

牛珀至宝微丸对内毒素急性肺损伤水通道蛋白表达的影响*

★ 黄洁^{1**} 李慧² 付友金² 陈肖君² 黄玮² 杨丽娜² 陈阳燕² 张蓉² 叶兵² 杜少辉² (1. 深圳市人民医院中医科 深圳 518020; 2. 深圳市中医院内科 深圳 518033)

摘要:目的:观察牛珀至宝微丸对内毒素急性肺损伤纤维化水通道蛋白表达的影响。方法:静脉注射内毒素 1.5 mg/kg、腹腔注射 D-氨基半乳糖 100 mg/kg 造成内毒素休克模型,用牛珀至宝微丸干预处理,HE 染色观察肺损伤, Van Gieson 法染色检测肺胶原纤维表达,免疫组化染色观察 AQP-1 和 AQP-5 表达。结果:内毒素造成严重的急性肺损伤,肺组织胶原纤维染色显著增强,AQP-1 和 AQP-5 表达减弱;牛珀至宝微丸能减轻急性肺损伤及肺组织胶原纤维表达,并能提高 AQP-1 和 AQP-5 表达。结论:牛珀至宝微丸能减轻内毒素急性肺损伤和纤维化的机理可能与调节 AQP-1 和 AQP-5 表达相关。

关键词:牛珀至宝微丸;肺纤维化;急性肺损伤;内毒素;水通道蛋白

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

The Influence of Niupozhibao pellet on the expression of aquaporins in LPS-induced acute lung injury

HUANG Jie¹, LI Hui², FU Jin-you², CHEN Xiao-jun², HUANG Wei², YANG Li-na², CHEN Yang-yan², ZHANG Rong², YE Bing², DU Shao-hui²

1. Department of TCM, Shenzhen people's hospital, Shenzhen 518020

2. Shenzhen Hospital of TCM, Shenzhen 518000

Abstract: Objective: To observe the effect of Niupozhibao (NPZB) pellet on the expression of aquaporins in LPS-induced acute lung injury (ALI). Methods: LPS-induced shock models were established by applying the intravenous LPS 1.5 mg/kg and the intraperitoneal D-Galn 100mg/kg, and it was intervened with NPZB pellet. Then the lung injury was observed with HE staining, the pulmonary collagen fibers expression was detected with Van Gieson staining, and the expression of AQP-1 and AQP-5 was surveyed by immunohistochemical staining. Results: LPS induced severe ALI, the staining of collagen fibers in lung tissues increases dramatically, and the expression of AQP-1 and AQP-5 decreased. NPZB pellet lessened ALI and the expression of collagen fibers in lung tissues, and improve the expression of AQP-1 and AQP-5. Conclusion: The effect of NPZB pellet on LPS-induced ALI and fibrosis might be related to the regulation of AQP-1 and AQP-5 expression.

Key word: NPZB pellet; pulmonary fibrosis; acute lung injury; LPS; aquaporin

牛珀至宝微丸由水牛角、麝香、地黄、朱砂、牛黄、郁金等组成,具有醒神开闭、祛邪固脱之功,前期研究表明对感染性休克的内厥外脱证及内毒素休克所致的多脏器损伤较好的疗效^[1]。2003 年春季发生的具有强烈传染性的严重非典型肺炎(severe acute respiratory syndrome, SARS)的主要死因是急性

呼吸窘迫综合征(ARDS)^[2,3],而 ARDS 为重度的急性肺损伤,难以控制的肺纤维化约占其死因的 40%~70%^[4]。鉴于 SARS 防治中也有不少单位推荐使用至宝丹,本研究重点探讨牛珀至宝微丸对急性肺损伤及其纤维化的影响,并从水通道蛋白角度研究其相关机理。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30572454);广东省中医药管理局项目(No. 2050055)。

** 作者简介:黄洁(1973-),女,副主任医师

1 材料与方法

1.1 材料

健康普通级 Sprague-Dawley 大鼠 36 只, 220 ~ 250 g, 雌雄不限, 雌鼠无孕, 由广州中医药大学实验动物中心提供。脂多糖 (Lipopolysaccharide LPS), Sigma 产品; 氨基胍 (Aminoguanidine Hemisulfate AG), CN CORP 产品; 其余化学试剂均为分析纯用双蒸水配制。AQP-1 和 AQP-5SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒, 由 Santa Cruz 公司提供。牛珀至宝微丸 (1 g/支, 由江西中医学院热病研究室提供, 批号 9901, 主要药物为水牛角、玳瑁、麝香、琥珀、血竭、藏红花、大黄、石菖蒲等, 将微丸溶于水, 制备成含生药量 1mg/ml 的口服液)。

