

丹参酮IIA对内毒素致急性肺损伤大鼠的影响

张建国¹, 陆素琴^{2*}, 胡建慧², 胡振奎¹, 缪志龙²

¹江苏大学附属医院, 江苏 镇江

²镇江市中医院, 江苏 镇江

Email: *suqin0511@126.com

收稿日期: 2021年2月12日; 录用日期: 2021年3月16日; 发布日期: 2021年3月23日

摘要

目的: 通过观察研究丹参酮IIA作用于内毒素导致的急性肺损伤大鼠后相关炎症因子及氧合指标的影响, 从而探讨该药对急性肺损伤的治疗效果。方法: 选取成年健康大鼠40只, 采用气道内滴注脂多糖(LPS)来建立急性肺损伤(ALI)的大鼠模型, 随机分为4组: 生理盐水对照组, LPS组, 丹参酮IIA + LPS观察组, 血必净 + LPS观察组, 在治疗6 h, 12 h后, 观察各组大鼠动脉血氧分压(PaO₂)、支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 及细胞总数, 中性粒细胞计数的改变。结果: LPS组大鼠中动脉血氧分压较对照组均明显降低, 丹参酮IIA + LPS组和血必净 + LPS组也降低, 与LPS组相比明显升高($P < 0.05$), 丹参酮IIA + LPS组和血必净 + LPS组相比无统计学差异($P > 0.05$); LPS组大鼠中细胞总数及中性粒细胞计数升高, 与对照组相比($P < 0.05$), 丹参酮IIA + LPS组和血必净 + LPS组也升高, 但与LPS组相比明显降低($P < 0.05$), 丹参酮IIA + LPS组和血必净 + LPS组相比无统计学差异($P > 0.05$); LPS组支气管肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)活性较正常大鼠升高, 丹参酮IIA + LPS组, 血必净 + LPS组的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)活性较LPS组降低($P < 0.05$)。结论: 丹参酮IIA能够下调内毒素导致的急性肺损伤大鼠的炎症因子水平, 缓解急性肺损伤的炎症反应, 从而对急性肺损伤起到治疗效果。

关键词

丹参酮IIA, 急性肺损伤, 肿瘤坏死因子- α , 脂多糖

Effects of Tanhinone IIA on Mice with Endotoxin-Caused Acute Lung Injury

Jianguo Zhang¹, Suqin Lu^{2*}, Jianhui Hu², Zhenkui Hu¹, Zhilong Miao²

¹The Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu

²Zhenjiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhenjiang Jiangsu

Email: *suqin0511@126.com

*通讯作者。

文章引用: 张建国, 陆素琴, 胡建慧, 胡振奎, 缪志龙. 丹参酮 IIA 对内毒素致急性肺损伤大鼠的影响[J]. 亚洲急诊医学病例研究, 2021, 9(2): 15-19. DOI: 10.12677/acrem.2021.92003

Abstract

Objective: By observing study of tanshinone IIA role in endotoxin induced acute lung injury in rats after related inflammatory factor and oxygenation index, explore the effect of the drug in the treatment of acute lung injury. **Methods:** Selected 40 adult health rats, established the rat model of acute lung injury (ALI) by using the lipopolysaccharide (LPS) airway instillation, divided into 4 groups randomly: normal control group, LPS group, tanshinone IIA + LPS group, Xuebijing + LPS group. Observing rat arterial blood oxygen partial pressure (PaO₂), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in bronchoalveolar lavage fluid, and the total number of cells, and neutrophils count change after treatment 6 h, 12 h. **Result:** The arterial blood oxygen pressure of the LPS group was significantly lower than the control group, and the level of the tanshinone IIA + LPS group and the Xuebijing + LPS group were also reduced, but significantly higher than in the LPS group ($P < 0.05$), no statistical difference between the tanshinone IIA + LPS group and the Xuebijing + LPS group ($P > 0.05$). The total number of cells and neutrophil count were increased compared with control group ($P < 0.05$). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) activity in the BALF in the LPS group was higher than in normal rats, the activity of tumor necrosis in the tanshinone IIA + LPS group and the Xuebijing +LPS group were lower than that of the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone IIA can reduce the level of inflammatory factor in mice with acute lung injury caused by endotoxin, relieve the inflammatory response of acute lung injury, and have therapeutic effect on acute lung injury.

