

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2020.01.014

论著·实验研究

积雪草苷对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良的保护作用及其机制研究

麦朗君 符学兴 何罡 赵二依 薛明

(儋州市人民医院儿科, 海南 儋州 571700)

【摘要】 目的 基于小分子 RNA-155 (miR-155) / 细胞因子信号抑制因子 1 (SOCS1) 轴研究积雪草苷对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良的保护作用。**方法** 将新生大鼠随机分为对照组、模型组、积雪草苷低剂量 (10 mg/kg) 组、积雪草苷中剂量 (25 mg/kg) 组、积雪草苷高剂量 (50 mg/kg) 组、布地奈德 (1.5 mg/kg) 组, 每组 12 只。除对照组外的其他各组在高浓度氧中暴露 14 d 建立新生大鼠支气管肺发育不良模型, 同时以相应浓度积雪草苷对不同剂量积雪草苷组进行灌胃, 布地奈德组行布地奈德雾化治疗。采用苏木精-伊红染色检测各组大鼠肺组织发育情况, 测定放射状肺泡计数 (RAC)、肺泡平均截距 (MLI); 采用超氧化物歧化酶 (SOD) 及丙二醛 (MDA) 检测试剂盒分别检测肺组织 SOD、MDA 水平; 采用酶联免疫吸附法检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 6 (IL-6) 水平; 采用实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠肺组织中 miR-155、SOCS1 的 mRNA 水平; 采用蛋白免疫印迹法检测各组大鼠肺组织中 SOCS1 蛋白的相对表达。**结果** 与对照组相比, 模型组大鼠出现肺组织结构紊乱, 肺泡融合增大, 肺泡间隔不均, 平均间隔增大, 肺泡数量明显减少等肺发育不良症状, 同时 MLI、肺组织 MDA 水平、血清 IL-6 及 TNF- α 水平、肺组织 miR-155 水平均明显升高 ($P < 0.05$), 肺组织 RAC、SOD 水平、SOCS1 mRNA 及蛋白水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组、布地奈德组大鼠上述肺发育不良症状改善, MLI、肺组织 MDA 水平、血清 IL-6 及 TNF- α 水平、肺组织 miR-155 水平均降低 ($P < 0.05$), 肺组织 RAC、SOD 水平、SOCS1 mRNA 及蛋白水平均升高 ($P < 0.05$), 且积雪草苷对肺发育不良症状及上述指标的改善程度有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, 上述指标差异均无统计学意义, 且均达到对照组水平 ($P > 0.05$)。**结论** 积雪草苷可减轻高氧导致的新生大鼠肺部炎症损伤, 改善支气管肺发育不良症状, 且存在剂量依赖性。其作用机制可能与下调 miR-155 表达、上调 SOCS1 表达有关。
[中国当代儿科杂志, 2020, 22(1): 71-76]

【关键词】 支气管肺发育不良; 积雪草苷; 小分子 RNA-155; 细胞因子信号抑制因子 1; 新生大鼠

Effect of asiaticoside on hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal rats and related mechanism

MAI Lang-Jun, FU Xue-Xing, HE Gang, ZHAO Er-Nong, XUE Ming. Department of Pediatrics, Danzhou People's Hospital, Danzhou, Hainan 571700, China (Email: mailangjun986@163.com)

Abstract: Objective To study the protective effect of asiaticoside against hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia in neonatal rats based on the microRNA-155 (miR-155)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) axis. **Methods** Neonatal rats were randomly divided into a control group, a model group, a low-dose asiaticoside group (10 mg/kg), a middle-dose asiaticoside group (25 mg/kg), a high-dose asiaticoside group (50 mg/kg), and a budesonide group (1.5 mg/kg), with 12 rats in each group. All rats except those in the control group were exposed to a high concentration of oxygen for 14 days to establish a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia. The low-, middle-, and high-dose asiaticoside groups were given asiaticoside at different doses by gavage, and those in the budesonide group were given budesonide aerosol treatment. Hematoxylin and eosin staining was used to observe lung tissue development and measure radial alveolar count (RAC) and mean linear intercept (MLI). Superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) detection kits were used to measure the levels of SOD and MDA in lung tissue. ELISA was used to measure

