

· 实验研究 ·

中药热毒清对内毒素性 DIC 家兔血浆白细胞介素 8 和一氧化氮水平影响的研究

杨 光 李鸣真 张艳萍 林宝英 徐丽君 王开富 杨明炜 吴朝栋

内容提要 本实验采用内毒素所致家兔弥散性血管内凝血(DIC)模型,测定外周血白细胞介素 8(IL-8)、亚硝酸根/硝酸根离子($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)水平,补体 C_{5a} 活性及中性粒细胞(PMN)趋化指数,并观察中药热毒清注射液对上述指标的影响。结果表明:模型组血浆 IL-8、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 水平及 C_{5a} 活性、PMN 趋化指数显著升高,其升高水平和组织、器官的损害程度相一致。热毒清组及地塞米松组上述指标均显著降低($P < 0.01$),病理组织学改变亦轻。提示:IL-8、一氧化氮(NO)参与 DIC 发病机制,而热毒清抑制炎症反应,防治 DIC 的作用机理部分是通过调控细胞因子网络而实现的。

关键词 白细胞介素 8 一氧化氮 热毒清 弥散性血管内凝血 补体 趋化性

Effects of Injectio Reduqing on Plasma IL-8 and Nitric oxide Levels in Rabbits with Endotoxin induced Disseminated Intravascular Coagulation YANG Guang, LI Ming-zhen, ZHANG Yan-ping, et al *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Tongji Medical University, Wuhan(430030)*

Experiments were performed for investigating the effects of Injectio Reduqing(RDQ) on plasma interleukin-8 (IL-8), $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, complement 5a(C_{5a}) and polymorphonuclear neutrophilic leukocyte (PMN) Chemotaxis Index (CI) in rabbits with endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation(DIC). The results showed that plasma IL-8, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, C_{5a} and CI levels of PMN increased markedly in model group, which were confirmed pathologically with obvious damage of tissues or organs. While in RDQ group the above-mentioned parameters and damage of tissues or organs were reduced significantly($P < 0.01$). The results suggested that the IL-8 and NO might be involved in pathogenesis of endotoxin-induced DIC, and RDQ could be used in preventing or treating DIC through mechanism of regulation of cytokines network.

Key words interleukin-8, nitric oxide, Injectio Reduqing, disseminated intravascular coagulation, complement, chemotaxis

白细胞介素 8(IL-8)和一氧化氮(NO)是体内重要的细胞因子,不仅参与机体的免疫调节及防御反应,还具有强烈的致炎活性,介导内毒素(LPS)的毒性作用。本实验采用间隔 24 h 两次注射 LPS 诱发家兔全身性施瓦茨曼(Shwartzman)反应,制作 DIC 模型^①。测定血浆 IL-8、亚硝酸根/硝酸根离子($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$)含量,观察补体 C_{5a} 活性及中性粒细胞(PMN)趋化指数的变化,旨在探讨 IL-8、NO 在内

毒素性弥散性血管内凝血(DIC)中的作用及热毒清对其病理作用的拮抗效应。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 健康大耳白兔 32 只,雌雄各半,体重 1.8~2.3 kg,月龄 2.7~3.3 月,由同济医科大学医学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 热毒清注射液(由等量金银花、大青叶、蒲公英、鱼腥草组成,每毫升含生药

lg、10ml/支由本研究所制剂室生产,批号950429。地塞米松磷酸钠注射液(5mg/ml)1ml/支,湖北宜昌制药厂生产,批号930703。主要试剂:冻干精制E. Coli O₁₁₁ B₄内毒素,1mg/支,上海生物制品研究所生产,批号931201。IL-8标准检测盒(荷兰Amsterdam红十字输血机构产品,批号1918-00-05)由美国Monsanto公司T.C. Wun Ph. D惠赠。3, 5, 3', 5'-四甲基联苯胺(TMB)、酵母多糖(Zymosan A)均为美国Sigma公司产品。Per-coll白细胞分层液(华美生物工程公司进口分装)。

1.3 仪器 国产GL-20B型高速冷冻离心机,国产DG-3022A型酶联检测仪,96孔PVC板(美国Corning公司产品),上海第三分析仪器厂生产的721型单光束分光光度计,自制薄层析柱。