Keywords

Tanshinone IIA, Acute Lung Injury, Tumor Necrosis Factor- α , Lipopolysaccharide

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)是急性呼吸窘迫综合征的早期阶段,属于临床上常见疾病,一旦处理不当,常常进展至多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF) [1],虽然人们对该病的研究较多,但临床死亡率仍高居不下,因此对于 ALI 的发病机制及治疗的研究十分必要。丹参酮 IIA 是中药丹参的最主要有效成分,生物学活性说明其可以清除炎症介质、减轻炎症反应、改善组织的缺血再灌注[2],但对于脓毒症导致的急性肺损伤是否有效还未见报道。本实验通过给脓毒症导致急性肺损伤大鼠使用丹参酮 IIA,监测大鼠的炎症指标及数据,探讨使用丹参酮 IIA 的治疗价值,并探求其可能的抗炎机制。

2. 材料与方法

2.1. 材料

健康雄性 SD 大鼠 40 只(清洁度 II 级),平均体重(256 ± 19) g,在江苏大学动物实验中心(SPF)级环境中饲养,实验获得江苏大学动物管理和使用委员会批准。实验使用主要试剂:丹参酮 IIA 磺酸钠购自上海上药第一生化药业有限公司,脂多糖(LPS)购自美国 Sigma 公司,肿瘤坏死因子- α 检测试剂盒购自英国 Serotec 公司。

2.2. 方法

1) 大鼠急性肺损伤模型的建立：将健康雄性大鼠随机分为对照组，LPS 组，丹参酮 IIA + LPS 组，血必净 + LPS 组，每组 10 只老鼠。具体建模方法是所有大鼠在实验前 12 h 开始禁食、但不禁饮，实验 2 h 前开始禁饮。动物称重后 10%水合氯醛(4 ml/kg)腹腔注射麻醉，无菌条件下，行颈前正中切口，长约 0.5 cm，暴露气管后，使动物呈头高脚底位，用 7 号针头刺入气管，缓慢滴注 5.0 mg/kg 的内毒素(LPS)。注射完毕后，保持这一体位约两分钟，随后缝合创口。即刻尾静脉持续输注 NS 0.5 ml/kg/h；丹参酮 IIA 治疗组，尾静脉注射丹参酮 IIA 10 mg/kg；血必净治疗组，尾静脉注射血必净 10 ml。分别在 6 小时和 12 小时后，将各组大鼠再次麻醉，采集相应的标本。

2) 血液标本的收集：将大鼠再次麻醉后，开胸，暴露大鼠心脏，取心脏内血液 0.5 ml，做动脉血气分析，测定各时间点的动脉氧分压(PaO₂)。

3) 测定血浆中 TNF- α 各组在获得血清后用于 TNF- α 的检测，按照试剂盒说明书进行操作。

4) BALF 的提取：解剖分离大鼠的颈部组织，暴露气管，尖刀划开气道，插入灌洗管，刻度适中，然后结扎防止滑脱，注入 1.0 ml 的平衡液，回收，总共 6 次。将肺泡灌洗液离心后，取上清液，冻存。离心后剩余的肺泡灌洗液中沉淀细胞混匀，裂解去除红细胞，统计细胞总数，然后 4%多聚甲醛固定后，进行 HE 染色，分别对中性粒细胞和淋巴细胞进行计数。

2.3. 统计学分析

采用 SPSS17.0 版统计学软件分析处理研究数据，计量资料以均数 \pm 标准误差($\bar{x} \pm s$)描述，多组比较经 F 检验，两两比较经 t 检验；计数资料比较经 χ^2 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

1) 动脉血气结果分析 注射脂多糖(LPS)后导致急性肺损伤的大鼠出现呼吸急促，状态萎靡，对外界刺激反应迟钝。在不同的时间点，LPS 组、丹参酮 IIA + LPS 组、血必净 + LPS 组的 PaO₂ 均要低于对照组($P < 0.05$)，其中丹参酮 IIA + LPS 组、血必净 + LPS 组的 PaO₂ 降低程度明显低于单纯的 LPS 组($P < 0.05$)。见表 1。

2) 支气管肺泡灌洗液中炎性细胞的影响：正常大鼠的肺泡灌洗液中以淋巴细胞占主要成分；脂多糖导致的急性肺损伤大鼠的灌洗液中白细胞数明显升高，而且以中性粒细胞为主。丹参酮 IIA + LPS 组和血必净 + LPS 组的白细胞数也升高，但与 LPS 组相比，升高程度明显较低($P < 0.05$)。说明丹参酮 IIA 和血必净能够抑制炎症因子，减少机体的炎症反应。见表 2。

3) 丹参酮 IIA 对 TNF- α 的影响：在正常大鼠的血清中基本不表达 TNF- α 。给与 LPS 刺激后，TNF- α 的表达水平明显的升高，当给与丹参酮 IIA 和血必净后，TNF- α 的水平较 LPS 组有所下降($P < 0.05$)。见表 3。

Table 1. Impact on the oxygen partial pressure at different time points after Tanshinone IIA processed ($\bar{x} \pm s$)

