

• 论著 •

# 清热燥湿方对急性肺损伤大鼠中性粒细胞弹性蛋白酶和肿瘤坏死因子-α 蛋白及 mRNA 的影响

杨爱东, 汪东颖, 李文雯, 吴中华, 郭永洁, 庞慧芳, 王利霞

(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)大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)和肺组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)蛋白及 mRNA 表达的影响。方法 将 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、清热燥湿方组, 每组再分为 4 h 和 8 h 两个亚组, 每个亚组 5 只。尾静脉注射 LPS 10 mg/kg 制备大鼠 ALI 模型。地塞米松组和清热燥湿方组分别于制模前灌胃地塞米松 0.45 mg/kg 和清热燥湿方 6.48 g/kg。分别采用酶联免疫吸附法、免疫组化法及实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 NE 含量和 TNF-α 蛋白及 mRNA 的表达; 同时进行肺组织病理观察。结果 与模型组相比, 清热燥湿方组 4 h、8 h BALF 中 NE 含量均显著降低(均  $P < 0.01$ ); 地塞米松组和清热燥湿方组 4 h 时 TNF-α 蛋白表达及 4 h、8 h 时 TNF-α mRNA 表达均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。组织病理学观察显示, 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 LPS 致 ALI 大鼠肺组织损伤, 其机制可能与清热燥湿方能降低 LPS 致 ALI 大鼠体内 NE 含量和 TNF-α 的表达有关。

**【关键词】** 清热燥湿方; 急性肺损伤; 中性粒细胞弹性蛋白酶; 肿瘤坏死因子-α

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.04.009

**Effects of Qingre Zaoshi decoction (清热燥湿方) on expressions of neutrophil elastase and tumor necrosis factor-α protein and mRNA in rats with acute lung injury caused by lipopolysaccharide** YANG Ai-dong, WANG Dong-ying, LI Wen-wen, WU Zhong-hua, GUO Yong-jie, PANG Hui-fang, WANG Li-xia. *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China*

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of Qingre Zaoshi decoction (清热燥湿方) on neutrophil elastase (NE) in bronchial alveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue expressions of tumor necrosis factor-α (TNF-α) protein and mRNA in the rats with acute lung injury (ALI) caused by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups: control, model, dexamethasone and Qingre Zaoshi decoction groups. Each group had two subgroups, 4 hours and 8 hours after LPS were injected. Each subgroup had 5 rats. The ALI rat model was established by intravenous injection of LPS (10 mg/kg) through a tail vein. The rats in dexamethasone group or Qingre Zaoshi decoction group were pretreated by gastric infusion of dexamethasone (0.45 mg/kg) or Qingre Zaoshi decoction (6.48 g/kg) respectively for 3 days before ALI induced by LPS. Then the expression of NE was measured by enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA), the expressions of TNF-α protein and mRNA were measured by immunohistochemistry ABC and real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR), while the histopathology of the lung injury was observed by light microscope. **Results** Compared with model group, the expression of NE in BALF in Qingre Zaoshi decoction group was obviously decreased at 4 hours and 8 hours (both  $P < 0.01$ ), and the expression of TNF-α protein positive area rate at 4 hours and TNF-α mRNA at 4 hours and 8 hours were obviously decreased in dexamethasone group and Qingre Zaoshi decoction group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Light microscope observation indicated that there were large areas of pulmonary hemorrhage and necrosis in model group, while in the Qingre Zaoshi decoction group, the pathological manifestations were much milder than those of the model group. **Conclusion** Qingre Zaoshi decoction ameliorates the injury of lung tissue in rats with ALI induced by LPS, thus it has protective effects on lung injury; the mechanism is possibly related to the inhibition of the expressions of NE in BALF and TNF-α protein and mRNA in injured lung tissue induced by LPS.

