

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.13.003

文章编号: 1005-8982(2020)13-0011-08

欧前胡素对小鼠急性肺损伤的影响及其机制研究

华俊萍, 王宋平

(西南医科大学附属医院 呼吸一科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 探讨欧前胡素对小鼠急性肺损伤的影响及其作用机制。**方法** 将32只雌性BALB/c小鼠随机分为正常对照组、模型组、欧前胡素30 mg/kg组、欧前胡素60 mg/kg组。用欧前胡素预处理,脂多糖诱导进行模型复制,7h后收集小鼠肺组织。测量肺湿/干重比,采用苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理学改变,检测小鼠肺组织中髓过氧化物酶(MPO)活力及活性氧类(ROS)的水平,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测小鼠肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β),Western blotting检测小鼠肺组织中磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、核转录因子 κ B(NF- κ B)p65及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织损伤评分、肺组织ROS水平及PI3K、Akt、NF- κ B p65蛋白磷酸化水平升高($P < 0.05$),TNF- α 、IL-1 β 的释放及MMP-9蛋白表达水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,欧前胡素组能够减轻肺组织损伤,降低肺损伤评分($P < 0.05$),降低小鼠肺组织中ROS水平及PI3K、Akt、NF- κ B p65蛋白磷酸化水平($P < 0.05$),降低TNF- α 、IL-1 β 的释放及MMP-9蛋白表达水平($P < 0.05$);与欧前胡素30 mg/kg组比较,欧前胡素60 mg/kg组小鼠肺损伤评分、肺组织ROS水平、Akt及NF- κ B p65蛋白磷酸化水平、TNF- α 的释放及MMP-9蛋白表达水平降低($P < 0.05$),PI3K蛋白磷酸化水平及IL-1 β 的释放差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤有保护作用,其作用机制可能与脂多糖诱导的急性肺损伤中ROS被抑制,以及ROS介导的PI3K/Akt/NF- κ B通路被抑制有关。

关键词: 急性肺损伤;脂多糖;欧前胡素;活性氧簇;核转录因子 κ B

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

Protective effects and mechanisms of imperatorin on acute lung injury of mice

Jun-ping Hua, Song-ping Wang

(The First Department of Respiratory Medicine, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanisms of imperatorin on mice with acute lung injury. **Methods** A total of 32 female BALB/c mice were randomly divided into four groups: normal control group, model group, imperatorin 30 mg/kg group, imperatorin 60 mg/kg group. Mice in imperatorin group were pretreated with imperatorin, the lung tissues of each group were collected after 7 hours of lipopolysaccharide modeling. The wet/dry weight ratio of lung was measured, the pathological changes of lung tissues in mice were observed by hematoxylin-eosin (H & E) staining, the activity of myeloperoxidase (MPO) and the reactive oxygen species (ROS) level in lung tissues of mice were measured, the tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in lung tissues of mice were detected by ELISA, and the expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), nuclear factor κ B (NF- κ B) p65 and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in lung tissues of mice were

收稿日期: 2020-01-15

[通信作者] 王宋平, E-mail: wang4816@sina.com

detected by Western blotting. **Results** Compared with normal control group, model group can lead to acute lung injury in mice, increase the lung injury score ($P < 0.05$), increase the ROS level ($P < 0.05$), increase the protein phosphorylation of PI3K, Akt, NF- κ B p65 ($P < 0.05$), and increase the release of TNF- α , IL-1 β and the protein expression of MMP-9 in the lung tissues of mice ($P < 0.05$). Compared with model group, imperatorin group can alleviate lung tissue injure, reduce the lung injury score ($P < 0.05$), reduce the ROS level ($P < 0.05$), decrease the protein phosphorylation of PI3K, Akt, NF- κ B p65 ($P < 0.05$), and decrease the release of TNF- α , IL-1 β and the protein expression of MMP-9 in the lung tissues of mice ($P < 0.05$). Compared with imperatorin 30 mg/kg group, imperatorin 60 mg/kg group can reduce the lung injury score ($P < 0.05$), reduce the ROS level ($P < 0.05$), decrease the protein phosphorylation of Akt and NF- κ B p65 ($P < 0.05$), and decrease the release of TNF- α and the protein expression of MMP-9 in the lung tissue of mice ($P < 0.05$), there was no significant difference between the protein phosphorylation of PI3K and the release of IL-1 β ($P > 0.05$). **Conclusion** The protective effects of imperatorin on acute lung injury induced by lipopolysaccharide may be related to the inhibition of ROS and the inhibition of PI3K/Akt/NF- κ B pathway mediated by ROS, and the effect of high dose group is better than that of low dose group.