[收稿日期] 2019-07-26; [接受日期] 2019-12-11

[基金项目] 海南省卫生计生行业科研项目 (17A200125)。

[作者简介] 麦朗君, 男, 本科, 主治医师。Email: mailangjun2008@126.com。

the serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Quantitative real-time PCR was used to measure the mRNA expression of miR-155 and SOCS1 in lung tissue. Western blotting was used to measure the protein expression of SOCS1 in lung tissue. **Results** Compared with the control group, the model group had the symptoms of bronchopulmonary dysplasia such as a disordered structure of lung tissue, enlargement of alveolar fusion, uneven alveolar septa, enlargement of average alveolar space, and a reduction in alveolar number. The model group also had significant increases in MLI, MDA level in lung tissue, serum levels of IL-6 and TNF- α , and miR-155 level in lung tissue ($P<0.05$) and significant reductions in RAC, SOD level, and mRNA and protein expression of SOCS1 in lung tissue ($P<0.05$). Compared with the model group, the low-, middle-, and high-dose asiaticoside groups and the budesonide group had significant improvement in the above symptoms of bronchopulmonary dysplasia, significant reductions in MLI, MDA level in lung tissue, serum levels of IL-6 and TNF- α , and miR-155 level in lung tissue ($P<0.05$), and significant increases in RAC, SOD level, and mRNA and protein expression of SOCS1 in lung tissue ($P<0.05$). Asiaticoside improved the above symptoms and indices in a dose-dependent manner. There were no significant differences in the above indices between the high-dose asiaticoside and budesonide groups ($P>0.05$). **Conclusions** Asiaticoside can alleviate inflammation injury induced by hyperoxia in neonatal rats and improve the symptoms of bronchopulmonary dysplasia in a dose-dependent manner, possibly by down-regulating the expression of miR-155 and up-regulating the expression of SOCS1. [Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(1): 71-76]

Key words: Bronchopulmonary dysplasia; Asiaticoside; microRNA-155; Suppressor of cytokine signaling-1; Neonatal rats

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是早产儿常见的慢性肺部疾病, 严重时可能造成生长发育迟缓、肺功能不全等多种并发症, 严重威胁患儿生长发育^[1-2]。早产儿在进行机械通气和氧疗时, 高氧会使患儿体内产生大量活性氧及自由基, 导致促炎因子 IL-6、TNF- α 等大量合成分泌, 引起严重的炎症及氧化应激反应, 降低超氧化物歧化酶 (SOD) 水平, 使脂质发生过氧化反应产生过量丙二醛 (MDA), 引起肺损伤, 在 BPD 的发生发展中起到重要作用^[3-5]。积雪草苷为中药积雪草的活性成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗组织纤维化、保护肺脏的作用^[6], 可通过抑制平阳县素引起的炎症而减弱肺间充质的纤维化^[7], 因而积雪草苷可能通过抑制炎症减轻高氧所致的新生大鼠 BPD 症状。小分子 RNA-155 (microRNA-155, miR-155) 不编码蛋白, 细胞因子信号抑制因子 1 (suppressor of cytokine signaling 1, SOCS1) 是一种可减轻炎症的蛋白, miR-155 可下调 SOCS1 蛋白水平, 增强炎症反应^[8]。miR-155 上调可加重肺损伤, SOCS-1 可通过抑制 NALP3 炎症小体的形成来抑制吸入烟雾所致的急性肺损伤, 因此 miR-155/SOCS1 信号是治疗肺损伤的一个靶点^[9-10], 下调 miR-155 表达、上调 SOCS1 表达可能是积雪草苷改善高氧致新生大鼠 BPD 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 75 只, 雌雄

