

金荞麦中药制剂对 LPS 诱导急性肺部炎症的治疗作用研究

黄双¹ 游佳豪² 陈淑培³ 郭一璇⁴ 曾利⁵ 李弘德^{*}

(长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: 目的: 探索金荞麦中药制剂对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导急性肺炎的治疗作用和初步机制。方法: 将 40 只 SPF 级 6~8 周龄的雌性 BALB/C 小鼠按体重随机分为 5 组, 即正常组、LPS 诱导急性肺炎模型组 (模型组)、金荞麦中药制剂-威麦宁胶囊低剂量治疗组 (100mg/Kg 体重)、中剂量治疗组 (200mg/Kg 体重)、高剂量治疗组 (300mg/Kg 体重), 每组 8 只。对各治疗组小鼠灌胃给药 1 周, 一天一次, 对正常组和模型组小鼠灌胃等容量生理盐水。末次给药 1h 后, 除正常组外其余各组采用鼻吸入法对小鼠施加 100 μ l 的 1g/L LPS 诱导急性肺炎, 建模 6h 后处死小鼠并取材。采用 ELISA 实验检测小鼠支气管肺泡灌洗液和肺组织匀浆中炎症因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平, HE 染色观察肺组织病理学变化, 借助免疫组织化学法检测肺组织 IL-1 β 和 TNF- α 的表达。结果: 与模型组相比, 不同剂量的威麦宁治疗均可改善小鼠肺间质水肿, 减少中性粒细胞等炎症细胞渗出, 减轻肺泡壁增厚程度, 同时降低支气管肺泡灌洗液、肺组织匀浆和肺组织中 IL-1 β 、TNF- α 的水平。其中, 中剂量治疗组对肺组织损伤改善效果最佳, 对炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的抑制作用最明显。结论: 动物实验表明, 金荞麦中药制剂对 LPS 诱导的急性肺炎模型具有显著治疗作用, 其机制可能与抑制肺组织中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平有关。

关键词: 金荞麦; 威麦宁胶囊; 脂多糖; 急性肺炎; 炎症因子

急性肺炎属于临床常见病和多发病, 预后效果差^[1], 病理学主要为肺泡腔出现大量渗出物, 肺泡壁出现增厚及水肿现象, 肺泡间隔毛细血管出现弥漫性扩张等。研究表明, 急性肺炎的发病机制之一是炎症介质的过分表达, TNF- α 和 IL-1 β 是炎症早期释放的因子, 二者协同促进其他炎症因子的表达, 产生“炎症因子风暴”, 促进肺部炎症反应^[2]。LPS 作为革兰氏阴性菌的组成成分, 作用于肺组织时, 诱导肺部炎症细胞反应链, 增强肺部水肿、出血和肺组织损伤。因此 LPS 常作为急性肺炎的诱导剂^[3]。

金荞麦, 根茎味微辛、苦, 具有消痈排脓、清热解暑等功效, 主治肺痈、肺热喘咳等^[4]。现代药理学研究表明, 金荞麦中富含的黄酮类成分在治疗急性肺炎中具有重要作用^[5]。例如, 槲皮素可显著抵消 LPS 诱导的 TNF- α 的释放, 通过影响促炎细胞因子的表达抑制炎性小体^[6]。木犀草素可抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 产生^[7], 对 LPS 诱导的急性炎症反应具有预防作用。EGCG (表没食子儿茶素-3 没食子酸酯) 为一种对抗 COVID-19 高炎症生长的安全天然补充剂, 可降低 LPS 诱导的促炎细胞因子和粘附分子的水平, 对多种炎症介质具有抑制作用^[8]。因此, 我们推测金荞麦根茎提取物可以对治疗急性肺炎发挥重要作用。

威麦宁胶囊的主要成分为金荞麦根茎提取物, 在中医上具有清热解毒、排脓祛瘀的功效, 为治疗肺痈、肺热咳喘之要药^[11]。因此, 本实验选用威麦宁胶囊探讨金荞麦中药制剂对 LPS 诱导急性肺炎的治疗作用和初步机制。