Keywords: acute lung injure; lipopolysaccharides; imperatorin; reactive oxygen species; NF-kappa B

急性肺损伤是由各种因素导致的急性弥漫性肺损伤,其特点是肺实质过度的急性炎症反应^[1]。急性肺损伤发病率、病死率高,在全世界重症监护室其发病率约占 10%,尽管近年对该疾病的研究有所进展,但大多数研究表明其病死率仍高达 30% ~ 40%^[2-3]。目前该病的治疗重点是肺保护性通气,尚无特定的药物治疗该疾病^[4]。因此迫切需要探索新的药物治疗急性肺损伤。

脂多糖是革兰阴性菌外膜的关键成分,是包括急性肺损伤在内的各种炎症疾病最常见的致病因素之一,常用于急性肺损伤模型的复制^[4-5]。氧化应激是急性肺损伤的重要发病机制之一,脂多糖可诱导细胞内活性氧类(reactive oxygen species, ROS)的产生,进而产生大量肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)等细胞因子,对肺组织造成损伤^[5]。ROS 是重要的调节因子,在急性肺损伤中起重要作用,通常被认为是激活下游信号级联而扩展炎症的次级信使^[5-7]。因此,阻断 ROS 的产生或作用可能对急性肺损伤等炎症疾病有治疗价值。

欧前胡素是呋喃香豆素的衍生物之一,存在于多种中药材中,具有抗炎、抗菌等多种生物活性,体内外有研究表明其对炎症疾病有保护作用^[8-10]。欧前胡素在体内是否抑制脂多糖诱导的 ROS,进而抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/核转录因子 κ B (PI3K/Akt/NF- κ B) 通路对炎症疾病(如急性肺损伤等)起到保护作用尚未见报道。本研究通过脂多糖复制急性肺损伤模型,探究欧前胡素对急性肺损伤的影响,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级健康雌性 BALB/c 小鼠 32 只 [动物室注册批文号: SCXK(湘)2016-0002], 6 周龄,体重(20 \pm 2)g,购自重庆莱彼特生物科技有限公司,动物饲养及实验方案均严格按照西南医科大学动物伦理委员会动物实验规范执行。

1.1.2 主要实验试剂及仪器 欧前胡素购自成都瑞芬思生物科技有限公司,脂多糖(LPS)、ROS 检测荧光探针 DHE 购自上海 Sigma 生物公司,髓过氧化物酶(MPO)试剂盒购自南京建成公司,小鼠 IL-1 β 和 TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉 ELK Bio 公司,PI3K、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化核转录因子 κ B(p-NF- κ B)、Akt、NF- κ B 抗体购自上海 CST 公司,磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体购自上海 Abcam 公司,电泳仪购自北京市六一仪器厂,酶标仪购自山东 Diatek 公司。

1.2 方法

1.2.1 急性肺损伤模型的复制 健康雌性 BALB/c 小鼠 32 只,喂养于 12 h 明暗循环的清洁级动物房,可自由获取食物和水。适应性喂养 2 周后,随机分为正常对照组(Control 组)、模型组(LPS 组)、欧前胡素 30 mg/kg 组(LPS+IMP 30 mg/kg 组)欧前胡素 60 mg/kg 组(LPS+IMP 60 mg/kg 组),每组 8 只小鼠。参照文献[11]的方法复制急性肺损伤动物模型,LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组分别腹腔注射欧前胡素 30 和 60 mg/kg,Control 组、LPS 组腹腔注

射相应体积 3% 二甲基亚砷溶液。1 h 后各组小鼠经腹腔注射水合氯醛 (10%, 4 mg/kg)^[12] 麻醉, LPS 组、LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组小鼠经鼻滴入含 10 μ g 脂多糖的 50 μ l 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, Control 组小鼠经鼻滴入相应体积的 PBS。

1.2.2 肺组织的采集 模型复制 7 h 后, 脱臼处死各组小鼠, 小鼠固定于手术板上, 暴露胸腔无菌条件下迅速取出肺组织, 并冷冻保存备用。

1.2.3 肺湿 / 干重比 取左肺用滤纸擦干后置于玻璃试管中称重, 获得肺组织湿重; 然后将其放置在 70 $^{\circ}$ C 的电热鼓风干燥箱中连续干燥、称重, 直至肺组织重量不再变化, 获得肺组织干重; 计算肺湿重与干重之比, 评价肺组织水肿。

