

龙胆苦苷抗急性肺损伤活性研究*

张丽^{1,2}, 王永艳¹, 王应霞³, 尹健彬¹, 成梦群¹, 张旋^{1**}

(1. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南昆明 650500;

2. 昆明医科大学学报编辑部, 云南昆明 650500;

3. 昆明医科大学第一附属医院病理科, 云南昆明 650032)

摘要:【目的】在脂多糖(LPS)致小鼠急性肺损伤(ALI)模型上评价龙胆苦苷抗急性肺损伤的活性。【方法】健康雄性成年 SPF 级昆明小鼠 40 只, 随机分为 4 组: 假手术组、ALI 模型组(气管滴入脂多糖 LPS 5 mg/kg)、阳性药物对照组(腹腔注射氢化可的松 3.3 mg/kg, 每日 1 次, 连续 3 d, 24 h 后气管滴入 LPS 5 mg/kg)、龙胆苦苷组(腹腔注射龙胆苦苷 20 mg/kg, 每日 1 次, 连续 3 d, 24 h 后气管滴入 LPS 5 mg/kg)。在气管滴入 LPS 后 24 h 处死动物, 检测肺系数、支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞计数和肺组织病理变化。【结果】阳性药物对照组和龙胆苦苷组小鼠肺系数明显低于 ALI 模型组($P<0.05$), 阳性药物对照组和龙胆苦苷组比较差异无统计学意义。ALI 模型组小鼠 BALF 中炎症细胞及中性粒细胞比例明显高于假手术组($P<0.01$), 阳性药物对照组和龙胆苦苷组明显低于 ALI 模型组($P<0.01$), 阳性药物对照组明显低于龙胆苦苷组($P<0.05$)。假手术组小鼠肺组织结构基本完整, 肺泡腔内无渗出物和炎细胞, ALI 模型组肺泡上皮细胞大量增生, 肺泡壁增厚, 肺间质、肺泡腔内可见大量炎细胞浸润, 部分肺间质发生实变, 阳性药物对照组和龙胆苦苷组肺组织炎症病理明显减轻。【结论】龙胆苦苷能够明显减轻脂多糖致 ALI 小鼠肺组织炎症反应程度, 具有较好的抗急性肺损伤活性。

关键词: 龙胆苦苷; 急性肺损伤; 炎症; 病理

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2018)03-0450-06

Anti-acute Lung Injury Activity of Gentiopicroside

ZHANG Li^{1,2}, WANG Yongyan¹, WANG Yingxia³, YIN Jianbin¹,

CHENG Mengqun¹, ZHANG Xuan¹

(1. School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products,

Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Editorial Department of Journal of Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

3. Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the anti-acute lung injury (ALI) activity of gentiopicroside on lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI mice model. [Methods] Forty healthy male adult SPF Kunming mice were randomly divided into 4 groups: sham group, ALI model group (intratracheal instillation of 5 mg/kg of LPS), positive drug control group (intraperitoneal injection of 3.3 mg/kg of hydro-

收稿日期: 2017-06-19

修回日期: 2017-06-29

网络出版时间: 2018-05-23

*基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81460565); 云南省应用基础研究面上项目(2014FB152); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目(2015HB042)。

作者简介: 张丽(1980—), 女, 云南永胜人, 硕士, 编辑, 主要从事天然药物活性研究和论文编辑工作。

E-mail: 310601872@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 张旋(1979—), 男, 山西运城人, 博士, 副教授, 主要从事天然药物抗炎与免疫药理研究。E-mail: snoopykm@126.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201706020](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201706020)

