

清热化痰解毒方对卒中相关性肺炎大鼠 Akt/JNK3/Caspase-3 和 NF- κ B 信号通路的影响

王 涛, 刘宏祥*, 王 颖, 王 杨, 刘 一, 闫丽静

(河北大学附属医院中西医结合科, 保定 071000)

【摘要】 目的 探究清热化痰解毒方对卒中相关性肺炎大鼠肺组织的影响, 以及与 Akt/c-Jun 氨基末端激酶 3 (JNK3)/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路的关系。**方法** 将 SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组(脑缺血再灌注-肺损伤大鼠)、热化痰解毒方低(7 mg/kg)、中(14 mg/kg)、高剂量(28 mg/kg)组, 尼莫地平组(200 mg/kg), 每组 24 只, 苏木精-伊红染色法(HE)观察大鼠肺部组织病理学变化, 测定大鼠肺组织湿重、动脉血氧分压; 酶联免疫法测定肺组织炎症因子、氧化指标水平, 免疫印迹法(Western blot)、免疫组化检测 Akt、p-Akt、JNK3、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组干湿重比值(Dry weight/wet weight, W/D)、中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil leukocyte, PMN)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肺组织分级、肺组织病理评分、肺组织 p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白及 p-JNK3、p65、p50 蛋白阳性表达率均升高, 动脉血氧分压(Partial pressure of oxygen, PaO₂)、氧合指数(oxygenation index, OI)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、肺组织 p-Akt 蛋白以及蛋白阳性表达率均降低; 与模型组相比, 阳性组、清热化痰解毒方组 W/D、PMN、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、肺组织分级、肺组织病理评分、肺组织 p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白及 p-JNK3、p65、p50 蛋白阳性表达率降低, PaO₂、OI、SOD、p-Akt 蛋白以及蛋白阳性表达率均升高, 具有剂量依赖性($P < 0.05$)。**结论** 清热化痰解毒方能够缓解卒中相关性肺炎大鼠肺炎炎症损伤, 其机制可能与抑制 JNK3/Caspase-3 和 NF- κ B 信号通路, 激活 Akt 表达有关。

【关键词】 卒中相关性肺炎; 肺损伤; 清热化痰解毒方; 蛋白激酶 B; c-Jun 氨基末端激酶; 核因子 κ B

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0042-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.007

Influence of Qingre Huatan Jiedu prescription on Akt/JNK3/Caspase-3 and NF- κ B signaling pathway in apoplexy-associated pneumonia rats

WANG Tao, LIU Hongxiang*, WANG Ying, WANG Yang, LIU Yi, YAN Lijing

(Department of integration of traditional Chinese and Western medicine,
Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of Qingre Huatan Jiedu prescription on lung tissues of rats with apoplexy-associated pneumonia, and its relationships with the Akt/c-Jun amino terminal kinase 3 (JNK3)/caspase-3 and nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** SD rats were divided into a sham group, model group (cerebral ischemia reperfusion lung injury rats), Qingre Huatan Jiedu prescription low-dose group (7 mg/kg), intermediate-dose

【基金项目】 河北省医药卫生科技计划项目(132777203)。

【作者简介】 王涛(1978—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管病及其并发症的防治。E-mail: wu_huali@126.com

【通信作者】 刘宏祥(1980—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管病。E-mail: liuhongxiang35@163.com

group (14 mg/kg), high-dose group (28 mg/kg), and nimodipine group (200 mg/kg), with 24 rats in each group. Pathological changes of lung tissues in rats were observed by the naked eye and hematoxylin-eosin staining (HE). The wet weight and dry weight of lung tissues and arterial oxygen partial pressure in rats were also measured, enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the oxidative index level in lung tissue, while western blot and immunohistochemistry were used to detect Akt, p-Akt, JNK3, p-JNK3, Caspase-3, p65, and p50 expression. **Results** Compared with those in the sham group, W/D, PMN, MDA, TNF- α , IL-1 β , lung tissue classification, lung tissue pathological score, the expression of p-JNK3, Caspase-3, p65, and P50 protein, and the positive expression rates of p-JNK3, p65, and P50 protein of lung tissue in the model group were all increased, while PaO₂, OI, SOD, the expression of p-Akt protein, and positive protein expression in lung tissue were all decreased. Compared with those in the model group, W/D, PMN, MDA, TNF- α , IL-1 β , lung tissue classification, lung tissue pathological score, the expression of p-JNK3, Caspase-3, p65, and P50 protein, and the positive expression rates of p-JNK3, p65, and P50 protein of lung tissue in the positive group and the Qingre Huatan Jiedu prescription group were all decreased, while PaO₂, OI, SOD, the expression of p-Akt protein, and positive protein expression in lung tissue were all decreased, in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusions** Qingre Huatan Jiedu prescription has a certain protective effect against lung injury in rats with apoplexy-associated pneumonia. Its mechanism of action may be related to inhibition of the JNK3/Caspase-3 and NF- κ B signaling pathway and activation of Akt expression.