1.2.4 肺组织病理学变化 取小鼠右肺固定于 4% 多聚甲醛中, 经脱水、石蜡包埋后进行 4 μ m 连续切片, 行苏木精 - 伊红 (HE) 染色。参照文献 [13] 的方法进行小鼠肺组织病理损伤评分。

1.2.5 ROS 检测 配置二甲基亚砷溶解 ROS 检测荧光探针 DHE 为 5 mmol/L 的溶液, 避光放置备用; 使用前将溶液按照 1 : 1 000 稀释后备用; 取冷冻保存的右肺组织切片; 制片后, 将稀释好的探针溶液滴加到组织, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 洗去多余探针溶液, 抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 MPO 活力检测 取右肺组织制备肺组织匀浆, 用 MPO 测试盒检测 MPO 活力, 参照该试剂盒说明书分别取肺组织匀浆上清及相应试剂于对照管及测定管中混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 再加入相应试剂混匀, 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 取出后立即在波长 460 nm 处测量各管的光密度 (OD) 值。MPO 活力 (μ g 组织湿重) = (测定 OD 值 - 对照 OD 值) / [11.3 \times 取样量 (g)]。

1.2.7 TNF- α 、IL-1 β 含量检测 取肺组织匀浆上清, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 TNF- α 、IL-1 β 水平, 按照 ELISA 试剂盒说明书分别将 100 μ l 稀释好的标准品与待测样品加入 96 孔的聚乙烯板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 弃掉样品, 加洗涤缓冲液洗涤 3 次; 分别在相应的 96 孔板中每孔加入 100 μ l 生物素化的 TNF- α 、IL-1 β 抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 分别在相应的 96 孔板中每孔加入 100 μ l 链霉亲和素 - 辣根过氧化物酶, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; 分别在相应的 96 孔板中每孔加入 90 μ l 四甲基联苯胺底物稀释溶液, 避光放置 15 min; 每孔加入 50 μ l 终止液; 用酶标仪在波长 450 nm 处测量 OD 值; 计算 TNF- α 、IL-1 β 的浓度。

1.2.8 Western blotting 采用 Western blotting 检测 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B、PI3K、Akt、NF- κ B、MMP-9 蛋白水平, 提取右肺组织总蛋白并检测蛋白浓度, 然后电泳分离蛋白, 转膜, 加入一抗 4 $^{\circ}$ C 封闭蛋白质过夜, 第 2 天弃去一抗, 加入酶标羊抗兔二抗, 滴加化学发光液, 曝光显影。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步的两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺湿 / 干重比的影响

各组小鼠肺湿 / 干重比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组高于 Control 组 ($P < 0.05$); LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组低于 LPS 组 ($P < 0.05$); LPS+IMP 60 mg/kg 组低于 LPS+IMP 30 mg/kg 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织病理学变化的影响

Control 组肺组织结构完整, 肺泡壁未见明显充血, 肺泡间隔内无水肿及炎症细胞浸润, 肺泡腔清晰, 无蛋白、炎症细胞浸润; 与 Control 组比较, LPS 组正常肺组织结构丧失, 肺泡间隔增厚, 可见水肿、充血及炎症细胞浸润, 肺泡腔减少; LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组可见部分正常肺组织结构, 肺泡间隔增厚, 水肿、充血及炎症细胞浸润较 LPS 组减轻, LPS+IMP 60 mg/kg 组肺组织损伤较 LPS+IMP 30 mg/kg 组轻。各组肺组织损伤评分比较, 差异有统计

表 1 各组小鼠肺湿 / 干重比的比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺湿 / 干重比
Control 组	14.93 \pm 3.65
LPS 组	39.05 \pm 3.73 ^①
LPS+IMP 30 mg/kg 组	25.82 \pm 4.99 ^②
LPS+IMP 60 mg/kg 组	19.61 \pm 3.60 ^③
F 值	23.063
P 值	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 LPS+IMP 30 mg/kg 组比较, $P < 0.05$ 。

学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组高于 Control 组 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组低于 LPS 组 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 60 mg/kg 组 低 于 LPS+IMP 30 mg/kg 组 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