**【Key words】** Qingre Zaoshi decoction; Acute lung injury; Neutrophil elastase; Tumor necrosis factor-α

中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)是引起急性肺损伤(ALI)炎症级联反应的最终效应因子, 主要是通

过损伤毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞, 消化和降解细胞外基质以及上皮连接结构, 参与和启动 ALI 的发生<sup>[1]</sup>。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)是 ALI 早期重要的促炎因子, 主要由细菌内毒素刺激肺泡巨噬细胞产生<sup>[2]</sup>。本研究中观察了清热燥湿方对 ALI 大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中 NE 含量和肺组织 TNF-α 蛋白及 mRNA 表达的影响, 旨在寻求有效的临床用药及探讨清热燥湿方的作用机制。

基金项目: 上海市教委高校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); 上海市重点学科建设项目(S30301); 上海中医药大学名师研究室资助项目(2005-62)

作者简介: 杨爱东(1968-), 男(汉族), 湖北省人, 医学博士, 副教授, Email: aidongy@126.com.

1 材料与方 法

1.1 主要试剂:大肠杆菌脂多糖(LPS,O111:B4)购自美国 Sigma 公司,大鼠 NE 酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒购自上海广实生物技术有限公司,大鼠 TNF- $\alpha$  免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。大鼠 TNF- $\alpha$ 、三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物和探针序列均由广州达辉生物技术有限公司合成,TNF- $\alpha$  上游引物 5'-GGCTGCCCGACTATGTG-3',下游引物 5'-TGACTTTC TCCTGGTATGAAATGG-3',探针序列 5'-CTCACACACCGTCAGCCGATTT-3';GAPDH 上游引物 5'-CCGAGGGCCACTAAAGG-3',下游引物 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3',探针序列 5'-CATCCTGGGCTACACTGAGGACCA-3';5'端 FAM 修饰,3'端 Tamra 修饰。TRIzol 总 RNA 提取试剂、反转录和聚合酶链反应(PCR)扩增所需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  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

1.2 动物制模及分组给药:40 只 Wistar 雄性大鼠,体重(220 $\pm$ 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。将大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、地塞米松组、清热燥湿方组,各组再分为 4 h 和 8 h 两个亚组,每个亚组 5 只。除对照组外,其余各组大鼠均经尾静脉注射 10 mg/kg LPS 复制 ALI 模型<sup>[3-4]</sup>,地塞米松组、清热燥湿方组在制模前给予相应的药液灌胃,每日 2 次,第 3 日灌胃后 3 h 经尾静脉注入 LPS (10 mg/kg);对照组和模型组在相应时间点给予等量生理盐水。各组动物用药量按人与动物的体表面积换算<sup>[5]</sup>,地塞米松灌胃量为 0.45 mg/kg,清热燥湿方灌胃量为 6.48 g/kg。

1.3 观察指标及检测方法:于相应时间点腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠,取腹主动脉血用于动脉血气分析;取 BALF 用于 NE 检测。开胸分离右肺上叶用甲醛水溶液固定,用于病理及肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白表达免疫组化检测;右肺下叶置于液氮罐中,用于 TNF- $\alpha$  mRNA 表达检测。

1.3.1 BALF 中 NE 含量检测:用 ELISA 检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.3.2 肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白含量检测:用免疫组化法检测,严格按试剂盒说明书操作。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 检测肺组织 TNF- $\alpha$

mRNA 表达:按 TRIzol 法提取总 RNA 后,逆转录合成 cDNA。PCR 扩增:在反应体系中加入 cDNA、ddH<sub>2</sub>O 水、PCR 缓冲液、荧光探针、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、TNF- $\alpha$  上下游引物,扩增条件:93  $^{\circ}$ C 2 min、93  $^{\circ}$ C 45 s、55  $^{\circ}$ C 1 min,10 个循环;93  $^{\circ}$ C 30 s、55  $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环。进行扩增产物分析,TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平以其与 GAPDH 的相对表达量比值来计算。

