

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.21.015

清肺承气汤对重症腹腔感染大鼠急性肺损伤的影响

张艳敏, 崔乃强*, 张淑坤

(天津市南开医院, 天津市南开区三纬路 122 号, 300100)

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”)资助项目(2009CB522703)

摘要 目的 探讨清肺承气汤对重症腹腔感染大鼠肺损伤保护作用的可能机制。方法 30 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组和中药组, 每组 10 只。模型组和中药组采用人工胃液联合大肠杆菌腹腔内注射制备大鼠腹腔感染模型, 假手术组以等量 10% BaSO₄ 营养肉汤取代菌液注射。中药组于造模前 1 天予清肺承气汤溶液(每毫升含生药量 1.5 g)灌胃, 每只大鼠 2 ml/次, 3 次/天; 于造模前 30 min 再给药 1 次, 总共给药 4 次。假手术组及模型组给予等量生理盐水。造模后 6 h 检测各组大鼠肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量、细胞学分类、内毒素水平、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)浓度, 肺组织湿/干重(W/D)比值, 并观察肺组织病理学改变。结果 模型组与中药组 BALF 中蛋白含量、中性粒细胞较假手术组明显升高($P < 0.05$)。模型组 BALF 中内毒素、ICAM-1 及 MCP-1 水平、W/D 比值较假手术组明显升高($P < 0.01$); 中药组大鼠内毒素、MCP-1 水平、W/D 比值较模型组明显降低($P < 0.01$)。中药组肺泡间质水肿、出血、炎细胞浸润及肺泡壁纤维组织增生等病理损伤均较模型组减轻。结论 清肺承气汤可减轻重症腹腔感染大鼠所致的急性肺损伤, 其可能与降低大鼠 BALF 中内毒素、MCP-1 水平有关。

关键词 清肺承气汤; 重症腹腔感染; 急性肺损伤; 内毒素

严重感染导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)在危重患者中十分常见, 其机制可能为腹腔感染状态下可导致肠黏膜屏障破坏, 大量细菌繁殖, 内毒素释放, 经血液循环和淋巴系统“易位”, 最终造成肺组织严重损伤^[1]。现代医学主要采用气管插管、正压通气及对症处理等疗法, 但病死率仍高达 66%^[2]。我们采用清肺解毒、泻热通便的治法, 以自拟清肺承气汤治疗重症腹腔感染合并 ALI。本实验在前期研究^[3]的基础上, 建立重症腹腔感染模型, 观察清肺承气汤对重症腹腔感染致大鼠 ALI 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 250 ~ 300 g, 购自中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物实验中心, 实验动物许可证号: SCXK(军)2009-003。

1.2 药物及菌株培养

清肺承气汤组成: 黄连 1.5 g, 厚朴 1.5 g, 枳实 1.5 g, 大黄 1.5 g 等, 中药配方颗粒由北京康仁堂药业有限公司提供, 配置成每毫升含生药量 1.5 g 的灌胃溶液。大肠杆菌菌株(E. Coli)经全自动微生物分析系统(法国生物梅里埃公司, VITEK-AMS)鉴定, 将 E. Coli 接种在营养琼脂培养基上, 37℃ 培养 18 h, 生理盐水冲洗菌苔, 应用比浊法测定 E. Coli 浓度, 配制浓度为 2×10^9 cfu/ml 的细菌悬浊液。

1.3 主要试剂及仪器

取 10.5% 盐酸(天津市南开医院制剂室, 批号 xk13-201-00115) 16.4 ml, 胃蛋白酶(Sigma 公司, 批号 9001-75-6) 10 g, 加生理盐水至 1000 ml, 配制成 pH = 1.5 的人工胃液。Improved-lowry 蛋白定量试剂盒, 北京康为世纪生物科技有限公司, 批号 CW0015。内毒素试剂盒, 厦门市鲎试剂实验厂, 批号 SJ-02。细胞间黏附分子-1(ICAM-1, 批号 ELR-ICAM1-001)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-

