

建立冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证和 10% 乙醇的辣椒溶液灌模胃热证可使机体之气偏盛偏衰, 寒热(阴阳)失衡, 与《素问·阴阳应象大论》中提到的“阳胜则身热……能冬不能夏, 阴胜则身寒……能夏不能冬”的论述相一致。在测定的一般生理指标及相关的生化指标结果与温度趋向行为学结果有一定的相关性。具体体现在与空白组比较, 冷氢氧化钠溶液灌胃模拟胃寒证小鼠体重、饮食量、饮水量和耗氧量下降, 肝、脾和脑的脏器指数有显著变化($P < 0.05$), ATP 酶、T-AOC 和 SOD 显著下降($P < 0.05$); 10% 乙醇的辣椒溶液灌模胃热证小鼠体重、饮食量和耗氧量下降, 饮水量上升, 脾和睾丸的脏器指数有显著变化($P < 0.01$), ATP 酶、T-AOC 和 SOD 显著上升($P < 0.05$), 提示不同寒热证模型在体内会产生相应的内在反映, 并且与小鼠的温度趋向性也存在一定的相关性。

参考文献

[1] 唐扩军, 刘士敬. 中医证型动物模型研究的反思[J]. 中医药

信息, 2000, 17(1): 3-4.

[2] 肖小河, 金城, 赵艳玲, 等. 中药药性的生物热力学表达及其应用[J]. 中美医学, 2006, 3(1): 1-6.

[3] Aguiar P, Mendonca L, Galhardo V, et al. Open Control: a free opensource software for video tracking and automated control of behavioral mazes[J]. J Neurosci Methods, 2007, 166(1): 66-72.

[4] 李茹柳, 陈艳芬, 陈蔚文. 左金丸方证相应动物模型建立的回顾及其对方证研究的意义[J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(3): 236-238.

[5] Jain Campbell. Body temperature and its regulation[J]. Anaesth Intens Care, 2008, 9(6): 259-263.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2007CB5-12607); 国家自然科学基金项目(30772740)

1 昆明理工大学生命科学与技术学院(650224);

2 中国人民解放军第三〇二医院;

3 成都中医药大学

通讯作者: 肖小河, xiaoxiaohe302@126.com, (010)66933322

清热解毒方对脓毒症大鼠机体免疫状态的影响

喻文立¹ 崔乃强² 傅强² 刘洪斌³ 李东华³

在脓毒症的初始阶段, 脓毒症以大量分泌炎性介质为主要特征, 而随着脓毒症的进展, 机体可能经历了一个免疫抑制阶段, 由此引起的迅速出现且难以控制的继发性感染是引起脓毒症患者死亡重要原因之一^[1]。目前认为, Th1 和 Th2 细胞功能的改变能够反映机体的免疫功能状态, 而 Treg 作为免疫系统的重要调节细胞之一, 可能与脓毒症早期细胞免疫抑制有关^[2]。中药治疗在脓毒症的防治中展现了良好的疗效, 这与其免疫调理功能密切相关^[3]。本研究以大鼠腹腔感染致脓毒症模型为研究对象, 探讨了清热解毒方对机体免疫失衡状态的影响及作用机理, 为脓毒症的临床防治提供理论依据。

1 材料与方

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠(动物由军事医学科学院四所动物室提供, 动物号为 DD20013) 96 只, 雄性, 体重 200~220g, 在实验室使用标准颗粒饲料喂养 1 周。

1.2 药物

清热解毒方剂, 由大黄、黄芩、白头翁、败酱草组成, 药物剂量配比为 2:2:3:3, 由天津市中西医结合急腹症研究所药研室提供, 制备成含生药量 1g/ml 的浓度浓缩煎剂, 分装, 高压灭菌后置于 4℃ 冰箱存放备用。

1.3 仪器和试剂

FACSCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickson 公司, 美国), CO₂ 培养箱(Thermo 公司, 美国)。红细胞溶血素(Becton Dickson 公司, 美国), 破膜剂(Becton Dickson 公司, 美国), 高尔基体转运抑制剂(BFA, Becton Dickson 公司, 美国), 佛波酯(PMA, Becton Dickson 公司, 美国), 离子霉素(Sigma 公司, 美国), 异硫氰酸荧光素(FITC)标记

