

基础研究

黄芪注射液对急性肺损伤小鼠钠通道表达的影响

赵燕,何婧,管弦,王导新

重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010

摘要:目的 探讨黄芪注射液对急性肺损伤(ALI)小鼠钠通道表达的影响及其可能的机制。方法 30只C57BL/6小鼠随机分为3组,对照组(NS组)、模型组(ALI组)和黄芪注射液组。观察各组12h后肺干湿质量比、支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞比例变化,并采用HE染色观察肺组织病理改变,Q-PCR检测 α -ENaC、TNF- α 、IL-8的mRNA表达水平。结果 ALI组BALF中性粒细胞比例升高,与其他2组比较差异有统计学意义。病检示黄芪注射液组肺组织炎症、充血水肿等情况有明显减轻。与NS组相比,ALI组 α -ENaC mRNA的表达显著降低,TNF- α 、IL-8mRNA表达显著升高。而黄芪注射液组的 α -ENaC mRNA的表达显著高于ALI组,TNF- α 、IL-8mRNA表达位于3组居中水平。结论 黄芪注射液可通过抑制急性肺损伤时炎症介质水平,上调ENaC表达,促进肺水肿清除,减轻肺组织损伤。

关键词:急性肺损伤;黄芪注射液;炎症;钠离子通道

中图分类号:R563.6 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)11-1603-03

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.11.017

Effect of astragali injection on epithelial sodium channel expression in mice with acute lung injury

ZHAO Yan, HE Jing, GUAN Xian, WANG Daoxin

Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Abstract: Objective To investigate the effect of astragali injection on the expression of epithelial sodium channel in mice with acute lung injury (ALI) and explore the possible mechanism. **Methods** Thirty C57BL/6 mice were randomized into 3 equal groups, namely the control group, ALI model group, and astragali injection treatment group. Twelve hours after the treatments, The wet-dry ratio (W/D) of the lungs, inflammation cell percentages in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and histopathological changes of the lung tissues were examined, and the expressions of α -ENaC, TNF- α , and IL-8 mRNA in the lung tissues were determined with quantitative RT-PCR. **Results** The neutrophil percentage in the BALF increased significantly in ALI group as compared with that in the other two groups. Pathological examination revealed milder lung tissue inflammation, congestion and edema in astragalus injection treatment group than in the ALI model group. Compared with those in the control group, α -ENaC mRNA expression decreased significantly while TNF- α and IL-8 mRNAs increased markedly in ALI group. In astragalus injection treatment group, the expression level of α -ENaC mRNA was higher than that in ALI group, and TNF- α and IL-8 mRNA expression lower than those in ALI group but higher than those in the control group. **Conclusion** Astragalus injection can ameliorate ALI in mice by inhibiting the release of inflammatory factors and up-regulating ENaC mRNA expression to promote the clearance of pulmonary edema fluid.

Key words: acute lung injury; astragali injection; inflammation; epithelial sodium channel

急性肺损伤(ALI)是呼吸科常见危重症,患者发生氧合障碍,病死率高。相关病理特点为:肺泡周围炎症细胞明显浸润,肺毛细血管弥漫性损伤、通透性增强,致肺水肿和肺透明膜形成,临床特征表现为难治性低氧血症^[1]。清除肺泡内多余液体,恢复肺组织与外界的气体交换是一种有效的治疗手段。在肺组织中,主要是存在于肺泡Ⅱ型上皮细胞的钠通道调节肺水平衡,保持肺泡干燥,维护通气功能。以往研究表明,黄芪可降低血管通透性,减少IL-8等炎症介质水平控制中性粒细胞的募

集。对于已有的中性粒细胞也可减少氧自由基、PGE₂、NO和超氧离子的生成,有很好的抗炎作用^[2]。近年来研究发现,黄芪可通过调节自由基代谢发挥对Ⅱ型上皮细胞数量及超微结构的保护^[3],故本文构建脂多糖致ALI模型,并以黄芪干预,了解黄芪对肺泡Ⅱ型上皮细胞钠通道表达的影响极其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

6~8周龄,清洁级,雄性C57BL/6小鼠,体质量18~20g/只,共30只,购自重庆医科大学实验动物中心。

将小鼠随机分为3组,10只/组:对照组(A)、ALI模型组(B)、黄芪干预组(C)。B组:小鼠称重后,按0.08 ml/10 g腹腔注射4%水合氯醛麻醉,固定于简易操作台。按文献造模剂量并改进方法,滴鼻给予总体积50 μ l的

收稿日期:2012-08-03

基金项目:国家自然科学基金(30971303)

Supported by National Natural Science Foundation of China(30971303).