* 通讯作者: cnq_nkyy@yeah.net, 18622600500

1, 批号 ELR-MCP1-001) 浓度测定试剂盒均购自 Raybiotech 公司。

高速离心机 (Beckman 公司, Allegra X-22R), 超低温冰箱 (Thermo 公司, MDF-U5386S), 光学显微镜 (Olympus 公司, CX31), 无热原试管、无热原吸头 (厦门鲎试剂实验厂, SJ-02), 漩涡混合仪 (上海精宏实验设备有限公司, DKZ-2B), 酶标仪 (上海科华检验医学产品有限公司, KHB-ST-360), 电热恒温振荡水槽 (天津天宇实验仪器有限公司, DKZ-450A), 光栅分光光度计 (南京宁博分析仪器有限公司, 722 型)。

1.4 模型制备和分组

30 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组和中药组, 每组 10 只。大鼠适应性饲养 1 周, 实验前自由进食、饮水。模型组和中药组采用人工胃液联合大肠杆菌腹腔内注射制备大鼠腹腔感染模型^[3], 假手术组以等量 10% BaSO₄ 营养肉汤取代菌液注射。中药组于造模前 1 天予清肺承气汤溶液以灌胃, 每只大鼠 2 ml/次, 3 次/天; 于造模前 30 min 再给药 1 次, 总共给药 4 次。假手术组及模型组给予等量生理盐水。造模后 6 h 分别处死各组大鼠, 取材备检。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肺泡灌洗液 (BALF) 蛋白含量测定及细胞分类计数 分离气管, 按照每次 1 ml 灌洗液量进行左肺灌洗 5 次, 回收灌洗液, 回收率 >80%, 留作支气管肺泡灌洗液, 使用酶标仪检测蛋白含量并进行细胞分类计数。

1.5.2 BALF 内毒素检测 基质偶氮染色法检测内毒素含量, 按照试剂盒说明进行操作。

1.5.3 BALF 中 ICAM-1、MCP-1 浓度测定 采用放射免疫分析法, 按试剂盒操作说明步骤, 使用酶

标仪进行测定。

1.5.4 肺组织湿重/干重 (W/D) 取右下肺叶, 滤纸吸干表面液体, 称湿重; 置于 80℃ 电热鼓风干燥箱中烘干 48 h 去除水分, 再称干重, 计算 W/D。

1.5.5 病理组织学检查 取右上肺叶, 经甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色后, 用普通光学显微镜观察。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析检验。

2 结果

2.1 各组大鼠 BALF 中蛋白含量及细胞分类计数比较

表 1 示, 模型组与中药组 BALF 中蛋白水平、中性粒细胞计数较假手术组明显升高 ($P < 0.05$); 巨噬细胞和淋巴细胞各组计数比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组和中药组蛋白水平、细胞分类计数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠 BALF 中内毒素、ICAM-1、MCP-1 水平比较

表 2 示, 模型组大鼠 BALF 中内毒素、ICAM-1 及 MCP-1 水平均较假手术组明显升高 ($P < 0.01$); 中药组大鼠 BALF 中内毒素、MCP-1 水平较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 但中药组内毒素、ICAM-1 水平仍明显高于假手术组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肺组织 W/D 比较

表 3 示, 模型组大鼠肺组织 W/D 较假手术组明显增高 ($P < 0.01$); 中药组肺组织 W/D 较模型组明显下降 ($P < 0.01$), 而与假手术组比较差异无统计学意义。

表 1 各组大鼠 BALF 中蛋白水平及细胞分类计数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	蛋白 (g/L)	中性粒细胞 (%)	巨噬细胞 (%)	淋巴细胞 (%)
假手术组	10	0.19 ± 0.04	3.20 ± 1.32	87.55 ± 5.81	9.25 ± 5.11
模型组	10	0.59 ± 0.11*	8.93 ± 2.89*	85.25 ± 5.27	5.82 ± 4.07
中药组	10	0.53 ± 0.15*	7.78 ± 1.53*	85.09 ± 4.35	6.92 ± 3.05

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$

表 2 各组大鼠 BALF 中内毒素、ICAM-1、MCP-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	内毒素 (Eu/ml)	ICAM-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)
假手术组	10	0.14 ± 0.01	5773.02 ± 61.54	3785.62 ± 1073.10
模型组	10	0.71 ± 0.08**	7576.08 ± 309.90**	23047.75 ± 1340.40**
中药组	10	0.43 ± 0.05**△	7153.29 ± 612.98*	7627.55 ± 2310.45△

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$

表 3 各组大鼠肺组织 W/D 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肺组织 W/D 比值
假手术组	10	4.93 $\pm$ 0.42
模型组	10	5.15 $\pm$ 0.01*
中药组	10	5.06 $\pm$ 0.03 $^{\Delta}$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠肺组织病理学观察结果

