

· 方药研究 ·

毒素清颗粒对内毒素肺损伤兔炎症因子表达的影响

李建生¹ 李素云² 刘宝君² 王湘雨²

(1. 河南中医学院老年医学研究所, 河南省郑州市金水路 1 号, 450000; 2. 河南中医学院第一附属医院呼吸疾病研究室)

[摘要] **目的** 探讨毒素清颗粒对内毒素肺损伤兔肺组织炎症因子表达的影响。**方法** 静脉注射脂多糖建立兔肺损伤模型。将大耳白兔 36 只随机分为空白组, 模型组, 毒素清颗粒大、中、小剂量组, 双黄连组。测定各组肺组织炎症因子的表达。**结果** 与空白组比较, 模型组肺组织巨噬细胞炎症蛋白 2 信使核糖核酸(MIP-2 mRNA)和肺组织巨噬细胞、白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α 、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)表达显著增强($P < 0.01$);与模型组比较, 毒素清颗粒组各炎症因子表达明显减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 双黄连组巨噬细胞、IL-1、TNF- α 、ICAM-1 和 VCAM-1 表达明显减弱($P < 0.01$)。**结论** 毒素清颗粒和双黄连均能显著抑制内毒素所致兔肺损伤模型炎症因子表达。

[关键词] 肺损伤; 毒素清颗粒; 细胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1; 巨噬细胞炎症蛋白-2 信使核糖核酸

Effect of Dusuqing Granule on the Expression of Inflammatory Factors of Lung Tissue of Rabbit with the Lung Injury Induced by Endotoxin

LI Jiansheng¹, LI Suyun², LIU Baojun², et al.

(1. Geriatrics Institute of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Dusuqing Granule (Toxin-eliminating Granule) on the expression of inflammatory factors of lung tissue of rabbit with the lung injury induced by endotoxin. **Methods** The rabbit models of lung injury were established by intravenous injection of lipopolysaccharides. The 36 flap-eared white rabbits were randomized into 6 groups: Normal control group, model group, Dusuqing Granule big, middle and small dosage groups, and Shuanghuanglian Oral Fluid group. The expression of inflammatory factors of lung tissues of rabbits were tested. **Results** Compared with the control group, the expressions of MIP-2 mRNA, macrophage of lung tissue, IL-1, TNF- α , ICAM-1 and VCAM-1 in the model group were increased. Compared with the model group, the expressions of inflammatory factors of Dusuqing Granule groups were obviously weakened ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the expressions of macrophage of lung tissue, IL-1, TNF- α , ICAM-1 and VCAM-1 in the Shuanghuanglian group were obviously weakened ($P < 0.01$). **Conclusion** The expressions of inflammatory factors of lung tissues of rabbits with the lung injury induced by endotoxin are obviously increased and Dusuqing Granule and Shuanghuanglian Oral Fluid can inhibit the expression of inflammatory factors.

Key Words Lung injury; Dusuqing Granule (Toxin-eliminating Granule); ICAM-1; VCAM-1; MIP-2 mRNA

革兰阴性菌感染性疾病是老年人临床常见病、多发病,内毒素血症是其主要病理生理改变,由其导致的急性肺损伤是急性呼吸衰竭高病死率和重危病患者死亡的主要原因。尽管抗生素能有效抑制和杀灭细菌,但杀灭细菌的同时使大量内毒素释放可加重内毒素血症。抗内毒素和抗细胞因子等单靶点治疗虽然备受关注,然而目前还没有取得突破性进展,因此,开展中医药对内毒素性老年肺损伤保护作用的研究具有重要意义。研究结果显示,毒素清颗粒对老年细菌性肺炎具有明显疗效,可以改善临床症状、体征和肺脏病理损伤,降低炎症反应^[1]。本课题进一步研究毒素清颗粒对内

毒素导致的肺损伤兔模型肺组织巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP-2) mRNA 和巨噬细胞、白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α 、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)和血管细胞黏附分子 1(VCAM-1)表达的影响。

1 材料

1.1 实验动物

健康日本大耳白兔 36 只,雄性,体重 1.8~2.2 kg,由河南省科学技术开发中心提供[普通级,许可证号:SCXK(豫)2005-0002]。常规饲料喂养,自由饮水,按时通风、冲刷粪便,保持环境安静。

