

芦丁对脂多糖诱导急性肺损伤小鼠的抗氧化应激作用

阮佼(三峡大学仁和医院重症医学科, 湖北 宜昌 443001)

摘要: 目的 探讨芦丁对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤氧化应激失衡的作用。方法 将 50 只 C57 小鼠随机分为 5 组($n=10$), 分别为对照组、模型组和芦丁低、中、高剂量(25, 50, 100 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。LPS 注射 6 h 后测小鼠血气, 取肺组织进行病理观察, 测肺组织的湿干比、丙二醛(MDA)含量、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 与对照组相比, 模型组的肺组织病理改变和肺组织的湿干比, 二氧化碳分压 $[p(\text{CO}_2)]$, 呼吸频率(RR)和 MDA 含量明显增加, 而氧分压 $[p(\text{O}_2)]$ 和 pH 值、CAT、GPx 和 SOD 活性明显降低。与模型组相比, 芦丁组的肺组织病理改变和肺组织湿干比, $p(\text{CO}_2)$ 、呼吸率和 MDA 含量呈浓度依赖性减少, 而 $p(\text{O}_2)$ 和 pH 值、CAT、GPx 和 SOD 活性呈浓度依赖性增高。结论 芦丁可呈浓度依赖性抑制氧化应激而减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤。

关键词: 芦丁; 脂多糖; 急性肺损伤; 氧化应激

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)09-1059-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.007

Effect of Rutin on Oxidative Stress of Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide

RUAN Jiao(Department of Critical-care Medicine, Three Gorges University Renhe Hospital, Yichang 443001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of rutin on oxidative stress of acute lung injury induced by lipopolysaccharide(LPS). **METHODS** Fifty male C57 mice were randomly divided into five groups: control group, model group, and rutin low, middle, high(25, 50, 100 $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. After 6 h of LPS injected, collecting arterial blood for blood gas analysis and lung tissue to examine pathological change, Wet/Dry, the expression of MDA and the activity of CAT, GPx and SOD. **RESULTS** Compared with the control group, the pathological change and Wet/Dry of lung tissue, the $p(\text{CO}_2)$ and respiratory rate(RR), the expression of MDA in lung tissue were dose-increased, while the $p(\text{O}_2)$, pH and the activity of CAT, GPx and SOD were decreased. Compared with the model group, the pathological change and Wet/Dry of lung tissue, the $p(\text{CO}_2)$ and RR, the expression of MDA in lung tissue in rutin groups were concentration-dependent decreased, while the $p(\text{CO}_2)$, pH and the activity of CAT, GPx and SOD were concentration-dependent increased. **CONCLUSION** Rutin pretreatment can concentration-dependent decrease LPS induced acute lung injury by suppressing oxidative stress.

KEY WORDS: rutin; lipopolysaccharide(LPS); acute lung injury; oxidative stress

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由肺内外因素导致的一种临床危重症, 其典型临床表现为进行性呼吸困难和顽固性低氧血症^[1], 其具体机制不明, 故尚无有效治疗措施。最近研究发现氧化应激是导致 ALI 的重要发病机制^[2]。芦丁是一种从植物提取的黄酮类化合物, 最近研究发现其具有抗氧化应激活性作用^[3]。而氧化应激是 ALI 重要发病机制^[1,4]。本实验以脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)在小鼠诱发 ALI 模型, 探讨芦丁对 ALI 氧化应激的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

芦丁(上海现代哈森); 脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, 美国 Sigma); 3%戊巴比妥钠(上海

桥星贸易有限公司); HE 试剂由三峡大学病理实验室配制。C0490 紫外分光光度计(Thermo fisher); YP-1401 逆转录仪(eppendorf); BIO-RAD IQ5 qPCR 仪(美国 BIO-RAD); BX51 显微镜(Olympus)及成像系统(HITMAS-30)均为三峡大学仁和医院病理科实验室临床病理组提供。

1.2 动物及分组

50 只健康 C57 小鼠, ♂, 20~25 g, SPF 级, 购自北京华富康实验动物中心, 质量合格证号: 510342011, 饲养于三峡大学仁和医院实验动物实验中心, 适应性喂养 7 d 后, 状态良好。小鼠随机分为对照组, 模型组和芦丁低、中、高剂量组, 每组 10 只。模型组注射 LPS 6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 造模, 芦丁低、中、高剂量组分别于 LPS 注射前 0.5 h 腹