作者简介:赵燕,硕士,E-mail: 514342948@qq.com

通讯作者:王导新,博士生导师,教授,主任医师,E-mail: wangdaoxin1@163.com

LPS(10 mg/kg)^[4]。A组给予相同体积的生理盐水。C组在造模后30 min腹腔注射黄芪注射液4 g/kg(约0.5 ml)。

1.2 药品与试剂

LPS(L4391 0111;B4)购自美国Sigma。黄芪注射液购自上海福达制药有限公司,批号050607。提取RNA及逆转录全套产品购自大连宝生物,定量PCR扩增试剂购自天根公司,PCR引物均由上海生工合成。其余为国产分析纯。

1.3 肺组织干湿质量比(W/D)

放血处死小鼠后,剪取左肺,以滤纸吸干表面水分后称量计湿质量(W)。60°烤箱放置24 h后称量计干质量(D),计算W/D。

1.4 支气管肺泡灌洗液炎症细胞分类计数

腹腔注射0.15 ml/10 g 4%水合氯醛麻醉,挖眼球放血处死小鼠。分离暴露气管,腰麻导管行气管插管,生理盐水灌洗全肺,1 ml/次,共3次,总回收率80%以上为

合格标本。所得支气管肺泡灌洗液(BALF)离心,50 μl生理盐水重悬沉淀,涂片。烤箱烘干后吉姆萨染色1~2 min,水洗多余染液。待其烘干后行油镜下细胞分类计数(表1)。

表1 各组小鼠炎症及水肿液渗出情况

Tab.1 Pulmonary inflammation and edema exudation in the 3 groups (n=10, Mean±SD, %)

组别	中性粒细胞比例	干湿质量比
对照组	14.7±4.8	1.128±0.095
ALI模型组	78.5±10.8 ^a	1.412±0.154 ^a
黄芪干预组	38.4±12.0 ^{ab}	1.267±0.860 ^{ab}

与对照组比较,^aP<0.01;与ALI模型组比较,^bP<0.01

1.5 肺组织病检

小鼠行支气管肺泡灌洗后取左肺,肺组织经过10%的甲醛固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色,光镜下观察病理改变(图1)。

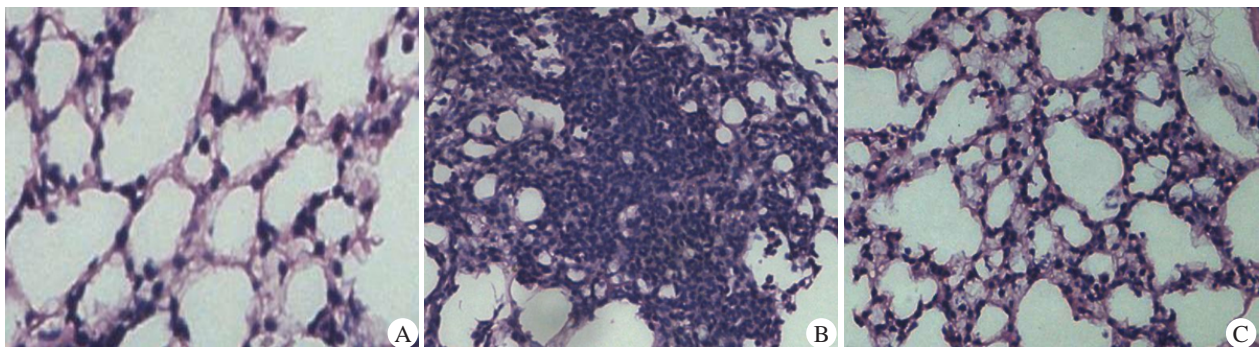


图1 肺组织病理学光镜图

Fig.1 Pathological examination of the lung tissues in the control (A), ALI (B), and astragali injection treatment groups (HE, original magnification: ×200). A: Control group; B: ALI model group; C: Astragali group

