

· 基础研究 ·

## 甘草酸二铵上调急性肺损伤大鼠糖皮质激素受体的表达\*

张剑锋,李超乾,郑晓文,赵春菱,凌志安,唐春柳  
(广西医科大学第一附属医院急诊科,南宁 530007)

**摘要:**目的 观察甘草酸二铵(DG)对急性肺损伤(ALI)大鼠肺组织糖皮质激素受体(GR)及血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10(IL-10)表达的影响。方法 将 36 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(S组)、ALI组、DG 干预组(HLG组)、地塞米松干预组(HLD组)、ALI 受体阻断组(ALIR组)和 DG 干预受体阻断组(HLGR组)。各组动物造成失血性休克,然后给予内毒素(LPS)2 mg/kg 腹腔注射;LPS 注射前 1 h,分别给予 DG 20 mg/kg 或地塞米松 2 mg/kg 腹腔注射,ALIR组和 HLGR组大鼠肌肉注射受体阻断剂 RU486。测定大鼠肺湿干比(W/D)、血氧分压(PaO<sub>2</sub>),并检测肺组织 GR mRNA 及 GR 蛋白的表达,同时测定血清 TNF- $\alpha$ 、IL-10 浓度。结果 (1)ALI组 TNF- $\alpha$  明显高于 S组、HLGR组和 HLG组( $P < 0.01$ );ALI组 IL-10 明显高于 S组( $P < 0.01$ ),但低于 HLG组和 HLGR组( $P < 0.05$ )。 (2)ALI组 GR mRNA 和蛋白的表达明显低于 S组( $P < 0.01$ );HLG组 GR mRNA 和蛋白的表达则明显高于 ALI组( $P < 0.05, P < 0.01$ )。 (3)ALI组肺组织出现充血、水肿、中性粒细胞浸润,HLG组肺部炎症较 ALI组减轻。结论 DG 可能通过上调 GR 及 IL-10 的表达,同时抑制 TNF- $\alpha$  的过度表达,从而起到减轻 ALI 的作用。

**关键词:**呼吸窘迫综合征,成人;甘草酸二铵;受体,糖皮质激素;细胞因子类

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.10.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)10-0970-03

## Upregulation of glucocorticoid receptor by diammonium glycyrrhizinate in rat with acute lung injury\*

Zhang Jianfeng, Li Chaoqian, Zheng Xiaowen, Zhao Chunling, Ling Zhian, Tang Chunliu

(Department of Emergency, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530007, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of diammonium glycyrrhizinate (DG) on the expressions of glucocorticoid receptor and cytokines in serum, and to explore the protective mechanism of DG in acute lung injury (ALI) induced by hemorrhagic shock combined with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Thirty-six male Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups ( $n=6$ ): sham group, ALI group, DG treated group, dexamethasone treated group, ALI receptor blocked group, and DG treated and ALI receptor blocked group. Rats were administered with LPS (2 mg/kg) after hemorrhagic shock, 1 hour before LPS injection, DG (20 mg/kg) or dexamethasone (2 mg/kg) was administered, and rats in receptor blocked group were administered RU486 (20 mg/kg). The rat lung wet/dry ratio and PaO<sub>2</sub> were calculated, the expression of GR mRNA and GR protein were determined by RT-PCR and Western blot, respectively. The concentration of TNF- $\alpha$  and IL-10 in serum were observed by ELISA. **Results** (1) TNF- $\alpha$  levels in sham group, ALI group, and DG treated group were (43.89  $\pm$  7.25), (153.76  $\pm$  20.69), and (87.35  $\pm$  7.57) ng/L, respectively, and IL-10 levels were (24.57  $\pm$  8.41), (42.54  $\pm$  6.58), and (58.03  $\pm$  9.66) ng/L, respectively, the difference being significant between groups ( $F=106.51, 33.40$ , all  $P < 0.01$ ). (2) GR mRNA expression (A) in sham group, ALI group, and DG treated group were (0.443  $\pm$  0.017), (0.175  $\pm$  0.026), and (0.316  $\pm$  0.029), respectively, and GR protein expression were (56.7  $\pm$  6.5), (14.5  $\pm$  2.6), and (24.7  $\pm$  4.9), respectively, the difference being significant between groups ( $F=86.068, 249.7$ , all  $P < 0.01$ ). (3) Compared with sham group, infiltration of PMNs, capillary congestion and swelling were found in rat lung of ALI group, treatment with DG could relieve lung injury. **Conclusion** Diammonium glycyrrhizinate has a protective effect on rats with ALI induced by hemorrhagic shock combined with LPS. It may involve in down-regulating of the expression of TNF- $\alpha$ , and up-regulating of the expression of GR and IL-10.

