

维生素 c 联合螺旋藻对 LPS 诱导的急性肺损伤的作用

李 雪 黄蒙蒙 江仁义 朱庆林 尹陈晨 王 静^{通讯作者}

(宿州学院生物与食品工程学院 安徽 宿州 234000)

【摘 要】目的: 探讨维生素 c (维 c) 联合螺旋藻 (LXZ) 对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠急性肺损伤 (Acute lung injury, ALI) 的作用。方法: 将 48 只 balb/c 雌性小鼠随机分为空白对照组、LPS 组、阳性药组 (Dex 组, 地塞米松, 2mg/kg)、维 c 组 (30mg/kg)、LXZ 组 (200mg/kg)、维 c (30mg/kg) + LXZ 组 (200mg/kg), 每组 8 只。空白对照组和 LPS 组均灌胃生理盐水, 每日 1 次, 连续灌胃 7 天; 阳性药组灌胃地塞米松, 每日 1 次, 连续 7 天; 维 c、LXZ 组、维 c+LXZ 组灌胃相应药物, 每日 1 次, 连续 7 天。末次给药 1 小时后, 除空白对照组外的其余各组均鼻内滴注 LPS (4mg/kg) 构建急性肺损伤模型。造模 6 小时后, 取肺组织检测湿干重比, 进行 HE 染色; 取血及肺泡灌洗液, 检测肺泡灌洗液中炎症因子含量, 检测肺泡灌洗液中炎症细胞数目, 对小鼠的肺部发生炎症的情况进行评定, 从而得出维生素 C 和螺旋藻对小鼠急性肺损伤的作用。结果: 与空白对照组比较, 模型组 LPS 组小鼠肺组织的湿干重比明显增大、HE 染色切片出现大量炎症细胞浸润、肺泡灌洗液中炎症相关的因子肿瘤坏死因子 (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6 (IL-6) 含量明显上升; 与 LPS 组进行对照, Dex 组、维 c 组、LXZ 组、维 c+LXZ 组, 小鼠肺组织出现的炎症情况均有明显的好转 ($P<0.05$)。结论: 维生素 C 联合螺旋藻对 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤有一定的保护作用。

【关键词】急性肺损伤; 维生素 c; 螺旋藻; 炎症

Effect of vitamin C combined with Spirulina on LPS induced acute lung injury

Xue Li Mengmeng Huang Renyi Jiang Qinglin Zhu Chenchen Yin Jing Wang*

(School of biology and food engineering, Suzhou University, Suzhou, Anhui, 234000)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of vitamin C (vitamin C) combined with Spirulina (lxz) on lipopolysaccharide (LPS) - induced acute lung injury (ALI) in mice. Methods: 48 balb/c female mice were randomly divided into blank control group, LPS group, positive drug group (DEX group, dexamethasone, 2mg/kg), vitamin C group (30mg/kg), lxx group (200mg/kg), vitamin C (30mg/kg) + lxx group (200mg/kg), with 8 mice in each group. The blank control group and LPS group were perfused with normal saline once a day for 7 days; In the positive drug group, dexamethasone was administered by gavage once a day for 7 days; Vitamin C, lxx group and vitamin C + lxx group were given corresponding drugs by gavage once a day for 7 days. One hour after the last administration, all the other groups except the blank control group were intranasal instillation of LPS (4mg/kg) to establish acute lung injury models. Six hours after modeling, the lung tissue was taken to detect the wet to dry weight ratio and stained with HE; Take blood and alveolar lavage fluid, detect the content of inflammatory factors in alveolar lavage fluid, detect the number of inflammatory cells in alveolar lavage fluid, and evaluate the pulmonary inflammation of mice, so as to obtain the effect of vitamin C and spirulina on acute lung injury in mice. Results: compared with the blank control group, the wet to dry weight ratio of lung tissue in LPS group in the model group was significantly increased, a large number of inflammatory cells infiltrated in HE staining sections, and the content of tumor necrosis factor (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) increased significantly; Compared with LPS group, the inflammation of mouse lung tissue in DEX group, vitamin C group, lxx group, vitamin C + lxx group, was significantly improved ($p<0.05$). Conclusion: Vitamin C combined with Spirulina has a protective effect on LPS induced acute lung injury in mice.

