

川芎嗪对内毒素诱导大鼠急性肺损伤的保护作用

张高峰,赵士弟,李 佳,杨锡兰,李 言

[摘要] **目的:**探讨川芎嗪(TMP)对内毒素(LPS)诱导大鼠急性肺损伤(ALI)的保护作用。**方法:**24只健康Wistar大鼠随机分为4组:对照组、LPS组、TMP I组(40 mg/kg)和II组(80 mg/kg),每组各6只。腹腔注射LPS 1 mg/kg,16 h后再次气管滴注LPS 3 mg/kg,造成内毒素二次打击,建立大鼠ALI模型。于气管滴注LPS后3 h处死大鼠,4%多聚甲醛固定后制作病理切片,同时测肺湿/干重比,测量肺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)含量。Western-blot测肺组织中RhoA、ROCK2蛋白表达量,RT-PCR测肺组织中ROCK2 mRNA表达量。**结果:**与对照组比较,LPS组病理切片显示大鼠肺间质水肿,肺泡腔内可见出血及大量炎性细胞渗出,肺湿/干重比、MPO活性及MDA含量均明显增加($P < 0.01$),RhoA及ROCK2蛋白表达显著升高($P < 0.01$),ROCK2 mRNA表达明显升高($P < 0.01$)。而TMP I组和II组的肺湿/干重比、MPO活性、MDA含量、RhoA及ROCK2指标均较LPS组显著减轻($P < 0.05 \sim P < 0.01$),而TMP I组和II组上述各指标间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**TMP对LPS诱导的大鼠ALI可能有保护作用。

[关键词] 川芎嗪;肺损伤;内毒素;髓过氧化物酶;丙二醛

[中国图书资料分类法分类号] R 563 [文献标志码] A

Protective effect of tetramethylpyrazine on the acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rat

ZHANG Gao-feng, ZHAO Shi-di, LI Jia, YANG Xi-lan, LI Yan

(Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of tetramethylpyrazine (TMP) on the acute lung injury induced (ALI) by lipopolysaccharide (LPS) in rats. **Methods:** All rats were randomly into the control group, LPS group, TMP I group (injected with 40 mg/kg) and TMP II group (injected with 80 mg/kg) (6 rats each group). The twenty-four ALI model Wistar rats were established by injecting 1 mg/kg of LPS into abdominal cavity, and dripping 3 mg/kg of LPS into trachea after 16 hours. The rats were sacrificed, fixed with 4% paraformaldehyde and treated with pathology at 3 hours after treatment with tetramethylpyrazine. The wet/dry weight ratio of lung and levels of MPO and MDA in lung tissues were measured. The protein expressions of RhoA and ROCK2, and mRNA expression of ROCK2 in lung tissues were detected using western-blot and RT-PCR, respectively. **Results:** Compared with the control group, the pathological section showed that the pulmonary interstitial edema, alveolar cavity bleeding, inflammatory cells exudate, wet/dry weight ratio of lung, MPO activity and MDA content increased significantly in LPS group ($P < 0.01$), the protein expressions of RhoA and ROCK2, and mRNA expression of ROCK2 were also increased in LPS group ($P < 0.01$). The wet/dry weight ratio of lung, MPO activity, MDA content and indexes of RhoA and ROCK2 in TMP I group and TMP II group were significantly less than those in LPS group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$), but their differences between TMP I group and TMP II group were not statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusions:** Tetramethylpyrazine can protect against the acute lung injury induced by LPS in rats.

[Key words] tetramethylpyrazine; lung injury; lipopolysaccharide; myeloperoxidase; malondialdehyde

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是多种炎症细胞介导的肺部炎症反应,多见于重大创伤、休克、严重感染等病理过程中,并可导致呼吸窘迫综合征

(ARDS)。ALI肺组织超微结构的主要变化是肺血管内皮屏障完整性破坏和内皮细胞间隙的改变^[1],这时ALI是肺内或全身失控的炎症反应发生的基础。而Rho/Rho激酶(ROCK)信号转导途径的激活在超微结构改变中起到重要作用。目前认为,小G蛋白Rho开启“分子开关”作用后,激活下游靶分子ROCK,进一步引起下游的级联反应进而参与许多细胞功能的调节,包括血管平滑肌细胞的收缩反应、肌动蛋白细胞骨架的重组、细胞附着和迁移运动、细胞增殖分化和基因表达等^[2]。关于该通路的研究主要集中于心脑血管疾病方面,但ROCK与脓毒症

