

## 实验研究

# 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠 CGRP、ET-1 的影响

李朝霞<sup>1</sup> 欧阳俊摇<sup>1</sup> 王雅丽<sup>1</sup> 赵 暉<sup>1</sup> 沈 素<sup>2</sup> 王丽丽<sup>2</sup> 李 任<sup>2</sup>

(1 首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京, 100069; 2 首都医科大学附属北京友谊医院, 北京, 100050)

**摘要** 目的:探讨蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠血浆降钙素基因相关肽(CGRP)、内皮素-1(ET-1)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的影响。方法:SD大鼠84只,雌雄各半,随机分为对照组、模型组、蛭丹化瘀组方3个剂量(33、16.5、8.25 g/kg)。大鼠气管内滴注LPS复制急性肺损伤大鼠模型,称重法检测大鼠肺含水量,放免法检测各组大鼠血浆ET、CGRP、TNF- $\alpha$ 的变化。结果:模型组大鼠肺含水量较正常组明显升高( $P < 0.01$ ),蛭丹化瘀组方(33 g/kg、16.5 g/kg)( $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ )以及阳性药地塞米松( $P < 0.01$ )可降低内毒素诱导肺损伤大鼠的肺含水量;与正常组比较,模型组大鼠血浆中内皮素(ET)、降钙素基因肽(CGRP)明显增高( $P < 0.01$ );蛭丹化瘀组方(16.5 g/kg、8.25 g/kg)和阳性药地塞米松可明显降低大鼠血浆ET含量,差异较模型组明显( $P < 0.01$ );蛭丹化瘀组方33 g/kg可明显增加血浆CGRP含量;与正常组比较,模型组大鼠血浆肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )明显增高( $P < 0.01$ );阳性药地塞米松及蛭丹化瘀组方(33 g/kg、16.5 g/kg、8.25 g/kg)均可明显降低大鼠血浆TNF- $\alpha$ 含量( $P < 0.01$ )。结论:蛭丹化瘀组方通过升高内毒素诱导肺损伤大鼠CGRP的含量,降低ET-1及TNF- $\alpha$ 含量发挥对肺损伤大鼠的保护作用。

**关键词** 蛭丹化瘀组方;肺损伤;降钙素基因相关肽;内皮素-1

## Effects of Zhi Dan Hua Yu prescription on CGRP and ET-1 of lung injury rats induced by LPS

Li Zhaoxia<sup>1</sup>, Ouyang Junyao<sup>1</sup>, Wang Yali<sup>1</sup>, Zhao Hui<sup>1</sup>, Shen Su<sup>2</sup>, Wang Lili<sup>2</sup>, Li Ren<sup>2</sup>

(1 School of traditional Chinese medicine, Beijing Key Lab of TCM Collateral Disease Theory Research, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2 Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To observe the effect of Zhi Dan Hua Yu prescription on CGRP, ET-1 and TNF- $\alpha$  of lung injury rats induced by endotoxin. **Methods:** A total of 84 SD rats with half males and half females were divided into control group, model group, Zhi Dan Hua Yu prescription group (33 g/kg, 16.5 g/kg, 8.25 g/kg) and dexamethasone group by random, detecting the changes of water content in lung injury rats' lung; utilizing radioimmunoassay to detecting changes of ET and CGRP in rat plasma. **Results:** Compared to control group, lung water content in model group rats were significantly increased ( $P < 0.01$ ), Zhi Dan Hua Yu prescription (33 g/kg, 16.5 g/kg) and dexamethasone obviously reduced water content in lung injury rats. The endothelin (ET) and calcitonin gene peptide (CGRP) in rat plasma of model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ) compared to that of control group; dexamethasone reduced ET content ( $P < 0.01$ ) and Zhi Dan Hua Yu prescription (16.5 g/kg, 8.25 g/kg) reduced ET content apparently ( $P < 0.01$ ); CGRP content in rat plasma of Zhi Dan Hua Yu prescription (33 g/kg) were increased significantly ( $P < 0.01$ ); The content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) was increased apparently ( $P < 0.01$ ) in comparison with that of control group; dexamethasone and Zhi Dan Hua Yu prescription (33 g/kg, 16.5 g/kg, 8.25 g/kg) reduced TNF- $\alpha$  in rat plasma obviously ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Zhi Dan Hua Yu prescription protect endotoxin-induced lung injury rats by increase CGRP content and reduce ET-1 and TNF- $\alpha$  content in rat plasma.