[Key words] Acute lung injury; Vitamin C; Spirulina; Inflammation

急性肺损伤 (ALI) 及其进一步发展引起的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是许多呼吸系统疾病的重要病理过程, 其中肺内炎症爆发是导致 ALI/ARDS 发生发展的重要因素之一^[1], 因此, 抑制 ALI/ARDS 早期的过度炎症反应可减轻肺组织损伤。目前, 已有大量关于减轻急性肺损伤药物资料, 但并未找到关于维生素 C 和螺旋藻对于其作用的研究。

维生素 C, 是人体不可缺少的微量元素, 它具备抗氧化的作用、有利于胶原蛋白的合成、以及预防和治疗坏血病和贫血、抗癌等多种增强机体的功能。除了这些功能以外, 维生素 C 还能加速身体内抗体的生成, 提升白细胞的保护能力和对疾病的抵御^[2], 从而增强机体的免疫功能。螺旋藻是近些年新兴的一种纯天然食物, 具有丰富的蛋白质含量, 并且含有大量的维生素和矿物质, 对人体非常有益, 大量研究表明, 螺旋藻可提高人体对疾病的抵抗能力, 能够辅助药物对疾病的治疗, 同时具有预防癌症、抵抗病毒等作用^[3-4], 两者均具有增强免疫、抗病毒、抗炎等功效, 同时螺旋藻对

疾病的治疗具有辅助的作用, 能够增强药物的作用效果, 故将两者进行结合^[5], 探究维生素 C 联合螺旋藻的提高免疫力、抗炎的效果是否能够增强。因此, 本实验以维生素 C 联合螺旋藻来研究两者对于急性肺损伤治疗作用的叠加效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无特定病原体 (SPF 级) 小鼠 48 只购于西普尔-必凯实验动物有限公司, 6 周龄, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 按照实验动物饲养标准饲养一周, 保证小鼠完全适应。

1.1.2 主要药物与试剂

维生素 c 购自华中药业股份有限公司, 螺旋藻购自北京活力达生物健康科技股份有限公司, 地塞米松购自上海上药信谊药厂有限公司, 脂多糖购自上海源叶生物科技股份有限公司, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

试剂盒购自 Elabscience 公司, 苏木素、伊红染色液、瑞氏染色液均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器

电子天平、离心机、显微镜均购于上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验小鼠的饲养

无特定病原体 (SPF 级) Balb/c 小鼠 48 只, 饲养于 12h 明暗循环的清洁级动物房, 可以自由获得食物和水。适应喂养一周后, 随机分为空白对照组 (Control 组)、模型组 (LPS 组)、阳性药地塞米松组 (Dex 组)、维生素 C 组 (维 c 组)、螺旋藻组 (LXZ 组)、混合给药组 (维 c+LXZ 组), 每组 8 只小鼠。

1.2.2 急性肺损伤模型的复制

造模前一周, Control 组和 LPS 组灌胃生理盐水, 每日一次, 灌胃 7d; Dex 组灌胃给予地塞米松 (2mg/kg), 每日一次, 灌胃 7d; 维 c 组灌胃维生素 c, 30mg/kg, 每日一次, 灌胃 7d; LXZ 组灌胃螺旋藻 200mg/kg, 每日一次, 灌胃 7d; 最后 1 次灌胃 1h 后, 除 Control 组外, 其他各组 LPS (4mg/kg) 滴鼻, 操作过程中要保证 LPS 滴入的完全, 以保证急性肺损伤模型复制的准确性。