[收稿日期] 2013-11-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81202833);安徽省教育厅青年基金资助项目(KJ2012B100);安徽省自然科学基金资助项目(1308085MH140);蚌埠医学院科技创新项目(bykf12A02)

[作者单位] 蚌埠医学院 病理生理学教研室,安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张高峰(1989-),男,硕士。

[通信作者] 李 言,博士,讲师。E-mail: yanniblossom@gmail.com

急性肺损伤的发生有着密切的关系^[3]。鉴于 ROCK 在增加内皮细胞通透性及炎症反应中的促进作用,推测其可能在 ALI 中起到关键的靶点作用。川芎嗪 (TMP) 是治疗脑血栓、冠心病等疾病的一种新型药物,能有效改善机体血液流变学、保护血管内皮细胞^[4-5]。本研究拟建立内毒素 (LPS) “二次打击”诱导大鼠 ALI 模型,肺组织切片 HE 染色、检查髓过氧化物酶 (MPO) 活性、丙二醛 (MDA) 含量,观察、评估肺组织损伤严重程度,检测 RhoA、ROCK2 蛋白表达量及 ROCK mRNA 表达量,探讨 TMP 对 ALI 的影响及 ROCK 信号转导途径在其中可能的分子生物学机制。

1 资料与方法

1.1 动物、药物和试剂 成年 Wistar 大鼠,体质量 200 ~ 250 g (本院动物中心提供); LPS 055: B5 (美国 Sigma 公司); 注射用盐酸 TMP (每瓶 80 mg, 合肥平光制药有限公司); 兔抗大鼠 ROCK2 抗体 (cell signaling 公司)、RhoA 抗体 (santa cruz biotechnology); β -actin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (武汉博士德生物工程有限公司); 第一条链合成试剂盒 (天根生化有限公司); PCR master mix (Fermentas 公司); MPO 试剂盒、MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 动物模型与分组 24 只 Wistar 大鼠随机分成 4 组, 每组 6 只。建立二次打击模型: 腹腔注射 LPS (1 mg/kg), 16 h 后气管滴注 LPS (3 mg/kg), 造成二次打击, 建立 ALI 模型^[6]。其中 LPS 组: 在腹腔注射 LPS 前半小时, 腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液进行预处理, 在气管滴注 LPS 之后 1 h 再次腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液。TMP I 组: 在腹腔注射 LPS 前半小时, 腹腔注射 TMP 40 mg/kg 进行预处理, 在气管滴注 LPS 之后 1 h 再次腹腔注射 TMP 40 mg/kg。TMP II 组: 步骤同 TMP I 组, TMP 注射剂量为 80 mg/kg。对照组: 步骤同 LPS 组, 用等量 0.9% 氯化钠注射液替代 LPS。各组于气管滴注 LPS 3 h 后处死。

1.3 检测指标

1.3.1 肺湿/干重比测定 用滤纸吸干肺表面水分, 称重并且记录, 置 70 °C 烘箱 48 h 至恒重后称量肺干重, 计算肺湿干重比, 并以此评估肺组织的水肿程度。

1.3.2 肺组织病理形态 于相应的时间点麻醉动物并处死, 开胸取右下肺, 经 4% 多聚甲醛固定、脱

水、包埋、切片、染色、封片等步骤, 用普通光学显微镜观察切片。

1.3.3 肺组织 MDA 含量和 MPO 活性检测 按照试剂盒说明书, 采用比色法测定。

1.3.4 Western blot 测肺组织 RhoA、ROCK2 蛋白水平 于匀浆器中加入细胞裂解液和肺组织, 匀浆后提取总蛋白, BCA 测定样品总蛋白含量。加上样缓冲液煮沸变性后, 取 50 μ g 蛋白样品于 SDS-PAGE 凝胶 (5% 浓缩胶; RhoA 使用 15% 分离胶, ROCK2 使用 8% 分离胶) 中进行电泳。电转移至 PVDF 膜上 (RhoA: 200 mA 2 h; ROCK2: 35 V 12 h)。5% BSA 室温封闭 2h。分别加入稀释比 1:1 000 的 RhoA 抗体、ROCK2 抗体和稀释比 1:500 的内参 (β -actin), 4 °C 孵育过夜, 加入辣根过氧化物标记的二抗室温孵育 2 h 后 ECL 化学发光, 凝胶成像系统照相。用 quantity one 进行积分光密度 (IOD) 值分析, 与 β -actin 蛋白 IOD 值之比作为蛋白相对表达量。