cortisone, once daily for 3 days, and intratracheal instillation of 5 mg/kg of LPS 24 hours later) and gentiopicroside group (intraperitoneal injection of 20 mg/kg of gentiopicroside, once daily for 3 days, and intratracheal instillation of 5 mg/kg of LPS 24 hours later). The mice in each group were sacrificed 24 h after intratracheal instillation of LPS. The lung coefficients, the ratio of inflammatory cells in bronchoalveolar lavage (BAL) and the pathological changes were tested. [**Results**] The mice's lung coefficients of the positive drug group and gentiopicroside group were significantly lower than that of the ALI model group ($P<0.05$), there was no significant difference between the positive drug group and gentiopicroside group. The percentage of inflammatory cells in BALF and the percentage of neutrophils in inflammatory cells of the ALI model group were significantly lower than those of the sham group ($P<0.01$), those of the positive drug group and gentiopicroside group was significantly lower than the ALI model group ($P<0.01$), the positive drug group was significantly lower than the gentiopicroside group ($P<0.05$). The structure of lungs from mice in the sham group was normal and no inflammatory cells in alveolar spaces, the ALI model group showed proliferation of alveolar epithelial cells, alveolar wall thickening, lymphocyte and neutrophil infiltration in the alveolar space, and consolidation of partial lung, the inflammatory pathological changes of lung tissues in the positive drug group and gentiopicroside group was significantly ameliorated. [**Conclusion**] Gentiopicroside injection can significantly ameliorate the inflammatory reaction degree in mice with acute lung injury induced by LPS, and shows good anti-ALI activity.

Keywords: gentiopicroside; acute lung injury; inflammation; pathology

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是一种由肺内外的各种因素 (机械因素、化学因素、生物因素) 引起的临床常见危重病症。ALI 的主要病理特征为肺内失控性炎症反应如大量中性粒细胞浸润、肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤和弥漫性肺间质及肺泡水肿, 临床表现为进行性呼吸困难和顽固性低氧血症^[1-2]。ALI 起病急, 进展迅速, 可快速进展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS), 患者预后差, 死亡率高, 目前临床治疗效果不理想^[3-4]。因此研发安全性高、疗效好的抗 ALI 药物非常必要。

龙胆苦苷 (gentiopicroside) 是龙胆属植物龙胆和秦艽的主要活性成分之一, 属于裂环环烯醚萜苷类化合物。现代药理研究发现: 龙胆苦苷具有多种药理作用, 如抗炎镇痛、保肝利胆、健胃、抗肿瘤、清除自由基、治疗胰腺炎等^[5-6], 但目前龙胆苦苷对肺疾病的治疗研究报道较少。研究发现: 以龙胆苦苷为主要有效成分的苦胆草片能够减轻博来霉素诱导的肺纤维化程度^[7], 且龙胆苦苷对盲肠结扎穿孔造成的脓毒症引起的急性肺损伤具有保护作用^[8], 故笔者推测: 龙胆苦苷对细菌细胞壁成分脂多糖诱导的急性肺损伤也具有防

治作用。因此, 本研究在脂多糖诱导的小鼠模型上评价龙胆苦苷抗急性肺损伤的活性, 为龙胆苦苷防治急性肺损伤提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物和主要试剂

健康雄性 SPF 级昆明小鼠购自昆明医科大学实验动物学部。龙胆苦苷标准品 (20 mg) 购自上海金穗生物有限公司, 脂多糖 (LPS O111: B4) 购自 Sigma 公司; 戊巴比妥钠购自 Merk 公司; 氢化可的松注射液 (2 mL : 10 mg) 购自百正药业股份有限公司。

1.2 动物分组与处理

健康雄性 SPF 级昆明小鼠 40 只, 体重 (20.0±2.0) g, 随机分为 4 组, 每组 10 只。假手术组: 仅切开颈部皮肤, 暴露气管。ALI 模型组: 一次性气管滴入 LPS 溶液 (5 mg/kg)。阳性药物对照组: 腹腔注射氢化可的松注射液 (3.3 mg/kg), 每日给药 1 次, 连续给药 3 d, 24 h 后气管滴入 LPS 溶液 (5 mg/kg)。龙胆苦苷组: 腹腔注射龙胆苦苷溶液 (20 mg/kg, 溶于生理盐水), 每日给药 1 次, 连续给药 3 d, 24 h 后气管滴入 LPS 溶液 (5 mg/kg)。