1.6 Q-PCR检测肺组织各基因表达情况

灭酶剪刀镊子剪取小鼠右肺中叶行肺组织匀浆,提取总RNA,测定浓度后逆转录为cDNA。以cDNA为模板行Q-PCR定量检测相关基因表达(表2)。内参β-actin F(ATATCGCTGCGCTGGTCGTC), R(AGGATGGCGTGAGGGAGAGC),产物长度517 bp。α-ENaC F(5'AG-CACAACCGCATGAAGACG 3'), R(5'GTGACGGCAGGGAAGACCAG 3'),产物长度160 bp。IL-8 F(GCTGTGACCCTCTCTGTGAAG), R(CAAACTCCATCTTGTTGTGTC),产物长度163 bp; TNF-α F(GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTC), R(CACTTGGTGGTTTGTACGA),产物长度215 bp,退火温度均为60℃。

1.7 统计学分析

数据以均数±标准差表示,数据库建立后应用统计学分析软件SPSS 17.0进行数据分析,组间差异的比较采用单因素方差分析,双侧检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 气道炎症情况与肺组织水肿液渗出情况比较

表2 各组小鼠肺组织相关基因表达情况

Tab.2 Comparison of IL-8, TNF-α and α-ENaC mRNA expression in the lung tissues between the 3 groups (n=10, Mean±SD)

组别	IL-8	TNF-α	α-ENaC
对照组	1	1	1
ALI模型组	3.02±0.57 ^a	2.49±0.22 ^a	0.71±0.46 ^a
黄芪干预组	1.54±0.76 ^{ab}	1.86±0.68 ^{ab}	0.92±0.37 ^{ab}

与对照组比较,^aP<0.05;与ALI模型组比较,^bP<0.05

跟对照组比较,ALI模型组中性粒细胞比例显著上升,经黄芪注射液干预后中性粒细胞比例显著下降,表明炎症程度减轻。各组W/D值做统计学分析:3组数据两两比较均有统计学差异。ALI组肺组织水肿液渗出明显,经黄芪注射液治疗后,水肿液渗出减轻。

2.2 肺组织病理改变

肉眼观察ALI模型组肺脏颜色鲜红,并可见散在出血点。对照组鼠肺呈粉红色。经脱水、包埋、石蜡固定切片、HE染色后光镜下观察可见:ALI模型组炎症细胞浸润明显、肺泡有破裂、融合、萎缩等表现,肺间质水肿

液积聚明显;黄芪治疗组炎症细胞浸润减轻,肺间质变薄,水肿液积聚减少。

2.3 Q-PCR 结果

以 β -actin为参考基线值,其余基因表达水平以与之相比的倍增倍数表示。 α -ENaC在正常小鼠肺组织中高表达,模型组表达最低,黄芪注射液治疗后表达上调。反之,炎症介质IL-8和TNF- α mRNA在ALI组的肺组织中表达最高,经黄芪注射液干预后表达下调。

3 讨论

在LPS致ALI中,早期关键事件为中性粒细胞的活化、募集。在机体正常情况下,中性粒细胞活化后从血液移行至间质,跨上皮屏障迁移至肺泡间隙发挥主动防御功能。当这种反应过于强烈,其释放的中性蛋白酶如髓过氧化物酶、溶菌酶等反而会损伤自身组织^[5]。文献报道气道滴注LPS后6 h中性粒细胞开始活化,12~24 h占总细胞比例达到峰值^[6]。因此我们选择造模后12 h处死小鼠。我们的结果显示模型组BALF中性粒细胞比例上升明显,最高达89.3%。同时肺组织病理也表现为较为严重的组织损伤、肺泡结构被破坏与炎症细胞浸润,建模成功。

