

蛭丹化瘀组方对 LPS 诱导急性肺损伤大鼠炎症反应的影响

李慢¹ 王雅丽¹ 李朝霞¹ 赵 晖¹ 沈 素² 王丽丽² 李 任²

(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: 研究蛭丹化瘀组方对脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肺损伤的影响。方法: SD大鼠72只, 随机分成对照组、模型组、蛭丹化瘀组方33、16.5、8.25 g/kg组、地塞米松阳性药组。气管滴注LPS制备急性肺损伤模型; HE染色, 光镜下观察肺组织病理学变化并进行肺病理损伤评分; 酶联免疫法检测各组大鼠肺组织炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量。结果: 模型组大鼠肺组织病理损伤评分增高, 肺组织炎症因子TNF- α 、IL-1 β 及IL-6含量较正常组明显增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 蛭丹化瘀组方33 g/kg及地塞米松组大鼠肺组织病理损伤评分较模型组大鼠明显降低($P < 0.05$), 蛭丹化瘀组方(33、16.5、8.25 g/kg)及地塞米松可明显降低肺组织TNF- α 、IL-6含量, 蛭丹化瘀组方16.5 g/kg还可明显降低肺组织IL-1 β 含量, 差异较模型组明显($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 蛭丹化瘀组方能够减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤, 其机制可能与降低肺组织中炎症反应因子TNF- α 、IL-6和IL-1 β 含量有关。

关键词 蛭丹化瘀组方; 脂多糖; 肺损伤; 炎症反应因子

Effects of Zhi Dan Hua Yu formula on inflammation of acute lung-injured rats induced by LPS

Li Manzhong¹, Wang Yali¹, Li Zhaoxia¹, Zhao Hui¹, Shen Su², Wang Lili², Li Ren²

(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 formula on acute-injured lung of rats induced by LPS. **Methods:** A total of 72 SD rats with half males and half females were divided into control group, model group, Zhi Dan Hua Yu group (33 g/kg, 16.5 g/kg, 8.25 g/kg) and dexamethasone group by random. Acute lung injury induced by instillation of LPS; HE staining; to observe the pathological changes of lung tissue and give a pathological score of lung injury by light microscope; to detect the content of lung tissue inflammation factor interleukin-1 beta (IL-1) and interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF alpha). **Results:** Compared with normal group, the Model group rats lung tissue pathological score were increased, TNF- α , IL-1 and IL-6 were significantly increased ($P < 0.01$). compared with the model group rats zhidanhuayu prescription 33 g/kg and dexamethasone group rat lung tissue pathological score were significantly decreased ($P < 0.05$). dexamethasone and zhidanhuayu prescription (33, 16.5, 8.25 g/kg) can significantly reduce the lung tissue TNF alpha, IL-6. zhidanhuayu prescription 16.5 g/kg also can significantly reduce the content of IL-1, which is more obvious than that of model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Zhidanhuayu formula could reduce the acute lung injury induced by LPS, the effect mechanism may be related to the decrease of TNF- α , IL-6 and IL-1 content.

Key Words Zhidanhuayu prescription; Lipopolysaccharide; Lung injury; Inflammatory factors

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.034

急性肺损伤(Acute Lung Injury, ALI)是指由心源性以外的各种肺内、外致病因素导致的急性进行性呼吸衰竭, 其病理基础主要表现为肺部炎症反应和肺毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞完整性破坏^[1]。严重感染是引起急性肺损伤的重要因素, 抑制炎症反应是治疗急性肺损伤的重要策略。目前尚缺乏特异有效治疗药物。因此, 探讨和寻找治疗其有效药物的研究尤为重要。蛭丹化瘀组方由黄芪、

