

实验研究

寒下药物对 MODS 大鼠模型肝细胞溶酶体的损伤及膜功能的影响

赵 琪* 崔乃强* 李继坤* 吴咸中*

摘要 作者对寒下药物对急性感染性腹膜炎及肠系膜动脉缺血再灌注致多脏器功能不全综合征(MODS)大鼠模型肝细胞溶酶体及膜功能的影响进行了观察,结果表明,MODS 大鼠肝细胞溶酶体中 N-乙酰氨基葡萄糖苷酸酶(NAG)活性显著升高($P<0.01$),以肠系膜动脉缺血再灌注致 MODS 大鼠肝细胞 NAG 活性升高最为显著,MODS 大鼠肝细胞溶酶体膜破裂后溢出之 NAG 水平显著高于对照组($P<0.01$),以急性感染性腹膜炎致 MODS 大鼠肝细胞中溶酶体溶破程度为著,大承气汤治疗 48 小时后能显著降低 MODS 大鼠肝细胞溶酶体 NAG 水平,并使溶酶体破裂溢出之 NAG 水平降低($P<0.05$)。大承气汤、承气合剂、大黄均能降低热诱导所致大鼠肝细胞溶酶体膜的溶破率($P<0.05$),表明通里攻下疗法具有脏器保护作用。

主题词 寒下剂/治疗应用 肝/酶学 溶酶体/药物作用

溶酶体的主要功能为细胞内消化作用,但在各种致病因素刺激下,溶酶体膜破裂,可使其内所含酸性水解酶活化而导致细胞被消化。本实验观察多脏器功能不全综合征(Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS)模型大鼠肝细胞溶酶体功能及溶酶体膜的稳定性改变,并探讨内毒素及下法药物对其影响。

1 材料与方法

1.1 体内给药实验

1.1.1 MODS 大鼠模型复制:感染性腹膜炎致 MODS 大鼠模型复制:Wistar 大鼠 10 只,雄性,体重 $200 \pm 18.3\text{g}$,腹腔内注射致病大肠杆菌($O_{127}H_6, 8 \times 10^8\text{cfu/ml}$)生理盐水混悬液 1ml,内含 10% BaSO_4 ,对照组腹腔内注射等量生理盐水,48 小时后颈椎离断处死大鼠,取肝组织分离溶酶体待测。

肠系膜上动脉缺血再灌注致 MODS 大鼠模型复

制:大鼠同上,模型制备前 12 小时禁食水,戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,无菌操作下取腹正中切口,切开腹壁各层,于肠系膜根部近主动脉处寻找肠系膜动脉,以动脉夹夹闭,逐层缝合腹壁各层,2 小时后开放动脉夹,重新缝合腹壁各层,假手术对照组开腹后于腹腔内轻扰后关腹,观察 48 小时后取肝组织分离溶酶体待测。

1.1.2 给药方法:上述 MODS 大鼠于模型制备同时予大承气汤(大黄、厚朴、枳实、芒硝,生药浓度 1g/ml ,本所药研室制备)灌胃,并于模型制备后 6 小时再次灌胃,每 24 小时灌胃 2 次,每次 2ml。对照组分别予等量生理盐水灌胃。

1.1.3 大鼠肝细胞溶酶体制备:上述 MODS 大鼠,经治疗后颈椎离断处死,取同一部位肝组织约 $250 \sim 300\text{mg}$,称重后迅速置少量预冷 0.25M 蔗糖溶液中冷淬后取出,剪碎,加入 3 倍量预冷 0.25M 蔗糖溶液,制成 20%(W/V)肝组织匀浆,2000g 离心 15 分钟(-4°C),上清液以 45000g 离心 20 分钟,保留上清, -4°C 60000g 离心 30 分钟,保留上清液,沉淀,以 0.25M 蔗糖溶液洗 1 次,并制成 1:1 溶酶体混悬液(V/V)。分别测定肝细胞溶酶体中(NAG)及溶酶体膜稳定性。

1.1.4 大鼠肝细胞溶酶体 NAG 测定方法:在上述已制备的 MODS 大鼠肝细胞溶酶体悬液中加入 10% Triton X-100 0.1ml,混匀后测定 NAG 含量,同时测定所保留的各组离心上清液中 NAG 含量。NAG 测定方法按大连金港制药有限公司生产的 NAG 检测试剂盒说明书进行。检测结果以每 mg 蛋白(Lowry 法)中所含 NAG 含量方式表示,即 u/mg/ml 。