发生ALI后,炎症损伤肺泡毛细血管屏障致肺泡间质水肿液聚集,严重影响氧合。组织缺氧又加重肺损伤的程度。分布于肺泡II型上皮细胞顶端侧的钠离子通道(ENaC),具有强大的水钠转运功能。其对钠离子的重吸收是清除肺内水肿液的主要动力。ENaC通道蛋白由 α 、 β 和 γ 3个亚基组成, $\alpha 2\beta\gamma$ 是大多数ENaC的组成模式。其中, α -亚基主要构成由 Ca^{2+} 激活的非选择性钠离子通道,被认为是ENaC最重要和最基本的组成亚基^[7]。Kerem等^[8]证实敲除ENaC α -亚基基因的小鼠因不能清除肺水而在出生后48 h内死亡。故本研究选择 α 亚基为PCR检测的目的基因,反应ENaC的表达及功能。

ENaC重吸收 Na^+ , Na^+/K^+ -ATPase排除 Na^+ ,由此创造渗透压将水从肺泡泵至组织间隙。在人类,ENaC功能失调会引起肺部感染。假性醛固酮减少症是一种罕见的隐性遗传疾病,调控ENaC的基因位点发生突变,可致气道内液体总量增加,且儿童期发病伴随有频发的肺部感染^[9-11]。反之,细菌与病毒感染也可以调节肺上皮细胞ENaC的表达及转运功能,而肿瘤坏死因子TNF- α 是重要媒介^[12-14]。在肺组织,TNF- α 主要与受体TNF-R I结合,下调ENaC三种亚基的表达影响通道水钠转运的功能,实现对肺泡腔内液体转运的调控^[15]。已有体外实验证实TNF- α 可下调肺泡上皮表面ENaC的表达,降低ENaC活性,影响肺水肿液的清除。并且TNF- α 的浓度与 α 亚基的表达呈负相关,对 α 亚基表达的影响最为明显^[16]。TNF- α 也是机体活化防御反应的重要促炎因子,可促进IL-1,IL-6,IL-8,GM-CSF等多种

炎症因子分泌。

我们的结果显示ALI组灌洗液中中性粒细胞比例明显增高;Q-PCR示TNF- α 、IL-8 mRNA表达上调,而 α -ENaC的表达则明显降低;病理学可见肺间质炎症细胞浸润明显;W/D示肺组织水肿液渗出明显。经黄芪注射液治疗后,灌洗液中中性粒细胞比例显著降低;Q-PCR示炎症指标表达水平均下调, α -ENaC表达有所上调但未恢复至正常水平;肺组织病理学检测也发现炎症细胞浸润明显减少;W/D示肺水肿程度减轻。表明黄芪对LPS诱导的小鼠ALI具有保护作用,可以减轻肺组织炎症损伤程度,促进肺间质水肿液的吸收。我们推测,黄芪注射液可下调TNF- α 、IL-8等炎症介质水平,减少中性粒细胞的募集,减轻ALI时肺组织炎症损伤程度,改善肺泡II型上皮细胞所处微环境,促进ENaC功能及数量的恢复,从而发挥对ALI小鼠的保护作用。

ALI复杂的发病机制是ALI治疗困难的重要原因。以中性粒细胞在肺泡腔内的聚集和活化为特征的促炎和抗炎的失衡机制被认为是发病的核心机制,可以触发其他发病机制的产生。本研究发现黄芪注射液可以减少中性粒细胞的募集减轻肺组织炎症损伤程度,上调ENaC表达,促进肺水肿液清除,为ALI治疗效果的提升提供新的切入点。

参考文献:

- [1] 顾俭勇,黄培志.黄芪注射液对脂多糖致大鼠急性肺损伤后细胞凋亡的保护作用[J].中国新药与临床杂志,2007,26(3):212-4.
- [2] 李金田,魏舒畅,刘永琦,等.黄芪多糖对肺纤维化大鼠肺上皮细胞超微结构及自由基代谢的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(10):2360-2.
- [3] 周建龙,邓青南,郭振辉.清气化痰汤对急性肺损伤小鼠水通道蛋白5表达的影响[J].中华中医药学刊,2011,29(6):1303-5.
- [4] Steen PW, Shi L, He L, et al. Neutrophil responses to injury or inflammation impair peripheral gustatory function [J]. Neuroscience, 2010, 167(3): 894-908.
- [5] Zhang X, Huang H, Yang T, et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Injury, 2010, 41(7): 746-52.
- [6] Gumz ML, Cheng KY, Lynch JJ, et al. Regulation of α ENaC expression by the circadian clock protein Period 1 in mpkCCD(c14) cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799(9): 622-9.
- [7] Hummler E, Barker P, Gatz J, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice [J]. Nat Genet, 1996, 12(3): 325-8.
- [8] Kerem E, Bistrizter T, Hanukoglu A, et al. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudo-hypoadosteronism[J]. N Engl J Med, 1999, 341(3): 156-62.
- [9] Kunzelmann K, Beesley AH, King NJ, et al. Influenza virus inhibits amiloride-sensitive Na^+ channels in respiratory epithelia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(18): 10282-7.

