

• 方药研究 •

凉膈散对内毒素致大鼠急性肺损伤
T 辅助细胞漂移的影响

胡孔友 余林中

(南方医科大学中医药学院, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 510515)

[摘要] **目的** 探讨凉膈散对内毒素致大鼠肺损伤时机体致炎、抗炎反应的分子机制。 **方法** 用内毒素脂多糖(LPS)复制大鼠急性肺损伤模型。分别用高、中、低剂量的凉膈散水煎剂灌胃给药,并与地塞米松做对照,于不同时间点检测外周血及支气管肺泡灌洗液(BALF)中 T 辅助细胞 1(Th1)和 T 辅助细胞 2(Th2)的含量,观察 Th1/Th2 比值的变化。 **结果** 模型组大鼠外周血与 BALF 中 Th1/Th2 比值逐渐降低,在 4、8、16h 时间点与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),中、高剂量组与地塞米松组的 Th1/Th2 比值在 8h 和 16h 与模型组同时点比较有所提高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 凉膈散在一定程度上纠正了 Th1/Th2 细胞比例失衡,这可能是其对急性肺损伤具有保护作用的机制之一。

[关键词] T 辅助细胞;急性肺损伤;内毒素;凉膈散

Effect of Lianggesan on T Helper Cell Shift in Rats with Acute Lung Injury Induced by Endotoxin

HU Kongyou, YU Linzhong

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

ABSTRACT **Objective** To investigate the molecular mechanism of inflammation development and anti-inflammation response of Lianggesan Decoction (Decoction for cooling the chest) on endotoxin-induced acute lung injury rats. **Methods** The rat models with acute lung injury were made by lipopolysaccharide (LPS) through intravenous injection. The high, middle and low dosage of Lianggesan Decoction were given by gastric perfusion and compared with dexamethasone (DXM). The contents of Th1 and Th2 in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured at different time points to observe the changes in Th1/Th2. **Results** In the model group, Th1/Th2 in peripheral blood and BALF was gradually lowering, the difference was significant compared with those of the blank group ($P < 0.01$) at 4h, 8h, 16h. In the middle and high dosage groups and DXM group, Th1/Th2 was getting higher at 8h and 16h compared with that of the model group with a significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Lianggesan Decoction corrects the Th1/Th2 imbalance, which might be one of the mechanisms in protecting the acute lung injury.

Key Words T helper cell; Acute lung injury; Endotoxin; Lianggesan Decoction (Decoction for cooling the chest)

内毒素性肺损伤主要是以肺泡—毛细血管膜急性损伤为基础的炎症反应,发病机制错综复杂。近些年研究发现 T 辅助细胞 1/T 辅助细胞 2(Th1/Th2)细胞比例失衡与急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发生密切相关^[1]。本研究通过温病治疗常用名方凉膈散的干预治疗,从 T 淋巴细胞免疫应答及免疫调节方面来研究 Th1/Th2 漂移的变化,以探讨凉膈散治疗急性肺损伤的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 156 只,体重 150~180g,

由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK 粤 2006-0015。

1.2 药物及试剂

内毒素(lipopolysaccharide, LPS^{055:B5}),购自美国 Sigma 公司,进口分装;FITC 标记的抗大鼠 CD3 单抗,TC(PE-cy5)标记的抗 CD8 单抗,破膜剂 FIX & PERM Kit 等均购自 Caltag 公司;PE 标记的小鼠 IgG1,κ 同种型对照免疫球蛋白购自 eBioscience 公司;PE-IFN- γ 、PE-IL-4 等购自 BD Pharmingen 公司;PMA、离子霉素(ionomycin)、莫能菌素(monensin)、多聚甲醛(PFA)等均购自 Sigma 公司;地塞米松(DEX)购自浙江仙琚制药股份有限公司,批号 070941。