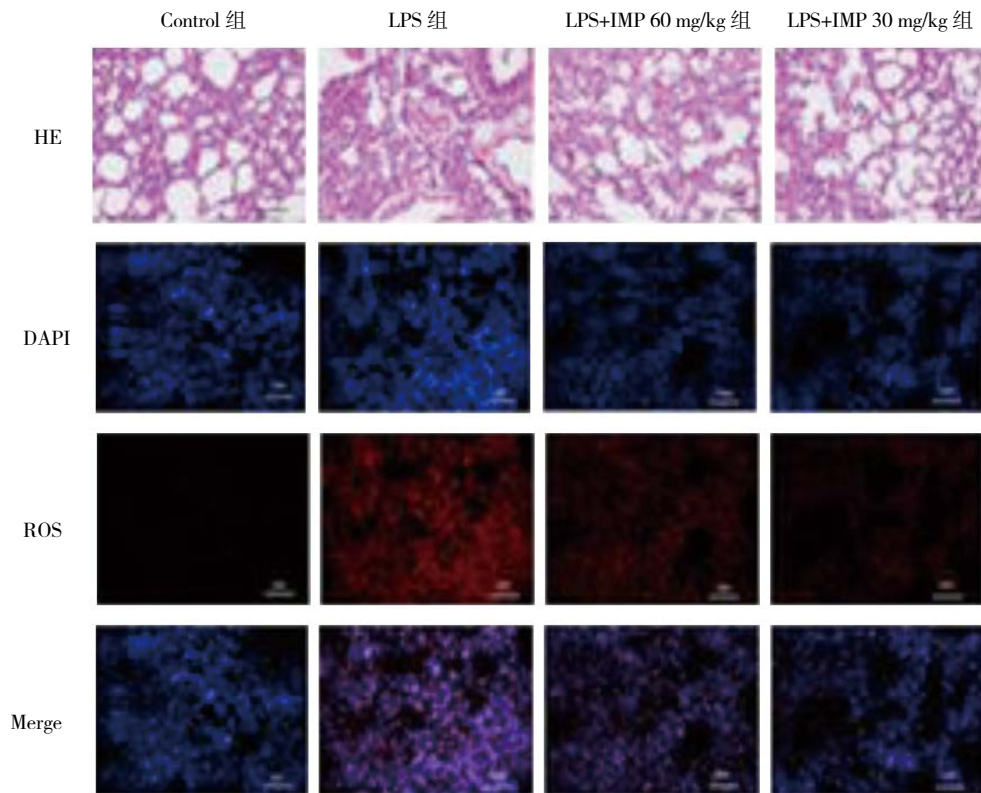
2.3 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织 ROS 相对荧光强度的影响

小鼠肺组织 ROS 相对荧光强度各组比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组肺组织较 Control 组高 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 60 mg/kg 组、LPS+IMP 30 mg/kg

组较 LPS 组低 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS+IMP 30 mg/kg 组低 ($P < 0.05$)。见图 1 和表 2。

2.4 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织 MPO 的影响

各组小鼠肺组织 MPO 活力比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组较 Control 组高 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 30 mg/kg 组 较 LPS 组 低；LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS 组低 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS+IMP 30 mg/kg 组低 ($P < 0.05$)。见表 3。



红色代表 ROS，蓝色代表细胞核，即 DAPI，Merge 代表 DAPI 与 ROS 融合图像

图 1 各组小鼠肺组织 (HE 染色 $\times 200$) 与 ROS 水平 (HE 染色 $\times 400$)

表 2 各组小鼠肺组织损伤评分及 ROS 相对荧光强度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肺组织损伤评分	ROS 相对荧光强度 /%
Control 组	0.67 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00
LPS 组	10.67 \pm 0.33 ^①	92.58 \pm 1.19 ^①
LPS+IMP 30 mg/kg 组	7.22 \pm 0.51 ^②	66.10 \pm 11.09 ^②
LPS+IMP 60 mg/kg 组	4.67 \pm 0.67 ^{②③}	49.46 \pm 5.22 ^{②③}
F 值	66.591	97.075
P 值	0.000	0.000

注：①与 Control 组比较， $P < 0.05$ ；②与 LPS 组比较， $P < 0.05$ ；③与 LPS+IMP 30mg/kg 组比较， $P < 0.05$ 。