1.2 药物及试剂

毒素清颗粒(河南中医学院第一附属医院制剂室提供,每克含生药量为 1.66 g,方药组成:人参 10 g,瓜蒌

20g, 麦冬 15g, 生地黄 15g, 鱼腥草 20g, 板蓝根 20g, 白头翁 10g, 牡丹皮 10g 等); 双黄连口服液(由河南竹林众生制药股份有限公司提供, 批号: 0411162); 精制大肠杆菌内毒素(LPS Coli O111:B4, 由美国 Sigma 公司提供, 用时用无热原生理盐水稀释成 100 μ g/ml 备用)。CD68 兔抗人单克隆抗体为福州迈新生物技术开发有限公司提供, ICAM-1、VCAM-1、IL-1、TNF- α 多克隆抗体和巨噬细胞炎症蛋白 2(MIP-2) 原位杂交试剂盒、SABC(兔 IgG)-POD 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 主要仪器

UV2450 可见紫外分光光度计(日本岛津制作所生产); L-200 精密天平(Corporation Kyoto Japan); SN-682 型放射免疫 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司提供); SN-697 B 型放射免疫 γ 计数测量系统(中国科学院上海原子核研究所提供); DK-8A 康乐电热恒温水槽(上海医用恒温设备厂生产); Olympus-DP70 显微镜及显微照相系统(日本); Image proplus 5.1 版本专业图像分析软件(美国)。

2 方法

2.1 动物造模与分组

内毒素肺损伤模型采用一次性耳缘静脉注射 LPS 60 μ g/kg。造模后 5h 开胸取全肺, 右肺下叶部分用 4% 多聚甲醛固定 1.5~2h, 流水冲洗 1h, 然后置于 70% 的酒精中用做病理、免疫组织化学和原位杂交分析。36 只大耳白兔随机分为 6 组: 空白组、模型组、毒素清颗粒大剂量组(大剂量组)、毒素清颗粒中剂量组(中剂量组)、毒素清颗粒小剂量组(小剂量组)、双黄连组。空白组和模型组在造模前 2d、2h 及造模后 30min 分别灌胃生理盐水。毒素清颗粒各剂量组和双黄连组于造模前 2d、2h 及造模后 30min 分别灌胃毒素清颗粒(5.04 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、2.52 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、1.26 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和双黄连(2.8ml $\cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 肺脏病理 肺脏组织用 4% 多聚甲醛固定, 常规行脱水、透明、浸蜡、包埋, HE 染色, 光镜下观察肺组织病理形态学改变。

2.2.2 肺组织巨噬细胞、IL-1、TNF- α ICAM-1 和 VCAM-1 的表达测定 免疫组织化学采用 SP 法。免疫组化染色结果分析方法: 光镜下观察, 在 400 倍视野下, 细胞膜、细胞浆呈棕色为免疫组化阳性。以光镜观察并用 Imageproplus 5.1 专业图像分析软件进行图像半定量分析并拍照, 每张切片随机选取不重叠的 5 个视野, 测定其积分光密度值(IOD), 取其平均值代表各细胞因子的表达水平。

2.2.3 原位杂交法检测 MIP-2 mRNA 的表达 肺组织切片用二甲苯 15min 常规脱蜡 3 次, 然后用梯度酒精处理, 3% H_2O_2 /甲醇液室温处理 15min, 蒸馏水洗涤 5min $\times$ 3 次, 在切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵箱消化 18min, 用 0.5M PBS 洗涤 5min $\times$ 3 次, 蒸馏水洗涤 1 次。预杂交: 每张切片滴加预杂交液 20 μ l, 40 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3h。杂交: 在切片上滴加 MIP-2 寡聚核苷酸探针杂交液 20 μ l, 加盖原位杂交专用硅化盖玻片, 恒温孵箱 40 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒杂交过夜。阴性对照不加探针杂交液。杂交后洗涤: 去掉盖玻片, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水温的 2 $\times$ SSC 洗涤 5min $\times$ 2 次, 0.5 $\times$ SSC 洗涤 15min $\times$ 1 次, 0.2 $\times$ SSC 洗涤 15min $\times$ 1 次。滴加封闭液: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30min, 甩去多余液体, 滴加生物素化鼠抗地高辛: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60min。原位杂交用 PBS 洗涤 5min $\times$ 4 次。滴加 SABC: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20min。原位杂交用 PBS 洗涤 5min $\times$ 3 次。滴加生物素化过氧化物酶: 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20min。原位杂交用 PBS 洗涤 5min $\times$ 4 次。DAB 显色, 苏木素复染, 充分水洗。酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