2 方法

2.1 动物模型的建立

大鼠 ALI 模型参照文献[2],各组动物末次给药

后在尾静脉注射 LPS 5mg/kg, 以大鼠肺组织病理切片示炎症表现为造模成功标志。

2.2 中药制备

凉膈散方中各药选择原药材符合 2005 年版《中国药典》规定, 加工炮制合格的饮片, 大黄 12g, 四川产; 芒硝 12g, 安徽产; 甘草 12g, 内蒙古产; 薄荷 6g, 安徽产; 栀子 6g, 湖南产; 黄芩 6g, 河北产; 连翘 24g, 湖南产。以上药材均由广东广弘药材有限公司提供, 并由南方医科大学中药鉴定室鉴定。先取生甘草、连翘、栀子、黄芩, 头煎加入 10 倍水量浸泡 30min, 煮沸 20min 后加入芒硝、大黄及薄荷, 继续煮沸 10min, 4 层无菌纱布过滤, 二煎加 6 倍水量, 煮沸 15min, 过滤, 两次所煎药液合并, 浓缩成含生药 3g/ml, 置 4℃ 冰箱保存备用。

2.3 动物分组及给药方法

采用随机数字表法分为空白组 6 只(灌胃生理盐水 2ml/只)、模型组 30 只(灌胃生理盐水 2ml/只)、低剂量组 30 只(灌胃凉膈散水煎液 7.5g 生药/kg)、中剂量组 30 只(灌胃凉膈散水煎液 15g 生药/kg)、高剂量组 30 只(灌胃凉膈散水煎液 30g 生药/kg)、地塞米松组 30 只(灌胃地塞米松 0.135mg/kg), 连续灌胃 5 天。末次给药后, 空白组大鼠尾静脉注射生理盐水 1ml/只, 其余 4 组大鼠尾静脉注射 LPS 5mg/kg。

2.4 检测指标和方法

2.4.1 标本收集 高、中、低剂量组和地塞米松组分别在注射 LPS 后 1、2、4、8、16h 不同时间点取材, 每个时间点 6 只大鼠, 10% 的水合氯醛麻醉, 采用腹主动脉采集抗凝动脉血; 支气管肺泡灌洗液(BALF)的制备: 打开胸腔, 用止血钳夹闭右侧主支气管, 在气管上段剪断, 插入 16 号针头, 用 4℃ 无菌生理盐水进行左肺灌洗, 每次 4ml, 反复灌洗 2 次后抽出, 共 2 次, 回收率达 85% 以上, 灌洗液经 1500r/min 离心 10min, 取其上清液及沉淀待测, 然后再取下肺组织。空白组 6 只大鼠在 1h 时一次性取材, 方法同上。

2.4.2 大鼠外周血及 BALF 中 Th1/Th2 比值的计算 取 80μl 全血标本于试管中, 用 RPMI1640(不含小牛

血清-FBS) 稀释至 300μl。取 BALF 中的 300μl 外周血单核细胞(PBMC, 2×10^6 细胞/ml) 于试管中, 加入 1μg/ml PMA 工作液, 50μg/ml Ionomycin 工作液, 0.1mg/ml Monensin 工作液, 混匀, 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 5h。混匀, 加入 CD8-PE-Cy5 和 CD3-FITC, 室温避光孵育 15min; 分成 3 管, 每管加入 100μl 已染色的全血, 加入 100μl Fix & Perm 中的 ReagentA(固定、溶血), 室温避光孵育 15min, 加入 3ml PBS, 1200r/min 离心 5min, 弃除上清液; 每管中加入 100μl Fix & Perm 中的 ReagentB(破膜), 同时各管中加入相应的抗体 IgG1-PE、IFN-γPE、IL-4-PE; 室温避光孵育 20min。每管中加入 3ml PBS, 1200r/min 离心 5min, 弃除上清液; 0.2ml PBS 重悬细胞, 应用流式细胞仪(FACS Calibur, Becton Dickinson)进行检测。首先以 CD3 和 CD8 双阳性细胞群开窗, 再检测 CD4 细胞群中细胞因子产生细胞的百分率。FACS Calibur 收集细胞(总数 10000 个细胞), Cell quest 软件分析流式结果。Th1、Th2 的含量分别为干扰素 γ(IFN-γ)、白细胞介素 4(IL-4) 在 CD4⁺T 细胞中所占的百分比, 再计算 Th1/Th2 的比值。

2.4.3 形态学变化 各组大鼠于相应的时间点麻醉, 开胸取右下肺, 观察肺大体病理改变, 经 10% 甲醛固定, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋切片, HE 染色后, 用普通光学显微镜观察。