1.2.3 肺泡灌洗液的采集

采血完毕, 脱臼处死小鼠, 固定在手术板上, 使用手术刀将小鼠咽喉部皮肤打开, 分离出气管, 插入软管, 将 1.5ml 生理盐水分 3 次注入小鼠肺部, 抽出肺泡灌洗液 [6], 4℃ 2000r/min 离心 5min, 收集上清, 用于检测 BALF 中的炎症因子含量, 沉淀用生理盐水重悬, 涂片, 用于 BALF 中性粒细胞和淋巴细胞计数。

1.2.4 肺的湿干重比较

处死的小鼠, 取左肺组织用滤纸吸干水分, 后放在称量纸上, 在电子天平上进行称重, 记录肺组织的湿重。记录完成后, 将肺组织放入 65℃ 干燥箱中干燥至恒重, 记为干重。计算肺组织的湿重和干重之比, 比较肺组织水肿的程度。

1.2.5 肺组织的病理学评估

处死小鼠, 将右肺取出, 置于 4% 的多聚甲醛中, 肺组织病理切片的制作以及 HE 染色严格按照实验标准进行 [7]。根据小鼠的肺组织是否结构完整、是否存在组织水肿、以及炎症细胞浸润情况, 来对不同的组别进行比较, 并对小鼠肺组织的受损情况进行评估 [8]。

1.2.6 炎症因子的含量检测

肺泡灌洗液中炎症因子的含量检测: 将取得的肺泡灌洗液使用酶联免疫吸附的方法 (ELISA), 检测炎症因子的含量, 并对各组数据进行比较;

1.2.7 数据统计方法

实验数据的统计使用 Graphpad Prism 5 软件, 以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 显著性检验先采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 维 c 联合 LXZ 对 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠肺湿 / 干比的影响

从图 1 中可知, 与 Control 组进行比较, LPS 组肺湿 / 干重比明显增大 ($P < 0.01$); 与 LPS 组进行比较, Dex 组肺湿 / 干重比值显著减小 ($P < 0.01$), 维 c 预处理也能明显减小肺湿干重比 ($P < 0.05$), 螺旋藻联合维生素 c 可显著降低

小鼠肺湿干重比 ($P < 0.01$), 肺湿干比是衡量肺水肿程度重要的指标, 以上数据说明维生素 c 联合螺旋藻能减轻 LPS 诱导的肺水肿。

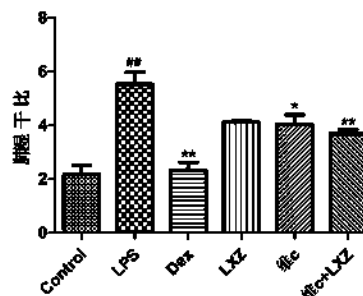


图 1 维 c 联合 LXZ 对 LPS 诱导的小鼠肺湿干比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

与 Control 组相比, $##P < 0.01$; 与 LPS 组相比, $**P < 0.01$, $*P < 0.05$

2.2 维 c+LXZ 对 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠肺组织病理学变化的影响

对各组小鼠肺组织 HE 染色, 结果可见图 2, Control 组肺组织结构清晰, 未出现病理现象; 与 Control 组相比, LPS 组小鼠肺组织已被严重破坏, 组织中出现大量炎症细胞, 并伴随着组织水肿, 肺泡隔增厚; 与 LPS 组相比, 阳性药组有明显的好转迹象, 肺组织结构大致清晰, 仅有少部分炎症细胞浸润出现; 维 c 组、LXZ 组、维 c+LXZ 组病理情况较 LPS 组均有好转, 维 c+LXZ 组减轻炎症效果较维 c 和 LXZ 单独用组明显。