各半, 体重为 160~200 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (川) 2017-0011, 动物使用许可证号: SYXK (川) 2017-0049, 质量合格证号: NO.0016681。大鼠饲养于清洁、安静、通风良好的环境中, 自由饮食、饮水, 自然光照, 温度 25℃, 湿度 50%, 定期更换垫料、清理消毒鼠笼。

1.2 主要试剂及仪器

积雪草苷 (广西昌洲天然产物开发有限公司, 批号: 20180124, 质量分数: 95%); 吸入用布地奈德混悬液 (阿斯利康制药有限公司, 国药准字: H20090903, 批号: 20180307); miR-155、U6、SOCS1、GAPDH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; SOD 检测试剂盒 (上海钰博生物科技有限公司); MDA 检测试剂盒 (上海信裕生物科技有限公司); 大鼠 IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒、兔源 GAPDH 及 SOCS1 一抗、羊抗兔二抗 (美国 Abcam 公司); RNAiso Plus、逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司); RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、HE 染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)。XELx800 酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); CFX96 Touch Deep Well 荧光定量 PCR 仪、1659001 蛋白电泳仪、Trans-Blot SD 半干转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 3900 型高通量 DNA 合成仪 (美国应用生物系统公司); Centrifuge 5424R 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 股份公司); CY100 型数字测氧仪 (杭州立华仪器有限公司); RM2035 轮转切片机、EG1160 包埋机、HI1220 烤片机 (德国 Leica 公司); Eclipse

E200 实验室教学生物显微镜（日本尼康公司）。

1.3 新生大鼠 BPD 模型制备及分组给药

SD 大鼠雌雄配对合笼后，将孕鼠分娩出的 1 日龄新生大鼠随机分为对照组、模型组、积雪草苷低剂量组、积雪草苷中剂量组、积雪草苷高剂量组、布地奈德组，每组 12 只。参考文献^[11]，将除对照组外的其他各组大鼠及其母鼠置于有机玻璃箱（100 cm × 50 cm × 30 cm）内，持续输入氧气，用测氧仪监测氧浓度，使其为 60%，箱中放置钠石灰吸收 CO₂，使其浓度 <0.5%，箱内温度、湿度与动物房内保持一致；对照组暴露在空气中，于动物房内常规饲养，定时更换垫料，添加水、饲料，并与对照组互换母鼠以避免其氧中毒，持续 14 d 造模，苏木精-伊红（HE）染色检测模型大鼠肺组织，呈现肺组织结构紊乱，肺泡融合增大，肺泡间隔不均，平均间隙增大，肺泡数量明显减少等肺发育不良症状，表示模型建立成功。共造模 63 只，成功 60 只，成功率为 95%。

造模同时，参照文献^[12]，以生理盐水溶解积雪草苷，配制浓度为 1.0、2.5、5.0 mg/mL 的溶液，以 10 mL/kg 的剂量分别对不同剂量积雪草苷组大鼠进行灌胃；布地奈德组大鼠以 1.5 mg/kg^[13] 剂量的布地奈德进行雾化吸入，并以等剂量的生理盐水灌胃；对照组与模型组大鼠以等剂量的生理盐水灌胃；1 d/次，共持续 14 d。

1.4 大鼠肺部病理检测及标本收集

末次给药 24 h 后，各组大鼠麻醉处死，经腹主动脉取血 1 mL，离心提取血清，储存在 -80℃ 备用。然后解剖分离肺组织，取 1.5 g 储存在 -80℃ 备用，剩余肺组织以生理盐水漂洗、4% 多聚甲醛固定、梯度酒精（由低到高）脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，以切片机做病理切片。参照说明书的步骤以 HE 试剂盒染色，经脱蜡、梯度酒精（由高到低）浸泡后置于蒸馏水中，再次经脱水、透明后封片，在光学显微镜下观察肺组织病理改变情况。每个标本随机取 3 张切片，每张切片随机选取 5 个视野，以 Image-Pro Plus 6.0 软件测定每个视野放射状肺泡计数（radial alveolar counts, RAC）、肺泡平均截距（mean linear intercept, MLI），取平均值。

