

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.009

银翘散对急性肺损伤模型小鼠肺损伤的改善及作用机制*

王逸凡, 杨居崩, 赵显芳, 聂发龙, 李秀芳[△]

(云南中医药大学药理教研室, 云南 昆明 650500)

摘要:目的 探讨银翘散对急性肺损伤(ALI)模型小鼠肺损伤的改善及作用机制。方法 将60只KM小鼠随机分为阴性对照组、模型组、银翘散组、脱氧核糖核酸酶I(DNase I)组,各15只。银翘散组灌胃给予银翘散(按生药和体质量计72.54 g/kg),阴性对照组、模型组、DNase I组小鼠均灌胃给予等体积生理盐水,每天1次,连续3 d。末次给药30 min后,腹腔注射10%水合氯醛麻醉小鼠,剥离皮下组织,暴露气管,于气管内滴注脂多糖(5 mg/kg),阴性对照组同法滴注生理盐水,以复制ALI模型小鼠;DNase I组建模成功10 min后同法滴注DNase I(5 mg/kg)。6 h后处死小鼠,取出肺组织,测定肺部湿/干重比(W/D);采用免疫荧光法和蛋白免疫印迹法检测髓过氧化物酶(MPO)和瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)的表达水平;苏木精-伊红(HE)染色,观察肺组织的病理形态。结果 与模型组比较,银翘散组W/D显著降低($P < 0.05$),MPO和CitH3的表达水平均显著降低($P < 0.05$),气道周围及肺组织中的炎性细胞浸润减轻。结论 银翘散可通过抑制中性粒细胞胞外诱捕网形成中MPO和CitH3的表达水平,从而减轻小鼠ALI。

关键词:银翘散;中性粒细胞胞外诱捕网;急性肺损伤;作用机制;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)09-0035-05

Improvement and Mechanism of Yinqiao Powder on Lung Injury in Acute Lung Injury Model Mice

WANG Yifan, YANG Jubeng, ZHAO Xianfang, NIE Falong, LI Xiufang

(Department of Pharmacology, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming, Yunnan, China 650500)

Abstract: Objective To investigate the improvement and mechanism of Yinqiao Powder on the lung injury in acute lung injury (ALI) model mice. **Methods** A total of 60 KM mice were randomly divided into the negative control group, model group, Yinqiao Powder group and deoxyribonuclease I (DNase I) group, with 15 mice in each group. Mice in the Yinqiao Powder group were gavaged with Yinqiao Powder (calculated by the crude drug and body mass, 72.54 g/kg), while mice in the negative control group, model group and DNase I group were gavaged with equal volume of normal saline, once a day for 3 d. The mice were anesthetized by intraperitoneal injection of 10% chloral hydrate 30 min after the last administration, the subcutaneous tissue was stripped, the trachea was exposed, lipopolysaccharide (5 mg/kg) was injected into the trachea, and mice in the negative control group were injected with normal saline in the same way to replicate the ALI model mice. Mice in the DNase I group were injected with DNase I (5 mg/kg) in the same way 10 min after the successful modeling. The mice were killed after 6 h, the lung tissue was taken out, and the wet-to-dry weight ratio (W/D) of the lung was measured. Immunofluorescence and Western blot methods were used to detect the expression levels of myeloperoxidase (MPO) and citrullinated histone H3 (CitH3). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology of lung tissue. **Results** Compared with those in the model group, the W/D in Yinqiao Powder group decreased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of MPO and CitH3 in Yinqiao Powder group decreased significantly ($P < 0.05$), and the infiltration of inflammatory cells around the airway and lung tissue decreased. **Conclusion** Yinqiao Powder can reduce the ALI in mice by inhibiting the expression levels of MPO and CitH3 in the formation of neutrophil extracellular traps.

Key words: Yinqiao Powder; neutrophil extracellular traps; acute lung injury; mechanism; mice

中性粒细胞是机体固有免疫防御系统的重要组成部分^[1]。2004年, BRINKMANN等^[2]首次发现了中性粒细胞对抗感染的新方式,即形成中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)。NETs由薄的染色质纤维组成,包含髓过氧化物酶(MPO)、瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)、防御素、抗菌肽等30种中性粒细胞蛋白^[3]。受到促炎介质、过氧化物

等刺激后,中性粒细胞也可形成NETs^[4]。在脂多糖诱导的新生小鼠急性肺损伤(ALI)模型中,支气管肺泡灌洗液及NETs的游离DNA水平均升高,使用NETs抑制剂脱氧核糖核酸酶(DNase)后,模型小鼠ALI症状缓解,提示NETs的产生可造成肺组织损伤^[5]。银翘散对病毒感染及由脂多糖诱导的小鼠ALI具有防护作用,可对抗