作者简介: 阮佼, 男, 主治医师 Tel: 13972515023 E-mail: 22409241@qq.com

腔注射芦丁 25, 50, 100 mol·kg⁻¹, 剂量参考文献[5]。

1.3 标本收集及血气与湿干比(wet/dry, W/D)的测量

各组小鼠在 LPS 注射后 6 h, 在 3%戊巴比妥钠局麻下行腹主动脉取血, 取 1 mL 送三峡大学仁和医院检验科血气分析, 其余室温下 3 000 r·min⁻¹离心 10 min 后取上清液。开胸取肺脏, 三分之一肺脏置于多聚甲醛做石蜡切片, 三分之一肺脏称湿重, 80 ℃恒温箱烤 48 h 至干重恒定, 称干重, 计算 W/D, 其余肺组织冷藏于-80 ℃冰箱。

1.4 肺脏病理检测

肺脏组织采用 10%多聚甲醛固定, 常规脱水浸蜡, 石蜡包埋, 4 μm 切片, 脱蜡透明后由病理科实验室 PAS 试剂进行 HE 染色, 光镜下观察形态结构。形态评分标准如下^[5]: 0 分, 没有损伤; 1 分, 轻度损伤, 间质水肿和局限性坏死; 2 分, 中度损伤, 广泛的肺脏细胞肿胀和坏死; 3 分, 严重损伤, 有血管浓缩和肺脏萎缩的坏死; 4 分, 极严重损伤, 弥漫性血管浓缩, 出血和肺脏坏死。损伤评分参考文献[4]。

1.5 测定肺组织匀浆中丙二醛(MDA)的含量及过

氧化氢酶(CAT)、GPx 和 SOD 的活性

剩余肺组织制备组织匀浆, 硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 的含量, CAT、GPx 和 SOD 测定肺组织中 CAT、GPx 和 SOD 的活性, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芦丁预处理可明显减轻脂多糖诱导的肺组织损伤

与对照组相比, 模型组的肺组织形态学变化明显增加, 表现为肺间质及肺泡腔有出血、水肿、渗出、中性粒细胞浸润, 毛细血管扩张明显增加。与模型组相比, 芦丁组的肺组织形态学变化明显减少, 表现为肺间质及肺泡腔有出血、水肿、渗出、中性粒细胞浸润, 毛细血管扩张明显减少。这显示芦丁预处理可明显减轻 LPS 对肺组织的损伤。结果见图 1 和表 1。

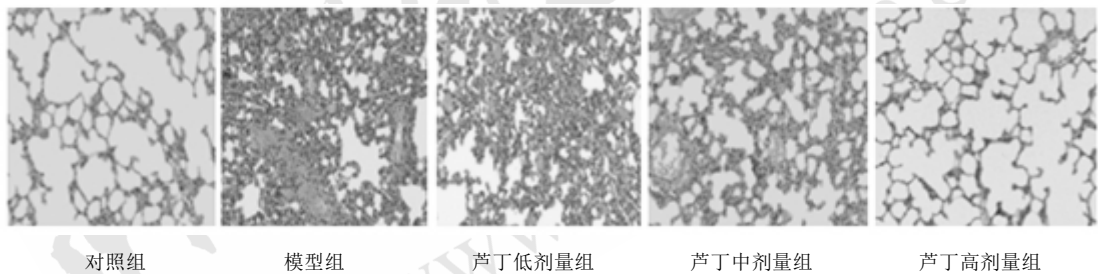


图 1 不同浓度芦丁对 LPS 诱发的 ALI 病理结构的影响(HE, 200×)

Fig. 1 The effect of different concentration of rutin on the pathological structure of ALI induced by LPS(HE, 200×)

表 1 不同浓度芦丁对 LPS 诱发的 ALI 评分结果和 W/D(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of different concentration of rutin on the score and W/D of ALI induced by LPS(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mol·kg ⁻¹	损伤评分/分	W/D
对照组	—	1±0.5	3.65±0.29
模型组	—	9±2 ¹⁾	7.32±0.55 ¹⁾
芦丁低剂量组	25	6±1 ²⁾	6.12±0.33 ²⁾
芦丁中剂量组	50	3±1 ²⁾	4.75±0.31 ²⁾
芦丁高剂量组	100	2±0.5 ²⁾	4.21±0.25 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾*P*<0.05, 与模型组相比, ²⁾*P*<0.05。
Note: Compared with control group, ¹⁾*P*<0.05; compared with model group, ²⁾*P*<0.05.