肺组织 MIP-2 原位分子杂交: MIP-2 mRNA 阳性信号表达显示为棕黄色颗粒, 每张玻片随机选取 5 个不重叠的视野进行图像分析, 400 倍光镜下测定 MIP-2 阳性细胞表达的光密度值。取其平均值进行统计学分析。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行统计分析, 所有计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肺脏的病理改变

空白组肺泡结构基本正常, 肺泡腔内无出血、渗出, 未见中性粒细胞, 肺泡间隔无明显水肿、增宽, 肺间质血管无扩张及充血。模型组肺组织弥漫性炎症, 支气管周围有大量炎症细胞浸润, 管腔堵塞, 肺实变, 肺泡隔增宽, 肺间质水肿, 可见较多中性粒细胞浸润, 局限性肺不张, 毛细血管扩张充血。毒素清颗粒组多数肺泡接近正常, 部分肺泡轻度充血, 无渗出物, 肺泡隔变窄, 支气管周围有少量炎症细胞浸润, 肺毛细血管小动脉管壁明显增厚。双黄连组肺组织弥漫性炎症, 肺泡壁接近正常, 肺间质充血、水肿、渗出, 支气管及血管周围中性粒细胞轻度浸润, 肺泡间隔毛细血管扩张。

3.2 肺组织巨噬细胞、IL-1、TNF- α ICAM-1、VCAM-1 及 MIP-2 mRNA 的表达

附表示, CD68 是巨噬细胞特异抗原, 空白组 CD68 阳性细胞(CD68 $^{+}$) 少, 细胞形态小。模型组 CD68 阳性细胞在肺血管、小支气管周围, 肺泡及间质表达强阳

性,定量分析结果显示,与空白组比较,模型组CD68 阳性细胞表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒大、中和小剂量组、双黄连组表达显著减低($P<0.01$ 和 $P<0.05$);与双黄连组比较,毒素清颗粒大剂量组显著降低($P<0.05$)。

TNF- α 免疫反应阳性产物呈棕黄色,阳性反应产物分布在细胞浆内。空白组肺内无或偶见TNF- α 蛋白的巨噬细胞。内毒素性肺损伤模型组支气管上皮、肺间隔巨噬细胞中TNF- α 表达阳性细胞数目增多,呈强阳性表达,毒素清颗粒各剂量组和双黄连组肺组织中TNF- α 表达阳性细胞数目相对较少。定量分析结果显示,与空白组比较,模型组TNF- α 表达明显增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒各剂量组和双黄连组TNF- α 表达明显减弱($P<0.01$),且毒素清颗粒中剂量组明显低于大低剂量组($P<0.05$)。

IL-1 阳性反应产物主要表达在细胞浆内。空白组在肺间质偶有表达,模型组在支气管上皮细胞、肺血管内皮细胞的胞浆内表达呈强阳性。毒素清颗粒大、中剂量组在上述部位表达呈弱阳性。定量分析结果显示,与空白组比较,模型组IL-1 的表达明显增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒大、中剂量组IL-1 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

ICAM-1、VCAM-1 阳性反应产物主要表达在细胞浆内,呈棕黄色。空白组ICAM-1、VCAM-1 表达阴性;模型组ICAM-1、VCAM-1 在支气管上皮细胞,血管内皮细胞表达明显;毒素清颗粒组在血管内皮细胞仅见少量表达。定量分析结果显示,与空白组比较,模型组ICAM-1、VCAM-1 的表达明显增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒各剂量组ICAM-1、VCAM-1 表达显著降低($P<0.01$),双黄连组ICAM-1 表达显著降低($P<0.05$);与双黄连组比较,毒素清颗粒大、中剂量组 ICAM-1 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

原位杂交结果显示,在内毒素性肺损伤家兔肺小

动、静脉及细支气管周围,疏松结缔组织内的巨噬细胞MIP-2 mRNA 阳性表达。定量结果显示,与空白组比较,内毒素肺损伤模型组MIP-2 mRNA 表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒各剂量组表达显著减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以中剂量组最为明显;与双黄连组比较,毒素清颗粒中剂量组MIP-2 mRNA 表达显著减低($P<0.01$)。