1 材料与仪器

1.1 动物

40 只 SPF 级 6~8 周的雌性 BALB/C 小鼠, 体质量 18~25g, 购自斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号 430727201101154332。动物饲养于长沙医学院动物实验中心, 自由摄食和饮水。适应性喂养 1 周后进行实验, 所有动物实验均严格按照实验动物管理法规的规定和总则建议进行。

1.2 药品及试剂

LPS (北京索莱宝科技有限公司, 批号 L8880); 威麦宁胶囊 (华颐药业有限公司, 批号 200602); 白细胞介素-1 β (IL-1 β) ELISA 试剂盒 (货号 SEKM-0002)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号 SEKM-0034), 均为北京索莱宝科技有限公司产品; HE 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 G1120); 组织固定液 (广州硕谱生物科技有限公司, 货号 BL539A)。

1.3 仪器

分析天平 (梅特勒-托利多 (常州) 测量技术有限公司, 型号 ME204E); 倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司, 型号 Olympus CKX53); 多功能酶标仪 (美国莱伯特公司, 型号 ELX800); 冷冻离心机 (美国莱伯特公司, 型号 C250-R-230V); 石蜡包埋机 (湖北省孝感市亚光医用电子技术有限公司, 型号 YB-7LF); 石蜡切片机 (徕卡显微系统 (上海) 贸易有限公司, 型号 HistoCore MULTICUT)。

2 方法

2.1 分组、给药及急性肺炎小鼠模型建立

将小鼠适应性培养一周后, 按体重随机分成 5 组, 即正常组、LPS 诱导急性肺炎组 (模型组)、威麦宁胶囊低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组, 每组 8 只。对威麦宁胶囊低、中、高剂量治疗组小鼠分别按照 100mg/Kg 体重、200mg/Kg 体重和 300mg/Kg 体重的剂量进行灌胃给药, 对正常组和模型组小鼠灌胃等体积的生理盐水, 每日定时给小鼠灌胃 1 次, 连续灌胃给药 1 周。末次给药 1h 后, 除正常组外, 其余各组小鼠采用鼻吸入法施加 100 μ l 的 1g/L LPS 诱导急性肺炎。

2.2 ELISA 法测定支气管肺泡灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 含量

小鼠麻醉后, 手术分离颈部气管插管, 用 PBS 灌洗肺组织, 灌洗 2 次, 每次静止平衡 30s, 合并灌洗液, 取灌洗液 1.5mL, 3000r/min 离心 5min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书操作, 测定支气管肺泡灌洗液中 IL-1 β 和 TNF- α 的含量。

2.3 H&E 染色检测肺组织病理学特征

实验小鼠麻醉后, 迅速摘取右肺中叶, 用 4% 甲醛固定, 经脱

水、石蜡包埋后制作肺组织石蜡切片，采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色法检测肺泡上皮细胞的损伤以及肺泡壁增厚等组织病理学特征。

2.4 免疫组织化学法检测肺组织炎症因子水平

将各实验组小鼠肺组织石蜡切片依次置于二甲苯、乙醇中脱蜡、水化后进行热抗原修复，用 3%过氧化氢溶液灭活内源性过氧化物酶。滴加 10%羊血清封闭液，室温封闭 30min 之后，滴加 IL-1β 或 TNF-α 抗体，37℃孵育 1-2h，PBS 洗三次 (3min/次)，二抗孵育 30min，再以 PBS 洗三次后滴加 DAB 显色剂，染色 5min，蒸馏水洗涤 3 次，每次 3min。最后，经脱水、透明、封片，于显微镜下观察 IL-1β 和 TNF-α 蛋白在肺组织中的表达水平。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 软件包进行统计学处理，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用单因素方差分析进行组间比较检验，LSD-t 法进行检验后多重比较，P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 金荞麦中药制剂降低 LPS 诱导急性肺炎小鼠支气管肺泡灌洗液中炎症因子水平

