

清热燥湿方对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子- κ B 蛋白及 mRNA 表达的影响

阮 琼¹, 汪东颖², 杨爱东², 李文雯², 吴中华², 郭永洁², 王利霞²

(1. 上海市第八人民医院急诊科, 上海 200233; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨清热燥湿方对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白及 mRNA 表达的影响。方法 40 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法均分为对照组、模型组、地塞米松组、清热燥湿方组 4 组。地塞米松和清热燥湿方在 LPS 诱导 ALI 模型前预处理 3 d。分别于制模后 4 h 和 8 h 采用免疫组化法和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 NF- κ B 的蛋白及 mRNA 表达, 并进行肺组织病理观察。结果 与模型组相比, 地塞米松组和清热燥湿方组 4 h、8 h NF- κ B 蛋白染色阳性面积率[4 h: (3.40 $\pm$ 0.39)%, (2.59 $\pm$ 0.62)% 比 (4.28 $\pm$ 0.55)% ; 8 h: (3.04 $\pm$ 0.74)%, (2.60 $\pm$ 0.11)% 比 (4.20 $\pm$ 0.62)%] 及 mRNA 表达[4 h: (12.88 $\pm$ 2.28) $\times 10^{-4}$, (3.07 $\pm$ 2.63) $\times 10^{-4}$ 比 (44.82 $\pm$ 9.27) $\times 10^{-4}$; 8 h: (3.30 $\pm$ 2.64) $\times 10^{-4}$, (1.53 $\pm$ 1.51) $\times 10^{-4}$ 比 (26.07 $\pm$ 3.81) $\times 10^{-4}$] 均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。光镜下观察, 模型组大鼠肺组织出现大片出血及坏死, 清热燥湿方组大鼠肺组织病理损伤程度较模型组减轻。结论 清热燥湿方能减轻内毒素致 ALI 大鼠肺组织损伤, 对肺损伤有保护作用, 其机制可能与其能降低损伤肺组织 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达有关。

【关键词】 清热燥湿方; 急性肺损伤; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.02.007

Effect of Qingre Zaoshi decoction (清热燥湿方) on lung expressions of nuclear factor- κ B protein and mRNA in rats with acute lung injury caused by lipopolysaccharide RUAN Qiong*, WANG Dong-ying, YANG Ai-dong, LI Wen-wen, WU Zhong-hua, GUO Yong-jie, WANG Li-xia. * Department of Emergency, Shanghai 8th People's Hospital, Shanghai 200233, China
Corresponding author: YANG Ai-dong, Email: aidongy@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Qingre Zaoshi decoction (清热燥湿方) on lung expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein and mRNA in rats with acute lung injury (ALI) caused by lipopolysaccharide (LPS). Methods Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups: normal control, LPS model, dexamethasone and Qingre Zaoshi decoction groups. The rats in dexamethasone group and Qingre Zaoshi decoction group were pretreated by dexamethasone or Qingre Zaoshi decoction respectively for 3 days before the establishment of LPS-induced ALI. The animals were sacrificed 4 hours and 8 hours after model formation, and then the expression of NF- κ B protein was measured by immunohistochemistry ABC, the expression of NF- κ B mRNA was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), while the histopathology of the lung injury was observed by light microscope. Results Compared with model group, the expressions of NF- κ B protein positive area rate [4 hours: (3.40 $\pm$ 0.39)%, (2.59 $\pm$ 0.62)% vs. (4.28 $\pm$ 0.55)%; 8 hours: (3.04 $\pm$ 0.74)%, (2.60 $\pm$ 0.11)% vs. (4.20 $\pm$ 0.62)%] and mRNA [4 hours: (12.88 $\pm$ 2.28) $\times 10^{-4}$, (3.07 $\pm$ 2.63) $\times 10^{-4}$ vs. (44.82 $\pm$ 9.27) $\times 10^{-4}$; 8 hours: (3.30 $\pm$ 2.64) $\times 10^{-4}$, (1.53 $\pm$ 1.51) $\times 10^{-4}$ vs. (26.07 $\pm$ 3.81) $\times 10^{-4}$] in the lung tissue were obviously decreased in dexamethasone group and Qingre Zaoshi decoction group at 4 hours and 8 hours ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Light microscope observation indicated that there were large areas of pulmonary hemorrhage and necrosis in the model group, while in the Qingre Zaoshi decoction group, the pathological manifestations were much more ameliorated than those of the model group. Conclusion Qingre Zaoshi decoction lessens the injury of lung tissues and has the protective effect on rats with ALI induced by LPS; the mechanism is possibly related to the inhibition of the expressions of NF- κ B protein and mRNA in injured lung tissues.

