

升降散对急性肺损伤大鼠肺细支气管粘膜上皮细胞 ICAM-1 表达的影响*

★ 魏凯峰 常加松 张梅勇 张庆宏 潘云 (南京中医药大学 南京 210029)

摘要:目的:探讨升降散对急性肺损伤模型大鼠细支气管粘膜上皮 ICAM-1 表达的影响。方法:40 只雄性 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、升降散大剂量组、中剂量组及小剂量组。给药 6 天后,舌下静脉注射 LPS 复制急性肺损伤模型,取肺组织切片,免疫组化检测。采集图像,分析细支气管粘膜上皮细胞胞质的平均灰度。结果:药物治疗组与模型组比较,能明显抑制肺细支气管粘膜上皮细胞胞质 ICAM-1 的表达,有显著性差异。结论:升降散可通过抑制肺细支气管粘膜上皮细胞胞质 ICAM-1 的表达,抑制炎症反应对肺组织造成的急性损伤,对急性肺损伤起到防治作用。

关键词:升降散;急性肺损伤;肺细支气管粘膜上皮细胞;ICAM-1

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Effect of Shengjiang Powder on Expression of ICAM-1 of Lung Bronchiolar Epithelium Mucosae in Acute Lung Injury Rats

WEI Kai-feng, CHANG Jia-song, ZHANG Mei-yong, ZHANG Qing-hong, PAN Yun

Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029

Abstract: Objective: To investigate the effect of Shengjiang Powder on expression of ICAM-1 of lung bronchiolar epithelium mucosae

称取已知含量的同一批样品 6 份,分别加入含量的 80%、100%、120% 的轮环藤碱对照品,按供试品溶液制备方法处理,进行测定,结果平均加样回收率为 98.84%, $RSD = 0.38\%$ 。

2.9 样品测定 取三批地不容药材(批号:20060513、20060514、20060515),按供试品溶液制备项下制备供试品溶液,进行测定,记录色谱峰面积,以外标法计算,结果见表 1。

表 1 地不容药材中轮环藤碱的平均含量($n=3$)

批号	轮环藤碱含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	$RSD(\%)$
20060513	2.34	0.95
20060514	2.32	1.43
20060515	2.28	1.72

3 讨论

3.1 流动相的选择 由于轮环藤碱具有一定的碱性,在流动相中加入一定量的三乙胺,很好地改善了峰形,轮环藤碱在药材样品中和其他杂质峰达到良

好的基线分离。

3.2 提取方法的选择 总生物碱的提取方法文献^[3]多采用在提取溶剂中加入一定量的酸回流提取或者用乙醇回流提取以后再加酸把生物碱提取出来,本文采用乙醇回流提取,并加入 5% 的盐酸将地不容中的生物碱提取出来,较好地达到了提取效果,提取的酸水液加入 5% NaOH 调 pH 至 10,用三氯甲烷多次萃取,生物碱转移比较完全。薄层显示轮环藤碱提取完全,该方法重复性较好。

参考文献

- [1] 江苏新医学院《中药大辞典》编委会. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:809
- [2] 杨云,张晶,陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册(第二版)[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:246
- [3] 安银铃,章欣,胡旺云. 百解藤的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发,1998,11(1):27

(收稿日期:2007-04-21)

* 基金项目:南京中医药大学校自然科学基金(No. 05XZK01)

in acute lung injury rats. Methods: Totally 40 healthy SD male rats of which were divided into 5 groups by random: control group, model group, Shengjiang powder high-, low- and middle- dose groups. At the 6th day after administration, reproduce acute lung injury rat models by injecting LPS into sublingual vein. Detected the expression of ICAM-1 by assessing lung histological sections by immunohistochemistry. Capture the images and measured the average gray values of cytoplasm of lung bronchiolar epithelium mucosae. Results: Compared with model group, Shengjiang Powder could depress the expression of ICAM-1 in the cytoplasm of lung bronchiolar epithelium mucosae, statistical difference existed between treating groups and model group. Conclusion: Shengjiang Powder can preventing and treating acute lung injury by inhibiting inflammatory damage on lung tissues through depressing the expression of ICAM-1 in the cytoplasm of lung bronchiolar epithelium mucosae.

