

基于络病学探讨内毒素“二次打击”急性肺损伤大鼠的 Rho/ROCK 机制及川芎嗪的保护作用

李 言¹ 梁俊清² 张高峰¹ 李 佳¹ 杨锡兰¹ 陈前芬¹ 赵士弟¹

(1 蚌埠医学院病理生理学教研室,蚌埠,233030; 2 河北以岭医药研究院有限公司,石家庄,050035)

摘要 目的:研究内毒素血症“瘀滞络脉”急性肺损伤大鼠的 Rho/ROCK 机制及川芎嗪的保护作用。方法:以内毒素“二次打击”建立大鼠内毒素血症“瘀滞络脉”急性肺损伤模型,分别设正常对照组、模型组、川芎嗪低剂量组、高剂量组,测定呼吸频率、肺泡灌洗液中性粒细胞(PMN)百分率、肺湿/干重比、肺组织髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)活性、ROCK mRNA 表达量,并观察、评估肺组织损伤严重程度。结果:与模型组相比,川芎嗪显著降低呼吸频率、PMN 百分率、肺湿/干重比、MPO 活性、ROCK mRNA 表达量,减轻大鼠急性肺损伤病理改变。结论:川芎嗪可能通过抑制 Rho/ROCK 通路对内毒素血症“瘀滞络脉”大鼠急性肺损伤有较好的保护作用。

关键词 络病学;内毒素血症;急性肺损伤;川芎嗪;Rho/ROCK

A Modified Lipopolysaccharide “Two-hit” Induced Acute Lung Injury Model in Rats via Rho/ROCK Mechanism and Protective Effects of Tetramethylpyrazine on Injury Based on Collateral Disease Theory

Li Yan¹, Liang Junqing², Zhang Gaofeng¹, Li Jia¹, Yang Xilan¹, Chen Qianfen¹, Zhao Shidi¹

(1 Department of Pathophysiology, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui Province 233030, China; 2 Hebei Yiling Medical research institute co., LTD, Shijiazhuang, Heibei Province 050035, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effect of tetramethylpyrazine (TMP) on acute lung injury (ALI) in endotoxemia rats with “Collaterals Damaged by Toxic Stasis” (YuZhiLuoMai) and its mechanism of Rho/ROCK. **Methods:** Endotoxemia rats model in ALI with YuZhiLuoMai were established through lipopolysaccharide “two-hit”. Rats were randomized into 4 groups: G1 (normal control group), G2 (“two-hit” group), G3 (low dosage TMP group) and G4 (high dosage TMP group). Measure the respiratory rate, lung wet/dry weight ratio, BALF PMN percentage, pulmonary MPO activity, ROCK2 mRNA expression quantity, observe and evaluate the severity of lung tissue injury. **Results:** Compared with the G2 rats, TMP significantly reduced respiratory rate, PMN percentage and lung wet/dry weight ratio, MPO activity and ROCK mRNA expression quantity, and reduced the pathological changes in endotoxemia rats with ALI. **Conclusion:** We found TMP might have better protection against ALI in endotoxemia rats with YuZhiLuoMai through inhibiting RhoA/ROCK pathway.

Key Words Collateral Disease Theory; Endotoxemia; Acute lung injury (ALI); Tetramethylpyrazine (TMP); Rho/ROCK

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.033

脓毒症(Sepsis)多为内毒素血症(Endotoxemia),是现代急诊医学面临的一个常见而复杂的难题,为全身性炎症反应综合征(Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)甚至多器官衰竭(Multiple Organ Failure, MOF)的前期状态,具有高死亡率、高医疗费用的特点^[1]。新近发现中药单体川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)可保护脓毒症动物心肾功能^[2-4],但确切机制未明。因此,继承和发展络病学有关理论,深入探讨内毒素血症的发病机制和川芎嗪的保护作用,对于内毒素血症的有效防治和川芎嗪的推广应用都具有积极意义。

综合相关研究表明,内毒素血症急性肺损伤(Acute Lung Injury, ALI),特征性病理生理学改变是肺毛细血管内皮细胞间隙形成、毛细血管内皮通透性增高,中性粒细胞黏附、迁移,通过血管内皮细胞间隙由血管向肺泡、肺间质外渗,释放大量促炎介质,由此导致中性粒细胞介导的肺损伤^[5]。而 Rho/ROCK 信号转导途径的激活在血管内皮超微结构改变中起着关键作用^[6-7]。