2 方法

2.1 动物模型建立和分组 将32只动物随机分为4组,每组8只。(1)模型组:从家兔耳缘静脉间隔24h两次注射LPS,用量分别为15μg/kg、35μg/kg体重。第1次注射LPS后立即注射生理盐水(NS)5ml/kg体重,以后每12h注射1次,共3次。(2)热毒清组:LPS给予方法及用量同模型组,以热毒清注射液代替NS,用法及用量同上组。(3)地塞米松组:LPS和NS给予方法及用量同模型组,在注射NS同时,每次经静脉给予地塞米松1ml/kg体重。(4)正常对照组:仅如模型组注射等量NS。

2.2 标本制备 根据预备实验DIC模型家兔IL-8高峰出现在每次注射LPS后2h,而第2次注射LPS后8h尚维持较高水平,明显高于基础值[(42.94±13.85)pg/ml],故各组动物于实验前24h及第2次注射内毒素后2h、8h,经兔耳中央动脉取血,作如下处理:(1)4℃低温分离血浆,分装冻存于-30℃待检。(2)沉降红细胞后,取上清液进行密度梯度离心,经Hanks液洗涤的细胞用RPMI-1640配成PMN悬液,分为2份,分别用于补体C_{5a}活性及PMN趋化性测定,浓度分别为5×10⁷/ml、

2.5×10⁷/ml,台盼蓝染色^[2],测定细胞成活率(95.6±0.5)%,PMN纯度(95.2±0.9)%。(3)补体激活血浆及趋化因子制备:分离的血浆中加入经调理的酵母多糖(Opsonized Zymosan, OPZ),温育后离心取上清,4℃下保存作PMN激活物用;另取4只健康兔耳静脉血2ml混合凝固后离心取上清,冻存于-30℃24h作趋化因子用。(4)最后一次取血后,快速颈动脉放血处死动物,取肝、肺、肾组织肉眼观察大体病变后,以10%福尔马林液固定,制作切片,HE及Mallory纤维素染色,作光镜检查。

2.3 检测方法 (1)IL-8采用夹心ELISA法,具体操作步骤按试剂盒说明书。包被抗IL-8单抗的PVC板,室温孵育后,各孔分别加入不同浓度的标准品及血浆样品,室温孵育、洗涤后加抗IL-8生物素结合物,孵育、洗涤后加链霉亲和素-HRP(辣根过氧化物酶)结合物,孵育、洗涤后加TMB/H₂O₂底物缓冲液反应显色,用1.8mmol/L H₂SO₄终止反应后,于酶联仪450nm处读数,根据标准曲线计算样品中IL-8含量。(2)PMN趋化性测定:琼脂糖玻片法^[3]。(3)NO₂⁻/NO₃⁻测定:镉还原柱层析和比色法^[4]。(4)补体C_{5a}活性测定:用C_{5a}介导的中性粒细胞凝集法^[5]。

2.4 统计学方法 所有数据按方差分析行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm S$ 表示。

结 果

1 血浆IL-8、NO₂⁻/NO₃⁻、PMN趋化指数、血浆C_{5a}活性变化,见表1。除正常组外,其他3组动物血浆IL-8、NO₂⁻/NO₃⁻水平、PMN趋化指数和血浆C_{5a}活性与实验前比较均有不同程度的升高,以模型组最为显著,与两治疗组相比有显著性差异($P < 0.01$)。相关分析表明,模型组IL-8与NO₂⁻/NO₃⁻水平呈正相关(相关系数 $r = 0.848$, $P < 0.01$)。

2 兔血WBC及PMN计数的动态变化,见表2。表2示,两次注射LPS后2h,血WBC总数和

表1 各组动物血浆IL-8、NO₂⁻/NO₃⁻、PMN趋化指数、血浆C_{5a}活性变化 ($\bar{x} \pm S$)

