

灯盏花素肺部给药抗 LPS 致大鼠急性肺损伤的作用研究

董彦琴¹⁾, 李 健¹⁾, 张路晗²⁾ 张 旋¹⁾, 李 晨¹⁾, 王殿华¹⁾

(1) 昆明医学院云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650031; 2) 云南省食品药品监督管理局, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 从组织因子(TF)的途径研究灯盏花素肺部给药抗内毒素 (LPS) 致大鼠急性肺损伤 (ALI)的作用. **方法** 健康 SD 大鼠 120 只随机分成 5 组 (n=24): 正常组、生理盐水组、灯盏花素组、LPS 组和灯盏花素 + LPS 组; 观察 2、6、12 h 的肺组织病理形态学变化、肺组织湿 / 干比、肺组织 MPO 活力、肺组织蛋白含量、血浆和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TF 含量. **结果** 与 LPS 组相比, 灯盏花素 + LPS 组大鼠肺组织损伤减轻, 肺组织湿 / 干比下降 ($P < 0.05$), 肺组织 MPO 活力下降 ($P < 0.05$), BALF 蛋白含量减少 ($P < 0.05$), 血浆和 BALF 中 TF 含量明显下降 ($P < 0.05$). **结论** 灯盏花素肺部给药对肺组织 TF 的产生具有抑制作用, 能够减轻 LPS 致大鼠的 ALI 的损伤程度.

[关键词] 内毒素; 急性肺损伤; 组织因子; 灯盏花素; 大鼠

[中图分类号] R 563.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2007) 06-0001-05

Therapeutic Effect of Pulmonary Delivery of Breviscapine on Rat with Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide

DONG Yan-qin¹⁾, LI Jian¹⁾, ZHANG Lu-han²⁾, ZHANG Xuan¹⁾, LI Chen¹⁾, WANG Dian-hua¹⁾

(1) Yunnan Pharmacological Laboratory of Natural Products, Kunming Medical College, Yunnan Kunming 650031; 2) Yunnan Food and Drug Administration, Yunnan Kunming 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore therapeutic effect of pulmonary delivery of breviscapine on rat with acute lung injury induced by lipopolysaccharide from tissue factor path way. **Methods** Healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups (n=24): control, saline, breviscapine group, lipopolysaccharide groupe, breviscapine+lipopolysaccharidegroup, the changes of lung histopathological were observed, the changes of lung W/D ratio and lung MPO activity were measured, total protein concentration in BALF and TF concentration in BALF as well as in plasma were measured. All changes were observed at 2 h, 6 h and 12 h. **Results** Compared with LPS group, the lung injury was evidently meliorated in breviscapine+ lipopolysaccharide group, the lung W/D ratio was evidently lower ($P < 0.05$), lung MPO activity ($P < 0.05$) and total protein concentration in BALF were also evidently lower ($P < 0.05$), TF concentration was also marked lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Pulmonary delivery of breviscapine can inhibit TF productivity in the lung and meliorate the change of ALI.

[Key words] Lipopolysaccharide; Acute lung injury; Tissue factor; Breviscapine; Rat

[基金项目] 云南省医药与生物技术创新人才联合培养基地基金资助; 昆明医学院创新群体基金项目 (KMC 2005 DG04)

[作者简介] 董彦琴 (1976~), 女, 山西五台县人, 在读硕士, 主要从事肺的病理生理与药理学研究.

[通讯作者] 王殿华. E-mail: wangdianhuakm@126.com

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由局部或全身多种疾病引起的一种常见的危重病, 发病机制复杂, 至今尚未完全阐明^[1], 目前认为肺泡内纤维蛋白沉积是 ALI 的一个重要特征^[2-4], 但其发生机制尚不十分清楚^[5]. 近年来研究表明, 在 ALI 发生过程中肺泡内发生纤维蛋白沉积与组织因子通路、蛋白 C 通路及纤维蛋白溶解异常导致凝血与纤维蛋白溶解失衡密切相关^[6]. 目前尚缺乏新的特异性强的治疗手段. 肺泡上皮是肺内纤维蛋白沉积的主要部位, 因此, 应用肺部给药靶向作用于肺泡上皮细胞, 调控凝血和纤维蛋白溶解作用, 减少肺泡内纤维蛋白沉积可能是临床治疗 ALI 的重要靶点. 本研究旨在从组织因子的途径研究灯盏花素肺部给药对 LPS 致大鼠 ALI 的抗损伤作用.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LPS (0111: B4) 购自 SIGMA 公司; 灯盏花素购自昆明龙津药业有限公司; 大鼠的 TF 试剂盒由美国 ADL 公司提供.