(下转1609页)

表 1 不同算法指标

Tab.1 Indexes of the methods

方法	PSNR(dB)	时间(s)
NLM	126.96	8644
本文算法	129.93	18

了样本邻域数据库,在去噪过程中,利用图像邻域检索结果采用NLM算法进行图像去噪,取得了更好的去噪效果,同时也大大减少了执行时间。下一步的工作是利用本文的思想,寻找更快,更好的算法来实现CT图像去噪。

参考文献:

- [1] Bian J, La Riviere PJ, Vargas PA. Penalized likelihood sinogram restoration for computed tomography [J]. IEEE Trans Med Imag, 2006, 25(8): 1022-36.
- [2] Wang J, Li T, Lu H, et al. Penalized weighted least squares approach to sinogram noise reduction and image reconstruction for low-dose x-ray computed tomography [J]. IEEE Trans Med Imag, 2006, 25(10): 1272-83.
- [3] 毕一鸣, 马建华, 路利军. 基于标准剂量CT图像非局部权值先验的低剂量图像恢复[J]. 电子学报, 2010, 38(5): 1146-50.

- [4] Shtok J, Elad M, Zibulevsky E. Sparsity-based sinogram denoising for low-dose computed tomography [C]. International Conference on Acoustics, Speech, and Signal Processing, 2011: 569-72.
- [5] Buades A, Coll B, Morel J. A review of image denoising algorithms, with anew one [J]. Multiscale Modeling Simulation, 2005, 4(2): 490-530.
- [6] Cou PE, Yger P, Barillot C. Fast non local means denoising for 3D MR images [C]. 9th International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention, 2006: 33-40.
- [7] Mahmoudi M, Sapiro G. Fast image and video denoising via non-local means of similar neighborhoods [J]. Signal ProcLett, 2005, 12(12): 839-42.
- [8] Dauwe A, Goossens B, Luong HQ. Fast non-local image denoising algorithm [C]. Proc SPIE Electr Imag, 2008, 6812(10): 1-8.
- [9] Bilcu RC, Vehvilainen M. Fast nonlocal means for image denoising [C]. Proceedings of the SPIE Conference on Digital Photography III, 2007: 1247-50.
- [10] Indyk P, Motwani R. Approximate nearest neighbor: towards removing the curse of dimensionality [C]. Proceedings of the 30th Symposium on Theory of Computing, 1998: 604-13.
- [11] Datar M, Immorlica N, Indy K. Locality-sensitive hashing scheme based on p-stable distributions [C]. Proceedings of the ACM Symposium on Computational Geometry, 2004: 253-62.

(编辑:黄开颜)

(上接 1605 页)

- [10] 马 铃, 李万冬, 陈卫民. 异丙酚对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠肺组织Toll样受体表达的影响[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(4): 261-4.
- [11] 彭 芳, 陆永利, 杨红卫. 尾核神经元的原代培养及离子通道特性的研究[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(8): 676-8.
- [12] Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T, et al. The regulation of amiloride-sensitive epithelial Sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2009, 166(1): 16-23.
- [13] 郭永全. 慢性乙肝患者外周血CD4+T细胞蛋白表达及ACTA、TNFOA

水平变化的临床诊断意义[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(1): 23-5.

- [14] 陈积雄, 黄晓燕, 汪道文. 细胞色素P450表氧化酶抑制肿瘤坏死因子诱导内皮细胞凋亡的研究[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(4): 441-4.
- [15] 卢 丽, 吴 亮, 陈 珺, 等. 钠离子对成骨细胞的影响及其与上皮钠通道的关系[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(11): 1871-4.
- [16] Dagenais A, Fréchette R, Yamagata Y, et al. Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(2): L301-11.

(编辑:孙昌朋)