

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.17.006

川芎嗪防护严重烧伤大鼠急性肺损伤及对 NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响

刘驰星¹, 何树清^{1△}, 詹剑华²

(1. 中国人民解放军联勤保障部队 908 医院, 江西 南昌 330002; 2. 南昌大学医学院第一附属医院, 江西 南昌 330002)

摘要:目的 探讨川芎嗪对严重烧伤大鼠急性肺损伤(ALI)的防护作用及核因子 κ B(NF- κ B)/NLRP3 信号通路的影响。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、川芎嗪组,其中模型组、川芎嗪组构建严重烧伤大鼠 ALI 模型,并于造模成功后给予相应药物腹腔注射,对照组和模型组分别给予 37℃ 温水和等体积生理盐水。结果 与对照组比较,模型组、川芎嗪组大鼠湿肺/体质量比值、肺损伤评分明显升高,动脉氧分压(PaO₂)水平明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,川芎嗪组大鼠湿肺/体质量比值、肺损伤评分明显降低,PaO₂ 水平明显升高($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组、川芎嗪组肺 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,川芎嗪组大鼠肺 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组、川芎嗪组大鼠 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,川芎嗪组大鼠 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$)。结论 川芎嗪对严重烧伤大鼠 ALI 具有防护作用,其机制可能与川芎嗪能抑制炎症信号通路 NF- κ B mRNA 和 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平,从而抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达有关。

关键词:川芎嗪;严重烧伤;急性肺损伤;NF- κ B/NLRP3;信号通路;大鼠

中图分类号:R932;R285.5;R256.1

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)17-0022-04

Protective Effect of Ligustrazine on Acute Lung Injury in Severely Burned Rats and Its Effect on NF- κ B/NLRP3 Signaling Pathway

LIU Chixing¹, HE Shuqing¹, ZHAN Jianhua²

(1. The 908th Hospital of the Joint Service Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Nanchang, Jiangxi, China 330002; 2. The First Affiliated Hospital of Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, China 330002)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of ligustrazine on acute lung injury in severely burned rats and its effect on NF- κ B/NLRP3 signaling pathway. **Methods** Totally 60 SD rats were randomly divided into the control group, model group and ligustrazine group. The rats in the model group and ligustrazine group were used to establish acute lung injury models of severely burned rats, and the corresponding drugs were injected intraperitoneally at the beginning of the establishment of the models. The rats in the control group were given warm water(37℃) and those in the model group were given the same amount of normal saline. **Results** Compared with those in the control group, the lung/body weight and the scores of lung injury increased significantly, and the level of the partial pressure of arterial oxygen(PaO₂) decreased significantly in the ligustrazine group and model group($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the lung/body weight and the scores of lung injury decreased significantly, and the level of PaO₂ increased significantly in the ligustrazine group($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the expression levels of NF- κ B mRNA, NLRP3 mRNA and protein in lung increased significantly in the model group and ligustrazine group($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the expression levels of NF- κ B mRNA, NLRP3 mRNA and protein in lung decreased significantly in the ligustrazine group($P < 0.05$). Compared with those in the control group, the expression levels of interleukin(IL-2), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) protein increased significantly in the model group and ligustrazine group($P < 0.05$). Compared with those in the model group, the expression levels of IL-2, IL-6 and TNF- α protein decreased significantly in the ligustrazine group($P < 0.05$). **Conclusion** Ligustrazine has protective effect on acute lung injury in severely burned rats. Its mechanism may be related to the inhibition of expression levels of NF- κ B mRNA and NLRP3 mRNA and protein in the inflammatory signaling pathway, as well as inhibition of expression levels of inflammatory factors such as IL-2, IL-6 and TNF- α .

Key words: ligustrazine; severe burns; acute lung injury; NF- κ B/NLRP3; signaling pathway; rats

急性肺损伤(ALI)及其所引发急性呼吸窘迫综合征是广泛性皮肤烧伤患者高发病率和高死亡率的主要原因,临床表现为低氧血症、非心源性肺水肿和急性呼吸衰竭。严重烧伤所致的 ALI 延迟复苏被认为是对肺的

间接(继发)损伤且与急性全身炎症反应综合征相关^[1-3]。严重的烧伤和复苏延迟可引发过度的炎症反应,表现为局部和全身炎症介质过表达。核因子 κ B(NF- κ B)的激活可调节一系列基因表达,以及肿瘤坏死因子- α