1.2 实验动物

采用健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 120 只, 体重 230 ~ 250 g, 由昆明医学院实验动物中心提供, 实验前禁食 12 h, 不禁水.

1.2.1 LPS 致大鼠 ALI 模型复制

腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 麻醉后, 无菌条件下颈前正中切口, 切口长约 5 mm, 暴露气管, 用 1 mL 注射器刺入气管, 缓慢滴入 0.05% LPS (1 μ L/g), 之后缝合皮肤, 分别于 2 h、6 h、12 h 后处死动物, 取材检测各项指标.

1.2.2 实验动物分组

随机分为 5 组 (n=24): ①正常组, 不做任何处理; ②生理盐水组, 气管内滴入生理盐水 (1 μ L/g); ③LPS 组, 气管内滴入 0.05% LPS (1 μ L/g); ④灯盏花素组, 气管内滴入 0.6% 灯盏花素 (1 μ L/g); ⑤灯盏花素 + LPS 组, 气管内滴入 0.6% 灯盏花素, 1 h 后滴入 0.05% LPS (1 μ L/g).

1.3 标本收集

于气管内滴药后 2 h、6 h、12 h 后股动脉放血处死, 在无菌条件下打开胸腔, 取出右肺, 经

盐水漂洗, 滤纸吸干, 测肺组织湿 / 干 (W/D) 比; 取左肺下部, 经中性甲醛固定, HE 染色光镜下观察肺组织结构变化; 取左肺上部, 经冰盐水漂洗, -70 $^{\circ}$ C 冻存待测肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 活力; 另取大鼠进行支气管肺泡灌洗 (BAL), 检测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中蛋白和 TF 含量; 用抗凝管接取股动脉血, 以 3000 r/min 离心 10 min, 取上清放入 -70 $^{\circ}$ C 冰箱待测 TF 含量.

1.4 各项指标测定

①肺病理组织形态观察: 光镜下观察各组大鼠肺组织形态学改变; ②肺组织湿 / 干比值测定: 取肺组织, 吸干表面水分后称重, 为其湿重 (W); 置 80 $^{\circ}$ C 恒温箱, 24 h 至恒重后取出再称, 为干重 (D); 计算肺组织 W/D 比值; ③采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测肺组织中 MPO 活力; ④采用考马斯亮蓝法检测肺泡灌洗液 (BALF) 中的蛋白含量; ⑤采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 BALF 和血浆中组织因子的含量.

1.5 统计学处理

应用 spss11.5 软件进行统计学处理. 实验所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间均数比较采用方差分析方法.

2 结果

2.1 肺组织病理形态学变化

光镜检查: 正常组, 生理盐水组和灯盏花素组各时间点大鼠肺病理组织形态学均未发现异常变化; 气管内滴入 LPS 2 h 后肺泡上皮细胞增生, 肺泡壁炎细胞浸润, 毛细血管扩张, 血液淤滞, 肺泡壁增宽, 局部细支气管上皮增生, 炎细胞浸润; 滴入 LPS 6 h 后肺泡上皮细胞大量增生, 肺泡壁增宽, 肺泡腔广泛缩小, 在肺泡间质可见大量的炎细胞浸润, 局部肺泡腔内有少量出血, 肺泡壁毛细血管扩张, 血液淤滞, 局部有少量出血. 细支气管上皮增生, 炎细胞浸润, 腔内可见脱落坏死的上皮细胞; 滴入 LPS 12 h 后, 肺叶片状实变, 肺泡腔广泛缩小或消失, 肺泡腔内可见脱落坏死的组织, 出血, 肺泡上皮细胞增生, 肺泡腔内及肺泡壁上遍布各种炎细胞, 肺泡壁增宽, 细支气管上皮增生, 炎细胞浸润, 腔内可见脱落

坏死的细胞;灯盏花素+LPS组与LPS组相比能够减轻各时间点的肺损伤程度.