川芎、制水蛭、牡丹皮、当归、赤芍、鸡血藤、组成, 具有益气活血的功效, 临床上多用于治疗小儿支原体感染及病毒性肺炎^[1-2]。体外研究显示, 蛭丹化瘀口服液体外有抗呼吸道合胞病毒(RSV)、肺炎支原体(MP)以及常见致病细菌如肺炎链球菌、乙型溶血性链球菌的作用, 整体实验显示, 蛭丹化瘀口服液可辅助罗红霉素减轻支原体肺炎小鼠的病理损伤, 减少血栓形成, 改善微循环^[3]。本研究通过建立 ALI 模

型,评价蛭丹化瘀组方抗急性肺损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 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,规格:0.75 mg/片,由天津力生制药股份有限公司提供,批号:140511;脂多糖,由 Sigma 公司提供,货号 L2880;大鼠 IL-1β、IL-4、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 检测试剂盒,由上海森雄科技实业有限公司提供。

1.2 动物 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重 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。

1.3 仪器 电子天平(型号:PL4001-L);Biofuge15R 低温离心机(Heraeussepatech 德国);JA-1003 电子分析天平(上海精科天平厂);超细匀浆器(上海季诺科贸有限公司),水浴锅(型号:02810202,天津市中环实验电炉有限公司);Multi-skan MK3 型酶标仪(芬兰 Thermo Labsystem 公司)。

1.4 动物分组与给药 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重 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。大鼠随机分成 6 组,即对照组、模型组、蛭丹化瘀组方 33、16.5、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 mL/100 g 体重。1 次/d、连续给药 4 d。第 5 天给药后 1 h 进行模型制备。

1.5 LPS 致肺损伤大鼠模型的制备 大鼠称重,按 35 mg/kg 剂量腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,仰卧位固定,沿颈部正中中线切开皮肤,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(3 min),缝合创口。造模 19 h 后,灌胃给药,给药后 1 h,取出肺组织,取右肺中叶称重,在无菌生理盐水中用玻璃匀浆器充分研磨,制成 10% 的组织匀浆, - 80 ℃ 冻存储备用。余肺、气管以 10% 福尔马林固定

1.6 肺组织病理学检查 肺组织固定 24 h 后,常规脱水,石蜡包埋,制作切片,切片厚 5 μm,苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin, HE)染色,在 Olympus 光学显微镜下观察肺组织病理形态学改变。参照 Mikawar^[4] 方法,进行肺组织病理学评分。对肺泡腔内出血、水肿;肺泡壁增宽;中性粒细胞浸润;支气管

积液;肺出血分别依病变轻重评分 0 ~ 4 分。0 分:极轻度损伤;1 分:轻度损伤;2 分:中度损伤;3 分:重度损伤;4 分:严重损伤。将项指标得分相加作为总分。

表 1 各组大鼠肺组织病理评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量(g/kg)	组织病理学评分
模型组	9	-	4.67 ± 1.12
地塞米松组	12	0.0005	2.40 ± 1.56 *
蛭丹化瘀组方组	11	33	2.69 ± 1.81 *
蛭丹化瘀组方组	11	16.5	4.22 ± 1.39
蛭丹化瘀组方组	12	8.25	4.56 ± 1.05

注:与模型组相比, * $P < 0.05$ 。

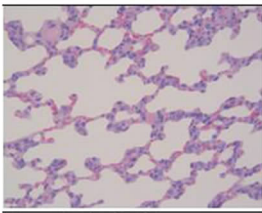


图 1-1 正常对照组

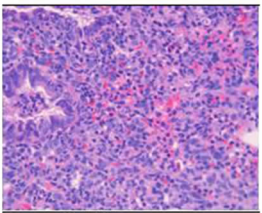


图 1-2 模型组

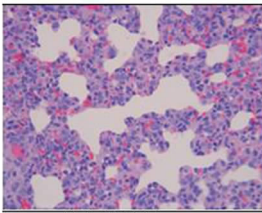


图 1-3 地塞米松组

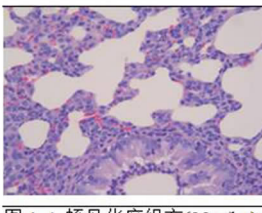


图 1-4 蛭丹化瘀组方(33 g/kg)

