

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 24520131153455

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

白花前胡有效成分 Pd-Ia 对 LPS 诱导的小鼠
急性肺损伤的作用及机制研究

Effects and mechanisms of Pd-Ia on LPS-induced acute lung
injury in mice

周晓霞

指导教师姓名: 薛茂强教授 邹军副教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩日期: 2016 年 5 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2016 年 5 月

白花前胡有效成分 P_{11} 对急性肺损伤的作用及机制研究

周晓霞

指导教师

薛茂强

教授

邹军

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

目的：随着环境的不断恶化，空气质量越来越差，并且已经严重影响到了人们的身体健康，雾霾已经遍布中国的众多城市，使得呼吸系统疾病的发病率日渐升高。急性肺损伤（ALI）/急性呼吸窘迫综合征（ARDS）都是比较常见的临床呼吸系统疾病，ARDS 对于临床疾病来说，可谓是灾难性的，属于严重的呼吸衰竭，目前无有效的药物治疗措施。ALI 是 ARDS 的早期阶段，其特点是弥漫性的炎症损伤，目前研究发现中药白花前胡根中提取出的活性成分白花前胡甲素（Pd-Ia）在 LPS 诱导的内皮细胞炎症损伤中具有良好的抗炎效果，这给予我们一个很大的启发，Pd-Ia 在 ALI 中是否也会具有相同的抗炎作用，从而有效的改善肺部损伤，本课题采用 LPS 诱导小鼠 ALI，从体内外对于 Pd-Ia 在 ALI 中的作用以及相关机制做了初步研究。

方法：异氟烷深度麻醉小鼠后，用移液器吸取 LPS 后通过鼻腔滴注诱导 ALI 模型，1h 后腹腔注射给予 Pd-Ia 干预，24h 后处死小鼠，采集相关组织标本进行后续检测。采用 HE 染色评判肺组织病理学改变程度。通过对肺泡灌洗液（BALF）中的细胞进行分类计数判断肺部炎性细胞浸润情况。利用 Real-time PCR、ELISA、Western blot 检测相关炎性因子的基因以及蛋白表达变化。在体外利用 Real-time PCR、Western blot 检测了相关信号通路的变化，对 Pd-Ia 在 ALI 中的作用机制做初步探讨。

结果：通过鼻腔滴注 LPS，成功诱导了小鼠 ALI 模型，小鼠 ALI 模型中肺泡间隔明显增宽，肺部出现大量的炎性细胞浸润，炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 以及趋化 MIP-1 α 、MIP-2 的表达明显增高。经给予 Pd-Ia 干预后发现粒细胞浸润明显减少，肺泡间隔增宽明显改善，并且主要炎性炎性因子以及趋化因子的表达也明显降低。同时发现在 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型中 Pd-Ia 能够抑制 P38MAPK/NF- κ B 的活化，从而抑制炎症的发生发展。此外我们还发现 Pd-Ia 影响了过氧化物酶体增殖物激活受体- α （PPAR- α ）的表达，利用 PPAR- α 敲除小鼠我们进一步研究发现，在 PPAR- α 敲除后，Pd-Ia 对 ALI 无明显的改善作用。这可能是 Pd-Ia 对 ALI 调节过程中的新靶点。在体外实验中我们通过研究 Pd-Ia

摘要

对 LPS 诱导的巨噬细胞的炎症反应发现, Pd-Ia 同样具有抗炎作用, 并且发现能 I κ B- ζ 可能与 Pd-Ia 通过 PPAR- α 对炎症的调节机制有关。

结论: Pd-Ia 对于 LPS 诱导的小鼠 ALI 具有改善作用, 其机制可能与 P38MAPK/NF- κ B 信号通路有关, PPAR- α 可能是其调节机制中的新的信号通路。

关键词: 脂多糖 急性肺损伤 白花前胡甲素 丝裂原活化蛋白激酶 过氧化物酶体增殖物激活受体- α

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Objective: With the deterioration of environment, the worse air has seriously impacted people's health. Haze is so common in many cities of China, which result in the high incidence of respiratory system. Acute lung injury (ALI)/Respiratory distress syndrome (ARDS) are common clinical respiratory system disease. Currently no effective treatment measures to ARDS, the severe respiratory failure. ALI whose characteristic is diffuse inflammation of the lung is the early stage for ARDS. Pd-Ia, extracted from bai hua qian hu roots, has anti-inflammatory effect in endothelial cell inflammatory. In this study, we use the LPS to induce the acute lung injury to explore the effect of Pd-Ia in mice. Furtherly, we also investigate its possible mechanism in ALI.

