

藻蓝素对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用

张大利¹, 吴建华², 谢黎明¹

(1. 南华大学附属第一医院急诊科, 湖南 衡阳 421001; 2. 衡阳市第一人民医院呼吸内科)

摘要: **目的** 观察藻蓝素(CPC)对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用。 **方法** SD大鼠随机分为对照组、模型组和CPC干预组。其中模型组采用盲肠结扎穿刺建立脓毒症急性肺损伤大鼠模型。CPC干预组在模型组基础上分别给予浓度为20 mg/kg、40 mg/kg和60 mg/kg CPC腹腔注射。术后72 h获取血液及肺组织标本,检测PaO₂/FiO₂、肺湿干重比、支气管肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-6水平,以及肺组织中丙二醛(MDA)水平及髓过氧化物酶(MPO)活性。 **结果** 与正常对照组相比,模型组PaO₂/FiO₂含量显著降低($P < 0.05$)。不同浓度CPC干预后,PaO₂/FiO₂进一步增高。模型组肺湿干重比以及MDA和MPO显著高于正常对照组($P < 0.05$),CPC处理后,肺湿干重、MDA和MPO水平随之降低;模型组大鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6含量明显增高,CPC能进一步降低其含量。 **结论** CPC可减轻脓毒症急性肺损伤大鼠肺部气体交换功能和炎症反应,从而发挥对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用。

关键词: 藻蓝素; 脓毒症; 急性肺损伤

中图分类号:R453.9 文献标识码:A

Protective Effect of C-phycoerythrin on Acute Lung Injury in Septic Rats

ZHANG Dali, WU Jianhua, XIE Liming

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of C-phycoerythrin (CPC) on acute lung injury in septic rats.

Methods SD rats were randomly divided into control group, model group and CPC group. Cecal ligation and puncture was used to establish septic acute lung injury rats (model group). For the CPC groups, septic acute lung injury rats were administered by 20, 40 and 60 mg/kg of CPC by peritoneal injection. 72 h after the operation, serum and lung tissue were obtained, the PaO₂/FiO₂, the wet to dry weight ratio, content of TNF- α , IL-6 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid, the concentration of malondialdehyde (MDA) and activity of myeloperoxidase (MPO) were analyzed. **Results** The PaO₂/FiO₂ in the model group was lower than that in the control group ($P < 0.05$), after CPC treatment, the level of PaO₂/FiO₂ increased. The wet to dry weight ratio and the content of MDA and activity of MPO in the model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$), and were decreased in CPC groups. In the model group, TNF- α , IL-6 and IL-10 in bronchoalveolar lavage fluid was increased, and CPC could also decrease them as the concentration increased. **Conclusion** CPC could relieve gas exchange function and the inflammatory response, and thus play a protective role in the septic acute lung injury.

Key words: C-phycoerythrin; sepsis; acute lung injury

脓毒症(sepsis)是由感染所引发的全身炎症反应综合征。严重脓毒症时,急性肺损伤(acute lung

injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)在多器官功能衰竭中出现最早,且发生率最高^[1]。目前认为ALI/ARDS本质是一种肺内过度性、失控性的炎症反应^[2]。其病理生理基础是中性粒细胞大量渗出,导致广泛的组织损伤^[3]。因此,采取不同的干预措施,针对促炎/抗

炎反应失衡的方向和程度,是防治 ALI/ARDS 的关键^[4]。藻蓝素(C-phycocyanin, CPC)是一种从螺旋藻提取、加工而成的天然食用色素,是一种营养价值极高的营养物质。研究显示, CPC 不但可以帮助调节合成人体所需要的多种重要酶,同时对人体的免疫系统具有一定的调控作用^[5-6]。本研究旨在探讨 CPC 对脓毒症诱导的 ALI 发挥保护效应。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CPC 购自 Sigma-Aldrich(纯度 98%)。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒购自深圳新博盛生物科技有限公司(检测下限为 5 pg/mL)。丙二醛(malondialdehyde; malonic dialdehyde, MDA)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒为南京建成生物工程研究所。其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 脓毒症急性肺损伤大鼠模型的构建及分组

