

甘草酸单铵对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用

汤慧芳, 毛连根, 江若安, 钱 韵, 陈季强*

(浙江大学 医学院 国家食品药品监督管理局 浙江呼吸药物研究实验室, 浙江 杭州, 310058)

摘要: 采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 气道滴入诱导小鼠急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 模型, 研究甘草酸单铵 (monoammonium glycyrrhizinate, MAG) 对 ALI 的防治作用及其机制。雄性 ICR 小鼠随机分为生理盐水 (NS) 对照组、MAG 3、10 及 30 mg·kg⁻¹ 组、LPS 组、地塞米松 (dexamethasone, DXM) 5 mg·kg⁻¹ 组。MAG 各组气道滴入 LPS 前 1 h 及滴入后 3 h 各给药 1 次, DXM 组气道滴入 LPS 前 1 h 给药 1 次。LPS 气道滴入后 6 h 处死动物, 测定各组的肺湿重/干重比、肺通透性、肺组织中性粒细胞髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 含量、ELISA 法检测肺组织匀浆 TNF- α 、IL-10 含量, 常规细胞形态学检测中性粒细胞在支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中的比例和肺组织病理改变。结果表明, MAG 剂量依赖性减轻气道内滴入 LPS 诱导的小鼠 ALI 程度, 降低肺湿重/干重比及肺组织伊文斯蓝的渗出, 降低 BALF 中白细胞总数和中性粒细胞数比例, 抑制组织 MPO 的释放, 降低肺组织匀浆 TNF- α 的含量, 增加肺组织 IL-10 的释放。以上结果提示, MAG 可能通过调节 TNF- α /IL-10 的平衡而有效保护脂多糖诱导的急性肺损伤。

关键词: 急性肺损伤; 甘草酸单铵; 脂多糖; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 10; 髓过氧化物酶; 中性粒细胞

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)09 - 0954 - 05

Protective effect against monoammonium glycyrrhizinate on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice

TANG Hui-fang, MAO Lian-gen, JIANG Ruo-an, QIAN Yun, CHEN Ji-qiang*

(Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of SFDA of China, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the effect of monoammonium glycyrrhizinate (MAG) on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) and its anti-inflammatory mechanism in mice. All male ICR mice were randomly divided into six groups: LPS group; control group; MAG 3, 10, and 30 mg·kg⁻¹ groups; and dexamethasone (DXM) 5 mg·kg⁻¹ group. Lung dry weight and wet weight percentage and permeability were detected. Neutrophil infiltration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues was detected by cell count and morphological analysis. The levels of TNF- α and IL-10 in lung were detected by ELISA. MPO activity was determined followed the specification. MAG induced a decrease in lung wet weight/dry weight ratio, and significantly decreased in total leucocyte number and neutrophil percentage in the BALF, and MPO activity of lung in a dose-dependent manner. Importantly, It could up-regulate the IL-10 level and down-regulate the TNF- α level in the lung tissue of ALI mice. These results suggested that the protective effect of MAG in mice on LPS induced ALI was associated with the regulation of TNF- α /IL-10 balance, and MAG maybe a potentially treatment for ALI/ARDS.

Key words: acute lung injury; monoammonium glycyrrhizinate; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor- α ; interleukin-10; myeloperoxidase; neutrophil

收稿日期: 2007-06-08.

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (Z204198); 浙江省教育厅科研项目 (20061416).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 571 - 88208232, E-mail: chenjq@zju.edu.cn

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是全身炎症导致多器官功能障碍综合征的肺部表现, 其严重阶段即为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)。临床上尽管采取多种综合治疗, 但病死率仍然较高, 因此寻找治疗急性肺损伤药物迫在眉睫。甘草为我国传统中药, 甘草酸是其中主要有效成分之一, 以 18H 两种差向异构体 (即 α 体和 β 体) 存在, 其中 β 体为主要成分, 在一定条件下可转化为 α 体^[1]。甘草酸单铵 (monoammonium glycyrrhizinate, MAG) 即为 β 体, 又称为甘草甜素、甘草皂苷、强力宁等, 临床主要用于治疗肝炎。随着药理研究的逐步深入, 已认识到此类药物有明显的抗炎作用, 其应用领域也在不断拓宽, 如用于婴幼儿哮喘、肺结核等疾病^[2], 尤其是对 SARS 病毒引起的严重急性呼吸综合征也有良好的治疗作用^[3]。但 MAG 是否对 ALI/ARDS 有效, 目前尚未见文献报道。因此本研究考察了 MAG 对小鼠脂多糖诱导的急性肺损伤模型的预防和治疗作用, 为揭示 ALI 的发病机制提供理论依据, 并为临床防治提供新思路。