在气管滴入 LPS 后 24 h 处死各组小鼠, 取出肺组织或行支气管肺泡灌洗, 称取肺重量, 进行细胞学和组织病理学等检查。

1.3 支气管肺泡灌洗液细胞学检查

每组选取 4 只小鼠, 脱臼法处死后即刻行支气管肺泡灌洗, 将小鼠仰卧位固定于固定板上, 切开颈部皮肤, 分离软组织, 暴露气管, 气管上剪 1 个倒 T 字形切口, 用自制灌洗器 (10 mL 注射器将针头部分磨平套上塑料管, 塑料管远离注射器的一头剪成斜线状, 然后连接 1 mL 注射器) 吸取 1 mL 生理盐水, 小心将塑料管前段伸入气管中, 将生理盐水缓慢注射进肺部, 轻轻按摩胸壁, 保留约 1 min 后, 回抽灌洗液并转移至离心管中, 重复灌洗 2 次, 每次回收率均大于 80%, 将收集到的肺泡灌洗液进行离心 5 min, 2 500 r/min, 吸出上清液进行冻存, 将细胞沉淀部分进行细胞涂片、95% 乙醇固定 20 min 后行 HE 染色, 显微镜下进行细胞计数, 并计算炎症细胞在其中的比例和中性粒细胞在炎症细胞中的比例。

1.4 肺系数和肺组织病理检测

各组剩余 6 只小鼠进行称重, 记录体重, 随后脱臼法处死, 取仰卧位固定于固定板上, 尽快打开胸腔及腹腔, 取出全肺, 将其余组织器官从

肺上剥离后做好标记, 采用微量分析天平称取小鼠湿肺重量。计算肺系数 (肺系数=肺湿重/体重 $\times$ 100%), 评价肺水肿程度。随后将肺组织固定于 10% 中性甲醛, 24 h 后, 常规进行石蜡包埋、切片, HE 染色后显微镜下观察肺组织病理形态变化。

1.5 统计学方法

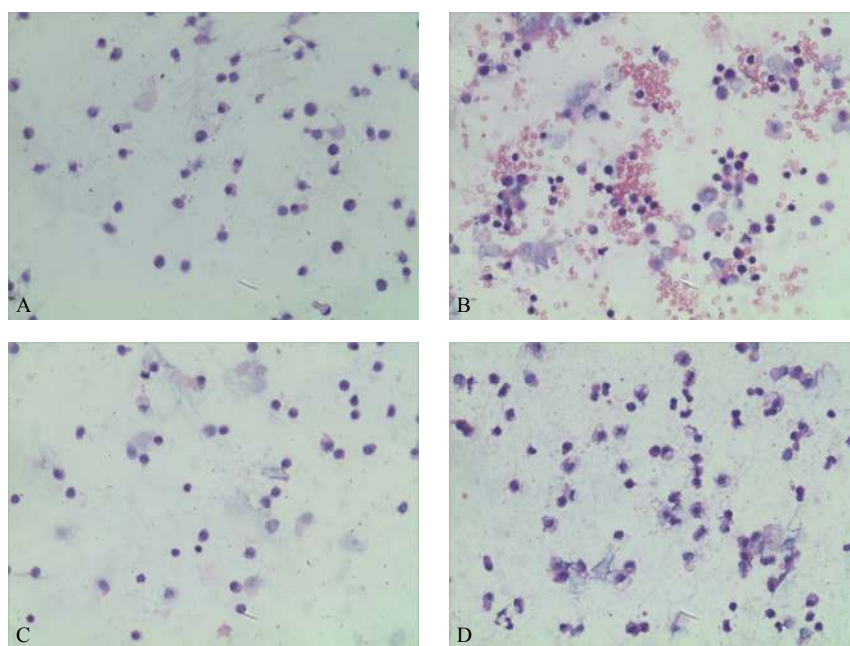
数据用“均数 $\pm$ 标准差”表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步每两组间比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 支气管肺泡灌洗液细胞学