Keywords: Shengjiang Powder; Acute lung injury; Lung bronchiolar epithelium mucosae; Expression of ICAM-1

细胞间粘附分子-1(ICAM-1)是免疫球蛋白样跨膜糖蛋白,在多形核中性粒细胞(PMN)上的配体是整合素 CD_{11}/CD_{18} ,其主要功能是介导 PMN 与血管内皮细胞及上皮细胞间的粘附^[1],在炎症反应发展中发挥着重要作用。本文用免疫组织化学方法研究了中药对肺终末性细支气管粘膜上皮细胞 ICAM-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物及分组 雄性 SD 大鼠,体重(160 ± 20) g,40 只。按随机分为 5 组,每组 8 只:正常对照组、模型组和升降散大剂量组、中剂量组、小剂量组。

1.1.2 药物 升降散:僵蚕、蝉蜕、大黄、姜黄按 6:3:12:1 比例组成。将药在粉碎机中分别粉碎后,过 200 目细筛,置干燥处备用。药物购自药材公司。

1.1.3 试剂及仪器 试剂:ICAM-1 兔抗大鼠、小鼠细胞间粘附分子;检测系统:即用型 SABC(过氧化物酶)试剂盒,一抗稀释:1:100;DAB 显色剂。以上试剂购自武汉博士德公司。LPS (Lipopolysaccharides from Escherichia coli O127:B8) 购自 Sigma 公司。其它试剂为进口或国产分析纯。

图像获取系统:Olympus DP70 CCD。

图像分析系统:北航病理图像分析系统。

1.2 方法

1.2.1 给药与造模 给药:药物治疗组,按大、中、小三个剂量,分别给升降散 4、2、1 g/kg。浓度分别为 10%、5%、2.5%。每天灌胃 2 次,两次间隔时间为 4 小时,连续灌胃 6 天。正常对照组及模型组灌相同剂量的蒸馏水。

造模:末次灌胃 2 小时后,用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉。正常对照组:舌下静脉注射生理盐水 2 mL/kg。模型及药物治疗各组:舌下静脉注射 LPS,用生理盐水配制,浓度为 2.5、5 mg/kg 体重复制急性肺损伤模型。各组于注射 2 小时后采集标本。

1.2.2 取材及切片 各组于注射 2 小时后,完整取出左、右肺,取右下肺叶浸泡于 4% 多聚甲醛中固定,一周后常规石蜡包埋,切片,片厚 5 μ m,置 56 $^{\circ}$ C 温箱中烤 12 小时。

1.2.3 免疫组化 切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温 7 分钟,消除内源性酶;pH6.0 枸橼酸盐缓冲液,高压修复抗原,以下步骤按照试剂盒中说明书操作。

1.2.4 图像观察及分析 每只大鼠选 1 张结构完整的切片,在 40 倍显微镜下观察,每张切片随机选 5~8 支、管径约 120 μ m 的细支气管,用 Olympus DP70 CCD 采集图像,然后用北航病理图像分析系统,分析细支气管粘膜上皮细胞的平均灰度及平均光密度。

1.2.5 统计方法 所获取图像的平均灰度及平均光密度值用 $\bar{x} \pm s$ 描述,用 SPSS11.0 软件(南京中医药大学流行病学与卫生统计教研室)行单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett T3 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

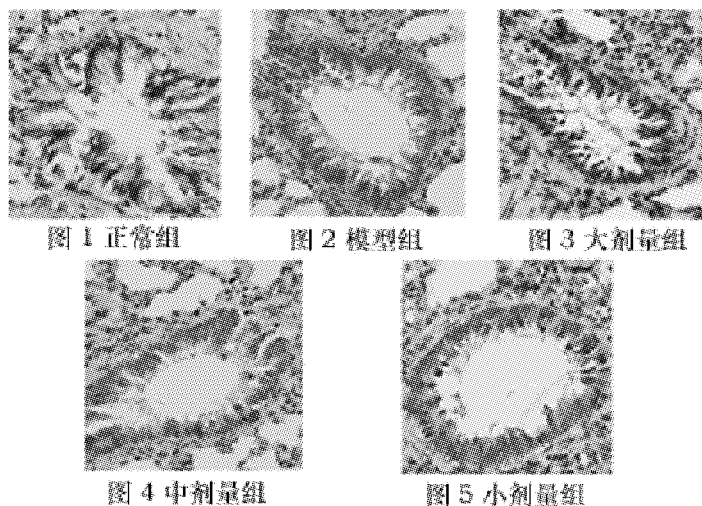
见表 1、图 1~5。

从表 1 可知,正常对照组与模型组比较有显著性差异,与治疗组比较差异无显著性。治疗组中、大剂量组表达明显低于模型组,差异有显著性,高于中剂量组及小剂量组,但三组间差异无显著性;中剂量组及小剂量组表达明显低于模型组,差异有显著性;与正常组及大剂量组比较,二者表达也较低,但四组比较无显著性差异。