小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), 藻红毒素(PE)标记小鼠抗大鼠干扰素-γ(IFN-γ)单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), PE 标记小鼠抗大鼠白细胞介素-4(IL-4)单克隆抗体(Becton Dickson 公司, 美国), PE 标记小鼠 IgG1κ 同型对照抗体(Becton Dickson 公司, 美国), FITC 标记小鼠抗大鼠 CD4 单克隆抗体(Biolegend 公司, 美国), FITC 标记小鼠抗大鼠 CD25 单克隆抗体(Biolegend 公司, 美国), 别藻蓝素(APC)标记小鼠抗大鼠叉头翼状螺旋转录因子(Foxp3)单克隆抗体(eBioscience 公司, 美国), APC 标记大鼠 IgG2a 同型对照抗体(eBioscience 公司, 美国), 固定/破膜剂(eBioscience 公司, 美国)。

1.4 脓毒症模型建立和分组

参照 Wichterman 等^[4]介绍的盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型: 大鼠麻醉后, 开腹分离暴露盲肠, 3-0 丝线结扎盲肠根部, 以 18G 穿刺针横穿肠壁, 挤出 0.1ml 肠内容物, 将盲肠放回腹腔, 术毕立即皮下注射 50ml/kg 林格液抗休克。96 只大鼠随机分为对照组、模型组、清热解毒方组, 每组 32 只。对照组动物只开腹、关腹与复苏, 但不进行盲肠结扎和穿孔。各组分别于造模后 12h、24h、48h、72h 随机取 8 只大鼠, 麻醉后解剖腹腔, 无菌留取腹主动脉血 1ml 待测。

1.5 检测指标

1.5.1 大鼠全血 Th1/Th2 比值测定 500μl 腹主动脉血以等倍 RPMI-1640 稀释, 加入刺激剂(PMA5ng, 离子霉素 0.5μg, BFA1μg)混合, 37℃、5% CO₂ 孵育 4 小时。取出混匀后, 将血样加入 3 只试管中(200μL/管), 分别加入 FITC 标记小鼠抗大鼠 CD4 抗体进行细胞外染色, 经

过溶血和破膜通透,将 PE 标记的小鼠 IgG1 抗体(同型对照)、小鼠抗大鼠 IFN- γ 抗体和 IL-4 抗体分别加入 3 只试管中进行细胞内染色。用 CellQuest 软件获取,收集 10 万个细胞,在 FSC/SSC 图中设门,选出淋巴细胞群,在 CD4-FITC/SSC 图中设门,选出 CD4⁺ T 细胞群。在 CD4-FITC/IgG1-PE 设定阴性区域,在 CD4-FITC/IFN- γ -PE 和 CD4-FITC/IL-4-PE 图中计算 IFN- γ ⁺ 细胞和 IL-4⁺ 细胞各占 CD4⁺ T 细胞的比例,以二者之比表示 Th1/Th2 比值。

1.5.2 大鼠全血 Treg 比例检测 取两只试管,各加入 100 μ l 肝素抗凝全血,每管加入 FITC 标记的小鼠抗大鼠 CD4 和 CD25 抗体进行细胞外染色,经过破膜通透,两管分别加入 APC 标记的大鼠 IgG2b 抗体(同型对照)和小鼠抗大鼠 Foxp3 抗体进行细胞内染色。用 CellQuest 软件获取,收集 10 万个细胞,在 FSC/SSC 图中设门,选出淋巴细胞群,在 CD4-FITC/CD25-PE 图中,运用十字象限确定 CD4⁺ CD25⁺ 细胞。在 CD4-FITC/IgG2a-APC 图中,设定阴性区域,在 CD4-FITC/Foxp3-APC 图中,确定 Foxp3⁺ 细胞比例,计算 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 细胞占 CD4⁺ 细胞的比例作为 Treg 比例。

2 结果

2.1 大鼠 CLP 后全血 Th1/Th2 比值的变化

表 1 示,与对照组比较,模型组 Th1/Th2 比值在造模后 12h 显著升高($P < 0.01$),清热解毒方组 Th1/Th2 比值升高幅度低于模型组;与对照组比较,造模后 24h 模型组和清热解毒方组 Th1/Th2 比值升高($P < 0.01$),两组之间比较差异无显著性;造模后 48h,3 组 Th1/Th2 比值比较差异无统计学意义;造模后 72h,模型组 Th1/Th2 比值与对照组比较明显降低($P < 0.01$),而清热解毒方组与对照组比较未见显著差异。

表 1 各组大鼠各时点全血 Th1/Th2 比值比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	12h	24h	48h	72h
对照组	0.57 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.14	0.61 $\pm$ 0.16	0.56 $\pm$ 0.13
模型组	1.45 $\pm$ 0.29 ^{**}	0.79 $\pm$ 0.25 ^{**}	0.55 $\pm$ 0.17	0.35 $\pm$ 0.16 [*]
清热解毒方组	0.96 $\pm$ 0.21 ^{**Δ}	0.82 $\pm$ 0.32 ^{**}	0.68 $\pm$ 0.32	0.59 $\pm$ 0.13 ^{Δ}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 大鼠 CLP 后全血 Treg 比例的变化