材料和方法

实验动物 健康雄性 ICR 小鼠, 体重 19 ~ 21 g, 由浙江省实验动物中心提供。合格证号: SXK(浙) 2003-0001。

试剂及主要仪器 LPS(大肠杆菌 O127: B8, 美国 Sigma 公司); 甘草酸单铵盐 S(含量 73%, HPLC, 国家标准) 由西安富捷药业有限公司赠送; 小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (武汉博士德公司); 小鼠 IL-10 ELISA 试剂盒 (美国 RB 公司); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒及髓过氧化物酶 (MPO) 测定试剂盒 (南京建成生物工程公司)。全波长 Multiskan Spectrum 酶标仪 (Thermo Electron 公司), 5840R 型低温高速离心机 (Eppendorf 公司)。

小鼠急性肺损伤模型的制备及实验动物分组 小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后, 暴露气管, LPS ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 气管内滴入, 对照组给予相同体积的生理盐水。将实验动物分为对照组、LPS 组、MAG 3、10 及 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和地塞米松 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。MAG 各组分别于造模前 1 h 和造模后 3 h 各腹腔注射给药 1 次, 地塞米松组于造模前 1 h 腹腔注射给药 1 次。造模 6 h 后, 股动脉放血处死, 结扎右肺, 暴露气管进行气管插管, 用生理盐水 $1.5 \text{ mL} \cdot \text{分}^{-1}$ 3 次进行支气管肺泡灌洗, 回收率达 90%, 混匀后进行

细胞总数计数, 以 $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取细胞沉淀涂片, 晾干后进行 HE 染色, 做细胞分类计数。取右上肺叶用中性福尔马林液固定, 石蜡切片, HE 染色。右肺中、下叶取出后马上于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定备用。另批小鼠处理前 30 min 尾静脉注射 1% 伊文斯蓝 (Evans blue) 染料 0.1 mL, 留取全部肺组织, 左肺用于测定肺湿重/干重比, 右肺用于测定肺通透性。

肺湿重/干重比测定 各组尾静脉注射伊文斯蓝的小鼠开胸取全部左肺, 滤纸吸干, 称取湿重, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘烤 48 h, 称取干重, 计算肺组织湿重/干重比 (W/D)。

肺通透性 取全部右肺, 去除血液、称湿重后放入甲酰胺液 2 mL 中, $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 72 h, $1500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液, 620 nm 测定吸收度值, 根据伊文斯蓝的标准曲线计算各组小鼠肺组织中伊文斯蓝的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 对肺毛细血管通透性进行定量。

TNF- α 、IL-10 及 MPO 的测定 取肺组织匀浆液, 采用酶联免疫吸附法测定各组小鼠肺组织中 TNF- α 及 IL-10 的含量。按试剂盒说明书测定 MPO, 测定过程中需注意低温及避光操作。

统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各个样本均数的比较采用单因素方差分析。所有数据用 SPSS 10.0 统计软件处理。

结果

1 MAG 对肺组织 W/D 和通透性变化的影响

LPS 组的肺组织 W/D 与对照组相比明显增加 ($P < 0.001$); 而 MAG 3、10 及 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的肺 W/D 有不同程度降低, MAG $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与 LPS 组比较有显著性差异, 但与对照组比较也有显著性差异 (表 1)。伊文斯蓝渗出结果表明, LPS 组伊文斯蓝渗出量明显高于对照组 ($P < 0.001$), MAG 各剂量组均能明显抑制伊文斯蓝的渗出, 但量效关系不明显; MAG $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组与 LPS 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$), MAG 10 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的伊文斯蓝渗出量明显下降, 与对照组和地塞米松组比较无统计学差异 (表 1)。

2 MAG 对 BALF 中白细胞总数及中性粒细胞比例的影响

与对照组比较, LPS 组 BALF 中的白细胞总数和分类计数中的中性粒细胞比例均明显增加 ($P < 0.001$); MAG 3、10 及 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 BALF 中的白

Table 1 Effect of MAG on the lung wet weight/dry weight ratio (W/D) and permeability in LPS-induced ALI mice

Group	Dose / mg• kg ⁻¹	W/D	Lung permeability / μg• g ⁻¹ (lung tissue)
Control		3.90 ± 0.24	221.40 ± 38.22
LPS		4.68 ± 0.24 ^{###}	271.87 ± 46.14 ^{###}
MAG	3	4.62 ± 0.10 ^{###}	233.17 ± 18.99 [*]
	10	4.53 ± 0.20 ^{###}	216.57 ± 35.88 [*]
	30	4.32 ± 0.26 [#]	212.33 ± 32.34 [*]
DXM	5	4.26 ± 0.67 ^{###}	223.51 ± 45.14 [*]