1.5 大鼠肺组织 SOD 及 MDA 水平、血清 IL-6 及 TNF-α 水平检测

取肺组织约 1 g 加入蛋白裂解液，制备匀浆液，

取其上清，以 SOD、MDA 试剂盒检测肺组织 SOD 及 MDA 水平，具体操作参照说明书，剩余上清收集后储存在 -80℃ 备用。

取血清置于 4℃ 解冻后，采用 IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒检测血清 IL-6、TNF-α 水平，具体操作参照说明书。

1.6 大鼠肺组织 miR-155 mRNA 及 SOCS1 mRNA 水平检测

取剩余肺组织加入 RNAiso Plus 提取总 RNA，然后以逆转录试剂盒逆转录为 cDNA，具体操作步骤参照说明书进行。再以荧光定量 PCR 试剂盒进行荧光定量 PCR 反应，反应体系：SYBR Premix 12.5 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，cDNA 0.5 μL，dH₂O 10 μL。反应条件：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 30 s，58℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，35 个循环。使用 U6 作为 miR-155 的内参基因，以 GAPDH 作为 SOCS1 的内参基因，以 2^{-ΔΔCt} 法对所得数据进行分析，各基因引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

引物名称	序列 (5' → 3')
miR-155	F: GCGCGTTAATGCTAATTGTGAT R: GTGCAGGCTCCGAGGT
SOCS1	F: ACCAGGTGGCAGCCGACAAT R: ATGCGCCGTAATCGGAGTG
U6	F: GCGCGTCGTGAAGCGTTC R: GTGCAGGCTCCGAGGT
GAPDH	F: CATCTTCTTTTGCGTCGCCA R: TAAAAGCAGCCCTGCTGACC

1.7 大鼠肺组织 SOCS1 蛋白表达检测

将 1.5 中剩余的匀浆上清液置于 4℃ 解冻后，采用 BCA 试剂盒测得各组总蛋白浓度，具体操作参照说明书。各组分别取含相同质量总蛋白的样品液进行电泳，转移蛋白至 PVDF 膜上，以 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h，根据分子量截取目的蛋白条带，加入兔源 SOCS1 及 GAPDH 一抗（1:1000），4℃ 孵育过夜，以 TBST 漂洗，加入羊抗兔二抗（1:2000），室温孵育 2 h，以 TBST 漂洗，采用增强化学发光法显色，凝胶成像系统拍照，以 Quantity One 软件分析条带灰度值，结果以 SOCS1 蛋白灰度值 / GAPDH 灰度值表示。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件对所有数据进行统计学分析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，

多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织损伤情况

对照组肺组织肺泡结构清晰完整, 无损伤症状; 模型组大鼠肺组织出现结构紊乱, 肺泡融合增大, 肺泡间隔不均、平均间隙增大, 肺泡数量明显减少等肺发育不良症状; 积雪草苷低、中、

高剂量组大鼠上述肺发育不良症状有所改善, 且随剂量升高其改善程度增强; 积雪草苷高剂量组与布地奈德组大鼠上述肺发育不良症状改善程度相似。与对照组相比, 模型组大鼠MLI明显升高, RAC明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组及布地奈德组大鼠MLI明显降低, RAC明显升高, 且积雪草苷各剂量组具有剂量依赖性 ($P < 0.05$); 积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, MLI及RAC值差异均无统计学意义, 且均达到对照组水平 ($P > 0.05$)。见图1, 表2。