1.3.4 肺组织病理学观察:常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组动脉血气分析结果(表 1):与对照组相比,模型组 4 h、8 h 时动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)和动脉血氧饱和度(SaO<sub>2</sub>)显著降低,动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)显著增高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与模型组相比,地塞米松组和清热燥湿方组 4 h、8 h 时 PaO<sub>2</sub> 和 SaO<sub>2</sub> 均显著增高,PaCO<sub>2</sub> 显著降低(均  $P<0.01$ )。与地塞米松组相比,清热燥湿方组 4 h 时,PaO<sub>2</sub> 显著升高,PaCO<sub>2</sub> 显著降低(均  $P<0.01$ );8 h 时 PaCO<sub>2</sub> 和 SaO<sub>2</sub> 显著降低( $P<0.05$  和  $P<0.01$ )。

表 1 各组大鼠制模后 4 h 和 8 h 血气分析比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	时间	动物数	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)	SaO <sub>2</sub>
对照组	4 h	5	81.80 $\pm$ 3.11	27.00 $\pm$ 1.54	0.96 $\pm$ 0.01
	8 h	5	89.40 $\pm$ 12.72	26.26 $\pm$ 1.79	0.90 $\pm$ 0.01
模型组	4 h	5	60.40 $\pm$ 7.83 <sup>b</sup>	37.12 $\pm$ 4.25 <sup>b</sup>	0.90 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
	8 h	5	62.60 $\pm$ 5.50 <sup>a</sup>	44.34 $\pm$ 2.86 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
地塞米松组	4 h	5	82.60 $\pm$ 7.86 <sup>d</sup>	34.68 $\pm$ 4.44 <sup>bd</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
	8 h	5	78.00 $\pm$ 4.74 <sup>ad</sup>	29.92 $\pm$ 1.05 <sup>d</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>bd</sup>
清热燥湿方组	4 h	4	87.00 $\pm$ 4.90 <sup>bd</sup>	26.12 $\pm$ 2.90 <sup>df</sup>	0.97 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
	8 h	5	84.40 $\pm$ 7.20 <sup>d</sup>	25.16 $\pm$ 3.14 <sup>de</sup>	0.92 $\pm$ 0.02 <sup>df</sup>

注:与对照组同期比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与模型组同期比较,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与地塞米松组同期比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>f</sup> $P<0.01$ ;1 mm Hg=0.133 kPa

2.2 各组 BALF 中 NE 含量比较(表 2):模型组和地塞米松组 4 h、8 h NE 含量较对照组显著增高(均  $P<0.01$ );清热燥湿方组 4 h、8 h NE 含量较模型组和地塞米松组显著降低(均  $P<0.01$ )。

2.3 各组肺组织 TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达比较(表 2):模型组 4 h 和 8 h TNF- $\alpha$  蛋白及 mRNA 表达较对照组显著增高(均  $P<0.01$ );地塞米松组和清热燥湿方组 4 h TNF- $\alpha$  蛋白表达及 4 h 和 8 h TNF- $\alpha$  mRNA 表达较模型组显著降低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

表2 各组大鼠BALF中NE含量及肺组织TNF-α蛋白和mRNA表达比较(±s)

组别	时间	NE含量 (μg/L)	TNF-α蛋白 表达(%)	TNF-α mRNA 表达(×10 <sup>-4</sup> )
对照组	4 h	3.98±1.54(5)	2.88±0.38(5)	12.21±10.51(4)
	8 h	4.10±2.37(5)	2.88±0.38(5)	12.21±10.51(4)
模型组	4 h	13.01±2.70(5) <sup>b</sup>	4.47±0.48(5) <sup>b</sup>	63.31±40.22(4) <sup>b</sup>
	8 h	17.69±7.01(5) <sup>b</sup>	5.05±1.26(5) <sup>b</sup>	139.10±36.33(4) <sup>b</sup>
地塞米松组	4 h	11.66±2.85(5) <sup>b</sup>	3.21±0.69(5) <sup>d</sup>	15.95±6.96(4) <sup>d</sup>
	8 h	21.57±5.74(5) <sup>b</sup>	3.70±0.80(5) <sup>c</sup>	39.95±17.25(4) <sup>d</sup>
清热燥湿方组	4 h	3.68±1.98(5) <sup>df</sup>	3.83±0.29(5) <sup>bc</sup>	3.92±1.89(4) <sup>d</sup>
	8 h	2.98±1.45(5) <sup>df</sup>	4.07±1.04(5)	23.60±6.96(4) <sup>d</sup>