由图 1 可知: 假手术组小鼠 BALF 中细胞数量较少, 主要为脱落的肺泡上皮细胞, ALI 模型组小鼠 BALF 中细胞数量较多, 有大量炎症细胞和红细胞, 阳性药物对照组和龙胆苦苷组小鼠 BALF 中炎症细胞数量明显减少, 未见红细胞。

由图 2 可知: ALI 模型组小鼠 BALF 中炎症细胞及中性粒细胞比例均明显高于假手术组 ($P < 0.01$); 与 ALI 模型组比较, 阳性药物对照组小鼠 BALF 中炎症细胞及中性粒细胞比例明显降低



注: A. 假手术组; B. ALI 模型组; C. 阳性药物对照组; D. 龙胆苦苷组。

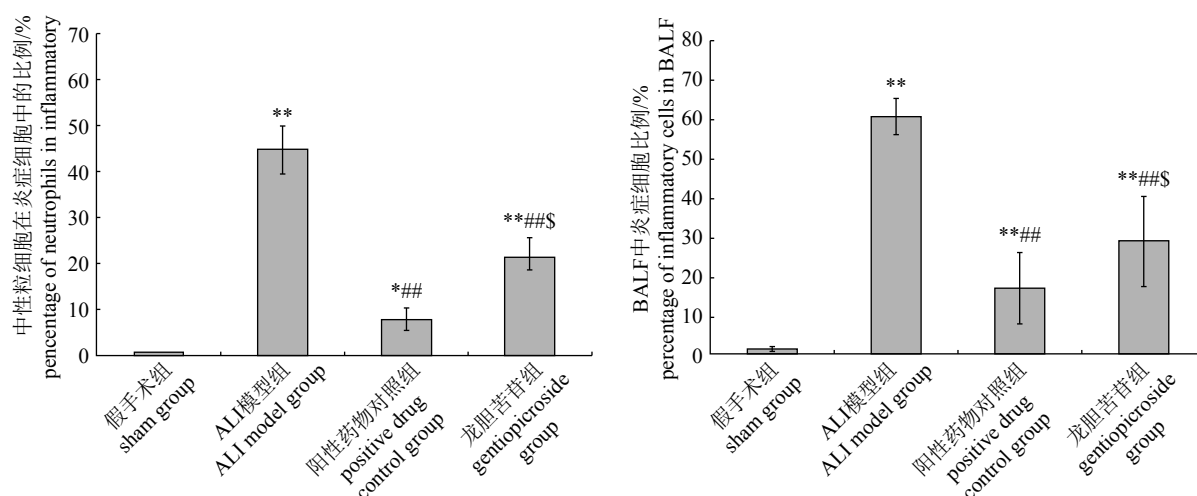
Note: A. sham group; B. ALI model group; C. positive drug control group; D. gentiopicroside group.

图 1 各组小鼠支气管肺泡灌洗液细胞学涂片 (HE 染色, 200 $\times$)

Fig. 1 The cell smear of BALF of mice in each group (HE staining, 200 $\times$)

($P<0.01$),但仍高于假手术组($P<0.01$);龙胆苦苷组小鼠BALF中炎症细胞及中性粒细胞比例明显低于ALI模型组($P<0.01$),但仍然高于假手术组($P<0.01$)和阳性药物对照组($P<0.05$)。结果表明:

20 mg/kg 龙胆苦苷腹腔注射可明显降低LPS致小鼠BALF中炎症细胞及中性粒细胞比例,减轻肺部炎症反应,有一定的抗急性肺损伤活性,但龙胆苦苷抗急性肺损伤活性不及阳性药物氢化可的松。



注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与ALI模型组比较,## $P<0.01$;与阳性药物对照组比较,\$ $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham group, ** $P<0.01$; compared with ALI model group, ## $P<0.01$; compared with positive drug control group, \$ $P<0.05$.