表 1. 丹参酮 IIA 处理后不同时间点氧分压的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PaO ₂ (mmHg)	
	6 h	12 h
对照组	87.5 \pm 4.8	84.7 \pm 6.2
LPS 组	54.9 \pm 3.8 ^a	47.2 \pm 3.7 ^a
丹参酮 IIA + LPS 组	68.3 \pm 2.8 ^{a,b}	64.5 \pm 1.9 ^{a,b,c}
血必净 + LPS 组	63.8 \pm 3.1 ^{a,b}	58.6 \pm 1.5 ^{a,b,c}

注：与对照组不同时间点比较 ^a $P < 0.05$ ，与 LPS 组相比，^b $P < 0.05$ ，两治疗组在不同时间点，氧分压的差异不大 ^c $P > 0.05$ 。

Table 2. The change of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid after Tanshinone IIA treatment ($\bar{x} \pm s$)
表 2. 丹参酮 IIA 处理后对支气管肺泡灌洗液中炎性细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	白细胞总数	中性粒细胞
对照组	10	1.68 ± 0.76	0.003 ± 0.002
LPS 组	10	42.56 ± 14.53 ^a	38.95 ± 10.82 ^a
丹参酮 IIA + LPS 组	10	25.49 ± 5.38 ^{a,b}	22.71 ± 3.92 ^{a,b}
血必净 + LPS 组	10	27.52 ± 4.28 ^{a,b}	23.57 ± 5.26 ^{a,b}
<i>F</i> 值		4.309	6.582
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: 与对照组相比较, ^a*P* < 0.05, 与 LPS 组相比, ^b*P* < 0.05。

Table 3. The effect of LPS rats serum TNF- α after Tanshinone IIA treatment ($\bar{x} \pm s$)
表 3. 丹参酮 IIA 对 LPS 大鼠血清中 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α
对照组	10	16.4 ± 7.5
LPS 组	10	59.3 ± 8.2 ^a
丹参酮 IIA + LPS 组	10	32.5 ± 6.1 ^{a,b}
血必净 + LPS 组	10	35.3 ± 7.4 ^{a,b}
<i>P</i> 值		<0.05

注: 与对照组相比较, ^a*P* < 0.05, 与 LPS 组相比, ^b*P* < 0.05。

4. 讨论

急性肺损伤的病理生理学特点主要表现为炎症的持续存在, 肺泡内皮细胞及上皮细胞屏障被破坏, 激活了大量的中性粒细胞与血小板, 并聚集成团, 并导致凝血功能的障碍等[3]。在脓毒症发生发展过程中, 病原体的入侵和免疫功能的受损是其主要因素。同时促炎因子的大量分泌, 降低了肺泡内巨噬细胞的功能, 导致呼吸道病原菌的定植并由此产生肺功能的损伤。研究目前主要集中在中性粒细胞与肺泡巨噬细胞、肺泡巨噬细胞与肺血管内皮细胞之间的相互作用, 以及相关受体分子的相互作用, 如 TLR4 和 TLR2 的相互作用。在肺部急性炎症时, 中性粒细胞表面的模式识别受体通过识别病原微生物表面的致病因子, 从而激发炎症反应[4]。由于炎性细胞因子的大量释放, 诱导了肺组织的炎症反应是导致肺泡毛细血管通透性增加和肺泡内液体清除障碍的主要原因之一, PMN (多形核白细胞)在其中发挥着重要作用[5]。PMN 激活后, 释放很多促炎细胞因子, 如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 等, 从而破坏了毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞间紧密连接。获得活性的中性粒细胞迁移并聚集到炎症部位, 清除入侵的病原体。然而中性粒细胞的增殖、长时间存在以及功能失调又会导致中性粒细胞释放大量的水解蛋白酶和活性氧自由基, 最终进一步加剧了组织细胞的损伤。巨噬细胞清除凋亡的中性粒细胞, 可以避免中性粒细胞内的有毒物质释放导致的二次打击, 早期的中性粒细胞凋亡信号能激活巨噬细胞, 促进巨噬细胞表型转化, 同时分泌可以减轻炎症反应的抗炎细胞因子 IL-10 和 TGF- β , MIP-2 [6]。因此, 认为中性粒细胞的凋亡能促进炎症的消退。有研究报道, 将凋亡的中性粒细胞注入小鼠体内能减轻感染性休克, 这说明促进中性粒细胞的凋亡可能是炎症疾病有效的治疗手段。

本实验采取直视下气管切开注入 LPS 进行造模。目前常用的 ALI 造模方式有腹腔 LPS 灌注法、盲肠结扎穿刺法及气管滴注 LPS 法, 几种方法中, 气管滴注 LPS 能够直接造成小鼠的肺损伤, 但是造模过程

