

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.21.016

王氏连朴饮对急性肺损伤大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的影响

师为人¹, 褚璨灿¹, 陈雅婷¹, 易旭², 李文¹, 朱星^{*}

(1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵州省贵阳市南明区市东路 50 号, 550002; 2. 贵阳中医学院第二附属医院)

摘要 目的 探讨王氏连朴饮治疗急性肺损伤的可能作用机制。方法 将 36 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、地塞米松组和王氏连朴饮大、中、小剂量组, 每组 6 只, 雌雄各半。造模前先连续灌胃 5 天, 地塞米松组用地塞米松注射液 (浓度为 0.9 mg/ml) 灌胃, 王氏连朴饮大、中、小剂量组分别给予浓度为 1.75、0.87、0.43 g/ml 药液灌胃, 对照组和模型组用等量蒸馏水灌胃, 每日 1 次, 每次 1 ml。第 6 天采用平刺尾静脉注射脂多糖 (0.2 g/100 g) 后静置 24 h 建立急性肺损伤模型。第 7 天检测大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β) 含量, HE 染色观察肺、肠组织病理形态学状态。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL- 1β 含量明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 地塞米松组和王氏连朴饮各剂量组大鼠血清 TNF- α 含量明显降低, 地塞米松组和王氏连朴饮大、中剂量组血清 IL- 1β 含量降低 ($P < 0.01$)。与王氏连朴饮小剂量组比较, 王氏连朴饮大剂量组大鼠血清 TNF- α 含量明显降低, 王氏连朴饮大、中剂量组大鼠血清 IL- 1β 含量亦降低 ($P < 0.01$)。HE 染色显示, 王氏连朴饮大、中、小剂量组对急性肺损伤大鼠肺、肠组织病理学均有所改善, 且以王氏连朴饮大剂量组效果更佳。结论 王氏连朴饮对急性肺损伤大鼠肺、肠组织具有一定的保护作用, 可能通过控制炎症反应, 从而抑制其肠-肺轴转移。

关键词 急性肺损伤; 王氏连朴饮; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β ; 炎症反应; 肠-肺轴

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指非心源性的急性进行性缺氧性呼吸衰竭, 通常由各种肺内外致病因素所导致, 以肺微血管通透性上升进而致使肺泡渗出液中的肺水肿 (富含蛋白质) 与透明膜的形成并伴随肺间质纤维化为主要病理特征, 属于临床常见的呼吸系统急危重症^[1]。临床上直接或间接因素如严重感染、休克、创伤及烧伤、吸入有害气体等均可以引起 ALI 的发生。ALI 的最终严重阶段会发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)。近年对该病的流行病学、发病机制及治疗策略等方面研究虽取得了许多重要的进展, 但仍缺乏有效的治疗方法, 导致病死率仍居高不下^[2]。中医学认为, ALI 主要病机为“热”或“湿热”, 并以湿热证临床致死率最高^[3]。早在《霍乱论》中就记载有王

氏连朴饮这一治疗湿热重证的名方, 为清代温病四大家之一王孟英所创。有研究显示, 王氏连朴饮对肺、肠炎症反应均具有改善作用, 尤其是对脾胃湿热证具有很好的疗效^[4]。本研究观察王氏连朴饮对急性肺损伤大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β) 的影响, 探讨其治疗 ALI 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠雌雄各 18 只, 鼠龄 45 天, 体重 150 ~ 200 g, 购自重庆腾新生物技术有限公司, 实验动物合格证号 SCXK (军) 2012-0011。

1.2 实验药物

王氏连朴饮组成: 姜厚朴 6 g, 黄连 3 g, 石菖蒲 3 g, 法半夏 3 g, 豆豉 9 g, 焦栀子 9 g, 芦根 60 g (参考《霍乱论》中原方比例按现代剂量调整)。制备方法: 用水浸泡 30 min, 加水约到药量的 9 倍, 反复煎煮 3 次, 期间用冷凝管采集蒸气中药物的挥发性成分, 混合 3 次药汁, 离心后取上清液,

基金项目: 国家自然科学基金 (81660764); 贵州省教育厅创新群体重大项目 (黔教合 KY 字 [2017] 041); 贵州省普通高等学校治未病工程中心 (黔科合 KY [2016] 013)