Method: Acute lung injury model was induced by intranasal instillation LPS after the mouse hocused by isoflurane. Pd-Ia was administrated by intraperitoneal injection after 1h of LPS exposure. Lung tissue samples were collected after 24h of LPS administration to investigate the role of Pd-Ia for acute lung injury. We can see the histopathological change by HE. Differential count in BALF can show the polymorphonuclear neutrophil infiltration in lung. The result of Realtime PCR, ELISA, western blot exhibit gene and protein changes of inflammatory cells. In vitro, we explore the mechanism of Pd-Ia in ALI by Realtime PCR and western blot.

Result: We have successfully induced the ALI mouse model. The alveolar interval widened obviously and a large number of inflammatory cells infiltration in lung. Gene and protein expression significantly increased, which were reduced by Pd-Ia. Treatment by Pd-Ia alleviate the granulocytic infiltration. It also reduce the expression of gene and protein. It is a new found the Pd-Ia effected the expression of PPAR- α in ALI. We confirm it by PPAR- α knock out mouse. It has the same result in vitro. Pd-Ia can decrease the inflammation in macrophage.

Conclusion: In this study, we demonstrate that Pd-Ia can alleviate the LPS

Abstract

-induced ALI in mouse through the PPAR- α , and may through P38MAPK/ NF- κ B pathway. Meanwhile PPAR- α also may be a new target for Pd-Ia.

Key Words: LPS; ALI; Pd-Ia; MAPKs; PPAR- α

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 前言.....	1
1.1. 急性肺损伤	1
1.1.1. LPS 引发的肺损伤	1
1.1.2. LPS 引发的 ALI 的发病机制	2
1.1.3. ALI 研究进展	4
1.2. Pd-Ia	5
1.2.1. 研究进展.....	6
1.3. PPARs.....	6
1.3.1. PPAR- α 结构	7
1.3.2. PPAR- α 与疾病	7
1.4. MAPKs 家族简介.....	9
1.5. IκB-ζ 简介	10
1.6. 立题依据	11
第二章 材料与方 法	12
2.1. 实验材料	12
2.1.1. 实验动物.....	12
2.1.2. 主要实验试剂.....	13
2.1.3. 主要溶液的配制.....	14
2.2. 实验方法	15
2.2.1. 急性肺损伤模型的制作以及 Pd-Ia 给药治疗.....	15
2.2.2. 取组织前的准备.....	15
2.2.3. 肺泡灌洗液的提取.....	16
2.2.4. 细胞涂片的制备:	16
2.2.5. 麦氏吉姆萨染色.....	16
2.2.6. 石蜡切片的制备.....	16
2.2.7. HE 染色	18
2.2.8. ELISA.....	19
2.2.9. RNA 提取	20
2.2.10. RNA 浓度测定、逆转录	20
2.2.11. Real time PCR.....	21
2.2.12. RT-PCR.....	22

2.2.13. 蛋白质提取.....	23
2.2.14. 蛋白浓度检测 (BCA 法)	23
2.2.15. 蛋白免疫印迹 (Western Blot)	24
2.2.16. 细胞的冻存及复苏.....	26
2.2.17. 数据统计分析.....	27
第三章 实验结果	28
3.1 Pd-Ia 改善 LPS 诱导的 ALI	28
3.1.1. 总结.....	31
3.2 Pd-Ia 改善 LPS 诱导的 ALI 的分子机制	31
3.2.1. Pd-Ia 对于 NF- κ B 信号通路的影响	31
3.2.2. Pd-Ia 对于 MAPKs 信号通路的影响	32
3.2.3. Pd-Ia 对 PPAR- α 信号通路的影响	33
3.2.4. PPAR- α 在 Pd-Ia 改善 ALI 中的作用机制	37
第四章 讨论.....	41
结 论.....	44
附 录.....	45
参考文献.....	46
致 谢.....	56

