

· 论著 ·

丹参注射液对“二次打击”急性肺损伤大鼠的保护作用

蔡婷婷¹, 黄小民², 何煜舟², 汪云开²

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省中医院急诊科, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的: 观察丹参注射液对急性肺损伤(ALI)大鼠的治疗作用及其机制。方法: Wistar 大鼠 30 只, 被随机分为正常组、模型组及丹参干预组, 每组 10 只。采用“二次打击”的方法复制 ALI 大鼠模型, 即从尾静脉注入油酸(OA)0.2 ml/kg, 4 h 后再从尾静脉注入脂多糖(LPS)2 mg/kg。注射 OA 前 1 h 经腹腔注射丹参注射液 12 ml/kg 作为干预措施。观察支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量、肺脏的大体及镜下病理改变, 以及肺组织湿/干重(W/D)比值, 并测定肺组织中一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的变化。结果: “二次打击”法可成功复制出 ALI 大鼠模型。与模型组相比, 丹参干预组 BALF 中蛋白含量、肺组织 W/D 比值和 MDA、NO 水平均明显降低(P 均 <0.01), 而肺组织 SOD、GSH-Px 活性则明显升高(P 均 <0.01), 并且丹参干预组可明显减轻“二次打击”所致的肺组织病理改变。结论: 丹参注射液通过抗氧化作用、调整氧化/抗氧化平衡, 对 ALI 大鼠具有较好的保护作用。

【关键词】 丹参注射液; 肺损伤, 急性; 氧化应激

中图分类号: R285.5; R278 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)01-0029-04

Protective effects of radix salviae miltiorrhizae injection (丹参注射液) on rats with acute lung injury induced by "two hits" CAI Ting-ting¹, HUANG Xiao-min², HE Yu-zhou², WANG Yun-kai². 1. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China; 2. Department of Emergency, Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China
Corresponding author: HUANG Xiao-min (Email: MXH251770@yahoo.com)

【Abstract】 Objective: To observe the effect and mechanism of radix salviae miltiorrhizae (RSM) injection (丹参注射液) on rats with acute lung injury (ALI) induced by "two hits". **Methods:** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, model group and RSM treatment group (each $n=10$). The ALI model was induced by "two hits": 0.2 ml/kg oleic acid (OA) was injected into one tail vein, and 2 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) was injected into the vein 4 hours later. One hour before the injection of OA, 12 ml/kg RSM injection was injected into the peritoneal cavity as the pretreatment measure. Then, the content of protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the general and pathological changes of rat lungs were observed, and the wet and dry weight ratio (W/D) of lung was calculated. In addition, the concentrations of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA), the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in lung tissues were measured by the method of colorimetry. **Results:** ALI was obviously observed in the model group. In model group, the activities of SOD and GSH-Px were decreased significantly (both $P<0.01$), however, the content of protein in BALF, the MDA, NO contents in lung tissues, and W/D of lung were increased markedly compared with those of RSM group (all $P<0.01$), and the pathological changes of the lungs induced by "two hits" were also ameliorated in RSM treatment group. **Conclusion:** RSM injection has protective effect on ALI in rats by anti-oxidation and adjusting oxidation/anti-oxidation balance.

【Key words】 radix salviae miltiorrhizae injection; acute lung injury; oxidative stress

急性肺损伤(ALI)是由于心源性以外的各种肺内、肺外致病因素导致的急性、进行性、缺氧性呼吸

衰竭。ALI 的严重阶段即急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[1], 其基本特征是肺内微血栓的形成和大量白细胞浸润, 有致病因素多样性和高病死率的特点。ALI 的病因各不相同, 发病机制复杂, 但在肺内聚集的大量中性粒细胞被激活, 经“呼吸爆发”产生大量氧自由基和活性氧(ROS)引起氧化应激状态; 被认为在 ALI 的发生发展中具有重要作用^[2]。丹参

基金项目: 浙江省卫生厅基金项目(2006A086)

通讯作者: 黄小民, 教授, 主任医师 (Email: MXH251770@yahoo.com)

作者简介: 蔡婷婷(1981-), 女(汉族), 浙江省人, 硕士研究生 (Email: lingting711@163.com)。

作为活血化瘀中药已用于临床治疗急性黄疸型肝炎、肺源性心脏病、中风先兆、肾小球疾病等,并取得了很好的疗效^[3,4],但有关丹参注射液用于治疗 ALI 的报道较少。本研究中采用尾静脉注射油酸(OA)和脂多糖(LPS)制备大鼠 ALI 模型^[5,6],模拟临床 ALI 的发展进程,并应用丹参注射液进行治疗,观察肺组织一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的变化,探讨丹参注射液是否通过氧化应激起到对 ALI 的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验材料:雌性清洁级健康 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,购自浙江中医药大学实验动物中心;OA(分析纯)购自华东医药公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;丹参注射液生药含量为 1.5 g/ml;MDA、SOD、GSH-Px 试剂盒均购自南京建成生物工程公司。