* 通讯作者: 11863362@qq.com, 18985157509

浓缩配成 1.75、0.87、0.43 g/ml 浓度的药液，4℃ 冰箱保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

地塞米松（新乡市常乐制药有限公司，批号：H41020216）；脂多糖（LPS，北京索莱宝科技有限公司，批号：L8880）；10% 水合氯醛（科密欧化学试剂有限公司，批号：AR250g）；TNF- α 试剂盒（批号：Ab46070）、IL-1 β 试剂盒（批号：Ab100768），艾博抗（上海）贸易有限公司；苏木素（西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司，批号：H9627）；伊红（批号：71014544）、无水乙醇（批号：10009218）、二甲苯（批号：10023418）、盐酸（批号：10011018）、包埋石蜡（批号：69019361）、中性树胶（批号：10004160），均为中国医药集团产品。

C2500-R-230V 微型离心机，美国 Labnet 公司；ICV-450 型电热恒温培养箱，日本 ASONE 公司；Multiskan MK3 型全自动酶标仪，Thermo scientific 公司；RM 2016 型轮转式切片机，德国 Leica 公司；R35 型一次性刀片，日本 Feather 公司；JK-6 型生物组织摊烤片机，武汉俊杰电子有限公司；BX53 型显微镜，奥林巴斯公司。

1.4 造模方法

参照文献 [5] 建立 ALI 动物模型。大鼠称重、编号后用固定架固定，露出尾部，75℃ 热水浸润水浴，直至暴露尾静脉。采用平刺尾静脉注射 LPS（0.2 g/100 g）后静置 24 h 建立 ALI 模型。造模成功评价标准参考文献 [6] 中内毒素致肺组织损伤，依据肺泡及间质炎症、出血、肺水肿、肺不张、透明膜形成等。

1.5 动物分组及干预方法

将 36 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为对照组、模型组、地塞米松组和王氏连朴饮大、中、小剂量组，每组 6 只，雌雄各半。造模前先连续灌胃 5 天，第 6 天除对照组外其余各组建立模型，第 7 天取材。每日固定 10:00 灌胃，地塞米松组用地塞米松注射液（浓度为 0.9 mg/ml）灌胃，王氏连朴饮大、中、小剂量组分别予 1.75 g/ml、0.87 g/ml、0.43 g/ml 浓度药液灌胃。灌胃量根据《中药药理研究方法学》[7] 换算，每日 1 次，每次 1 ml；对照组和模型组用等量蒸馏水灌胃，连续灌胃 5 天。动物均于造模前 12 h 开始禁食，自由饮水。

1.6 观察指标及方法

试验期间观察各组大鼠一般情况，包括活动、

皮毛、呼吸及大小便。所有动物在造模成功后用 10% 水合氯醛（0.3 ml/100 g）腹腔注射麻醉，迅速打开腹腔，经腹主动脉采血 2 ml，4℃、3000 r/min 离心 10 min，分离血清，-20℃ 冰箱冻存待测。后处死并采集肺、肠组织，装入充满 4% 多聚甲醛的采集管内使其完全浸没，固定后常温保存待测。血清标本利用 ELISA 法检测，严格按照 TNF- α 、IL-1 β 试剂盒说明操作；肺、肠组织经过 HE 染色后用光镜观察并摄像。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，计量资料用（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组间数据比较用独立样本 t 检验，多组比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

对照组大鼠形体正常，自主活动、精神状态均较好，呼吸频率正常，大小便正常；模型组大鼠表现为嗜卧懒动，精神萎靡，呼吸频率 24 h 内均见升高，心跳微弱，大便溏稀不成型，实验期间死亡 1 只；地塞米松组大鼠形体瘦弱，动作迟缓，精神状态一般，身形消瘦，呼吸频率 24 h 内均见升高，便溏；王氏连朴饮各剂量组大鼠形体正常，动作迟缓，精神状态一般，呼吸频率 24 h 内均见升高，便溏。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量比较