相比于正常组，模型组的支气管肺泡灌洗液中 IL-1β、TNF-α 表达显著升高 (P < 0.01)；与模型组相比，金荞麦中药制剂威麦宁治疗可显著降低 IL-1β、TNF-α 的水平，中剂量治疗组降低最为明显 (P < 0.05、0.01)，见图 1。

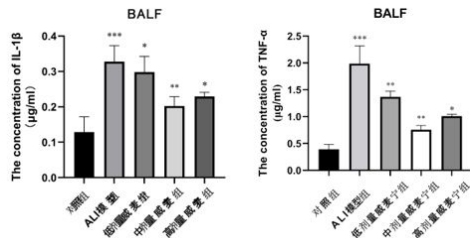


图 1 支气管肺泡灌洗液检测肺组织中 IL-1β、TNF-α 的表达

3.2 金荞麦中药制剂下调急性肺炎小鼠模型肺组织匀浆中炎症因子水平

对比正常组，模型组的肺组织匀浆中 IL-1β、TNF-α 表达显著升高 (P < 0.01)；经过威麦宁治疗，各剂量组的 IL-1β 和 TNF-α 的表达水平均下降，中剂量治疗组降低最为明显 (P < 0.05、0.01)，见图 2。

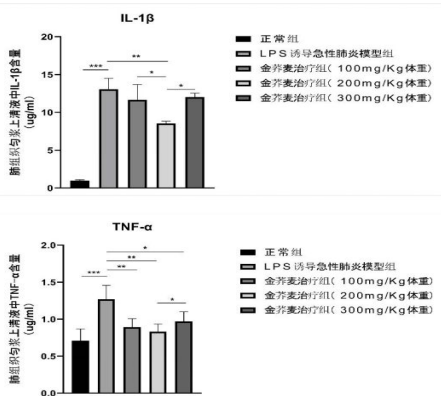


图 2 肺组织匀浆检测肺组织中 IL-1β、TNF-α 的表达

3.3 金荞麦中药制剂改善急性肺炎模型小鼠模型肺组织病理学特点

HE 染色结果显示，正常组小鼠肺泡腔结构清晰，腔内无渗出物、水肿现象，肺间质均匀完整，肺泡壁完好。LPS 诱导构建急性肺炎模型后，小鼠肺部组织病变，肺泡腔结构不清晰，腔内有大量中性粒细胞渗出，肺间质水肿明显，肺泡壁明显增厚。在威麦宁治疗下，各剂量组的肺泡间隔水肿情况明显改善、渗出物减少、无显著充血现象，其中金荞麦中剂量对肺部病变改善效果更佳，见图 3。

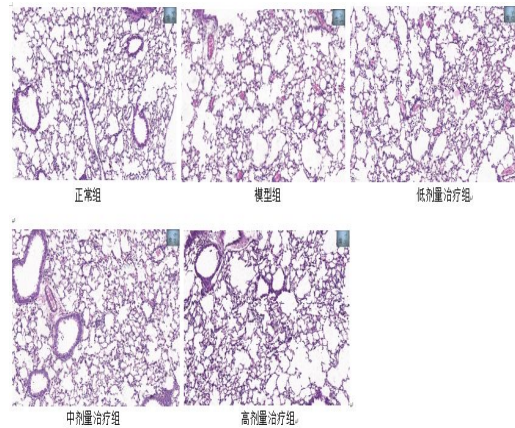


图 3 HE 染色检测肺组织中 IL-1β、TNF-α 的表达

3.4 金荞麦中药制剂抑制急性肺炎模型小鼠的肺组织中 IL-1β 表达

IHC 实验结果显示，LPS 诱导小鼠急性肺炎后，肺组织中炎症因子 IL-1β 表达水平明显提高，经过威麦宁治疗后，IL-1β 在肺组织中的表达明显下降，当剂量为 200mg/Kg 体重时，对炎症因子 IL-1β 表达抑制能力最强，见图 4。