2.5 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织 IL-1、TNF- α 的影响

各组小鼠肺组织 IL-1 β 、TNF- α 细胞因子水平比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LPS 组较 Control 组高 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS 组低 ($P < 0.05$)；LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS+IMP 30 mg/kg 组低 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.6 欧前胡素抑制 ROS 介导的 PI3K/Akt/NF- κ B 通路活化及对 MMP-9 蛋白表达的影响

各组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、MMP-9 蛋白表达水平比较，差异有统计学意义

表 3 各组小鼠 MPO 活力的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MPO 活力 (u/g 组织湿重)
Control 组	0.69 ± 0.09
LPS 组	1.54 ± 0.23 ^①
LPS+IMP 30 mg/kg 组	1.28 ± 0.06 ^②
LPS+IMP 60 mg/kg 组	0.78 ± 0.22 ^{②③}
F 值	15.547
P 值	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 LPS+IMP 30 mg/kg 组比较, $P < 0.05$ 。

表 4 各组小鼠肺组织 IL-1、TNF- α 水平的比较

组别	($\bar{x} \pm s$)	
	IL-1 β	TNF- α
Control 组	41.68 ± 4.58	93.40 ± 4.67
LPS 组	132.45 ± 17.25 ^①	226.71 ± 31.99 ^①
LPS+IMP 30 mg/kg 组	76.80 ± 15.11 ^②	156.36 ± 16.05 ^②
LPS+IMP 60 mg/kg 组	66.32 ± 9.56 ^{②③}	125.31 ± 7.08 ^{②③}
F 值	25.573	26.345
P 值	0.000	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较, $P < 0.05$; ③与 LPS+IMP 30 mg/kg 组比较, $P < 0.05$ 。

($P < 0.05$)。LPS 组较 Control 组高 ($P < 0.05$); 与 LPS 组比较, LPS+IMP 30 mg/kg 组、LPS+IMP 60 mg/kg 组较低 ($P < 0.05$); LPS+IMP 60 mg/kg 组较 LPS+IMP 30 mg/kg

组低 ($P < 0.05$) (见表 5)。各组间 Akt、PI3K、NF- κ B p65 蛋白表达水平无明显变化 (见图 2)。

表 5 各组小鼠 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、MMP-9 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K	p-Akt	p-NF- κ B p65	MMP-9
Control 组	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.03
LPS 组	0.64 ± 0.16 ^①	0.40 ± 0.06 ^①	0.62 ± 0.10 ^①	0.58 ± 0.08 ^①
LPS+IMP 30mg/kg 组	0.43 ± 0.06 ^②	0.23 ± 0.01 ^②	0.39 ± 0.02 ^②	0.31 ± 0.06 ^②
LPS+IMP 60mg/kg 组	0.15 ± 0.08 ^{②③}	0.08 ± 0.03 ^{②③}	0.16 ± 0.02 ^{②④}	0.14 ± 0.01 ^{②③}
F 值	19.922	42.573	60.740	49.247
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与 Control 组比较, $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较 $P < 0.05$; ③与 LPS+IMP 30 mg/kg 组比较, $P < 0.05$ 。

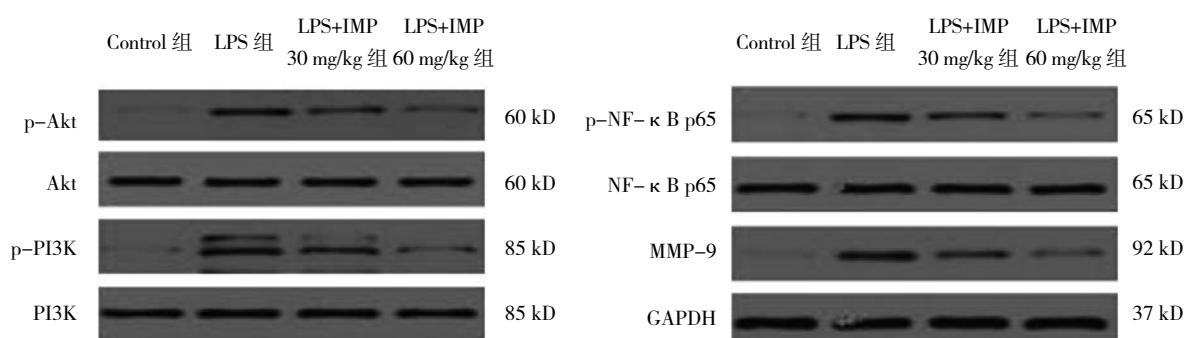


图 2 各组小鼠肺组织中 p-PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、MMP-9 蛋白表达水平情况