表 1 示，与对照组比较，模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量明显增高（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，地塞米松组和王氏连朴饮各剂量组大鼠血清 TNF- α 含量明显降低，地塞米松组和王氏连朴饮大、中剂量组血清 IL-1 β 含量降低（ $P < 0.01$ ）。与地塞米松组比较，王氏连朴饮中、小剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 升高（ $P < 0.01$ ），王氏连朴饮

表 1 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量比较（pg/ml， $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	TNF- α	IL-1 β
对照组	6	31.832 $\pm$ 4.605	60.472 $\pm$ 6.610
模型组	5	73.097 $\pm$ 6.032*	120.453 $\pm$ 14.893*
地塞米松组	6	33.817 $\pm$ 6.058 Δ	63.152 $\pm$ 5.578 Δ
王氏连朴饮大剂量组	6	49.547 $\pm$ 10.200 $\Delta\#$	88.067 $\pm$ 10.474 $\Delta\#$
王氏连朴饮中剂量组	6	50.256 $\pm$ 8.052 $\Delta\blacktriangle$	93.907 $\pm$ 9.020 $\Delta\blacktriangle\#$
王氏连朴饮小剂量组	6	61.227 $\pm$ 4.701 $\Delta\blacktriangle$	106.896 $\pm$ 7.594 $\Delta\blacktriangle$

注：TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；与对照组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与地塞米松组比较， $\blacktriangle P < 0.01$ ；与王氏连朴饮小剂量组比较， $\#P < 0.01$

大剂量组血清 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与王氏连朴饮小剂量组比较,王氏连朴饮大剂量组大鼠血清 $\text{TNF-}\alpha$ 含量明显降低 ($P < 0.01$),王氏连朴饮大、中剂量组大鼠血清 $\text{IL-1}\beta$ 含量亦降低 ($P < 0.01$)。

2.3 各组大鼠肺、肠组织 HE 染色病理形态学结果

图 1 示,对照组大鼠肺泡壁和肺泡隔结构完整,肺泡腔彼此分离、大小正常,没有水肿迹象,肺间质稠密,毛细血管周围有丰富的结缔组织包被。模型组大鼠肺泡壁和肺泡隔结构受到破坏,有不同程度的缺损,肺泡腔广泛融合、体积扩大,疑似出现水肿,肺间质稀疏,毛细血管周围缺少结缔组织包被。地塞米松组大鼠肺泡与模型组相比,肺

泡壁和肺泡隔结构修复良好,肺泡腔恢复隔离、体积恢复正常,水肿消失,肺间质恢复稠密,毛细血管周围有结缔组织包被,但与对照组相比仍未完全修复。王氏连朴饮大、中、小剂量组大鼠肺泡与模型组相比均有不同程度的修复,其中王氏连朴饮大剂量组修复效果最为明显,基本恢复正常;王氏连朴饮中剂量组修复效果一般,但组织结构均基本恢复完整;王氏连朴饮小剂量组修复效果最差,组织结构勉强恢复完整,肺间质仍然稀疏。

图 2 示,对照组大鼠结肠上皮、固有层、黏膜下层、肌层结构完整,层次分明,无黏膜结构紊乱、杯状细胞减少,上皮较平滑,固有层腺体数量、大小正常,腺腔清晰可见。模型组大鼠结肠黏