第一作者:刘驰星,男,大学本科,主治医师,研究方向为烧伤整形,(电子信箱)410138942@qq.com。

[△]通信作者:何树清,男,大学本科,副主任医师,研究方向为烧伤整形,(电子信箱)2771559779@qq.com。

(TNF- α)、白细胞介素 2(IL-2)、白细胞介素 6(IL-6), 均可导致肺组织损伤^[4-5]。NLRP3 是一种由 Nod 样受体 (NLR) 家族组成的多蛋白复合物, 在 ALI 中起重要作用。NLRP3 炎性体由 NLRP3、ASC 和半胱天冬酶-1 组成, 其激活可诱导 IL-1 β 的成熟和分泌。因此, 抑制 NF- κ B 和 NLRP3 炎性体的活性可抑制由严重烧伤诱导的肺组织的炎性反应^[6-7]。川芎嗪来源于草药川芎, 具有抗炎、抗癌作用, 可改善肺癌患者胸腔积液^[8-9], 抑制人表皮角质形成细胞的炎性反应。本研究中拟探讨川芎嗪对严重烧伤大鼠 ALI 防护作用及 NF- κ B/NLRP3 信号通路的影响, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体质量 250~300 g, 由山东大学医学院动物实验中心提供(许可证号为 SCXK<鲁>20001003); 本研究方案经医院动物研究委员会批准, 符合美国国立卫生研究院动物使用和护理指南。动物随意获取食物和水, 自动控制昼夜循环(12 h/12 h), 室温(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C。将大鼠随机分为对照组、模型组、川芎嗪组, 每组 20 只, 雌雄各半。

1.2 方法

使用具有圆形开口的木板暴露大鼠 30% 的总体表面积。通过腹膜内注射戊巴比妥钠(剂量为 30 mg/kg)麻醉后, 夹住模型组、川芎嗪组大鼠的背毛, 使其仰卧在装置上。将具有木制装置的大鼠背部区域浸入热水(100 $^{\circ}$ C)中 15 s, 产生全层皮肤烧伤; 通过组织学验证烧伤创面深度; 烧伤后 4 h 通过腹膜内注射每 1 kg 体质量 4 mL 体内表面积的乳酸林格溶液复苏。大鼠皮下注射丁丙诺啡 0.25 mg/kg, 并单独用笼子饲养。川芎嗪组在烧伤后立即予大鼠腹膜内注射 50000 U/kg 注射用盐酸川芎嗪(哈尔滨三联药业股份有限公司, 国药准字 H20041171, 规格为每支 40 mg)。模型组大鼠仅接受少量的载体(0.9% 氯化钠注射液, USP 标准品, 上海现代哈森<商丘>药业有限公司)。对照组采用 37 $^{\circ}$ C 温水予相同程序和复苏。

1.3 指标测定

湿肺/体质量及肺损伤评分: 试验结束后(6 h 后), 颈椎脱臼处死大鼠, 取右肺组织, 测定湿肺/体质量。随后取右侧部分肺组织, 行常规染色切片, 镜下阅片, 对肺泡内充血、肺间质水肿、中性粒细胞浸润、肺泡水肿进行评分。极重度改变为 4 分、重度改变为 3 分、中度改变为 2 分、轻度改变为 1 分、无改变或非常轻微为 0 分, 上述 4 项总分即为肺损伤评分。烧伤后 6 h, 收集 3 组大鼠外周动脉血样品, 使用 GEM Premier 3000 型血气分析仪(Instrumentation Laboratory, Breda, The Netherlands)分析动脉氧分压(PaO₂)。

大鼠肺组织 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA 表达

水平: 使用 RNeasy 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)从肺组织中分离总 RNA, 测定其浓度和纯度, 使用 Access RT-PCR 系统(Bio-Rad, Hercules, CA)进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。参照 GenBank 数据获取 2 个基因位点的序列, 设计待测基因位点的 PCR 扩增引物和单碱基延伸引物, 使用 One Step Prime Script miRNA cDNA 合成试剂盒(TaKaRa)将 RNA 逆转录为 cDNA, 并使用 SYBR Premix Ex Taq II(TaKaRa)进行定量实时 PCR 使用引物。NF- κ B, 正向 5'-CCGTAGCC-CACGTCGTAGCAAACCA-3, 反向 5'-TCCTTAGGGCAAGGGCTCTTGATGG-3'; NLRP3, 正向 5'-GAATGAC-CTGTTCTTTGA GGCTGAC-3; GAPDH 用作管家基因: 正向 5'-CACGGCAAGTTCAACGGCACAGTCA-3, 反向 5'-GATACATTGGGGGTAGGAACACGGA-3。反应体系为, 正向引物 10 μ L, 反向引物 10 μ L, RNA 模版 0.6 μ L, 超级酶混合物 0.2 μ L, 2 $\times$ μ Byr 一步法 RT-qPCR 缓冲液 5 μ L, 去 RNA 水 3.4 μ L; PCR 程序, 95 $^{\circ}$ C 下, 初始变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 下, 熔化 30 s; 60 $^{\circ}$ C 下, 退火 40 s; 在 72 $^{\circ}$ C 下, 伸长 1 min; 在 10 $^{\circ}$ C 下, 最终伸长 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 下 2 min, 保持在 4 $^{\circ}$ C。通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算 NF- κ B 和 NLRP3 相对表达水平。

