

水飞蓟素对急性肺损伤小鼠肺组织 IL-1 β 、IL-6、趋化因子 fractalkine 表达的影响

张晓鸣¹, 顾绍庆²

(¹江苏大学附属医院儿科, 江苏 镇江 212000; ²江苏大学附属人民医院儿科, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的:探讨水飞蓟素(silymarin, SIL)对急性肺损伤小鼠肺组织中白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、趋化因子 fractalkine 表达的影响与意义。方法:利用内毒素(lipopolysaccharide, LPS)气管内滴入制备小鼠急性肺损伤的模型;设立 SIL 治疗组(S 组)、LPS 组(L 组)、生理盐水对照组(N 组),S 组在气管内滴入 LPS 前 6、4、2 h 以 200 mg/kg 水飞蓟素灌胃,分别在 LPS 处理后 6、12、24 h 取肺组织匀浆,用 ELISA 法分别测定各组 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白水平。结果:在各时间点,S 组肺组织中 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白表达水平均显著低于 L 组。结论:SIL 能有效抑制小鼠急性肺损伤时肺组织中 IL-1 β 、IL-6、趋化因子 fractalkine 的表达。

[关键词] 水飞蓟素;急性肺损伤;白介素-1 β ;白介素-6;fractalkine

[中图分类号] R563

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1083-04

The effects of silymarin on IL-1 β , IL-6, fractalkine gene expression in lung tissue rats with acute lung injury

ZHANG Xiao-ming¹, GU Shao-qing²

(¹Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000; ²Department of Pediatrics, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of silymarin (SIL) on the expressions of IL-1 β , IL-6, and fractalkine in lung tissue of rat with acute lung injury. **Methods:** A rat model of acute lung injury (ALI) was induced by lipopolysaccharide (LPS). All rats were randomly divided into SIL group, LPS group and normal saline control group. SIL (200 mg/kg) was dropped into airway of rats in SIL group 6, 4, and 2 h before treated with LPS. After LPS was given for 6, 12 and 24 h, IL-1 β , IL-6, chemotatic factor fractalkine protein levels in lung tissue homogenate were detected by ELISA. **Results:** At all time point, IL-1 β , IL-6, fractalkine protein levels of SIL group were all significantly lower than those in LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** SIL could significantly inhibit the expression of IL-1 β , IL-6, fractalkine in lung tissue of rat with acute lung injury.

[Key words] silymarin; acute lung injury; IL-1 β ; IL-6; fractalkine

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1083-1086]

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是临床的急重症之一。其机制复杂,涉及到多种炎性细胞活化、炎性介质过度释放、氧化应激、蛋白酶与抗蛋白酶及氧化和抗氧化系统之间的相互作用等^[1-3]。水飞蓟素(silymarin, SIL)具有广泛的药理作用,其机制有抗氧化、抗脂质过氧化、抗纤维化、细胞膜稳定作用、降血脂、保护心肌的作用^[4-5]。白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、趋化因子 fractalkine 是在炎症反应中起重要作用的促炎性细胞因子,对淋巴细胞的活化、定向迁移趋化有很强的诱导作用。本实验探讨了

SIL 对急性肺损伤小鼠肺组织中促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 fractalkine 表达的影响与意义。

1 材料和方法

1.1 材料

选用 ICR 小鼠 45 只,由江苏大学实验动物中心提供,随机分为生理盐水对照组(N 组, $n = 15$),内毒素(LPS)组(L 组, $n = 15$),SIL 治疗组(S 组, $n = 15$)。LPS 购自美国 Sigma 公司。小鼠 IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒由上海依科赛生物制品有限公司提

供,fractalkine ELISA 试剂盒购自深圳晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备与标本采集