【Key words】 Qingre Zaoshi decoction; Acute lung injury; Nuclear factor- κ B

核转录因子- κ B(NF- κ B)广泛存在于细胞中, 具有多种转录调节作用, NF- κ B 活化后可启动和调控促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介

素-8(IL-8)及黏附分子等一系列参与炎症反应的炎症因子基因表达, 介导急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)的发生^[1-2]。本课题组前期研究表明, 清热燥湿方对内毒素休克肺有保护作用, 其机制可能与调控肺组织 NF- κ B p65 表达有关^[3]。在此基础上, 本研究中观察了清热燥湿方对内毒素致 ALI 大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达的影响, 旨

基金项目: 上海市教委高水平特色发展项目[沪教委财(2005)81号]; 上海市高等学校科学技术发展基金项目(04CB17)

通信作者: 杨爱东, Email: aidongy@126.com

作者简介: 阮 琼(1969-), 女(汉族), 湖北省人, 医学硕士, 主治医师。

在寻求有效的临床用药及探讨清热燥湿方的作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、药品:Wistar 雄性大鼠 40 只,体重(220±20) g,由上海中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(沪)2007-005。大肠杆菌脂多糖(LPS, O111:B4)购自美国 Sigma 公司;NF- κ B p65 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;NF- κ B p65 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 生物技术公司,批号:SC-114。大鼠 NF- κ B、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物和探针序列由广州达辉生物技术有限公司合成,引物序列:NF- κ B 上游引物 5'-CTA CAC CGA AGC AAT TGA AGT GA-3',下游引物 5'-CAG CGA GTG GGC CTG AGA-3',探针序列:5'-AGGCAGCCT CCAGCCAGTGA-3';GAPDH 上游引物 5'-CCG AGG GCC CAC TAA AGG-3',下游引物 5'-GCT GTT GAA GTC ACA GGA GAC AA-3',探针序列:5'-CATCCTGGGCTACACTGAGGA CCA-3'。TRIzol 总 RNA 提取试剂、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增所需的酶及其他试剂均购自美国 Invitrogen 公司。清热燥湿方由厚朴、黄芩、草果、槟榔等中药按一定比例组成,浓缩成含生药 1 g/ml 的水煎液,高温高压灭菌,4℃冷藏备用。中药饮片均购自上海曙光医院东院。

1.2 动物分组、制模及给药:按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、地塞米松组、清热燥湿方组,每组再分为制模后 4 h 和 8 h 两个亚组。除对照组外,其余各组大鼠均经尾静脉注射 10 mg/kg 的 LPS 复制 ALI 模型^[4-5]。地塞米松组、清热燥湿方组在制模前给予地塞米松 0.45 mg/kg 或清热燥湿方 6.48 g/kg,每日 2 次,连续灌胃 3 d。对照组和模型组灌胃等量蒸馏水。

1.3 检测指标及方法:各组动物于制模后 4 h 和 8 h 用乌拉坦 1.0 g/kg 腹腔麻醉。开胸分离右肺上叶,用体积分数为 10% 的甲醛水溶液固定,用于病理观察及肺组织 NF- κ B 蛋白表达检测;取右肺下叶置于液氮中,用于 NF- κ B mRNA 表达检测。

1.3.1 肺体指数测定:肺体指数以肺重与大鼠体重的比值表示。

1.3.2 肺组织 NF- κ B 蛋白含量的检测:采用免疫组化法检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.3.3 肺组织 NF- κ B mRNA 表达的检测:采用 RT-PCR 法。按 TRIzol 法提取总 RNA,逆转录合成

cDNA;在 50 μ l 反应体系中加入 cDNA 5 μ l、ddH₂O 水 32 μ l、PCR 缓冲液 5×10 μ l、荧光探针 0.5 μ l、Taq DNA 聚合酶 1 μ l、dNTPs 0.5 μ l、NF- κ B 上、下游引物各 0.5 μ l 进行 PCR 扩增。扩增条件:93℃ 2 min;93℃ 45 s、55℃ 1 min,10 个循环;93℃ 30 s、55℃ 45 s,30 个循环。采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS 软件进行数据分析。NF- κ B mRNA 表达水平以 NF- κ B mRNA 与内参照 GAPDH 的相对表达量来表示。