1.2 ALI 大鼠模型制备及分组:按随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组和丹参干预组,每组 10 只。用戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉;模型组麻醉后以 OA 0.2 ml/kg 从尾静脉注入,4 h 后用 LPS 2 mg/kg 再次从尾静脉注入;正常组以等量生理盐水代替 OA 和 LPS;丹参干预组在给予 OA 前 1 h 经腹腔注射丹参注射液 12 ml/kg。各组动物在第二次打击后 2 h 被处死。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 支气管肺泡灌洗液(BALF)中各指标测定:将动物开胸,每次用 3 ml 的磷酸盐缓冲液(PBS)灌洗左肺,共 3 次,合并 3 次收集到的 BALF 冻存待测。BALF 中蛋白含量测定用考马斯亮蓝法,操作按试剂盒说明书要求进行。

1.3.2 肺湿/干重(W/D)比值:用滤纸吸去右肺上叶血,称湿重后,置烤箱中(80℃,20 h)烤至恒重,称干重,计算肺 W/D 比值。

1.3.3 肺组织学检查:先观察肺脏大体改变;然后取右肺下叶经体积分数为 10%的甲醛固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.3.4 肺组织 NO 含量测定:制备体积分数为 10%的肺组织匀浆,2 500 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,收集上清液。采用硝酸还原酶法测定 NO 含量,操作按试剂盒说明书要求进行。

1.3.5 肺组织氧化/抗氧化指标检测:制备成 10%的肺组织匀浆,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min 后,取上清液测定 MDA(硫代巴比妥酸比色

法)、SOD(黄嘌呤氧化酶法)、GSH-Px(二硫代二硝基苯甲酸法)水平,匀浆中总蛋白含量测定用双缩脲法,操作按试剂盒说明书要求进行。

1.4 统计学方法:应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 BALF 中蛋白含量(表 1):模型组 BALF 中蛋白含量显著高于正常组($P < 0.01$),丹参干预组蛋白含量较模型组显著降低($P < 0.01$),但接近正常组水平($P > 0.05$)。

2.2 肺 W/D 比值(表 1):模型组 W/D 比值明显高于正常组($P < 0.01$),丹参干预组 W/D 比值较模型组显著降低($P < 0.01$),但接近正常组水平($P > 0.05$)。

表 1 3 组 BALF 中蛋白含量及肺 W/D 比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the protein content in BALF and W/D of lung in three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	BALF 中蛋白(g/L)	肺 W/D
正常组	10	102.47±17.45	4.20±0.31
模型组	10	240.36±47.17 ^{△△}	5.48±0.28 ^{△△}
丹参干预组	10	116.51±12.85 ^{**}	4.47±0.30 ^{**}

注:与正常组比较;^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较;^{**} $P < 0.01$

2.3 肺脏大体及光镜下病理改变

2.3.1 大体改变:正常组双侧肺脏色泽、形态正常,表面无出血点,胸腔内无渗出液;模型组可见双侧肺叶充血水肿,肺叶色泽呈暗红色,肺脏表面可见紫红色斑块,且胸腔内渗出液可呈淡血性;丹参干预组双侧肺叶轻度充血,肺脏表面呈淡粉红色,局部肺叶表面可见暗红色的出血点,肺叶弹性良好,胸腔内部分可见少量淡黄色稀薄的渗出液。

2.3.2 镜下改变:正常组绝大部分肺组织结构正常,仅可见极少部分的肺间质及肺泡壁轻度水肿,并有少量炎性细胞浸润(彩色插页图 1A);而模型组则可见明显肺间质及肺泡腔水肿,渗出液量多,腔内可见较多溢出的红细胞,肺泡壁间质增厚,毛细血管扩张、淤血,肺泡间隔明显增宽,并且有较多的炎性细胞浸润(彩色插页图 1B);丹参干预组肺泡壁毛细血管扩张、淤血程度较模型组轻,仅见少部分的肺间质及肺泡腔水肿,肺泡腔内红细胞等渗出物也明显减少,肺泡间隔仅为轻度增宽,可见少量的炎性细胞浸润(彩色插页图 1C)。

