

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.011

# 大黄素对急性肺损伤模型大鼠的保护作用\*

朱丽华<sup>1</sup>, 王 芃<sup>1</sup>, 彭信言<sup>1</sup>, 章忠明<sup>1△</sup>, 李激文<sup>2</sup>

(1. 广西医科大学第一附属医院, 广西 南宁 530021; 2. 广西壮族自治区柳州市工人医院急诊科, 广西 柳州 545005)

**摘要:**目的 探讨大黄素对急性肺损伤模型大鼠的保护作用。方法 将40只SD大鼠随机分为对照组、模型组及大黄素低、高剂量组,各10只。除对照组外,其余3组大鼠均尾静脉注射油酸(0.1 mL/kg)以复制急性肺损伤模型,建模成功后,大黄素低、高剂量组大鼠分别给予10,20 mg/kg大黄素灌胃,对照组和模型组予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃,每天1次,连续14 d。采用全自动血气分析仪检测大鼠动脉血pH、氧分压(PaO<sub>2</sub>)和氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>),测定大鼠肺组织湿干质量比(W/D);以苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠肺组织病理学变化;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠肺泡灌洗液中白细胞介素1β(IL-1β)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平;采用Western blotting法检测大鼠肺组织中水通道蛋白4(AQP4)和核因子-κB(NF-κB)蛋白表达水平。结果 与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠动脉血pH、PaO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>均显著升高;肺组织的W/D及其中AQP4蛋白和p-NF-κBp65蛋白表达水平,肺组织学评分及肺泡灌洗液中IL-1β、TNF-α、IL-6水平均显著降低(P<0.05)。结论 大黄素对模型大鼠的急性肺损伤状态有一定改善作用,其机制可能与下调炎症细胞因子和AQP4表达水平及抑制NF-κB信号通路有关。

**关键词:**大黄素;急性肺损伤;水通道蛋白4;核因子-κB;信号通路;作用机制;大鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)18-0041-05

## Protective Effect of Emodin on Acute Lung Injury Model Rats

ZHU Lihua<sup>1</sup>, WANG Peng<sup>1</sup>, PENG Xinyan<sup>1</sup>, ZHANG Zhongming<sup>1</sup>, LI Jiwen<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021; 2. Department of Emergency, Liuzhou Workers' Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545005)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of emodin on acute lung injury model rats. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into the control group, model group and low-dose and high-dose emodin groups, 10 rats in each group. In addition to the rats in the control group, the rats in the other three groups were injected with oleic acid (0.1 mL/kg) through the tail vein to replicate the acute lung injury model. After successful modeling, the rats in the low-dose and high-dose emodin groups were given 10, 20 mg/kg of emodin by gavage respectively, and the rats in the control group and the model group were given the equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution by gavage, once a day for 14 d. The arterial blood pH, partial pressure of oxygen (PaO<sub>2</sub>) and oxygenation index (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) were measured by the automatic blood gas analyzer, and the wet-dry mass (W/D) ratio of the lung tissues of rats in each group was measured. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue of rats. The levels of interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The expression level of aquaporin 4 (AQP4) and nuclear factor-κB (NF-κB) protein in the lung tissue of rats were detected by Western blotting. **Results** Compared with those in the model group, the arterial blood pH, PaO<sub>2</sub> and PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> of rats in the low-dose and high-dose emodin groups were significantly higher, the W/D ratio of lung tissue, the expression levels of AQP4 protein and p-NF-κBp65 protein, the lung

\*基金项目:广西急诊与医学救援人才小高地·广西高校急诊医学重点实验室开放课题[GXJZ201623];广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题[Z2016181]。

第一作者:朱丽华,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为呼吸病学,(电子信箱)eavorforever@163.com。