**Key Words** Zhi Dan Hua Yu prescription; Lung injury; CGRP; ET-1

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.031

急性肺损伤 (Acute Lung Injury, ALI) 是严重感染、创伤、休克等打击后, 出现肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤, 造成弥散性肺间质及肺泡水肿而导致的急性低氧性呼吸功能不全症<sup>[1]</sup>。ALI 时各

种肺内外因素可引起多种炎性反应递质的释放,引发肺内过度、失控的炎性反应,形成恶性循环,加重机体损伤<sup>[2]</sup>。蛭丹化瘀组方由制水蛭、牡丹皮、当归、赤芍、鸡血藤、黄芪、川芎组成,具有益气活血的功效,临床上多用于治疗治疗小儿支原体感染及病毒性肺炎<sup>[3,4]</sup>。本实验采用内毒素诱导 ALI 的方法,观察蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠肺含水量的影响,并通过检测血浆降钙素基因相关肽(CGRP)、内皮素-1(ET-1)肿瘤坏死因子(TNF-α)的变化,研究蛭丹化瘀组方对 ALI 大鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体质重 80 ~ 100 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品与试剂 蛭丹化瘀组方由黄芪、当归、赤芍、川芎、鸡血藤、水蛭、牡丹皮组成,经水提醇沉工艺制成组方颗粒剂的流浸膏,生药含量为 4.85 g/mL,由北京中医药大学中药学院中药药剂教研室制备。醋酸地塞米松片:天津力生制药股份有限公司产品,批号:140511。脂多糖,由 Sigma 公司提供,货号 L2880。大鼠 ET-1、CGRP、TNF-α 放免检测试剂盒由北京华英生物技术研究所提供。

1.3 方法

1.3.1 模型的制备、分组及给药 参考文献方法制备 ALI 大鼠模型<sup>[5]</sup> SD 大鼠随机分成 6 组,即对照组、模型组、蛭丹化瘀组方 33 g/kg、16.5 g/kg、8.25 g/kg 组、阳性对照组(地塞米松 0.5 mg/kg)。除对照组、模型组灌胃给予等量生理盐水外,其他各组均灌胃给与相应药物,1 次/d,连续给药 4 d。第 5 次给药后 1 h,大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(35 mg/kg)麻醉,仰卧位固定,沿颈部正中线切开皮肤,暴露气管,脂多糖(LPS)按 7.5 mg/kg 剂量,0.2 mL/100 g 给药容积于气管内缓慢滴入,缝合创口。造模 19 h 后,大鼠麻醉,取材。

1.3.2 血浆 TNF-α、ET、CGRP 检测腹主动脉取血,制备血浆 -80 °C 冻存备用;放免法检测血浆 TNF-α、ET、CGRP,由北京华英生物技术研究所检测。

1.4 统计学方法 运用 SPSS 10.0 进行单因素方差分析,LSD 检验比较 2 组间差异。

2 结果

2.1 蛭丹化瘀组方对内毒素致肺损伤大鼠肺含水量的影响 结果见表 1。与正常组比较,模型组大鼠肺含水量明显升高(P < 0.01);阳性药地塞米松及蛭丹化瘀组方(33、16.5 g/kg)组可明显降低大鼠

肺含水量。

表 1 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠肺指数及肺含水量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	动物数	肺含水量(%)
对照组	-	14	80.18 ± 0.90 **
模型组	-	14	80.99 ± 0.78
蛭丹化瘀组方组	33	14	79.65 ± 0.55 **
蛭丹化瘀组方组	16.5	14	80.31 ± 0.70 *
蛭丹化瘀组方组	8.25	14	80.62 ± 0.59
地塞米松组	0.0005	14	79.23 ± 1.45 **

注:与模型组比较 \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

2.2 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠血浆内皮素(ET)、降钙素基因肽(CGRP)的影响 与正常组比较,模型组大鼠内皮素(ET)、降钙素基因肽(CGRP)明显增高(P < 0.01);蛭丹化瘀组方(16.5 g/kg、8.25 g/kg)和阳性药地塞米松可明显降低大鼠血浆 ET 含量,差异较模型组明显(P < 0.05);蛭丹化瘀组方 33 g/kg 可明显增加血浆 CGRP 含量。

表 2 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠血浆 ET、CGRP 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	剂量(g/kg)	ET (pg/mL)	CGRP (pg/mL)
正常	9	-	60.38 ± 6.95 **	75.92 ± 16.24 **
模型	9	-	110.75 ± 20.42	103.70 ± 16.35
地塞米松组	12	0.0005	78.14 ± 29.30 **	97.90 ± 18.73
蛭丹化瘀组方组	11	33	110.87 ± 23.86	130.62 ± 13.82 **
蛭丹化瘀组方组	11	16.5	79.84 ± 42.05 **	106.96 ± 18.55
蛭丹化瘀组方组	12	8.25	64.98 ± 14.19 **	91.17 ± 24.34

注:与模型组相比, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

2.3 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠血浆肿瘤坏死因子(TNF-α)的影响 与正常组比较,模型组大鼠血浆肿瘤坏死因子(TNF-α)明显增高(P < 0.01);阳性药地塞米松及蛭丹化瘀组方(33 g/kg、16.5 g/kg、8.25 g/kg)均可降低大鼠血浆 TNF-α 含量,与模型组比较差异具有统计学意义。

表 3 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠血浆 TNF-α 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	剂量(g/kg)	TNF-α (pg/mL)
正常	9	-	60.81 ± 6.60 **
模型	9	-	89.67 ± 8.13
地塞米松组	12	0.0005	66.41 ± 9.65 **
蛭丹化瘀组方组	11	33	72.74 ± 8.09 **
蛭丹化瘀组方组	11	16.5	65.58 ± 9.13 **
蛭丹化瘀组方组	12	8.25	62.41 ± 7.35 **