20 世纪 80 年代以来,络病学理论与实践的不断进展^[8-9]和内毒素血症病理机制的深入研究^[10-11],为“瘀滞络脉”病机假说提供了初步的现代生物学

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81202833);安徽省自然科学基金项目(编号:1308085MH140)

作者简介:李言(1977—),男,安徽,博士,副教授,研究方向:中西医结合防治血管内皮细胞损伤相关疾病, E-mail:408829061@qq.com

通信作者:赵士弟(1976—),男,安徽,副教授,研究方向:心脑血管病理生理学, E-mail:zhshdi@126.com

依据。有学者研究表明,川芎嗪有抑制 Rho/ROCK 信号通路的作用^[12]。川芎嗪是否通过减轻骨架重构、通路排毒,防治内毒素血症? 源于此,本研究基于络病学,试图揭示内毒素血症“瘀滞络脉”病机假说的现代分子生物学基础,探讨中药单体川芎嗪对内毒素血症急性肺损伤时内皮细胞骨架重构、血管内皮屏障损伤的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年 Wistar 大鼠,体重 200 ~ 250 g (蚌埠医学院实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(皖)2011-002),雌雄各半。

1.2 试剂及仪器 内毒素 (Lipopolysaccharide, LPS)055:B5(美国 Sigma 公司);注射用盐酸川芎嗪 (批号:20140403,80 mg/瓶;合肥平光制药有限公司);呼吸频率监测仪 (Model RM-80,美国 Columbus Instruments);第一条链合成试剂盒 (天根生化有限公司);PCR master mix (Fermentas 公司);MPO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 动物模型制备 将 LPS 溶于 0.9% 生理盐水 (NS)制成 1 mg/mL 溶液备用。大鼠随机分为 4 组:G1(生理盐水对照组),G2(内毒素“二次打击”组),G3(低剂量 TMP 组)和 G4(高剂量 TMP 组)。实验开始时 G1 组腹腔注射生理盐水 1 mL/kg 体重作为对照,其余各组大鼠腹腔注射 LPS(1 mg/kg)进行首次打击(图 1)。16 h 后,所有动物经腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉后,仰位于 60° 的平板上。行颈部正中手术暴露气管,G1 组气管滴注 NS(1 mL/kg),其余各组大鼠气管滴注 LPS(3 mg/kg)进行二次打击;此后每只大鼠通过 1 mL 注射器注入 0.1 mL 空气^[13]。大鼠滴注后垂直位旋转 0.5 ~ 1 min 以使滴注液均匀分布到肺部。

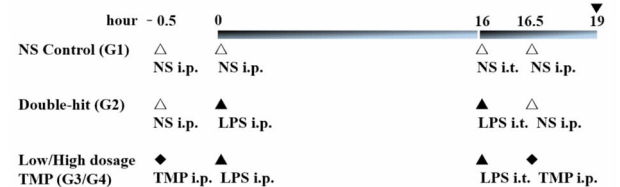


图 1 图示动物分组和实验流程:

大鼠随机分为 4 组 (G1 ~ G4)

注:G1(生理盐水对照组),G2(内毒素“二次打击”组),G3(低剂量 TMP 组)和 G4(高剂量 TMP 组)。(▼:实验终点)

2.2 川芎嗪应用 G3 和 G4 组在首次打击之前 30 min 和二次打击之后 30 min,腹腔注射 TMP(G3)40

mg/kg 或 TMP(G4)80 mg/kg 生理盐水溶液,其余各自同样时间点腹腔注射等量生理盐水。

2.3 检测指标

2.3.1 呼吸频率 利用全身体积描记 (Whole-body Plethysmography) -呼吸频率监测仪检测呼吸频率,并以此反映肺功能的损伤情况。静息状态和实验结束时进行检测,测量 4 次取平均值。

2.3.2 肺组织病理 检测呼吸频率后过量麻醉动物并处死,开胸取右下肺 (n = 6),经 4% 多聚甲醛固定、脱水、包埋、切片、染色、封片等步骤,用普通光学显微镜观察切片。切片由病理医师双盲观测和评分^[14]。

2.3.3 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中性粒细胞百分率是急性肺损伤白细胞炎性反应的重要标志。大鼠处死后进行左肺支气管肺泡灌洗 (n = 6),以 2 mL 生理盐水灌洗左肺,反复 3 次,总回收量约为 5 mL。将 BALF 以 300 × g 速度 4 °C 离心,取沉渣涂片,瑞氏-吉姆萨染色,光镜下计数细胞总数及中性粒细胞百分率。