△通信作者:章忠明,男,硕士研究生,主任医师,研究方向为血液病学,(电子信箱)zzmmissyou@126.com。

- rotenone-induced cell death in SH-SY5Y neuronal cells[J]. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016,8(12):72-77.
- [11] 李俊,肖瑶,晏蔚田,等.黄药子肝毒性及减毒配伍研究进展[J].中华中医药学刊,2020,38(12):100-103.
- [12] NIU CW, SHENG YC, YANG R, et al. Scutellarin protects against the liver injury induced by diosbulbin B in mice and its mechanism[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015,164:301-308.
- [13] 牛成伟,陆宾,季莉莉,等.黄独素B诱导小鼠急性肝损伤及其机制[J].中国中药杂志,2014,39(7):1290-1292.
- [14] 王晓晨,吉爱国. NF-κB 信号通路与炎症反应[J]. 生理科学进展,2014,45(1):68-71.
- [15] 吴亚楠,赵鹏翔,马雪梅. NF-κB 研究进展及其与炎症的关系[J]. 安徽农业科学,2012,40(34):16533-16535.
- [16] 乔丽杰,王延让,张明. Nrf2/HO-1 通路在氧化损伤保护机制中研究进展[J]. 中国职业医学,2013,40(1):82-84.
- [17] 王甜甜,陈淳媛,杨雷,等. Nrf2/HO-1 信号轴在氧化应激性疾病中的机制[J]. 中南大学学报(医学版),2019,44(1):74-80.

(收稿日期:2021-02-28;修回日期:2021-05-11)

histological score and the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 in the BALF of rats in the low-dose and high-dose emodin groups were significantly lower ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Emodin can improve the state of acute lung injury in model rats, and its mechanism may be related to down-regulating the expression of inflammatory cytokines and AQP4, and inhibiting the activity of NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** emodin; acute lung injury; aquaporin 4; nuclear factor- $\kappa$ B; signaling pathway; action of mechanism; rat

急性肺损伤(ALI)是以肺泡-毛细血管壁损伤、肺水肿和炎性细胞募集为特征的综合征,表现为肺内皮细胞被破坏,肺毛细血管的高通透性和临床肺水肿<sup>[1]</sup>。水通道蛋白(AQP)属膜水运输蛋白,AQP4为其中通透性最强的蛋白<sup>[2]</sup>,在肺、胃肠器官和肾脏的星形胶质细胞、骨骼肌和上皮细胞的足突中均有表达<sup>[3]</sup>。核因子(NF)- $\kappa$ B在炎症调节中起重要作用,而炎症反应在ALI的发生、发展中起关键性作用<sup>[4]</sup>。大黄素存在于各种中草药,有抗肿瘤、抗炎等多种作用<sup>[5]</sup>。本研究中探讨了大黄素对急性肺损伤模型大鼠肺组织中炎性细胞因子、AQP4和NF- $\kappa$ B表达水平的影响。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与动物

仪器:CKX53型倒置生物显微镜(日本Olympus公司);MK-3型全自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司);GEMPremier300型全自动血气分析仪(美国Jinkou公司)。

试剂:大黄素(上海吉至生化科技有限公司,批号为518-82-1);苏木素-伊红(HE)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号为AR1180);白细胞介素试剂盒(IL-1 $\beta$ , IL-6, 北京百奥莱博科技有限公司,批号分别为ARB12155, ZN2880-GPK);肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )试剂盒(武汉亚科因生物科技有限公司,批号为AbbkineKET9007);RIPA裂解液及BCA试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R0020, PC0020);AQP4抗体、p-NF- $\kappa$ Bp65抗体、NF- $\kappa$ Bp65抗体、GAPDH抗体和IgG-HRP抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为59678S, 3033S, 8242S, 5174S, 7074S)。

动物:SPF级SD大鼠40只(广西医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK桂2020-0003),雄性,8~10周龄,体质量(180 $\pm$ 20)g,饲养于标准动物房(使用许可证号:SYXK桂2020-004),自由获取食物和水。适应环境1周后,进行后续实验。