LPS 4 mg• kg⁻¹ was given intratracheally to male mice, and MAG and dexamethasone were given by ip. Six hours later, the mice were killed. The lung permeability was expressed by the leakage of Evans blue in lung tissue. n = 10, $\bar{x} \pm s$. # P < 0.05, ### P < 0.001 vs control group; * P < 0.05, ** P < 0.01 vs LPS group

细胞总数均呈剂量依赖性降低, MAG 10及 30 mg• kg⁻¹组与对照组比较无统计学差异。MAG各剂量组对 BALF中中性粒细胞比例的影响不明显, MAG 30 mg• kg⁻¹组与地塞米松组比较无统计学差异,见表 2。

3 MAG对肺组织匀浆中 TNF-α、IL-10分泌及 MPO活性的影响

与对照组比较, LPS组的肺组织匀浆 TNF-α明显增加 (P < 0.01), 而 IL-10明显降低 (P < 0.001), TNF-α/IL-10比值为 3.6。MAG 3、10及 30 mg• kg⁻¹组的肺组织匀浆 TNF-α均呈剂量依赖性降低, 而 IL-10有不同程度的增加, TNF-α/IL-10比值分别为 14.57、9.68及 5.75, 呈现剂量依赖性下降。MAG 3、10及 30 mg• kg⁻¹组及地塞米松 5 mg• kg⁻¹组对 TNF-α的生成抑制率分别为 25%、42%、48%及 51%。MAG 30 mg• kg⁻¹组的 TNF-α、IL-10分泌量与对照组比较无统计学差异。地塞米松组对 TNF-α的分泌呈明显的抑制作用 (P < 0.001), 对

IL-10的分泌调节作用弱, TNF-α/IL-10比值为 11.4。见表 3。

Table 2 Effect of MAG on the total leukocyte number and neutrophils percentage in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in LPS-induced ALI mice

Group	Dose / mg• kg ⁻¹	WBC/L (× 10 ⁻⁷)	Neutrophil/%
Control		38 ± 12	10 ± 6
LPS		102 ± 28 ^{###}	72 ± 11 ^{###}
MAG	3	61 ± 21 ^{###*}	57 ± 15 ^{###}
	10	53 ± 20 ^{**}	56 ± 21 ^{###}
	30	38 ± 10 ^{**}	41 ± 22 [#]
DXM	5	26 ± 81 ^{####*}	38 ± 19 [#]

n = 10, $\bar{x} \pm s$. # P < 0.05, ### P < 0.001 vs control group; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs LPS group

与对照组比较, LPS组的肺组织 MPO活性明显增加 (P < 0.05); 而 MAG 3、10及 30 mg• kg⁻¹组的肺组织 MPO活性均有不同程度的降低, MAG 3、10及 30 mg• kg⁻¹及地塞米松 5 mg• kg⁻¹组对 MPO的生成抑制率分别为 23%、32%、35%及 32%。对于 MAG 30 mg• kg⁻¹组、地塞米松 5 mg• kg⁻¹组与对照组的 MPO活性进行比较, 差异无统计学显著性。见表 3。

4 MAG对 LPS诱导的 ALI肺部病理变化的影响

LPS组肺组织表面有点状出血点、水肿区域, 而对照组肺外观无这些异常改变; 组织病理切片镜下可见气道管腔内、血管腔内有大量中性粒细胞聚集, 肺组织间隙可见大量中性粒细胞浸润和红细胞渗出, 肺泡内有蛋白水肿液, 肺泡间隙边缘有轻度透明膜形成。MAG各组病变较 LPS组减轻, MAG 30 mg• kg⁻¹组气道管腔内、血管腔内中性粒细胞聚集明显减轻, 肺组织间隙中性粒细胞浸润和红细胞渗出明显减少。见图 1。

Table 3 Effect of MAG on the TNF-α, IL-10 level and MPO activity of lung tissues in LPS-induced ALI mice

Group	Dose / mg• kg ⁻¹	TNF-α / ng• L ⁻¹	IL-10 / ng• L ⁻¹	MPO activity / U• g ⁻¹ (wet weight)
Control		453.40 ± 126.35	125.55 ± 31.70	2.47 ± 1.38
LPS		1078.94 ± 173.25 ^{##}	50.27 ± 23.34 ^{###}	4.16 ± 0.44 [#]
MAG	3	801.62 ± 178.09 [#]	55.00 ± 25.90 ^{###}	3.19 ± 1.17
	10	620.56 ± 185.27 [*]	64.09 ± 21.13 ^{###}	2.79 ± 0.82 [*]
	30	554.59 ± 131.65 ^{**}	96.39 ± 45.10 ^{**}	2.72 ± 0.29 [*]
DXM	5	526.33 ± 100.26 ^{**}	46.27 ± 19.00 ^{###}	2.84 ± 0.93 [*]

n = 6 - 8 (TNF-α, IL-10 level), n = 8 - 10 (MPO). $\bar{x} \pm s$. # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs control group; * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs LPS group

