

生脉饮对内毒素诱导急性肺损伤大鼠一氧化氮及其合酶的影响

何新华, 李春盛, 桂培春

(首都医科大学附属北京朝阳医院急诊科, 北京 100020)

【摘要】 目的:探讨一氧化氮(NO)和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在脂多糖(LPS)诱导大鼠急性肺损伤(ALI)中的作用及生脉饮对其的影响。方法:雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为对照组、ALI 组、生脉饮组、地塞米松组。舌下静脉注射 LPS 复制 ALI 模型。观察大体标本、组织病理以及肺湿/干重比、支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞比、蛋白含量、肺毛细血管通透性和肺泡通透性指数等生物学指标。测定血浆 NO 和肺组织匀浆 iNOS 活性。结果:与对照组比较,ALI 组肺组织病理显示肺间质及肺泡有明显的损伤和细胞浸润,各生物学指标及 NO 和 iNOS 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 ALI 组比较,地塞米松组和生脉饮组肺组织病理明显减轻,各生物学指标及 NO、iNOS 也相应下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:地塞米松和生脉饮两种药物对 LPS 诱导的 ALI 具有保护作用,其机制可能是通过抑制 NO 水平和 iNOS 活性实现。

【关键词】 一氧化氮;诱生型一氧化氮合酶;肺损伤,急性;内毒素;生脉饮;地塞米松

中图分类号:R256.1;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2006)03-0175-04

Effects of Shengmai drink (生脉饮) on nitric oxide and inducible nitric oxide synthase in rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide HE Xin-hua, LI Chun-sheng, GUI Pei-chun. Department of Emergency, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of Shengmai drink (生脉饮) on nitric oxide (NO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** The male Wistar rats were randomly divided into four groups: control group, ALI group, Shengmai drink group and dexamethasone group. LPS was injected into the sublingual vein of rats to prepare ALI models. Macroscopic and histopathological examinations were performed and biological indexes including lung wet weight/dry weight, the ratio of neutrophils and protein content in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), pulmonary vascular permeability and pulmonary alveolar permeability index were detected. Meanwhile, the activities of serum NO and lung tissue homogenate iNOS were measured. **Results:** Lung histopathological examination showed the injury and cellular infiltration in the pulmonary stroma and alveoli were more prominent in the ALI group than that in the control group. Lung wet weight/dry weight, the ratio of neutrophils and protein content in BALF, pulmonary alveolar permeability index, pulmonary vascular permeability were significantly increased, NO and iNOS were also markedly elevated in the ALI group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with ALI group, in the dexamethasone and Shengmai drink groups, the histopathological changes were significantly milder, and the above biological indexes of lung injury and the contents of NO and iNOS were correspondingly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** Dexamethasone and Shengmai drink have protective effect on LPS induced ALI and their therapeutic mechanism is possibly via inhibiting the activities of NO and iNOS.

【Key words】 nitric oxide; inducible nitric oxide synthase; acute lung injury; lipopolysaccharide; Shengmai drink; dexamethasone

脓毒症、严重创伤、大手术后等并发症的发生和致死原因主要是急性肺损伤(ALI),进而发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。革兰阴性杆菌脂多糖(LPS)介导的炎性细胞如单核细胞、巨噬细胞、中性

粒细胞,以及致伤内皮细胞产生释放的大量促炎因子、炎性介质、趋化因子、生长因子等在这些过程中起关键作用^[1]。具有信号转导和肺血管扩张作用的一氧化氮(NO)作为炎症介质参与了ALI复杂的病理生理过程^[2]。ALI发病机制复杂,目前还没有有效的治疗方法。医学先祖孙思邈《千金要方》中的生脉