2.5 统计学方法

计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析和组间多重比较 LSD 法。

3 结果

3.1 各组大鼠外周血 Th1/Th2 比值变化

表 1 示, 模型组大鼠外周血中 Th1/Th2 的比值在 2、4、8、16h 点时与空白组 1h 时比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中剂量组 16h 和高剂量组 8h、16h 与模型组同时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 地塞米松组在 4、8、16h 时与

表 1 各组大鼠不同时间点外周血 Th1/Th2 比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1h	2h	4h	8h	16h
空白组	6	1.37 ± 0.19	—	—	—	—
模型组	30	1.54 ± 0.20	1.07 ± 0.15 *	0.62 ± 0.22 **	0.44 ± 0.10 **	0.37 ± 0.10 **
低剂量组	30	1.55 ± 0.40	1.14 ± 0.22	0.65 ± 0.13	0.47 ± 0.10	0.40 ± 0.08
中剂量组	30	1.54 ± 0.20	1.18 ± 0.29	0.81 ± 0.21	0.58 ± 0.12	0.58 ± 0.08 △△
高剂量组	30	1.53 ± 0.37	1.20 ± 0.21	0.83 ± 0.18	0.64 ± 0.12 △	0.61 ± 0.09 △△
地塞米松组	30	1.55 ± 0.42	1.21 ± 0.19	0.88 ± 0.17 ▲	0.68 ± 0.10 ▲▲▲	0.64 ± 0.15 ▲▲▲

注: 与空白组 1h 时比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时间点比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与低剂量组同时间点比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ (空白组大鼠只在 1h 一次性取材, 故比较均采用此数值)

表 2 各组大鼠不同时间点 BALF Th1/Th2 比值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1h	2h	4h	8h	16h
空白组	6	1.40±0.32	—	—	—	—
模型组	30	1.49±0.35	1.07±0.42	0.58±0.19*	0.52±0.23*	0.45±0.12*
低剂量组	30	1.51±0.50	1.16±0.26	0.76±0.20	0.70±0.18	0.66±0.17
中剂量组	30	1.43±0.32	1.23±0.43	0.83±0.21	0.82±0.20△	0.81±0.23△
高剂量组	30	1.42±0.48	1.27±0.46	0.93±0.32△	0.86±0.21△	0.82±0.28△△
地塞米松组	30	1.41±0.35	1.26±0.31	0.99±0.34△	0.93±0.19△△	0.88±0.18△△

注:与空白组 1h 时比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时时间点比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ (空白组大鼠只在 1h 一次性取材, 故比较均采用此数值)

模型组同时时间点、低剂量组同时时间点比较亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 高、中、低剂量组相互之间比较无统计学差异。

3.2 各组大鼠外周血 Th1/Th2 比值变化

表 2 示, 模型组 4、8、16h 时与空白组 1h 时比较差异有统计学意义($P < 0.01$); 中剂量组 8、16h 时与模型组同时时间点比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 高剂量组和地塞米松组 4、8、16h 与模型组同时时间点比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 高、中、低剂量组与地塞米松组组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.3 各组大鼠肺组织病理改变比较

造模后各组大鼠大体观察肺, 4h 可见肺体积增大, 表面有斑点状出血灶; 空白组光镜观察肺泡结构完整, 肺泡壁无水肿、渗出液。模型组至 8h 及 16h, 肺水肿程度明显, 斑点状出血灶增多, 光镜观察肺泡腔内大量炎性细胞浸润, 肺间质及肺泡水肿、出血, 肺泡膨胀不全或肺泡融合。高、中、低剂量组及地塞米松组损伤程度介于模型组与空白组之间, 镜下显示病变程度较模型组轻, 渗出比模型组明显减少。