[Keywords] apoplexy-associated pneumonia; lung injury; Qingre Huatan Jiedu prescription; protein kinase B; C-Jun amino terminal kinase; nuclear factor κ B

脑卒中属于临床常见脑血管疾病,其发病率、致死率逐年升高,而脑卒中患者中约 50% 死因为肺损伤^[1]。目前关于脑卒中引发肺损伤机制研究较多,但尚未有统一定论。研究显示炎症反应在脑缺血再灌注损伤过程中发挥重要作用,其中 Akt 属于磷脂酰肌醇激酶-3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/Akt) 信号通路中重要蛋白,其激活后能够抑制炎症反应,保护脑损伤、肺损伤^[2]。c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 在受到炎症因子刺激后可转移至细胞核促进炎症相关基因的表达^[3]。核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 被认为是脑缺血后最先启动的炎症因子,抑制其表达后能够减轻脑缺血引发肺损伤^[4]。Akt、JNK3、NF- κ B 是否也参与脑缺血引发的肺损伤,目前研究不多。清热化痰解毒方要由郁金、蒲公英、丹参、杏仁、黄芩等组成,具有清热解毒效果、活血透表祛风、化痰止咳的功效,在肺部病变中应用较多。临床研究显示直肠滴注清热化痰方可治疗脑病并发肺部感染,且效果较好^[5]。清热解暑中药治疗肺损伤患者后能够明显减轻肺组织病变,降低肺组织中炎症指标水平^[6]。痰热清干预肺损伤大鼠后可降低肺组织中 MDA 水平,升高 SOD 水平,改善肺组织病理保护肺部功能^[7]。本研究通过制备脑缺血再灌注-肺损伤大鼠,并给予清热化痰解毒方,以探究脑卒中相关性肺炎肺损伤的发病机制,为临床研究提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 144 只,体重为 220 ~ 260 g, 6 月龄,购自河南省实验动物中心 [SYXK(豫)2016-0002], [SCXK(豫)2016-0009]。严格遵循动物饲养规则喂养,饲养环境统一设定为温度为 25℃,湿度为 60%,饮用蒸馏水,喂养期间保持房间干净、通风,并定时清理鼠笼。本研究经河南省动物伦理委员会批准同意,审查编号:20160816。

1.2 主要试剂和仪器

药品与试剂:清热化痰解毒方(成分主要包括瓜蒌 10 g、郁金 10 g、石菖蒲 10 g、蒲公英 10 g、丹参 10 g、桔梗 10 g、杏仁 10 g、射干 10 g、川贝 10 g、黄芩 10 g,药材均购自于张仲景大药房);尼莫地平(亚宝药业集团股份有限公司;批号:20160817;规格:20 mg); p-Akt、p-JNK3、Caspase-3 兔抗鼠单抗购自于英国 Abcam 生物公司;p65、p50、 β -actin 兔抗鼠单抗购自于美国 SantaCruz 公司;山羊抗兔 IgG 二抗购自于上海容创生物科技有限公司;苏木素、伊红染液购自于美国 Sigma 公司;BCA 试剂盒购自于 Thermo Fisher Scientific 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自于北京天根生化科技有限公司;

仪器:全自动生化检测仪购自于 BECKMAN 公司;SOD、MDA 酶联免疫检测试剂盒购自于 Biovision 公司;SMZ745 尼康光学显微镜购于上海衡浩仪器

有限公司;CFX96 PCR 仪购自于美国 BioRad 公司;GIS-500 凝胶成像仪购自于 Miulab 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 脑缺血再灌注-肺损伤大鼠模型的建立