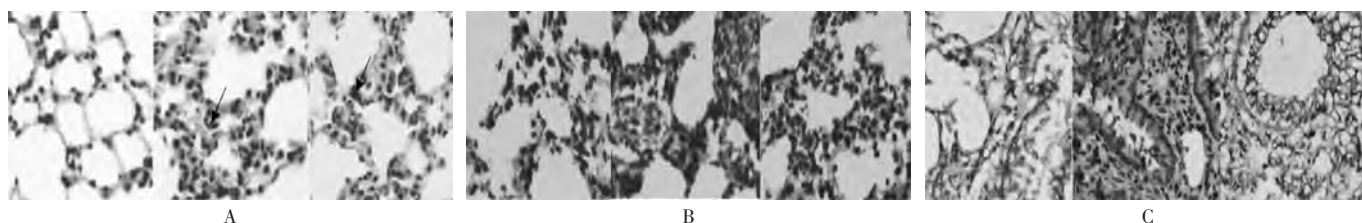
大鼠肺部组织 NF- κ B 和 NLRP3 蛋白表达水平: 免疫组化法测定 NF- κ B 和 NLRP3 蛋白在大鼠肺部组织的表达, 石蜡包埋的肺组织切片用 1% H₂O₂ 处理, 以抑制内部过氧化物酶, 并与牛血清预孵育以阻断非特异性结合。切片与 NF- κ B 和 NLRP3 一抗(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz)孵育, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将生物素化的二抗(ProSci, Poway, CA)应用于样品 1 h。ABC 试剂盒(Vector Laboratories, Burlingame, CA)和 3,3'-二氨基联苯胺用于显色。随机选择图像并使用 TE300 型显微镜(日本尼康公司)捕获。随机选取 5 个高倍视野($\times$ 400)计数, 设立阴性对照(用 PBS 来替代一抗体, 染色结果作为阴性, 排除染色过程中非特异染色和交叉反应所造成的假阳性结果)和阳性对照(用 Dako 公司生产的一抗作为阳性对照, 染色结果作为标准结果)。采用双盲法统计结果, 评分标准, 0 分(0), 1 分(0~10%), 2 分(10~50%)和 3 分(>50%)。强度评分, 0 分(阴性染色), 1 分(弱染色), 2 分(中度染色)和 3 分(强烈染色)。通过将阳性比例得分乘以染色强度得分来计算 NF- κ B 和 NLRP3 表达的最终得分, 范围为 0~9 分。

大鼠肺组织中 IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平: 按照无菌条件操作, 称取 0.1 g 肺组织, 加入少量液氮, 在研钵中迅速将肺组织碾碎至粉末状; 将组织粉末转入 2 mL Eppendorf 管中, 加入 1.2 mL PBS(pH=7.4), 充分振荡混匀, 2000 g, 4 $^{\circ}$ C, 离心 20 min。仔细收集上清液, 获取肺组织匀浆后, 采用 ELISA 法检测肺组织中

表1 各组大鼠观察指标比较($\bar{X} \pm s, n=20$)

组别	湿肺/体质量比值	肺损伤评分(分)	PaO ₂ (mmHg)	NF- κ B mRNA	NLRP3 mRNA	蛋白表达评分(分)		炎症因子水平表达(ng/g)		
						NF- κ B	NLRP3	IL-2	IL-6	TNF- α
对照组	4.92 $\pm$ 0.32	2.20 $\pm$ 0.21	122.69 $\pm$ 9.36	0.94 $\pm$ 0.29	1.01 $\pm$ 0.51	1.21 $\pm$ 0.32	1.14 $\pm$ 0.49	78.98 $\pm$ 16.32	123.65 $\pm$ 23.21	99.36 $\pm$ 18.63
模型组	10.04 $\pm$ 0.49 [*]	8.75 $\pm$ 0.37 [*]	69.21 $\pm$ 9.21 [*]	5.32 $\pm$ 0.51 [*]	4.91 $\pm$ 0.39 [*]	6.21 $\pm$ 0.54 [*]	5.53 $\pm$ 0.41 [*]	326.21 $\pm$ 19.69 [*]	413.65 $\pm$ 13.69 [*]	589.36 $\pm$ 18.34 [*]
川芎嗪组	8.32 $\pm$ 0.36 ^{*Δ}	5.35 $\pm$ 0.31 ^{*Δ}	96.21 $\pm$ 8.96 ^{*Δ}	2.12 $\pm$ 0.51 ^{*Δ}	2.31 $\pm$ 0.41 ^{*Δ}	2.45 $\pm$ 0.49 ^{*Δ}	2.63 $\pm$ 0.48 ^{*Δ}	201.36 $\pm$ 15.32 ^{*Δ}	302.67 $\pm$ 19.32 ^{*Δ}	432.39 $\pm$ 15.39 ^{*Δ}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较, ^{Δ} $P<0.05$ 。



