

· 论著 ·

大黄素对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用及其分子作用机制研究

苏 华

【摘要】 目的 探讨大黄素对脓毒症急性肺损伤 (ALI) 大鼠的保护作用及其分子作用机制。**方法** 将 24 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、脓毒症 ALI 组、大黄素干预组, 各 8 只。脓毒症 ALI 组及大黄素干预组腹腔内注射内毒素 (LPS) 10 mg/kg 建立脓毒症 ALI 模型, 正常对照组腹腔注射等量 0.9% 氯化钠溶液, 大黄素干预组于造模前 30 min 腹腔注射大黄素 25 mg/kg。造模后 12 h 取血, 应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清白介素 6 (IL-6)、白介素 17 (IL-17) 水平, 处死大鼠, 测定肺组织湿/干重比值 (W/D), 行 HE 染色计算肺病理组织评分, 测定肺组织匀浆液中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT) 活性。**结果** 脓毒症 ALI 组大鼠肺 W/D、肺病理组织评分、肺组织 MDA 活性及血清 IL-6、IL-17 水平均高于正常对照组和大黄素干预组, 而肺组织 SOD、GSH-Px 和 CAT 活性均低于正常对照组和大黄素干预组 ($P < 0.05$)。**结论** 大黄素对脓毒症 ALI 大鼠具有良好的保护作用, 其分子作用机制可能与增强抗氧化能力及抑制炎症反应有关。

【关键词】 脓毒症; 急性肺损伤; 大黄素; 保护作用; 药理作用分子作用机制

【中图分类号】 R 563.8 **【文献标识码】** A doi: 10.3969/j.issn.1008-5971.2014.07.017

作者单位: 421001 湖南省衡阳市, 南华大学附属第一医院重症医学科

是 IR 存在的标志。

本研究结果显示, GDM 组血清 FBG、Fins、SF、FFA 水平及 HOMA-IR 高于正常非孕组和正常孕妇组, 正常孕妇组血清 Fins、SF、FFA 水平及 HOMA-IR 高于正常非孕组; Pearson 相关分析结果显示, 血清 SF 水平、FFA 水平均与 HOMA-IR 呈正相关, 血清 SF 水平与血清 FFA 水平呈正相关。表明 GDM 孕妇存在 IR 及高铁蛋白血症、高游离脂肪酸血症, 血清 SF、FFA 水平越高, IR 程度越重, SF 和 FFA 水平升高可导致 GDM, 使机体对葡萄糖的利用降低, 血清 FBG 水平升高; 血清 SF 水平与血清 FFA 水平呈正相关的原因可能与铁介导氧化的 FFA 水平升高有关^[7]。因此, 在 GDM 的早期干预中应重视 SF 和 FFA 的调控, 以更好地控制 GDM 的发生和发展。

参考文献

- 1 Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362 (12): 1090-1101.
- 2 林红. 妊娠期糖尿病筛查与诊断研究进展 [J]. *海南医学*, 2007, 18 (2): 99-101.
- 3 尹玉竹, 李小毛, 侯红瑛, 等. 孕晚期妊娠期糖尿病妇女胰岛素抵抗与分泌的研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27 (3): 173-175.
- 4 曹东红, 谭卫强. 胰岛素抵抗与妊娠期糖尿病 [J]. *内科*, 2007, 2 (1): 109.
- 5 Wlazlo N, van Greevenbroek MM, Ferreira I, et al. Iron metabolism is associated with adipocyte insulin resistance and plasma adiponectin; the Cohort on Diabetes and Atherosclerosis Maastricht (CODAM) study

[J]. *Diabetes Care*, 2013, 36 (2): 309-315. doi: 10.2337/dc12-0505.

- 6 Hämäläinen P, Saltevo J, Kautiainen H, et al. Erythropoietin, ferritin, haptoglobin, hemoglobin and transferrin receptor in metabolic syndrome: a case control study [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2012, 11: 116. doi: 10.1186/1475-2840-11-116.
- 7 须静, 胡晓波. 2 型糖尿病患者铁蛋白浓度与胰岛素抵抗的相关性研究 [J]. *检验医学*, 2013, 28 (9): 805-808.
- 8 王依訖, 张钰. 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗与血清游离脂肪酸浓度的关系 [J]. *检验医学*, 2012, 27 (10): 806-808.
- 9 陆秋涯, 陆怡德. 空腹血清游离脂肪酸与 2 型糖尿病的关系 [J]. *检验医学*, 2012, 27 (9): 725-727.
- 10 Carpenter MW. Gestational diabetes, pregnancy hypertension, and late vascular disease [J]. *Diabetes Care*, 2007, 30 (Suppl 2): S246-S250.
- 11 付冬霞, 王光亚, 许金秀, 等. 血清铁蛋白在妊娠期糖尿病患者中的水平及其与胰岛素抵抗的关系 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15 (11): 3827-3830.
- 12 Kundu D, Roy A, Mandal T, et al. Relation of iron stores to oxidative stress in type 2 diabetes [J]. *Niger J Clin Pract*, 2013, 16 (1): 100-103. doi: 10.4103/1119-3077.106776.
- 13 Jehn ML, Guallar E, Clark J, et al. A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study [J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 165 (9): 1047-1054.