附表示,与空白组比较,模型组CD68⁺、TNF- α 、IL-1、ICAM-1、VCAM-1 和MIP-2 mRNA 的表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,毒素清颗粒各剂量组、双黄连组CD68 阳性细胞表达显著减低($P<0.01$ 或 $P<0.05$);毒素清颗粒各剂量组和双黄连组TNF- α 表达明显减弱($P<0.01$),且毒素清颗粒中剂量组明显低于大低剂量组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),毒素清颗粒大、中剂量组IL-1 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);毒素清颗粒各剂量组ICAM-1、VCAM-1 表达显著降低($P<0.01$),双黄连组ICAM-1 表达显著降低($P<0.05$);毒素清颗粒各剂量组表达显著减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以中剂量组最为明显;与双黄连组比较,毒素清颗粒大剂量组CD68 阳性细胞表达显著降低($P<0.05$);毒素清颗粒各剂量组ICAM-1、VCAM-1 表达显著降低($P<0.01$),毒素清颗粒各剂量组表达显著减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中以中剂量组最为明显;与双黄连组比较,毒素清颗粒大、中剂量组 ICAM-1 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);毒素清颗粒中剂量组MIP-2 mRNA 表达显著减低($P<0.01$)。

3 讨论

毒素清颗粒方中人参大补元气而生津养阴;瓜蒌清热,宽胸利气,与人参共为君药;麦冬养阴,益胃生津,清心除烦;生地黄清热凉血,养阴生津,此二味甘寒养阴生津为臣,与人参相伍,共奏益气养阴之效;鱼腥草清热解毒、排脓、利湿;白头翁清热解毒亦为臣,与瓜蒌相伍,以达清热解毒之功;丹参活血,凉血清心,牡丹

附表 各组肺组织中CD68 阳性细胞、IL-1、TNF- α 、ICAM-1、VCAM-1 和MIP-2 mRNA 表达的积分光密度比较(IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	CD68 ⁺	IL-1	TNF- α	ICAM-1	VCAM-1	MIP-2 mRNA
空白组	6	3.82±1.93	3.92±2.83	5.87±1.54	2.86±1.04	2.52±2.89	3.32±2.22
模型组	6	21.81±5.51*	11.06±3.04*	25.76±3.19*	29.06±5.75*	23.57±6.72*	17.67±6.84*
大剂量组	6	10.60±3.47△△▲	7.37±2.51△	13.09±1.36△△#	15.73±3.18△△▲	11.56±4.43△△	10.43±3.72△#
中剂量组	6	11.49±4.23△△	4.71±2.43△△	10.48±1.68△△	10.53±3.03△△▲	8.81±2.61△△	4.69±3.27△△
小剂量组	6	15.36±3.57△	8.38±1.99	16.92±2.92△△##	16.57±7.06△△##	15.02±4.88△△##	10.85±6.79△
双黄连组	6	16.22±6.81△	7.85±4.41	17.28±1.29△△	22.76±6.71△	17.84±6.56	12.47±5.58

注:与空白组比较,* $P<0.01$,与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,与双黄连组比较,▲ $P<0.05$,与中剂量组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

皮清热凉血,活血散瘀,此二味凉血活血,畅通血脉,以防热毒淫及营血,为方中之佐药。全方共奏清热解毒,益气养阴之功。

内毒素肺损伤模型兔肺组织呈现弥漫性炎症,主要表现为支气管周围有大量炎症细胞浸润,管腔堵塞,肺实变,肺泡隔增宽,肺间质水肿,有多白细胞浸润,局限性肺不张,毛细血管扩张充血。经毒素清颗粒干预后,多数肺泡接近正常,部分肺泡轻度充血,无渗出物,肺泡隔变窄,支气管周围有少量炎症细胞浸润,肺毛细血管小动脉管壁较明显增厚,提示毒素清颗粒能够减轻内毒素所致的肺损伤。

TNF- α 可直接损伤肺血管内皮细胞,使内皮细胞通透性增加,引起肺水肿,同时还可上调内皮白细胞黏附分子-1及细胞间黏附分子-1,从而促进PMN与内皮细胞黏附,进而向肺内浸润,释放炎症介质^[2],激发中性粒细胞释放大量损伤介质,诱发急性肺损伤;TNF- α 与其他细胞因子相互促进或相互制约而形成纵横交错的作用网络,介导炎症反应性损伤肺组织,还可以激活凝血系统和补体系统而凝血增加,加重肺内炎症反应。本实验结果提示,毒素清颗粒和双黄连可能是通过对机体内毒素的清除,抑制和减少炎性因子的合成和释放,削弱和阻断炎性因子的作用而实现。