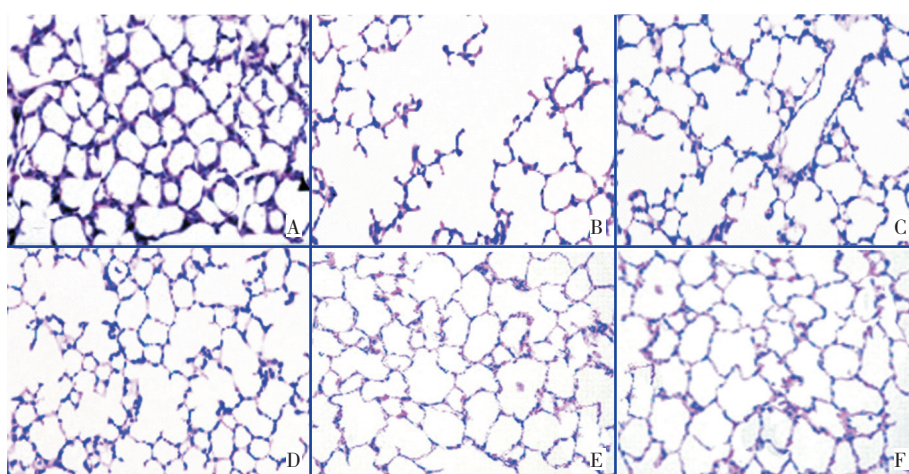


图1 各组大鼠肺组织病理结果(苏木精-伊红染色, $\times 200$) A: 对照组新生大鼠肺泡结构清晰完整, 无损伤症状; B: 模型组新生大鼠出现肺泡融合增大, 肺泡间隔不均、平均间隙增大, 肺泡数量明显减少等肺发育不良症状; C: 积雪草苷低剂量组新生大鼠肺发育不良症状较模型组有所改善; D: 积雪草苷中剂量组新生大鼠肺发育不良症状较积雪草苷低剂量组进一步改善; E: 积雪草苷高剂量组新生大鼠肺发育不良症状改善程度相比积雪草苷中剂量组更高, 肺组织基本恢复正常; F: 布地奈德组新生大鼠肺发育不良症状改善程度与积雪草苷高剂量组相似, 肺组织基本恢复正常。

表2 各组大鼠肺组织MLI及RAC比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	MLI (μm)	RAC (个)
对照组	38.8 ± 1.7	10.92 ± 0.81
模型组	53.3 ± 2.2^a	4.72 ± 0.19^a
积雪草苷低剂量组	$48.8 \pm 2.0^{a,b}$	$6.22 \pm 0.28^{a,b}$
积雪草苷中剂量组	$44.1 \pm 1.8^{a,b,c}$	$8.13 \pm 0.23^{a,b,c}$
积雪草苷高剂量组	$39.8 \pm 1.0^{b,c,d}$	$10.21 \pm 0.63^{b,c,d}$
布地奈德组	$40.0 \pm 1.9^{b,c,d}$	$10.33 \pm 0.72^{b,c,d}$
<i>F</i> 值	321.357	686.500
<i>P</i> 值	< 0.001	< 0.001

注: [MLI] 肺泡平均截距; [RAC] 放射状肺泡计数。a 示与对照组相比, $P < 0.05$; b 示与模型组相比, $P < 0.05$; c 示与积雪草苷低剂量组相比, $P < 0.05$; d 示与积雪草苷中剂量组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠肺组织SOD及MDA水平

与对照组相比, 模型组大鼠肺组织MDA水平

明显升高, SOD水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组及布地奈德组大鼠肺组织MDA水平降低, SOD水平升高, 且积雪草苷各剂量组之间有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, 肺组织MDA、SOD水平差异均无统计学意义, 且均达到对照组水平 ($P > 0.05$)。见表3。

2.3 各组大鼠血清中IL-6及TNF- α 水平变化

与对照组相比, 模型组大鼠血清中IL-6、TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组及布地奈德组大鼠血清中IL-6、TNF- α 水平均降低, 且积雪草苷各剂量组之间有剂量依赖性 ($P < 0.05$)。积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, 血清中IL-6、TNF- α 水平差异均无统计学意义, 且均达到对照组水平