L组、S组在小鼠气管内滴注 LPS(10 mg/kg,溶于 100 μ l 生理盐水)制备 ALI 动物模型,N组仅滴入生理盐水 100 μ l。在气管内滴入 LPS 前 6、4、2 h S组以 200 mg/kg 水飞蓟素灌胃。N组、L组则分别以等体积生理盐水灌胃,在滴注 LPS 或生理盐水 6、12、24 h 后,打开各组小鼠胸腔取肺组织 100 μ g,分别加 0.01 mol/L PBS 1 ml(pH7.4),冰浴下匀浆 30 s,超速离心机 4 $^{\circ}$ C离心 15 min,取上清液,-70 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2 指标测定及方法

取上清液测定 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白含量,测定方法严格按 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.3 统计学方法

采用 SPSS.13 统计软件进行。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法(q 检验), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况

L组、S组小鼠经气管滴注 LPS 后,均出现呼吸急促,口唇发绀,精神萎靡,少动少食,以 L组各时相点明显,而 S组表现相对较轻。在实验所设的各时相点所有动物均存活。

2.2 各组小鼠肺组织中 IL-1 β 水平

S组肺组织中 IL-1 β 水平在各时间点均低于 L组,差异有统计学意义($P < 0.05$);L组肺组织中 IL-1 β 水平在各时间点均高于 N组,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

表 1 各组患者肺组织中 IL-1 β 水平

Table 1 IL-1 β levels of three groups

(pg/ml, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
N 组	867.4 \pm 93.6	889.6 \pm 102.3	947.0 \pm 127.8
L 组	1 359.8 \pm 1 22.2 ^A	1 761.4 \pm 1634.2 ^A	2 459.6 \pm 158.2 ^A
S 组	1 196.2 \pm 94.4 [*]	1 573.4 \pm 73.5 [*]	2 113.0 \pm 116.4 [*]

与 N 组比较, ^A $P < 0.01$; 与 L 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 各组小鼠肺组织中 IL-6 水平

S组肺组织中 IL-6 水平在各时间点均显著低于 L组,差异有统计学意义($P < 0.05$);L组肺组织中 IL-6 水平在各时间点均高于 N组,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 2)。

2.4 各组小鼠肺组织中 fractalkine 水平

S组肺组织中 fractalkine 蛋白水平在各时间点均显著低于 L组,差异有统计学意义($P < 0.05$);L组肺组织中 fractalkine 蛋白水平在各时间点均高于 N组,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 3)。

表 2 各组患者肺组织中 IL-6 水平

Table 2 IL-6 levels of three groups

(pg/ml, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
N 组	416.0 \pm 63.1	441.8 \pm 61.1	483.2 \pm 105.3
L 组	643.4 \pm 63.1 ^A	812.4 \pm 72.7 ^A	1 397.8 \pm 131.8 ^A
S 组	531.4 \pm 77.8 [*]	690.8 \pm 82.7 [*]	1 040.4 \pm 160.7 [*]

与 N 组比较, ^A $P < 0.01$; 与 L 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

表 3 各组患者肺组织中 fractalkine 蛋白水平

Table 3 Fractalkine protein levels of three groups

(pg/ml, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h
N 组	1 082.2 \pm 102.2	1 127.0 \pm 186.7	1 141.0 \pm 236.7
L 组	2 524.6 \pm 174.3 ^A	3 310.8 \pm 168.4 ^A	3 780.6 \pm 268.5 ^A
S 组	1 908.4 \pm 219.4 [*]	2 821.2 \pm 174.5 [*]	3 366.2 \pm 267.9 [*]

与 N 组比较, ^A $P < 0.01$; 与 L 组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨论

ALI 是严重损伤引起机体全身炎症反应综合征的不同发展阶段之一,临床表现为急性进行性加重的呼吸困难和难治性低氧血症,进一步发展可演变为急性呼吸窘迫综合征。本实验参照文献[6]动物模型制备方法,采用小鼠气管内滴注 LPS 建立 ALI 模型。经气管滴注 LPS 后,实验动物均出现呼吸急促,口唇发绀,精神萎靡,少动少食,肺组织中 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白表达均较对照组显著增加,表明 ALI 造模成功。