2.2 肺组织 W/D 比值变化

灯盏花素组与正常组和生理盐水组比较,大鼠的肺组织 W/D 无明显差别 ($P > 0.05$);与正常组和生理盐水组相比,LPS 组滴入 LPS 2 h 后可见肺组织 W/D 明显增加,12 h 后仍显著高于对照组 ($P < 0.05$);灯盏花素+LPS 组显著低于 LPS 组 ($P < 0.05$),见表 1.

表 1 各组大鼠肺组织 W/D 比值变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Change of W/D ratio of lung in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间 (h)		
		2	6	12
正常组	24	4.07 ± 0.09	4.05 ± 0.03	4.05 ± 0.04
生理盐水组	24	4.08 ± 0.08	4.09 ± 0.06	4.07 ± 0.09
灯盏花素组	24	4.05 ± 0.05*	4.05 ± 0.07*	4.05 ± 0.03*
LPS 组	24	4.75 ± 0.13 [▲]	5.28 ± 0.29 [▲]	6.95 ± 0.21 [▲]
灯盏花素+LPS	24	4.23 ± 0.12*	4.50 ± 0.12*	5.80 ± 0.27*

与正常组和生理盐水相比, * $P > 0.05$, [▲] $P < 0.05$;与 LPS 组相比, * $P < 0.05$.

2.3 BALF 中蛋白含量变化

正常组和生理盐水组大鼠 BALF 中蛋白含量较低;当气管内滴入 LPS 2 h、6 h、12 h,蛋白含量显著高于正常组和生理盐水组 ($P < 0.05$);灯盏花素+LPS 组低于 LPS 组 ($P < 0.05$);灯盏花素组与正常组和生理盐水组相比无明显的差异 ($P > 0.05$),见表 2.

表 2 各组大鼠 BALF 中蛋白含量变化 [$(\bar{x} \pm s)$, g/L]

Tab.2 change of protein contents of BALF in each group of rats [$(\bar{x} \pm s)$, g/L]

组别	n	时间 (h)		
		2	6	12
正常组	24	0.46 ± 0.10	0.46 ± 0.11	0.47 ± 0.07
生理盐水组	24	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.22	0.46 ± 0.23
灯盏花素组	24	0.43 ± 0.11*	0.43 ± 0.14*	0.43 ± 0.12*
LPS 组	24	1.60 ± 0.36 [▲]	2.91 ± 0.59 [▲]	4.25 ± 0.35 [▲]
灯盏花素+LPS	24	0.66 ± 0.16*	1.85 ± 0.15*	2.03 ± 0.04*

与正常组和生理盐水相比, * $P > 0.05$, [▲] $P < 0.05$;与 LPS 组相比, * $P < 0.05$.

2.4 肺组织 MPO 活力变化

灯盏花素组与正常组和生理盐水组相比无差异 ($P > 0.05$);当气管内滴入 LPS 后 2 h、6 h、12 h,大鼠肺组织 MPO 活力明显高于正常组和生理盐水组 ($P < 0.05$);灯盏花素+LPS 组各时间点明显低于 LPS 组 ($P < 0.05$),见表 3.

表 3 各组大鼠肺组织 MPO 活力变化 [$(\bar{x} \pm s)$, U/g]

Tab.3 Activity of MPO contents of lung in each group of rats [$(\bar{x} \pm s)$, U/g]

组别	n	时间 (h)		
		2	6	12
正常组	24	1.43 ± 0.03	1.32 ± 0.09	1.29 ± 0.10
生理盐水组	24	1.40 ± 0.04	1.27 ± 0.14	1.29 ± 0.07
灯盏花素组	24	1.42 ± 0.07*	1.33 ± 0.10*	1.26 ± 0.01*
LPS 组	24	1.65 ± 0.12 [▲]	2.34 ± 0.21 [▲]	2.74 ± 0.13 [▲]
灯盏花素+LPS	24	1.54 ± 0.13*	2.08 ± 0.15*	2.22 ± 0.18*

与正常组和生理盐水相比, * $P > 0.05$, [▲] $P < 0.05$;与 LPS 组相比, * $P < 0.05$.

2.5 血浆和 BALF 中 TF 含量变化

灯盏花素组与正常组和生理盐水组相比,各时间点血浆和 BALF 中 TF 含量变化无显著差异 ($P > 0.05$);LPS 组各时间点血浆和 BALF 中 TF 含量显著高于正常组和生理盐水组 ($P < 0.05$);灯盏花素+LPS 组各时间点血浆和 BALF 中的 TF 含量明显低于 LPS 组 ($P < 0.05$),见表 4,表 5.