3 讨论

急性肺损伤是由各种肺内外致病因素引起的危及生命的疾病, 肺部过度急性弥漫性炎症反应是其主要特点, 导致肺泡上皮和内皮屏障功能障碍, 弥漫性肺泡损伤, 肺泡腔渗出富含蛋白质的液体, 肺泡出血, 肺水肿, 进而肺容积减少, 肺顺应性降低等^[14]。本研究结果显示, LPS 组肺湿/干重比高于 Control 组, 提

示肺水肿, HE 染色示 LPS 组正常肺组织结构丧失, 肺泡间隔增厚, 充血及炎细胞浸润, 肺泡腔减少, 支气管腔内见蛋白及炎症细胞浸润, 提示急性肺损伤^[15], 而欧前胡素预处理上述病理变化有所减轻, 表现出对脂多糖诱导的急性肺损伤有保护作用, 且欧前胡素高剂量组效果优于低剂量组。中性粒细胞浸润是急性肺损伤的特征之一, 其可通过脱颗粒释放出杀菌蛋白,

同时释放细胞因子、ROS, 以及中性粒细胞外陷阱的产生对疾病的发生、发展起重要作用。MPO 由中性粒细胞分泌, 可用于评估中性粒细胞在肺组织中的积聚^[16-17]。本研究显示脂多糖刺激使急性肺损伤小鼠肺组织中 MPO 活力升高, 中性粒细胞在肺组织中大量积聚, 而欧前胡素预处理使 MPO 活力降低, 中性粒细胞在肺组织中积聚减少, 且欧前胡素剂量高者优于剂量低者。

基质金属蛋白酶是一组锌依赖的内肽酶, 参与急性肺损伤的发生, MMP-9 属于明胶酶亚类, MMP-9 是已知的降解细胞外基质的主要成分。MMP-9 从活化的中性粒细胞中释放, 其可降解细胞外基质的主要成分, 包括细胞间连接蛋白、基底膜和将细胞锚定在基底膜上的蛋白质, 从而增加肺泡毛细血管通透性, 介导炎症细胞向肺泡间隙的迁移, 蛋白渗漏, 肺组织细胞外间隙含水量增加, 导致肺结构的广泛改变, 其还可活化细胞因子、趋化因子等, 最终放大气道炎症。有研究显示减低 MMP-9 对急性肺损伤有保护作用^[16, 18-20]。TNF- α 、IL-1 β 等在急性肺损伤中起重要作用, 可启动、放大和维持急性肺损伤的炎症反应^[16]。据报道, IL-1 β 可引起促炎细胞因子和趋化因子产生, 炎症细胞聚集, 减少上皮钠通道, 改变内皮-上皮屏障通透性和液体运输, 导致肺水肿等造成急性肺损伤^[21-22]。TNF- α 是炎症反应的主要调节因子, 失调的 TNF- α 信号使细胞发生氧化应激、坏死及凋亡, 刺激白细胞在损伤和感染部位的积累、增殖和分化, 激活组织中中性粒细胞及巨噬细胞, 该活化的炎症细胞又可分泌 TNF- α 和其他促炎细胞因子, 趋化因子等造成急性肺损伤^[6, 23]。本研究显示, 脂多糖刺激使 MMP-9 蛋白表达水平升高, 小鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 水平升高, 而欧前胡素预处理使 MMP-9 蛋白表达水平降低, TNF- α 、IL-1 β 的释放减少, LPS+IMP 60 mg/kg 组效果优于 LPS+IMP 30 mg/kg 组。表明欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用可能与降低 MMP-9 蛋白表达及减少 TNF- α 、IL-1 β 的释放, 进而减轻肺组织水肿、蛋白渗出、炎症细胞的迁移积聚, 减少细胞因子等的释放活化有关。

ROS 包括羟基自由基、超氧化物和过氧化氢氧自由基, 主要由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶参与产生^[24]。ROS 在炎症性疾病中, 尤其是急性肺损伤中起重要的作用, 是扩展炎症的次级信使^[5]。ROS 还可介导 PI3K/Akt/NF- κ B 通路激活增加炎症细胞因子