**Key words:** respiratory distress syndrome, adult; diammonium glycyrrhizinate; receptors, glucocorticoid; cytokines

研究证实甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate, DG)对急性肺损伤(acute lung injury, ALI)大鼠具有良好的抗炎作用<sup>[1]</sup>。近年研究发现 ALI 大多出现糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)下调,从而影响药物对 ALI 的治疗效果<sup>[2-3]</sup>。DG 结构与肾上腺皮质激素类似<sup>[4]</sup>,具有类似激素样抗炎作用,其是否通过与 GR 结合发挥抗炎作用,抑或通过上调 GR 表达而发挥作用?目前尚缺乏相应研究。本研究采用失血性休克复合内毒素(lipopolysaccharide, LPS)注射诱导大鼠 ALI 模型,观察 DG 预处理对肺组织 GR 及血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-10(IL-10)表达的影响;并对部分 ALI 大鼠采用 RU486 进行 GR 阻断,观察 DG 的作用效应,以探讨 DG 对 ALI 的保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 脂多糖(LPS, O55:B5, 美国 Sigma 公司), DG(江苏正大天晴制药有限公司),米非司酮(RU486)(美国 Sigma 公司),IL-10、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(武汉博士德生物公司),TRIZOL 试剂盒(美国 Boehringer mannheim 公司),逆转录试剂盒(美国 Promega 公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术研究所),兔抗大鼠 GR 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中山试剂公司),DNA 电泳 marker(广州东盛生物科技有限公司)。

**1.2 实验动物及分组** 按随机数字表法,将 36 只雄性 SD 大鼠(体质量 200~250 g,广西医科大学动物实验中心提供)分为假手术组(S组),ALI组,DG 干预组(HLG组),地塞米松干预

\* 基金项目:广西教育厅科研课题资助项目(201012MS057);广西卫生厅重点课题资助项目(重 2011092)。

表 1 各组大鼠 W/D、PaO<sub>2</sub> 及血清 TNF-α、IL-10 的变化 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	W/D	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	血清 IL-10(ng/L)	血清 TNF-α(ng/L)
S 组	5.082±0.496	95.405±3.512	24.57±8.41	43.89±7.25
ALI 组	7.422±0.752*	67.656±3.364*	42.54±6.58*	153.76±20.69*
ALIR 组	7.873±0.687*	62.972±3.094*	43.52±7.23*	196.01±18.64*
HLG 组	5.738±0.521*#	82.127±4.118*#	58.03±9.66*△	87.35±7.57*#
HLD 组	5.926±0.353*#	80.817±2.997*#	43.74±7.69*	76.56±8.62*#
HLGR 组	5.773±0.375*#	81.271±4.151*#	56.17±5.63*△	102.33±8.14*#
F	28.198	72.814	33.40	106.51
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