按参考文献^[8]制备脑缺血再灌注大鼠,腹腔注射 3 mg/g 20% 水合氯醛进行麻醉,固定,消毒,分离颈总、内外动脉,用棉线于总动脉处环向绕 1 cm,两侧线环交叉埋于皮下并缝合切口。随后转移大鼠至立体定位仪暴露颈椎后将注射器插入颈椎横突翼小孔内,轻柔旋转,当有血液流出时,说明椎动脉穿刺成功。24 h 后打开颈部切口,采用显微镜动脉夹将双侧劲动脉夹住后阻断脑部供血,15 min 后撤去动脉夹恢复脑部供血。造模后符合以下的大鼠确定为肺部感染:(1)精神萎靡、毛发光泽度差、进食量减少、饮水增多、体重降低、耳缘静脉突起加粗、鼻唇分泌液增多;(2)呼吸急促,肺部出现啰音。

1.3.2 动物分组以及给药方法

所有大鼠按照随机数字表法分为假手术组(仅暴露颈总动脉,不阻断血管)、模型组、清热化痰解毒方低、中、高剂量预处理组、阳性组(尼莫地平组),每组 24 只。(1)假手术组、模型组大鼠均灌胃等量生理盐水;(2)清热化痰解毒方低、中、高剂量药物剂量为 7、14、28 mg/kg;(3)阳性组给药剂量为 200 mg/kg 尼莫地平。各组给药时间为预处理大鼠在造模前 3 日灌胃,每日 2 次,最后一次给药时间为造模前 3 h,共给药 7 次。给药剂量参照人体表法^[9]计算,成年人标准体重 60 kg,大鼠给药剂量为成人的 6.25 倍,成人每日给药剂量为 60 mg,所有大鼠平均体重 220 g,则大鼠每日给药剂量为 7 mg/kg。

1.3.3 动脉氧分压的测定

于大鼠右侧股动脉采集 2 mL 血液,采用全自动生化检测仪对动脉血氧分压(Partial pressure of oxygen, PaO₂)进行测定,并计算氧合指数(oxygenation index, OI)。

1.3.4 大鼠肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage, BAL)中中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil leukocyte, PMN)计数

各组选取 12 只大鼠进行支气管肺泡灌洗,利用自动血细胞分析仪对 BAL 中 PMN 进行计数。

1.3.5 大鼠肺组织湿干重变化

各组随机选取 12 只大鼠处死后,将右肺下叶用滤纸吸干水后置于玻璃试管中称重,所测重量为湿

重,随后放置在干燥箱中,温度设为 80℃,连续烘烤直至质量测定不变时此时重量为干重,计算大鼠肺组织 W/D。

1.3.6 肺组织 SOD、MDA 以炎症因子检测

用无菌剪刀将肺组织剪碎,制作 10% 匀浆液,放置低温离心机中 4000 r/min 离心 10 min,收集上清,采用酶联免疫法测定组织中 SOD、MDA、TNF- α 、IL-1 β 活性,具体参照试剂盒说明进行操作。

1.3.7 Western blot 检测肺组织中 Akt/JNK3/Caspase-3 和 NF- κ B 蛋白表达

肺组织剪碎后添加蛋白裂解液放置 30 min,离心后收集上清液,参照蛋白提取试剂盒提取肺组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,进行 SDS-PAGE 电泳、转膜反应,置于凝胶成像仪中观察 Akt、p-Akt、JNK3、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达情况。

1.3.8 免疫组化法检测肺组织中 p-Akt、p-JNK3、p65、p50 蛋白阳性表达

常规制备肺组织石蜡切片,免疫组化法检测肺组织中 p-Akt、p-JNK3、p65、p50 蛋白,置于显微镜下进行观察统计阳性染色细胞数,计算阳性百分比 = 阳性数/细胞总数 $\times$ 100%。

1.4 统计学方法

应用 SPSS22.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间对比采用单因素方差分析,两两对比采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠一般症状观察

大鼠在模型制备过程中,未出现死亡,造模成功大鼠共 96 只。假手术组大鼠精神状态较好,毛发光泽,饮水、摄食正常,体重逐渐增加,耳唇分泌液正常,呼吸正常。模型组大鼠出现精神萎靡、毛发光泽度差、进食量减少、饮水增多、体重降低、耳缘静脉突起加粗、鼻唇分泌液增多,呼吸急促,肺部出现啰音。经清热化痰解毒方治疗后,得到不同程度改善。