1. 对照组 2. 模型组 3. 川芎嗪组
A. 大鼠右侧肺组织 HE 染色 B. 川芎嗪对大鼠肺部 NF- κ B 表达 C. 川芎嗪对大鼠肺部 NLRP3 表达

图1 各组大鼠右侧肺组织 HE、NF- κ B 表达、NLRP3 表达染色图($\times 400$)

IL-2, IL-6, TNF- α 蛋白表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表1和图1。由图1A可见,对照组大鼠肺泡组织结构正常,无炎性细胞浸润、无胶原蛋白沉淀;模型组大鼠肺泡壁明显增厚、破裂,可见中性粒细胞及少量嗜酸性粒细胞浸润,肺间质可见较多胶原蛋白沉淀;川芎嗪组大鼠肺泡结构基本正常,有少量中性粒细胞浸润,几乎无胶原蛋白沉淀。采用免疫组化法, NF- κ B 和 NLRP3 主要定位于胞质,其阳性表达为棕褐色。

3 讨论

肺部通常是烧伤后损伤的第1个器官,即使没有吸入性损伤和感染,也会继发ALI。此外,肺功能的损害如炎症反应和严重的低氧血症,会损害其他器官和组织,从而导致多器官功能障碍综合征的进展。因此,鉴定烧伤诱导ALI的早期介质及其潜在的分子机制至关重要。本研究结果显示,与模型组比较,川芎嗪组湿肺/体质量比值、肺损伤评分明显降低, PaO₂ 水平明显升高;对照组肺泡组织结构正常,无炎性细胞浸润、无胶原蛋白沉淀;川芎嗪组肺泡结构基本正常,有少量中性粒细胞浸润,几乎无胶原蛋白沉淀。这表明川芎嗪对严重烧伤诱导大鼠ALI具有保护作用,湿肺/体质量比值、肺损伤评分均明显降低, PaO₂ 水平明显升高,炎性细胞因子减少,纤维蛋白原和炎性细胞浸润减轻。

NF- κ B 是参与炎症反应的重要转录因子,可诱导大量炎性细胞的表达,在损伤后作为炎症的早期内源性警

报细胞外释放,较其他促炎细胞因子早释放,并作为脓毒症“早期介质”^[10]。阻断 NF- κ B 活性,可降低动物内毒素血症模型的死亡率。未活化的 NF- κ B 以具有 I κ B 的聚合物形式或以与前体蛋白的2种聚合物形式存在。在炎症诱导因子的刺激中, NF- κ Bp65 从细胞质转移到细胞核中以调节炎性细胞因子的表达^[11]。NLRP3 炎症小体激活和 IL-1 β 分泌最近成为肺损伤等疾病发病的重要机制。与衔接蛋白 ASC 复合的 NLRP3 诱导 Caspase-1 的激活,以响应各种刺激^[12]。活化的 Caspase-1 切割 pro-IL-1 β 并促进 IL-1 β 的分泌。NLRP3/ASC/Caspase-1 轴在 LPS 诱导的肺损伤中起重要作用,抑制 NLRP3 炎症小体激活具有抵抗脂多糖诱导急性肺损伤的能力^[13]。本研究中,为了阐明川芎嗪的保护机制,检测了川芎嗪对 NF- κ B 和 NLRP3 炎症小体的影响。结果显示,与模型组比较,川芎嗪组大鼠肺 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平均明显降低,表明川芎嗪通过抑制 NF- κ B 和 NLRP3 炎症表达的活化来抑制炎症反应。模型组、川芎嗪组大鼠肺 IL-2, IL-6, TNF- α 表达水平均明显升高;与模型组大鼠比较,川芎嗪组大鼠 IL-2, IL-6, TNF- α 表达水平均明显降低。说明川芎嗪能抑制炎症信号通路 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平,从而抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达。

综上所述,川芎嗪对严重烧伤大鼠ALI有防护作用,其机制与川芎嗪能抑制炎症信号通路 NF- κ B mRNA 及 NLRP3 mRNA、蛋白表达水平,从而抑制炎症因子 IL-2, IL-6, TNF- α 的表达有关。

参考文献:

- [1] LAVINIA I, BYRNE RN, TIM VH, et al. Stem cell conditioned medium improves acute lung injury in mice: *in vivo* evidence for stem cell paracrine action[J]. American Journal of Physiology