大体观察: 假手术组肺组织颜色均匀, 包膜光滑, 呈白色略显粉红, 组织柔软弹性好; 模型组肺组织明显肿胀, 呈暗红色, 部分表面可见片状的淤斑和出血; 中药组肺组织略肿胀, 表面散在点状淤斑。光镜观察: 光镜下, 假手术组大鼠肺血管、肺泡间质和肺泡上皮小叶间质均正常; 模型组肺间质水肿、出血, 肺泡壁纤维组织增生变宽、有断裂、融合, 肺泡腔内可见炎细胞浸润; 中药组肺泡间质水肿、出血、炎细胞浸润及肺泡壁纤维组织增生等病理损伤均较模型组轻。

3 讨论

肠是体内具有独特免疫功能且代谢活跃的器官, 是体内最大的致病菌库^[1]。目前有学者认为, 肠道是多器官功能障碍综合征 (MODS) 的“启动器官”, 肠功能衰竭可以导致全身炎症反应综合征 (SIRS) 及 MODS 发生。重症腹腔感染是导致急性肠功能衰竭的主要原因之一^[2], 能引起肠黏膜屏障损伤, 进而肠黏膜通透性发生改变, 肠内细菌毒素移位及炎症介质激活, 从而诱发 SIRS, 进一步发展出现 ALI 及 MODS。

中医学认为, 肺与大肠相表里, 肺气肃降有助于大肠传导, 而大肠传导则利于肺气肃降, 从而维持肺与大肠生理平衡, 保证人体的正常活动。疾病时则肺病和肠病互相影响, 大肠实热邪郁, 腑气不通, 必然会通过大肠—肺相互络属的经脉从而影响肺的某些功能^[3]。ALI 不是一个孤立存在的疾病, 而是严重损伤引起的全身炎症瀑布反应发展过程中的一个阶段。肺脏是全身炎症反应病理过程中最易受损伤的首位靶器官, 其症状与中医学中的“风温肺热”相似。外邪入侵机体, 使正气受损, 机体免疫力下降, 肠道屏障功能亦随之下降, 肠道菌群入血, 内毒素释放, 从而引发脓毒血症, 即邪毒亢盛, 表现为实热壅盛, 可见发热、大便秘结、腹胀等。若邪气太盛, 正气不足以抗邪外出, 邪毒壅滞于肺, 灼伤气阴, 煎熬血液, 则见瘀血, 血瘀则水停, 瘀血、水邪阻滞则肺失宣降, 可见肺间质渗

出、水肿^[4], 肺毛细血管通透性增加^[5], BALF 中的中性粒细胞比例增加等。此外, ALI 是一种失控的炎症反应, 病理特征表现为肺血管上皮细胞及肺泡上皮细胞广泛损伤。ICAM-1 和 MCP-1 在此过程中发挥着不可替代的作用^[6]。单核/巨噬细胞首先在趋化因子的作用下聚集到肺组织, 在单核/巨噬细胞和微血管内皮细胞产生的黏附分子相互作用下和微血管内皮细胞黏附才能跨血管迁移并于炎症部位浸润, 这是肺损伤的起始步骤, 介导炎症和免疫反应的关键环节^[10-13]。

清肺承气汤是在大承气汤基础上加减, 其中大黄具有清火泻热、祛瘀凉血、通里攻下、荡涤肠胃的作用, 且现代医学研究表明大黄具有抗内毒素及抗炎的作用, 并可促进肠蠕动、维护肠道屏障功能、防止肠道菌群移位、抗氧化作用及免疫调节等多种功效^[14]。积滞内阻则腑气不通, 故以厚朴、枳实行气散结, 消痞除满, 并助大黄推荡积滞以加速热结之排泄。黄连清热泻火解毒, 以增强大承气汤清热解毒及清气分、营血分之热功效。大便解, 热结去, 腹满除, 津液回, 胃气和, 阴阳平, 则病愈人安。本研究结果提示, 清肺承气汤能够明显改善大鼠腹腔感染后的肺组织 W/D, 可以减轻肺组织的病理损伤, 降低 BALF 中内毒素、MCP-1 水平, 说明清肺承气汤可以通过控制炎症反应, 减少内毒素移位, 保护肠黏膜屏障功能, 从而达到保护脏器的作用。