表 4 各组大鼠血浆中 TF 含量变化 [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/L}$]

Tab.4 change of TF contents of blood plasma in each group of rats [$(\bar{x} \pm s)$, $\mu\text{g/L}$]

组别	n	时间 (h)		
		2	6	12
正常组	24	0.32 ± 0.58	0.32 ± 0.59	0.32 ± 0.59
生理盐水组	24	0.33 ± 0.27	0.34 ± 0.19	0.33 ± 0.26
灯盏花素组	24	0.35 ± 0.17*	0.35 ± 0.18*	0.35 ± 0.16*
LPS 组	24	0.55 ± 0.22 [▲]	1.24 ± 0.18 [▲]	1.88 ± 0.48 [▲]
灯盏花素+LPS	24	0.47 ± 0.18*	0.96 ± 0.15*	1.26 ± 0.10*

与正常组和生理盐水相比, * $P > 0.05$, [▲] $P < 0.05$;与 LPS 组相比, * $P < 0.05$.

表5 各组大鼠 BALF 中 TF 含量变化 $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/L}]$
Tab.5 change of TF contents of BALF in each group of rats $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/L}]$

组别	n	时间 (h)		
		2	6	12
正常组	24	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.14	0.42 ± 0.16
生理盐水组	24	0.43 ± 0.29	0.44 ± 0.38	0.42 ± 0.13
灯盏花素组	24	0.46 ± 0.28*	0.46 ± 0.28*	0.46 ± 0.27
LPS 组	24	1.38 ± 0.13 [▲]	1.77 ± 0.19 [▲]	2.59 ± 0.12 [▲]
灯盏花素 + LPS	24	0.78 ± 0.42*	1.22 ± 0.06*	2.21 ± 0.33*

与正常组和生理盐水相比, * $P > 0.05$, [▲] $P < 0.05$; 与 LPS 组相比, * $P < 0.05$.

3 讨论

严重感染是 ALI 常见的原因之一, 约有 40% ~ 50% 的 ALI/ARDS 患者与感染或脓毒症有关. 感染细菌以革兰氏阴性菌为主, 内毒素 (LPS) 又称脂多糖是其细胞壁的主要成分^[7]. LPS 的大量和持续释放是导致 ALI 发生发展的重要因素. 本实验结果显示: LPS 组大鼠肺组织 W/D 增高, 肺组织 MPO 活力增高, BALF 中蛋白含量增高, 肺组织病理形态学表现为肺泡上皮细胞增生, 肺泡壁炎细胞浸润, 毛细血管扩张, 血液淤滞, 肺泡壁增宽, 局部细支气管上皮增生, 炎细胞浸润. 提示我们在气管内滴入 LPS, 已成功复制了 ALI 的模式.

近年来研究发现, ALI 发生肺泡内和肺微血管床内纤维蛋白沉积与凝血作用增高和纤维蛋白溶解作用降低密切相关. ALI 患者有组织因子 (tissue factor, TF) 激活, 蛋白 C (protein C, PC) 活化下调和纤溶酶原激活物抑制剂-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 产生增多^[6]. TF 是一种膜结合蛋白, 与凝血因子 VIIa 形成复合物, 使 X 转化为 Xa, 从而激活凝血酶, 使纤维蛋白原转化为不可溶的纤维蛋白. 正常人肺组织、肺泡巨噬细胞和肺泡上皮细胞含有 TF^[8-9]. 本实验研究结果发现, LPS 致大鼠 ALI 模型的血浆和 BALF 中的 TF 含量均明显高于正常组和生理盐水组, 提示 TF 在 ALI 的发生过程中可能起到作用. Gunther 等^[10]发现肺炎患者支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中 TF 依赖性

促凝血活性增高. Gando 等^[11]发现 ALI 患者血浆中 TF 水平增高. 本实验结果与上述报道相一致, 组织因子 (tissue factor, TF) 引发外源性凝血途径可能是 ALI 发生凝血的一个重要机制.