*基金项目:国家自然科学基金[81860724];云南省科技厅中医药基础研究联合专项重大项目[202001AZ070001-001];云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项项目[2019FF002(-054)]。

第一作者:王逸凡,女,在读硕士研究生,研究方向为中药药理学,(电子信箱)984436752@qq.com。

[△]通信作者:李秀芳,女,博士,教授,研究方向为中药药理学,(电子信箱)sofinelxf@163.com。

氧化应激损伤,抑制白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症因子的释放^[6-7]。本研究中探讨了银翘散通过抑制NETs的形成而改善脂多糖诱导的小鼠ALI的作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:XS125A型分析天平(瑞士普利赛斯公司,精度为十万分之一);Infinite M200 PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司);cf16RX型低温高速离心机(日本Hitachi Koki公司);OSE-Y50型高速组织研磨器(天根生化科技<北京>有限公司);Ti-S型倒置相差显微镜、Ci-L型正置荧光显微镜(日本Nikon公司);EG1150型石蜡包埋机、RM2235型手动轮转式切片机(德国徕卡仪器有限公司)。

试药:银翘散组方药材购自云南慈慧药业有限公司,制备工艺参考文献[8];脂多糖(美国Sigma公司,货号为O111:B4,批号为019M4009V);兔来源抗CitH3抗体(批号为GR-13294584),兔来源抗MPO抗体(批号为GR3243222-17),均购自英国Abcam公司;DAPI染料(批号为20200630),驴血清(批号为20200818),DNase I(批号为20200630),均购自北京索莱宝科技有限公司;异硫氰酸荧光素(FITC)山羊抗兔荧光抗体(批号为20000168),四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)山羊抗兔荧光抗体(批号为20000054),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(批号为20000243),抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号为00083126),均购自美国Proteintech Group公司。

动物:健康雄性KM小鼠,60只,体质量17~20 g,购自成都达硕实验动物有限公司,动物生产许可证号为SYXK(川)K2020-030,合格证号为51203500017366。饲养环境为温度18~22℃,相对湿度40%~60%,明暗交替(12 h/12 h)。动物实验经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准,动物伦理审查编号为R-06202009。

1.2 方法

分组、造模与给药:按随机数字表法将60只KM小鼠分为阴性对照组、模型组、银翘散组、DNase I组,各15只。银翘散组小鼠灌胃给予银翘散(按生药和体质量计72.54 g/kg),阴性对照组、模型组、DNase I组小鼠均灌胃给予等体积生理盐水^[9],每天1次,连续3 d。造模前均禁食不禁饮8 h。末次给药30 min后,腹腔注射10%水合氯醛麻醉小鼠,仰卧位固定于手术板上,颈部皮肤消毒,纵向切开,剥离皮下组织,暴露气管,于气管

内滴注脂多糖生理盐水溶液(5 mg/kg),阴性对照组同法滴注等体积生理盐水。随后立即直立小鼠,上下轻度晃动数次,使脂多糖均匀分布于肺部,DNase I组小鼠滴注脂多糖10 min后再同法滴注DNase I(5 mg/kg),缝合伤口,待小鼠自然清醒^[10-11]。

指标观察及检测:1)肺湿/干重比(W/D)。模型复制6 h后处死小鼠,无菌条件下迅速取出肺组织。取左肺上叶,准确称定质量并记录湿重(W),放入恒温80℃干燥箱中烘烤72 h,称定质量,并记录干重(D),计算W/D。2)肺组织形态。取右肺中叶,用10%多聚甲醛固定48 h,脱水,浸蜡,石蜡包埋,制成4 μ m薄片,用苏木精-伊红(HE)染色,于显微镜下观察。3)MPO和CitH3的表达水平。取右肺上叶,采用蛋白免疫印迹法检测MPO和CitH3的表达水平;取左肺中叶,采用免疫荧光法检测MPO和CitH3的荧光表达水平。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计学软件分析。计数资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用LSD法,方差不齐者采用Tamhane's法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 W/D

与阴性对照组比较,模型组小鼠肺组织W/D显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,银翘散组W/D显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 各组小鼠肺组织W/D比较($\bar{X} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of W/D of lung tissue of mice in each group($\bar{X} \pm s$)

组别	W/D	组别	W/D
阴性对照组($n=14$)	5.45 ± 0.80	银翘散组($n=12$)	$6.12 \pm 1.11^{\#}$
模型组($n=13$)	$7.21 \pm 1.88^*$	DNase I组($n=9$)	$6.03 \pm 1.53^{\#}$

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。图3同。

Note: Compared with those in the negative control group,* $P < 0.05$; Compared with those in the model group, $^{\#}P < 0.05$ (for Tab. 1 and Fig. 3).