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1.Acute lung injury	1
1.1.1. Acute lung injury LPS-induced.....	1
1.1.2. The pathogenesis of ALI induced by LPS.....	2
1.1.3. The advance of acute lung injury.....	4
1.2.Pd-Ia.....	5
1.2.1. Research progress.....	6
1.3.PPARs.....	6
1.3.1. Structure of PPAR- α	7
1.3.2. PPAR- α and disease.....	7
1.4. MAPKs.....	9
1.5. IκB-ζ.....	10
1.6. Basis.....	11
Chapter 2 Materials and Methods	12
2.1 Experimental Materials.....	12
2.1.1. Animals.....	12
2.1.2. Equipment and supplies.....	13
2.1.3. Main configure solution.....	14
2.2. Experimental Method.....	15
2.2.1. Acute lung injury model.....	15
2.2.2. The preparation for organization.....	15
2.2.3. The extraction of alveolar lavage fluid.....	16
2.2.4. The preparation of cell smear.....	16
2.2.5. MGG staining.....	16
2.2.6. The preparation of paraffin section.....	16
2.2.7. HE.....	18
2.2.8. ELISA.....	19
2.2.9. RNA extraction.....	20
2.2.10. RNA concentration determination.....	20
2.2.11. Real time PCR.....	21
2.2.12. RT-PCR.....	22
2.2.13. Protein extraction.....	23

2.2.14. Protein concentration detection (BCA)	23
2.2.15. Western Blot.....	24
2.2.16. Cells cryopreserved and recovery.....	26
2.2.17. Statistic analysis of data.....	27
Chapter 3 Results	28
3.1 Pd-Ia improve ALI LPS-induced.....	28
3.1.1. Conclusion.....	31
3.2. The molecular mechanisms of Pd-Ia improving ALI.....	31
3.2.1. The influence of Pd-Ia on the signal path of NF- κ B.....	31
3.2.2. The influence of Pd-Ia on the signal path of MAPKs.....	32
3.2.3. The influence of Pd-Ia on the signal path of PPAR- α	33
3.2.4. The function of PPAR- α in ALI.....	37
Chapter 4 Discussion	41
Conclusion.....	44
Appendices.....	45
References	46
Acknowledgements	56

第一章 前言

1.1. 急性肺损伤

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)具有相同的病理以及生理改变,是由肺内外的各种非心源性的因素引起的急性呼吸衰竭性疾病,如严重感染、休克、中毒、创伤、脓毒症等均是主要的诱因^[1,2]。它的实质是由多种炎性介质以及炎性细胞共同参与的,并且呈级联性放大的继发性炎症损伤与弥漫性的肺实质的损伤^[3,4]。自美国罗拉多大学于1967年报道第一例成人急性呼吸窘迫(acute respiratory distress in adult)以来,引起了各国学者的高度重视^[5],目前ALI/ARDS的基础研究以及临床治疗已经取得了巨大的进展,但是其发病率以及致死率仍居高不下,病死率达40%-70%,若伴有并发性脓毒症,则其病死率可高达90%^[6]。ARDS属于多器官功能障碍综合征的一种,所以常伴有其他器官功能障碍,若同时并发四个以上器官障碍,则死亡率可达100%^[7]。ALI是ARDS的早期阶段,对于ALI发病机制的研究以及可能的治疗手段的探索,对于早日攻克ARDS的医学难题有着巨大的意义^[8]。

1.1.1. LPS 引发的肺损伤

ALI和ARDS是严重引起机体免疫反应过程的不同发病阶段,而肺脏则是其主要的靶器官,ALI出现较早,其发病率也较高^[9]。脓毒症以及严重的创伤都是ALI的主要诱因,其中由于脓毒症所引发的ALI的损伤程度与血浆中的革兰氏菌的细胞壁主要成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的水平密切相关。脓毒症休克中ARDS的发病率则高达37%,LPS高出检测水平的患者其中有51%并发ARDS,而低于检测水平的患者出现ARDS的概率只有26%,这也说明LPS的水平决定了ARDS病程发展的危险性^[10]。表明LPS是引起ALI/ARDS的重要致病因子。