### 1.2 方法

将40只SD大鼠随机分为对照组、模型组、大黄素低剂量组和大黄素高剂量组,各10只。除对照组外,另3组大鼠经尾静脉注射油酸(0.1 mL/kg)溶液以复制急性肺损伤模型。12 h后,从大鼠尾动脉抽取0.2 mL血液监测氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>),若PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>≤300,提示建模成功;对照组大鼠经尾静脉注射等体积的0.9%氯化钠溶液。建模成功后,大黄素低、高剂量组大鼠分别给予大黄素10, 20 mg/kg灌胃,其余组给予等体积

0.9%氯化钠溶液,每天1次,连续14 d。

### 1.3 观察指标

动脉血血气分析:末次给药2 h后,大鼠每100 g体质量经腹腔注射3%戊巴比妥钠0.1 mg麻醉,抽取腹主动脉血液,采用全自动血气分析仪检测pH、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)和PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>。

肺组织湿干质量比(W/D):取大鼠部分肺组织,用0.9%氯化钠溶液冲洗表面的血液后擦拭干表面水分,称定质量,即为湿质量(W);置真空干燥箱内烘烤22 h后称定质量,即为干质量(D);计算W/D。

肺组织病理学:摘除大鼠右下肺叶,以10%甲醛溶液固定、常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,并制成5  $\mu$ m厚石蜡切片,HE染色,用中性树胶封片,镜下观察肺组织病理学变化。采用Smith评分法对肺水肿、肺泡及间质炎症、肺泡及间质出血、肺不张和透明膜形成分别评分,计0~4分。无损伤为0分;病变范围<25%为1分;病变范围25%~50%为2分;病变范围50%~75%为3分;病变满视野为4分;每组选取10个高倍(400倍)显微镜视野,取其平均值,计算肺组织学评分。

肺泡灌洗液中炎性因子:取大鼠左肺进行支气管肺泡灌洗。左肺中注入2.5 mL 0.9%氯化钠溶液,冲洗2~3次后,放入无菌容器中。将肺泡灌洗液在4℃以1 000 g离心10 min,分离,收集上清液,采用酶联免疫吸附(ELISA)法,以酶标仪在450 nm波长处依序测定吸光度(OD)值,根据OD值绘制的标准曲线计算肺泡灌洗液中IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 计算的含量。

肺组织中AQP4和p-NF- $\kappa$ B蛋白表达:采用Western blotting法检测。取肺组织样品,加RIPA裂解液提取总蛋白,以BCA法测定总蛋白含量。样品经变性后上样,电泳,转膜,封闭(5%脱脂奶粉,1 h),加一抗孵育[AQP4抗体(1:1 000)、p-NF- $\kappa$ Bp65抗体(1:1 000)、NF- $\kappa$ Bp65抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:2 000),4℃过夜],清洗3次,加二抗孵育[对应一抗种属来源的IgG-HRP标记的二抗(1:3 000),室温1 h]回收二抗,清洗3次,加入化学发光试剂,将PVDF膜放入暗盒,压上X胶片,取出胶片后显影定影、清洗。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统分析蛋白条带的灰度值。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。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Tukey检验;计数资料以率(%)表示,行 $\chi^2$ 检

验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对动脉血气的影响

与对照组比较,模型组大鼠各动脉血气指标均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠动脉血气指标均明显升高( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 各组大鼠动脉血气分析值比较( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab.1 Comparison of arterial blood gas analysis values of rats in each group( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量(mg/kg) | pH                       | PaO <sub>2</sub> (mmHg)    | PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> |
|---------|-----------|--------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 对照组     |           | 7.39 ± 0.07              | 79.23 ± 3.67               | 352.67 ± 12.78                     |
| 模型组     |           | 7.11 ± 0.03*             | 44.67 ± 2.12**             | 234.14 ± 9.45**                    |
| 大黄素低剂量组 | 10        | 7.26 ± 0.06              | 57.43 ± 2.24 <sup>#</sup>  | 275.32 ± 10.56 <sup>#</sup>        |
| 大黄素高剂量组 | 20        | 7.32 ± 0.05 <sup>#</sup> | 65.89 ± 2.15 <sup>##</sup> | 296.45 ± 9.32 <sup>##</sup>        |

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。下同。1 mmHg = 0.133 kPa。

Note: Compared with those in the control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ; compared with those in the model group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ; as well as the following figures. 1 mmHg = 0.133 kPa.