1.2 分组及处理措施

SD 大鼠随机分成正常组、模型组、中药治疗组 3 组, 分 3 批进行实验, 每批每组 12 只。中药治疗组用牛珀至宝微丸悬溶液 (1 mg/L) 每天两次, 灌胃 7 d 后进行实验。动物于实验前 12 h 禁食, 自由饮水, 实验时腹腔注射 10% (W/V) 水合氯醛 (0.3 ml/kg) 麻醉, 右颈总动脉分离, 插 PE50 管, BL-410 生理仪观察并记录血压变化。待 10 ~ 20 min 血压稳定后记录血压并定为记录 0 点, 除正常组外, 其余各组于尾静脉注射 LPS (1.5 mg/kg), 腹腔注射 D-GalN (100 mg/kg), 正常组相应注射等量生理盐水。

1.3 观察指标

1.3.1 HE 染色 以上各组分别于造模后 6 h 后以 4% (W/V) 多聚甲醛灌注固定, 取肺组织块, 梯度酒精脱水, 浸蜡包埋, 切片, 片厚 3 μ m, 贴片 (玻片经粘片剂 APES 处理), 62 $^{\circ}$ C 烤箱过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 常规 HE 染色, 光镜下观察病理变化。

1.3.2 Van Gieson 法染色 同上处理方法至双蒸水, 用 Weigert 铁苏木素液染 5 ~ 10 min, 流水洗数分钟, 1% 盐酸乙醇分化, 自来水洗至蓝化, 再蒸馏水洗。用 Van Gieson 液染 1 ~ 5 min, 倾去染液, 直接用 95% 乙醇分化和脱水。无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。光镜下观察可见胶原纤维呈红色, 肌纤维、胞质及红细胞呈黄色, 细胞核呈蓝褐色。

1.3.3 AQP-1 和 AQP-5 免疫组化染色 以上各组实验结束即时以 4% (W/V) 多聚甲醛灌注固定, 取肺组织块, 梯度酒精脱水, 浸蜡包埋, 切片, 片厚 3 或 5 μ m, 贴片 (玻片经粘片剂 APES 处理), 62 $^{\circ}$ C 烤箱过夜, 二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 3 μ m 厚的组织片用于 HE 染色, 5 μ m 厚的组织片用于免疫组化染色, 按链酶亲和素-过氧化物酶 (strept avidin-biotin complex, SABC) 免疫组化试剂盒说明操作, DAB 显

色, 不复染, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选取 10 个高倍视野, 计算其中阳性细胞数和总细胞数, 求出百分比, 分析结果。

1.4 统计方法

所有数值输入 SPSS 统计软件采用 *t* 检验, $P < 0.01$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 HE 染色结果

正常组细支气管周围偶有炎细胞浸润, 肺泡完整正常。模型组肺泡腔内有炎性渗出物, 大量炎细胞浸润, 细支气管收缩闭锁, 肺间质增厚, 肺泡壁毛细血管扩张充血, 腔内有微血栓形成。中药组肺泡腔内有炎性渗出物, 炎细胞浸润, 渗出减少, 水肿减轻, 肺间质基本正常, 肺泡完整。

2.2 Van Gieson 法染色结果

与正常组相比, 模型组胶原纤维表达明显较强, 血管壁、支气管壁和肺泡隔均有大量红色胶原纤维阳性表达, 肺泡隔以红色的胶原纤维相连, 血管壁与支气管壁的内皮下与肌层下均有胶原纤维表达; 中药治疗组也有较多的胶原纤维表达, 血管壁与支气管壁的胶原纤维主要表达在肌层下, 内皮下的胶原纤维表达显著减少, 肺泡隔阳性较模型组显著减弱。

2.3 AQP-1 和 AQP-5 免疫组化 G 染色结果

正常组 AQP-1 和 AQP-5 呈高水平表达, 其中 AQP-1 主要定位于肺血管内皮, 呈棕黄色染色强阳性表达, AQP-5 主要定位于肺泡上皮, 也呈棕黄色染色强阳性表达, 模型组 AQP-1 和 AQP-5 的表达均较正常组明显减弱, 表现在定位于肺血管内皮和肺泡上皮的棕黄色染色浅。而中药治疗组其较模型组表达增强, 但较正常组表达弱。

表 1 各组大鼠肺 AQP-1 免疫组化染色结果 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	阳性细胞数	总细胞计数	阳性率 (%)
正常	12	220 $\pm$ 25	300 $\pm$ 14	73 $\pm$ 3.5
模型组	12	120 $\pm$ 22	300 $\pm$ 12	40 $\pm$ 2.7 **
中药组	12	180 $\pm$ 31	300 $\pm$ 16	60 $\pm$ 2.8 * $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠肺 AQP-5 免疫组化染色结果 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	阳性细胞数	总细胞计数	阳性率 (%)
正常	12	160 $\pm$ 12	300 $\pm$ 10	53 $\pm$ 2.6
模型组	12	80 $\pm$ 15	300 $\pm$ 12	27 $\pm$ 2.1 **
中药组	12	125 $\pm$ 30	300 $\pm$ 20	42 $\pm$ 3.0 * $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