图2 支气管肺泡灌洗液中炎症细胞及中性粒细胞在炎症细胞中的比例

Fig. 2 The ratio of inflammatory cells in BALF and ratio of neutrophils in inflammatory cells

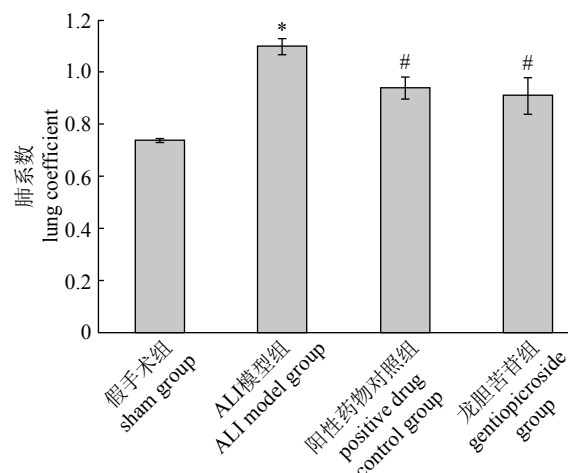
2.2 肺系数与肺组织病理

由图3可知:ALI模型组小鼠肺系数明显高于假手术组($P<0.01$);与ALI模型组比较,阳性药物对照组和龙胆苦苷组小鼠肺系数明显降低($P<0.05$),但仍高于假手术组;龙胆苦苷组和阳性药物对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

由图4可知:假手术组小鼠肺组织结构正常,肺泡壁薄,肺间质和肺泡腔几乎无炎症细胞浸润;ALI模型组小鼠肺泡上皮细胞大量增生,弥漫性肺泡间隔增厚,肺泡腔缩小,部分肺泡塌陷,肺组织有炎症细胞浸润,有局灶性肺组织实变;阳性药物对照组和龙胆苦苷组小鼠肺泡上皮增生,局部肺泡间隔增厚,肺泡腔和肺间质有少量炎症细胞浸润,与ALI模型组比较,炎性病理改变明显减轻。结果表明:阳性药物氢化可的松和龙胆苦苷均能减轻肺损伤时肺水肿程度和肺组织炎症反应程度,具有抗急性肺损伤的作用。

3 讨论

急性肺损伤(ALI)是以急性发作的进行性呼吸衰竭为特征的一种临床常见危急重症,可迅速



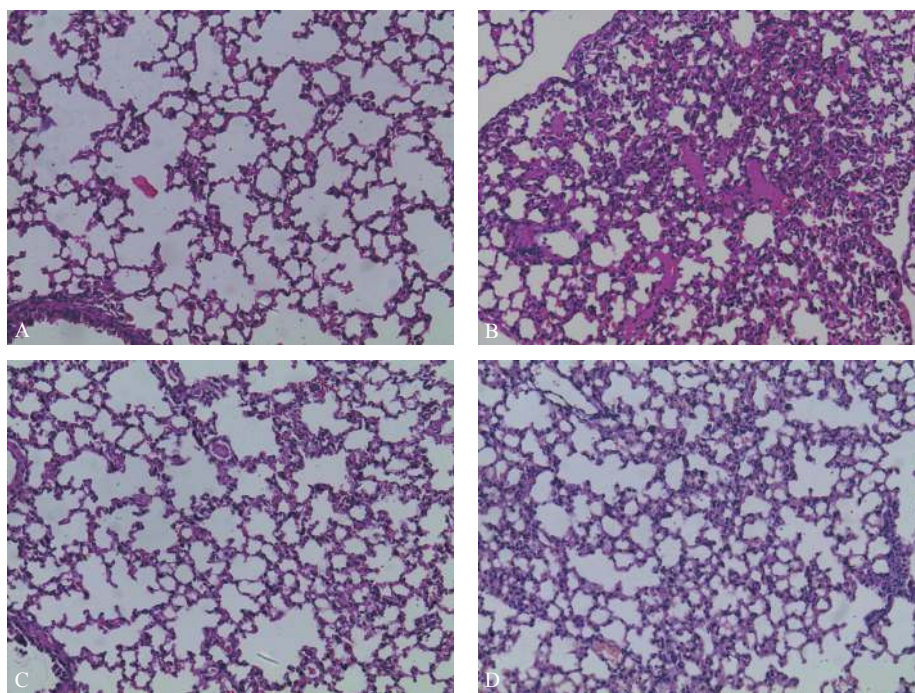
注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与ALI模型组比较,# $P<0.05$ 。

Note: Compared with sham group, * $P<0.05$; compared with ALI model group, # $P<0.05$.