等的释放^[5, 10]。PI3K/Akt 通路是炎症反应的重要信号级联, 是 NF- κ B 的上游分子, 可使 NF- κ B 激活^[25-27]。有研究显示抑制 PI3K/Akt 的磷酸化, 对急性肺损伤有保护作用^[5, 28]。NF- κ B 在炎症的调控中起着关键作用^[26, 29], NF- κ B 家族包括 NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52)、RelA (p65)、c-Rel 和 RelB, 其都包含有介导二聚化, DNA 结合, 核定位的 Rel 同源结构域, 仅 RelA (p65)、c-Rel 和 RelB 包含有靶基因表达所必需的转录激活结构域, NF- κ B 家族中的各成员间可以彼此缔合成各种异二聚体和同二聚体^[10]。NF- κ B 常由 p50/p65 亚基组成, 调控炎症反应^[5]。RelA (p65) 的核易位使炎症细胞因子等基因表达^[1], 从而导致 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的生成及 MMP-9 蛋白的表达。该研究显示, 欧前胡素预处理可使脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织中 ROS 水平降低, PI3K/Akt/NF- κ B 通路磷酸化水平降低, 有体外研究表明欧前胡素可抑制 ROS 介导的 PI3K/Akt/NF- κ B 通路激活^[10], 表明欧前胡素可能是通过阻断脂多糖诱导的急性肺损伤中的 ROS, 以及阻断 ROS 介导的 PI3K/Akt/NF- κ B 通路激活有关, 对急性肺损伤表现出保护作用。而 TNF- α 、IL-1 β 对 TNF- α 、IL-1 β 起正反馈作用, 使 NF- κ B 激活增加, 进一步促进细胞因子的释放, 从而放大炎症反应^[30]。该研究表明, 欧前胡素预处理可减低细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 等的释放, 从而减少其对 NF- κ B 的正反馈作用, 减少细胞因子的进一步增加, 减少炎症反应的瀑布效应, 对急性肺损伤起保护作用。

综上所述, 与 Control 组比较, LPS 组脂多糖刺激可致急性肺损伤, 使肺组织水肿, 肺泡完整性破坏, 蛋白及炎症细胞渗出, 中性粒细胞浸润, 肺泡腔减少, 并使细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放增加, MMP-9 的表达水平升高, 提高 ROS 水平, 提高 PI3K、Akt、NF- κ B p65 的磷酸化; 而欧前胡素预处理可使脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织中 ROS 水平降低, 降低 PI3K、AKT、NF- κ B p65 的磷酸化, 减少细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放, 降低 MMP-9 的表达水平, 从而减轻肺水肿, 减轻中性粒细胞浸润, 减轻肺组织病理变化, 减轻小鼠急性肺损伤。因此, 欧前胡素对脂多糖诱导的急性肺损伤有保护作用, 其可能与减少细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放, 降低 MMP-9 的表达水平有关, 其作用机制可能与脂多糖诱导的急性肺损伤中 ROS 被抑制, 以及 ROS 介导的 PI3K/Akt/

NF- κ B 通路被抑制有关。该实验存在一定的局限: ①样本量偏小, 但本实验中该样本量仍具有统计学意义, 下一步可增大样本量进一步研究; ②欧前胡素是否通过其他机制对脂多糖诱导的急性肺损伤发挥保护作用有待进一步探索。该实验为欧前胡素治疗急性肺损伤提供了一定的实验依据和理论基础。

参 考 文 献:

- [1] POOLADANDA V, THATIKONDA S, BALE S, et al. Nimbolide protects against endotoxin-induced acute respiratory distress syndrome by inhibiting TNF- α mediated NF- κ B and HDAC-3 Nuclear translocation[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 81.
- [2] HAMACHER J, HADIZAMANI Y, BORGMANN M, et al. Cytokine-Ion channel interactions in pulmonary inflammation[J]. *Front Immunol*, 2018, 4(8): 1644.
- [3] MATTHAY M A, ZEMANS R L, ZIMMERMAN G A, et al. Acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 18.
- [4] ROCCO P R, NIEMAN G F. ARDS: what experimental models have taught us[J]. *Intensive Care Med*, 2016, 42(5): 806-810.
- [5] JIANG K, GUO S, YANG C, et al. Barbaloin protects against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury by inhibiting the ROS-mediated PI3K/AKT/NF- κ B pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64: 140-150.
- [6] MALAVIYA R, LASKIN J D, LASKIN D L. Anti-TNF- α therapy in inflammatory lung diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 18: 90-98.
- [7] BLASER H, DOSTERT C, MAK T W, et al. TNF and ROS crosstalk in inflammation[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(4): 249-261.
- [8] LIU M J, ZHANG G H, ZHENG C, et al. Activating the pregnane X receptor by imperatorin attenuates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175(17): 3563-3580.
- [9] ZHANG X X, LI W C, ABUDUREHEMAN A, et al. Imperatorin possesses notable anti-inflammatory activity in vitro and in vivo through inhibition of the NF- κ B pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8619-8626.
- [10] WANG K S, LV Y, WANG Z, et al. Imperatorin efficiently blocks TNF- α -mediated activation of ROS/PI3K/Akt/ NF- κ B pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(6): 3397-3404.
- [11] SUN J J, CHI G, SOROMOU L W, et al. Preventive effect of imperatorin on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 369-374.
- [12] 孟璐. 右美托咪定对 LPS 诱导急性肺损伤的保护作用及机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [13] 邱建磊. 谷氨酰胺对机械通气肺损伤的保护作用及机制 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [14] FAN E, BRODIE D, SLUTSKY A S. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment[J]. *JAMA*, 2018, 319(7): 698-710.
- [15] AEFNER F, BOLON B, DAVIS I C. Mouse models of acute respiratory distress syndrome: a review of analytical approaches, pathologic features, and common measurements[J]. *Toxicol Pathol*, 2015, 43(8): 1074-1092.
- [16] CHAO W, DENG J S, HUANG S S, et al. 3, 4-dihydroxybenzalacetone attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury via down-regulation of MMP-2 and MMP-9 activities through suppressing ROS-mediated MAPK and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 50: 77-86.
- [17] POTEY P M, ROSSI A G, LUCAS C D, et al. Neutrophils in the initiation and resolution of acute pulmonary inflammation: understanding biological function and therapeutic potential[J]. *J Pathol*, 2019, 247(5): 672-685.
- [18] LIANG Y F, YANG N, PAN G, et al. Elevated IL-33 promotes expression of MMP-2 and MMP-9 via activating STAT3 in alveolar macrophages during LPS-induced acute lung injury[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2018, 23: 52.
- [19] ZHANG F, HU L, WU Y X, et al. Doxycycline alleviates paraquat induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72: 243-251.
- [20] ZHANG X, SUN C Y, ZHANG Y B, et al. Kegan Liyan oral liquid ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway and MMP-9 expression[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 186: 91-102.
- [21] ZHENG D Y, ZHOU M, JIN J, et al. Inhibition of p38 MAPK downregulates the expression of IL-1 β to protect lung from acute injury in intestinal ischemia reperfusion rats[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 9348037.
- [22] JIA X H, CAO B, AN Y Q, et al. Rapamycin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting IL-1 β and IL-18 production[J]. *Int Immunopharma*, 2019, 67: 211-219.
- [23] LAI W Y, WANG J W, HUANG B T, et al. A novel TNF- α -targeting aptamer for TNF- α -mediated acute lung injury and acute liver failure[J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1741-1751.
- [24] KELLNER M, NOONEPALLE S, LU Q, et al. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS)[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 967: 105-137.
- [25] HSIEH Y H, DENG J S, CHANG Y S, et al. Ginsenoside Rh2 ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by regulating the TLR4 PI3K/Akt/mTOR, Raf-1/MEK/ERK, and Keap1 Nrf2 HO-1 signaling pathways in mice[J]. *Nutrients*, 2018, 10(9): E1208.
- [26] KONDYLIS V, KUMARI S, VLANTIS K, et al. The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation[J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 113-127.

- [27] ZHOU B, WENG G, HUANG Z, et al. Arctiin prevents LPS-induced acute lung injury via inhibition of PI3K/AKT signaling pathway in mice[J]. *Inflammation*, 2018, 41(6): 2129-2135.
- [28] MENG L, LI L Y, LU S, et al. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. *Mol Immunol*, 2018, 94: 7-17.
- [29] AFONINA I S, ZHONG Z, KARIN M, et al. Limiting inflammation-the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(8): 861-869.
- [30] CATRYSSSE L, van LOO G. Inflammation and the metabolic syndrome: The tissue-specific functions of NF- κ B[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(6): 417-429.

(张西倩 编辑)

本文引用格式：华俊萍，王宋平. 欧前胡素对小鼠急性肺损伤的影响及其机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(13): 11-18.