40 只雄性 SPF 级 SD 大鼠(体重 200 ~ 250 g)购自南华大学实验动物中心。动物随机分为 3 组:①对照组(或假手术组):SD 大鼠用 10% 水合氯醛生理盐水麻醉(400 mg/kg),去除毛发并进行皮肤消毒后,沿前腹正中中线作 3 cm 长的切口,取出盲肠,然后逐层关腹。②模型组:取出盲肠后,用 4.0 丝线在距盲端 1.5 cm 处结扎,用 18 号针头在盲肠结扎处远端穿刺 2 次,挤出少量粪便,随后将盲肠回纳入腹腔中,逐层关腹。③CPC 干预组:又分为 3 个亚组,术后 2 h 分别予 20 mg/kg、40 mg/kg 和 60 mg/kg CPC 腹腔注射,12 h 后给予第二次注射。72 h 后处死大鼠用于下一步研究。

1.3 血气分析及肺组织湿干比的测定

获取处理后大鼠动脉血,采用全自动血气分析仪(NOVA-K)检测 PaO₂/FiO₂。随后通过 CO₂ 麻醉处死大鼠,取各组右肺下部,获得湿重,然后在烤箱内 60 °C 放置 48 h,获取干重。计算肺湿/干比值。

1.4 MDA 含量及髓过氧化物酶(MPO)活性测定

按试剂盒提供的步骤分别加入测试样品及试剂,混匀后 95 °C 水浴 40 min,4 000 r/min 离心 10 min,测定上清中 OD 值(波长 532 nm),结果以 nmol/mL 表示。测定 MPO 活性时,肺组织加入 50 mmol/L KH₂PO₄(含 5 mmol/L 十六烷基三甲基

溴化铵, pH = 6)后超声破碎,并经 3 个冻融循环后,4 °C、14 000 g 离心 10 min。20 μ L 组织上清液与 40 μ L 分析缓冲液(含 0.167 mg/mL 二盐酸邻联茴香胺和 0.0005% H₂O₂)混合后,3 min 内于 460 nm 处动态测定 MPO 的活性。MPO 的活性计算为 460 nm 处 1 min 内吸光度的改变(ΔA),用每分钟 $\Delta A/g$ 表示。

1.5 支气管肺泡灌洗液(BALF)的采集以及细胞因子测定

在大鼠右主支气管部位对右肺进行结扎,气管插管后注入 5 mL 无菌 PBS 并从左肺收集 BALF。利用 ELISA 法测定 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 one-way ANOVA 分析后进行 Student-Newmen-Kuels q 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组大鼠血气分析

如图 1 所示,与正常对照组相比,模型组 PaO₂/FiO₂ 含量显著降低($P < 0.01$)。不同浓度 CPC 干预后,PaO₂/FiO₂ 进一步增高。

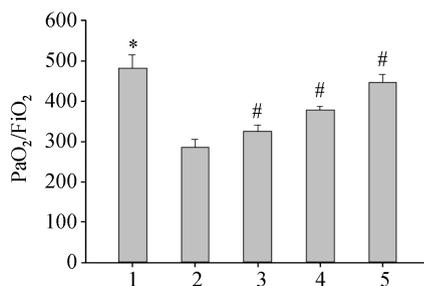


图 1 各组大鼠动脉血气分析 PaO₂/FiO₂ 结果 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 20mg/kg CPC 干预组; 4: 40mg/kg CPC 干预组; 5: 60mg/kg CPC 干预组. 与对照组比较, *: $P < 0.01$; 与模型组比较, #: $P < 0.05$

2.2 各组肺湿干比情况

模型组肺湿干比高于正常对照组($P < 0.01$)。经 CPC 干预后,肺湿干重比均低于模型组,且 60mg/kg CPC 处理后,肺湿干重明显低于 20mg/kg 和 40mg/kg 组,见图 2 所示。