2.4 肺组织氧化/抗氧化指标

2.4.1 肺组织 NO 和 MDA 含量的比较(表 2):模型组 NO 和 MDA 含量均显著高于正常组(P 均 <

表 2 3 组肺组织 NO、MDA、SOD 和 GSH - Px 水平比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of NO, MDA, SOD and GSH - Px levels of lung tissues in three groups($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	NO($\mu\text{mol/g}$)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH - Px(U/g)
正常组	10	0.66±0.08	0.94±0.24	143.86±8.63	70.40±9.34
模型组	10	0.79±0.10 $\Delta\Delta$	2.73±0.64 $\Delta\Delta$	99.99±9.11 $\Delta\Delta$	42.13±8.00 $\Delta\Delta$
丹参干预组	10	0.63±0.10**	1.39±0.37**	121.16±7.46**	61.41±5.85**

注:与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$

0.01);而丹参干预组 NO 和 MDA 含量升高程度不明显,接近正常组水平(P 均 > 0.05),但显著低于模型组(P 均 < 0.01)。

2.4.2 肺组织 SOD 和 GSH - Px 活性的比较(表 2);模型组 SOD 和 GSH - Px 活性均较正常组显著降低(P 均 < 0.01);而丹参干预组 SOD 和 GSH - Px 活性下降程度不明显,接近正常组水平(P 均 > 0.05),但显著高于模型组(P 均 < 0.01)。

3 讨论

关于 ALI 的发病机制,目前公认的关键环节是多种炎性细胞参与的肺脏局部炎症反应和炎症反应失控所致的肺毛细血管损伤。近年发现 NO 参与了炎症性疾病^[7],NO 是近年来发现的体内一种新型信号分子、炎症介质和免疫调节因子,生理状态下,肺组织内源性 NO 具有舒张血管、气管作用;但病理过程中过量生成的 NO 在 ALI 发生发展过程中起损伤作用^[8,9];一定剂量的 NO 对改善 ALI 时的炎症反应具有显著作用^[10]。本实验中模型组 NO 含量明显高于正常组,结果与上述观点一致。

ALI 时中性粒细胞等炎性细胞在组织中浸润以及细胞氧化损伤对其发生发展起重要作用^[11]。机体中氧化反应可产生超氧阴离子、过氧化氢、羟自由基等各种 ROS 成分。在正常情况下,体内存在着作为清除系统的 SOD、GSH - Px、过氧化氢酶等抗氧化酶系统以及谷胱甘肽、硫氧化还原蛋白、维生素 E 等抗氧化物质,共同维持内环境稳态;同时,ROS 在正常机体内不断地产生,发挥着杀灭微生物、清除衰老死亡细胞和肿瘤细胞以及调节炎症反应等一定的生理作用。在氧化应激情况下,体内总 ROS 的生成超过抗氧化系统的防御能力,作为氧自由基代谢产物 MDA 含量的高低可间接反映氧自由基的水平。本实验中模型组 SOD、GSH - Px 活性均明显低于正常组,MDA 含量明显高于正常组。从以上这些氧化/抗氧化指标的变化可以看出,氧化应激对 ALI 有重要的影响。

丹参是一种常用的活血化瘀中药,其化学成分有脂溶性的二萜醌和水溶性的酚性酸两类。丹参的

水溶性部分具有抗炎、抗白细胞趋化和聚集等作用^[12],对多种细胞因子的分泌具有调节作用,而且这种调节作用具有双相性^[13]。本实验中丹参干预组 BALF 蛋白含量明显少于模型组,肺 W/D 比值明显小于模型组,肺脏大体及病理光镜检查炎性细胞浸润、肺间质充血水肿情况较模型组有改善,证实丹参注射液对 ALI 大鼠具有治疗作用;且丹参干预组 SOD、GSH - Px 活性明显高于模型组,MDA 含量明显低于模型组,提示丹参可能具有抗氧化作用。

参考文献:

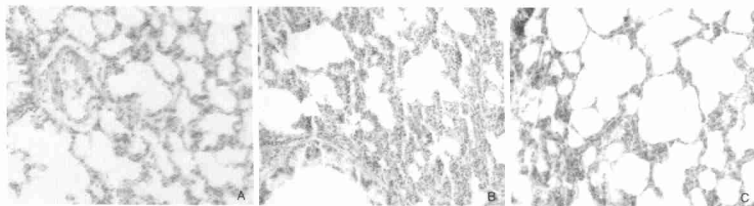
- [1]钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志,1999,24(5):313-316.
- [2]王焯,袁秀红,郭德玉,等. 急性肺损伤家兔早期中性粒细胞相关功能的变化研究[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(7):403-408.
- [3]黄宝英,林应华. 活血化瘀中药治疗急性黄疸型肝炎的探讨[J]. 中国中西医结合急救杂志,1997,4(4):184-185.
- [4]曹元成,马英玲. 丹参的多种临床应用[J]. 中国中西医结合急救杂志,1994,1(1):20.
- [5]Ottonello L, Arduino N, Bertolotto M, et al. In vitro inhibition of human neutrophil histotoxicity by ambroxol: evidence for a multistep mechanism[J]. Br J Pharmacol, 2003, 140(4): 736-742.
- [6]李琦,钱桂生,张青,等. 油酸-内毒素序贯致伤引起大鼠急性肺损伤的特点[J]. 第三军医大学学报,2004,26(10):856-858.
- [7]Atheldal S M, Smith C W, Wang P A. Adhesion molecules and inflammatory injury[J]. FASEB J, 1994, 8: 504-512.
- [8]Lee, R P, Wang D, Kao S J, et al. The lung is major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2001, 28(4): 315-320.
- [9]Arkovitz M S, Wispe J R, Garcia V F, et al. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular flux during acute endotoxemia[J]. J Pediatr Surg, 1996, 31(8): 1009-1015.
- [10]杨毅,邱海波,周韶霞,等. 吸入一氧化氮对急性肺损伤小鼠肺组织炎症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学,2002,14(12): 723-727.
- [11]曹慧玲,吕士杰,姜艳霞,等. 急性肺损伤大鼠氧自由基变化及不同中药治疗作用的对比[J]. 中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):146-149.
- [12]张白嘉,刘榴. 丹参水溶部分药理研究进展[J]. 中草药,1996,27(10):634-636.
- [13]王文俊,吴威中,姚智,等. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎性细胞因子的调节[J]. 中国免疫学杂志,1995,11(6):370-372.

(收稿日期:2006-12-12 修回日期:2007-01-13)

(本文编辑:李银平)

丹参注射液对“二次打击”急性肺损伤大鼠的保护作用

(正文见29页)

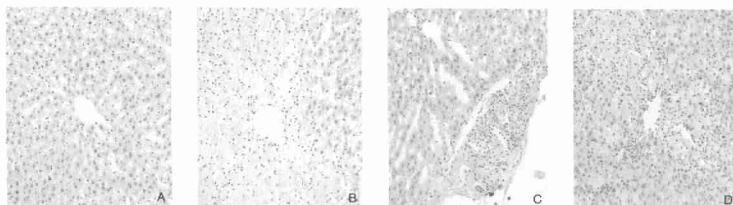


A: 正常组; B: 模型组; C: 丹参干预组
图1 3组肺组织病理变化(HE, $\times 400$)

Figure 1 Change of pathology of lung tissues in three groups (HE, $\times 400$)

维拉帕米和生脉注射液抗大鼠 肝脏缺血/再灌注损伤的作用研究

(正文见35页)



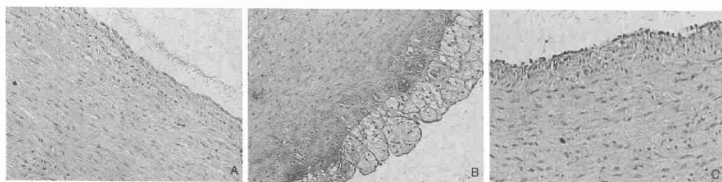
A: 假手术组; B: I/R组; C: 维拉帕米组; D: 生脉注射液组

图2 各组大鼠肝组织病理学改变(HE, $\times 100$)

Figure 2 Change of pathology of rats liver tissues in each group (HE, $\times 100$)

冠心康颗粒对高同型半胱氨酸血症致兔动脉粥样硬化 作用的实验研究

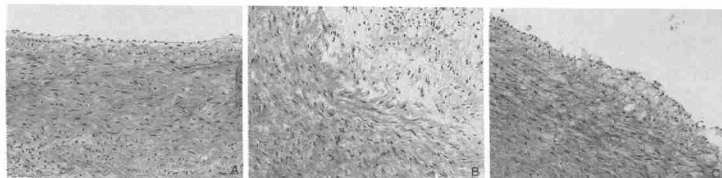
(正文见51页)



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 冠心病治疗组

图2 3组主动脉内皮细胞NF- κ B p65蛋白的表达(免疫组化, $\times 100$)

Figure 2 Expression of NF- κ B p65 protein of endothelial cells in three groups (immunohistochemistry, $\times 100$)



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 冠心病治疗组

图3 3组主动脉病理形态学观察(HE, $\times 100$)

Figure 3 Observation of pathomorphology of aorta in three groups (HE, $\times 100$)