4 讨论

炎症本质上是机体的防御反应, 但炎症失控又可损伤自身细胞, 炎症是否失控取决于炎症和抗炎反应之间能否达到相对平衡。Th1、Th2 细胞是 CD4⁺T 辅助细胞分化产生不同细胞因子的效应细胞亚群, Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 等促炎细胞因子, 介导细胞免疫, Th2 细胞主要分泌 IL-4 等抗炎细胞因子, 介导体液免疫, 两者的平衡实际上反映了促炎和抗炎的平衡。Th2 细胞虽然可以对抗 Th1 细胞引起的炎症反应, 但 Th2 细胞过强又会引起机体免疫机能低下, 发生脓毒血症, 而且 Th2 细胞过强可能导致炎症反应发生后机体过度增生修复, 过度“修复”反而影响功能恢复, 导致肺纤维化, 反而会加重 ALI^[6-8]。ALI 作为机体过度炎症反应的后果, 调控炎症反应则是防止 ALI 发生发

展、降低死亡率的关键所在。故近几年来如何维持 Th1/Th2 免疫失衡成为研究治疗急性肺损伤的思路之一。

《温病条辨》云:“肺位最高, 邪必先伤”, “热”、“水(湿)”、“瘀”、“虚”是 ALI 的主要病机关键, 外邪犯肺, 邪热传入阳明, 与肠道糟粕搏结, 肺气不通, 肺失宣降, 上逆则喘, 中阻则满, 热迫血瘀, 瘀热互结, 壅滞于肺, 致水液运行障碍, 水聚成痰或水泛为肿^[6]。中医理论认为, “肺与大肠相表里”, 故用泻下热结, 通畅腑气, 以通腑利肠泻肺实, 使肺气得以宣发肃降, 从而达到治疗肺炎感染的作用。凉膈散为温病治疗常用名方, 王今达等曾以凉膈散为主方重用大黄清上泻下治疗 ALI、急性呼吸窘迫综合征(ARDS) 获得一定的效果, 研究发现, 在探讨解毒作用机制中凉膈散能够抑制小鼠体内炎症因子 TNF- α 及 IL-6 的表达, 减轻肝、肺组织损伤^[7,8]。因此通过多种有效成分、多个作用靶点来调控炎症反应, 以维护机体炎症、抗炎反应的动态平衡, 这种综合性治疗作用可能是凉膈散发挥作用的重要机制。

在本实验中, 通过建立大鼠急性肺损伤的模型, 从 5 个不同的时间点动态的观察细胞内 Th1/Th2 的平衡变化, 在模型组中 Th1/Th2 比值逐渐减小, 说明 Th1 向 Th2 漂移, 4h 后大鼠肺组织病理形态学表现为大量炎性细胞浸润并扩散到肺泡腔内, 肺间质及肺泡水肿、出血, 说明模型制作成功; 凉膈散各剂量组与地塞米松组可以减缓 Th1/Th2 比值的降低, 并且以高剂量组和地塞米松组更为明显, 减少肺水含量, 肺组织表现病理损害减轻, 对 ALI 发挥一定的保护作用。因此, 可以通过检测 Th1/Th2 的平衡变化, 选择适当的时机, 而给予中药的干预措施, 恢复促炎/抗炎平衡, 这可能是防治急性肺损伤的重要方向。

参考文献

[1] 冯英凯, 徐剑铤, 杨庆华, 等. 内毒素肺损伤大鼠 Th1/Th2 细胞漂移的变化及其作用[J]. 实用医学杂志, 2004, 20(5): 485-488.

腰痛宁组 NGF 表达量比模型大鼠明显升高 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠比目鱼肌中 NGF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	灰度值
假手术组	3	4.43 ± 0.60
模型组	3	$6.50 \pm 0.56^*$
腰痛宁组	3	$8.20 \pm 0.70^{**\Delta}$

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

3 讨论

一般研究认为,腰椎间盘突出对神经根的机械性压迫是诱发疼痛的重要原因,腰椎间盘突出症的动物模型设计大多采用外源压迫模拟突出椎间盘。本研究所借鉴文献经验改进模型^[8],将特制的硅胶片置于左侧 L5 神经根出硬膜囊的交界处,从而造成对神经根单纯的机械性压迫,该模型操作简便易行,成功率高。