作者简介:何新华(1967-),男(汉族),湖南人,医学硕士,副主任医师(Email:xhhe2000@yahoo.com.cn)。

饮组方,近年常被用于中毒性休克、心力衰竭(心衰)、慢性阻塞性肺疾病(COPD)等治疗,取得很好疗效。有鉴于此,本研究中探讨了 NO 和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在 LPS 诱导 ALI 中的作用机制及生脉饮的治疗作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:体重 200~350 g 的雄性 Wistar 大鼠 160 只,称重后麻醉,经舌下静脉注射 LPS(O55:B5, Sigma) 5 mg/kg,然后按随机数字表法分 4 组,每组 40 只。对照组舌下静脉注射生理盐水;ALI 组注射 LPS;生脉饮组在注射 LPS 前 1 h 腹腔内注射生脉饮提取液(本院中药制剂室提取,1 ml 含生药 1 g) 20 ml/kg;地塞米松组在注射 LPS 前 1 h 腹腔内注射地塞米松 70 mg/kg。每组大鼠均在注射生理盐水或 LPS 后 2 h 后活杀动物,并采集标本。

1.2 肺组织湿/干重比以及支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量和中性粒细胞比测定:开胸取出肺脏,称湿重后,置烤箱(80 ℃, 20 h)烤至恒重,称干重,计算湿/干重比;另一批大鼠,开胸后行肺泡灌洗,灌洗液在显微镜下进行细胞总数计数并分类。Lowry 法测定蛋白含量,计算肺泡通透指数(LPI, LPI=BALF 蛋白/血浆蛋白)。

1.3 肺毛细血管通透性变化:在注射 LPS 的同时股静脉注射伊文思蓝 50 mg/kg,将动物开胸取肺脏,剪去周围组织,将肺浸泡在甲酰胺溶液中(甲酰胺用量按动物体重给予,200 mg/kg)。置 45~50 ℃温箱中温育 72 h,待组织中色素全部浸出,取出组织,1 500 r/min(离心半径 5 cm),离心 10 min 后取上清液,用 72 型分光光度计在波长 620 nm 处进行比色,根据标准曲线计算伊文思蓝含量来反映肺血管通透性的变化。

1.4 血浆 NO 浓度测定:取血测血浆 NO 浓度,试剂盒购自邦定公司,按说明检测。

1.5 肺组织 iNOS 活性测定:大鼠断头,迅速取出左肺,按 1:5 加入预冷的提取液,冰水中匀浆,4 ℃ 20 000×g 离心 60 min,收集上清液(即 NOS 提取液),用 Lawrys 法测定 iNOS 提取液的蛋白浓度, H₃ 精氨酸转化实验测定提取液 NOS 活性,以 1 min 1 mg 蛋白生成 H₃ 瓜氨酸的量(pmol)表示。

1.6 组织学检查:取肺组织,经体积分数为 10% 的甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色后,用普通光学显微镜观察,并在此基础上再制成 1 mm³大小的肺组织块。用体积分数为 25% 的戊二

醛溶液固定,然后固定于体积分数为 1% 的 OSO₄ 固定液中,乙醇、丙酮脱水,经 Epon 81 包埋,制备超薄切片后,行铀-铅双重染色,用 Philips EM400T 型透射电镜观察。

1.7 统计学处理:应用 SPSS11.5 软件分析,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较用方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺湿/干重比、BALF 中性粒细胞比及蛋白含量变化(表 1):ALI 组肺湿/干重比、中性粒细胞比、蛋白含量均较对照组显著增加(*P* 均 < 0.01)。生脉饮组、地塞米松组治疗后肺湿/干重比、中性粒细胞比、蛋白含量均较 ALI 组显著降低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);与对照组比较有轻度升高;而两治疗组之间比较差异不显著。

表 1 各组肺湿/干重比和 BALF 中性粒细胞比、蛋白含量的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes in lung wet weight/dry weight, the ratio of PMN and protein content of BALF in ALI rats($\bar{x} \pm s$)

组别	肺湿/干重比	中性粒细胞比	蛋白含量(mg/g)
对照组	4.18±0.28(8)	0.233±0.098(8)	62.17±19.13(8)
ALI 组	4.47±0.14(8)**	0.492±0.085(8)**	240.33±109.67(8)**
地塞米松组	4.22±0.16(8)**	0.307±0.157(8)**	116.00±38.47(8)**
生脉饮组	4.32±0.15(8)**	0.346±0.134(8)**	117.20±48.30(8)**

注:与对照组比较:**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 ALI 组比较:
#*P* < 0.05,##*P* < 0.01;括号内为动物数