1.1.1.1. LPS 直接损伤

LPS进入机体后,可被宿主的受体识别,从而启动了肺内多细胞参与的信

号级联反应，正常的肺组织是由肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞组成的肺泡-毛细血管屏障，当 LPS 直接作用于肺组织时，首先损伤肺泡上皮细胞，并激活巨噬细胞以及炎症反应链，导致肺内炎症反应的大规模爆发，肺泡上皮细胞损伤后会导致屏障功能发生障碍，肺泡内的渗出物增多，II 型上皮细胞的损伤还会引起上皮细胞表面活性物质合成减少以及肺水的清除能力减弱，最终出现肺泡腔内水肿、胶原蛋白、纤维蛋白的渗出以及中性粒细胞聚集，最终导致肺部实质性病变为主要特征的病理性改变，其主要体现在肺泡腔内改变为主^[9, 11]。

1.1.1.2. LPS 间接损伤

间接损伤是指 LPS 引起的多种细胞因子参与的全身性的免疫反应综合征与代偿性抗炎反应综合征之间失衡导致的肺内炎症疾病，主要是由于肺外的炎性介质通过循环系统进入了肺部，从而使得肺脏成为全身性炎症反应的靶器官之一进一步引发的损伤，首先导致肺部血管充血，损伤血管内皮细胞，血管通透性增加同时单核巨噬细胞、淋巴细胞、血小板等炎性细胞的聚集，进而导致肺毛细血管充血以及肺间质水肿，使得肺泡塌陷，肺功能障碍，但其肺泡腔的结构相比较而言正常^[12, 13]。

1.1.2. LPS 引发的 ALI 的发病机制

1.1.2.1. LPS 引起的 ALI/ARDS 的炎症介质

过度活化的炎症反应是 ALI 的主要发病机制，参与 ALI 的主要炎症介质有 NF- κ B，促炎因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等，抗炎因子 IL-1RA、IL-4、IL-10 等。LPS 进入机体后，刺激巨噬细胞产生的 TNF- α 和 IL-1 β 是炎症反应的起始因子，TNF- α 是始动因素，IL-1 β 具有协同作用，TNF- α 可直接对内皮细胞造成损伤，并能激活中性粒细胞（polymorphonuclear, PMN），使肺部的 PMN 迅速增多，而且可以增强 PMN 的吞噬能力，能促进 PMN 脱颗粒和溶酶体酶的释放，最终增强 PMN 导致呼吸暴发^[14]。IL-1 β 又可以刺激巨噬细胞、内皮细胞、间充质细胞等在炎症部位产生趋化因子 IL-8、MCP-1 从而增加 PMN 的粘附，产生大量的 PMN 浸润以及炎性因子的释放^[15, 16]。IL-1 β 还可以刺激上述炎症细胞产生 IL-6，它又称为 B 细胞刺激因子，可以促进淋巴细胞的分化和炎性激活，能够进一步加强炎症反应^[17]。在炎症反应过程中抗炎因子也具有重要作用，促

炎因子与抗炎因子反应失衡也是 ALI 的主要发病机制，由 Th2 细胞产生的 IL-10、IL-4 是主要的抗炎因子^[18]，IL-4 可促进 IgE 和 IgG1 的生成从而下调 CD14 的表达，并且能够抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 的表达，还可降低 LPS 诱导转录因子(activator protein 1, AP-1)的结合活性以及 NF- κ B 的转录活性，从而减弱肺损伤的发生发展^[19]。IL-10 可抑制巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1、IL-6 和趋化因子，从而抑制巨噬细胞对淋巴细胞的辅助作用^[20]。并且在转录以及转录后水平对于多种促炎因子的产生具有抑制作用，能够促进抗炎因子的产生，能够更好的拮抗炎症反应发生。NF- κ B 在炎症反应过程中也有极其重要的作用，它作为一种转录调节因子，活化后上调炎性因子的表达，从而诱发炎症反应，最终导致靶器官损伤^[21]。