2.2 肺组织病理形态学变化

阴性对照组小鼠肺泡结构完整,支气管和血管周围未见明显炎症变化;模型组小鼠肺毛细血管通透性增高,肺部水肿,肺组织间隙可见大量中性粒细胞浸润和红细胞渗出;银翘散组和DNase I组小鼠肺组织病变均较模型组减轻,气道周围及肺组织炎性细胞浸润减轻。详见图1。

2.3 肺组织中 MPO 和 CitH3 免疫荧光表达

与阴性对照组比较,模型组小鼠MPO和CitH3的荧光表达水平均升高;与模型组比较,银翘散组小鼠MPO

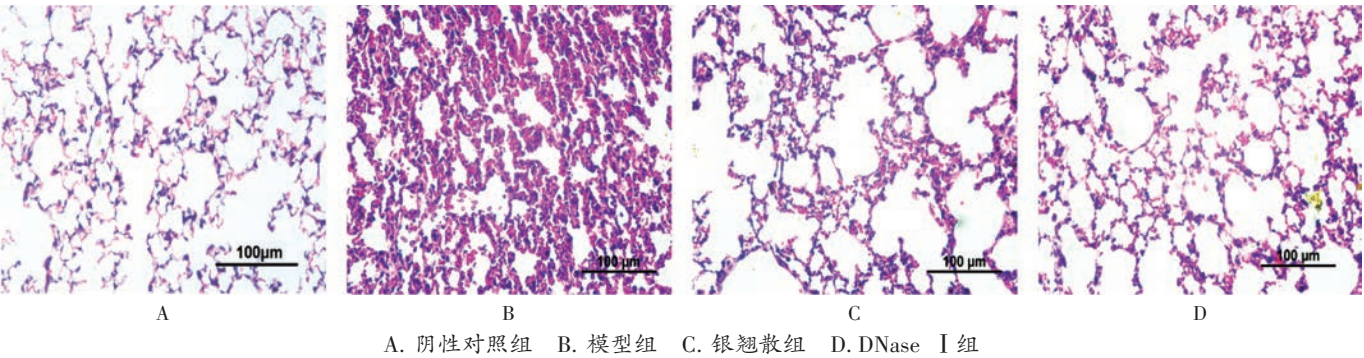


图 1 肺组织病理形态学变化(HE, × 200)

A. Negative control group B. Model group C. Yinqiao Powder group D. DNase I group

Fig. 1 Pathomorphological changes of lung tissue of mice(HE, × 200)

