

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110504. 1202. 009

大承气汤对内毒素血症大鼠炎性细胞因子的影响

马超英¹, 周鹃², 李海霖², 耿耘¹, 唐静雯¹, 彭春荣¹, 涂显琴¹, 徐寅生¹

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031; 2. 青海省中医院, 西宁 810000)

[摘要] 目的: 观察大承气汤对内毒素血症大鼠炎性细胞因子的影响, 探讨大承气汤在治疗内毒素血症中的作用机制。方法: SD 大鼠 50 只, 随机分为假手术组、模型组、大承气汤组、大黄组、厚朴组。ig 剂量按 $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予大鼠, 大鼠术前给药 2 d, 末次给药 1 h 后, 按盲肠结扎穿孔术 (CLP) 方法造模, 术后连续按相同剂量给药 3 d, 测定大鼠血浆内毒素和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素- 1β (IL- 1β)、白介素-10 (IL-10) 的含量。结果: 与模型组相比, 各治疗组血浆内毒素含量、血清 TNF- α 含量均明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组血清 IL- 1β 和 IL-10 含量均显著降低, 差异显著 ($P < 0.01$); IL- 1β /IL-10 模型组 (1.2186 ± 0.3879)、大承气汤组 (0.3891 ± 0.2239)、大黄组 (0.3667 ± 0.2489)、厚朴组 (0.3725 ± 0.1858) 亦有明显差异 ($P < 0.01$)。结论: 大承气汤对内毒素血症的作用机制与拮抗血清炎性细胞因子 TNF- α , IL- 1β 和调节 IL- 1β /IL-10 比值有关。

[关键词] 内毒素血症; 大承气汤; 炎性细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)13-0130-04

Effect of Dachengqi Decoction on Cytokines Tumor Necrosis Inflammatory Cytokines in Rats with Endotoxaemia

MA Chao-ying¹, ZHOU Juan², LI Hai-lin², GENG Yun¹,
TANG Jing-wen¹, PENG Chun-rong¹, TU Xian-qin¹, XU Yin-sheng¹

(1. Life Science and Engineering College of Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;
2. Qinghai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xining 810000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Dachengqi Decoction (DT) on inflammatory cytokines in rats suffered from the endotoxemia, and to discuss the mechanism of DT when curing the endotoxemia. **Method:** Fifty SD rats were divided into 5 groups randomly: sham operation group, model group, DT group, Rhei Radix et Rhizome group and *Magnolia officinalis* group. Two days before model establishment, rats were intervened by intragastric administration ($1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) for the medication groups; and 1 hour after the last drug administration, model was established by CLP, then medication was continued for 3 days. The serum content of endotoxin, TNF- α , IL- 1β and IL-10 was detected. **Result:** The content of plasma endotoxin, TNF- α , IL- 1β and IL-10 was decreased evidently in curing group compared with those in the model group ($P < 0.01$). Concerning IL- 1β /IL-10, model group (1.2186 ± 0.3879), DT group (0.3891 ± 0.2239), Radix Et Rhizome Rhea group (0.3667 ± 0.2489), *M. officinalis* group (0.3725 ± 0.1858), each treatment group compared with model group also had significant difference ($P < 0.01$). **Conclusion:** It shows that the mechanism of DT on endotoxemia is related with the antagonistic to the serum

[收稿日期] 20101214(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873365); 中央高校基本科研业务费专项研究项目(SWJTU09ZT29)

[第一作者] 马超英, 医学硕士, 教授, 从事中药及复方的作用机制研究, E-mail: mcy195888@126.com

[网络出版时间] 2011-5-4 12:02

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110504.1202.009.html>

inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and the moderating effect to the ratio of IL-1 β /IL-10.

[Key words] endotoxemia; Dachengqi Decoction; inflammatory cytokines

内毒素血症是多种严重感染性疾病的病理基础,是导致感染性疾病加重和产生多种并发症的根本原因,如何有效地控制疾病的发展,是降低多种严重感染性疾病死亡率的关键之一。近年来的研究表明,炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10) 等在内毒素血症的发病机制中起到重要的作用。目前认为 TNF- α 是内毒素所致机体多种损伤的重要介导因子之一;另一方面促炎介质与抗炎介质的不平衡是加重炎症、促进内毒素血症发生发展的重要因素。因此,调控这些细胞因子的释放对控制感染性疾病的发展有重要意义。