1.3.4 肺组织病理观察:制备肺组织标本,常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理改变。

1.4 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件,计量数据以均数±标准差($\bar{x}$ ±s)表示,采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺体指数改变(表 1):与对照组相比,模型组 4 h、8 h 大鼠肺体指数显著升高($P<0.01$ 和 $P<0.05$);与模型组相比,地塞米松组和清热燥湿方组 4 h、8 h 大鼠肺体指数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),但两组间差异无统计学意义。

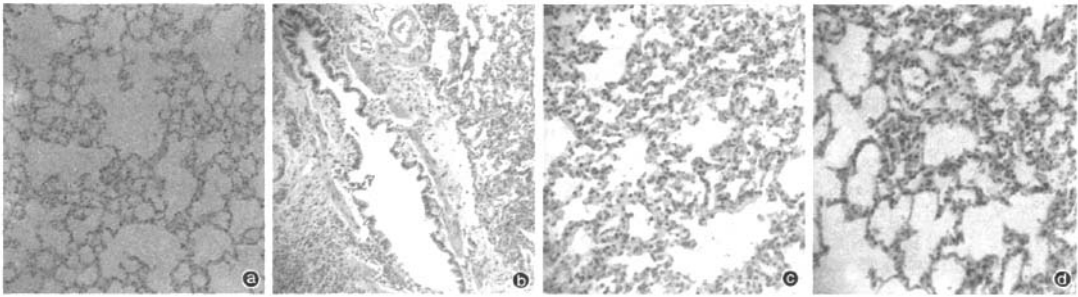
2.2 大鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达(表 1):模型组肺泡壁明显增宽,可见炎性细胞大量增生,肺泡上皮损伤明显,肺泡腔有较多渗出液及脱落坏死细胞,肺泡壁和细支气管壁散在分布大量的 NF- κ B p65 阳性细胞,以胞核着色为主,8 h 更为严重。地塞米松组可见局灶性病灶,表现为肺泡壁明显增宽,炎性细胞增生,肺泡腔内无明显水肿液,肺泡壁和肺泡腔散在分布 NF- κ B p65 阳性细胞,胞质和胞核内均有着色,以 8 h 较轻。清热燥湿方组肺泡壁较模型组明显变薄,炎性细胞消退明显,肺泡腔内无水肿液,散在分布 NF- κ B p65 阳性细胞,以胞质着色多见,仅少量细胞核着色,以 8 h 较轻。与对照组相比,模型组 4 h、8 h NF- κ B p65 蛋白染色阳性面积率均显著增高(均 $P<0.01$);与模型组相比,地塞米松组和清热燥湿方组 NF- κ B p65 蛋白染色阳性面积率均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且清热燥湿方组 4 h 较地塞米松组降低明显($P<0.05$)。

2.3 大鼠肺组织 NF- κ B mRNA 表达(表 1):与对照组相比,模型组 4 h、8 h NF- κ B mRNA 表达均明显升高(均 $P<0.01$)。与模型组相比,地塞米松组和清热燥湿方组 4 h、8 h NF- κ B mRNA 表达均明显降低(均 $P<0.01$);且清热燥湿方组较地塞米松组降低更为明显,但两组间比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 1 各组 ALI 大鼠肺体指数及肺组织 NF-κB 蛋白、mRNA 表达的变化比较(̄x±s)

组别	动物数	肺体指数(×10 ⁻³)		NF-κB 蛋白染色阳性面积率(%)		NF-κB mRNA(×10 ⁻⁴)	
		制模 4 h	制模 8 h	制模 4 h	制模 8 h	制模 4 h	制模 8 h
对照组	10	7.57±0.68	7.31±0.13	2.79±0.79	2.79±0.79	4.26±2.76	4.26±2.76
模型组	10	11.18±0.81 ^b	10.61±1.12 ^a	4.28±0.55 ^b	4.20±0.62 ^b	44.82±9.27 ^b	26.07±3.81 ^b
地塞米松组	10	8.17±0.73 ^d	8.51±0.57 ^c	3.40±0.39 ^c	3.04±0.74 ^d	12.88±2.28 ^d	3.30±2.64 ^d
清热燥湿方组	10	8.55±0.34 ^d	7.14±3.12 ^c	2.59±0.62 ^d	2.60±0.11 ^d	3.07±2.63 ^d	1.53±1.51 ^d