1.3.5 肺组织 ROCK2 mRNA 表达 用 Trizol 试剂盒提取肺组织的总 RNA, 按试剂盒步骤进行 RT-PCR。ROCK2 引物为: 上游 5' CCA GTA TAG GCA GTG GAC CAG 3', 下游 5' GGT CGG ACA TGA AAT AGC TTG T3', 产物长度为 232 bp; GAPDH 引物为: 上游 5' AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG 3', 下游 5' CCA GTA GAC TCC ACG ACA TAC TCA 3', 产物长度为 137 bp。按试剂盒说明书进行第 1 条链合成。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 56 ~ 58 °C 复性 (ROCK2 56 °C, GAPDH 58 °C) 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增后 2% 琼脂糖凝胶电泳, 成像系统观察结果并拍照, 分析吸光度积分值, 用 ROCK2 PCR 产物与内参照 GAPDH PCR 产物的吸光度值之比作为 mRNA 的相对含量。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 4 组大鼠肺湿/干重比值、肺组织中 MPO 活性和 MDA 水平比较 LPS 组大鼠肺湿/干重比值、MPO 活性、MDA 含量较对照组显著增大 ($P < 0.01$); 与 LPS 组比较, TMP I 组和 TMP II 组大鼠肺湿/干重比值、MPO 活性、MDA 含量均下降 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。而 TMP I 组与 TMP II 组上述各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 1)。

2.2 肺组织病理改变 对照组肺泡结构完整, 肺泡腔清晰可见, 肺泡腔内无明显渗出。LPS 组大体观

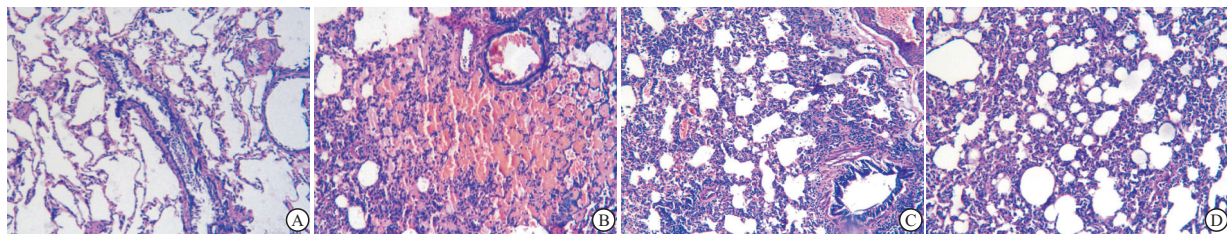
可见肺表面有斑点状出血灶,体积增大;光镜观察可见肺泡间隔增厚,肺间质及肺泡大量炎性细胞浸润,毛细血管扩张、出血,部分视野可见肺泡结构紊乱、膨胀不全或肺泡融合。TMP I、II 组镜下显示病变程度较对照组轻,渗出比对照组明显减少,其中 II 组 TMP 渗出减少更显著(见图 1)。

表 1 4 组大鼠肺组织湿干重比值及 MDA、MPO 水平变化 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	肺湿/干重比值	MPO/(U/g)	MDA/(nmol/mg)
对照组	3.31 ± 0.37	1.22 ± 0.17	1.49 ± 0.34
LPS 组	4.33 ± 0.44 **	2.07 ± 0.33 **	4.01 ± 0.44 **
TMP I 组	3.73 ± 0.40 #	1.73 ± 0.28 **	3.51 ± 0.34 **
TMP II 组	3.53 ± 0.38 ##	1.65 ± 0.26 **	3.35 ± 0.28 **
<i>F</i>	7.16	10.30	58.04
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.159	0.071	0.126

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 LPS 组比较#

$P < 0.05$, ## $P < 0.01$



A:对照组; B:LPS组; C:TMP I 组; D:TMP II 组

图1 肺组织HE染色切片

表 2 4 组大鼠肺组织 RhoA、ROCK2 蛋白及 ROCK2 mRNA 表达水平比较 ($n_i = 6; \bar{x} \pm s$)