2.2 各组大鼠动脉氧分压以及 PMN 测定结果

与假手术组相比,模型组肺组织干湿重比值、中性粒细胞数升高,动脉氧分压、氧合指数均降低,差异有显著性($P < 0.05$);与模型组相比,阳性组、清热化痰解毒方组 W/D、PMN 降低,PaO₂、OI、PMN 升高,具有剂量依赖性,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 肺组织光镜检测结果

假手术组肺泡结构完整,肺泡腔清晰,未出现炎性细胞浸润;与假手术组相比,模型组肺组织毛细血管扩张,弥漫性充血,出现炎性浸润,肺泡腔内有红细胞渗出以及炎性浸润,肺泡壁增厚、充血;阳性组、灯盏花素治疗组大鼠肺泡腔结构逐渐恢复、炎性细胞浸润减轻。见下图 1。与假手术组相比,模型组大鼠肺组织病理评分升高,差异有显著性($P < 0.05$);与模型组相比,阳性组、清热化痰解毒方组大鼠肺组织病理评分均降低,随着给药剂量的升高,肺组织病理评分逐渐降低,差异有显著性($P <$

0.05)。给药后,假手术组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性组大鼠肺组织病理学评分分别为 0、(3.78 ± 0.74)、(2.87 ± 0.52)、(2.28 ± 0.71)、(0.97 ± 0.28)和(0.64 ± 0.17)分,各组组间比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.4 各组 SOD、MDA 水平测定结果

与假手术组相比,模型组 SOD 降低,MDA、TNF- α 、IL-1 β 升高,差异有显著性($P < 0.05$);与模型组相比,阳性组、清热化痰解毒方组 SOD 升高,MDA、TNF- α 、IL-1 β 降低,具有剂量依赖性,差异有显著性($P < 0.05$)。见下表 2。

表 1 各组大鼠 W/D、PaO₂、OI 水平对比
Table 1 Comparison of W/D, PaO₂, and OI levels in rats in each group

组别 Groups	肺组织干湿重比值 W/D	动脉氧分压 (mmHg) PaO ₂	氧合指数 (mmHg) OI	中性粒细胞 ($\times 10^7$ /L) PMN
假手术组 Sham group	4.36 $\pm$ 0.38	94.78 $\pm$ 1.52	440.52 $\pm$ 8.62	0.91 $\pm$ 0.16
模型组 Model group	6.36 $\pm$ 0.51 *	58.72 $\pm$ 0.64 *	296.87 $\pm$ 6.35 *	2.88 $\pm$ 0.53 *
低剂量组 Low dose group	5.86 $\pm$ 0.34 [#]	67.52 $\pm$ 0.73 [#]	337.29 $\pm$ 8.27 [#]	2.12 $\pm$ 0.29 [#]
中剂量组 Middle dose group	5.16 $\pm$ 0.24 ^{#a}	76.13 $\pm$ 0.52 ^{#a}	372.25 $\pm$ 7.39 ^{#a}	1.64 $\pm$ 0.36 ^{#a}
高剂量组 High dose group	4.72 $\pm$ 0.43 ^{#ab}	85.76 $\pm$ 0.74 ^{#ab}	398.72 $\pm$ 6.89 ^{#ab}	1.14 $\pm$ 0.28 ^{#ab}
阳性组 Positive group	4.62 $\pm$ 0.56 [#]	89.84 $\pm$ 0.71 [#]	417.29 $\pm$ 9.04 [#]	0.97 $\pm$ 0.23 [#]

注:与假手术组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,[#] $P < 0.05$;与低剂量组相比,^a $P < 0.05$;与中剂量组相比,^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, [#] $P < 0.05$. Compared with the low dose group, ^a $P < 0.05$. Compared with the middle dose group, ^b $P < 0.05$.