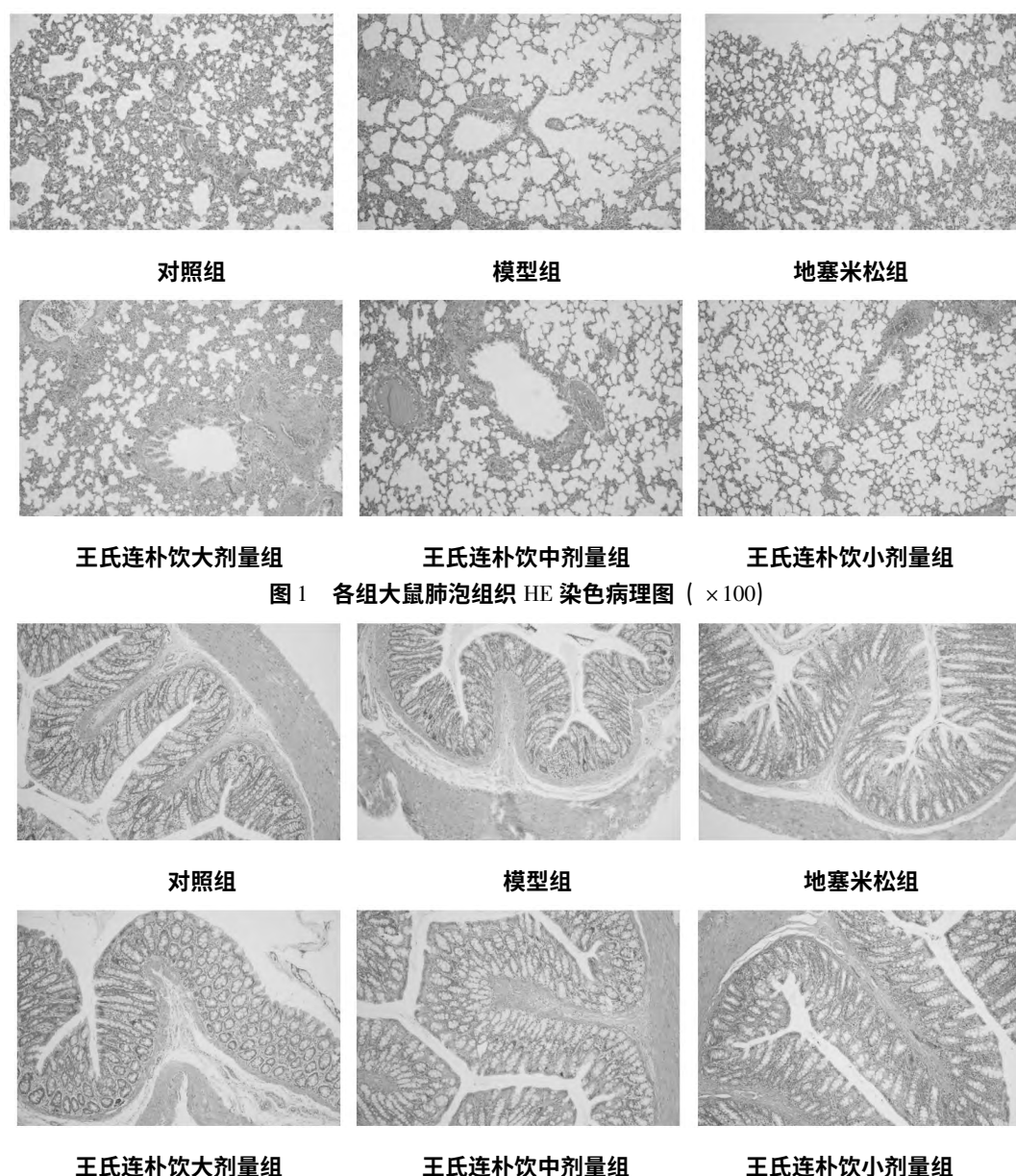


图 1 各组大鼠肺泡组织 HE 染色病理图 ($\times 100$)

图 2 各组大鼠结肠组织 HE 染色病理图 ($\times 100$)

膜结构出现破坏,层次较对照组欠佳,黏膜上皮细胞可见萎缩缺失,上皮不够平滑,杯状细胞减少,上皮细胞与固有层的间距增宽,固有层腺体明显减少和萎缩,腺腔模糊但尚可见。地塞米松组大鼠结肠与模型组相比,黏膜层次结构得到修复,杯状细胞数量正常,上皮恢复完整平滑,固有层腺体数量、大小恢复正常,腺腔较对照组有所萎缩但边界清晰。王氏连朴饮大、中、小剂量组大鼠结肠与模型组相比均有明显修复,基本恢复正常。