\*: P<0.01, 与 S 组比较; #: P<0.01, △: P<0.05, 与 ALI 组比较。

组(HLD 组), ALI 受体阻断组(ALIR 组)和 DG 干预受体阻断组(HLGR 组), 每组 6 只。ALI 模型建立操作如下: 动物 10% 水合氯醛麻醉后, 手术切开分离颈动脉, 并行动脉插管放血, 造成失血性休克(平均动脉压 50 mm Hg, 维持 60 min), 1 h 后腹腔注射 LPS(2 mg/kg)。HLG 组和 HLGR 组于失血性休克 1 h 后腹腔注射 DG(20 mg/kg), HLD 组于失血性休克 1 h 后腹腔注射地塞米松(2 mg/kg)。ALIR 组和 HLGR 组于麻醉前 1 h 肌肉注射 RU486(20 mg/kg)。LPS 注射 6 h 后处死动物留取标本。监测大鼠血气变化情况, 以氧合指数(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>) 小于 300 mm Hg 作为 ALI 模型成功的标准<sup>[5]</sup>。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 大鼠肺湿干比(W/D)测定 动物放血处死后, 立即开胸取肺, 结扎右肺, 滤纸吸干肺脏表面水分, 称取右下肺组织湿重, 然后置 80 °C 烤箱干燥, 72 h 后取出, 称取干重, 计算 W/D, 以此评估肺水肿程度。

1.3.2 大鼠动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)检测 将大鼠麻醉后沿腹正中中线切开, 抗凝注射器腹主动脉取血 1.5~2 mL, 通过全自动血气分析仪进行检测。

1.3.3 肺组织病理观察 剪取部分右肺组织, 10% 甲醛固定, HE 染色, 光镜观察。

1.3.4 细胞因子 IL-10、TNF-α 的测定 采取双抗体夹心法, 严格按照 ELISA 试剂盒操作说明进行。

1.3.5 肺组织 GR mRNA 水平检测 采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术对转录产物进行扩增, 以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参对照。mRNA 引物由上海生工公司合成, 大鼠 GR 序列: 5'-TCT GCT TTG CTC CTG AT-3' (上游), 5'-GAG TTC CCT TCC CTT TT-3' (下游), 扩增片段长 262 bp, 反应条件: 95 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s; GAPDH 序列: 5'-GCA GTG ATG GCA TGG CAC TGT-3' (上游), 5'-TCA TTG ACC TCA ACT ACA TG-3' (下游), 扩增片段长 475 bp, 反应条件: 95 °C 45 s, 56.6 °C 45 s, 72 °C 60 s。各组反应均为 35 个循环, 终末延伸为 72 °C, 10 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Gel Doc 2000 型凝胶电泳成像分析系统(意大利 BiO-RAD 公司)分析扩增产物条带的 A 值, 以目的基因与内参对照的吸光度比值表示 mRNA 相对表达量。

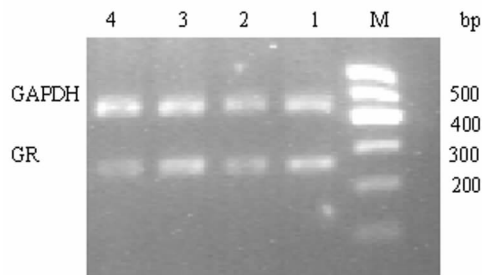
1.3.6 肺组织 GR 蛋白水平检测 采用蛋白免疫印迹(Western blot, WB)方法。用蛋白裂解液提取肺组织蛋白并测定浓度(BCA 法), 行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白转印至硝酸纤维素膜, 在封闭液中与一抗(兔抗大鼠 GR 单克隆抗体)结合, 然后再与二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG)室温孵育过夜, 在暗室中采用化学发光反应试剂盒进行发光, 暗室曝光, 底片经 LEICA Q2550IW 图像处理系统分析, 测定各条带的光密度值, 进行定量分析<sup>[6]</sup>。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计分析软件处理, 各组合计资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 成组资料采用单因素方差分析  $\chi^2$ , 先进行方差齐性检验, 各组间相互比较采用 q 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验大鼠基本情况 S 组大鼠呼吸匀称, 食欲正常, 活动灵活, 鼠毛色泽光亮清洁, 精神状态佳。ALI 组大鼠 LPS 打击后 1 h 即进食进水量减少, 嗜睡、烦躁, 走路不稳, 呼吸急促, 口鼻分泌物增多, 甚至出现四肢无力。ALIR 组病情更为加重。各干预组(HLG 组、HLD 组和 HLGR 组)与 ALI 组比较仍可见上述中毒反应, 但程度减轻, 尤其是呼吸困难明显减轻。S 组大鼠全部存活, ALI 组 3 只死亡, ALIR 组 4 只死亡, HLG 组、HLD 组和 HLGR 组死亡数分别为 1 只、2 只和 2 只。