2.3.4 肺湿/干重比测定 生理盐水冲洗右上肺表面血污 (n = 6),用滤纸吸干,称湿重,置 70 °C 烘箱 48 h 至恒重后称干重,计算肺湿/干重比,并以此评估肺组织的水肿程度。

2.3.5 肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 活性检测 按照试剂盒说明书操作,取右后肺 (n = 6) 制成组织匀浆、离心后取上清加反应液在酶标仪 460 nm 波长下,测各管 OD 值。计算公式: MPO 单位/克湿片 = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值) / (11.3 × 取样量 g)。

2.3.6 ROCK2 mRNA 表达 用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法。用 Trizol 试剂盒提取肺组织的总 RNA,按试剂盒步骤进行第一条链合成和 RT-PCR。ROCK2 引物为:上游 5'CCAGTATAGGCAGTGGAC-CAG3',下游 5'GGTCGGACATGAAATAGCTTG3',产物长度为 232bp; GAPDH 引物为:上游 5'AAGT-TCAACGGCACAGTCAAG 3',下游 5'CCAGTAGACTC-CACGACATACTCA 3',产物长度为 137bp。取 PCR 产物加入 2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析仪下进行灰度扫描并观察拍照,分析光密度积分值,结果以 ROCK2 条带密度与内参照 GAPDH 条带密度的比值作为 mRNA 的相对含量。

2.4 统计学方法 所有数据均使用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,计量资料均写成均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般表现 除对照组外,内毒素“二次打击”后其余各组表现出不同程度的竖毛、反应性下降、进行性呼吸困难、气促和发绀等表现,表明已成功造成内毒素血症急性肺损伤模型。

3.2 川芎嗪对内毒素血症急性肺损伤的保护作用 呼吸频率相对值的变化(实验末期呼吸频率/实验前静息呼吸频率)作为肺功能损伤的整体表现(图 2A),在单纯内毒素“二次打击”组明显上升(与对照组比较, $P < 0.01$),在应用川芎嗪的 2 组显著下降(与模型组比较, $P < 0.01$)。

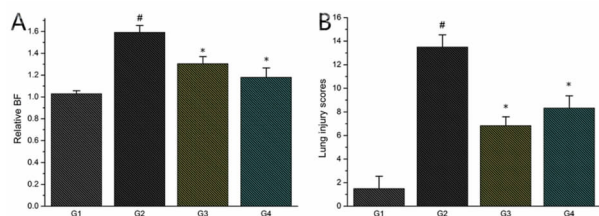


图 2 (A) TMP 对呼吸频率的影响;

(B) TMP 对肺损伤积分的影响

注:G1(生理盐水对照组),G2(内毒素“二次打击”组),G3(低剂量 TMP 组)和 G4(高剂量 TMP 组)。与 G1 比较, # $P < 0.01$;与 G2 比较, * $P < 0.01$

此外,通过组织学评估内毒素血症急性肺损伤程度。内毒素引起明显中性粒细胞浸润、肺泡间质增厚(间质水肿)和肺泡损伤,而川芎嗪能够大幅度改善这些损伤性变化(图 3)。同时,对肺损伤严重程度进行评分结果显示,川芎嗪能够显著降低肺损伤评分(图 2B)(与对照组比较, $P < 0.01$;与模型组比较, $P < 0.01$)。

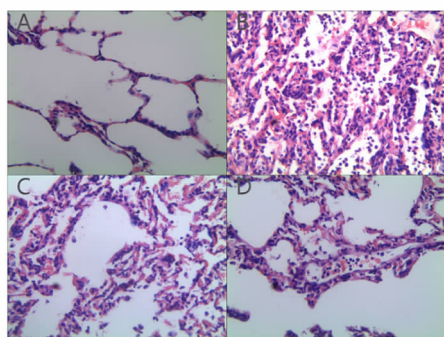


图 3 TMP 对组织学变化的影响(400 ×)

注:A(生理盐水对照组),B(内毒素“二次打击”组),C(低剂量 TMP 组)和 D(高剂量 TMP 组)

进而,通过肺湿/干重比和支气管肺泡灌洗液(BALF)中性粒细胞百分率评估肺水肿程度。此两项指标在模型组显著上升(图 4)(与对照组比较, $P < 0.01$);而在应用川芎嗪的 2 组显著下降(与模型