表 2 各组大鼠各时点全血 Treg 比例比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	12h	24h	48h	72h
对照组	5.78 $\pm$ 1.14	5.81 $\pm$ 1.23	5.83 $\pm$ 1.13	5.75 $\pm$ 1.19
模型组	2.37 $\pm$ 0.74 ^{$\Delta\Delta$}	4.02 $\pm$ 0.85 [*]	7.32 $\pm$ 0.76 [*]	8.37 $\pm$ 1.46 ^{**}
清热解毒方组	2.97 $\pm$ 0.89 ^{$\Delta\Delta$}	3.15 $\pm$ 0.72 ^{**Δ}	4.68 $\pm$ 0.62 ^{Δ}	5.33 $\pm$ 1.16 ^{$\Delta\Delta$}

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 示,造模后 12h,模型组与清热解毒方组 Treg 比例与对照组比较均显著降低($P < 0.01$),两组之间比较差异无统计学意义;造模后 24h,模型组与清热解毒方组 Treg 比例仍低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但清热

解毒方组与模型组比较显著降低($P < 0.01$);造模后 48h 和 72h,模型组 Treg 比例显著高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而清热解毒方组与对照组比较无显著差异。

2.3 模型组和清热解毒方组大鼠 Th1/Th2 比值与 Treg 比例相关性分析

模型组 Th1/Th2 比值与 Treg 比例呈线性负相关($r = -0.867, P < 0.05$)。清热解毒方组 Th1/Th2 比值与 Treg 比例呈线性负相关($r = -0.914, P < 0.05$)。

3 讨论

CLP 模型通过将盲肠近端结扎、远端穿孔的方法,使动物自身肠内容物外溢造成混合性细菌感染引起腹膜炎,是国内外公认的脓毒症动物模型^[5]。腹腔感染可以通过多种因素造成肠屏障功能的损害,引起肠源性内毒素血症,导致脓毒症的产生^[6]。研究表明^[7],T 辅助淋巴细胞(Th),特别是 Th1 和 Th2 细胞功能的改变能够反映机体的免疫功能状态,Th1 和 Th2 细胞可通过所产生的细胞因子发挥相互调节和相互制约作用,Th1/Th2 的平衡变化有助于反映 SIRS/CARS 的失衡。本实验结果显示,与对照组比较,模型组 Th1/Th2 比值在造模后 12h 上升并达到峰值,从 24h 到 72h 呈持续下降的趋势。大量研究证实,感染、创伤等导致脓毒症时机体炎症反应的同时伴有抗炎反应发生,且早期以炎症反应为主,晚期以抗炎反应为主,随着时间延长,出现 Th1 向 Th2 漂移,本实验结果验证了这一结论。清热解毒方组 Th1/Th2 比值变化趋势与模型组一致,但是 Th1/Th2 升高和降低的幅度小于模型组,说明以大黄、黄芩、白头翁及败酱草为组方的清热解毒方剂可以增强和调节机体免疫功能,在腹腔感染早期明显降低促炎反应和抗炎反应程度,在脓毒症进展过程中维持 Th1 细胞功能,抑制 Th1 向 Th2 漂移,使抗炎与促炎反应趋向平衡。

参考文献

- [1]林洪远,盛志勇.脓毒症免疫调理治疗的新思路[J].中国危重病急救医学,2004,16(2):67-69.
- [2]姚咏明.免疫功能紊乱在脓毒症发病中的作用及意义[J].中国危重病急救医学,2007,19(3):138-141.
- [3]崔乃强,傅强,邱奇,等.通里攻下法对 SIRS/MODS 的治疗价值—多中心临床分析[J].中国中西医结合外科杂志,2007,13(1):3-7.
- [4]Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal[J]. J Surg Res, 1980, 29 (1): 189-201.
- [5]Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection[J]. Shock, 2005, 24(1): 19-23.
- [6]Leaphart CL, Tepas JJ 3rd. The gut is a motor of organ system dysfunction[J]. Surgery, 2007, 141 (6): 563-569.
- [7]Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes[J]. Nature, 1996, 383 (3): 787-793.

1 天津市第一中心医院麻醉科(300192);

2 天津市南开医院外科;

3 天津市中西医结合急腹症研究所

通讯作者:喻文立, wlyu9@sina.com, 13920098326

http://www.cnki.net