($P>0.05$)。见表 4。

表 3 各组大鼠肺组织 SOD 及 MDA 水平比较
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)
对照组	118 ± 10	5.6 ± 0.4
模型组	79 ± 7 ^a	8.6 ± 0.9 ^a
积雪草苷低剂量组	93 ± 8 ^{a,b}	7.7 ± 0.8 ^{a,b}
积雪草苷中剂量组	103 ± 8 ^{a,b,c}	6.7 ± 0.5 ^{a,b,c}
积雪草苷高剂量组	115 ± 8 ^{b,c,d}	5.6 ± 0.4 ^{b,c,d}
布地奈德组	116 ± 8 ^{b,c,d}	5.6 ± 0.4 ^{b,c,d}
<i>F</i> 值	111.506	138.055
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: [SOD] 超氧化物歧化酶; [MDA] 丙二醛。a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与模型组相比, $P<0.05$; c 示与积雪草苷低剂量组相比, $P<0.05$; d 示与积雪草苷中剂量组相比, $P<0.05$ 。

表 4 各组大鼠血清中 IL-6 及 TNF- α 水平比较
($\bar{x} \pm s$, ng/mg, $n=12$)

组别	IL-6	TNF- α
对照组	0.431 ± 0.032	0.984 ± 0.055
模型组	1.162 ± 0.084 ^a	1.624 ± 0.072 ^a
积雪草苷低剂量组	0.915 ± 0.065 ^{a,b}	1.411 ± 0.037 ^{a,b}
积雪草苷中剂量组	0.766 ± 0.058 ^{a,b,c}	1.222 ± 0.023 ^{a,b,c}
积雪草苷高剂量组	0.502 ± 0.034 ^{b,c,d}	1.024 ± 0.027 ^{b,c,d}
布地奈德组	0.494 ± 0.021 ^{b,c,d}	1.018 ± 0.019 ^{b,c,d}
<i>F</i> 值	1064.785	1379.455
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与模型组相比, $P<0.05$; c 示与积雪草苷低剂量组相比, $P<0.05$; d 示与积雪草苷中剂量组相比, $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠肺组织中 miR-155 mRNA 及 SOCS1 mRNA 表达变化

与对照组相比, 模型组大鼠肺组织中 miR-155 mRNA 水平升高, SOCS1 mRNA 水平降低($P<0.05$)。与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组及布地奈德组大鼠肺组织中 miR-155 mRNA 水平降低, SOCS1 mRNA 水平升高, 且积雪草苷各剂量组之间有剂量依赖性($P<0.05$)。积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, 肺组织中 miR-155 mRNA 及 SOCS1 mRNA 水平差异均无统计学意义, 且均达到对照组水平($P>0.05$)。见表 5。

2.5 各组大鼠肺组织中 SOCS1 蛋白表达

与对照组相比, 模型组大鼠肺组织中 SOCS1

蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。与模型组相比, 积雪草苷低、中、高剂量组及布地奈德组大鼠肺组织中 SOCS1 蛋白表达水平升高, 且积雪草苷各剂量组之间有剂量依赖性($P<0.05$)。积雪草苷高剂量组与布地奈德组相比, SOCS1 蛋白表达水平差异无统计学意义, 且均达到对照组水平($P>0.05$)。见表 5、图 2。

表 5 各组大鼠肺组织中 miR-155 mRNA、SOCS1 mRNA 及其蛋白相对表达水平比较
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	miR-155 mRNA	SOCS1 mRNA	SOCS1
对照组	0.991 ± 0.073	1.012 ± 0.085	1.014 ± 0.055
模型组	2.265 ± 0.133 ^a	0.384 ± 0.026 ^a	0.154 ± 0.026 ^a
积雪草苷低剂量组	1.856 ± 0.085 ^{a,b}	0.578 ± 0.037 ^{a,b}	0.424 ± 0.033 ^{a,b}
积雪草苷中剂量组	1.438 ± 0.045 ^{a,b,c}	0.762 ± 0.045 ^{a,b,c}	0.685 ± 0.042 ^{a,b,c}
积雪草苷高剂量组	1.046 ± 0.039 ^{b,c,d}	0.970 ± 0.056 ^{b,c,d}	0.974 ± 0.045 ^{b,c,d}
布地奈德组	1.037 ± 0.025 ^{b,c,d}	0.982 ± 0.041 ^{b,c,d}	0.981 ± 0.052 ^{b,c,d}
<i>F</i> 值	1 659.066	936.649	2 490.669
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: [miR-155] 小分子 RNA-155; [SOCS1] 细胞因子信号抑制因子 1。a 示与对照组相比, $P<0.05$; b 示与模型组相比, $P<0.05$; c 示与积雪草苷低剂量组相比, $P<0.05$; d 示与积雪草苷中剂量组相比, $P<0.05$ 。