中要求较高, 尽量避免因为手术创伤对老鼠的肺脏造成损伤。2018年 Hu 和他的团队在研究低温对于急性肺损伤小鼠治疗的影响一文中, 就采用了该方法[7]。

丹参酮 IIA 能诱导白血病细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。在前髓性白血病 HL60 细胞系中, 丹参酮 IIA 诱导 DNA 断裂成 180bp 的复合物[8]。在人神经胶质瘤细胞中, 丹参酮 IIA 有较强的生长抑制、抗凋亡和分化诱导的作用[9]。有研究发现经丹参酮 IIA 预处理后, 可提高被过氧化氢刺激后脐内皮细胞的生存力, 同时抑制细胞凋亡和 CD40 分子的表达, 显示出一定的抗炎症反应作用[10]。此外, 丹参酮 IIA 可通过负性调节磷脂酰肌醇激酶信号途径抑制巨噬细胞向补体 C5a 或巨噬细胞炎性蛋白-1 的趋化, 从而发挥抗炎作用[11]。这些研究提示, 丹参酮 IIA 能够抑制缺血再灌注造成的全身炎症反应, 进一步改善缺血再灌注器官以及远处器官的功能和预后, 对缺血再灌注器官具有保护作用。

本研究结果表明, 急性肺损伤大鼠在给与丹参酮 IIA 治疗后的氧分压水平明显高于对照组, 研究组的纤维支气管镜肺泡灌洗液中的白细胞计数、中性细胞数及 TNF- α 也明显低于对照组, 说明丹参酮 IIA 可以清除炎症介质、减轻炎症反应、改善组织的缺血再灌注, 同时同归对炎症介质的抑制、促进中性粒细胞的凋亡从而改善脓毒症导致的急性肺损伤大鼠的氧合水平, 从而改善大鼠的预后。因此该研究可以为丹参酮 IIA 对于脓毒症导致的急性肺损伤的治疗提供了实验依据。

基金项目

江苏省中医药局科技项目, 项目号: YB2017079。

参考文献

- [1] Castillo, R.L., Carrasco Loza, R. and Romero-Dapueto, C. (2015) Pathophysiological Approaches of Acute Respiratory Distress Syndrome: Novel Bases for Study of Lung Injury. *The Open Respiratory Medicine Journal*, **9**, 83-91. <https://doi.org/10.2174/1874306401509010083>
- [2] Yuan, L.M., et al. (2020) Tanshinone IIA Inhibits the Adipogenesis and Inflammatory Response in ox-LDL-Challenged Human Monocyte-Derived Macrophages via Regulating miR-130b/WNT5A. *Journal of Cellular Biochemistry*, **121**, 1400-1408. <https://doi.org/10.1002/jcb.29375>
- [3] Park, I., et al. (2019) Neutrophils Disturb Pulmonary Microcirculation in Sepsis-Induced Acute Lung Injury. *European Respiratory Journal*, **53**. <https://doi.org/10.1183/13993003.00786-2018>
- [4] Blazquez-Prieto, J., et al. (2018) The Emerging Role of Neutrophils in Repair after Acute Lung Injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **59**, 289-294. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0101PS>
- [5] Feng, Y.K., et al. (2008) Effects of HMGB1 on PMN Apoptosis during LPS-Induced Acute Lung Injury. *Experimental and Molecular Pathology*, **85**, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.09.002>
- [6] Wang, J., et al. (2019) GTS-21 Reduces Inflammation in Acute Lung Injury by Regulating M1 Polarization and Function of Alveolar Macrophages. *Shock*, **51**, 389-400. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001144>
- [7] Hu, J.T., et al. (2018) Hypothermia Alleviated LPS-Induced Acute Lung Injury in Rat Models through TLR2/MyD88 Pathway. *Experimental Lung Research*, **44**, 397-404. <https://doi.org/10.1080/01902148.2018.1557299>
- [8] Guo, Y., et al. (2019) The Combination of Nutlin-3 and Tanshinone IIA Promotes Synergistic Cytotoxicity in Acute Leukemic Cells Expressing Wild-Type p53 by Co-Regulating MDM2-P53 and the AKT/mTOR Pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **106**, 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.10.008>
- [9] Zhou, L., et al. (2017) Tanshinone Inhibits Neuronal Cell Apoptosis and Inflammatory Response in Cerebral Infarction Rat Model. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **30**, 123-129. <https://doi.org/10.1177/0394632017703274>
- [10] Fang, J., et al. (2018) Tanshinone IIA Attenuates TNF- α Induced PTX3 Expression and Monocyte Adhesion to Endothelial Cells through the p38/NF- κ B Pathway. *Food and Chemical Toxicology*, **121**, 622-630. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.063>
- [11] Wang, B.C., et al. (2017) Tanshinone IIA Suppresses the Progression of Atherosclerosis by Inhibiting the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells and the Proliferation and Migration of Macrophages Induced by ox-LDL. *Biology Open*, **6**, 489-495. <https://doi.org/10.1242/bio.024133>