大承气汤 (DT) 源于张仲景所著的《伤寒论》,其组成为大黄、芒硝、厚朴、枳实,功能峻下热结,是通里攻下的代表方剂,近年研究报道,大承气汤广泛地用于治疗各种感染性疾病。本文对其作用机制与调控炎性细胞因子的相关性进行了探讨。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,体重 (220 $\pm$ 30) g,由成都达硕生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2008-24。

1.2 药物 大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.,产地青海;厚朴为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd et Wils 的干燥树皮、根皮和枝皮,产地四川;枳实为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 的干燥幼果,产地四川;芒硝 (Natrii Sulfas),产地四川。以上药物购自四川新荷花中药饮片有限公司,经西南交通大学生命科学与工程学院宋良科副教授鉴定,均为正品。大承气汤煎煮方法按张仲景《伤寒论》中大承气汤的煎煮方法,最后制成含生药 0.5 g·mL⁻¹ 溶液;大黄水煎剂和厚朴水煎剂的煎煮方法按减去其他药后同法制得,最后制成含生药 0.5 g·mL⁻¹ 溶液。

1.3 试剂 大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 20091016),大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 20091027),大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒 (批号 20091023,由武汉博士德公司生产)。

1.4 仪器 ELX800UV 型酶标仪 (BIO-TEK INSTRUMENTS. INS 公司),BET-72 型细菌内毒素分

析仪 (天津大学无线电厂)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 SD 大鼠随机分为 5 组,雌雄各半,适应性喂养 1 周,每组 10 只,依据大鼠性别和体重随机分为假手术组、模型组、大承气汤组、厚朴组、大黄组。假手术组、模型组按 1 g·kg⁻¹ 给予 0.9% NaCl 灭菌溶液;大承气汤组及单味药按组以 1 g·kg⁻¹ 给予大鼠,2 次/d,术前 2 d,术后 3 d。

2.2 动物模型制作 内毒素血症模型建立^[1]:采用成年大鼠,实验前禁食约 16 h,可自由饮水。用 1% 戊巴比妥钠 (40 mg·kg⁻¹) 麻醉动物后,常规消毒腹部皮肤,从腹中线作切口 (长约 2 cm),开腹后小心分离盲肠,寻找盲肠与小肠及大肠交界处,然后用 0 号丝线环形结扎回盲瓣的末端,结扎完毕后应仔细检查保持肠道通路正常,以防止肠腔被结扎而阻塞。用 7 号针头在酒精灯上烧红,在与肠系膜相对的盲端肠壁浆膜面迅速刺 1 个孔,轻压盲肠让小量肠内容物排出于腹腔内,以证实所穿的孔是通畅的。然后将盲肠放回腹腔,分两层缝合伤口,术后即皮下注射 3 mL·kg⁻¹ 的生理盐水以补充术中体液丢失,全部过程约 10 min。假手术组开腹后提出盲肠但不结扎、不穿孔。其余各组造模方法相同。

2.3 检测指标及方法 造模 3 d 后,用 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠后,心脏取血。① 取 2 支一次性玻璃管收集 1 mL 血液,室温凝固 2 h 左右,放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,第 2 天离心 1 500 $\times$ g 15 min,收集血清,分装后 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存,ELISA 法测定血清 TNF- α , IL-1 β 及 IL-10,测定范围 1 ~ 1 000 ng·L⁻¹。② 取 2 支一次性玻璃管收集 1 mL 血液,按博康海洋公司体液处理液处理方法对样品进行处理和稀释,取处理后的样品 200 μ L,加入到含有萤试剂 100 μ L 的小试管中,用内毒素检测仪在 620 nm 测定吸光度值。

2.4 IL-1 β , IL-10 浓度测定 按试剂盒说明操作。采用 ELISA 法,取血清 100 μ L,在抗体包被的 96 孔酶标板进行反应,用酶标仪在 450 nm 测定吸光度值。

2.5 统计学处理 采用完全随机设计,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 软件分析系统处理,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 大承气汤对内毒素血症大鼠血浆内毒素含量和血清 TNF- α 含量的影响 由表 1 可见,建立内毒素血症模型后,与模型组相比,大承气汤组、大黄组及厚朴组的血浆内毒素和血清 TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$);与大承气汤组相比,大黄组和厚朴组的血浆内毒素含量较高,有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.2 大承气汤对内毒素血症大鼠血清 IL-1 β 和 IL-10 含量的影响 由表 2 可见,建立内毒素血症模型后,与模型组相比,大承气汤组、大黄组及厚朴组血清 IL-1 β 和 IL-10 含量显著降低 ($P < 0.01$);而从 IL-1 β /IL-10 值来看,各治疗组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.01$)。