研究表明^[7-8],促炎性细胞因子和趋化因子是白细胞募集和游走的主要调节蛋白。促炎性细胞因子主要有肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、IL-1、IL-6、IL-8 等,趋化因子目前已知的已达 50 多种,它们与炎症的发生、发展关系密切。促炎性细胞因子及炎症化学趋化因子的异常升高又可以导致广泛的组织损伤。IL-1 β 是一种在炎症反应中起重要作用的促炎性细胞因子^[9],可以与 TNF- α 一起共同启动炎症反应,可由多种细胞类型产生,如单核细胞、巨噬细胞等。IL-1 β 的作用主要表现在以下几个方面:①诱导巨噬细胞产生多种趋化因子如单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、IL-8 等。趋化单核巨噬细胞和中性粒细胞(PMN)到达炎症局部,在局部释放溶酶

体酶和产生多种促炎性细胞因子。②激活中性粒细胞,使其细胞表面表达蛋白分化抗原 CD11/CD12 水平增高。通过其上述作用,从而促进 PMN 的聚集、黏附,释放炎性介质破坏结缔组织,使内皮细胞完整性破坏,导致水和大分子成分外渗,形成肺水肿。IL-6 又名 B 细胞刺激因子,由单核细胞、内皮细胞和成纤维细胞等多种细胞产生。在 LPS 介导的 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中,IL-6 可被 LPS 直接或经前炎性因子 TNF- α 、IL-1 刺激上述细胞大量产生。IL-6 不但可以促进细胞间黏附分子 1 的表达,还可以促进淋巴细胞的分化和炎性激活,使炎性损伤反应进一步加强^[10]。根据趋化因子肽链 N 端高度保守的半胱氨酸残基的数目和相对位置的差异,可将趋化因子分为 CXC、CC、C 和 CX3C 四个亚族。其中 CX3C 亚族仅发现 fractalkine 一种趋化因子。它是 1997 年才发现的唯一的膜结合型趋化因子,大多数 fractalkine 表达在活化的内皮细胞表面,既有趋化作用又有黏附功能,参与白细胞向炎症组织的游走^[11]。本文推测促炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及炎症化学趋化因子 fractalkine 在急性肺损伤的炎性反应中发挥重要作用。

本研究利用 LPS 制备小鼠急性肺损伤的动物模型,结果发现 LPS 处理后肺组织中 IL-1 β 、IL-6 和 fractalkine 蛋白表达显著增加。这表明 IL-1 β 、IL-6 和 fractalkine 参与了小鼠急性肺损伤的发病过程。本研究还显示 IL-1 β 、IL-6 和 fractalkine 表达呈时间依赖性增加,24 h 左右达高峰,与文献报告一致^[12]。

本实验发现水飞蓟素能够显著抑制 LPS 诱导的肺组织中 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白表达水平。资料表明^[13],ALI 发生机制复杂,涉及到 PMN 活化、炎症因子过度分泌、肺组织中蛋白酶与抗蛋白酶失衡、体内氧化和抗氧化系统失衡等多个方面,其中的蛋白酶与抗蛋白酶的失衡在 ALI 的发病机制中占据重要地位。作为重要炎性损伤因子的中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)是 PMN 内容酶体释放的主要蛋白水解酶。NE 具有很大的破坏性,不仅对细胞外基质具有水解活性,其本身又可以诱发上皮细胞释放炎症细胞因子、IL-1、IL-8 等,激活更多的 PMN 发生趋化、迁移并导致肺组织损伤,于是 NE 的这些多重级联放大网络效应形成恶性循环,因此 NE 被认为是 ALI 级联反应的主要终效应因子。水飞蓟素是从水飞蓟的种子中提取的一类生物活性成分。其作为一种草本药物用于治疗各种原因引起的肝病已有多年的历史,对前列腺癌、皮肤癌、膀胱癌、肺癌和结肠癌