正常情况下ICAM-1表达和活化都受到严格的调控,在刺激因素IL-1、TNF- α 、LPS等作用下,ICAM-1表达上调、与相应配体结合,激活多条细胞内信号转导途径,导致细胞骨架蛋白的重组,造成细胞形态的变化以及细胞的增生、分化、凋亡、细胞因子生成等。在内毒素刺激下,内皮细胞表达ICAM-1增高,中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附作用增强,促进炎症的发生与发展。本研究结果提示,毒素清颗粒可明显抑制内毒性肺损伤时ICAM-1在肺血管内皮细胞的表达,减低肺部炎症反应。

VCAM-1参与免疫细胞的黏附和迁移,在IL-1、TNF- α 等炎症细胞因子的诱导下表达,它的表达也可

诱导细胞因子及一些趋化因子的产生。本研究结果表明,毒素清颗粒能够显著减低肺损伤肺组织中VCAM-1的表达水平,从而减轻肺部炎症反应。

肺泡巨噬细胞是机体重要的炎症细胞,是肺部防御病原微生物和肺损伤的第一道防线^[3]。CD68为巨噬细胞特异抗原^[4],本研究结果提示,毒素清颗粒能够抑制内毒素性肺损伤时巨噬细胞在肺内的聚集,从而减轻肺损伤的程度。MIP-2属于C-X-C亚家族的主要成员,与内皮细胞外基质中带有硫酸乙酰肝素的葡萄糖相互作用,可增加炎症细胞与内皮细胞的黏附,上调白细胞表面黏附分子CD11b/CD18的表达,引导白细胞穿越内皮细胞到达炎症部位^[5]。LPS、TNF、IL-1等可诱导MIP-2的产生。在急性炎症的发生过程中,巨噬细胞炎症蛋白MIP-2是炎症发生时中性粒细胞(PMN)聚集的主要趋化因子,MIP-2高水平表达时间越长,炎症越严重,且与PMN聚集呈正相关,用MIP-2抗体处理后,病情严重程度得到缓解。本研究结果提示,毒素清颗粒的作用机制可能为增加体内内毒素的清除有关,从而抑制多形核细胞的趋化,降低其在肺组织的聚集,最终达到减轻肺部炎症的目的。

参考文献

[1]李建生,程龙,马利军,等.毒素清颗粒治疗老年人细菌性肺炎的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2002,22(7):505-507.
[2]孙中吉,卢青,李银平.急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质[J].中国危重病急救医学,2003,15(3):186-189.
[3]闫文生,阚文宏,黄巧冰,等.脂多糖诱导小鼠脏器中细胞间黏附分子-1的表达[J].生理学报,2002,54(1):71-74.
[4]张伟,蒋耀光,李磊.肺泡巨噬细胞与急性肺损伤[J].创伤外科杂志,2003,5(5):389-391.
[5]蔡珊,陈平.巨噬细胞炎症蛋白与呼吸系统疾病[J].国外医学呼吸系统疾病分册,2002,22(4):175-178.

(收稿日期:2008-01-25;修回日期:2008-05-10)

[编辑:叶晨]

(上接第45页)

参考文献

[1]罗才贵.推拿治疗学[M].北京:人民卫生出版社,2001:69.
[2]黄锦军.推拿治疗椎动脉型颈椎病近况[J].广西中医学院学报.2007;10(3):101-103.
[3]陈文,顾红卫,马维平,等.针刺足三里、悬钟对缺血性中风患者脑血管功能的影响:多中心随机对照研究[J].中国针灸.2006;26(12):851-853.
[4]郭红健.风池透风池穴对改善缺血性脑血管病椎-基底动脉血流量的疗效观察[J].北京中医.2005,24(6):368.

[5]何学斌,吴耀,舒荣.针刺对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].针刺研究.2003,28(2):85-88.
[6]易玮,许能贵,靳瑞.针刺对局灶性脑缺血大鼠脑血流量的影响[J].新中医.2001,33(10):75-76.
[7]王怡明,裘秀兰,王莺,等.1000例颈椎病性眩晕经颅多普勒超声分析[J].浙江中西医结合杂志,1998,8(1):11.
[8]陈艳君,鲍海萍,孙文平.椎基底动脉供血不足的血液流变学分析[J].大连医科大学学报.2007,29(2):179-180.

(收稿日期:2007-09-30;修回日期:2008-06-28)

[编辑:行之]