3 讨论

现代医学认为,ALI 的发病机制主要是肺源性或全身性失控炎症反应,治疗多从控制感染、改善通气、减轻肺损伤入手,一般使用糖皮质激素、氧自由基清除剂和抗氧化剂、血管扩张剂、免疫抑制剂、肺泡表面活性物质替代等^[8]。地塞米松是一种人工合成的皮质类固醇,属于糖皮质激素,长期服用容易导致骨质流失、易瘀青、肌无力甚至萎缩、医源性库欣综合征面容和体态等^[9]。在炎症反应中,肠道是机体最早发生炎症反应的脏器,而肺则是功能最早发生异变的脏器,因此肺与肠道的炎症反应在 ALI 的发生过程中具有非常密切的关系^[10-11]。此外有研究表明,在失血性休克模型实验中,肺的炎症损伤是由肠源性炎症因子转移引起的,其传导通路不是通过门静脉循环,而是通过肠系膜淋巴液而到达肺部^[12]。因此,除了传统的体循环途径,另有一种联系肺与肠道的通路称之为“肠-肺轴”,该轴由迷走神经和一系列信号因子共同起到炎症信号的传导作用^[13]。通过该轴的联系,肺、肠组织的炎症反应可以相互影响,出现肺与肠道炎症的恶性循环^[14]。

中医学认为,ALI 多属湿热壅肺证,主要由外感邪气,肺失宣降,痰湿内生,湿郁化热,痰热互结于肺所致。脾为生痰之源,肺为储痰之器,脾阳被困而不振,加重痰湿壅肺;再有外感时邪与内生湿热相合,本虚而标实,肺气郁遏上逆,故发热不恶寒,气急而咳喘;肺中痰热壅盛气滞郁热,故胸闷而胀满,烦躁而痰黄稠;湿热上逆头面,故面红而目眵;热盛则耗气伤阴,痰壅则津液不行,故咽干而口燥,舌苔黄腻而饮水不多,脉象又因外感而浮数。肺与大肠同属阳明,以阳明经相互络属,故肺中湿热郁久多下移大肠;肺主宣发肃降,若为湿热郁遏,则为气机逆乱之始,导致升多降少,化火生毒,痰浊、水湿、瘀血、火毒诸邪聚生,产生胃

肠湿热证^[15]。治当用燥湿泄热法,王氏连朴饮方中黄连、栀子清泄里热;厚朴、半夏燥湿化痰;淡豆豉配栀子清宣郁热;石菖蒲芳香化浊,佐助半夏、厚朴化浊;芦根清热利湿。共奏燥湿化痰、清肺泄热、理气调中,燥化肺中痰湿,清泄肺中郁热之功,同时调畅中焦气机,达到肺(胃)肠同治的效果。

本次实验指标 TNF- α 、IL-1 β 作为临床上两个重要的炎症指标,可以直观反映炎症反应的变化趋势^[16]。本研究结果显示,模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 含量较对照组明显增高,而地塞米松组和王氏连朴饮各剂量组均在一定程度上降低血清 TNF- α 、IL-1 β 含量,且王氏连朴饮大剂量效果和地塞米松相当。HE 染色结果也显示,王氏连朴饮大剂量组对 ALI 大鼠肺组织和肠组织病理改善亦优于中、小剂量。因此,可以初步认为王氏连朴饮对 ALI 具有一定的改善作用,尤其以大剂量效果更好,其机制可能是下调 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,从而控制肠道炎症反应,进而通过肠-肺轴减弱肺部炎症信号的传导,间接使肺部的炎症反应得到控制,最终对 ALI 中的肺、肠组织起到保护作用。

参考文献

- [1] 王吉耀. 内科学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 159-160.
- [2] BEASLEY MB. The pathologist's approach to acute lung injury [J]. Arch Pathol Lab Med, 2010, 134(5): 719-727.
- [3] 杨英伟, 刘恩顺. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医病因病机及辨证分型的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 49(9): 1937-1939.
- [4] 周燕萍, 高清华, 李华锋, 等. 3 种温病治法对温病湿热证模型血浆 ETX 血清 TNF- α 、IL-1 β 影响的对比研究 [J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(8): 1567-1568.
- [5] 李琦, 钱桂生, 张青, 等. 不同剂量脂多糖对大鼠急性肺损伤效应的观察 [J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(10): 871-873.
- [6] 刘泽茹, 宋磊, 李丹. 急性肺损伤实验动物模型的特征和评价方法 [J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(6): 1100-1102.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [8] LIU Y, HOLDBROOKS AT, MEARES GP, et al. Preferential recruitment of neutrophils into the cerebellum and brainstem contributes to the atypical experimental autoimmune encephalomyelitis phenotype [J]. J Immunol, 2015, 195(3): 841-852.
- [9] 郭松文. 地塞米松对大鼠内毒素急性肺损伤肺损伤肺

泡灌洗液中白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 含量的影响 [J]. 中华损伤与修复杂志, 2013, 8(5): 464-469.