(收稿日期: 2014-01-10)

Protective Effect of Emodin on Rats with Sepsis and Acute Lung Injury and Its Molecular Mechanism SU

Hua. Department of ICU, the First Affiliated Hospital of South China University, Hengyang 421001, China

[Abstract] **Objective** To explore the protective effect of emodin on rats with sepsis and acute lung injury (ALI) and its molecular mechanism. **Methods** 24 male SD rats were randomly divided into normal control group, sepsis and ALI group and emodin intervention group, each of 8 rats. Rats in sepsis and ALI group and emodin intervention group were injected with LPS, 10 mg/kg, to establish sepsis and ALI model; whereas those in normal control group were injected with same volume of 0.9% sodium chloride solution. 30 minutes before establishing model, rats in emodin intervention group were injected with emodin, 25 mg/kg. After 12 hours of establishing model, blood was collected and serum interleukin-6 (IL-6) and interleukin-17 (IL-17) levels were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Subsequently, all rats were sacrificed and lung W/D was measured. Pulmonary pathological tissue scores were calculated by HE stain. The activities of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in the homogenate of pulmonary tissues were examined. **Results** The lung W/D, pulmonary pathological tissue scores, pulmonary MDA activities and serum levels of IL-6 and IL-17 were higher but pulmonary SOD, GSH-Px and CAT activities were lower in sepsis and ALI group than those in normal control group and emodin intervention group ($P < 0.05$). **Conclusion** Emodin has good protective effect in sepsis and ALI rats, and its molecular mechanism may be associated with enhancing antioxidative ability and inhibiting inflammatory response.

[Key words] Sepsis; Acute lung injury; Emodin; Protective effect; Molecular mechanisms of pharmacological action

脓毒症是由严重创伤、大量失血、休克及外科大手术继发感染引起的全身性炎症反应综合征,是危重病病房内患者最常见的死亡原因,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)系脓毒症最常见的并发症。脓毒症 ALI 的发生发展与促炎细胞因子的过度释放及氧化应激损伤密切相关^[1]。大黄素属于蒽醌类衍生物,是中药大黄的主要有效单体,具有明显的抗炎、免疫调节及抗氧化应激等药理作用^[2]。陈亮等^[3]报道,大黄素通过抑制核因子 κ B 的活化及肿瘤坏死因子 α 、白介素 1 β 的表达,对脓毒症 ALI 大鼠的肺组织产生保护作用。然而,大黄素抗脓毒症 ALI 的机制尚未完全阐明。为此,本研究拟观察大黄素对脓毒症 ALI 大鼠氧化应激及血清白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白介素 17 (interleukin-17, IL-17) 水平的影响,探讨其对脓毒症 ALI 的保护作用及其分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与药物 雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 200~250 g,购于南华大学动物实验中心。大黄素由国家药物和生物制品检定研究所 (NICBPB) 提供。二甲亚砜 (DMSO)、内毒素 (LPS) 分别购于美国 Sigma、R&D 公司。

1.2 动物分组、模型制备及药物干预 将 24 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、脓毒症 ALI 组、大黄素干预组,各 8 只。脓毒症 ALI 组及大黄素干预组大鼠腹腔内注射 LPS 10 mg/kg (补注少量 0.9% 氯化钠溶液,使总注射量为 2 ml/kg) 以建立脓毒症 ALI 模型,正常对照组大鼠腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液 2 ml/kg。大黄素干预组大鼠在 LPS 造模前 30 min 腹腔内注射大黄素 25 mg/kg (溶解于 DMSO),其他两组大鼠腹腔内注射等量 0.9% 氯化钠溶液。

1.3 标本采集与处理 造模后 12 h,各组大鼠从尾静脉抽血 2 ml,以 3 000 r/min 离心 10 min,提取上层血清,置 -20 ℃ 低温冰箱保存,用于 IL-6、IL-17 的检测。然后,给予水合氯醛 (3 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定于手术板上处死大鼠,分离左上肺,用吸水纸吸去肺表面血液后称湿重 (W),随后