等亦具有抑制作用。此外,也具有抗炎和抗氧化活性作用^[14-15]。Hale 等^[16]的研究显示水飞蓟素通过抗炎作用对内毒素诱导的急性肺损伤和急性脑损伤有保护作用。王占海等^[17]的研究提示:水飞蓟素对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤具有拮抗作用,其机制是通过抑制氧自由基的产生和抑制脂质过氧化反应以及抑制肺组织中的 TNF- α 、IL-1 β 及 MCP-1 而发挥作用。本实验表明,水飞蓟素抑制了肺损伤时肺组织中 IL-1 β 、IL-6、fractalkine 蛋白表达,减弱了炎症过度反应,从而对肺组织产生保护作用。

[参考文献]

- [1] Zhang X,Huang H,Yang TT,et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Injury*,2010,41(7):746-752
- [2] Ahn CM,Sandler H,Saldeen T. Decreased lung hyaluronan in a model of ARDS in the rat:effect of an inhibitor of leukocyte elastase[J]. *Ups J Med Sci*,2012,117(1):1-9
- [3] Zhang B,Liu ZY,Li YY,et al. Antiinflammatory effects of matrine in LPS-induced acute lung injury in mice[J]. *Eur J Pharm Sci*,2011,44(5):573-579
- [4] Colturato CP,Constantin RP,Maeda AS Jr,et al. Metabolic effects of silibinin in the rat liver [J]. *Chem Biol Interact*,2012,195(2):119-132
- [5] DrydenGW,Song M,McClain C. Polyphenols and gastrointestinal diseases [J]. *Curr Opin Gastroenterol*,2006,22(2):165-170
- [6] Zhang X,Huang H,Yang TT,et al. Chlorogenic acid protects mice against lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. *Injury*,2010,41(7):746-752
- [7] El-Shazly A,Berger P,Girodet PO,et al. Fraktalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma[J]. *J Immunol*,2006,176(3):1860-1868
- [8] Yang R,Yang L,Shen X,et al. Suppression of NF- κ B pathway by crocetin contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *Eur J Pharmacol*,2012,674(2-3):391-396
- [9] Song MJ,Wang YQ,Wu GC. Additive anti-hyperalgesia of electroacupuncture and intrathecal antisense oligodeoxynucleotide to interleukin-1 receptor type I on carrageenan-induced inflammatory pain in rats [J]. *Brain Res Bull*,2009,78(6):335-341
- [10] Granger J,Remick D. A cute pancreatitis:models,markers,and mediators[J]. *Shock*,2005,24(1):45-51
- [11] Ileana M,Elena D,Manuela C,et al. Resistin up-regulates fractalkine expression in human endothelial cells;lack of

- additive effect with TNF-alpha [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(1):96-101
- [12] Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, et al. Synergistic stimulation, by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma, of fractalkine expression in human astrocytes [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 303(2): 132-136
- [13] Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, et al. Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide induced I κ B- α degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 33648-33653
- [14] Chtourou Y, Trabelsi K, Fetoui H, et al. Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(8): 1546-1557
- [15] Ha HL, Shin HJ, Feitelson MA, et al. Oxidative stress and antioxidants in hepatic pathogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(48): 6035-6043
- [16] Hale ZT, Tugba TA, Ayliz VO, et al. Silymarin, the antioxidant component of silybum marianum, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury [J]. *J Surg Res*, 2008, 145(2): 214-222
- [17] 王占海, 沈凌鸿, 陈向东, 等. 水飞蓟素对脂多糖性大鼠急性肺损伤的拮抗作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(2): 280-283

[收稿日期] 2012-03-30

本刊来稿题名和作者署名的注意事项

1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 名间加连字符, 如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称(标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病学与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“*”, 并在论文首页下补充基金名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)