图3 不同组小鼠肺系数比较

Fig. 3 Comparison of the lung coefficients of mice between different groups

进展为急性呼吸窘迫综合征,死亡率很高。目前对ALI发病机制和药物研究主要是建立在动物模型上^[9]。急性肺损伤的发病原因有多种,因此,急性肺损伤的动物模型也有多种,如机械创伤型、



注：A.假手术组；B.ALI 模型组；C.阳性药物对照组；D.龙胆苦苷组。

Note: A. sham group; B. ALI model group; C. positive drug control group; D. gentiopicroside group.

图 4 各组小鼠肺组织病理变化 (HE 染色, 100×)

Fig. 4 The pathological changes of lungs of mice in each group (HE staining, 100×)

盐酸吸入型、输血相关型、脂肪栓塞型、机械通气型、盲肠结扎型、缺血再灌注型、内毒素(脂多糖)型等^[9-11]。临床最常见的急性肺损伤是严重感染导致的肺损伤,而感染导致肺损伤的原因主要是革兰阴性菌,其细胞壁的主要成分为内毒素即脂多糖(LPS)。LPS可损伤肺微血管内皮细胞,诱导中性粒细胞活化聚集、导致呼吸爆发,释放多种炎症细胞因子和大量氧自由基,从而诱发急性肺损伤的发生^[12-13]。因此,本研究采用气管内滴入LPS方法建立小鼠急性肺损伤模型,并在此动物模型上评价龙胆苦苷的抗急性肺损伤活性。

组织病理检查是判断疾病动物模型成功建立的金标准。本研究发现:ALI模型组小鼠肺组织表现出典型的炎症性损伤变化,包括肺泡上皮细胞大量增生,弥漫性肺泡间隔增厚,肺泡腔缩小,部分肺泡塌陷,炎症细胞浸润,局灶性肺组织实变,表明ALI模型成功建立;龙胆苦苷和阳性药物氢化可的松都可以明显减轻ALI小鼠肺组织炎症病理改变。氢化可的松是糖皮质激素类抗炎药物,龙胆苦苷也具有抗炎作用,因此本研究发现符合预期结果,表明龙胆苦苷和氢化可的松都具有抗急性肺损伤的作用。

急性肺损伤时,肺微血管内皮细胞损伤,血管通透性增大,表现肺水肿,肺泡上皮细胞也会发生损伤,导致气血屏障破坏,肺组织炎症细胞特别是中性粒细胞大量浸润,并扩散至肺泡腔内,因此,肺泡灌洗液中会出现炎症细胞和中性粒细胞增多^[14-15]。因此,本研究选择可间接反映肺水肿的肺系数和反映炎症反应的支气管肺泡灌洗液中炎症细胞与中性粒细胞比例作为指标,评价龙胆苦苷的抗急性肺损伤活性。结果发现:阳性药物氢化可的松和龙胆苦苷均能明显降低ALI小鼠肺系数($P<0.05$),但二者比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明二者可减轻ALI时肺水肿程度;ALI模型组小鼠BALF中细胞数量较多,有大量炎症细胞和红细胞,阳性药物氢化可的松和龙胆苦苷均能明显减少ALI小鼠BALF中炎症细胞和中性粒细胞的比例,但阳性药物氢化可的松作用更明显。结果表明:阳性药物氢化可的松和龙胆苦苷均能抑制ALI小鼠肺内炎症反应,但龙胆苦苷效果不及氢化可的松。