置于 80 ℃ 烘箱烘干,48 h 后再称干重 (D),计算 W/D。另取部分左下肺组织,保存于 -70 ℃ 冰箱,用于蛋白质提取及丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione-peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性检测。取右肺上叶置于 10% 中性甲醛固定,石蜡包埋、切片,用于 HE 染色,并参照 Hofbauer 等^[4]的方法行肺损伤病理组织评分。

1.4 肺组织匀浆液中 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 活性的检测 取 100 mg 肺组织,利用苯甲磺酰基氟化物将其匀浆,离心,提取上清液,通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。根据南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 活性,严格按照说明书进行操作。

1.5 血清 IL-6、IL-17 浓度测定 通过双抗体夹心酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清 IL-6、IL-17 浓度,试剂盒购于深圳晶美生物技术有限公司,所有操作严格按照试剂盒说明书由专人进行统一检测。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺 W/D 及病理组织评分比较 3 组大鼠肺 W/D 及病理组织评分比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);其中脓毒症 ALI 组大鼠肺 W/D 和肺病理组织评分高于正常对照组和大黄素干预组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$,见表 1)。正常对照组大鼠肺组织结构完整,肺泡间隔无水肿、炎症,肺泡腔清晰,脓毒症 ALI 组大鼠大部分肺泡腔内可见渗出、水肿、出血,肺间质有大量炎性细胞浸润,而大黄素干预组大鼠上述病变明显减轻。

2.2 各组大鼠肺组织 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 活性比较 3 组大鼠肺组织 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 活性比较,差

异有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中脓毒症 ALI 组大鼠肺组织 MDA 活性高于正常对照组和大黄素干预组, SOD、GSH-Px 及 CAT 活性低于正常对照组和大黄素干预组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 见表 2)。

表 1 各组大鼠肺 W/D 及病理组织评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of lung W/D and pathological tissue score in each group of rats

| 组别 | 只数 | 肺 W/D | 肺病理组织评分(分) |
|-----------|----|-------------|-------------|
| 正常对照组 | 8 | 3.62 ± 0.46 | 0 |
| 脓毒症 ALI 组 | 8 | 5.48 ± 0.75 | 2.67 ± 0.63 |
| 大黄素干预组 | 8 | 4.43 ± 0.56 | 1.74 ± 0.45 |

表 2 各组大鼠肺组织 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of lung tissue MDA, SOD, GSH-Px, CAT activity in each group of rat

| 组别 | 只数 | MDA (nmol/mg 蛋白) | SOD (U/mg 蛋白) | GSH-Px (U/mg 蛋白) | CAT (U/mg 蛋白) |
|-----------|----|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
| 正常对照组 | 8 | 12.48 ± 1.79 | 53.81 ± 7.92 | 27.96 ± 5.47 | 36.47 ± 6.12 |
| 脓毒症 ALI 组 | 8 | 34.61 ± 5.37 | 25.57 ± 4.36 | 12.65 ± 1.93 | 15.84 ± 2.49 |
| 大黄素干预组 | 8 | 23.45 ± 3.64 | 38.49 ± 5.47 | 20.07 ± 2.85 | 26.35 ± 3.78 |

注: MDA = 丙二醛, SOD = 超氧化物歧化酶, GSH-Px = 谷胱甘肽过氧化物酶, CAT = 过氧化氢酶

2.3 各组大鼠血清 IL-6、IL-17 水平比较 3 组大鼠血清 IL-6、IL-17 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中脓毒症 ALI 组大鼠血清 IL-6、IL-17 水平高于正常对照组和大黄素干预组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见表 3)。

表 3 各组大鼠血清 IL-6、IL-17 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

Table 3 Comparison of the levels of serum IL-6, IL-17 in each group of rat

| 组别 | 只数 | IL-6 | IL-17 |
|-----------|----|---------------|--------------|
| 正常对照组 | 8 | 37.25 ± 5.49 | 21.27 ± 3.43 |
| 脓毒症 ALI 组 | 8 | 81.42 ± 10.68 | 50.36 ± 7.58 |
| 大黄素干预组 | 8 | 54.17 ± 7.34 | 36.21 ± 5.14 |

