

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.14.010

原儿茶酸对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用*

李 君¹ 赵铭山^{1△} 张秀丽² 李 岩¹ 韩 冰¹

(1 滨州医学院附属医院 山东 滨州 256603; 2 滨州医学院 山东 烟台 264003)

摘要 目的:探索原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)小鼠的保护作用,探讨其保护机制。**方法:**将40只昆明小鼠按随机数字表法均分为空白对照组(NC组)、LPS模型组、原儿茶酸预处理组(PCA+LPS组)、地塞米松阳性对照组(Dex+LPS组),每组10只,模型组以5mg·kg⁻¹脂多糖腹腔内注射诱导急性肺损伤。6h后处死小鼠,HE染色观察肺组织病理学变化;BCA法检测肺泡灌洗液中总蛋白浓度;ELISA检测肺泡灌洗液炎症因子TNF-α、IL-1β含量;Western Blot检测肺组织中p38MAPK、p-p38MAPK、p-ATF2蛋白的表达水平。**结果:**与对照组相比,模型组小鼠肺损伤明显,肺泡内出血、水肿、炎细胞浸润,肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β的含量及总蛋白浓度增加,肺组织中p38MAPK/p-p38MAPK、p-ATF2表达均明显增加(均P<0.01)。与模型组相比,原儿茶酸预处理组、地塞米松阳性对照组肺组织病理损伤程度明显减轻,肺泡灌洗液中TNF-α、IL-1β的含量及总蛋白浓度、肺组织中p38MAPK/p-p38MAPK、p-ATF2表达均明显降低(均P<0.01)。**结论:**PCA对LPS诱导的急性肺损伤有保护作用,其作用机制可能与其抑制p38MAPK-p-ATF2信号通路的活化、降低肺组织炎症反应有关。

关键词:急性肺损伤;原儿茶酸;p38MAPK; p-ATF2

中图分类号: Q95-3, R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)14-2646-04

Protective Effects of Protocatechuic Acid on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice*

LI Jun¹, ZHAO Ming-shan^{1△}, ZHANG Xiu-li², LI Yan¹, HAN Bing¹

(1 Affiliated Hospital to Binzhou Medical University, Shandong, Binzhou, 256603, China;

2 Binzhou Medical University, Shandong, Yantai, 264003, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the protective effect of PCA on lung tissues during ALI in mice caused of by LPS and its possible mechanism. **Methods:** Forty Kunming mice were randomly divided into four groups: normal control group, LPS group, PCA pretreatment group (PCA+LPS group), dexamethasone positive control group (Dex+LPS group) with ten mice in each group. ALI was induced by intraperitoneal injection of 5mg·kg⁻¹ LPS. Mice were sacrificed at 6 hours, the lungs were harvested for observation of pathological changes. The total protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid were observed by BCA method and the levels of TNF-α and IL-1β in serum of BALF were tested by ELISA. The expression of p38MAPK, p-p38MAPK, p-ATF2 in lung tissue activation were detected by Western Blotting. **Results:** Compared with the control group, in the model group, there were significant lung structural damage, the histological results showed pulmonary alveolar hemorrhage, edema and inflammatory cell infiltration; the expression of TNF-α, IL-1β and the total protein concentration in BALF and the expression of p38MAPK/p-p38MAPK, p-ATF2 in lung tissue were significantly increased, (all P<0.01). Compared with the modal group, the lung histological changes were much more ameliorated, and the expression of TNF-α, IL-1β and the total protein concentration in BALF and the expression of p38MAPK/p-p38MAPK, p-ATF2 in lung tissue were markedly suppressed in PCA pretreatment group and dexamethasone positive control group (all P<0.01). **Conclusion:** PCA has remarkable protective effect on ALI induced by LPS in mice, its mechanism is possibly related to the inhibition p38MAPK-p-ATF2 activation and reduction of inflammatory response in the lung tissue.

Key words: ALI; PCA; p38MAPK; p-ATF2

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)14-2646-04

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81102828;81273037);山东省自然科学基金(Y2007C162)

作者简介:李君,女,在读研究生,主要研究方向:急性肺损伤发病机制的研究,

电话:18306492668, E-mail:lijunbzm@126.com

△ 通讯作者:赵铭山, E-mail:tozhaoms@163.com

(收稿日期:2013-11-20 接受日期:2013-12-13)