注:与对照组比较,^a*P*<0.05,^b*P*<0.01;与模型组比较,^c*P*<0.05,^d*P*<0.01;与地塞米松组比较,^e*P*<0.05



④:对照组(×200); ⑤:模型组(×400); ⑥:地塞米松组(×400); ⑦:清热燥湿方组(×400)

图 1 光镜下观察各组 ALI 大鼠肺组织病理改变(HE)

2.4 各组大鼠肺组织病理观察(图 1):光镜下观察,对照组大鼠肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡内未见水肿液,肺间质无炎性细胞浸润。模型组大鼠肺泡腔内充满炎性渗出物和出血,肺泡壁毛细血管扩张、充血,细支气管黏膜上皮损伤部分脱落,管壁上大量淋巴细胞浸润,管壁增厚,可见肺不张、肺气肿。清热燥湿方组和地塞米松组局部肺泡壁毛细血管扩张、充血,肺泡腔内见红细胞和少量渗出物。

3 讨论

正常状态下,NF-κB 与其抑制蛋白(IκB)相结合,以非活化形式存在于细胞质内。当细胞受到多种细胞内/外信号刺激时,IκB 发生磷酸化并降解,与 NF-κB 解离,使 NF-κB 暴露出核定位信号并迅速从细胞质移位到细胞核,在核内与目的基因上的 κB 位点特异性结合,促进相关基因的转录,引起一系列炎症反应^[6]。因此,NF-κB 是多种促炎症基因高度转录的必需因子,在 ALI 炎症反应机制的启动过程中起着至关重要的作用^[7]。NF-κB 的活化还有调节细胞凋亡的作用,能够抑制中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等炎性细胞的凋亡,导致炎性细胞数量异常增加,释放大量的炎症介质,加重肺组织损伤^[8]。可见 NF-κB 的不适当激活在病理性炎症过程中起关键作用,因此,NF-κB 可作为一个潜在的治疗靶点来减轻组织损伤。直接针对 NF-κB 的异常激活,而不是对各个细胞因子分而治之,将会产生更好的治

疗效果^[2]。

本实验结果表明,模型组大鼠肺组织出现大片出血及坏死,提示制模成功。用清热燥湿方预处理能使 LPS 诱导的 ALI 肺组织水肿、出血等损伤程度明显减轻,肺组织 NF-κB 蛋白及 mRNA 表达均明显降低。表明清热燥湿方对内毒素致大鼠 ALI 有保护作用,其机制可能与其能降低内毒素致 ALI 大鼠肺组织 NF-κB 蛋白及 mRNA 的表达有关。

参考文献

[1] 路小光,战丽彬,刘伟光,等. 大黄附子汤对重症急性胰腺炎肺损伤大鼠肺组织 Toll 样受体 4/核转录因子-κB 的影响. 中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):14-17.

[2] 王进,杨光田,乔礼芬,等. 醒脑静注射液对内毒素诱导大鼠肺巨噬细胞核转录因子-κB 激活和细胞因子产生的影响. 中国中西医结合急救杂志,2008,15(4):212-215.

[3] 杨爱东,屠燕捷,郭永洁,等. 不同治法对内毒素性休克小鼠多器官功能障碍和肺 NF-κB 表达的影响. 江苏中医药,2009,41(2):71-73.

[4] 张青,李琦,毛宝麟,等. 内毒素致伤大鼠肺组织促炎与抗炎细胞因子 mRNA 表达的时相性研究. 中国危重病急救医学,2004,16(10):585-588.

[5] Kao SJ, Wang D, Lin HI, et al. N-acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin. Clin Exp Pharmacol Physiol,2006,33(1-2):33-40.

[6] Xiao W. Advances in NF-kappa B signaling transduction and transcription. Cell Mol Immunol,2004,1(6):425-435.

[7] Christman JW,Sadikot RT,Blackwell TS. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases. Chest,2000,117(5):1482-1487.

[8] 何杰明,郝青林. 细胞因子与急性肺损伤研究进展. 医学综述,2009,15(3):385-389.

(收稿日期:2010-01-04)

(本文编辑:李银平)