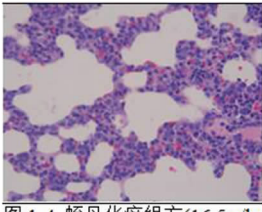


图 1-4 蛭丹化瘀组方(16.5 g/kg)

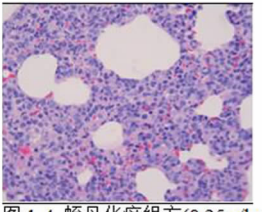


图 1-4 蛭丹化瘀组方(8.25 g/kg)

图 1 各组大鼠肺组织病理变化(HE × 400)

1.7 大鼠肺组织炎性反应因子测定 设标准孔 8 孔,每孔中各加入样品稀释液 100 μL,第 1 孔加标准品 100 μL,混匀后用加样器吸出 100 μL,移至第 2 孔。如此反复作对倍稀释至第七孔,最后,从第七孔中吸出 100 μL 弃去,使之体积均为 100 μL。第八孔为空白对照。将待测肺组织匀浆 100 μL 加入到预先已用抗大鼠 IL-1β、IL-4、IL-6、TNF-α 和 IFN-γ 单克隆抗体包被的酶标板上;将反应板充分混匀后置 37 ℃ 温箱 120 min,使标准品、待测样品中的抗原与单抗充分结合;用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次,向滤纸上晾干;每孔中加入生物素化的一抗(IL-1β/IL-4/IL-6/TNF-α/IFN-γ)工作液 50 μL,置 37 ℃ 温箱 60 min;洗板;每孔加辣根过氧化物酶标记的

Streptavidin 抗体工作液 100 μL, 将反应板置 37 ℃ 温箱 60 min, 使酶标抗体工作液与生物素化一抗结合成复合物; 洗板; 每孔加入 OPD (邻苯二胺) 底物工作液 100 μL, 置 37 ℃ 暗处反应 5 ~ 10 min; 每孔加入 1 滴终止液 (2M 硫酸) 混匀; 在酶标仪上 450 nm 处测各孔吸光值。用 curve expert1.3 软件, IFN-γ 以标准品 4 000、2 000、1 000、500、250、125、62.5、0 pg/mL 之 OD 值做出标准曲线, 根据样品 OD 值在该曲线图上求出每 mL 组织匀浆中相应因子的含量。IL-1β、IL-4、IL-6 和 TNF-α 以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.62、0 pg/mL 之 OD 值做出标准曲线, 根据样品 OD 值在该曲线图上求出每毫升组织匀浆中相应因子的含量。

1.8 统计学方法 运用 SPSS 13.0 进行数据统计分析, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法进行, 以 $P < 0.05$ 表示为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蛭丹化瘀组方对内毒素致肺损伤大鼠肺组织

表 2 蛭丹化瘀组方对内毒素诱导肺损伤大鼠肺组织炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	剂量 (g/kg)	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常组	9	-	23.07 ± 3.23 **	76.70 ± 41.96 *	38.82 ± 20.60 **
模型组	9	-	32.39 ± 10.57	118.28 ± 45.77	83.28 ± 46.19
地塞米松组	12	0.0005	18.41 ± 6.38 **	124.11 ± 32.85	44.71 ± 18.17 **
蛭丹化瘀组方	11	33	16.69 ± 5.20 **	102.60 ± 42.31	40.41 ± 11.90 **
蛭丹化瘀组方	11	16.5	17.54 ± 4.80 **	83.42 ± 31.69 *	33.27 ± 40.45 **
蛭丹化瘀组方	12	8.25	18.64 ± 8.75 **	100.18 ± 36.79	39.53 ± 44.04 **