前言

ALI 及其更严重的形式急性呼吸窘迫(acute respiratory distress syndrome, ARDS),是在严重感染、休克、创伤及烧伤等非心源性疾病过程中,肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,导致的急性低氧性呼吸功能不全或衰竭,其病理学改变为肺容积减少、肺顺应性降低、严重的通气/血流比例失调,临床表现为进行性低氧血症和呼吸窘迫,肺部影像学表现为非均一性的渗出性病变^[1],ALI/ARDS 机制复杂未明,病死率可高达 50%^[2]。

研究表明,促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是介导细胞内重要的信号传导通路。其中 p38MAPK 信号通路是 MAPK 介导炎症反应的主要通路,与炎症、细胞生长、细胞分化、细胞凋亡有关^[3],在 ALI 中发挥重要作用^[4],其磷酸化后通过作用于下游底物实现信号转导,诱导多种细胞因子的表达,从而介导炎症反应。PCA 具有广泛的药理学作用如抗氧化、抗炎、抗凋亡及抗肿瘤作用^[5-9]。但其作用与 p38MAPK 信号通路是否相关国内外鲜有报道。本实验通过腹腔注射 LPS 的方法建立小鼠急性肺损伤模型,观察 PCA 对 LPS 致急性肺损伤的保护作用,有望为 ALI 的临床治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

清洁级昆明种小鼠,雌雄各半,体重(18-20)g,购自烟台绿叶制药有限公司,动物合格证号:鲁动质字 200106003。LPS 购自美国 sigma 公司;原儿茶酸购于南京替斯艾中中药研究所;地塞米松购自济南利民制药有限公司;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β) ELISA 检测试剂盒购自上海朗顿生物科技有限公司;兔抗鼠多克隆抗体 p38MAPK、p-p38MAPK、p-ATF2 及 α -tublin 购于巴傲得生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体由北京康为世纪生物科技有限公司提供;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及模型建立 小鼠分笼饲养于(24 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C、相对湿度为 40-80%的室内,自由进食进水,12 h 光照,适应 2-3d 后进行实验。将小鼠随机分成空白对照组、LPS 模型组、PCA 干预组、地塞米松阳性对照组,每组 10 只。造模前 1h, PCA+LPS 组、Dex+LPS 组分别腹腔注射原儿茶酸 30 mg $\cdot$ kg⁻¹、地塞米松 1 mg $\cdot$ kg⁻¹ 各 0.1 mL。除正常对照组外,其它各组小鼠腹腔注射 LPS 5 mg $\cdot$ kg⁻¹ 0.1 mL,正常对照组腹腔注射等体积生理盐水,造模 6h 后处死小鼠。

1.2.2 标本的制备和处理 支气管肺泡灌洗液(BALF):麻醉动物打开胸腔,暴露肺组织并观察其大体外观改变,迅速分离肺组织,结扎右主支气管及气管,在气管结扎下端经气管行左肺肺泡灌洗,用 0.5 mL 高压灭菌的 PBS 缓冲液缓慢冲洗肺组织 3 次,回收 BALF,回收率约 80%,置于离心管中,于 4 $^{\circ}$ C 3000 r $\cdot$ min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存备用。肺组织:取下右肺组织分离右肺上叶并置于 4%多聚甲醛固

定,余右肺组织迅速置于液氮中冻存。

1.2.3 肺组织病理形态观察 取小鼠部分右肺上叶组织用 4%多聚甲醛固定 72 h 后,常规制备石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察病理学改变。

1.2.4 细胞因子的检测 按照 ELISA 试剂盒说明,检测 BALF 上清中 TNF- α 、IL-1 β 的表达,终止反应后用酶标仪测 450 nm 处光密度值,并将其与标准曲线比较以确定其浓度。

1.2.5 蛋白浓度测定 采用 BCA 试剂盒检测 BALF 中蛋白浓度。

1.2.6 Western Blot 检测 取出液氮中冻存的肺组织,称取不同组肺组织,加入细胞裂解液后在冰上匀浆 30 min 后,4 $^{\circ}$ C 14000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min,分装上清储存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中,并依照 BCA 试剂盒要求进行蛋白浓度测定。每组取 50 μ L 样品加上样缓冲液后 95 $^{\circ}$ C 煮 5 min 使蛋白变性,而后进行 10% SDS-PAGE,分离蛋白,并将其转移到 PVDF 膜上,经 TBST 洗膜后,用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入 p38MAPK、p-p38MAPK、 α -tublin 多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下于脱色摇床上反应 1h,经 TBST 洗膜后加入 ECL 发光液反应, X 光片显影、定影。胶片扫描后用相应软件分析光密度值,对结果进行分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS15.0 软件进行统计学分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCA 对小鼠肺组织病理学的影响