2.2 肺组织病理学改变 S 组大鼠肺组织结构清晰, 肺泡腔无炎性细胞浸润, 间质血管无扩张, 支气管黏膜上皮完整。ALI 组及 ALIR 组大鼠肺组织大体标本可见肺组织肿胀, 散在出血点, 光镜下观察见肺泡间隔明显增宽, 肺泡壁完整性破坏, 肺组织大量炎症细胞浸润, 肺泡腔红细胞及单核巨噬细胞渗出。HLG 组、HLD 组和 HLGR 组病变不同程度减轻, 组织轻度水肿, 见炎症细胞浸润, 未见出血点, 肺泡结构完整。见封 3 图 1。



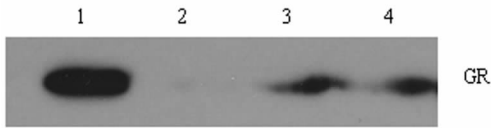
M: 标志物; 1: S 组; 2: ALI 组; 3: HLG 组; 4: HLD 组。

图 2 大鼠肺组织 GR mRNA 表达变化

2.3 大鼠肺 W/D、PaO<sub>2</sub> 及血清 TNF-α、IL-10 变化 ALI 组及 ALIR 组肺 W/D 升高, PaO<sub>2</sub> 明显下降, 血清 TNF-α 浓度显著升高, IL-10 浓度亦有升高, 与 S 组比较差异有统计学意义(P<0.01); HLG 组、HLD 组和 HLGR 组 W/D 降低, 血清 TNF-α 浓度显著降低, PaO<sub>2</sub> 回升, 与 ALI 组比较差异有统计学意义(P<0.01); HLG 组和 HLGR 组 IL-10 浓度进一步增高, 与 ALI 组比较差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

2.4 大鼠肺组织 GR mRNA/GR 表达变化 与 S 组比较, ALI 组肺 GR 及 GR mRNA 表达均明显降低(P<0.01); DG 干预后肺组织 GR 及 GR mRNA 表达均有所升高, 与 ALI 组比较差异有统计学意义(P<0.05), 而 HLD 组 GR 及 GR mRNA 表达与 ALI 组比较差异无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

及图 2、3。



1: S 组; 2: ALI 组; 3: HLD 组; 4: HLG 组。

图 3 大鼠肺组织 GR 蛋白表达变化

表 2 大鼠肺 GR mRNA、GR 表达变化 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	GR mRNA	GR
S 组	0.443 ± 0.017	56.7 ± 6.5
ALI 组	0.175 ± 0.026*	14.5 ± 2.6*
HLG 组	0.316 ± 0.029* <sup>△</sup>	24.7 ± 4.9* <sup>#</sup>
HLD 组	0.187 ± 0.015*	16.3 ± 3.4*
F	86.068	249.7
P	<0.01	<0.01

\*:  $P < 0.01$ , 与 S 组比较; #:  $P < 0.01$ ,  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与 ALI 组比较。

### 3 讨论

ALI 本质上是机体炎症反应/抗炎反应平衡失控导致的严重后果<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,失血性休克复合内毒素注射诱发 ALI 大鼠 TNF- $\alpha$  显著升高,而抗炎介质 IL-10 仅轻度升高,表明肺损伤过程存在炎症反应失控。本实验还发现,ALI 大鼠肺组织 GR 表达水平显著下降,GR 下调直接影响了糖皮质激素对 ALI 的疗效<sup>[2]</sup>。

本研究结果证实 DG 能减轻内毒素诱导 ALI 大鼠的肺水肿程度,肺组织病理得到一定程度减轻,DG 治疗后血清 TNF- $\alpha$  浓度降低,IL-10 浓度进一步升高。同时发现,DG 可上调肺损伤时受抑制的 GR 转录水平及蛋白表达水平,而地塞米松未具备这一功能。DG 是从中草药甘草中提取的一种有效成分单体,其结构与肾上腺皮质激素类似,具有类激素样抗炎、抗病毒等作用<sup>[8-9]</sup>,推测 DG 至少是部分通过 GR 信号通路来调节 ALI 炎症失控状态<sup>[10-11]</sup>。