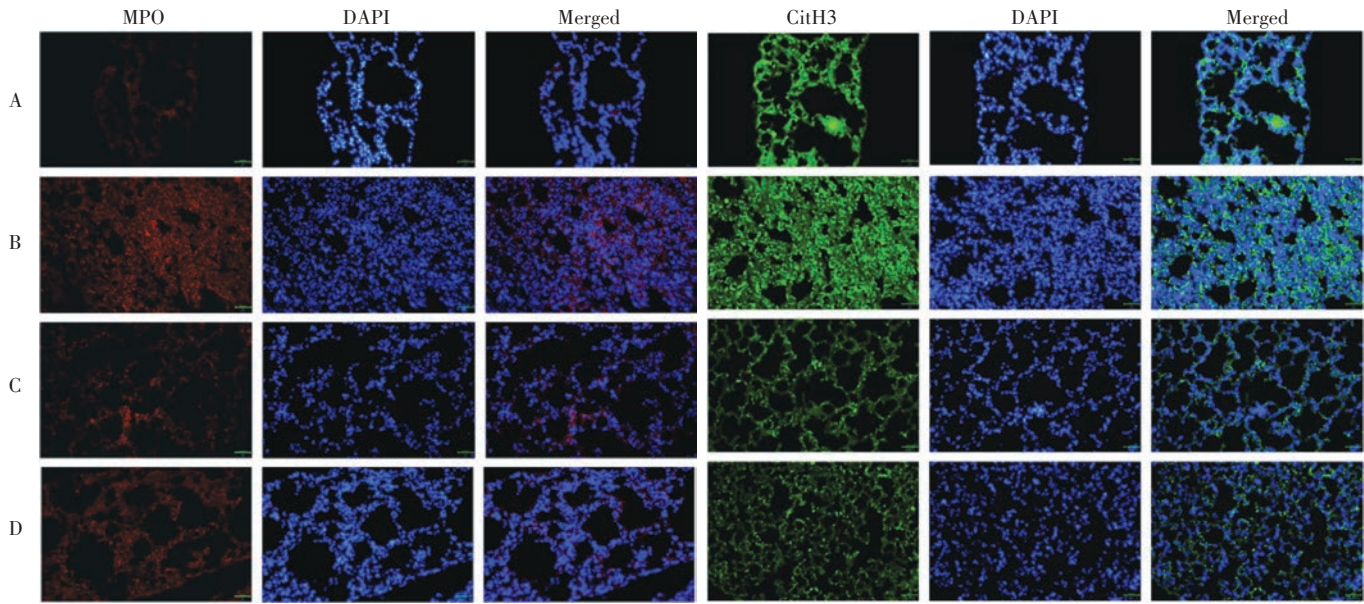
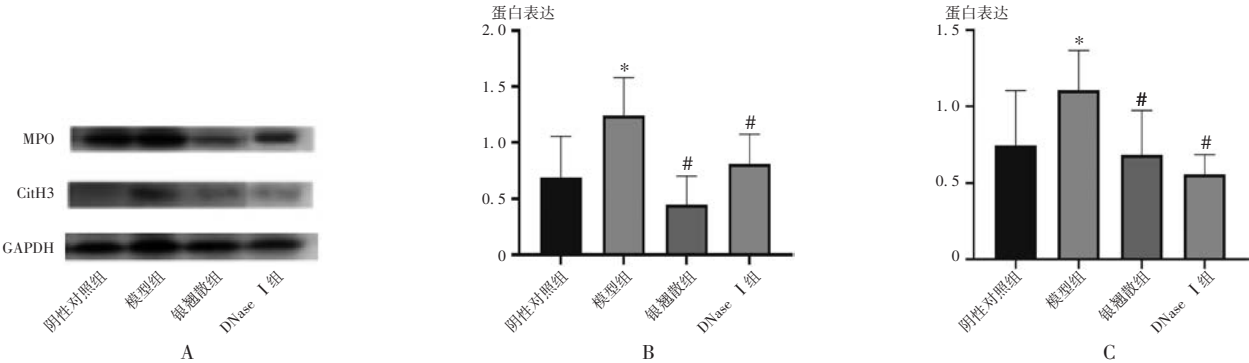


图 2 小鼠肺组织中 MPO 和 CitH3 免疫荧光表达 (× 200)

A. Negative control group B. Model group C. Yinqiao Powder group D. DNase I group

Fig. 2 Immunofluorescence expression of MPO and CitH3 in lung tissue of mice(× 200)



A. 电泳图 B - C. 数据统计(分别为 MPO 和 CitH3)

图 3 小鼠肺组织中 MPO 和 CitH3 蛋白表达水平变化

A. Electropherograms B - C. Statistics(MPO and CitH3, respectively)

Fig. 3 Changes of MPO and CitH3 protein expression levels in lung tissue of mice

和 CitH3 的荧光表达水平均下降。详见图 2。

2.4 肺组织中 MPO 和 CitH3 的蛋白表达水平

与阴性对照组比较,模型组小鼠肺组织中 MPO 和

CitH3 表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,银翘散组小鼠肺组织中 MPO 和 CitH3 表达水平均显著降低($P < 0.05$)。详见图 3。

3 讨论

ALI是由多种诱因引起的以急性、进行性呼吸功能不全为特点的常见临床危重症,严重时表现为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[12]。ALI/ARDS由直接或间接的过度肺部损伤和全身性炎症反应引起,其中NETs发挥了重要作用^[13]。新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)引起的呼吸道疾病,可能发展为ARDS^[14]。COVID-19感染患者气道腔内的NETs,促进血纤蛋白沉积和微血栓形成,阻塞肺泡和细小血管,导致气管堵塞和肺通气障碍^[15]。COVID-19严重感染患者的肺中存在多个广泛分布的NETs浸润区域,NETs通过促进纤维细胞的分化,从而加重肺部纤维化^[16]。中性粒细胞形成NETs,可增强其直接杀灭或间接干扰病原体扩散的作用,阻止上呼吸道感染的进一步发展。但过度激活的中性粒细胞在肺部形成大量的NETs,会直接加剧肺组织的损伤,推动呼吸道感染的恶化进程。