光镜下正常对照组小鼠肺泡结构基本正常,肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡间隔无增厚;模型组肺泡结构破坏严重,肺泡萎陷、肺泡间隔增厚、炎细胞浸润;PCA 干预组组织损伤程度比 LPS 组显著减轻,肺间质和肺泡腔内渗出物及炎细胞浸润较 LPS 组明显减少;阳性对照组也可见组织损伤较 LPS 组减轻,大部分肺泡结构清晰,肺泡间隔略增厚。(见图 1)。

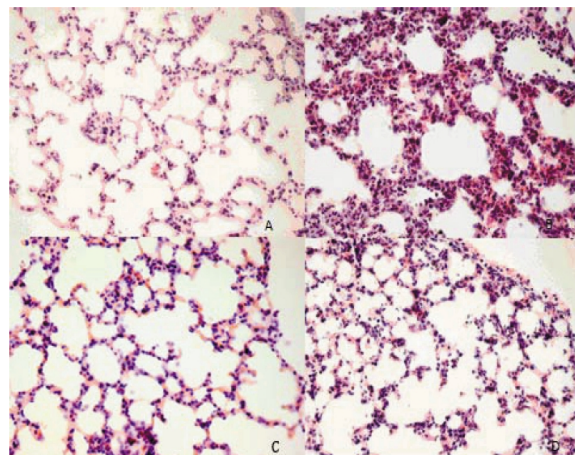


图 1 各组小鼠给药 6h 后光镜下肺组织形态学改变(HE, $\times 400$)

Fig.1 Light micrographs changes of lung tissues structure in mice 6h after agent administration (HE staining, $\times 400$)

A:NC 组; B:LPS 组; C:PCA+LPS 组 D: Dex+LPS 组

A:Control group; B:LPS group; C:PCA+LPS group D: Dex+LPS group

2.2 PCA 对 LPS 所致 ALI 小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 的影响

与正常对照组相比,模型组小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 含量明显增高($P<0.05$);PCA 干预组小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β

含量与模型组相比出现明显下降($P<0.01$);阳性对照组也表现出相同的作用效果,BALF 中 TNF- α 显著减少($P<0.01$),BALF 中 IL-1 β 亦减少($P<0.05$)。(见表 1)

表 1 PCA 对 LPS 所致 ALI 小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 的影响($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=10$)

Table 1 Effect of Protocatechuic Acid on TNF- α , IL-1 β production in BALF in LPS-Induced ALI Mice($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, $n=10$)

Group	TNF- α	IL-1 β
Normal Control	246.96 $\pm$ 22.54	51.31 $\pm$ 5.85
LPS	283.04 $\pm$ 14 [#]	60.60 $\pm$ 2.74 [#]
PCA+LPS	249.72 $\pm$ 18.09 [*]	56.05 $\pm$ 1.25 [*]
Dex+LPS	247.40 $\pm$ 13.67 ^{**}	55.35 $\pm$ 0.37 [*]

注:与正常对照组相比: # $P<0.05$;与 LPS 组相比: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

Note: # $P<0.05$ as compared to normal group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ as compared to model group.

2.3 PCA 对小鼠 BALF 中蛋白浓度的影响

与正常组相比,模型组小鼠 BALF 中蛋白浓度含量水平明显增高($P<0.01$),PCA 干预后小鼠 BALF 中蛋白浓度含量与模

型组相比出现明显下降($P<0.01$)。阳性药物地塞米松组也表现出相同的作用效果,BALF 中蛋白浓度含量明显低于模型组($P<0.05$)。(见表 2)。

表 2 PCA 对 LPS 所致 ALI 小鼠 BALF 中蛋白浓度的影响($\text{ug}\cdot\text{uL}^{-1}$, $n=10$)

Table 2 Effect of Protocatechuic Acid on protein concentration production in BALF in LPS-Induced ALI Mice($\text{ug}\cdot\text{uL}^{-1}$, $n=10$)

Group	Normal Control	LPS	PCA+LPS	Dex+LPS
Protein concentration	0.365 $\pm$ 0.125	0.991 $\pm$ 0.231 ^{##}	0.381 $\pm$ 0.124 ^{**}	0.414 $\pm$ 0.211 [*]

注:与正常对照组相比: ## $P<0.01$;与 LPS 组相比: ** $P<0.01$ 。

Note: ## $P<0.01$ as compared to normal group; ** $P<0.01$ as compared to model group.