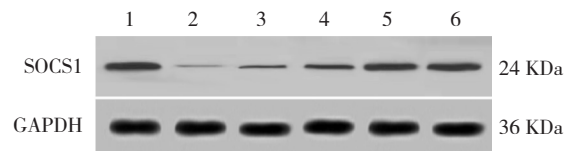


图 2 Western blot 法检测各组大鼠肺组织中 SOCS1 蛋白水平电泳图 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 积雪草苷低剂量组; 4: 积雪草苷中剂量组; 5: 积雪草苷高剂量组; 6: 布地奈德组。

3 讨论

如今 BPD 的发病率逐年增加, 预后差、病死率高^[14-15], 发病机制复杂, 公认高氧导致的氧化应激及炎症损伤是主要致病原因^[16], 因而本文将新生大鼠暴露在高氧中建立新生大鼠 BPD 模型。结果显示, 模型组大鼠肺组织结构紊乱, 肺泡融合增大, 肺泡间隔不均, 肺泡数量明显减少, MLI 明显升高、RAC 明显降低, 表明模型组新生大鼠肺泡减少, 出现发育不良症状。且模型组大鼠肺组织 MDA 水平、血清 IL-6 及 TNF- α 水平明显升高,

肺组织 SOD 水平明显降低,表明高氧引起大鼠肺组织氧化应激及炎症反应,损伤肺组织,最终导致肺发育不良,BPD 模型建立成功。

积雪草苷可抑制炎症因子分泌,减轻炎症损伤,促进肺上皮细胞存活,并可缓解肺纤维化,因而可能阻止高氧导致的 BPD^[17]。布地奈德是雾化吸入给药的糖皮质激素,具有高效的局部抗炎作用,可减轻支气管肺水肿,预防、治疗 BPD^[18],故可做为阳性对照药。miR-155 可靶向下调 SOCS1,促进炎症进展,引起肺损伤,下调其表达,可促进 SOCS1 表达,抑制炎症反应,因此 miR-155/SOCS1 是调控肺部氧化应激及炎症反应的作用靶点^[19],并可能是积雪草苷减轻高氧所致 BPD 的药理机制。模型大鼠经积雪草苷治疗后,可下调其肺组织 miR-155 表达,上调 SOCS1 表达,改善肺发育不良症状,降低肺组织 MLI、MDA、IL-6 及 TNF- α 水平,升高肺组织 RAC、SOD 水平,且有剂量依赖性,表明积雪草苷可调控 miR-155/SOCS1 信号,抑制高氧导致的炎症及氧化应激反应,改善 BPD 症状,且随剂量增加而疗效增强,表明积雪草苷可能通过下调 miR-155,上调 SOCS1 减轻高氧导致的氧化应激及炎症损伤,缓解新生大鼠 BPD。