牛珀至宝微丸是根据清代何廉臣《重订广温热

论》所载犀珀至宝丹而化裁,本方是在中医“三宝”之一的至宝丹基础上增加了通瘀开窍、辟秽化浊的功能,并且为了使其更有利于体内吸收,本课题组将其改为微丸剂型。何氏称其“此丹大剂通瘀直达心窍,又能上清脑络,下降浊阴,专治一切时邪内陷血分,瘀塞心房,不省人事”。

急性肺损伤是各种严重的休克、感染与创伤等所致的急性弥漫性肺泡和肺血管内皮细胞的损伤,严重的表现为急性呼吸窘迫综合征,其中难以控制的肺纤维化约占其死因的40%~70%^[4]。目前最常用的糖皮质激素只对不足20%的病人有效,且有不少副作用发生^[5]。肺是内毒素最常累及和最先攻击的靶器官,本课题组长期致力中药对内毒素休克所致多脏器损伤保护的研究,在国家自然科学基金的多次资助下,本课题组观察到牛珀至宝微丸对内毒素休克所致的多脏器损伤有明显改善作用,本研究发

现牛珀至宝微丸能改善急性肺损伤及其并发的纤维化。水通道属于主体内在蛋白家族,迄今为止,已在细菌、酵母、植物、昆虫和脊椎动物中发现至少50余种水通道。世界上第一个哺乳动物的水通道是由Agre等于1988年发现的,1991年确定了其反向转运脱氧核糖核酸(cDNA)顺序,随后进行了功能鉴定,证明了其协助细胞转运水的作用。自1992年Preston等^[6]首次在Science杂志上报道以来,已证实AQP是一组对水特异通透的膜蛋白分子,无论在生理或病理状态下对肺内的水平衡调节发挥重要作用。研究发现,敲除AQP-1基因小鼠的肺泡-毛细血管水通透性可降低至1/10^[7],同时敲除AQP-1、AQP-5基因小鼠的水通透性甚至可降低至1/25~

1/30^[8]。且近年的研究表明,AQP-1、AQP-5参与了多种肺损伤后肺水肿的病理过程^[9],其中AQP-1主要定位于肺微血管内皮,其主要功能是清除支气管和血管周围组织的水分,AQP-5位于I型肺泡膜,主要功能是清除肺泡腔内水分。综上所述,内毒素大鼠肺组织AQP-1和AQP-5表达显著下调。中药治疗后AQP-1或AQP-5表达有所提高,表明牛珀至宝微丸减轻肺水肿及肺纤维化的机理可能与调节水通道蛋白相关。

参考文献

- [1] 万兰清,马超英,耿耘,等. 开闭固脱法治疗感染性休克106例的临床与实验研究[J]. 中国病理生理杂志,1994,10(增刊):60-63.
- [2] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome [J]. N Engl J Med, 2003, 348(20):1953-1966.
- [3] 何为群,陈思蓓,刘晓青,等. SARS合并ARDS患者死亡高危因素分析[J]. 中国危重病急救医学,2003,15(6):336-337.
- [4] Marshall R, Bellingan G, Laurent G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane[J]. Thorax, 1998, 53:815-817.
- [5] 李兴旺,蒋荣猛,郭嘉祯. 糖皮质激素治疗重症急性呼吸综合征初探[J]. 中华内科杂志,2003,42(6):378-381.
- [6] Preston GM, Carroll TP, Guhhino WB, et al. Appearance of water channels in xemopuococyte expressing red cell CHIP28 protein[J]. Science, 1992, 256(5055):385-387.
- [7] JIAO Guangyu, L I Erran, YU Runjiang. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats [J]. Chin Med J, 2002, 115(7):963-967.
- [8] Ma T, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. [J]. J Clin Invest, 2000, 105(1):93-100.
- [9] 岳冬梅,薛辛东. 水通道蛋白1,5与新生鼠高氧肺损伤肺水肿的关系研究[J]. 中国当代儿科杂志,2006,2(4):147-150.

(收稿日期:2008-11-17)

新专栏征稿

《江西中医学院学报》(双月刊)已全面改版,以下重点栏目面向全国征稿:

● **理论研究** 对中医重大理论问题进行专题论述。讨论专题有:中医水理论研究、火理论研究、体质学说研究、梦理论研究、病证理论研究。

● **百家争鸣** 旨在打破中医学术界的沉闷局面,对中医药事业发展的重大问题展开讨论争鸣。争鸣要求坚持良好的学术道德,敢说真话,敢亮观点。争鸣的主要内容有:中医教育反思、中医科研走向、中医发展前景、中西医结合前景、新时期中医的生存模式等。

● **中医文化研究** 主要反映中医与古代哲学、古代社会政治经济、人文地理等文化形态的研究成果以及五运六气研究、生命学说研究的最新动态。

● **道教医学研究** 包括道教医药文献研究、道教医药人物研究、道教医药史研究、道教医学理论研究、道教医学方药研究、道教医学养生研究等,要求观点正确,不违背国家宗教政策。

欢迎广大作者踊跃投稿。