CitH3的生成可反映NETs水平。组蛋白瓜氨酸化后,核小体中组蛋白和DNA间的紧密静电结合被削弱,随后DNA骨架解螺旋,NETs形成^[17]。而组蛋白在体内外均可对上皮细胞产生细胞毒性作用,加重ALI症状^[18]。MPO可导致体外肺上皮和内皮细胞死亡,表明MPO对肺泡-毛细血管屏障有直接毒性作用^[19],其表达也可反映NETs水平。本研究中模型组小鼠肺组织中NETs水平较高,且肺组织炎症细胞浸润严重,可能是NETs中MPO与CitH3等对肺组织的损伤造成的。中医认为,ALI主要由肺部损伤以致肺失宣降、郁热内生,影响水液的输布和排泄导致^[20]。银翘散主要由金银花、连翘、桔梗、甘草、薄荷、牛蒡子等组方,具有疏散风热、辛凉宣散、清热解毒、开宣肺气、止咳等功效^[21-24]。本研究结果显示,银翘散可缓解ALI模型小鼠肺部炎症的渗出和水肿,且小鼠肺组织中NETs形成相关蛋白MPO和CitH3表达水平均降低,提示银翘散可能通过抑制NETs的形成而减轻ALI,但其具体作用机制还需进一步研究。

参考文献

[1] 时小淋,王晓丰,刘鹏,等. 中性粒细胞杀菌机理的最新研究进展[J]. 现代检验医学杂志,2020,35(1):161-164.
[2] BRINKMANN V, REICHARD U, GOOSMANN C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. Science, 2004, 303(5663): 1532-1535.
[3] BUHR ND, KÖCKRITZ - BLICKWEDE MV. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible[J]. J Immunol Res, 2016, 2016:4604713.
[4] BURGNER SS, SCHRODER K. Neutrophil Extracellular

Traps in Host Defense[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(7):a037028.
[5] 徐苏晴,常明,宓兰兰,等. 中性粒细胞胞外诱捕网在新生大鼠急性肺损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2020, 36(5):913-917.
[6] 王佳,冯星火,国丽娜,等. 银翘散对流感病毒感染性重症肺炎小鼠肺组织的修复机制研究[J]. 陕西中医,2020, 41(2):156-159.
[7] 喻良文,黄晓其,钟燕珠. 银翘散对LPS致急性肺损伤小鼠的保护作用[J]. 四川中医,2014,32(5):71-72.
[8] 贾波,李翼. 方剂学(第9版)[M]. 北京:中国中医药出版社,2014:32-33.
[9] 晏雪梅. 解表方对寒冷刺激致小鼠鼻黏膜免疫屏障功能低下的影响[D]. 昆明:云南中医药大学,2020.
[10] CHOI K, KIM M, RYU J, et al. Ginsenosides compound K and Rh₂ inhibit tumor necrosis factor- α -induced activation of the NF- κ B and JNK pathways in human astroglial cells[J]. Neuroscience Letters, 2007, 421(1):37-41.
[11] LI KP, HE ZR, WANG XQY, et al. Apigenin C-glycosides of *Microcos paniculata* protects lipopolysaccharide induced apoptosis and inflammation in acute lung injury through TLR4 signaling pathway[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 124:163-175.
[12] 凌亚豪,魏金锋,王爱平,等. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变,2017, 29(2):151-154.
[13] 赵洁,张根生,崔巍,等. 中性粒细胞胞外诱捕网在急性肺损伤及急性呼吸窘迫综合征气道炎症中的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2020,36(7):664-670.
[14] 李忠霞,岳静茹,张姮. COVID-19粪便传播可能性的研究[J]. 江汉大学学报(自然科学版),2021,49(2):20-28.
[15] BARNES BJ, ADROVER JM, BAXTER - STOLTZFUS A, et al. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2020, 217(6):e20200652.
[16] RADERMECKER C, DETREMBLEUR N, GUIOT J, et al. Neutrophil extracellular traps infiltrate the lung airway, interstitial, and vascular compartments in severe COVID-19[J]. The Journal of Experimental Medicine, 2020, 217(12): e20201012.
[17] SOLLBERGER G, TILLEY DO, ZYCHLINSKY A. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization[J]. Dev Cell, 2018, 44(5):542-553.
[18] FREDRIKSSON L, LI H, ERIKSSON U. The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2004, 15(4):197-204.
[19] WAN RJ, JIANG J, HU CP, et al. Neutrophil extracellular traps amplify neutrophil recruitment and inflammation in neutrophilic asthma by stimulating the airway epithelial cells to