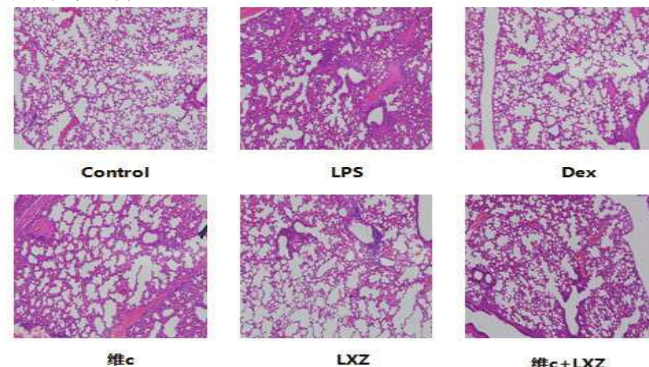


图 2 维 c+LXZ 对肺组织病理形态学的影响

2.3 维 c+LXZ 对小鼠 BALF 中中性粒细胞和淋巴细胞数量的影响

与 Control 组相比, LPS 组小鼠 BALF 中的中性粒细胞和淋巴细胞数量明显上升 ($P < 0.01$), 与 LPS 组相比, Dex 组、维 c 组、LXZ 组、维 c+LXZ 组的中性粒细胞和淋巴细胞数量明显降低 ($P < 0.05$)。

2.4 维 c+LXZ 对小鼠 BALF 中炎症因子含量的影响

如图 4, 与 Control 组相比, LPS 组小鼠 BALF 中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量都明显升高 ($P < 0.01$); 而 Dex 组、维 c 组、LXZ 组以及维 c+LXZ 组的炎症因子含量都显著下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由各种直接或间接因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤, 造成弥漫性肺间质及肺泡水肿, 进而导致急性低氧性呼吸功

能不全。以肺容积减少、肺顺应性降低、通气 / 血流比例失调为病理生理特征,临床上表现为进行性低氧血症和呼吸窘迫。目前已有大量的研究表明螺旋藻和维生素 C 具有增强免疫、抗病毒、抗炎等功效。本实验以 LPS 为诱导物,采用鼻腔滴入的方法建立小鼠急性肺损伤模型,并通过灌胃法给药预处理,操作过程均严格按照实验标准进行,结果可靠。LPS (脂多糖),由脂质和多糖构成,是革兰氏阴性菌细胞外壁的一种化学物质,侵入细胞时会引发机体的炎症反应,当 LPS 作为抗原与细胞表面受体结合时,由于机体的自我保护机制, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的含量将会上升,是模拟急性肺损伤模型的常用试剂。经查阅相关文献,维生素 C 和螺旋藻都具有抗炎、增强免疫的功能,因此本实验以 LPS 作为诱导剂,构建急性肺损伤模型,以维生素 C 和螺旋藻作为治疗药物,来研究维生素 C 和螺旋藻对急性肺损伤小

鼠的保护作用,同时探讨两者的联合应用是否对小鼠急性肺损伤的治疗有叠加效果。根据我们所得到的实验结果, LPS 组中小鼠肺湿干重比升高,肺组织病理学变化, BALF 中的炎症细胞包括中性粒细胞及淋巴细胞数量增加, BALF 中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量增加均说明我们造模成功,而使用维生素 c、螺旋藻预处理均能降低小鼠肺湿干重比,减轻肺组织的病理变化,降低肺泡灌洗液中炎症因子的含量,减少肺泡灌洗液中的炎症细胞数量,说明维生素 c 及螺旋藻对急性肺损伤小鼠有一定的保护作用,而两者的联合应用使这种保护作用进一步加强。