组别	IL-8(pg/ml)			NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ (μmol/L)			PMN 趋化指数	C _{5a} (u/ml)
	实验前24h	实验后2h	8h	实验前24h	实验后2h	8h		
正 常	42.93±13.05	—	—	28.68±7.03	—	—	1.63±0.08	4.10±0.62
热毒清	43.20±8.88	316.87±27.51 △*	197.31±27.75 △*	31.07±9.21	160.78±16.45 △*	143.24±31.21 △*	2.15±0.04 △*	19.63±1.69 △*
地塞米松	42.67±16.17	327.75±25.68 △*	224.90±61.60 △*	33.46±12.87	216.37±21.02 △*	172.64±29.43 △*	2.09±0.07 △*	20.30±1.19 △*
模 型	42.94±13.85	654.37±68.38 △	446.63±35.27 △	32.27±11.64	626.38±82.77 △	455.83±119.48 △	2.54±0.05 △	30.87±1.09 △

注:与本组实验前24h或正常组比较,△ $P < 0.01$;与模型组同时间比较,* $P < 0.01$;各组兔数均为8只

PMN 数目均下降, 此后持续回升; 而热毒清组下降幅度小。模型组外周血 WBC 和 PMN 计数变化与血浆 IL-8 水平呈显著负相关($r = -0.809$, $P < 0.01$; $r = -0.795$, $P < 0.01$); 与血浆 C_{5a} 活性变化亦呈显著负相关($r = -0.797$, $P < 0.01$; $r = -0.764$, $P < 0.01$)。

表 2 注射内毒素后兔血 WBC 及 PMN 数目的变化 ($\times 10^9/L$, $\bar{x} \pm S$)

组别		WBC	PMN
模型组	注射前	8.74 $\pm$ 1.54	5.19 $\pm$ 0.94
	第 1 次 2 h	3.03 $\pm$ 1.62 $\Delta\Delta$	2.58 $\pm$ 1.09 $\Delta\Delta$
	4 h	10.63 $\pm$ 1.33 $\Delta\Delta$	8.23 $\pm$ 1.09 $\Delta\Delta$
	第 2 次 2 h	5.30 $\pm$ 1.03 $\Delta\Delta$	4.23 $\pm$ 0.65 $\Delta\Delta$
	4 h	8.33 $\pm$ 1.43	6.69 $\pm$ 0.74 Δ
	6 h	9.50 $\pm$ 0.82 Δ	7.65 $\pm$ 0.79 $\Delta\Delta$
	8 h	12.68 $\pm$ 1.37 $\Delta\Delta$	9.45 $\pm$ 3.39 $\Delta\Delta$
	注射前	8.55 $\pm$ 2.37	4.88 $\pm$ 1.03
热毒清组	第 1 次 2 h	5.49 $\pm$ 2.84 $\Delta\Delta^{**}$	3.46 $\pm$ 1.96 Δ^{**}
	4 h	8.32 $\pm$ 1.81 **	5.27 $\pm$ 0.97 Δ^{**}
	第 2 次 2 h	6.51 $\pm$ 1.55 Δ^{*}	3.99 $\pm$ 2.19 Δ^{*}
	4 h	6.95 $\pm$ 1.87 Δ^{**}	4.51 $\pm$ 1.65 **
	6 h	7.56 $\pm$ 2.35 Δ^{**}	5.25 $\pm$ 1.41 **
	8 h	9.09 $\pm$ 2.42 **	6.58 $\pm$ 2.56 Δ^{**}
	注射前	8.55 $\pm$ 2.37	4.88 $\pm$ 1.03
	第 1 次 2 h	5.49 $\pm$ 2.84 $\Delta\Delta^{**}$	3.46 $\pm$ 1.96 Δ^{**}

注: 与模型组同一时间比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与本组注射前比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 各组兔数均为 8 只

3 病理学观察 大体观察: 模型组肺体积膨大, 表面有暗红色点片状出血, 切面有较多淡红色液体溢出; 肝脏淤血, 表面有点片状坏死灶; 肾包膜下有出血点。光镜观察: 模型组肺间质及肺泡水肿, 充血、出血明显, 肺血管内 PMN 聚集, 靠边多见, 肺内炎性细胞渗出以 PMN 为主; 肝组织切片见小叶结构紊乱, 有较多点片状坏死灶, 肝窦及中央静脉淤血, 大量炎性细胞浸润及 Kupffer 细胞增生。肝、肺、肾组织的微、小血管中有广泛的微血栓形成。两治疗组上述变化明显减轻, 而正常组未见上述变化。

