

槐定碱对急性肺损伤小鼠肺组织 SOD，
MDA 及 TLR4 表达的影响

杨翠萍¹, 杨晓金², 田真真¹, 叶荷平¹, 朱金华¹, 付艳丽¹, 万红娇^{1*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学医学院 2010 级硕士研究生, 南昌 330006)

[摘要] 目的:研究槐定碱对内毒素(LPS)致急性肺损伤(ALI)小鼠肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及 Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响。方法:采用随机数字法,将 60 只清洁级昆明种小鼠分成 6 组:正常组、模型组、预防给药组、槐定碱低剂量组、槐定碱中剂量组、槐定碱高剂量组,每组 10 只。①正常组、②模型组、④槐定碱低剂量组、⑤槐定碱中剂量组、⑥槐定碱高剂量组:ip 生理盐水 0.5 mL,连续 6 d。③预防给药组:ip 5 mg·kg⁻¹槐定碱,连续 6 d。上述②~⑥组均在末次注射生理盐水或药物后 1 h ip 脂多糖(LPS)9 mg·kg⁻¹造模,造模 2 h 后④~⑥组分别给槐定碱 9,5,2.5 mg·kg⁻¹。6 h 后检测肺组织匀浆中 SOD 活性及 MDA 的含量,取新鲜肺组织裂解后提取 RNA,RT-PCR 法检测 TLR4 mRNA 的表达水平。结果:与正常组(86.22±8.86)U·mg⁻¹相比,LPS 模型组(50.58±10.06)U·mg⁻¹肺组织匀浆 SOD 活性明显下降;与模型组相比,各给药组 SOD[预防给药组(64.71±5.74)U·mg⁻¹,高剂量组(56.34±6.88)U·mg⁻¹,中剂量组(75.50±13.01)U·mg⁻¹,低剂量组(67.02±10.19)U·mg⁻¹]均明显升高(P<0.05);而肺组织中 MDA 含量变化趋势与 SOD 相反(P<0.05);TLR4 mRNA 的表达灰度值与正常组(0.45±0.20)比较,LPS 模型组(0.82±0.20)明显升高;与模型组比较,各用药组[预防给药组(0.60±0.32)s,高剂量(0.55±0.19),中剂量(0.54±0.29),低剂量组(0.61±0.26)]均明显降低(P<0.05)。结论:槐定碱能降低 ALI 模型小鼠肺组织匀浆中 MDA 的活性,提高 SOD 含量,降低 TLR4 mRNA 的表达。

[关键词] 槐定碱;急性肺损伤;脂多糖;超氧化物歧化酶;丙二醛;Toll 样受体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)14-0180-05

Effect of Sophoridine on Expression of Superoxide Dismutase, Malonaldehyde
and TLR4 mRNA in Acute Lung Injury Mice Induced by Lipopolysaccharide

YANG Cui-ping¹, YANG Xiao-jin², TIAN Zhen-zhen¹, YE He-ping¹,
ZHU Jin-hua¹, FU Yan-li¹, WAN Hong-jiao^{1*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Grade 2010 Postgraduate, Medical School of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of Sophoridine on expression of super oxide dismutase (SOD), malonaldehyde (MDA) and Toll-like receptor 4 (TLR4) of in acute lung injury (ALI) mice induced by lipopolysaccharide (LPS). Method: Sixty healthy KM mice were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, prevention treatment group, sophoridine high dose group, sophoridine middle dose group, low dose group sophoridine, 10 mice each group. The normal group, model group, sophoridine high, middle and low groups were lavaged 0.5 mL sodium chloride and the prevention treatment group was lavaged 0.5 mL sophoridine every day. It lasted 6 days. The disposable intraperitoneal injection of endotoxin method was used to establish intends to induce acute lung injury model in mice. The model was set up in the sixth day by injecting LPS 9 mg·kg⁻¹. 2 hours later, sophoridine high, middle and low groups were given 9, 5, 2.5 mg·kg⁻¹ respectively. According to the manual of kits, SOD, MDA were detected. Reverse transcriptase-PCR was used to study the