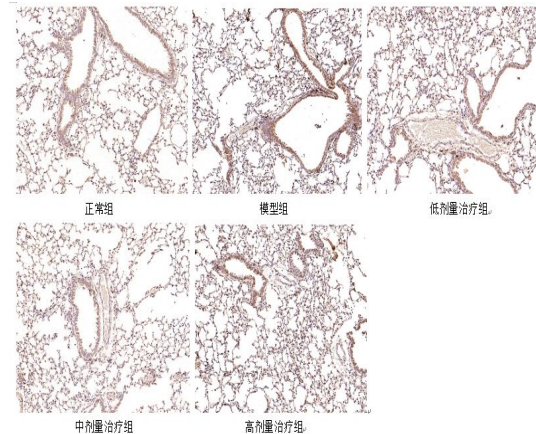


图 4 免疫组织化学 (IHC) 检测肺组织中 IL-1β 的表达 (200 ×)

3.5 金荞麦中药制剂抑制急性肺炎模型小鼠的肺组织中 TNF-α 表达

IHC 实验结果显示，LPS 诱导小鼠急性肺炎后，肺组织中炎症因子 TNF-α 表达水平明显提高，经过威麦宁治疗后，TNF-α 在肺组织中的表达明显下降，当剂量为 200mg/Kg 体重时，对炎症因子 TNF-α 表达抑制能力最强，见图 5。

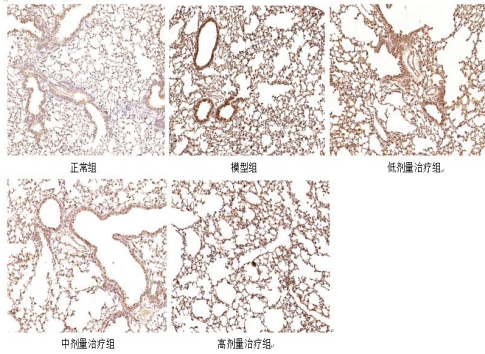


图 5 免疫组织化学 (IHC) 检测肺组织中 TNF- α 的表达 (200 \times)

4 讨论

急性肺炎是一种不可控的炎症反应引起的肺部功能障碍综合征,其产生与内毒素的炎症刺激密切相关^[10]。TNF- α 作为激活巨噬细胞分泌的一种调节因子,在炎症反应的启动中发挥关键作用。IL-1 β 可调节免疫应答、细胞代谢等,是一种较重要的促炎活性因子^[11]。脂多糖 (LPS) 来源于革兰氏阴性细菌,通过诱导 TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子表达,产生强烈的炎症反应,导致肺泡结构改变,严重损伤肺组织^[12]。因此 LPS 常用于构建肺炎动物模型。

廖科植物金荞麦,具有抗炎止痛、抗癌抗肿瘤、抗氧化等作用。其根茎部分富含的黄酮类成分在治疗疾病中发挥积极作用。研究表明,槲皮素可减少 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子的释放,抑制肺泡壁增厚、浸润现象。木犀草素可下调炎症因子产生信号,抑制肺泡充血现象,减轻肺水肿。EGCG 可显著降低促炎细胞因子的表达水平,减少渗出物浸润,改善肺损伤现象。

本实验采用鼻吸入法施加 100 μ l 的 1g/L LPS 诱导急性肺炎模型,结果显示模型组小鼠肺部组织发生严重病变,肺泡腔内部结构不清晰,肺间质水肿明显,肺泡壁明显增厚,肺部组织损伤。金荞麦中药制剂治疗后,小鼠肺组织损伤改善,肺间质水肿和肺泡壁增厚程度减轻,肺泡腔内结构恢复正常。