1.1.5 MODS 大鼠肝细胞溶酶体膜稳定性测定:对上述各组 MODS 大鼠肝细胞溶酶体制备过程中所保留的上清液行 NAG 测定。

1.2 体外给药实验

1.2.1 含有中药寒下药物有效吸收成分兔血清的制备:健康北京大耳白兔 6 只,分别以大承气汤、承气合剂及大黄(生药浓度 1g/ml)灌胃,每种药物试验用兔 2 只,剂量为每天 30ml/kg ,分 3 次灌服,连续灌服 3 天,同时禁食不禁水,在最后一次中药灌胃 4 小时后做心

* 天津市中西医结合急腹症研究所,天津市南开区三纬路 122 号(300100)

收稿日期:1997-10-30;修回日期:1998-03-20

脏穿刺采血,分离血清,56℃2小时使补体成分灭活。此血清即为含中药寒下药物有效吸收成分之兔血清,一20℃保存备用。

1.2.2 对溶酶体膜保护作用的体外观察:取健康大鼠,制备肝细胞溶酶体混悬液方法同上。同时取此溶酶体混悬液,分别在含大承气汤、承气合剂、大黄有效吸收成分的兔血清相互作用后测定溶酶体膜溶破后释放于上清液中的NAG含量。具体方法为:取此健康大鼠肝细胞溶酶体悬液0.8ml,分别加入上述兔血清0.2ml,42℃水浴2小时,热诱导法溶破溶酶体膜,60000g离心15分钟(-4℃),取上清液测定NAG含量(方法同上)。以等量0.25M蔗糖溶液代替兔血清作为空白对照组,以地塞米松(终浓度100μg/ml)为阳性对照组,每组设平行管6管。

2 结果

感染性腹膜炎及肠系膜动脉缺血再灌注所致MODS大鼠模型肝细胞溶酶体NAG含量较健康对照组明显升高,以肠系膜动脉缺血再灌注大鼠肝细胞溶酶体NAG水平升高最为显著($P<0.01$),感染性腹膜炎致MODS组次之($P<0.01$)。溶破至细胞质内或细胞组织间之溶酶体酶NAG在MODS模型组中显著高于对照组,但以感染性腹膜炎组升高为著($P<0.01$),肠系膜动脉缺血再灌注致MODS组次之($P<0.01$)。以大承气汤作为攻下药物治疗MODS模型大鼠48小时后,能使大鼠肝细胞内溶酶体酶NAG水平降低($P<0.05$),大承气汤同时能使逃逸至细胞内或细胞间的NAG水平降低,以感染性腹膜炎致MODS模型组NAG下降最为显著($P<0.01$)。肠系膜缺血再灌注组次之($P<0.05$)。

体外实验结果表明,大承气汤、承气合剂、大黄能降低热诱导所致大鼠肝细胞溶酶体膜的溶破率,以承气合剂的溶酶体膜稳定作用最为显著($P<0.05$),大黄次之($P<0.05$),大承气汤最弱($P<0.05$)。但三种药物的稳定溶酶体膜作用均较地塞米松组为弱($P<0.01$)。

3 讨论

肝细胞同胰腺细胞、多形核白细胞等相似,均含有丰富的溶酶体,酸性水解酶中的NAG为溶酶体标志物(marker)之一,且对细胞损伤反应最为敏感,为监测细胞损伤的标志物之一。但目前对肝细胞的溶酶体酶活化及介导细胞损伤的机制尚不十分清楚^[1]。

本实验证实MODS发病时,肝细胞溶酶体酶含量急骤增加,且释放至胞质及组织细胞间的NAG酶含量亦明显增加,表明MODS发病时溶酶体酶大量外溢。溶酶体酶外溢过程本身亦即溶酶体酶活化的过程。资料表明,以大肠杆菌LPS复制家兔内毒素休克时,静注LPS1小时后外周血中NAG活性即显著增高,并介导MODS过程的发生,经治疗后MODS的状态改善,则外周血NAG水平亦随之下降。溶酶体酶活化后,对细胞及组织产生致损作用,使细胞溶解,又可导致其他溶酶体膜溶破及酶活化,产生溶酶体酶活化及细胞损伤的“瀑布效应”,导致组织脏器功能严重损伤^[2]。溶酶体膜脆性增加是导致溶酶体酶溢出活化及MODS时脏器损伤的重要因素之一^[3],体内实验证实,大承气汤能使游离NAG水平降低,即具有稳定溶酶体膜的作用。体外热诱导法也证实此结论。大黄及承气合剂体外稳定溶酶体膜的作用要优于大承气汤。大承气汤尚能抑制MODS发病时溶酶体酶的过度合成,使溶酶体酶总含量降低,此可能为下法治疗MODS的机制之一。