注: 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

急性肺损伤是以肺泡-毛细血管膜的急性弥漫性损伤为主要病理改变的危急重症^[5], 其主要原因与炎症反应细胞因子大量释放导致炎症反应瀑布样反应有关^[6]。脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 是革兰阴性杆菌细胞壁的主要组成部分, 其诱导的内毒素血症是急性肺损伤常见诱因。通过气管内滴入 LPS, 建立与呼吸道感染过程相似的急性肺损伤模型, 是目前国内外普遍使用的模拟人类因感染诱发急性肺损伤的造模方法^[7]。在 LPS 刺激下, 中性粒细胞浸润入肺组织, 激活的中性粒细胞释放炎症反应因子, 引起炎症反应瀑布样反应^[8]。在本次实验中, 我们观察到大鼠气管内滴入 LPS 后可见肺间隔加宽, 肺泡结构破坏, 大量炎症反应细胞浸润等病理改变, 说明内毒素致急性肺损伤模型成功。过度、失控的炎症反应是各种病因所致 ALI 的根本

病理学影响 HE 染色结果显示, 正常对照组大鼠肺组织结构清晰, 肺泡腔清晰, 肺泡壁未见异常充血, 肺间质无炎性细胞。模型组大鼠病变主要表现为肺泡壁增厚伴炎细胞浸润, 部分大鼠肺组织出现片状实变炎症反应灶, 肺泡塌陷, 肺泡出血。各治疗组大鼠病变特征与模型组相似, 但肺泡损伤的程度较模型组不同程度减轻 (图 1)。肺组织病理学评分结果显示, 地塞米松及蛭丹化瘀组方 (33 g/kg) 组大鼠肺组织病理学评分较模型组明显下降 ($P < 0.05$), 蛭丹化瘀组方 (16.5、8.25 g/kg) 组大鼠肺组织病理学评分虽较模型组有下降趋势, 但差异没有统计学意义 (表 1)。

2.2 蛭丹化瘀组方对内毒素致肺损伤大鼠炎症反应细胞因子的影响 模型组大鼠肺组织炎症反应因子 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 含量较正常组大鼠明显增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 阳性药地塞米松及蛭丹化瘀组方 (33、16.5、8.25 g/kg) 可明显降低大鼠肺组织 TNF-α 及 IL-6 含量, 差异较模型组明显 ($P < 0.01$); 蛭丹化瘀组方 16.5 g/kg 组大鼠肺组织 IL-1β 含量较模型组显著性降低 ($P < 0.05$)。

原因, LPS 作为肺部炎症反应的重要促发因子, 进入肺内与效应细胞表面 TLR4 和 CD14 受体发生特异性结合, 启动多形核白细胞, 释放各种炎症反应递质^[9]。

作为炎症反应过程中的主要效应细胞, 中性粒细胞激活后释肿瘤坏死因子-α (TNF-α), 白介素-1β (IL-1β)、和白介素-6 (IL-6) 等炎症反应细胞因子, 破坏毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞紧密连接, 参与肺泡毛细血管膜损伤^[10], 相关报道表明 TNF-α 和 IL-6 的含量在急性肺损伤后 2 h 开始增加, 并于 6 ~ 24 h 达到高峰^[11]。TNF-α 可损伤血管内皮细胞, 增加其通透性, 导致白细胞黏附、中性粒细胞脱颗粒并趋化到炎症反应损伤部位^[12], IL-6 和 IL-1β 可活化巨噬细胞、粒细胞, 增强其活性, 通常与 TNF-α 起协同作用^[13]。本次实验结果表明, 经气管内滴注 LPS 后, 大鼠的肺组织呈现中性粒细胞浸润的病

理改变,肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 浓度明显升高,说明促炎因子释放是 ALI 发病的重要环节。蛭丹化瘀组方可明显降低肺组织炎症反应因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-6 、 $\text{IL-1}\beta$ 含量,提示蛭丹化瘀组方可有效阻断促炎因子的炎症反应活化,对急性肺损伤具有良好的保护作用。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 刘晓红,侯安存,辛德莉,等. 蛭丹化瘀口服液对支原体感染小鼠肺炎的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2003,23(6):441-444.
- [4] 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):1751-1755.
- [5] 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.
- [6] 颜春松,赵年贵,杨夏玲,等. 抑制炎症反应治疗急性肺损伤的实验研究[J]. 江西医学院学报,2008,48(5):20-23,28.
- [7] 张祺嘉钰,王国全,余林中. 2 种内毒素经支气管给药致急性肺损