本实验最终结果表明,维生素 C、螺旋藻对于小鼠急性肺损伤的保护均有一定的效果,且维生素 C 联合螺旋藻对小鼠急性肺损伤的作用效果最佳。维生素 C 和螺旋藻对 LPS (脂多糖) 诱导小鼠急性肺损伤的保护具有一定的效果,在研究维生素 C、螺旋藻抗炎和增强免疫中具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 朱爱萍. 白藜芦醇对急性肺损伤中 TREM-1 表达的影响及机制 [D]. 湖南: 湖南师范大学, 2019.
- [2] 孙秀川. 维生素 C 对机体免疫功能的影响 [J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(02): 174-176.
- [3] 何善生, 王力, 李健, 纪乃茹, 苏文金. 螺旋藻研究进展 [J]. 食品工业, 2017, 38(12): 263-268.
- [4] 陈忠伟, 邱洁, 李晓玉, 赵武, 秦毅斌, 卢冰霞, 段群棚, 梁家幸, 李斌, 周英宁, 胡庭俊, 何颖. 螺旋藻抗炎和免疫增强作用的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(07): 2135-2143.
- [5] 余丹. 氨溴索联合地塞米松治疗海水淹溺性肺损伤的实验研究 [D]. 福建: 福建医科大学, 2017.
- [6] 王瑛, 石书梅, 殷悦. 肺感染大鼠肺泡灌洗液及血清中 TNF- α 、IL-6、IL-8 的水平及其临床意义 [J]. 实用医药杂志, 2019, 36(10): 927-929.
- [7] 王玉明. 脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤模型的建立 [J]. 畜牧兽医杂志, 2016, 35(06): 28-31.
- [8] 黄丽密, 石计朋, 余震, 徐丹. 脂肪乳剂对急性肺损伤大鼠肺组织病理形态的影响 [J]. 肠外与肠内营养, 2012, 19(02): 107-110.

【基金项目】安徽省创新训练项目 (S202010379065)

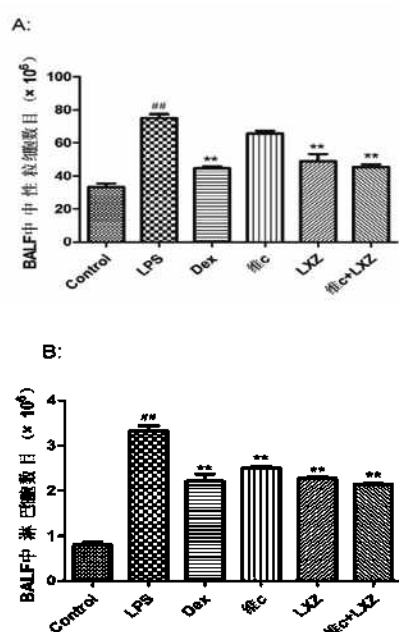


图3 维 c+LXZ 对 BALF 中中性粒细胞和淋巴细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

与 Control 组相比, $^{##}P<0.01$; 与 LPS 组相比, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$

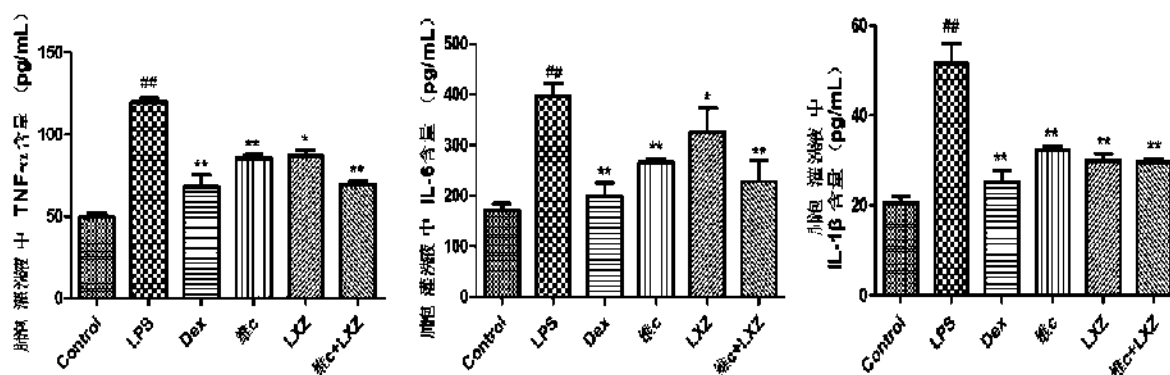


图4 维 c+LXZ 对 BALF 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=5)

与 Control 组相比, $^{##}P<0.01$; 与 LPS 组相比, $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$