组比较, $P < 0.01$)。

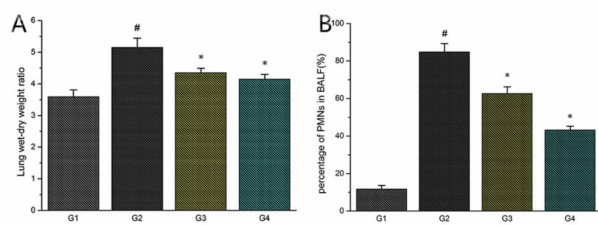


图 4 (A) TMP 对肺湿/干重比的影响;

(B) TMP 对 BALF 中 PMN 百分率的影响

注:G1(生理盐水对照组),G2(内毒素“二次打击”组),G3(低剂量 TMP 组)和 G4(高剂量 TMP 组)。与 G1 比较, # $P < 0.01$;与 G2 比较, * $P < 0.01$

3.3 川芎嗪降低急性肺损伤 MPO 活性 MPO 活性检测可反映中性粒细胞浸润情况,与正常组比较,内毒素“二次打击”后 MPO 活性显著升高(图 5A)($P < 0.01$),川芎嗪能够显著降低 MPO 活性($P < 0.05$,G3 vs. G2; $P < 0.01$,G4 vs. G2)。

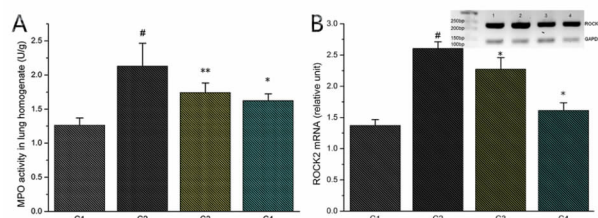


图 5 (A) TMP 对 MPO 活性的影响;

(B) TMP 对 ROCK2 mRNA 表达量的影响

注:G1(生理盐水对照组),G2(内毒素“二次打击”组),G3(低剂量 TMP 组)和 G4(高剂量 TMP 组)。与 G1 比较, # $P < 0.01$;与 G2 比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$

3.4 川芎嗪下调 ROCK2 mRNA 表达水平 RT-PCR 结果显示(图 5B),内毒素“二次打击”组大鼠肺组织 ROCK2 mRNA 表达水平较对照组均显著升高($P < 0.01$);而在应用川芎嗪的 2 组其表达水平显著下降(与模型组比较, $P < 0.01$)。

4 讨论

内毒素血症时肺血管内皮屏障通透性的升高,是中性粒细胞外渗至血管外组织、触发肺损伤炎症级联反应的关键环节。基于络病学理论,参照最新《脓毒症中西医结合诊疗指南》,该《指南》指出:脓毒症的基本病机是正虚毒损、瘀滞络脉、气机逆乱,脏腑功能失调(图 6)。因此,“瘀滞络脉”是内毒素血症乃至脓毒症的重要病位特征^[15-16]。既往及前期研究都提示,络脉受损、内皮通透性升高,可归因于 Rho/ROCK 信号转导途径介导的血管内皮细胞骨架重构,但具体机制未明。本实验中内毒素血症急性肺损伤组在功能学、形态学改变以及肺泡中性粒细

胞浸润的同时,MPO 活性、ROCK2 mRNA 表达水平也明显高于对照组,提示 Rho/ROCK 信号转导通路参与了“瘀滞络脉”骨架重构的病理过程。

依据络脉学说“营卫承制调平”的核心理论^[8]、

针对其病机,确立脓毒症的主要治则^[15]:扶正排毒通络、分层扭转,而通络以制其“络道亢变”、顾护和修复人体的排毒管道、调其气机逆乱、改善各脏腑的温煦濡养,应贯穿脓毒症治疗的全程。