- 伤模型再评价研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(5):226-229.
- [8] 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.
 - [9] 石计朋,黄丽密,钱燕,等. 橄榄油脂肪乳对 LPS 诱导急性肺损伤 SD 幼年大鼠前炎症因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 的影响[J]. 实用预防医学,2014,21(3):275-277,260.
 - [10] Kim J, Woo J, Lyu JH, et al. Carthami Flos suppresses neutrophilic lung inflammation in mice, for which nuclear factor-erythroid 2-related factor-1 is required[J]. Phytomedicine, 2014, 21(4):470-478.
 - [11] Reutershan J, Basit A, Galkina EV, et al. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(5):L807-815.
 - [12] Lau KS, Juchheim AM, Cavaliere KR, et al. In vivo systems analysis identifies spatial and temporal aspects of the modulation of $\text{TNF-}\alpha$ -induced apoptosis and proliferation by MAPKs[J]. Sci Signal, 2011, 4(165):ra16.
 - [13] 李胜亮,张淑琴,武志宏,等. 脂多糖致肺血管内巨噬细胞释放 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 及 IL-8 的改变[J]. 临床肺科杂志,2011,16(1):4-5.

(2016-02-29 收稿 责任编辑:王明)

世界中医药学会联合会络病专业委员会中俄学术论坛在莫斯科召开

世界中医药学会联合会络病专业委员会中俄络病学术论坛于 2016 年 4 月 20 日在俄罗斯莫斯科胜利召开,来自中国境内及俄罗斯当地的共计 200 余名专家学者参加了本次论坛。

首先以岭药业营销中心王卫平总经理代表以岭集团,向远道而来的参会专家表示热烈的欢迎和衷心的感谢。

秦树坤秘书长助理出席开幕式并讲话,对各位专家的出席表示欢迎。他向与会专家介绍世界中联成立以来在学术发展、团队建设、中医药标准化、国际化推广等方面做出的积极贡献。他指出络病专业委员会为世界中联的一个分支机构应继续围绕学会总体发展目标,为中医药的国际发展作出更大贡献。

络病专业委员会尹宏军副秘书长代表络病专业委员会,介绍了专业委员会成立以来的发展情况。并指出专委会将继续遵循世界中联分支机构发展的宗旨和任务,做出更多努力。尤其是专委会在学术发展方面已经做出了一定的成绩,每年一届的国际络病学术大会以及区域学术论坛,为中医络病学的国际推广做出了贡献。

上海复旦大学附属华山医院傅晓东教授,在会上做了动

脉粥样硬化中西医结合治疗的专题报告,他指出动脉粥样硬化是不可避免的,不稳定斑块是心脑血管病发生的根本,降低 ASCVD 风险和事件已被临床诊疗指南推荐为治疗的最终目标。并通过循证医学研究证明,通心络胶囊与他汀类联合治疗动脉粥样硬化可进一步降低心血管事件的发生率,降低用药不良风险。

中日友好医院专家侯丕华教授,就中药整合调节-安全有效治疗心律失常向与会专家做了报告,她指出现代医学对心律失常的治疗采用单纯的阻抑对抗治疗方法,存在诸多不尽人意的的问题;调律是心律失常治疗的新策略,如循证医学研究证实参松养心胶囊在心功能不全伴室性早搏、窦性心动过缓伴室性早搏等西医治疗棘手的问题上体现出非常好的疗效,治疗心律失常方面的安全性也要优于西药。

与会专家还前往北京中医药大学圣彼得堡医院中医中心进行了考察,俄方专家尤里·阿纳托利耶维奇就针灸治疗神经官能症在俄罗斯的临床应用做了报告,并与大家就中医药在俄罗斯当地的发展进行座谈。

本次论坛学术氛围浓厚,得到了与会专家积极响应。