2.2 芦丁可明显抑制 LPS 诱导的肺 W/D 的增加

LPS 刺激 6 h 后, 与对照组相比, 模型组肺 W/D 比值明显增加(*P*<0.05); 与模型组相比, 芦丁组 W/D 明显降低(*P*<0.05), 并呈浓度依赖性, 这显示芦丁预处理可明显减轻 LPS 诱导的肺水肿(*P*<0.05), 结果见表 1。

2.3 芦丁可呈浓度依赖性减轻 LPS 诱发的小鼠血气改变

与对照组相比, 模型组动脉血二氧化碳分压 [*p*(CO₂)]和呼吸频率(respiratory rate, RR)明显增加(*P*<0.05), 而血氧分压 [*p*(O₂)]和 pH 值明显降低(*P*<0.05)。与模型组相比, 芦丁组 *p*(CO₂)和 RR 明

显降低($P<0.01$), 而 $p(\text{O}_2)$ 和 pH 值明显增加($P<0.01$), 这显示芦丁预处理可以降低 LPS 诱发的血气改变, 结果见表 2。

表 2 芦丁对 LPS 诱发的小鼠血气改变的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of different concentration of rutin on the blood gas in the mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$p(\text{O}_2)/$ Pa	$p(\text{CO}_2)/$ Pa	RR/ $\text{次} \cdot \text{min}^{-1}$	pH 值
对照组	—	98±2	20±3	20±1	7.4±0.05
模型组	—	45±5 ¹⁾	60±7 ¹⁾	33±2	4.7±0.11 ¹⁾
芦丁低剂量组	25	58±7 ²⁾	45±5 ²⁾	28±2	5.3±0.22 ²⁾
芦丁中剂量组	50	68±8 ²⁾	33±6 ²⁾	25±1	6.4±0.19 ²⁾
芦丁高剂量组	100	75±6 ²⁾	27±3 ²⁾	22±1	7.1±0.28 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.4 芦丁预处理呈浓度依赖性减少 MDA 的含量

与对照组相比, 模型组 MDA 含量明显增加($P<0.05$); 与模型组相比, 芦丁组 MDA 含量明显降低($P<0.01$), 这显示芦丁预处理可以减轻 LPS 诱发的氧化应激, 结果见表 2。

表 3 TBA 法检测芦丁预处理对 MDA 含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The effect of rutin pretreatment on the expression of MDA examined by TBA($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	MDA/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	—	110±20
模型组	—	2 500±400 ¹⁾
芦丁低剂量组	25	1 500±300 ²⁾
芦丁中剂量组	50	1 200±230 ²⁾
芦丁高剂量组	100	900±150 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

2.5 芦丁预处理呈浓度依赖性增加抗氧化应激酶 CAT、GPx 和 SOD 的活性

与对照组相比, 模型组 CAT、GPx 和 SOD 活性明显降低($P<0.05$); 与模型组相比, 芦丁组的 CAT、GPx 和 SOD 的活性明显升高, 这显示芦丁预处理可以明显增加 CAT、GPx 和 SOD 活性($P<0.01$), 结果见表 4。

3 讨论

ALI 是呼吸系统疾病中最常见的疾病之一, 常继发于感染、休克、外伤等危重症过程, 临床表现为呼吸窘迫, 顽固性低氧血症等^[1,4]。其致病机

表 4 活性试剂盒检测芦丁预处理对 CAT、GPx 和 SOD 活性的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The effect of rutin pretreatment of on the activation of CAT, GPx and SOD examined by active reagent kit ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	CAT/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	GPx/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	—	100±20	105±25	100±10
模型组	—	35±7 ¹⁾	25±7 ¹⁾	30±9 ¹⁾
芦丁低剂量组	25	50±6 ²⁾	37±9 ²⁾	45±8 ²⁾
芦丁中剂量组	50	65±11 ²⁾	48±6 ²⁾	55±12 ²⁾
芦丁高剂量组	100	72±13 ²⁾	56±11 ²⁾	79±14 ²⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, 与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

制为外因素诱发体内的大量中性粒细胞广泛激活, 导致大量氧自由基、活性氧产生, 引发氧化应激状态^[2]。因此抑制氧化应激是减轻 ALI 的有效途径。

芦丁又名紫槲皮苷、芸香苷, 是从芸香、烟叶、枣、杏、橙皮等提取的一种维生素类物质, 因其具有降低毛细血管通透性和脆性的作用, 保持及恢复毛细血管正常弹性的功效, 因而在临床用于防治脑溢血、高血压、视网膜出血、紫癜和急性出血性肾炎等^[5-6]。最近研究发现, 芦丁具有抗自由基活性、抗脂质过氧化、血管舒张、抗炎、抗病毒等活性^[5-6]。而氧化应激是 ALI 的重要发病机制^[7-9]。

实验结果显示, LPS 可导致小鼠肺间质及肺泡腔有广泛出血、水肿、渗出、中性粒细胞浸润, 毛细血管扩张明显增加、肺 W/D 明显增加, $p(\text{CO}_2)$ 和 RR 明显增加, 而 $p(\text{O}_2)$ 和 pH 明显降低。而芦丁预处理可导致小鼠肺间质及肺泡腔有出血、水肿、渗出、中性粒细胞浸润, 毛细血管扩张明显减少、肺 W/D 明显减低, $p(\text{CO}_2)$ 和 RR 明显降低, 而 $p(\text{O}_2)$ 和 pH 明显增高。这显示芦丁预处理减轻 LPS 导致的小鼠 ALI。但芦丁如何减轻 ALI 的具体机制不明。