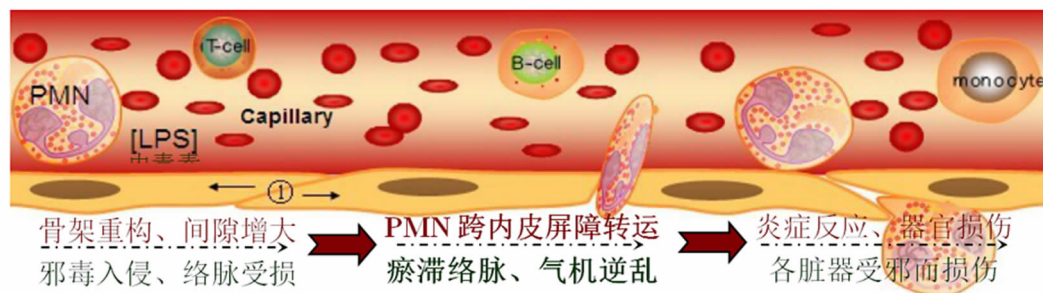


图6 内毒素血症的“瘀滞络脉”病机假说

近期研究提示,中药单体川芎嗪可能通过减轻机体过度炎症反应、改善器官组织微循环等作用,阻止脓毒症的加剧^[2-3,17],并且不良反应较少。川芎(Ligusticum Chuanxiong Hort.)是历史悠久的传统活血化瘀中药,具有活血行气、祛风止痛功效。川芎嗪是其有效成分之一,属酰胺类生物碱,为四甲基吡嗪。本研究显示,川芎嗪对内毒素血症急性肺损伤的具有保护作用;同时,川芎嗪2组MPO活性、ROCK2 mRNA表达水平均显著低于内毒素血症急性肺损伤组,提示川芎嗪保护内毒素血症急性肺损伤的分子机制可能与抑制RhoA/ROCK信号转导通路进而改善“瘀滞络脉”骨架重构有关。以上基本进展有助于深入探讨内毒素血症骨架重构及其防治机制,并将进一步丰富和完善内毒素血症“瘀滞络脉”理论。

参考文献

- [1] Funk D, Kethireddy S, Kumar A. Improving Outcomes in Sepsis and Septic Shock: Getting it Right the First Time [A]. J. Rello, J. Lipman, T. Lisboa. Sepsis Management [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2012:219-235.
- [2] 杨澄,张敏州,郭力恒,等. 川芎嗪对脓毒症大鼠心功能保护作用的研究[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2302-2303.
- [3] 刘海华. 川芎嗪对脓毒症致急性肾损伤保护作用的实验研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2010.
- [4] 范晓钦. 川芎嗪对脓毒症大鼠急性肺损伤的保护作用,老年危重病患者营养支持的临床研究[D]. 合肥:安徽医科大学,2008.
- [5] Ragaller M, Richter T. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. Journal of Emergencies, Trauma and Shock, 2010, 3 (1):43-51.
- [6] Li Y, Wu Y, Wang Z, et al. Fasudil attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through the Rho/Rho kinase pathway [J]. Medical science monitor; international medical journal of experi-

mental and clinical research,2010,16(4):BR112-118.

- [7] Suzuki K, Nemoto K, Ninomiya N, et al. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced vascular hyperpermeability and colonic muscle relaxation in guinea pigs [J]. The Journal of Surgical Research, 2012, 178 (1):352-357.
- [8] 吴以岭. 通络干预血管病变的整合调节机制——承制调平 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22 (10):661-665.
- [9] 杨国栋. 络脉学说理论与临床实践应用研究 [J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2014 (12):1-5.
- [10] Kwok W, Clemens M G. Rho-kinase activation contributes to Lps-induced impairment of endothelial nitric oxide synthase activation by endothelin-1 in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells [J]. Shock (Augusta, Ga.), 2014, 42 (6):554-561.
- [11] Reho J, Fisher S. Myosin phosphatase isoforms in the microvasculature during endotoxemia (678.2) [J]. The FASEB Journal, 2014, 28 (1Sup):678.2.
- [12] 罗运春, 项蔷薇, 王强, 等. 川芎嗪对哮喘小鼠肺组织 Rho 和 Rho 激酶的表达及小鼠气道炎症的影响 [J]. 中华儿科杂志, 2008, 46 (11):868-869.
- [13] Zou Y, Dong C, Yuan M, et al. Instilled air promotes lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Experimental and therapeutic medicine, 2014, 7 (4):816-820.
- [14] Wu Q, Gui P, Yao S, et al. Expression of integrin alpha v beta 6 in rats with ventilator-induced lung injury and the attenuating effect of synthesized peptide S247 [J]. Medical Science Monitor; International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2008, 14 (2):BR41-48.
- [15] 刘清泉, 张伟, 姜良铎. 瘀毒伤络、阻络病机与脓毒症 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8 (17):199-200.
- [16] 吴以岭. 络病学基础与临床研究 (第二辑) [M]. 北京:中国科学技术出版社, 2006.
- [17] 王慧琦, 陈远卓, 李丛烨, 等. 川芎嗪对脓毒症急性肺损伤的保护作用 [J]. 同济大学学报 (医学版), 2014, 35 (5):20-25.

(2015-07-23 收稿 责任编辑:张文婷)