分组	RhoA	ROCK2	ROCK2 mRNA
对照组	0.33 ± 0.10	1.22 ± 0.17	2.27 ± 0.19
LPS 组	0.55 ± 0.10 **	2.07 ± 0.33 **	2.79 ± 0.16 **
TMP I 组	0.41 ± 0.09 #	1.73 ± 0.28 **	2.56 ± 0.24 *
TMP II 组	0.39 ± 0.08 #	1.65 ± 0.26 **	2.55 ± 0.17 *
<i>F</i>	6.03	10.33	7.33
<i>P</i>	<0.01	$P < 0.01$	$P < 0.01$
<i>MS</i> 组内	0.009	0.071	0.037

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;与 LPS 组比较#

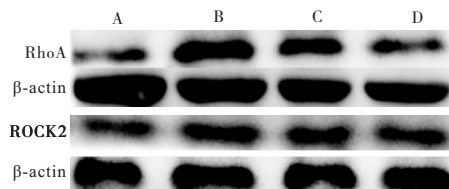
$P < 0.05$

形成,通透性增加,引发 ALI。孙耕耘等^[8]研究发现,这种通透性增高与 F-肌动蛋白解聚密切相关。F-肌动蛋白是肌动蛋白的多聚体,在维持细胞骨架、稳定细胞通透性上起重要作用。此外,这种微血管通透性的增加出现在炎性细胞因子的血浆峰值及黏附分子表达之前^[9]。这提示 LPS 可直接损伤内皮

2.3 大鼠肺组织 RhoA、ROCK2 蛋白和 ROCK2 mRNA 表达水平比较 对照组大鼠肺组织 RhoA、ROCK2 蛋白和 ROCK2 mRNA 表达均明显低于 LPS 组 ($P < 0.01$)。TMP I 组和 TMP II 组中 RhoA、ROCK2 蛋白和 ROCK2 mRNA 表达均低于 LPS 组 ($P < 0.05$),而 TMP I 组和 TMP II 组 RhoA、ROCK2 蛋白和 ROCK2 mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (见表 2、图 2~3)。

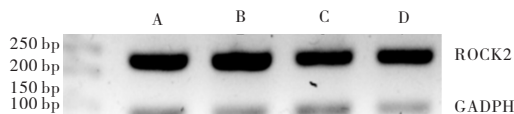
3 讨论

ALI 的病因很多,主要包括严重脓毒症、创伤、重症肺炎等。其中,脓毒症患者中 ARDS 的发生率为 18%~38%,病死率高达 90%^[7]。G⁻ 细菌细胞壁成分 LPS 与脓毒症的发生密切相关。LPS 可以直接或间接导致 ALI 的发生。直接损伤作用为 LPS 可以直接损伤内皮细胞,使内皮细胞收缩,细胞间裂



A:对照组; B:LPS组; C:TMP I 组; D:TMP II 组

图2 大鼠肺组织RhoA蛋白、ROCK2蛋白表达



A:对照组; B:LPS组; C:TMP I 组; D:TMP II 组

图3 大鼠肺组织ROCK2 mRNA蛋白表达

细胞,使其通透性增高。间接损伤作用为 LPS 进入机体后,通过被宿主受体识别并启动炎症级联反应,激活中性粒细胞、肺泡巨噬细胞等并释放多种炎症因子,包括趋化因子、促炎因子、黏附分子、活性氧等。而这些促炎因子和抗炎因子的失衡引起的全身炎症反应综合征被认为是引起 ALI 的重要机制之

一。这些炎症介质包括:核因子- κ B,促炎因子白介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等,抗炎因子IL-4、IL-10等。MPO水平及活性变化代表着嗜中性白细胞的功能和活性状态,MDA则反映脂质过氧化,本实验中以上2个指标及病理切片、肺湿/干重比值等其他指标均提示LPS造成了严重的肺损伤,造模成功。