2.2 LPI 及肺毛细血管通透性的变化(表 2):ALI 组 LPI 及肺毛细血管通透性均显著高于对照组(*P* 均 < 0.01)。生脉饮组和地塞米松组两项指标均较 ALI 组明显下降(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),与对照组相比也有轻度升高(*P* 均 < 0.05);但两治疗组间差异不显著。

表 2 各组 LPI 和肺毛细血管通透性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of LPI and pulmonary vascular permeability among groups($\bar{x} \pm s$)

组别	LPI(×10 ⁻³)	肺毛细血管通透性(mg/L)
对照组	1.90±0.28(8)	2.70±0.78(8)
ALI 组	4.78±1.90(8)**	6.08±0.73(8)**
地塞米松组	2.88±0.19(8)**	3.90±0.78(8)**
生脉饮组	3.78±0.62(8)**	3.17±1.60(8)**

注:与对照组比较:**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 ALI 组比较:
#*P* < 0.05,##*P* < 0.01;括号内为动物数

2.3 血浆 NO 和肺组织 iNOS 的影响(表 3):ALI 组血清 NO 水平和肺组织 iNOS 活性均明显高于对

照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);应用生脉饮、地塞米松进行干预治疗后,其血浆 NO 水平及肺组织的 iNOS 活性较 ALI 组均明显降低(P 均 < 0.01);与对照组相比,血浆 NO 水平轻度降低(P 均 < 0.05),肺组织 iNOS 活性差异不明显。

表 3 各组血浆 NO 和肺组织 iNOS 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum NO and iNOS levels of lung tissues among groups($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆 NO($\mu\text{g/L}$)	肺组织 iNOS($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照组	2.10 \pm 0.34(16)	37.25 \pm 12.10(8)
ALI 组	3.16 \pm 0.88(16)*	109.87 \pm 50.28(8)**
地塞米松组	1.26 \pm 0.69(16)**	40.77 \pm 6.91(8)**
生脉饮组	1.49 \pm 1.07(16)**	40.84 \pm 10.00(8)**

注:与对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 ALI 组比较;

** $P < 0.01$;括号内为动物数

2.4 肺组织病理学改变

2.4.1 大体标本:LPS 致伤大鼠肺组织可见斑片状坏死,全肺充血;地塞米松及生脉饮治疗后肺表面充血程度较 ALI 组明显减轻,未见斑片状坏死;对照组肺组织未见异常。

2.4.2 光镜观察:ALI 组肺间质水肿,弥漫性出血,肺泡腔内可见大量红细胞渗出和中性粒细胞浸润,血浆蛋白渗出增多,形成透明膜,肺泡隔增厚;地塞米松组和生脉饮组肺组织渗出明显减少,中性粒细胞及红细胞渗出减少;对照组肺组织正常。

2.4.3 电镜观察:ALI 组肺血管内皮细胞损伤,肺泡上皮不完整;地塞米松组和生脉饮组肺血管内皮细胞较完整;对照组肺血管内皮细胞完整无损。

3 讨论

3.1 肺损伤形成:舌下静脉注射 LPS 后 2 h,大鼠出现了典型 ALI 表现。除了肺组织病理表现外,ALI 生物指标均较对照组明显升高。提示 ALI 组不仅出现血管内皮细胞受损,而且肺泡上皮也明显受损,由此导致大量蛋白和中性粒细胞等血管内容物渗漏到肺泡腔内,致使 BALF 中蛋白含量和中性粒细胞比显著升高,肺湿/干重比增加,这些变化符合 ALI 的病理变化^[3,4]。LPS 致 ALI 可能通过中性粒细胞在肺内聚集以及通过直接途径激活或损伤内皮细胞,后者在 LPS 刺激下释放产生白细胞介素、生长因子和 NO,表达黏附分子,引起内皮细胞骨架蛋白解聚和重组,细胞与细胞间、细胞与基底膜间的黏附连接松解,细胞间缝隙形成,最后导致微血管通透性升高^[5]。上述变化与李春盛等^[6,7]报道的结果相符。本实验中在电镜下观察到肺毛细血管内皮细胞受损这一病理改变,为其通透性增加、肺泡上皮及毛细血管