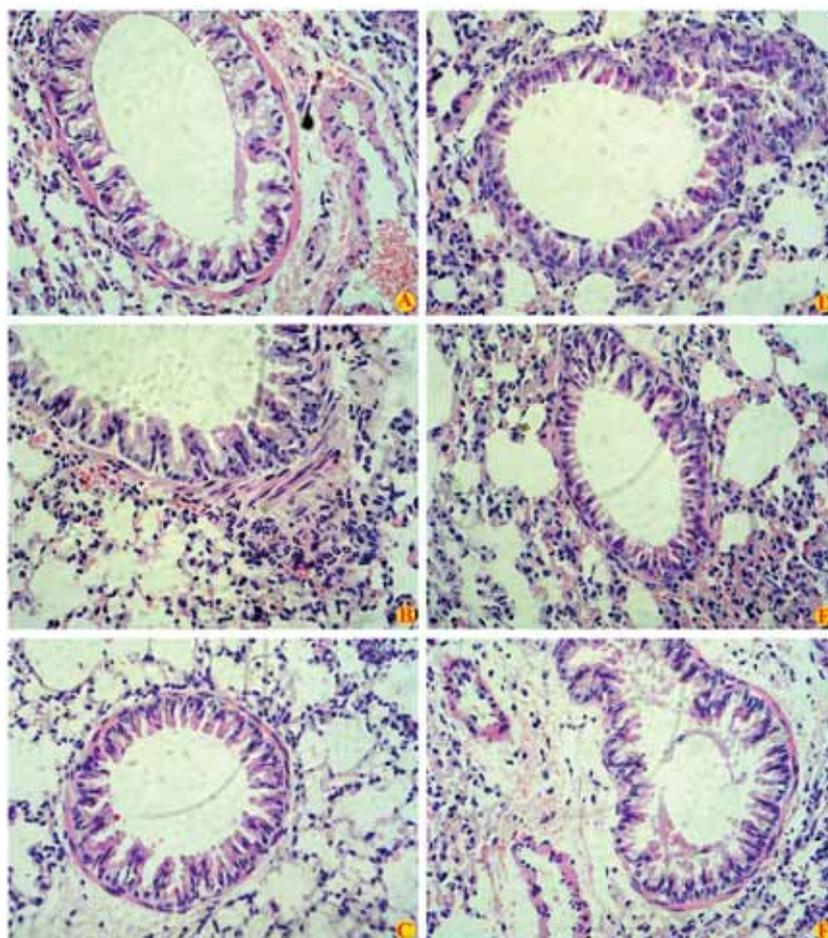


Figure 1 Neutrophil recruitment in the lung tissues of mice at 6 h after intratracheal administration of LPS, and the effects of MAG and DXM on the neutrophil recruitment. A: Control group; B: LPS group; C: DXM $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; D: MAG $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; E: MAG $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group; F: MAG $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group (HE stain, $\times 400$)

讨论

MAG体内分布广,在组织中浓度较高,其抗炎作用强,如对巴豆油、醋酸所致的急性炎症、棉球所诱发的慢性炎症、弗氏完全佐剂所致的免疫性炎症等均具有抑制作用,能减轻急性炎症的红肿反应,以及抑制慢性炎症所致的肉芽组织增生^[4];抑制角叉菜胶诱导的胸膜炎和支气管肺泡灌洗液中炎症细胞的渗出^[5],诱导 NO合成酶的表达^[6];抑制 ALI大鼠肺泡巨噬细胞 IL-10及 IL-18的表达^[7],抑制肺部成纤维细胞释放 IL-8和 eotaxin-1等^[8]。有关甘草酸抗炎作用机制方面, Sakamoto等^[9]发现,甘草甜素与高速泳动族蛋白 1/2连接,可抑制 DNA连接活性,以及 PKC或 CK-1介导的磷酸化作用。近年来也有报道利用静脉内注射脂多糖方法复制小鼠肺部感染模型,在小鼠肺部聚集大量血小板,使用甘草酸治疗后,小鼠的死亡率显著降低^[10],此作用与其抗