2.3 各组肺组织中 MDA 和 MPO 的变化

模型组 MDA 和 MOP 含量显著高于正常对照组,差异有显著性($P < 0.01$)。不同浓度 CPC 干预后,肺组织中 MDA 和 MPO 水平随着 CPC 浓度的增高而降低,差异有显著性($P < 0.05$),见表 1。

2.4 各组 BALF 细胞因子含量测定

实验各组各时间点 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平见表 2 所示。与对照组相比,模型组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量明显增高。不同浓度 CPC 干预后,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量进一步降低,其中 60mg/kg CPC 处理后,细胞因子含量显

著低于 20mg/kg 和 40mg/kg 组($P < 0.05$)。

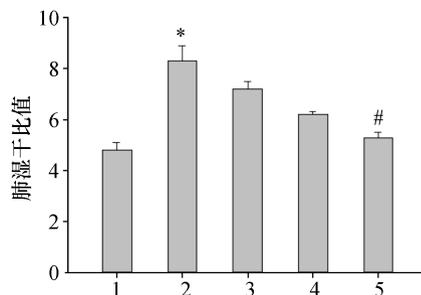


图 2 各组大鼠肺湿干比结果 1:对照组;2:模型组;3:20mg/kg CPC 干预组;4:40mg/kg CPC 干预组;5:60mg/kg CPC 干预组。与对照组比较,* : $P < 0.01$;与 30mg/kg 和 50mg/kg 组比较,#: $P < 0.05$

表 1 各组肺组织中 MDA、MPO 和 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量的比较 ($n = 3$)

组别	剂量	MDA (nmol/mg)	MPO ($\Delta A/g$)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
对照组		9.12 \pm 0.56	1.75 \pm 0.81	12.54 \pm 5.85	2.46 \pm 1.49	3.18 \pm 2.29
模型组		18.17 \pm 0.58 ^a	11.21 \pm 1.98 ^a	428.73 \pm 25.31 ^b	84.28 \pm 9.37 ^b	81.15 \pm 8.09 ^b
CPC 组	20mg/kg	16.81 \pm 0.41 ^c	8.66 \pm 0.72 ^c	334.02 \pm 30.69 ^c	57.08 \pm 6.11 ^c	60.29 \pm 9.71 ^c
	40mg/kg	13.49 \pm 0.77 ^{cd}	6.16 \pm 0.3 ^{8ed}	217.84 \pm 23.86 ^c	37.03 \pm 5.73 ^c	38.98 \pm 9.33 ^c
	60mg/kg	11.96 \pm 1.41 ^{cd}	3.88 \pm 0.53 ^{cd}	137.76 \pm 19.17 ^{cd}	25.27 \pm 4.01 ^{cd}	14.34 \pm 7.94 ^{cd}

与对照组比较,a: $P < 0.01$,b: $P < 0.05$;与模型组比较,c: $P < 0.05$;与 20mg/kg 组比较,d: $P < 0.05$

3 讨 论

脓毒症发生发展过程中,肺是最先被累及的器官。本研究采用经典的大鼠盲肠结扎穿刺法建立脓毒症肺损伤动物模型^[7],观察 CPC 对 ALI 大鼠气体交换、肺水含量、细胞因子含量以及肺组织中 MDA 和 MPO 活性的变化。结果显示,大鼠盲肠结扎穿刺法建立的急性肺损伤模型中上述各项指标均与对照组相比存在统计学差异,这表明 ALI 模型建模成功。

近年来针对脓毒症所致的治疗是研究的热点。由于中药具有毒性低,药源充足,在防治脓毒症所致 ALI 中日益受到重视。CPC 可以帮助调节合成人体所需要的多种重要酶,对抑制癌细胞的生长和促进人体细胞再生具有重要作用,同时 CPC 还可以调节人体的免疫系统,增强免疫系统的功能,提高人体对疾病的抵抗能力^[8]。ALI 发生时,因为肺组织水肿导致的顺应性改变,以及通气血流灌注比例异常,临床上常表现为难治性低氧血症。在治疗过程中,肺换气功能的改善是评价 ALI 病情的重要依据^[9]。PaO₂/FiO₂ 是最常用的评价肺气体交换简便而有效的指标。由于 PaO₂/FiO₂ 受吸氧浓度的干扰小,因此能真实地反应体内的缺氧状