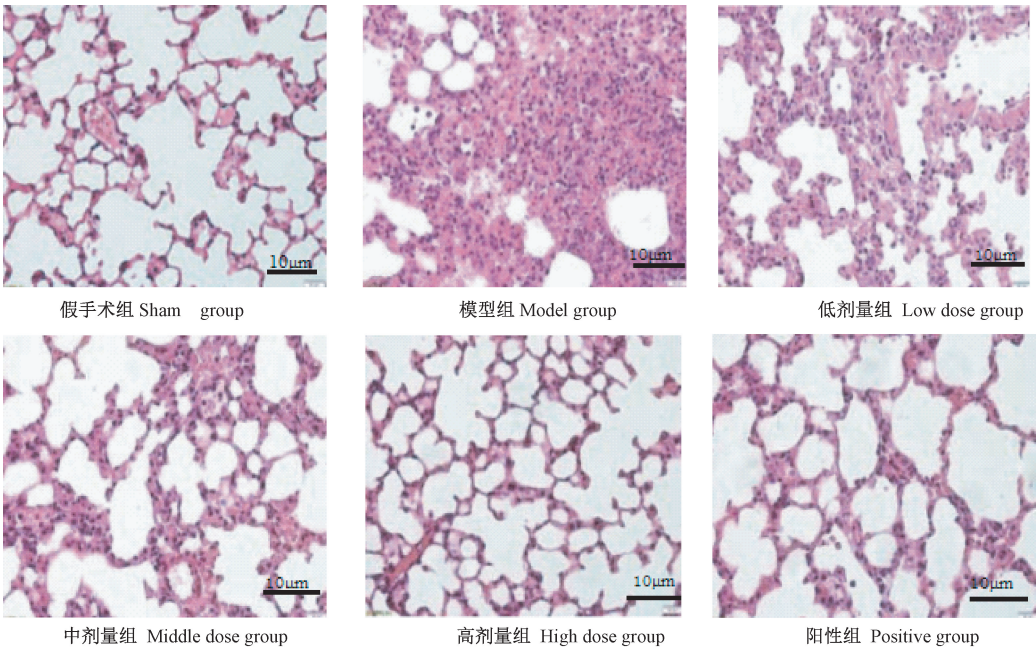


图 1 肺组织病理形态学(HE 染色, $\times 400$)

Figure 1 Pathomorphology of lung tissue (HE staining, $\times 400$)

表 2 各组大鼠 SOD、MDA 水平对比
Table 2 Comparison of SOD and MDA levels in rats in each group

组别 Groups	SOD(NU/mg)	MDA(umol/g)	TNF-α(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)
假手术组 Sham group	36.69 ± 2.07	134.27 ± 13.66	16.57 ± 4.22	6.04 ± 1.06
模型组 Model group	22.63 ± 1.29 *	203.75 ± 16.38 *	257.56 ± 20.64 *	193.54 ± 28.46 *
低剂量组 Low dose group	25.76 ± 1.03 #	184.69 ± 16.44 #	200.18 ± 23.44 #	134.25 ± 20.34 #
中剂量组 Middle dose group	28.56 ± 1.19 # ^a	167.33 ± 15.85 # ^a	170.23 ± 19.25 # ^a	113.49 ± 15.48 # ^a
高剂量组 High dose group	34.18 ± 1.55 # ^{ab}	155.49 ± 15.79 # ^{ab}	141.69 ± 15.53 # ^{ab}	91.39 ± 10.65 # ^{ab}
阳性组 Positive group	33.29 ± 1.14 #	145.63 ± 15.49 #	105.76 ± 14.28 #	82.45 ± 11.39 #

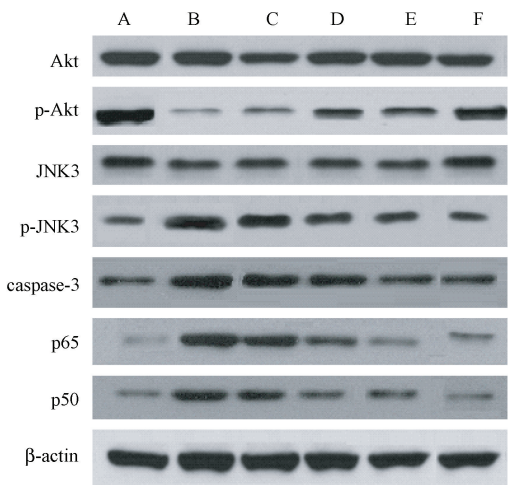
注：与假手术组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ；与低剂量组相比，^a $P < 0.05$ ；与中剂量组相比，^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the low dose group, ^a $P < 0.05$. Compared with the middle dose group, ^b $P < 0.05$.