[收稿日期] 20111222(021)

[基金项目] 江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ11190)

[通讯作者] * 万红娇,教授,博士,主要从事中药药理研究, E-mail:yangcuipingy2@sina.com

expression of TLR4 mRNA. **Result:** In model group SOD content (50.58 ± 10.06) compared to other groups decreased significantly ($P < 0.05$). In model group MDA content (2.01 ± 0.15) and the expression of TLR4 mRNA compared to other groups increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sophoridine can reduce ALI model mice lung tissue MDA content and the expression of TLR4 mRNA and increase the value of SOD.

[**Key words**] sophoridine; acute lung injury; lipopolysaccharide; super oxide dismutase; malonaldehyde; Toll-like receptor

Toll 样受体 (TLRs) 是新近发现的先天免疫系统中的细胞跨膜受体及模式识别受体之一,在急性炎症反应、细胞信号转导及细胞凋亡中起重要作用。在人体免疫系统中,不同吞噬细胞如嗜中性粒细胞和树突细胞等通过来自 Toll 样受体 (TLR) 的信号而辨别出病原体及“自己”。在启动先天免疫对抗病原体的过程中最重要的一步就是识别,由杀伤细胞的受体识别存在于病原体而不存在于细胞中的成分,它们被称为病原体相关分子模式 (PAMP)。不同的 TLR 识别的 PAMP 不同,TLR4 可以识别革兰阴性菌 (G^-) 的脂多糖 (LPS, 内毒素的主要成分)、病毒的融合蛋白、机体的热休克蛋白等。TLR4 是第一个被发现的 TLR 成员,开始被称为人 Toll (hToll)。LPS 是 TLR4 的主要配体。大量 LPS 刺激机体免疫系统,可引起血压下降并发生败血症性休克。这就是为什么引发急性肺损伤 (ALI) 的致病菌中, G^- 占检出率高达 70% ~ 80%。

因此,TLR4 可能作为炎症反应网络中的急性炎症反应损伤的扳机点,启动 ALI/ARDS 的病理过程;进一步假设,如能调节 TLR4 的信号传导、控制 NF- κ B 的活性,就可能在不同的病理阶段将炎症反应水平调控在合适水平,从而有利于 ALI/ARDS 的防治。但是,目前众多的研究只是初步证实 TLR4 在内毒素信号转导信号途径中的关键作用,而以 TLR4 为靶点的拮抗内毒素信号传导途径的治疗策略尚未成熟;因此,如能以 TLR4 为切入点控制这种无序性的瀑链式炎症反应,将对 ALI/ARDS 的治疗产生深远影响。我们采用 ip LPS 的方法,造成小鼠急性肺损伤模型,用不同剂量的槐定碱 ip,观察小鼠肺组织匀浆超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 含量的变化,并结合 TLR4 mRNA 的表达,探讨槐定碱对 LPS 导致的急性肺损伤的作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,60 只,雌雄各半,24 ~ 26 g,动物许可证号 SCXK (赣)2009-0001,由江西中医学院实验动物中心提供。

1.2 药物 LPS (E. coli) Sigma 公司,规格 10 mg ·

支⁻¹,批号 00164401,每支加 10 mL 无菌生理盐水,质量浓度为 1 g · L⁻¹;盐酸槐定碱注射液,通化方大药业股份有限公司,规格 25 g/2 L,批号 20051681,每支槐定碱注射液加入 5% 葡萄糖 23 mL,质量浓度为 1 g · L⁻¹,4 °C 保存备用。

1.3 仪器与试剂 SOD (批号 20100413)、(MDA 批号 20100413) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所),RT-PCR 试剂盒 (日本东洋纺公司),ELX800 型酶标仪 (美国宝特),PCR 基因扩增仪 (PERKIN ELMER)。

2 方法

2.1 分组 小鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为 6 组,每组 10 只。分别为正常组、模型组、槐定碱预防给药组、槐定碱低、中、高剂量组。