ALI的发生主要有2个层面的因素:一是内皮细胞间隙增大,通透性升高;二是通透性升高后各种细胞及细胞因子引起的全身炎症反应。其中,Rho/ROCK信号转导通路在前者的发生发展中起到重要的作用。Rho蛋白为小分子鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(又称小G蛋白),包括RhoA、RhoB和RhoC。Rho蛋白参与了多种细胞代谢过程,包括细胞骨架肌动蛋白的重组、细胞生长、增殖、分化和活性氧产生等。Rho可在GDP与GTP间转化,当Rho与GTP结合,由细胞质内转移至细胞膜,激活ROCK。ROCK的下游靶分子很多,主要包括肌球蛋白轻链(MLC)、肌球蛋白轻链磷酸酶(MLCP)、细胞骨架连接蛋白(ERM)、单丝氨酸蛋白(LIM)激酶等约20余种^[10]。ROCK增加血管通透性的机制主要通过以下几个方面:(1)活化的ROCK作用于MLCP,并使其失活,失活的MLCP抑制了MLC脱磷酸化,间接导致磷酸化的MLC水平增高,使肌球蛋白交联增加,微丝骨架收缩^[11]。(2)ROCK还能直接磷酸化MLC,促进细胞骨架收缩。(3)ROCK还能使ERM发生磷酸化,促进其与肌动蛋白和跨膜受体间的相互作用和应力纤维的形成,加剧了血管内皮的渗出^[12]。(4)ROCK可使LIM激酶发生磷酸化,灭活丝切蛋白。后者是一种微丝解聚因子,调节肌动蛋白动力学,抑制肌动蛋白解聚,间接促进应力纤维的形成,增加内皮细胞的通透性。此外,ROCK还能提高细胞对钙的敏感性而增强血管内皮通透性。本实验中LPS组RhoA蛋白、ROCK2蛋白及ROCK2 mRNA表达均明显高于对照组,提示Rho/ROCK信号转导通路参与了ALI的病理过程。

川芎是历史悠久的传统活血化瘀中药,其有效成分是TMP,属酰胺类生物,碱化学结构为四甲基吡嗪。研究^[12-13]发现,TMP在扩张微血管、改善微循环、保护心脑血管缺血性损伤等方面有着重要的作用。近期研究^[14]还提示,TMP可以通过减轻机体过度的炎症反应、改善组织器官的微循环等作用,阻止脓毒症的进展。本研究显示,TMP I组和TMP II组较LPS组肺湿/干重比、MPO活性及MDA含量均下降($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),肺组织中炎性细胞渗出减少,说明TMP对ALI大鼠有保护作用。同时,

TMP I、II组RhoA蛋白、ROCK2蛋白及ROCK2 mRNA表达均显著低于LPS组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),提示TMP保护ALI分子机制可能与抑制RhoA/ROCK信号转导通路有关。然而TMP对RhoA/ROCK通路详细的调控机制以及TMP在LPS诱导的肺损伤中的地位和具体机制等问题尚不清楚,还需要进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, *et al.* Endothelial pathomechanisms in acute lung injury [J]. *Vascul Pharmacol*, 2008, 49(4/6): 119 - 133.
- [2] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(1): 153 - 208.
- [3] Tasaka S, Koh H, Yamada W, *et al.* Attenuation of endotoxin-induced acute lung injury by the Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632 [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32(6): 504 - 510.
- [4] Lu B, Yu L, Li S, *et al.* Alleviation of CCl₄-induced cirrhosis in rats by tetramethylpyrazine is associated with downregulation of leptin and TGF- β 1 pathway [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, 33(3): 310 - 315.
- [5] Mei D, Mao S, Sun W, *et al.* Effect of chitosan structure properties and molecular weight on the intranasal absorption of tetramethylpyrazine phosphate in rats [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70(3): 874 - 881.
- [6] Wang HM, Bodenstern M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury [J]. *Eur Surg Res*, 2008, 40(4): 305 - 316.
- [7] 陈肖, 曾因明. 内毒素两次打击大鼠急性呼吸窘迫综合征模型的研究 [J]. *南通医学院学报*, 2004, 24(3): 256 - 258.
- [8] 孙耕耘, 肖贞良, 方传彪. 山莨菪碱对内毒素致肺微血管内皮细胞骨架变化的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2001, 17(2): 197 - 199.
- [9] Okajima K. Regulation of inflammatory responses by endothelial cells--Understanding the molecular mechanism (s) and its therapeutic application to sepsis [J]. *Masui*, 2008, 57(3): 311 - 320.
- [10] Loirand G, Guérin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology [J]. *Circ Res*, 2006, 98(3): 322 - 334.
- [11] Matsui T, Maeda M, Doi Y, *et al.* Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association [J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(3): 647 - 657.
- [12] 李薇. 疏甲丙脯酸、川芎嗪联合应用对慢性肺源性心脏病心衰功能的影响 [J]. *中国社区医师*, 2012, 14(33): 121 - 122.
- [13] 王齐荣. 川芎嗪对心肺复苏后脑缺血再灌注损伤的临床研究 [J]. *中国实用医药*, 2012, 7(17): 157.
- [14] 刘丹, 周发春. 川芎嗪对脓毒症诱导的急性肺损伤小鼠血管内皮生长因子水平变化的影响 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(2): 199 - 202.