注: IL-6 = 白介素 6, IL-17 = 白介素 -7

3 讨论

器官功能衰竭为脓毒症最严重的并发症, 而肺脏是最容易受到累及的器官, 在重症脓毒症患者中, 几乎一半的患者最终会进展为 ALI 和急性呼吸窘迫综合征^[4-5]。大黄性寒、味苦, 具有攻积导滞、泻火、凉血、活血祛瘀、利胆退黄等功效。大黄素是中药大黄中最主要的活性成分, 化学名称为 1, 3, 8-三羟基-6-甲基蒽醌, 具有广阔的临床应用前景^[6]。本研究结果表明, 经过大黄素干预处理后, 大鼠肺 W/D、肺病理组织评分明显低于脓毒症 ALI 组, 与文献报道相符^[3], 表明大黄素对脓毒症 ALI 大鼠有保护作用。

氧化应激损伤在脓毒症 ALI 发生发展中的作用已得出共识^[7]。MDA 是脂质过氧化的终产物, 能够损伤生物膜脂质双分子层结构, 其浓度可以间接反映氧自由基对细胞的损伤程度。SOD、GSH-Px 和 CAT 构成第一线的抗氧化酶防御系统, 其中 SOD 将超氧阴离子 (O_2^-) 转换为过氧化氢 (H_2O_2), CAT 再把 H_2O_2 转化为水, 从而使有毒性的 O_2^- 和 H_2O_2 均被转化为无害的水分子, GSH 通过将氧化型物质还原, 解除其毒性^[8]。本研究结果发现, 与脓毒症 ALI 组比较, 大黄素干预组肺组织 MDA 活性降低, 而 SOD、GSH-Px、CAT 活性增

加, 表明大黄素能增加脓毒症 ALI 大鼠体内抗氧化酶的活性, 清除氧自由基, 抑制脂质过氧化引起的肺组织损害。

脓毒症的本质是机体炎症反应不断加剧, 并持续恶化^[9]。IL-6 是参与多种生理与免疫过程的重要细胞因子, 具有广泛的生物活性, 被认为是全身炎症反应综合征的一个标志^[10]。IL-17 作为一种重要的促炎递质, 主要由 Th17 细胞分泌, 可促进多种炎症递质的产生及炎症细胞在炎症部位聚集^[11]。熊斌等^[12]报道, 脓毒症 ALI 大鼠肺组织损伤程度与血清 IL-6、IL-17 水平呈正相关, 表明这两种细胞因子在脓毒症所致的 ALI 中起重要作用。本研究结果表明, 大黄素处理明显降低脓毒症 ALI 大鼠血清 IL-6、IL-17 水平, 提示抑制炎症反应可能是大黄素抗脓毒症 ALI 的重要机制。

总之, 大黄素可能通过减少自由基损害及抑制炎症反应对脓毒症 ALI 大鼠发挥保护作用, 但具体机制仍需要进一步研究, 这为大黄素治疗脓毒症 ALI 提供了实验依据。

参考文献

- Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis [J]. In Vivo, 2013, 27 (6): 669-684.
- 刘晗, 高云. 大黄素药理作用的分子机制研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25 (12): 1552-1555.
- 陈亮, 白静慧, 张凯, 等. 大黄素对脓毒症急性肺损伤大鼠肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-1 β 水平的影响 [J]. 广东医学, 2013, 34 (13): 1992-1994.
- Hofbauer B, Seluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experiment acute pancreatitis [J]. Gastroenterology, 1998, 115 (5): 1238-1247.
- Sadowitz B, Roy S, Gattol A, et al. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9 (12): 1169-1178.
- 郑素平, 万莉红, 周黎明. 大黄素抗炎作用及对急性胰腺炎治疗作用研究进展 [J]. 四川生理科学杂志, 2006, 28 (4): 175-177.
- 彭登高, 卿国忠, 李霖, 等. 小剂量胰岛素对脓毒症大鼠急性肺损伤巨噬细胞移动抑制因子和氧化应激的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23 (18): 12-16.
- 徐霞, 杨清, 隋在云, 等. 白花丹参水提物对缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 GSH、CAT、SOD 和 MDA 的影响 [J]. 河南中医, 2013, 33 (5): 684-685.
- 屈纪富, 梁华平. 炎症调控与脓毒症研究进展 [J]. 创伤外科杂志, 2012, 14 (5): 459-463.
- 沈丽娟, 吴锡平, 关云艳, 等. 脓毒症患者血清 IL-6 和 NT-proBNP 的变化及其临床意义 [J]. 临床急诊杂志, 2013, 14 (3): 119-122.
- Song X, Qian Y. IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases [J]. Cell Signal, 2013, 25 (12): 2335-2347.
- 熊斌, 王兴勇. 脓毒症大鼠急性肺损伤血清 IL-6、IL-17 的变化及其意义 [J]. 儿科药理学杂志, 2010, 16 (1): 11-13.

(收稿日期: 2014-02-15)