血小板作用相关。在对从 SARS患者分离出的病毒体外研究中发现,甘草酸有明显的抗 SARS病毒的作用^[3]。这些研究结果提示,甘草酸完全可能用于急性呼吸系统疾病。

本研究结果表明, MAG对于 LPS诱导的 ALI小鼠模型肺组织湿重/干重比、肺组织伊文斯蓝渗出及肺组织 MPO释放均有明显的抑制作用;肺组织病理学结果也显示, MAG对于 ALI的炎症浸润有一定的保护作用。这些结果提示, MAG可能用于 ALI/ARDS。但总体上 MAG的量效关系不明显,可能与剂量选择较接近有关。MAG 10和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对 MPO活性、伊文斯蓝的渗出作用等无统计学差异。

TNF- α 及 IL-10被认为是感染性 ALI或 ARDS发病中较为重要的细胞因子^[11]。TNF- α 为促炎因子,是创伤或感染后机体最早产生的多功能细胞因子,主要来源于 LPS刺激的单核细胞和巨噬细胞,

可与多种分子、细胞相互作用,对组织产生广泛的损害效应。而 IL-10 为抗炎因子,主要是由单核巨噬细胞、T 细胞、B 细胞产生,影响前炎症细胞因子的产生。本试验通过气道滴入 LPS 制备 ALI 模型,在此模型上,LPS 组 TNF- α 分泌量较基础值升高 2.3 倍,而 IL-10 分泌量较基础值下降。提示在 LPS 所致肺组织损害的过程中,发生了促炎反应和抗炎反应。MAG 剂量依赖性地抑制 TNF- α 的分泌,而提高 IL-10,使 TNF- α / IL-10 的比值明显变小,而地塞米松对于促炎因子和抗炎因子均有强大的抑制作用。提示两者作用机制上存在差异,MAG 对于 TNF- α / IL-10 的分泌有调节作用。

综上所述,气道滴入 LPS 前后应用 MAG,能改善肺组织 W/D、肺组织通透性及 MPO 活性的增加,观察发现肺组织病理反应和炎症损伤减轻,且作用不弱于地塞米松,并能明显调节 TNF- α / IL-10 比例,说明 MAG 可能通过调节促炎性因子和抗炎因子的释放而产生保护作用,其确切机制与临床应用价值有待进一步研究,这对于应用甘草酸治疗细菌败血症诱发急性呼吸窘迫有重要的参考意义。

References

- [1] Wu XM, Lu J. The comparative research on epimeride of 18H glycyrrhizic acid [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 1993, 28: 215 - 218.
- [2] Liu B, Qi Y. Pharmacology research progress of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid [J]. World Notes Plant Med (国外医药 植物药分册), 2006, 21: 100 - 104.
- [3] Hoever G, Baltina L, Michaelis M, et al. Antiviral activity of glycyrrhizic acid derivatives against SARS-coronavirus [J]. J Med Chem, 2005, 48: 1256 - 1259.
- [4] Hang NH, Li CX, Luo J, et al. Anti-inflammatory effects of monoammonium glycyrrhetate [J]. J Guiyang Med Coll (贵阳医学院学报), 1995, 20: 26 - 28.
- [5] Tang FD, Wang Y, Xie QM, et al. Anti-inflammatory effects of monoammonium glycyrrhetate on pleurisy and inflammatory cells in bronchoalveolar lavage [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 1999, 15: 17 - 18.
- [6] Jeong HG, Kim JY. Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18 β -glycyrrhetic acid in macrophages [J]. FEBS Lett, 2002, 513: 208.
- [7] Zhao XQ, Zhang JF, Kuang XC, et al. The effect of α -diammonium glycyrrhizinate on the expression of IL-10 and IL-18 of pulmonary alveolar macrophage from acute lung injury rats [J]. Chin J Tuberc Respir Dis (中华结核和呼吸系疾病杂志), 2004, 27: 126 - 127.
- [8] Matsui S, Matsumoto H, Sonoda Y, et al. Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin-1 in a human lung fibroblast cell line [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4: 1633 - 1644.
- [9] Sakamoto R, Okano M, Takena H, et al. Inhibitory effect of glycyrrhizin on the phosphorylation and DNA-binding abilities of high mobility group proteins 1 and 2 *in vitro* [J]. Biol Pharm Bull, 2001, 24: 906 - 911.
- [10] Yu Z, Ohtaki Y, Kai K, et al. Critical roles of platelets in lipopolysaccharide-induced lethality: effects of glycyrrhizin and possible strategy for acute respiratory distress syndrome [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5: 571 - 580.
- [11] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome [J]. J Pathol, 2004, 202: 145 - 156.