注:与模型组相比, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

3 讨论

ALI 以进行性呼吸困难和难以纠正的低氧血症为主要表现的肺部继发性损伤<sup>[6]</sup>,严重的 ALI 在临

床上也被称为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。由于肺微血管通透性增高,肺内液体渗出与吸收动态平衡遭到破坏,大量富含蛋白质的液体渗入组织间隙,因此肺水肿是其主要的病理表现<sup>[7]</sup>。本研究结果表明,LPS致ALI大鼠肺含水量明显增高,经蛭丹化瘀组方33、16.5 g/kg或地塞米松治疗后,大鼠肺含水量明显降低,提示蛭丹化瘀组方可有效抑制肺损伤时肺微血管通透性增加,改善肺水肿。

内皮素(ET)是目前已知的最强的血管收缩因子,其增高可引起肺血管、支气管痉挛和毛细血管通透性增加,并通过刺激肺部花生四烯酸合成与释放,诱导氧自由基生成,激活致炎因子的表达,损伤肺组织<sup>[8]</sup>。研究表明,ETR拮抗剂、内皮素转化酶抑制剂等可下调ET-1的合成和分泌,通过抑制其促炎、缩血管、抑制肺泡液体清除能力等环节,减轻肺组织炎性损伤,改善肺血流动力学、呼吸力学指标,减轻肺水肿,改善通气换气功能<sup>[9]</sup>。降钙素基因相关肽(CGRP)是一种血管活性多肽,是迄今为止在人和哺乳动物内发现的一种最强的扩血管物质,其释放受内毒素、前列腺素、缓激肽等炎性因子和递质的调节,具有扩张血管、降低动脉血压的作用。在病理状态下CGRP的分泌和释放能够缓解缺氧所致的肺血管收缩。本实验研究发现,模型组大鼠血浆CGRP、ET-1含量较正常组明显升高,蛭丹化瘀组方(16.5 g/kg、8.25 g/kg)以及阳性药地塞米松可降低ALI大鼠血浆ET-1,蛭丹化瘀组方33 g/kg还可明显增高ALI大鼠血浆CGRP,表明蛭丹化瘀组方既可抑制ET-1生成及释放,又可促进血浆中CGRP的合成,从而减轻肺血管、支气管痉挛,降低毛细血管通透性,减轻肺损伤。

目前认为,炎症反应是ALI/ARDS发生的主要机制<sup>[7]</sup>,研究发现<sup>[11]</sup>注射LPS 6 h后,动物血清TNF- $\alpha$ 含量就明显升高。TNF- $\alpha$ 作为启动炎症反应瀑布级联反应的促炎递质,能诱导肺血管内皮细胞活化及中性粒细胞脱颗粒释放氧自由基等递质,引

起白细胞迁移,损害肺泡表面活性物质系统<sup>[10]</sup>。本次研究结果显示,蛭丹化瘀组方在减轻肺含水量的同时,可明显降低ALI大鼠血浆TNF- $\alpha$ 含量。

综上,本次实验发现蛭丹化瘀组方对LPS致ALI具有一定的改善作用,其初步的作用机制可能与其促进CGRP的合成与释放,抑制ET-1的生成,减轻肺水肿,并通过抑制TNF- $\alpha$ 的分泌,减轻致炎因子介导的炎性损伤。从而起到防治模型大鼠ALI的作用。

#### 参考文献

- [1]郭争鸣,陈懿,刘惠君,等.金纳多对内毒素诱导小鼠急性肺损伤保护作用机制的初步研究[J].国际病理科学与临床杂志,2009,29(4):277-283.
- [2]高冬娜,张彧.急性肺损伤研究进展[J].中国急救医学,2008,28(1):72-76.
- [3]杭敏,侯安存,王新佳.蛭丹化瘀口服液治疗小儿病毒性肺炎50例[J].中医杂志,2006,47(8):615.
- [4]李黎,马少杰,刘晓红,等.蛭丹化瘀口服液治疗耐药肺炎支原体肺炎的疗效[J].实用儿科临床杂志,2010,25(16):1264-1265,1267.
- [5]Mikawa K,Nishina K,Takao Y,et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits[J]. Anesth Analg,2003,97(6):1751-5.
- [6]段立彬,何先弟.细胞因子与急性肺损伤的关系[J].蚌埠医学院学报,2010,35(2):208-210.
- [7]刘新华.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J].中国卫生产业,2014(1):92-93.
- [8]Kmieć. Cooperation of liver cells in health and disease[J]. Adv Anat Embryol Cell Biol,2001,161:III-XIII,1-151.
- [9]蔡闯,徐军,钟南山.内皮素-1与急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征[J].解放军医学杂志,2010,35(5):595-597.
- [10]姜远旭,徐世元,张雪萍,等.右美托咪定联合乌司他丁减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤[J].中国病理生理杂志,2014,30(1):96-101.
- [11]黄亮,季宪飞.降钙素基因相关肽对内毒素急性肺损伤的保护作用[J].临床急诊杂志,2004,5(4):4-6.

(2016-02-29 收稿 责任编辑:王明)