2.5 Western blot 检测肺组织中 Akt、p-Akt、JNK3、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达

与假手术组相比，模型组 p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达升高，p-Akt 蛋白表达降低，差异有显著性 ($P < 0.05$)；与模型组相比，阳性组、清热化痰解毒方组 p-Akt、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达降低，p-Akt 蛋白表达升高，具有剂量依赖性，差异有显著性 ($P < 0.05$)。各组 Akt、JNK3 蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。见表 3，图 2。

2.6 免疫组化检测肺组织中 p-Akt、p-JNK3、p65、p50 表达

与假手术组相比，模型组 p-JNK3、p65、p50 蛋白阳性表达率升高，p-Akt 蛋白阳性表达率降低，差异有显著性 ($P < 0.05$)；与模型组相比，阳性组、清热化痰解毒方组 p-JNK3、p65、p50 阳性表达率降低，p-Akt 蛋白阳性表达率升高，具有剂量依赖性，差异有显著性 ($P < 0.05$)。见表 4。



注：A：假手术组；B：模型组；C：低剂量组；D：中剂量组；E：高剂量组；F：阳性组。

图 2 各组 Akt、p-Akt、JNK3、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达

Note. A: Sham operation group. B: Model group. C: Low dose group. D: Medium dose group. E: High dose group. F: Positive group.

Figure 2 Expression of Akt, p-Akt, JNK3, p-JNK3, Caspase-3, p65 and P50 in each group

表 3 大鼠肺组织中 Akt、p-Akt、JNK3、p-JNK3、Caspase-3、p65、p50 蛋白表达
Table 3 Expression of Akt, p-Akt, JNK3, p-JNK3, Caspase-3, p65, and p50 proteins in rat lung tissue

组别 Groups	Akt	p-Akt	JNK3	p-JNK3	Caspase-3	p65	p50
假手术组 Sham group	0.72 ± 0.13	0.76 ± 0.04	0.58 ± 0.12	0.17 ± 0.03	0.22 ± 0.04	1.29 ± 0.06	1.16 ± 0.05
模型组 Model group	0.69 ± 0.16 *	0.13 ± 0.08 *	0.64 ± 0.11 *	0.95 ± 0.09 *	0.83 ± 0.08 *	0.22 ± 0.03 *	0.18 ± 0.05 *
低剂量组 Low dose group	0.62 ± 0.14 #	0.24 ± 0.09 #	0.66 ± 0.11 #	0.78 ± 0.09 #	0.68 ± 0.13 #	0.49 ± 0.03 #	0.33 ± 0.08 #
中剂量组 Middle dose group	0.67 ± 0.12 # ^a	0.42 ± 0.06 # ^a	0.63 ± 0.14 # ^a	0.64 ± 0.13 # ^a	0.52 ± 0.06 # ^a	0.71 ± 0.11 # ^a	0.76 ± 0.06 # ^a
高剂量组 High dose group	0.70 ± 0.16 # ^{ab}	0.58 ± 0.13 # ^{ab}	0.61 ± 0.13 # ^{ab}	0.48 ± 0.08 # ^{ab}	0.38 ± 0.09 # ^{ab}	0.97 ± 0.09 # ^{ab}	0.92 ± 0.07 # ^{ab}
阳性组 Positive group	0.60 ± 0.18 #	0.63 ± 0.05 #	0.56 ± 0.12 #	0.21 ± 0.03 #	0.26 ± 0.05 #	1.11 ± 0.08 #	1.05 ± 0.06 #

注：与正常组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ ；与低剂量组相比，^a $P < 0.05$ ；与中剂量组相比，^b $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the sham group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the low dose group, ^a $P < 0.05$. Compared with the middle dose group, ^b $P < 0.05$.

表 4 肺组织中 p-Akt、p-JNK3、p65、p50 蛋白阳性表达
Table 4 Positive expression of p-Akt, p-JNK3, p65, and p50 proteins in lung tissue

组别 Groups	p-Akt	p-JNK3	p65	p50
假手术组 Sham group	18.76 ± 2.44	22.69 ± 4.07	18.92 ± 3.12	16.85 ± 2.94
模型组 Model group	82.71 ± 9.872 [*]	77.92 ± 9.07 [*]	78.27 ± 8.03 [*]	70.58 ± 6.08 [*]
低剂量组 Low dose group	65.44 ± 7.52 [#]	58.24 ± 6.11 [#]	49.62 ± 4.06 [#]	66.49 ± 5.28 [#]
中剂量组 Middle dose group	47.63 ± 5.87 ^{#a}	37.76 ± 3.97 ^{#a}	38.46 ± 3.62 ^{#a}	57.33 ± 4.62 ^{#a}
高剂量组 High dose group	31.52 ± 3.74 ^b	25.44 ± 3.68 ^b	23.77 ± 4.26 ^b	28.96 ± 3.66 ^b
阳性组 Positive group	24.73 ± 4.05 ^b	24.39 ± 3.81 ^b	21.67 ± 3.05 ^b	24.66 ± 2.68 ^b