综上所述,积雪草苷可减轻高氧导致的新生大鼠肺部氧化应激及炎症损伤,恢复肺泡结构功能,改善新生大鼠肺发育不良症状,并逆转高氧导致的 miR-155 表达上调及 SOCS1 表达下调,这可能是其药理机制,但本研究只进行了初步研究,未使用通路抑制剂、激动剂进行对照验证,还存在不足,有待于进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Davis NL. Commentary on "Oxygen desaturations in the early neonatal period predict development of bronchopulmonary dysplasia" by Fairchild et al[J]. *Pediatr Res*, 2019, 85(7): 927-928.
- [2] Shahzad T, Radajewski S, Chao CM, et al. Pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia: when inflammation meets organ development[J]. *Mol Cell Pediatr*, 2016, 3(1): 23.
- [3] Bhunwal S, Mukhopadhyay K, Bhattacharya S, et al. Bronchopulmonary dysplasia in preterm neonates in a level III neonatal unit in India[J]. *Indian Pediatr*, 2018, 55(3): 211-215.
- [4] Ito M, Nagano N, Arai Y, et al. Genetic ablation of Bach1 gene enhances recovery from hyperoxic lung injury in newborn mice via transient upregulation of inflammatory genes[J]. *Pediatr Res*, 2017, 81(6): 926-931.
- [5] Jobe AH, Bancalari EH. Controversies about the definition of bronchopulmonary dysplasia at 50 years[J]. *Acta Paediatr*, 2017, 106(5): 692-693.
- [6] 郭宇杰, 徐钧. 积雪草苷药理作用的研究进展 [J]. *山西医药杂志*, 2017, 46(15): 1829-1832.
- [7] 叶文静, 朱小春, 王晓冰, 等. 积雪草苷通过抑制炎症和纤维化减弱平阳霉素诱导的肺间质纤维化 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(1): 29-37.
- [8] Zheng X, Huang H, Liu J, et al. Propofol attenuates inflammatory response in LPS-activated microglia by regulating the miR-155/SOCS1 pathway[J]. *Inflammation*, 2018, 41(1): 11-19.
- [9] Yuan Z, Syed M, Panchal D, et al. TREM-1-accentuated lung injury via miR-155 is inhibited by LP17 nanomedicine[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(5): L426-L438.
- [10] Zhang L, Xu C, Chen X, et al. SOCS-1 suppresses inflammation through inhibition of NALP3 inflammasome formation in smoke inhalation-induced acute lung injury[J]. *Inflammation*, 2018, 41(4): 1557-1567.
- [11] 尹玲玲, 叶贞志, 唐丽君, 等. 大黄对高氧致新生大鼠支气管肺发育不良的影响 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2018, 20(5): 410-415.
- [12] Ye WJ, Zhu XC, Wang XB, et al. Asiaticoside attenuates bleomycin-induced interstitial pulmonary fibrosis[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2016, 30(1): 29-37.
- [13] 寇晨, 韩冬, 李兆娜, 等. 肺表面活性物质联合布地奈德气管内给药对早产儿支气管肺发育不良的防治效果 [J]. *中国医药*, 2019, 14(1): 53-57.
- [14] Méndez-Abad P, Zafra-Rodríguez P, Lubián-López S, et al. NTproBNP is a useful early biomarker of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants[J]. *Eur J Pediatr*, 2019, 178(5): 755-761.
- [15] McCrary AW, Barker PCA, Torok RD, et al. Agreement of an echocardiogram-based diagnosis of pulmonary hypertension in infants at risk for bronchopulmonary dysplasia among masked reviewers[J]. *J Perinatol*, 2019, 39(2): 248-255.
- [16] Chen XQ, Wu SH, Luo YY, et al. Lipoxin A₄ attenuates bronchopulmonary dysplasia via upregulation of Let-7c and downregulation of TGF- β_1 signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2094-2108.
- [17] 刘涛, 魏海龙, 李伟, 等. 积雪草苷对 TGF- β_1 诱导的肺泡上皮细胞增殖和 Vimentin 蛋白表达影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(1): 25-29.
- [18] Bassler D, Plavka R, Shinwell ES, et al. Early inhaled budesonide for the prevention of bronchopulmonary dysplasia[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(16): 1497-1506.
- [19] Rao R, Rieder SA, Nagarkatti P, et al. Staphylococcal enterotoxin B-induced microRNA-155 targets SOCS1 to promote acute inflammatory lung injury[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7): 2971-2979.

(本文编辑: 万静)