表 1 升降散对模型大鼠肺终末性细支气管粘膜上皮 ICAM-1 表达的影响

分组	n	灰度值
正常组	8	142.871 $\pm$ 14.462**
模型组	8	97.709 $\pm$ 23.080##
升降散大剂量组	8	136.227 $\pm$ 15.949**
升降散中剂量组	8	145.062 $\pm$ 11.838**#
升降散小剂量组	8	145.907 $\pm$ 11.321**#

注:与模型组比较: ** $P < 0.01$;与大剂量组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。



注:支气管粘膜上皮细胞 ICAM-1 表达、染色后,胞质呈棕红色,表达越显著,染色越深;未表达胞质染色后呈蓝色。

3 讨论

ICAM-1 为免疫球蛋白超家族粘附分子之一,它作为炎性细胞表面 β_2 整合素(CD_{11a}/CD_{18} , CD_{11b}/CD_{18})的配体,在多种细胞均有表达。在正常大鼠肺血管内皮、炎性细胞表面以及肺间质细胞表面 ICAM-1 呈弱表达,而在肺泡上皮表达强于在肺泡巨噬细胞及血管内皮的表达^[2]。以往研究大多集中在药物对肺微血管内皮细胞及肺泡上皮细胞 ICAM-1 的表达影响方面,如刘氏等研究表明,LPS 能诱导肺微血管内皮细胞 NF- κ B 的活化,活化的 NF- κ B 迅速转核与 ICAM-1 启动子部位 κ B 位点结合,启动 ICAM-1 的转录,ICAM-1 再介导 PMVEC-PMN 的粘附,从而导致 PMN 肺微血管内的“扣押”,血栓形成和血管内皮损伤,形成 LPS 诱导的 ALI^[3]。佟氏等观察到在博来霉素(BLM)致大鼠肺组织慢性炎症过程中,肺泡上皮细胞 ICAM-1 表达于 BLM 灌注 24 小时即开始升高,与生理盐水对照组比较,差异有显著性,且肺组织炎症病理积分与肺泡上皮 ICAM-1 表达存在明显的相关性,表明肺泡上皮 ICAM-1 表达与肺组织炎症细胞之间的作用^[2]。

升降散为杨栗山《伤寒温疫条辨》治温疫 15 方之总方,临床用治多种外感疾病及内伤之疾均有显著疗效。该方由僵蚕、蝉衣、姜黄、大黄、米酒和蜂蜜等 6 味药组成。杨栗山用其治“表里三焦大热、其证

治不可名状者”。现代临床及实验研究发现,本方具有较好地退热、抗炎以及保护肺组织作用^[4~6]。

本实验观察了 LPS 诱导大鼠肺终末性细支气管粘膜上皮细胞 ICAM-1 表达情况,结果表明,LPS 诱导后,其表达显著增加,差异有显著性。同时观察了升降散对其表达的影响,结果表明,大、中、小剂量组药物对 ICAM-1 的表达都有明显的抑制作用,与模型组比较有显著性差异,其中大剂量组表达较中、小剂量组高,但三者间无显著性差异。实验结果表明,升降散可以通过抑制肺组织细胞 ICAM-1 的表达,以起到防治 ALI 的作用。

参考文献

- [1] Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process[J]. Cardiovascular Research, 1996, 32: 733 ~ 742
- [2] 佟振月,侯立新,马跃文,等. 肺纤维化细胞间粘附分子 1 基因产物表达的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(6): 363 ~ 365
- [3] 刘小丽,顾大勇,马布仁,等. LPS 直接诱导的肺微血管内皮细胞与 PMN 的粘附作用及核因子 κ B 调控机理的实验研究[J]. 青海医药杂志, 2003, 33(1): 2 ~ 6
- [4] 刘建军,孙向党. 升降散加减治疗重症肺炎 11 例观察[J]. 中医药学刊, 2001, 19(2): 149
- [5] 李际强,张春学,胡溪柳,等. 升降散抗小鼠流感病毒性肺炎的实验研究[J]. 实用中医内科杂志, 2004, 18(1): 28
- [6] 彭燕. 孙定隆副教授应用升降散加减治疗小儿重症肺炎经验[J]. 疑难病杂志, 2004, 3(3): 179

(收稿日期:2007-05-17)