2.2 动物模型建立 正常组,模型组,槐定碱低、中、高剂量组分别 ip 生理盐水 0.5 mL,槐定碱预防给药组 ip 盐酸槐定碱 5 mg · kg⁻¹,1 次/d,连续 3 d。第 3 天在注射完盐水或药物后 1 h,除了正常组外,各组分别 ip LPS 9 mg · kg⁻¹,复制 ALI 小鼠模型。

2.3 给药 ①正常组:小鼠 ip 0.5 mL 生理盐水,连续 6 d;②模型组:小鼠 ip 生理盐水 0.5 mL,连续 6 d;③预防给药组:ip 5 mg · kg⁻¹ 槐定碱,连续 6 d。④槐定碱低剂量组:ip 生理盐水 0.5 mL,连续 6 d;⑤槐定碱中剂量组:ip 生理盐水 0.5 mL,连续 6 d;⑥槐定碱高剂量组:ip 生理盐水 0.5 mL,连续 6 d。上述② ~ ⑥组均在末次注射生理盐水或药物后 1 h ip LPS 9 mg · kg⁻¹ 造模,造模 2 h 后④ ~ ⑥组分别给槐定碱 2.5,5,9 mg · kg⁻¹。4 h 后取血检测。

2.4 肺组织匀浆 SOD 和 MDA 的测定 取出右肺组织,放入冰生理盐水中漂洗除去浮血,滤纸吸干后,在冰浴上剪成碎块,称取适量组织,加入 19 倍量预冷的生理盐水,以冰浴中快速研磨制成 5% 组织匀浆,4 °C 3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液进行肺组织匀浆 SOD 和 MDA 的测定,操作步骤按试剂盒说明书进行。

2.5 PCR 引物序列 TLR4 引物序列:上游引物 5'-

TTTATTCAGAGCCGTTGG-3'; 下游引物 5'-AGTTGCCGTTTCTTGTTTC-3',产物长度 285 bp。 β -actin 内参:上游引物 5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3';产物长度 461 bp,下游引物 5'-GTCTTTACGGATGTCAACG-3',产物长度 461 bp。

2.6 对急性肺损伤小鼠肺组织 TLR4 mRNA 基因表达水平影响 经 2.4 后,取下左肺,在无菌操作台冰上研磨提取 RNA,采用 RT-PCR 的半定量的方法,对 TLR4 mRNA 的表达进行分析。肺组织 TLR4 mRNA 基因表达图像分析,灰度值与含量成正比例关系,即肺组织 TLR4 mRNA 基因表达越多,灰度值就越高,含量也就越高。

2.7 统计学处理 应用 SPSS 15.0 统计软件,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。RT-PCR 数据,进行 LSD 检验。采用单因素方差分析方法进行统计学处理。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠肺匀浆 SOD 活性、MDA 含量变化 与正常组相比,其余各组小鼠肺组织匀浆 SOD 活性均明显降低($P < 0.05$),以 LPS 模型组活性最低,见表 1。与 LPS 模型组相比,槐定碱中、低剂量组和预防给药组肺组织匀浆 SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。与正常组肺组织匀浆 MDA 含量相比,模型组 MDA 含量明显升高($P < 0.05$);槐定碱中、低剂量组和预防给药组肺组织匀浆 MDA 含量显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠肺匀浆 SOD 和 MDA 测定 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
正常对照	-	86.22 ± 8.86	1.38 ± 0.18
模型	-	50.58 ± 10.06 ¹⁾	2.01 ± 0.15 ¹⁾
槐定碱预防给药	5	64.71 ± 5.74 ^{1,2)}	1.82 ± 0.12 ^{1,2)}
槐定碱	9	56.34 ± 6.88 ¹⁾	1.88 ± 0.03 ¹⁾
	5	75.50 ± 13.01 ^{1,2)}	1.58 ± 0.29 ^{1,2)}
	2.5	67.02 ± 10.19 ^{1,2)}	1.75 ± 0.20 ^{1,2)}