表 1 大承气汤对内毒素血症大鼠血浆内毒素,血清 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	内毒素	TNF- α ng·L ⁻¹
假手术	-	0.474 0 $\pm$ 0.010 6	6.875 6 $\pm$ 2.990 7
模型	-	94.721 3 $\pm$ 36.599 6 ¹⁾	115.720 7 $\pm$ 28.533 6
大承气汤	1	10.333 1 $\pm$ 4.791 7 ²⁾	25.819 9 $\pm$ 8.615 2 ²⁾
大黄	1	24.337 9 $\pm$ 10.443 3 ^{2,3)}	24.518 1 $\pm$ 13.381 8 ²⁾
厚朴	1	26.559 2 $\pm$ 4.566 5 ^{2,3)}	26.054 1 $\pm$ 13.341 8 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与大承气汤组相比³⁾ $P < 0.05$;以上各组均为剔除死亡和与均值偏差 3 倍的样本(表 2 同)。

表 2 大承气汤对内毒素血症大鼠血清 IL-1 β , IL-10 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-10/ng·L ⁻¹	IL-1 β /IL-10
假手术	-	6.249 13 $\pm$ 1.654 7	35.957 4 $\pm$ 10.476 9	0.200 2 $\pm$ 0.096 2
模型	-	221.894 9 $\pm$ 51.623 9	187.527 8 $\pm$ 36.029 4	1.218 6 $\pm$ 0.387 86
大承气汤	1	37.037 2 $\pm$ 17.408 4 ²⁾	100.678 1 $\pm$ 20.862 ²⁾	0.389 12 $\pm$ 0.223 9 ²⁾
大黄	1	37.882 3 $\pm$ 16.585 4 ²⁾	108.507 4 $\pm$ 31.511 9 ²⁾	0.366 7 $\pm$ 0.248 9 ²⁾
厚朴	1	33.777 6 $\pm$ 16.335 1 ²⁾	100.702 5 $\pm$ 19.420 1 ²⁾	0.372 5 $\pm$ 0.185 8 ²⁾

4 讨论

TNF 是内毒素血症时机体产生的内源性细胞因子,内毒素能刺激巨噬细胞产生 TNF, TNF 进一步介导内毒素的效应,血浆内毒素升高的同时, TNF- α 亦升高,二者呈正相关^[2]。目前认为 TNF 是内毒素所致机体多种损伤的重要介导因子之一。IL-1 是急性应激反应和损伤的重要介质,是一种很强的促炎症因子,可激活血管内皮细胞和中性粒细胞,增强黏附分子表达,促进其他细胞因子如 IL-6, IL-8, 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子释放,与 TNF- α 一起引起各种全身炎症反应,伴随着内毒素血症的发生和发展,在整个病理过程中起着重要作用^[3]。本次实验结果显示:造模后各组血浆内毒素含量显著升高,与假手术组比较均有非常显著性差异 ($P < 0.01$),说明造模成功。造模后,血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平除假手术组外均明显上升,且较假手术组均有显著性差异,其中模型组最高,而大承气汤组、大黄组和厚朴组较模型组均明显降低 ($P < 0.01$),说明大承气汤、大黄和厚朴均具有较明显的降低大鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平的作用。

IL-10 是一种免疫抑制因子,它主要来源于 CD4⁺ 调节性 T 淋巴细胞尤其是 Th2 细胞。IL-10 可作用于多种细胞,其作用是抑制细胞因子的产生,引起细胞免疫抑制。已有研究表明,IL-10 为内毒素和炎症细胞因子的一种重要功能性拮抗剂,且在炎症较早期即已诱导出来^[4]。Lehmann 等^[5]发现血清中 IL-10 的水平与促炎细胞因子的浓度呈正相关。本实验结果显示:血清中 IL-10 水平除假手术组外均明显上升,且较假手术组均有显著性差异。造模后,血清中 IL-10 水平升高,其中模型组最高,大承气汤组、大黄组和厚朴组较模型组均明显降低 ($P < 0.01$)。同时我们将 IL-1 β 和 IL-10 的比值作对比,发现各治疗组的比值都较接近于假手术组,模型组明显高于各组,这也验证了促炎介质与抗炎介质的不平衡是加重炎症介质,促进内毒素血症发生发展的重要因素。本实验说明大承气汤、大黄和厚朴均具有调节大鼠血清中 IL-10 的水平,抑制过高水平的 IL-10 对细胞的损害,使 IL-1 β 和 IL-10 的比值保持在平衡值之间,从而达到抗内毒素血症的作用。