腰椎间盘突出后产生压迫,导致神经根微循环障碍,组织水肿、毛细血管通透性增高,神经内轴浆流动改变,造成神经细胞缺血、缺氧、营养输送及代谢物排泄途径受阻,使神经根产生实质性损伤。继而出现一系列神经根失功能的症状和体征,诸如感觉异常、运动功能减弱等。神经根组织超微结构的改变以及神经纤维的变性是其病理形态学基础。神经根组织的病理变化,脊神经节神经元细胞膜水肿,内膜间隙明显充血、水肿,出现变性、坏死;胞质内粗面内质网及线粒体等细胞器含量减少,粗面内质网核糖体脱落,线粒体肿胀嵴消失,核膜皱缩^[9]。本实验光镜观察压迫损伤 30 天神经元细胞肿胀,胞浆空泡样改变,神经纤维脱髓鞘改变。透射电镜观察,损伤神经元结构破坏,无完整的胞膜和核膜,细胞质裂解成颗粒状。神经根纤维明显脱髓鞘变,髓鞘板层结构松散、扭曲、紊乱,轴突萎缩变细,甚至纤维变性消失,轴突与髓鞘间出现空隙,雪旺细胞

核浓缩,胞浆肿胀。

腰痛宁方中以马钱子通络散结,消肿止痛为君;配以全蝎、僵蚕熄风通络;土鳖虫、乳香、没药活血化瘀、通经舒络为臣;苍术、麻黄温经通络以除湿邪为佐;牛膝引药下行,甘草调和诸药并制马钱子之烈性为使。全方具有化瘀通络、消肿止痛的作用。本实验利用免疫组化和 Western blot 方法观察到腰痛宁对模型大鼠神经根损伤后局部和靶器官处 NGF 表达的作用,抑制神经根损伤后局部 NGF 的高表达,促进其支配的靶器官 NGF 表达。

参考文献

[1] 朱盛修. 现代骨科手术学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1619.
[2] 杨毓华. 腰腿痛的椎管外因素[J]. 中国骨伤, 1991, 4(4): 46.
[3] 李兰芳, 李国风, 解丽君, 等. 腰痛宁的毒理学研究[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(11): 102-106.
[4] 计福全. 腰痛宁临床疗效及特点[J]. 中草药, 1997, 28(2): 125.
[5] 王拥军, 万超, 沈培芝, 等. 实验性腰神经根压迫模型的建立[J]. 中国中医骨伤科杂志, 1999, 7(1): 9-12.
[6] 方喜业主编. 医学实验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 220-223.
[7] Zhang M, Zhou Q, Liang QQ, et al. IGF-1 regulation of type II collagen and MMP-13 expression in rat endplate chondrocytes via distinct signaling pathways[J]. Osteoarthritis and Cartilage, 2009, 17(1): 100-106.
[8] Yoshizawa H, Kobayashi S, Morita T. Chronic nerve root compression. Pathophysiologic mechanism of nerve root dysfunction[J]. Spine, 1995, 20(4): 397-407.
[9] 岳寿伟, 张纓, 吴宗耀. 兔腰神经慢性压迫和炎症刺激后背根神经节的形态学变化研究[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25(10): 577-580.

(收稿日期: 2008-12-16; 修回日期: 2009-03-15)

[编辑: 邓媛]

(上接第 1025 页)

[2] 胡孔友, 余林中, 陈育尧, 等. 凉膈散对内毒素致大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2008, 24(5): 3-5.
[3] Barbarin V, Xing Z, Delos M, et al. P Hmonary overexpression of IL-10 augments lung fibrosis and Th2 responses induced by silica particles[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(5): 841-848.
[4] 尹红军, 曹书颖. Th1/Th2 型细胞因子与肺纤维化[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25(5): 352-357.
[5] Misson P, Brombacher F, Delos M, et al. Type 2 immune response associated with silicosis is not instrumental in the de-

velopment of the disease[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(1): 107-113.
[6] 陈天琪, 葛正行. 浅谈中医对急性肺损伤的认识[J]. 贵阳中医学院学报, 2006, 28(5): 7-8.
[7] 余林中. 中药解毒新机制——对细胞信号转导调控作用研究[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2002, 18(1): 8-10.
[8] 林慧, 余林中, 秦清和. 凉膈散对内毒素肺损伤小鼠肺组织核因子- κ B 活性的影响[J]. 四川中医, 2004, 22(7): 16-18.

(收稿日期: 2008-12-31; 修回日期: 2009-03-30)

[编辑: 邓媛]