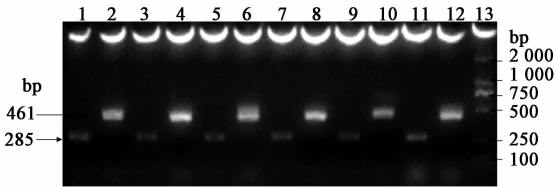
注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 LPS 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 槐定碱对急性肺损伤小鼠肺组织 TLR4 mRNA 基因表达水平影响 与正常组肺组织匀浆 TLR4 mRNA 表达的水平相比,模型组 TLR4 mRNA 表达的水平明显升高($P < 0.05$);槐定碱的高、中、低剂量组及预防给药组的 TLR4 mRNA 表达的水平均明显低于模型组,均有显著性差异($P < 0.05$)见表 2,图 1。

表 2 肺组织 TLR4 mRNA 基因表达图像分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	灰度值
正常	-	0.45 ± 0.20 ²⁾
模型	-	0.82 ± 0.20
预防给药	5	0.60 ± 0.32 ¹⁾
槐定碱	2.5	0.61 ± 0.27 ¹⁾
	5	0.54 ± 0.29 ²⁾
	9	0.55 ± 0.19 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。



- 1. 正常组 (5 mg·kg⁻¹) 目的基因;2. 正常组内参;
- 3. 槐定碱预防给药组 (5 mg·kg⁻¹) 目的基因;4. 槐定碱预防给药组内参;5. 模型组 (5 mg·kg⁻¹) 目的基因;6. 模型组内参;
- 7. 槐定碱高剂量组 (9 mg·kg⁻¹) 目的基因;8. 槐定碱高剂量组内参;9. 槐定碱中剂量组 (5 mg·kg⁻¹) 目的基因;
- 10. 槐定碱中剂量组内参;11. 槐定碱低剂量组 (2.5 mg·kg⁻¹) 目的基因;12. 槐定碱低剂量组内参;13. 2 000 bp marker

图 1 小鼠肺组织 TLR4 mRNA 的表达

4 讨论

从中医上讲,肺位胸腔,上通于喉,外合皮毛,开窍于鼻,为气体出入之器官,故《素问阴阳应象大论篇》云:“天气通于肺”,《灵枢脉度篇》曰:“肺气通于鼻”。且肺为“华盖”,故外邪从口鼻或皮毛而入必先伤肺,即“温邪上受,首先犯肺”、“肺位最高,邪必先伤”^[1]。由于内毒素是决定 G⁻ 细菌感染的主要致病因子,因此,现代医家的临床及实验研究多集中在内毒素感染所致的 ALI/ARDS 上。ALI 的发病机制目前尚未完全阐明,有学者认为机体尤其是肺内部氧化/抗氧化平衡失调起主要作用^[2]。内毒素感染时,大量黄嘌呤脱氢酶转化为氧化酶,同时高能磷酸化合物分解为次黄嘌呤,黄嘌呤氧化酶在催化次黄嘌呤生成尿酸过程中释放出大量超氧自由基;内毒素又经补体或直接激活中性粒细胞产生呼吸爆发,也生成大量超氧自由基等,经过氧化反应而损伤细胞。氧自由基一方面引起肺泡毛细血管膜通透性增加,形成肺间质水肿,慢性炎细胞浸润,影响气体交换,致使机体组织缺氧;另一方面又可进一步活化炎性细胞,相互影响,形成复杂的系统炎症效应,最终导致肺组织细胞损伤^[3]。