综上所述,金荞麦作为中国传统中医药,其所含的黄酮类成分在抑制炎症因子释放、治疗急性肺炎中发挥重要作用。一方面,槲皮素、木犀草素、EGCG 等有效成分抑制 IL-1 β 、TNF- α 炎症因子释放,预防炎症反应;另一方面,槲皮素、木犀草素、EGCG 等有效成分抑制炎症细胞浸润,减少肺泡壁增厚,减轻肺泡充血现象,显著改善肺组织损伤,治愈肺部炎症反应。

参考文献:

- [1]赵博,段广靖,屈新亮,卫培峰,王斌,李敏.黄芩茎叶-桑白皮配伍对脂多糖致急性肺炎大鼠 TRPV1 信号蛋白的影响[J].中中药学,2022,20(01):14-20.
- [2]张鹏,张宇晨,王润智.秦皮甙对幼鼠肺炎链球菌肺炎的改善作用及机制[J].广州中医药大学学报,2022,39(04):892-898.
- [3]唐思璇,肖芳.脂多糖诱导肺炎动物模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2020,28(06):864-869.

[4]严晶,袁嘉嘉,刘丽娜,尚文斌,孙志广.金荞麦药理作用及临床应用研究进展[J].山东中医杂志,2017,36(07):621-624.DOI:10.16295/j.cnki.0257-358x.2017.07.026.

[5]钟灵允,赵钢,赵江林.荞麦黄酮及其生物合成调控研究进展[J].广西植物,2021,41(06):1021-1034.

[6]Saeedi Boroujeni Ali,Mahmoudian Sani Mohammad Reza. Anti-inflammatory potential of Quercetin in COVID-19 treatment[J]. Journal of Inflammation,2021,18(1).

[7]Fan Shengnuo,Habib Ahsan,Liu Jun,Tan Jun. LED enhances anti-inflammatory effect of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) in vitro.[J] American journal of translational research,2018,10(1).

[8]Li Zhi Hui,Shi Zhanli,Tang Shengjie,Yao Hang Ping,Lin Xihua,Wu Fang. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates LPS-induced inflammation by inhibiting the phosphorylation of Akt and ERK signaling molecules in rat H9c2 cells.[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2020, 20(2).

[9]沈羽嘉,卞兆连,邵建国.金荞麦片对 DSS 诱导炎症模型小鼠炎症因子水平的影响[J].中医学报,2019,34(09):1916-1920.DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2019.09.448.

[10]Mei - Rong Shan,Sheng - Nan Zhou,Chang - Ning Fu,Jia - Wen Song,Xue - Qing Wang,Wen - Wu Bai,Peng Li,Ping Song,Mo - Li Zhu,Zhi - Min Ma,Zhan Liu,Jian Xu,Bo Dong,Chao Liu,Tao Guo,Cheng Zhang ,Shuang - Xi Wang. Vitamin B6 inhibits macrophage activation to prevent lipopolysaccharide - induced acute pneumonia in mice[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine,2020,24(5).

[11]陈永宏,余海燕,向江琳,陈瑞华,肖江峰,谢婷,田冰.奥司他韦对成人急性重症病毒性肺炎患者 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及免疫功能的影响[J].内蒙古医科大学学报,2020,42(03):307-310.DOI:10.16343/j.cnki.issn.2095-512x.2020.03.023.

[12]Lu Meng,Longyun Li,Shan Lu,Kai Li,Zhenbo Su,Yunyun Wang,Xiaodi Fan,Xuyang Li,Guoqing Zhao. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B and PI3K/Akt/mTOR pathways[J]. Molecular Immunology,2018,94.

第一作者:黄双,2002年9月,女,汉族,湖南醴陵,本科,中药学。

通讯作者:李弘德,男,汉族,医学博士,功能核酸基础与临床湖南省高校重点实验室,医学检验学院,长沙医学院。

基金项目:长沙医学院大学生创新创业训练计划项目,长医教〔2021〕47号-133;长沙医学院ESI学科建设专项课题重点项目,2022CY005;长沙市自然科学基金,kq2202312;湖南省教育厅科学研究优秀青年项目,22B0897。