态^[10]。本研究运用 PaO₂/FiO₂ 来评估 ALI 的保护效应,结果显示,不同剂量 CPC 处理后,PaO₂/FiO₂ 得到了明显的改善,表明 CPC 能有效提高肺组织的氧合状况,从而改善肺的换气功能。肺湿/干比反应的是肺组织中水的含量,常用于评价肺水肿的严重程度^[11]。本研究显示,不同剂量的 CPC 可降低脓毒症诱导的肺水肿,表明 CPC 可能在一定程度上改善肺微血管的通透性,从而抑制肺内组织液的渗出。肺组织中中性粒细胞积聚是 ALI 发生的关键,并直接影响到患者的预后。因此抑制中性粒细胞渗出可减轻 ALI^[12]。本研究采用 MPO 的活性间接评价中性粒细胞的渗出。结果发现 MPO 水平随着 CPC 浓度的增高而降低。同时在 BALF 中也发现中性粒细胞释放的促炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平也受到了一定的抑制。虽然 TNF- α 等炎症细胞因子在机体抗感染过程中发挥重要作用,但其过度分泌显然是 ALI/ARDS 发生的重要机制。CPC 能有效抑制细胞因子的过度分泌,表明其能在一定程度上轻脓毒症急性肺损伤大鼠肺部气体交换功能,抑制炎症反应,从而发挥对脓毒症急性肺损伤大鼠的保护作用。

(下转第 482 页)

参考文献:

- [1] Seeley EJ. Updates in the management of acute lung injury: a focus on the overlap between AKI and ARDS [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2013, 20(1): 14-20.
- [2] Zhang H, Neuhofer P, Song L, et al. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(3): 1019-1031.
- [3] Mondrinos MJ, Kennedy PA, Lyons M, et al. Protein kinase C and acute respiratory distress syndrome [J]. *Shock*, 2013, 39(6): 467-479.
- [4] Kiemer AK, Muller C, Vollmar AM. Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF-alpha production by alpha-lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Immunol Cell Biol*, 2002, 80(6): 550-557.
- [5] Pleonsil P, Soogarun S, Suwanwong Y. Anti-oxidant activity of holo-and apo-c-phycoyanin and their protective effects on human erythrocytes [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60(9): 393-398.
- [6] Shanab SM, Mostafa SS, Shalaby EA, et al. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(8): 608-615.
- [7] 魏西军. 盲肠结扎穿刺法大鼠脓毒症模型的复制 [J].

西部医学, 2012, 24(7): 1243-1244, 1248.

- [8] Gantar M, Dhandayuthapani S, Rathinavelu A. Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP [J]. *J Med Food*, 2012, 15(12): 1091-1095.
- [9] Lange M, Hamahata A, Enkhbaatar P, et al. Assessment of vascular permeability in an ovine model of acute lung injury and pneumonia-induced *Pseudomonas aeruginosa* sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(4): 1284-1289.
- [10] Pichot C, Petitjeans F, Ghignone M, et al. Is there a place for pressure-support ventilation and high positive end-expiratory pressure combined to alpha-2 agonists early in severe diffuse acute respiratory distress syndrome [J]. *Med Hypotheses*, 2013, 80(6): 732-737.
- [11] 谢荣俊, 李峰, 张树友. 姜黄素治疗大鼠重症急性胰腺炎相关性肺损伤的实验研究 [J]. *中南医学科学杂志*, 2011, 39(6): 622-625.
- [12] Krupa A, FudCPC R, Florence JM, et al. Bruton's tyrosine kinase mediates Fc gamma RIIa/Toll-like receptor-4 receptor crosstalk in human neutrophils [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(2): 240-249.

(此文编辑: 朱雯霞)