内皮屏障障碍提供了进一步证据。

3.2 NO 和 iNOS 的作用途径:NO 是内皮依赖性舒张因子的重要活性成分。正常肺组织内,NO 作为第二信使主要由 NOS 生成,NOS 有神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和 iNOS 3 种。前两者主要在气道上皮细胞、肺血管内皮细胞存在;后者主要对炎性细胞因子和 LPS 触发作出反应。NO 能调节血管张力,调节炎性细胞与内皮细胞间的相互作用,减少血小板聚集,抑制血小板、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞与内皮细胞的黏附,因而 NO 具有抗炎作用;另外,NO 也可抑制中性粒细胞在肺组织中聚集,维护肺血管内皮依赖性舒张功能^[5,8]。这些提示 NO 在减轻 ALI 时起到有益作用。

我们研究了 NO 和 iNOS 在 LPS 诱导大鼠 ALI 的作用,结果发现 NO 和 iNOS 较对照组显著升高,与之相一致的是代表肺泡和毛细血管屏障受损所致的 BALF 中蛋白浓度和中性粒细胞比也相应增加,肺湿/干重比、肺毛细血管通透性、LPI 均增加,这些肺损伤标志物的显著变化与肺组织病理学表现也相一致。与国内余追等^[9]报道内毒素性 ALI 时肺组织 iNOS mRNA 大量表达,导致内源性 NO 爆发式产生,从而介导肺损伤相一致。Enkhbaatar 等^[10]发现,肺组织严重损伤而产生炎症反应,炎症细胞因子诱发 iNOS mRNA 表达增加,使 NO 大量生成对细胞产生毒性作用。此外,在 NO 升高的同时伴有肺间质水肿、出血、大量炎症细胞浸润、肺泡结构破坏,可见 iNOS 诱导产生的大量 NO 参与肺损伤的病理生理过程^[11]。由此证明,iNOS 表达产生大量 NO 是导致肺损伤的主要发病机制。

3.3 生脉饮和地塞米松的作用途径:生脉饮方由人参、麦冬、五味子 3 味中药组成。其中:人参大补元气、固脱生津、安神,元气振奋则肺气旺,腠理固而阴液不致外泄,短气自汗诸症解;麦冬甘寒,养阴润肺、清心除烦、益胃生津;五味子酸温入肺、肾两经,敛肺生津而聚耗之气。三药相合,一补、一清、一敛,具有益气养阴、生津止渴、敛阴止汗之功,使气复津回,汗止而阴存。呼吸衰竭患者肺肾气阴极亏,心脉瘀滞,表现为呼吸困难、发绀、自汗、纳差、烦躁或嗜睡,舌质干红无苔,脉微等危症^[12]。

应用生脉饮和地塞米松对 LPS 诱导的 ALI 进行干预治疗,结果显示,两种药物均可使 ALI 的肺湿/干重比、BALF 中的中性粒细胞比、蛋白含量、LPI、肺毛细血管通透性等肺损伤标志均较 ALI 组明显改善,肺组织病理也相应较 ALI 组显著减轻。

与这些变化一致的是 NO 和 iNOS 也较 ALI 组显著降低。由此可以认为,两种药物对 LPS 导致的 ALI 具有保护和治疗作用。地塞米松为糖皮质激素,糖皮质激素对 LPS 诱导的致炎介质释放有强大的抑制作用^[13]。人参皂甙 Rg1 和 Rb1 含量较高,后两者具有降低细胞内钙而减少 NO 产生和 iNOS 活性的作用^[14,15]。由此推测,生脉饮对 ALI 的治疗机制可能与抑制 NO 水平和 iNOS 活性有关,但还需进一步深入研究。

综上所述,本研究证明 NO 和 iNOS 在 LPS 诱导的 ALI 发病过程中确实起到较为关键性的作用,生脉饮、地塞米松对 LPS 诱导的 ALI 具有保护作用,其机制可能是通过抑制 NO 水平和 iNOS 活性来实现的。

参考文献:

- [1] 冯英凯,杨庆华,徐剑铖,等. 炎症介质与内毒素肺损伤[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2004, 24: 329-333.
- [2] Wyncoll D L, Evans T W. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 1999, 354: 497-501.
- [3] Pittet J F, Mackersie R C, Martin T R, et al. Biological markers of acute lung injury; prognostic and pathogenetic significance [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: 1187-1205.
- [4] Uchiba M, Okajima K, Murakami K, et al. Endotoxin-induced pulmonary vascular injury is mainly mediated by activated neutrophils in rats [J]. Thromb Res, 1995, 78: 117-125.
- [5] Bloomfield G L, Holloway S, Ridings P C, et al. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute

- lung injury [J]. Crit Care Med, 1997, 25: 584-593.
- [6] 李春盛,何新华,桂培春. 大黄对急性肺损伤大鼠血浆和支气管肺泡灌洗液中炎症细胞因子表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12: 306-308.
- [7] 薛响,吴新民,张生锁,等. 内毒素预处理对大鼠急性肺损伤的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 361-363.
- [8] Pheng L H, Francoeur C, Denis M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome [J]. Inflammation, 1995, 19: 599-610.
- [9] 余追,许友芝,周晓阳,等. 大鼠急性肺损伤时 iNOS mRNA 和 eNOS mRNA 表达的时相变化 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2003, 24: 24-26.
- [10] Enkhbaatar P, Murakami K, Shimoda K, et al. The inducible nitric oxide synthase inhibitor BBS-2 prevents acute lung injury in sheep after burn and smoke inhalation injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167: 1021-1026.
- [11] Kutzsche S, Lyberg T, Bjertnaes L J, et al. Effects of adenosine on extravascular lung water content in endotoxemic pigs [J]. Crit Care Med, 2001, 29: 2371-2376.
- [12] 沈烈行,冯晓,高秀芝. 生脉饮药理作用与临床应用 [J]. 医药导报, 2003, 22: 634-635.
- [13] Meduri G U. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS; pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment [J]. Eur Respir J, 1996, 9: 2650-2670.
- [14] 张均田. 人参皂甙 Rg1 和 Rb1 药理作用的比较 [J]. 基础医学与临床, 2000, 20: 388-390.
- [15] 李刚,徐亚平,岳旭,等. 人参总皂甙对大鼠脑缺血时脑微血管及脑组织中一氧化氮合酶的影响及脑保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12: 140-143.

(收稿日期: 2006-02-08)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

2006 年第 14 届亚太危重病医学会议征文通知

由亚太危重病医学学会(Asia-Pacific Association of Critical Care Medicine, APACCM)主办,中国病理生理学会危重病医学专业委员会(Chinese Society of Critical Care Medicine, CSCCM)和中国科协承办的第 14 届亚太危重病医学大会,暨第 7 届全国危重病医学学术会议将于 2006 年 8 月 26—29 日在北京国际会议中心隆重召开。中国病理生理学会理事长、中国科学院院士韩启德教授任大会名誉主席。CSCCM 主任委员陈德昌教授任大会主席。本届大会将邀请欧美、亚太地区以及国内 50 余名知名学者就当今危重病医学领域热点问题作专题报告。会议主要内容涉及全身性感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性肾功能衰竭、液体复苏与组织灌注、微循环、机械通气、持续肾脏替代治疗、营养支持、神经功能评价与支持及伦理学等。大会前, CSCCM 将进行全国委员会的换届选举工作,同时还安排专题讲座、大会发言及墙报,充分展示近年来危重病医学领域的重要进展,会议还设立了优秀青年论文奖。

本次国际会议已经建立英文网站,论文摘要征集已开始,希望国内学者踊跃投稿,在本届大会上充分展示我国危重病医学工作者的风貌,并积极与会,参与新一届学会的组织建设工作,进一步推动我国危重病医学事业的蓬勃发展。

欧洲危重病医学学会(ESICM)和美国危重病学会(SCCM)将于 2006 年 8 月 24—26 日举办会前培训课程,内容:①危重病入紧急事件处理培训课程;②危重病医学基础培训(FCCS);③灾难医学救治基础(FDM, SCCM)。结业时将由上述学会分别颁发相应证书。

组委会联系人:马朋林, Email: plma1019@yahoo.com; 电话: 010-66775088(办)。论文投稿联系人:李志强, Email: dubin@apaccm2006.org.cn; 电话: 010-88062211(办)。本次会议网页: <http://www.apaccm2006.org.cn>。

(亚太危重病医学会议组委会)