MDA 是自由基与生物膜多聚不饱和和脂肪酸发

生脂质过氧化的产物,其含量反映了机体内脂质过氧化程度和自由基水平。SOD 为过氧化产物,是存在于机体细胞内清除氧自由基的一种酶,SOD 的高低可以间接反映机体清除氧自由基的能力。SOD 活性下降和 MDA 含量升高反映了体内氧化/抗氧化平衡的失调,氧化/抗氧化失衡可以进一步引起蛋白质及 DNA 损伤、改变信号传导通路,刺激转录因子活化,诱导细胞凋亡,引起肺组织的过度损伤^[4]。有研究表明内毒素感染时,MDA 含量上升,SOD 活性下降,且与机体的损伤程度呈相关^[5]。

本实验发现模型组 SOD 活性明显较正常组,槐定碱高、中、低剂量组和预防给药组低;MDA 含量增多,说明槐定碱能提高小鼠体内清除自由基的能力、减少体内的氧自由基积聚,对内毒素肺损伤模型鼠的氧化损伤有一定的保护作用。关于 LPS 膜受体信号转导的分子机制,一直是研究的热点和难点^[6]。等提出了一套完整的学说,他认为 LPS 首先与 LPS 结合蛋白(LPS binding protein, LBP)、CD14 形成 LPS-LBP-CD14 复合物,再通过跨膜分子将信号转导至细胞内。CD14 与其他跨膜信号受体不同,他不能直接将信号转导到细胞内,目前认为:LPS 受体属于“多构件受体”,包含至少 2 种以上的蛋白。CD14 是主要的配基结合构件,其他蛋白介导 LPS 和 CD14 结合后的跨膜信号。TLR4 是 LPS 的跨膜信号转导受体,是一种 Toll 蛋白。目前普遍认为 TLR4 是 LPS 信号从细胞外至细胞内的跨膜转导受体。有文献报道,它可直接与 LPS 结合,也可与 CD14-LBP-LPS 结合将信号传入胞内并启动炎症反应,其激活将引起一系列下游分子的活化,如通用 NF- κ B、活性蛋白-1(activating protein-1, AP-1)等,并最终引起以 TNF, IL-6 等为中心的促炎症因子激活,放大炎症效应,导致多种炎症因子的瀑链式释放,形

成第二次打击力量而产生众多生物学损伤效应。因此,TLR4 可能作为炎症反应网络中的急性炎症反应损伤的扳机点,启动 ALI/ARDS 的病理过程;如能调节 TLR4 的信号传导,就可能在不同的病理阶段将炎症反应水平调控在合适水平,从而有利于急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征 ALI/ARDS 的防治。本实验还发现正常小鼠 TLR4 mRNA 可少量表达,模型组小鼠表达量明显升高,给药组表达量较模型组下降,表明槐定碱具有下调 TLR4 mRNA 表达的作用。

综上所述,槐定碱可降低 LPS 致 ALI 鼠肺组织匀浆的 MDA 含量,提高 SOD 活性,下调 TLR4 mRNA 表达,从抗氧化损伤及调节 TLR4 的信号传导等角度发挥其作用。

[参考文献]

- [1] 陈正堂. 急性呼吸窘迫综合征发病机制及诊治进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(1): 65.
- [2] 高晓玲, 刘卓拉. 氧自由基在急性肺损伤发病中的作用[J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2002, 22(6): 310.
- [3] 金惠铭. 病理生理学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 152.
- [4] 金婧, 董淑红, 苏力, 等. 新生大鼠内毒素性急性肺损伤肺组织 MDA、SOD 和 IL-10、IL-18 的改变[J]. 新生儿科杂志, 2004, 19(2): 69.
- [5] 廖欣, 杨爱莲, 杜少辉, 等. 牛珀宝微丸对内毒素急性肺损伤 MDA 和 SOD 的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2006, 16(4): 196.
- [6] 钱小顺, 牛庆磊, 杨洁, 等. 老年和青年大鼠肺泡巨噬细胞凋亡的初步研究[J]. 中华医学杂志, 2005, 85: 253.