注：与正常组相比，^{*}*P* < 0.05；与模型组相比，[#]*P* < 0.05；与低剂量组相比，^a*P* < 0.05；与中剂量组相比，^b*P* < 0.05。
Note. Compared with the sham group, ^{*}*P* < 0.05. Compared with the model group, [#]*P* < 0.05. Compared with the low dose group, ^a*P* < 0.05. Compared with the middle dose group, ^b*P* < 0.05.

3 讨论

过往研究认为脑缺血早期容易导致肺损伤,且肺组织会出现典型病理特征,主要为肺泡结构变化、肺水肿、以及炎性浸润^[10]。本研究采取脑中动脉线栓法制备脑缺血再灌注大鼠模型,结果显示模型组大鼠肺组织出现肿胀伴弥漫性肺出血,毛细血管扩张,弥漫性充血,出现炎性浸润,符合肺损伤特点^[11-12]。进一步研究显示模型组 W/D、PMN、TNF-α、IL-1β 升高,PaO₂、OI 均降低,表明肺组织出现缺氧、炎症细胞浸润、氧化应激损伤,以上均提示脑缺血再灌注损伤大鼠肺损伤模型制备成功。在给予清热化痰解毒方后,大鼠肺组织炎症损伤有一定改善,W/D、MDA、TNF-α、IL-1β 降低,PaO₂、OI、SOD 升高,提示清热化痰解毒方能够缓解肺部炎症损伤,降低氧化应激反应进而保护肺功能。

近期越来越多研究表明 PI3K/AKT 信号通路 与肺损伤密切相关^[13-15]。本研究结果显示模型组 p-Akt 蛋白表达降低,给予清热化痰解毒方后 p-Akt 蛋白表达升高,说明清热化痰解毒方缓解卒中 大鼠肺部炎症损伤可能与激活 Akt 蛋白有关。JNK 信号通路激活后使 JNK 蛋白中 Thr 位点发生磷酸化进而激活 JNK,随后 JNK 进入细胞核内,发挥其生物学效应^[16]。胰腺炎肺损伤大鼠发病初期 p-JNK 表达明显升高,且经干预后其表达明显降低,表明 JNK 蛋白参与胰腺炎肺损伤病理过程^[17]。高氧肺损伤大鼠 JNK 信号通路激活可导致肺组织细胞大量凋 亡,引发肺损伤^[18]。本研究结果显示模型组 p-JNK3 蛋白表达降低,清热化痰解毒方组 p-JNK3 蛋白表达升高,提示清热化痰解毒方缓解卒中 大鼠肺部炎症损伤可能与激活 JNK3 蛋白有关。

Caspases 为细胞凋亡主要调节者,其能够激活 DNA 断裂因子引发细胞死亡,抑制 Caspase-3 表达可降低组织细胞凋亡,降低组织损伤^[19]。本研究发

现,清热化痰解毒方干预可使 Caspase-3 表达下降,提示清热化痰解毒方能够抑制 Caspase-3 表达进而减轻肺炎炎症损伤。NF-κB 在机体内主要以二聚体形式存在,细胞未受到外界刺激时,NF-κB 与抑制物 IκBa 结合,细胞受到刺激后,IκBa 发生磷酸化后,使 NF-κB 转移至细胞核内,促进靶基因的转录^[20-21]。本研究结果显示模型组肺组织中 p65、p50 蛋白表达明显升高,而给予清热化痰解毒方后能够明显降低 p65、p50 蛋白表达,提示清热化痰解毒方可能通过抑制 NF-κB 通路改善大鼠肺部炎症损伤。

综上所述,本研究成功制备卒中相关性肺炎大鼠模型,发现 JNK3/Caspase-3 和 NF-κB 信号通路激活,Akt 通路被抑制;给予清热化痰解毒方发现其能够缓解卒中相关性肺炎大鼠肺炎炎症损伤,其机制可能与抑制 JNK3/Caspase-3 和 NF-κB 信号通路、激活 Akt 有关。然而本研究未能直接证实清热化痰解毒方缓解脑缺血再灌注肺损伤直接作用于肺,这还有待后续深入探究。

参考文献:

[1] Chang L, Dong Y, Zhou P. Investigation on Risk Factors of Ventilator-Associated Pneumonia in Acute Cerebral Hemorrhage Patients in Intensive Care Unit[J]. Can Respir J, 2017, 2017 (4): 1-4.