综上所述,龙胆苦苷可明显减轻脂多糖致急性肺损伤小鼠肺组织炎症反应程度,具有一定的抗急性肺损伤作用,本研究可为呼吸系统危急重

症-急性肺损伤的防治提供新的候选药物,为龙胆苦苷防治急性肺损伤提供一定的理论和试验依据。但本研究仅仅采用了单剂量龙胆苦苷,进一步的剂量-效应关系以及抗急性肺损伤的作用机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] DUSHIANTHAN A, GROCOTT M P W, POSTLE A D, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury[J]. *Postgraduate Medical Journal*, 2011, 87(1031): 612. DOI: [10.1136/pgmj.2011.118398](https://doi.org/10.1136/pgmj.2011.118398).
- [2] SWEENEY R M, GRIFFITHS M, MCAULEY D. Treatment of acute lung injury: current and emerging pharmacological therapies[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 34(4): 487. DOI: [10.1055/s-0033-1351119](https://doi.org/10.1055/s-0033-1351119).
- [3] ORTIZ-DIAZ E, FESTIC E, GAJIC O, et al. Emerging pharmacological therapies for prevention and early treatment of acute lung injury[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 34(4): 448. DOI: [10.1055/s-0033-1351118](https://doi.org/10.1055/s-0033-1351118).
- [4] XIONG B, WANG C B, TAN J, et al. Statins for the prevention and treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Respirology*, 2016, 21(6): 1026. DOI: [10.1111/resp.12820](https://doi.org/10.1111/resp.12820).
- [5] 匡海学, 吴高松, 刘华, 等. 龙胆苦苷和龙胆碱的生物转化和药理活性研究进展[J]. *天津中医药*, 2016, 33(7): 385. DOI: [10.11656/j.issn.1672-1519.2016.07.01](https://doi.org/10.11656/j.issn.1672-1519.2016.07.01).
- [6] 郭清峰, 王玮, 韩文清. 龙胆苦苷的药理作用进展[J]. *广东化工*, 2014, 41(17): 121. DOI: [10.3969/j.issn.1007-1865.2014.17.064](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-1865.2014.17.064).
- [7] 王应霞, 张丽, 张旋, 等. 苦胆草对博来霉素致大鼠肺纤维化的防治作用[J]. *昆明医科大学学报*, 2016, 37(5): 38. DOI: [10.3969/j.issn.1003-4706.2016.05.009](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-4706.2016.05.009).
- [8] 陈露露, 徐关丽, 袁红梅, 等. 龙胆苦苷对脓毒症所致急性肺损伤小鼠的保护作用[J]. *第三军医大学学报*, 2012, 34(23): 2392.
- [9] 李竹英, 王雪慧, 刘建秋. 急性肺损伤动物模型研究进展[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(11): 1817. DOI: [10.3969/j.issn.1004-745X.2011.11.051](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-745X.2011.11.051).
- [10] 胡媛, 陈唯韞, 黄宇光. 输血相关急性肺损伤动物模型研究进展[J]. *中国输血杂志*, 2016, 29(11): 1296.
- [11] 曹志敏, 唐明美, 文强, 等. 内毒素所致急性肺损伤动物模型的研究进展[J]. *实验动物科学*, 2017, 34(1): 62. DOI: [10.3969/j.issn.1006-6179.2017.01.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-6179.2017.01.014).
- [12] SOROMOU LW, CHEN N, JIANG L X, et al. Astragal-in attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by downregulating NF- κ B signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 419(2): 256. DOI: [10.1016/j.bbrc.2012.02.005](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.02.005).
- [13] 吴海青, 李涛平, 徐健, 等. 脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的机制研究[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(19): 3648.
- [14] FU J J, WANG Y T, ZHANG J X, et al. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of oxysophoridine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *American Journal of Translational Research*, 2015, 7(12): 2672.
- [15] ZHANG Z P, LUO Z W, BI A J, et al. Compound edaravone alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 811: 1. DOI: [10.1016/j.ejphar.2017.05.047](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.047).

责任编辑: 何馨成