[责任编辑 聂淑琴]

金匱肾气丸对异丙肾上腺素致心室重构
大鼠神经体液因子的调节

廖月玲, 刘艳, 顾燕频, 黄玮, 章忱, 袁宝萍, 吕嵘, 卫洪昌*
(上海中医药大学病理教研室, 上海 201203)

〔摘要〕 目的:研究金匱肾气丸对异丙肾上腺素致大鼠心室重构相关神经体液因子和形态学的改变。方法:异丙肾上腺素连续 3 d 以 20, 10, 5 mg·kg⁻¹ 递减皮下注射, 3 mg·kg⁻¹ 维持 7 d 制备大鼠心室重构模型, 造模成功后分别用依那普利 (2 mg·kg⁻¹), 金匱肾气丸 (7.5 g·kg⁻¹) ig 给药 5 周及 15 周, 从血浆中神经内分泌因子和形态学进行疗效比较研究。结果:血浆中神经内分泌因子的检测:5, 15 周时模型组血浆中心房钠尿肽 (ANP) 含量均高于正常组; 5 周时与模型组比较, 金匱肾气丸组的 ANP 含量均较低 ($P < 0.05$); 15 周时, 金匱肾气丸组的 ANP、脑钠肽 (BNP) 含量均降低 ($P < 0.05$)。5 周模型组的血清去甲肾上腺素 (NE) 浓度高于正常组, 但无显著性差异, 15 周模型组的 NE 显著高于正常组 ($P < 0.05$); 5, 15 周时, 依那普利组和金匱肾气丸组的 NE 与模型组比较均无显著性差异。5, 15 周, 模型组的血清血管紧张素 II (Ang II) 浓度与正常组比较均无显著性差异。心肌病理形态学观测结果:5 周时, 模型组有较多成纤维细胞和新生毛细血管, 肉芽组织较明显, 15 周时, 模型组呈现广泛纤维化, 形成疤痕组织; 5, 15 周时, 金匱肾气丸组的心肌细胞均有一定程度的病理变化, 但较模型组而言均有改善。结论:金匱肾气丸能够改善异丙肾上腺素致大鼠心室重构过度激活的神经体液水平, 但这种改善作用在晚期时较为明显。

〔关键词〕 慢性心力衰竭; 异丙肾上腺素; 心室重构; 心房钠尿肽; 脑钠尿肽; 去甲肾上腺素; 血管紧张素 II; 金匱肾气丸

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903 (2012) 14-0184-05
〔网络出版地址〕 <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1540.013.html>
〔网络出版时间〕 2012-05-15 15:40

Regulation of Neuroendocrine Factors by Jinkui Shenqi Wan
on Cardioventricular Reconstruction in Rat Induced by Isoproterenol

LIAO Yue-ling, LIU Yan, GU Yan-pin, HUANG Wei, ZHANG Chen, YUAN Bao-ping,
LV Rong, WEI Hong-chang*

(Department of Pathophysiology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To observe the effect of Jinkui Shenqi Wan on the cardioventricular reconstruction in rat induced by Isoproterenol (ISO). **Method:** The rats were injected subcutaneously by 20, 10, 5 mg·kg⁻¹ ISO for 3 days and then 3 mg·kg⁻¹ ISO as maintenance dose for 7 days to build the rat model of cardioventricular reconstruction, Enalapril and Jinkui Shenqi Wan were given to the rats for 5 and 15 weeks as interventions and after that, stained the myocardium with Hematoxylin Eosin (HE) staining method and observed the myocardial morphologic changes by light microscope. The density of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), norepinephrine (NE) and angiotensin II (Ang II) in blood serum were detected by method of ELISA. **Result:** The results of neuroendocrine factors in blood serum: at 5 weeks, compared with model group, the density

〔收稿日期〕 20111204 (013)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目 (30973821); 上海市教委重点学科建设项目 (J50301)
〔第一作者〕 廖月玲, 博士研究生, 中医药防治心血管疾病实验研究, Tel: 021-51322460, E-mail: lylsolo@126.com
〔通讯作者〕 * 卫洪昌, 教授, 从事中医药防治心血管疾病的基础研究, Tel: 021-51322158, E-mail: bljys@yahoo.com.cn