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110504. 1200. 004

全蝎、蜈蚣对胶原诱导型关节炎大鼠肠黏膜免疫状态的调节作用

刘端勇^{1*}, 赵海梅¹, 程绍民², 左志琴¹, 吕爱平³

(1. 江西中医学院 科技学院, 南昌 330025; 2. 江西中医学院 中诊教研室, 南昌 330004;

3. 中国中医科学院中医临床基础研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察全蝎、蜈蚣对胶原蛋白诱导型关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠肠黏膜免疫状态的调节作用。方法: Wistar 大白鼠 60 只, 随机分成 6 组, 即正常组, 模型组, 全蝎蜈蚣高、中、低剂量组, II 型胶原蛋白(type II collagen, CII)组。采用 II 型胶原蛋白诱导法复制大鼠关节炎模型, 并 ig 给予全蝎蜈蚣混悬液($0.4, 0.2, 0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)进行干预, CII 组予 CII 蛋白冻干粉 $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig 进行对照, 共计 40 d。采用流式细胞术分别检测大鼠肠道派伊尔(peyer's patches, PP)结淋巴细胞亚群水平, 采用酶联免疫吸附试验法检测小肠组织匀浆转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、分泌型免疫球蛋白(secreted immunoglobulin, sIgA)的表达水平。结果: 与模型组比较, 各治疗组均可明显下调 CD4^+ , CD8^+ T 细胞水平, 升高 $\text{CD4}/\text{CD8}$ 水平, 并具有显著性意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。同时, 除中剂量组外, 其他各治疗组小肠组织匀浆 sIgA 水平均明显上升($P < 0.01$), 至于 TGF- β_1 , 则仅中剂量组和 CII 组小肠组织匀浆中 TGF- β 表达明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 全蝎、蜈蚣调节胶原免疫性关节炎黏膜免疫的作用可能通过调节小肠黏膜局部 PP 结 T 淋巴细胞亚群平衡, 降低肠黏膜 TGF- β_1 和升高 sIgA 表达水平来实现的。

[关键词] 类风湿性关节炎; 全蝎; 蜈蚣; 黏膜免疫

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)13-0133-04

[收稿日期] 20101129(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30860377); 江西省自然科学基金项目(2009GZY0118); 江西省卫生厅科技计划(20092050, 20092052)

[通讯作者] * 刘端勇, 副教授, 硕士, 从事自身免疫性疾病及中药免疫药理研究, Tel: 13970933193, Fax: 0791-6588549, E-mail: liudyanyong@163.com

[网络出版时间] 2011-5-4 12:00

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110504.1200.004.html>

由此可以推论, 大承气汤治疗内毒素血症的主要作用机制为: ①通过泻下排除肠道内的细菌及其产生的内毒素的作用; ②下调巨噬细胞活性, 减少 TNF- α , IL-1 等炎症细胞因子的产生和释放, 从而减轻全身炎症反应; ③调节促炎介质与抗炎介质间的平衡, 抑制巨噬细胞的激活, 阻滞局部的炎症因子前体释放, 降低内毒素血症的严重程度。

[参考文献]

- [1] 马超英, 宋雅琴, 耿耘. 加减陷胸桃承汤合参麦注射液对盲肠结扎穿孔术后 ARDS 大鼠的作用观察[J]. 四川中医, 2005, 23(10): 24.
- [2] 郑晓宾, 韩德五, 马学惠, 等. TNF 在肠源性内毒素血症

中的作用及丹参防治机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15(1): 51.

- [3] 秦春宏, 张学林, 贺红杰, 等. CO_2 气腹对大鼠重症急性胰腺炎胰腺病理变化及白介素 1, 2, 6, 10 表达的影响[J]. 腹腔镜外科杂志, 2009, 12(10): 989.
- [4] 马超英, 耿耘, 陈玉英, 等. 牛珀至宝丹和鸡卵黄免疫球蛋白对内毒素休克大鼠 IL-1, IL-10 的影响[J]. 四川中医, 2003, 21(12): 22.
- [5] Lehmann A K, Halstensen A, Sornes S, et al. High levels of interleukin-10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease [J]. Infect Immun, 1995, 63(6): 2109.

[责任编辑 聂淑琴]