### 2.2 对肺组织 W/D 值的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺组织 W/D 明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠肺组织 W/D 明显降低( $P < 0.05$ )。详见图 1。

### 2.3 对肺组织病理学的影响

对照组大鼠肺组织均未显示肺间质水肿、出血、充血和炎性细胞浸润,且肺结构完整;模型组大鼠肺组织均出现损伤,肺间质水肿、肺结构破坏、出血、充血和炎性细胞浸润;大黄素低、高剂量组大鼠肺组织的肺间质水肿、肺结构破坏、出血和充血,以及炎性细胞浸润均明显改善。详见图 2 A。与对照组比较,模型组大鼠肺组织学评分明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠肺组织学评分均明显降低( $P < 0.05$ )。详见图 2 B。

### 2.4 对肺泡灌洗液中炎性因子水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠肺泡灌洗液中 IL-1 $\beta$ ,

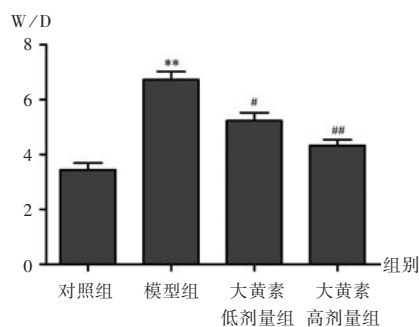


图 1 各组大鼠肺组织 W/D 值比较

Fig.1 Comparison of W/D ratio of lung tissues of rats in each group

IL-6, TNF- $\alpha$  水平均明显升高( $P < 0.01$ );与模型组大鼠比较,大黄素低、高剂量组大鼠肺泡灌洗液中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平均明显降低( $P < 0.05$ )。详见图 3。

### 2.5 对肺组织中蛋白表达水平的影响

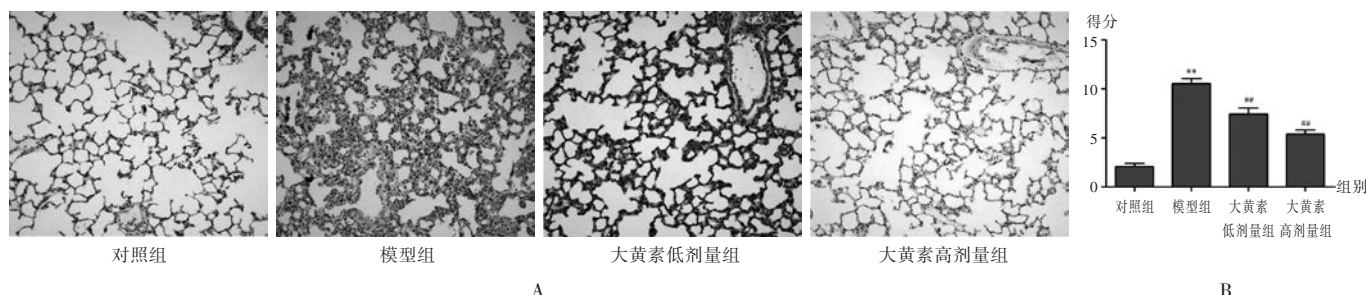
与对照组比较,模型组大鼠肺组织中 AQP4 和 p-NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,大黄素低、高剂量组大鼠肺组织中 AQP4 蛋白表达水平均明显降低( $P < 0.05$ )。详见图 4、图 5。