[2] Hsu HS, Liu CC, Lin JH, et al. Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 579-561.

[3] 夏莉, 张云龙, 杨鹏举, 等. 姜黄素预先给药对单肺通气诱发小鼠急性肺损伤时 JNK 信号通路的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(7): 805-809.

[4] Hu X, Shen H, Wang Y, et al. Liver X receptor agonist T0901317 attenuates paraquat-induced acute lung injury through inhibition of NF-κB and JNK/p38 MAPK signal pathways[J]. Biomed Res Int, 2017, 49(4): 693-699.

- [5] 吕军影, 李凯, 黄李平, 等. 清热化痰通腑方直肠滴注治疗脑病并发肺部感染的疗效[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(6): 1001–1004.
- [6] 周风华, 程赛博, 张宇, 等. 黄连解毒汤通过调节性 T 细胞产生抗动脉粥样硬化作用[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(3): 233–238.
- [7] 吴俭, 金国强, 余伟, 等. 痰热清注射液对小鼠内毒素急性性肺损伤的保护作用研究[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(6): 443–447.
- [8] 马贤德, 孙宏伟, 柴纪严, 等. 线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型的方法研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(6): 1200–1201.
- [9] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则[J]. 中药药理与临床, 2016(3): 196–197.
- [10] Mai N, Prifti L, Rininger A, et al. Endotoxemia induces lung-brain coupling and multi-organ injury following cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Exp Neurol*, 2017, 297(12): 82–91.
- [11] Yuan Z, Syed M, Panchal D, et al. Translational research in acute lung injury and pulmonary fibrosis: TREM-1-accentuated lung injury via miR-155 is inhibited by LP17 nanomedicine[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(5): 426–431.
- [12] Hu Y, Xiong LL, Zhang P, et al. Microarray expression profiles of genes in lung tissues of rats subjected to focal cerebral ischemia-induced lung injury following bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 39(1): 57–70.
- [13] 耿焱, 苏磊, 彭娜, 等. 劳力型与经典型热射病大鼠急性肺损伤的病理特点及时程变化比较[J]. 解放军医学杂志, 2016, 41(7): 550–554.
- [14] Zhao YR, Wang D, Liu Y, et al. The PI3K/Akt, p38MAPK, and JAK2/STAT3 signaling pathways mediate the protection of SO₂ against acute lung injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats[J]. *J Physiol Sci*, 2016, 66(3): 229–239.
- [15] Li LF, Liu YY, Yang CT, et al. Improvement of ventilator-induced lung injury by IPS cell-derived conditioned medium via inhibition of PI3K/Akt pathway and IP-10-dependent paracrine regulation[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 78–91.
- [16] Lee CY, Yang JJ, Lee SS, et al. Protective effect of Ginkgo biloba leaves extract, EGB761, on endotoxin-induced acute lung injury via a JNK- and Akt-dependent NFκB pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(27): 6337–6344.
- [17] Choi SB, Bae GS, Jo IJ, et al. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathways[J]. *Mol Immunol*, 2016, 74(5): 27–38.
- [18] 周璟, 谭利平, 许峰, 等. 丝裂原活化蛋白激酶信号对高氧性肺损伤水通道蛋白 5 的调控机制[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(9): 1231–1236.
- [19] Wang HW, Liu M, Zhong TD, et al. Saikosaponin-d attenuates ventilator-induced lung injury in rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15137–15145.
- [20] Al-Harbi NO, Imam F, Al-Harbi MM, et al. Dexamethasone Attenuates LPS-induced Acute Lung Injury through Inhibition of NF-κB, COX-2, and Pro-inflammatory Mediators[J]. *Immunol Invest*, 2016, 45(4): 349–369.
- [21] Lan CC, Peng CK, Tang SE, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Suppresses ERK and NF-κB Activation in Ischemia-Reperfusion Lung Injury[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0159922.

[收稿日期]2018–04–26