- [10] HASSOUN HT, KONE BC, MERCER DW, et al. Post-injury multiple failure: the role of the gut [J]. Shock, 2001, 15(1): 1-10.
- [11] DAYAL SD, HAUSER CJ, FEKETEVA E, et al. Shock mesenteric lymph-induced rat polymorphonuclear neutrophil activation and endothelial cell injury is mediated by aqueous factors [J]. J Trauma, 2002, 52(6): 1048-1055.
- [12] DEITCH EA, ADAMS C, LU Q, et al. A time course study of the protective effect of mesenteric lymph duct ligation on hemorrhagic shock-induced pulmonary injury and the toxic effects of lymph from shocked rats on endothelial cell monolayer permeability [J]. Surgery, 2001, 129(1): 39-

47.

- [13] MARSLAND BJ, TROMPETTE A, GOLLWITZER ES. The gut-lung axis in respiratory disease [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12 (Suppl 2): S150-S156.
- [14] FINK MP, DELUDE RL. Epithelial barrier dysfunction a unifying theme to explain the pathogenesis of multiple organ dysfunction at the cellular level [J]. Crit Care Clin, 2005, 21(2): 177-196.
- [15] 孔立, 卢笑晖, 江涛. 全身炎症反应综合征的根本病机是气机逆乱 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 16(2): 68-70.
- [16] 戴丽, 端莉梅, 姚志清. 木犀草素对脂多糖诱导下小鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究 [J]. 河北医药, 2015, 37(3): 339-342.

Effects of *Wangshi Lianpo Decoction* (王氏连朴饮) on Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β in Rats with Acute Lung Injury

SHI Weiren¹, CHU Cancan¹, CHEN Yating¹, YI Xu², LI Wen¹, ZHU Xing¹

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002; 2. Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effects and possible mechanism of *Wangshi Lianpo Decoction* (王氏连朴饮) on acute lung injury. **Methods** A total of 36 SD rats were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group and *Wangshi Lianpo Decoction* high, middle and low dose groups, with 6 rats in each group, half male and female. The rats were given intragastric administration for 5 days before modeling, and the dexamethasone group was intragastrically administered with dexamethasone injection (0.9 mg/ml). The concentration of the high, middle and low doses groups were given 1.75, 0.87, 0.43 g/ml *Wangshi Lianpo Decoction*, and the control group as well as the model group were orally administered with the same amount of distilled water once a day, 1 ml each time. On the 6th day, a model of acute lung injury was established after tail-end injection of endotoxin (LPS) and was allowed to stand for 24 hours. On the 7th day, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the serum of rats were detected, and the histopathological state of lung and intestine was observed by HE staining. **Results** The expressions of TNF- α and IL-1 β in serum of ALI model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, serum TNF- α levels in the dexamethasone group and all *Wangshi Lianpo Decoction* groups were significantly decreased, and serum IL-1 β levels were decreased in the dexamethasone group and *Wangshi Lianpo Decoction* high and middle dose groups ($P < 0.01$). Compared with *Wangshi Lianpo Decoction* low-dose group, the serum TNF- α content of *Wangshi Lianpo Decoction* high-dose group was significantly decreased, and the serum IL-1 β content of *Wangshi Lianpo Decoction* high and middle dose groups was also decreased ($P < 0.01$). HE staining showed that the high, middle and low doses of *Wangshi Lianpo Decoction* had improved the lung and intestine tissues of ALI rats. The most remarkable effect occurred in the high dose *Wangshi Lianpo Decoction* group. **Conclusion** *Wangshi Lianpo Decoction* has a certain protective effect on lung and intestinal tissues of rats with acute lung injury, and may inhibit the intestinal lung axis metastasis by controlling the inflammatory response.

Keywords acute lung injury; *Wangshi Lianpo Decoction*; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; inflammatory reaction; intestinal-pulmonary axis

(收稿日期: 2018-04-16; 修回日期: 2018-07-03)

编辑: 邓 媛