## 3 讨论

病原体、毒素、感染、自身免疫因素等均可诱发 ALI。研究表明,急性炎症和氧化应激与 ALI 的发生有关<sup>[6]</sup>。临床治疗 ALI 主要采用保护性肺通气和使用糖皮质激素,但疗效欠佳。油酸因建模简单且成功率高<sup>[7]</sup>被广泛用于复制 ALI 模型。

黄天鹏等<sup>[8]</sup>的研究表明,ALI 伴 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-23 等促炎细胞因子的释放<sup>[8]</sup>。聂进等<sup>[9]</sup>研究发现,ALI 组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的表达量较对照组明显增加。本实验结果显示,模型组大鼠肺泡灌洗液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 水平相较于对照组均明显升高。

AQP 又称水孔蛋白,是位于细胞膜上的蛋白质,可维持肺泡、肺间质及肺毛细血管间的水平衡,在清除肺泡内多余液体过程中起主导作用<sup>[10]</sup>。LI 等<sup>[11]</sup>研究发现,



A. 肺组织病理图 B. 肺组织学评分

图 2 各组大鼠肺组织病理学比较

A. Lung histopathology B. Lung histological score

Fig.2 Comparison of lung histopathology of rats in each group



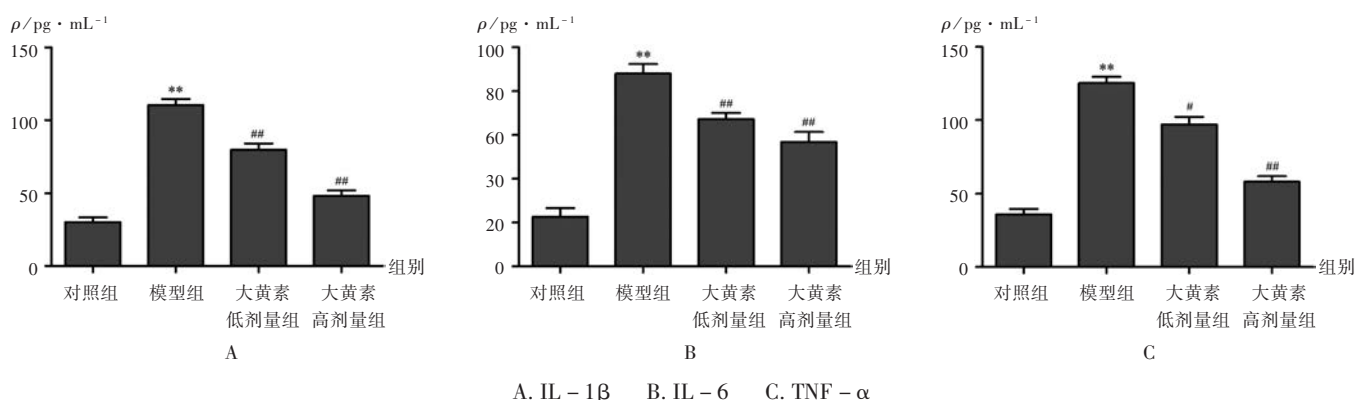


图3 各组大鼠肺泡灌洗液中炎症因子水平比较

Fig. 3 Comparison of inflammatory factors levels in BALF of rats in each group

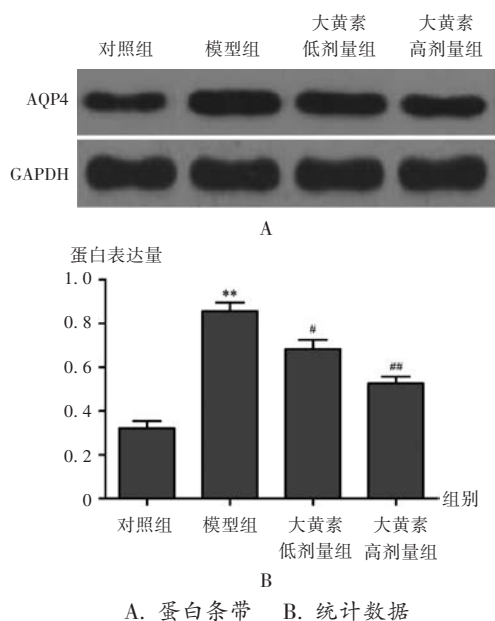


图4 各组大鼠肺组织中 AQP4 蛋白表达水平比较

A. Protein band B. Statistical data

Fig. 4 Comparison of AQP4 protein expression levels in lung tissues of rats in each group