MDA 是脂质过氧化的最终产物, 其含量与脂质过氧化反应呈正比, 是机制氧化应激的标志^[7-8]。实验结果显示, LPS 可导致肺组织 MDA 含量明显增高, 芦丁预处理可明显减少 MDA 含量。这显示芦丁可减轻 LPS 导致的氧化应激水平。CAT, GPx 和 SOD 是机体典型的抗氧化酶, 可拮抗机体氧化

应激水平^[8-11]。实验结果显示, LPS 可导致 CAT、GPx 和 SOD 活性明显降低, 而芦丁可增加 CAT、GPx 和 SOD 活性。实验结果显示, 芦丁可通过抗氧化应激减轻 LPS 导致的 ALI, 这为临床预防治疗 ALI 提供了新思路。但在 ALI 中, 芦丁除干预氧化应激外, 是否还有其他途径目前仍然不清楚, 这将是笔者进一步研究解决的问题。

REFERENCES

- [1] SUN T. A study on chemical constituents of the leaves from *Engelhardtia roxburghiana* and *Brassica pekinensis* [D]. Beijing: Chinese Academy of Medical Science Peking Union Medical College, 2012.
- [2] CHEN H, BAI C, WANG X. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2010, 4(6): 773-783.
- [3] MCDONALD C I, FUNG Y L, SHEKAR K, et al. The impact of acute lung injury, ECMO and transfusion on oxidative stress and plasma selenium levels in an ovine model [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 30(3): 4-10.
- [4] GAO H C, ZHU K, GAO H M, et al. Role of tissue transglutaminase in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and the intervention effect of rutin [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(4): 1103-1108.
- [5] HUANG R, ZHONG T, WU H. Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through suppression of inflammation and oxidative stress [J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(2): 427-432.
- [6] SRIVASTAVA R. A review on phytochemical, pharmacological, and pharmacognostical profile of *Wrightia tinctoria*: Adulterant of kurchi [J]. *Pharmacogn Rev*, 2014, 8(15): 36-44.
- [7] CHUA L S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3): 805-817.
- [8] CHEN S, ZHENG S, LIU Z, et al. Endogenous sulfur dioxide protects against oleic acid-induced acute lung injury in association with inhibition of oxidative stress in rats [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(2): 142-156.
- [9] SHOHRATI M, KARIMZADEH I, SABURI A, et al. The role of N-acetylcysteine in the management of acute and chronic pulmonary complications of sulfur mustard: a literature review [J]. *Inhal Toxicol*, 2014, 26(9): 507-523.
- [10] MADL A K, PLUMMER L E, CAROSINO C, et al. Nanoparticles, lung injury, and the role of oxidant stress [J]. *Annu Rev Physiol*, 2014, 76(8): 447-465.
- [11] YE H C H, YANG J J, YANG M L, et al. Rutin decreases lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibition of oxidative stress and the MAPK-NF- κ B pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69(7): 249-257.

收稿日期: 2015-04-15

荧光光谱法研究安非他酮与人血清白蛋白的相互作用

周彬, 汤从容, 胡卢丰(温州医科大学附属第一医院药学部, 浙江 温州 325000)

摘要: 目的 研究安非他酮与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的相互作用。方法 通过荧光光谱法研究安非他酮对 HSA 的荧光猝灭光谱和同步荧光光谱的影响。由 Stern-Volmer 方程确定安非他酮对 HSA 的荧光猝灭机制, 双对数方程确定反应结合位点和结合常数。根据热力学方程讨论两者间主要的作用力类型。结果 荧光猝灭光谱显示, 安非他酮对 HSA 有猝灭作用, 在 17 °C 和 37 °C 时的猝灭速率常数分别为 5.714×10^3 和 $3.126 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 反应前后的焓变和熵变均 < 0 , 结合点数为 1。结论 安非他酮对 HSA 的猝灭过程为静态猝灭, 二者间的结合力主要为氢键和范德华力。

关键词: 安非他酮; 人血清白蛋白; 荧光猝灭; 荧光光谱法

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1062-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.008

Study on the Interaction Between Amfebutamone and Human Serum Albumin by Fluorescence Spectrum

ZHOU Bin, TANG Congrong, HU Lufeng(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the interaction between amfebutamone and human serum albumin(HAS). **METHODS** Fluorescence spectrum was used to measure the effects of amfebutamone on the fluorescence quenching spectra and synchronous

作者简介: 周彬, 男, 药师 Tel: (0577)88069699 E-mail: zb1890@189.cn