4 参考文献

- 1 王今达. 90年代多脏器综合征: SIRS与MODS. 中国危重病急救医学, 1995, 7(6): 324.
- 2 Beal, AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s, system inflammatory response and organ dysfunction. JAMA, 1994, 271: 226.
- 3 赵琪, 崔乃强, 吴咸中, 等. 内毒素对外周血单核细胞内游离钙离子浓度的影响. 中国中西医结合外科杂志, 1996, 2(2): 115.

注: 此研究系国家中医药管理局招标课题(0920181)

北京明驰医药信息中心经销下列商品

电脑骨质增生治疗仪 393元/台(袖珍)
电脑关节肌肉治疗仪 393元/台(袖珍)
风湿骨质增生治疗仪 3700元/台
HT-1电子痔疮治疗仪 13900元/台
HP-1型脑痛治疗仪 580元/台
HP-1型脑痛治疗仪 2300元/台
KWD0808全能脉冲电疗仪 480元/台
韩氏六位神经刺激仪
LH-202型 680元/台
高性能针灸治疗仪 1280元/台
HXY-1手术治疗仪 740元/台
DAJ-10多功能艾炙仪 3980元/台
DAJ-4多功能艾炙仪 580元/台
糖尿病治疗仪 398元/台
三特针灸按摩仪 398元/台
程控针灸按摩治疗仪 398元/台
多用电子穴位测定治疗仪 260元/台
中风治疗仪 890元/台
超低频治疗仪 450元/台

G6805 I型 216元/台
G6805 II型(青岛产) 286元/台
G6805-2A型(上海产) 330元/台
韩氏治疗仪
WQ1002型 230元/台
WQ1002型(离子导入) 270元/台
WQ1002K型(8路输出) 2100元/台
智能型关节治疗仪 398元/台
808理疗枪式拔罐 34元/套(精装)
TDP神灯治疗仪(单头) 620元/台
TDP神灯治疗仪(双头) 940元/台
高血压治疗仪 480元/台
海华治疗仪 328元/台
五星磁吸针 150元/套
奇罐 325元/台
医用定时钟 198元/台
吴氏十八罐 198元/套
橡胶火罐 25元/套

小针刀(拔毒) 150元/套
小针刀(拔毒精装) 180元/套
小针刀疗法 11元/册
小针刀包 62元, 小针刀包 22元/套
单头火针 6元/支
可调单头火针 18元/支
多头火针 15元/支
可调多头火针 28元/支
黄金提针 38元/支
新九针包 310元/套
大号气针袋 58元/只
太极保健笔 75元/只
王不留行贴 20元/包
磁珠贴 80元/包
医用耳穴定向磁珠 30元/袋
耳穴板 10元/片
耳穴板 15元/片(新型)
中国温灸器 78元/套
微烟灸器 18元/套

新型灸架 12元/只
制艾柱模具 28元/套
微烟药条(福康) 6元/盒
温灸纯艾条(安徽) 5元/盒
温灸纯艾条 6元/盒
太乙药艾条 7元/盒
金鑫药艾条 7元/盒
头针模型 36元/个
手针模型 19元/个
足针模型 21元/个
耳针模型(22CM) 35元/个
耳针模型(13CM) 16元/个
耳穴挂图 12元/套
女性人体穴位挂图 34元/套
男性人体穴位挂图 22元/套
颈椎牵引器 165元/个
腰椎牵引器 190元/个
颈椎牵引器(充气) 96元/个
骨槽模型 160元/套

人体解剖模型(男性) 220元/套
人体解剖模型(女性) 240元/套
50cm男性穴位模型 55元/个
26cm男性穴位模型 32元/个
50cm女性穴位模型 58元/个
磁圆海针 85元/只(带教材盒装)
师怀堂九针包 580元/套(带教材)
太极平衡刮痧用盘 50元/套
各种规格华佗、环球针灸针
中医药图书、医学影像详细目录表索
以上商品 50元以上办理邮寄,
另加10%邮费。款到3日内必发货, 对所售商品实行三包。在汇款单附言内
写清所购商品名称和数量。地址: 北京市东直门内南小街16号, 邮政编码:
100007, 联系人: 李维明, 电话(传真):
(010) 64033987, 手机: (010) 1381089887. (广告编号: 9811-14)