2.4 PCA 对小鼠肺组织 p38MAPK、p-p38MAPK、p-ATF2 表达的影响

模型组小鼠肺组织 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ATF2 蛋白的表达强度较对照组显著增高 ($P<0.01$);PCA 干预组

p-p38MAPK/p38MAPK、p-ATF2 蛋白表达量较 LPS 模型组显著降低($P<0.01$)。阳性药物地塞米松组也表现出类似的作用效果,肺组织中 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ATF2 含量明显低于模型组($P<0.01$)。(见图 2 及图 3)。

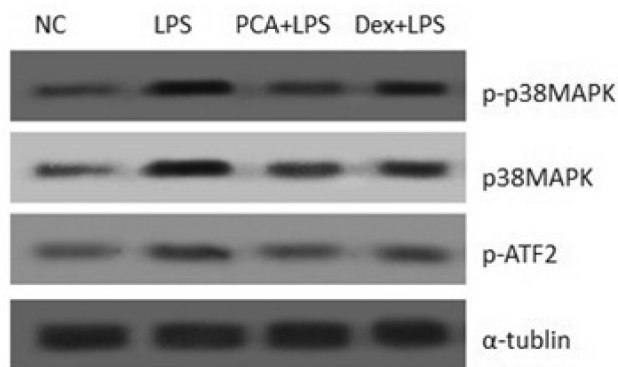


图 2 PCA 对小鼠肺组织中 p38MAPK、p-p38MAPK、p-ATF2 表达的影响

Fig.2 Effect of Protocatechuic Acid on P38MAPK, p-P38MAPK, p-ATF2 expression in lung tissue in LPS-Induced ALI Mice

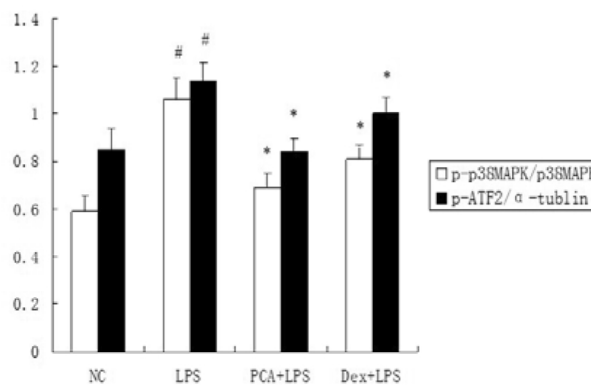


图 3 PCA 对小鼠肺组织中 p38MAPK/p-p38MAPK、p-ATF2 表达的影响(% , $n=10$)

Fig.3 Effect of Protocatechuic Acid on P38MAPK/p-P38MAPK, p-ATF2 expression in lung tissue in LPS-Induced ALI Mice(% , $n=10$)

3 讨论

原儿茶酸,3,4-二羟基苯甲酸,为苯甲酸的主要衍生物,存在于许多食品及中药材中,药理学作用广泛,对炎症反应有一定防治作用。LPS 是 Toll 样受体(TLR)信号途径的配基能特异性地与内皮细胞膜上的 TLR4 结合^[10],可诱导多种炎症因子及趋化因子的合成与释放,如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6,在 ALI 中发挥

重要作用^[11]。TNF- α 、IL-1 β 不仅可以扩大炎症级联反应,并且可以引起炎症时中性粒细胞向肺组织的募集^[12],特别是 TNF- α 在 ALI 的发生及演化中占据重要作用。在本研究中我们发现 PCA 可以降低 LPS 处理后 BALF 中增加的 TNF- α 、IL-1 β ,并可减轻肺部病理学损伤,而 PCA 有可能是通过减少炎症因子的分泌来改善肺损伤的。为了进一步研究 PCA 对 ALI 的抗炎机制我们对相关信号通路进行深入研究。

MAPK 是近年来成为引人注目的蛋白激酶级联通路^[13-15]。MAPK 家族包括 3 个亚家族:ERK-1/2、JNK 及 p38MAPK^[16]。已有很多报道证明 MAPKs 在 ALI 中发挥重要作用^[17-18]。LPS 通过与血循环中 LPS 结合蛋白并与单核细胞表面 CD14 分子结合,经 p38MAPK 磷酸化三级激酶传递过程从而启动胞内信号转导系统,使单核细胞表达、合成和释放 TNF- α 、IL-1 β 等多种炎症细胞因子^[19]。已有研究表明 p38MAPK 在急、慢性炎症的细胞应激反应中具有重要作用,是参与应激过程中多种基因表达的重要介质^[20],静息状态下 p38MAPK 主要分布于细胞质中,激活后可进入细胞核磷酸化其下游的转录因子(ATF2、HSP-27、AP-1)而使其活化,从而调节相关效应基因的表达调节多种生物学反应。p38MAPK 主要通过作用于活化转录因子-2(ATF-2),使其磷酸化,从而介导炎症因子 TNF- α 、IL- β 的产生。我们在本实验中,发现 LPS 诱导后肺组织中 p-p38MAPK/p38MAPK、p-ATF2 表达增多,提示 p38MAPK-p-ATF2 通路可能在 LPS 诱导的肺损伤中发挥重要作用。同时观察 PCA 干预后,肺组织中 p38MAPK/p38MAPK、p-ATF2 表达水平较 LPS 组明显减轻,且肺组织损伤减轻,揭示了 PCA 的治疗机制可能通过抑制 p38MAPK-p-ATF2 信号转导途径的过度活化有关,从而对肺脏起保护作用。至于 PCA 通过何种途径抑制 p38MAPK-p-ATF2 的活化尚待进一步探讨。