灯盏花素 (breviscapine) 是从天然植物灯盏花中提取的黄酮类活性成份, 为灯盏花甲素、灯盏花乙素的混合物, 主要成分为灯盏乙素 (scutellarin)^[12], 含量占 90% 以上. 1979 年灯盏花素制剂开始应用于临床, 特别在治疗脑血管病、冠心病等心脑血管缺血性疾病有显著的疗效^[13]. 近年来, 灯盏花素的临床应用范围不断拓宽, 在抗凝血方面也发挥了相当的作用^[14-16], 但对 TF 的作用未见报道. 本实验研究结果发现灯盏花素 + LPS 组大鼠血浆和 BALF 中 TF 含量明显低于 LPS 组, 提示灯盏花素肺部给药对 TF 的产生具有抑制作用, 能够减轻 LPS 致大鼠的 ALI 程度; 同时也说明 TF 在 ALI 发生中的作用. 一些研究也证实, 抑制 TF 活性可以减轻内毒素引起的肺损伤和促炎症细胞因子释放^[17-19].

肺泡内纤维蛋白沉积是 ALI 的一个重要特征, 肺泡上皮是肺内纤维蛋白沉积的主要部位. 灯盏花素肺部给药可能作用于肺泡上皮细胞, 通过调控 TF 途径, 减少肺泡内纤维蛋白沉积, 从而发挥抗 ALI 作用. 但是灯盏花素肺部给药的确切作用机制还有待进一步研究.

[参考文献]

- [1] MICHAELAM, GUY A Z, CHARLES E, et al. Future research directions in acute lung injury: ummary of a National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167 (7): 1027-1035
- [2] PRABHAKARAN P, WAREL B, WHITEK E, et al. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 in pulmonary edema fluid are associated with mortality in acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285: L20-L28
- [3] KERMARREC N, ZUNIC P, BELOUCIF S, et al. Impact of inhaled nitric oxide on platelet aggregation and fibrinolysis in rats with endotoxic lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158: 833-839
- [4] VANDER-POLL T, LEVI M, NICK J A, et al. Ac

- tivated protein C inhibits local coagulation after intrapulmonary delivery of endotoxin in humans [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171: 125-1128
- [5] BACHOFEN M, WEIBEL E R. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome [J]. *Clin Chest Med*, 1982, 3: 35-56
- [6] WARE L B, BASTARACHE J A, WANG L. Coagulation and fibrinolysis in human acute lung injury -New therapeutic targets [J]. *Keio J Med* 2005, 54 (3): 142-149
- [7] ULEVITCH R J, TLBIAS P S. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin [J]. *Annu Rev Immunol*, 1995, 13: 437
- [8] DRAKE T A, MORRISSEY J H, EDGINGTON T S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis [J]. *Am J Pathol* 1989, 134: 1087-1097
- [9] PRUDHOMME J B, GEISER T, MATTAY M A, et al. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor on the cell surface [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169: A414
- [10] GUNTHER A, MOSAVI P, HEINEMANN S, et al. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161: 454-462
- [11] GANDO S, NANZAKI S, MORIMOTO O, et al. Systemic activation of tissue-factor dependent coagulation pathway in evolving acute respiratory distress syndrome in patients with trauma and sepsis [J]. *Trauma*, 1999, 47: 719-723
- [12] 张卫东. 灯盏花的化学成分研究 (II) [J]. *中国医药工业杂志*. 1998, 29 (12): 554-555
- [13] 邓廷飞. 灯盏花素注射液在临床中的应用 [J]. *中国药业*, 2002, 11 (9): 72-74
- [14] 盛净, 赵佩琪, 黄震华, 等. 灯盏细辛干预血小板、凝血功能对急性冠状动脉血栓形成后溶栓的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 1999, 27 (2): 115-116
- [15] 王影, 杨祥良, 刘宏, 等. 灯盏花素抗凝血作用的研究 [J]. *中药材*, 2003, 26 (9): 656-658
- [16] 沈志强, 雷伟亚. 灯盏花总黄酮对血小板聚集和血栓形成的影响 [J]. *天然产物研究与开发*, 2000, 12 (1): 22
- [17] WELTY-WOLF K E, CARRAWAY M S, MILLER D L, et al. Coagulation blockade prevents sepsis-induced respiratory and renal failure in baboons [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164: 1988-1996
- [18] MILLER D L, WELTY-WOLF K, CARRAWAY M S, et al. Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26: 650-658
- [19] CARRAWAY M S, WELTY-WOLF K E, MILLER D L, et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1200-1209

(2007-09-20 收稿)