1.1.2.2. LPS 引起的 ALI/ARDS 的炎性细胞

正常情况下，肺泡内的细胞主要为巨噬细胞，ALI 发生后，主要以中性粒细胞为主，含量在 90% 以上，机体内 PMN 主要存在于骨髓、血液和组织中，炎性介质进入血液后能迅速刺激骨髓释放更多的 PMN^[22]，并与 PMN 表面的受体相互作用导致 PMN 内的细胞骨架重新分布，这将使 PMN 变硬，由于 PMN 的直径大于肺毛细血管，必须通过变形与延伸才能通过，变硬后其变形能力减弱，使得大量的 PMN 留滞在血管内^[23]，另一方面，由于释放的细胞大多属于不成熟细胞，本身变形能力较差，这都使得 PMN 在毛细血管内的大量聚集。炎性因子刺激 PMN 活化后释放大量的氧自由基、蛋白酶等细胞毒性物质，对肺泡上皮细胞以及毛细血管内皮细胞造成损伤，导致毛细血管的通透性增加，使得 PMN 穿过内皮进入肺泡腔内以及肺间质中，持续活化产生大量的粘附分子以及活性物质等，最终导致弥漫性的肺组织损伤^[24]。

肺泡上皮巨噬细胞 (alveolar epithelial macrophages, AM) 在 ALI 的发生过程中也具有不可忽视的作用^[25, 26]，它占正常肺组织内细胞的 80% 以上，AM 除了具有吞噬作用外，也是细胞因子的主要来源，LPS 进入机体后 AM 首先被持续过度激活，产生大量的前炎性细胞因子，如 TNF- α 、IL-1 等，启动炎性炎症反应的级联反应，并且进一步激活、趋化 PMN 在肺泡腔-肺毛细血管内的大量聚集，产生呼吸爆发，引起 ALI^[27]。

1.1.2.3. 参与 LPS 诱导的 ALI 的其他机制

细胞凋亡紊乱：细胞凋亡是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主有序的死亡，与炎症反应相独立的细胞变化。但是最新研究表明，细胞凋亡也参与了 ALI 的发病过程^[28, 29]。ALI 发生时，肺毛细血管内皮细胞以及肺泡上皮细胞的凋亡增加，上皮细胞的凋亡引起肺泡表面的活性物质减少，导致肺泡塌陷，毛细血管内皮细胞的凋亡使得毛细血管的完整性受损并且引起通透性增加，促进肺水肿的发生，导致肺功能障碍^[30]。表达于多种细胞表面的 Fas 是一种跨膜蛋白，属于肿瘤坏死因子受体超家族成员，它与 FasL 结合可以启动凋亡信号的转导引起细胞凋亡，单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等均有表达，ALI 发生时，Fas 能诱导 AM 和 PMN 凋亡，AM 的凋亡增加使得其吞噬能力减弱，凋亡的 PMN 不能及时被清除，从而加重炎症反应。ALI 发生后产生的大量的炎症因子以及暂时升高的钙离子都使得 PMN 的正常凋亡途径发生障碍，引起 PMN 在炎症部位的大量聚集，造成持续性损伤，加重 ALI 的反应^[28]。

促凝/抗凝反应的失衡^[31]：由于肺部的血流十分丰富，凝血与抗凝系统的作用不可忽视，研究发现 ALI 时凝血与抗凝系统发生异常，正常生理状态下，凝血系统主要防止血栓的形成以及溶解纤维蛋白原，但是 ALI 发生时，它的作用正好相反，转为促进凝血以及抗纤维蛋白原溶解，凝血系统受到内源性以及外源性两方面因素的调节，LPS 进入机体后，可直接活化内源性凝血系统，通过激活凝血因子 XII，引发微血栓形成以及高凝状态出现，同时依赖于外源性组织因子(tissue factor, TF)的凝血调节系统被激活，LPS 主要通过 ASK I - P38MAPK 通路调节 TF 的表达^[32]，ALI 发生时 TF 主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞以及透明膜中表达，肺泡上皮细胞在 LPS 刺激下还可以释放活性物质增加 TF 的促凝活性^[33]，导致外源性的凝血系统失常，致使形成大量凝血酶和纤维素沉积。凝血酶能够使 PMN 粘附于内皮细胞的能力增加并促使其表达选择素，纤维素使得毛细血管的通透性增加，并且能够活化内皮细胞，诱导 PMN 的粘附并且促使其迁移。凝血产物增多加重肺损伤，炎症反应增强，产生大量的炎症介质，又可进一步促进凝血反应的发生，凝血以及纤溶系统的失衡对于 ALI 的发生发展也有着极其重要的作用^[34]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.