总之,通过对 LPS 所致小鼠 ALI 及其 PCA 对其保护作用机制的研究,证实 ALI 时增加的炎症因子及 p38MAPK-p-ATF2 途径的过度活化,是导致 ALI 的重要因素。PCA 对 ALI 小鼠的保护作用,其作用机制可能与其抑制 p38MAPK-p-ATF2 信号通路的活化、降低肺组织炎症反应有关。

参考文献(References)

- [1] 中华医学会重症医学分会,急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006)[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(12):706-710
Chinese Medical Association of Critical Care Medicine Branch, diagnosis and treatment guidelines of acute lung injury / acute respiratory distress syndrome (2006)[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2006, 18(12):706-710
- [2] Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. N Engl J Med, 2005, 353(16):1685-1693
- [3] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. Physiol Rev, 2001, 81(2):807-869
- [4] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function[J]. Cell Signal, 2000, 12(1):1-13
- [5] Lin WL, Hsieh YJ, Chou FP, et al. Hibiscusprotocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage [J]. Arch Toxicol, 2003, 77(1):42-47
- [6] Liu WH, Hsu CC, Yin MC. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of diallylsulphides and protocatechuic acid[J]. Phytother Res, 2008, 22(1):53-57
- [7] Yan JJ, Jung JS, Hong YJ, et al. Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(12):2024-2027
- [8] Justyna Szumilo. Protocatechuic acid in cancer prevention[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2005, 59:608-615
- [9] Zhang L, Cheng YX, Liu AL, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-influenza properties of components from Chaenomeles speciosa [J]. Molecules, 2010, 15(11):8507-8517
- [10] Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene [J]. Science, 1998, 282(5396):2085
- [11] 白静慧,丁环,蒋雷,等.槲皮素对脓毒症急性肺损伤大鼠肿瘤坏死因子- α /白细胞介素-1 β 的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(5):293-295
Bai Jing-hui, Ding Huan, Jiang Lei, et al. The infection of Quercetin on tumor necrosis factor- α / IL-1 β in sepsis related acute lung injury rats[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2011, 18(5):293-295
- [12] Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(4):319-327
- [13] Han HJ, Li M, Son JK, et al. Sauchinone, a lignan from Saururus chinensis, attenuates neutrophil pro-inflammatory activity and acute lung injury[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(2):471-477
- [14] Zhong WT, Jiang LX, Wei JY, et al. Protective effect of esculetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. J Surg Res, 2013, 185(1):364-372
- [15] Chen J, Wang JB, Yu CH, et al. Total flavonoids of Mosla scabra leaves attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via down-regulation of inflammatory signaling in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(3):835-841
- [16] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600):1911-1912
- [17] Kim HJ, Lee HS, Chong YH, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappaB activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages [J]. Toxicology, 2006, 225(1):36-47
- [18] Schuh K, Pahl A. Inhibition of the MAP kinase ERK protects from lipopolysaccharide-induced lung injury[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(12):1827-1834
- [19] 毛岸荣,黄河,方国恩等. p38 丝裂原活化蛋白激酶磷酸化对多器官功能障碍综合征肿瘤坏死因子- α 基因表达调控的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(9):518-520
Mao An-rong, Huang He, Fang Guo-en, et al. The effects of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation on tumor necrosis factor- α gene expression of multiple organ dysfunction syndrome[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2009, 21(9):518-520
- [20] 董宇杰,丁春华,谷玮玮,等. 褪黑素抑制大鼠急性肺损伤时磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶的表达 [J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22(7):418-421
Dong Yu-jie, Ding Chun-hua, Gu Wei-wei, et al. The Inhibition of Melatonin on the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase of acute lung injury in rats[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2010, 22(7):418-421