DG 究竟通过何种途径对 GR 进行调节? 目前研究尚未完全明确。为此,本实验采用糖皮质激素受体阻断剂 RU486 特异性阻断 GR,观察 DG 对 ALI 大鼠的影响,结果表明 DG 仍能明显减轻 ALI 大鼠肺损伤程度,同时 TNF- $\alpha$  浓度降低,IL-10 浓度进一步升高,说明 DG 的类激素样抗炎效应并非通过与 GR 结合而起作用,而是另有作用途径。已有研究发现,DG 能通过抑制高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1)<sup>[12-13]</sup> 和上调 GR 表达<sup>[14]</sup> 而发挥作用,最近研究发现,DG 可上调 ALI 大鼠肺组织热休克蛋白 70 的表达水平<sup>[15]</sup>。另有研究证实,甘草酸通过直接抑制肺泡上皮细胞白介素-8 (IL-8) 及核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 活性而达到抗炎效应<sup>[16]</sup>。

综上所述,DG 能显著抑制 TNF- $\alpha$  的过度表达,同时上调抗炎介质 IL-10 和 GR 的表达水平,从而明显减轻内毒素诱导的大鼠急性肺损伤程度,但 DG 并非通过与 GR 结合而起作用,其上调 GR 表达的具体调控途径尚需进一步研究明确。

### 参考文献:

[1] 赵晓琴,张剑锋,邴晓聪,等.甘草酸二铵对急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞白介素 10 及 18 表达影响[J].中华

结核和呼吸杂志,2004,27(2):126-127.

- [2] Da J, Chen L, Hedenstierna G. Nitric oxide up-regulates the glucocorticoid receptor and blunts the inflammatory reaction in porcine endotoxin sepsis[J]. Crit Care Med, 2007, 35(1): 26-32.
- [3] 马钧. 急性呼吸窘迫综合征患者糖皮质激素合理使用方案及受体机制[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(11): 680-682.
- [4] Wu P, Zhang Y, Liu Y, et al. Effects of glycyrrhizin on production of vascular aldosterone and corticosterone[J]. Horm Res, 1999, 51(4): 189-192.
- [5] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al. The American-European consensus conference on ARDS. definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149(3 pt 1): 818-824.
- [6] Kettritz R, Choi M, Rolle S, et al. Integrins and cytokines activate nuclear transcription factor-kappaB in human neutrophils[J]. J Biol Chem, 2004, 279(4): 2657-2665.
- [7] Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis[J]. Infect Immun, 1996, 64(11): 4733-4738.
- [8] Takei M, Kobayashi M, Li XD, et al. Glycyrrhizin inhibits R5 HIV replication in peripheral blood monocytes treated with 1-methyladenosine[J]. Pathobiology, 2005, 72(3): 117-123.
- [9] Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Glycyrrhizin, an active component of liquorice Roots, and replication of SARS-associated coronavirus [J]. Lancet, 2003, 361(9374): 2045-2046.
- [10] Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro[J]. Life Sci, 2007, 80(20): 1821-1831.
- [11] Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, et al. A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release[J]. Am J Physiol, 2002, 283(6): C1592-C1603.
- [12] Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities[J]. Chem Biol, 2007, 14(4): 431-441.
- [13] 张剑锋,李超乾,磨静佳,等.甘草酸二铵对急性肺损伤大鼠肺组织转化生长因子  $\beta_1$  及 HMGB1 表达的影响[J]. 中国急救医学, 2010, 30(5): 435-438.
- [14] 柳涛,王保法,王晓红,等.甘草对慢性阻塞性肺疾病患者糖皮质激素受体的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(10): 18-20.
- [15] 周道扬,张剑锋,李超乾,等.甘草酸二铵上调急性肺损伤大鼠热休克蛋白 70 的表达[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(8): 839-842.
- [16] Takei H, Baba Y, Hisatsune A, et al. Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor-kappaB activity in lung epithelial cells, but not through glucocorticoid receptors[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 106(3): 460-468.