参考文献

- [1] 朱义用, 景炳文, 姜永华. 肠源性感染致早期肺损伤模型的制备及其机制探讨 [J]. 中国危重急救医学, 2000, 12(9): 541-545.
- [2] 顾勤. 急性呼吸窘迫综合征的死亡率与危险因子 [J]. 国外医学内科分册, 1995, 22(1): 17-18.
- [3] 喻文立, 崔乃强, 刘洪斌, 等. 清热解毒方剂对腹腔感染大鼠肠黏膜屏障功能的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2009, 15(3): 305-308.
- [4] 王佩燕. 肠: 多器官功能障碍综合征防治的靶器官 [J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(11): 647-648.
- [5] 邱海波, 周韶霞. 多器官功能障碍综合征现代治疗 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 152.
- [6] 韩国栋, 常繁华, 冯学瑞, 等. 对“肺与大肠相表里”理论的实验研究: 大承气汤对改进动物模型肺脏的影响 [J]. 中医杂志, 1990(2): 48-50.
- [7] 孟繁魁. 宣白承气汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床疗效观察 [J]. 新中医, 2012, 44(4): 23-24.
- [8] 张勤, 雷澍, 叶雪惠. 大黄煎酊对腹腔感染大鼠急性肺

损伤的防治作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2004, 10(4): 303-305.

[J] Lazarov S, Balutsov M, Ianev E. The role of cell adhesion molecules and proinflammatory mediators in the pathogenesis of endotoxin adult respiratory distress syndrome [J]. Vutr Bo les, 2000, 32(4): 18-24.

[10] 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症介质 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 186-189.

[11] Bevilacqua M, Stengelin M, Seed B, et al. Endothelial leucocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for

neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins [J]. Science, 1989, 243(4895): 1160-1165.

[12] Yoshimoto T. The expression of ICAM-1 and cytokines in the reperfusion state [J]. Hokkaido Igaku Zasshi, 1997, 72(1): 97-112.

[13] Lefer AM, Lefer DJ. The role nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemia - reperfusion [J]. Cardiovasc Res, 1996, 32(4): 743-751.

[14] 郑世华, 全巧云, 朱宗耀, 等. 不同途径注入大黄对重症胰腺炎患者细胞因子的影响研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(7): 437-438.

Effect of *Qingfei Chengqi Decoction* on Acute Lung Injury in Rats with Severe Abdominal Infection

ZHANG Yanmin, CUI Naiqiang, ZHANG Shukun

(Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100)

ABSTRACT Objective To discuss the possible protective mechanism of *Qingfei Chengqi Decoction* on acute lung injury in rats with severe abdominal infection. **Methods** Totally 30 Wistar rats were randomized into the sham operation group, model group and TCM group, with 10 in each. The model group and TCM group were treated with simulated gastric fluid and *E. coli* intraperitoneal injection to create abdominal infection model. The sham operation group was treated with equal volume of 10% BaSO₄ nutrient broth. One day before modeling, TCM group was gavaged with *Qingfei Chengqi Decoction* solution (1.5 g crude drug/ml) 2ml/time for each rat and 3 times daily. The TCM group was given gastric administration again 30min before modeling together 4 times. The sham operation group and model group were given equal volume of normal saline. Six hours after modeling, the protein level, cytological classification, endotoxin level, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and lung wet/dry weight (W/D) ratio in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected in each group. The pathological changes of lung tissue were observed. **Results** Comparing with the sham operation group, the protein level and neutrophil level in BALF were significantly increased in the model group and TCM group ($P < 0.05$). Comparing with the sham operation group, the levels of endotoxin, ICAM-1, MCP-1 and W/D ratio were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the levels of endotoxin, MCP-1 and W/D ratio were significantly decreased in TCM group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the interstitial edema, hemorrhage, inflammatory cell infiltration, fibrous hyperplasia of alveolar wall and other pathological lesions were alleviated in TCM group. **Conclusion** *Qingfei Chengqi Decoction* can reduce acute lung injury in rats with severe abdominal infection, which may be relevant to decreasing the levels of endotoxin and MCP-1 in BALF.

Keywords *Qingfei Chengqi Decoction*; severe abdominal infection; acute lung injury; endotoxin

(收稿日期: 2013-12-24; 修回日期: 2014-04-09)

编辑: 邓 媛