抑制 AQP4 可减轻辐射诱发模型小鼠肺损伤,这与炎症细胞的浸润减弱,以及促炎细胞因子的产生及 M<sub>2</sub> 巨噬细胞的激活均受抑制有关。本实验结果表明,模型组大鼠肺组织中 AQP4 蛋白表达水平较对照组明显升高。

NF- $\kappa$ B 属核转录因子,参与炎症反应、免疫应答、肿瘤生长等多种过程,其信号途径的活化在 ALI 发病机制中起重要作用<sup>[12]</sup>。李莉等<sup>[13]</sup>研究发现,在 ALI 组大鼠肺组织中 NF- $\kappa$ Bp65 的磷酸化程度增加。本实验结果表明,模型组大鼠肺组织中 p-NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平明显升高,与上述文献报道一致。

大黄素具有多种生物学功能,包括抗炎、抗癌、免疫抑制、抗病毒特性等<sup>[14]</sup>。大黄素还可治疗风湿性关节炎,抑制 ERK1/2 和 p38 MAPK 在成纤维样滑膜细胞中的表达。此外,李剑等<sup>[15]</sup>等的研究表明,大黄素可抑制

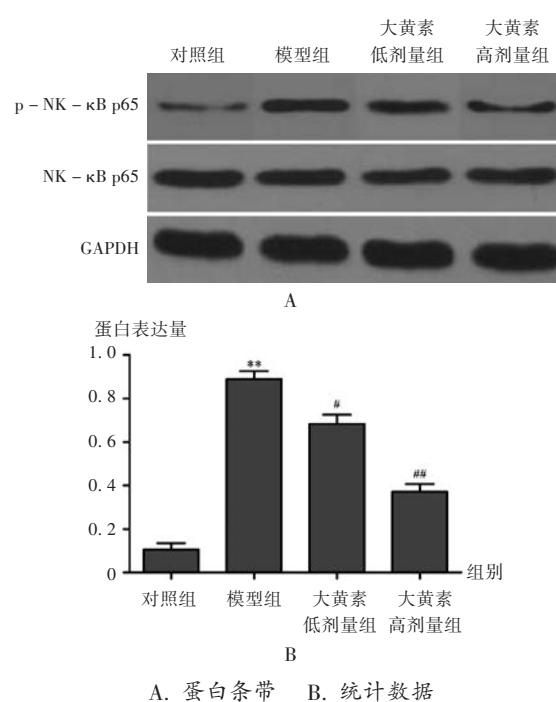


图5 各组大鼠肺组织中 p-NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达水平比较

A. Protein band B. Statistical data

Fig. 5 Comparison of p-NF- $\kappa$ Bp65 protein expression levels in lung tissues of rats in each group

A549 细胞的增殖、迁移和侵袭,下调分泌蛋白 SDF1 和 CXCR4 的表达。本实验结果表明,大黄素可升高大鼠动脉血气指标,降低肺 W/D,下调炎症细胞因子、AQP4 表达及抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活性;其中以高剂量大黄素的效果更好。

综上所述,大黄素能降低急性肺损伤模型大鼠肺 W/D,抑制 AQP4 表达、NF- $\kappa$ B 信号通路的活性及炎症因子的释放,缓解肺组织病理性损伤。该研究可为临床治疗 ALI 提供参考。

#### 参考文献

- [1] 魏桂红. GLP-1 受体在急性肺损伤中对肺血管内皮细胞的保护作用及机制探讨[D]. 南京:南京医科大学,2019.