注:与对照组同期比较,<sup>b</sup>P<0.01;与模型组同期比较,<sup>c</sup>P<0.05,<sup>d</sup>P<0.01;与地塞米松组同期比较,<sup>i</sup>P<0.01;括号内为动物数

2.4 各组肺组织病理变化: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

ALI的病理特征是大量活化的中性粒细胞(PMN)在肺血管和间质聚集,活化的PMN释放NE和氧自由基<sup>[6]</sup>,而NE可通过水解肺弹性蛋白、蛋白多糖和胶原直接损伤肺血管内皮细胞和血管基底膜,并有可能是全身炎症反应综合征(SIRS)时各种原因导致ALI的共同通路<sup>[1,7]</sup>。活化的PMN还可诱导血管内皮细胞和肺泡巨噬细胞释放TNF-α、白细胞介素-8及γ-干扰素,促使更多PMN活化和跨内皮细胞转移,触发NE的“瀑布样”级联释放,加重肺损伤<sup>[8-9]</sup>。TNF-α在ALI的发生发展过程中起着非常重要的作用。异常升高的TNF-α与肺组织TNF-α受体结合,使溶酶体受损,直接损伤肺血管

内皮细胞;还能刺激血管内皮细胞,使肺血管内皮细胞间黏附分子-1表达上调,导致内皮细胞和白细胞黏附,白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管通透性增强,并迁移至炎症部位,引起肺损伤<sup>[10]</sup>。

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大鼠,能使LPS诱导的ALI肺组织水肿、出血等损伤程度明显减轻。与模型组相比,清热燥湿方组4h和8h PaCO<sub>2</sub>显著降低,PaO<sub>2</sub>和SaO<sub>2</sub>明显增高,BALF中NE含量显著降低,且明显优于地塞米松组;4h时TNF-α蛋白表达明显降低,4h和8h时TNF-α mRNA表达显著降低。提示清热燥湿方能减轻内毒素致ALI大鼠肺组织损伤,其机制可能与其降低内毒素致ALI大鼠BALF中NE和肺组织TNF-α蛋白及mRNA的表达有关。

参考文献

- [1] 高冬娜,张璇.中性粒细胞弹性蛋白酶致急性肺损伤机制的研究进展.中国危重病急救医学,2006,18(8):510-512.
- [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泡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] 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.
- [4] 林英,朱曦,和宇,等.颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响.中国危重病急救医学,2008,20(10):621-624.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1996:1103.
- [6] 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.中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):146-149.
- [7] Moraes TJ, Chow CW, Downey GP. Proteases and lung injury. Crit Care Med, 2003, 31 (4 Suppl): S189-194.
- [8] Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury. Curr Opin Crit Care, 2001, 7(1): 1-7.
- [9] 马希刚,张珍祥,徐永建.火把花根片对急性肺损伤的保护作用研究.中国中西医结合急救杂志,2007,14(3):176-179.
- [10] Xiao W. Advances in NF-kappa B signaling transduction and transcription. Cell Mol Immunol, 2004, 1(6): 425-435.

(收稿日期:2010-03-06)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》、《医学主题词注释序贯表》、《中医药主题词表》中的主题词。对于没有通用译名的名词术语,在文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。中医名词术语按GB/T 16751.1-1997《中医临床诊疗术语疾病部分、证候部分、治法部分》执行,经络针灸学名词术语按GB/T 16751.2-1997《经穴部位》和GB/T 16751.3-1997《耳穴名称与部位》执行。中药应采用正名,药典未收录者应附注拉丁文。冠以外国人名体的征、病名、试验、综合征等,人名可以用中译文,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“s”。文中应尽量少用缩略语。已被公认缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI等。不常用的、尚未被公认缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。