讨 论

热毒清是由中医清热解毒之传统方剂五味消毒饮加减而成。方内含金银花、蒲公英、大青叶、鱼腥草, 经加工制成静脉注射液。我们曾经发现它具有抑菌、抗炎、解热、增强机体免疫功能、直接降解内毒素^[1]等作用。综合以往研究结果提示, 中医的清热解毒, 既解入侵细菌病原微生物之“外毒”, 又能解内毒素及其诱生的炎症介质和细胞因子之“内毒”; 既能“祛邪”, 又能“扶正”。

IL-8 是由单核细胞、组织巨噬细胞、

PMN、血管内皮细胞在 LPS 等刺激下产生的多源性细胞因子。是目前已知最强的 PMN 趋化和激活因子^[6]。IL-8 能诱导细胞变形反应, 脱颗粒反应, 呼吸爆发及释放蛋白酶、溶酶体酶类和氧自由基, 促进内皮或非内皮源性左旋精氨酸/一氧化氮(L-Arg/NO)途径刺激 NO 产生。有资料表明, IL-8 介导白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)等在体内的炎症效应, 能引起与内毒素血症、感染性休克类似的病理生理反应。其参与 DIC 发生的可能机制: 趋化和过度激活粒细胞, 释放大量毒性产物及炎症介质, 激活凝血、纤溶、激肽系统, 最终导致内皮损伤及微血管血栓形成^[7]。

近年来, NO 在败血症、感染性休克发病机制中的作用十分引人注目。单核/巨噬细胞的诱导型 NO 合成酶(iNOS)在 LPS 和 TNF、IL-1 等细胞因子刺激下, 持续大量产生 NO, 可导致血管持续舒张, 血压降低, 组织灌注异常, 乃至休克, 并可损伤血管内皮细胞, 导致 DIC 发生^[8]。

本实验发现, 内毒素性 DIC 家兔模型中循环血 IL-8、NO₂⁻/NO₃⁻水平均较正常对照组显著升高, 且升高水平与脏器组织的损害程度一致, IL-8 与 NO₂⁻/NO₃⁻水平呈显著正相关, 表明二者协同参与 DIC 的发病机制。

本实验早期外周血白细胞计数短暂下降, 而 C_{5a} 活性及 PMN 趋化指数明显增高, 白细胞计数变化与 IL-8 水平呈显著负相关, 与血浆 C_{5a} 活性变化亦呈明显负相关关系, 而组织学检查见脏器内有大量 WBC 浸润, 提示在 IL-8、 C_{5a} 趋化作用下, WBC 从中央池向边缘池转移, 在重要脏器中“扣押”。WBC 在组织内大量聚集与过度激活, 导致和加重组织细胞的损害。热毒清在降低 IL-8、NO₂⁻/NO₃⁻水平及 C_{5a} 活性的同时, 减轻 WBC 浸润及脏器组织病理改变, 可认为热毒清能调控其水平并部分拮抗其病理效应。我们以往研究热毒清所具清除氧自由基, 维护钙稳态, 保护线粒体、稳定溶酶体膜^[9], 防治 TNF- α 、IL-6 介导的损害作用亦与此有关^[10]。地塞米松抑制细胞因子诱导 iNOS, 且直接抑制 iNOS 的表达; 在转录水平抑制 IL-8 的产生, 并可取消 IL-8 诱导的白细胞游走^[11]。本实验发现热毒清与地塞米松具有同样效果, 提示热毒清与地塞米松对细胞因子的作用类似, 有可能也是通过抑制其合成、中和其作用或阻断其效应, 使其恢复至接近正常细胞因子的网络水平, 终止其介导的炎症反应, 达到防治内毒素性 DIC 之目的。

参 考 文 献

1. 李鸣真, 叶望云, 林菊云, 等. “热毒清”抗内毒素的实验研究. 同济医科大学学报 1989; 18(2): 87—90.
2. 陶义训, 章谷生, 孙 荫. 临床免疫学检验(上册). 第 1 版. 上海: 科学技术出版社, 1983: 18.
3. 张克坚. 琼脂糖法白细胞趋化实验. 中国医科大学学报 1984; 13(4): 70—72.
4. Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. Clin Chim Acta 1982; 125(2): 107—115.
5. 王士雯, 范 利, 贾万钧, 等. 过敏毒素 C_{5a}与老年多器官衰竭(MOF). 免疫学杂志 1989; 5(3): 209.
6. Hack CE, Hart M, Van schijndel RJMS, et al. Interleukin-8 in Sepsis: relation shock and inflatory mediators. Infection Immunity 1992; 60(7): 2835—2842.

7. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Am surg 1992; 216(2): 117—134.
8. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43(2): 109—142.
9. 李鸣真, 叶望云, 涂胜豪, 等. 热毒清防治内毒素性 DIC (续)——保护肝微粒体、钙稳态和抗自由基的实验研究. 危重病急救医学 1993; 5(5): 262—265.
10. 吴朝栋, 李鸣真, 张艳萍, 等. 中药热毒清对内毒素 DIC 家兔血浆肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 水平影响的研究. 中国中西医结合杂志 1995; 15(6): 356—358.
11. Mukaida N, Gussella GL, Kasahara T, et al. Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human cell line. Immunology 1992; 75: 674—679.

(收稿: 1995—11—27 修回: 1996—03—15)

中西医结合无痛一次性根治尖锐湿疣 37 例

孟战战 邹永清

我们从 1993 年 12 月~1995 年 11 月用中西医结合方法治疗尖锐湿疣 37 例, 疗效较好, 现报告如下。

临床资料 本组 37 例均经病理诊断证实为尖锐湿疣, 为本院男性专科门诊患者, 年龄 18~47 岁, 平均 31 岁。病程 2 个月~4 年, 平均 4 个月。已婚者占 73%。外地流动人员占 27%, 司机及个体经营者占 19%, 餐馆员工占 8%, 军人及干部各 1 例。37 例中否认性接触史者 7 例。病理分布特点: 37 例的疣体均主要生长于龟头, 其中 34 例的疣体同时浸及冠状沟及包皮系带, 34 例中又有 5 例还同时浸及包皮的皮肤; 37 例中另 3 例除浸及龟头外, 还同时浸及尿道外口。

治疗方法 外敷麻药散的制备和使用: 先将中药草拔 4g 乳香 6g 没药 6g 生南星 10g 川乌 10g 草乌 10g 肉桂 12g 半夏 10g 胡椒 6g 风茄果 15g 白丁香 6g 蟾酥 5g 共研细粉, 以 75% 酒精 70 ml 调成糊状即成外敷麻药散, 盛入研口瓶备用。每例患者取外敷麻药散 20 g 敷于患处及四周, 不必包裹, 待 20 min 后, 取掉外敷麻药散, 即可达到完全无痛。然后用上海产一次性皮试注射器向湿疣基底注射 5-氟脲嘧啶针剂 0.01~0.02 ml

(0.25~0.5 mg), 使之成为一个皮丘, 皮丘以稍超出疣基底 2 mm 范围为度。每个疣体基底各注射一个相同的皮丘, 立即剪掉疣体送病理检查。最后撒上一层自配的甘石丹粉约 2 g, 甘石丹粉由东丹 10 g 炉甘石 15 g 石膏 12 g 乌贼骨 15 g 冰片 5 g 共研细粉而成。撒药粉后以无菌纱布包裹 24 h。

结 果 37 例麻药过后均无疼痛, 37 例中有 31 例于治疗后 24~72 h 内疣体从基底干痂脱落, 6 例于治疗后 72 h 后干痂脱落。干痂脱落后不留疤痕, 亦无色素沉着, 治愈率 100%。37 例中有 29 例随访 0.5 年以上, 8 例随访 1 年以上, 均无复发迹象。

体 会 人类乳头瘤有 50 多种类型, 导致尖锐湿疣的是 6、11、18 型, 5-氟脲嘧啶是嘧啶类氟化物, 治疗尖锐湿疣的机理在于阻断了尖锐湿疣病毒的核苷酸合成酶, 从而阻断病毒 DNA 和 RNA 的合成而消灭病毒, 使之根治成为可能。外敷麻药散中风茄果、蟾酥、川乌、草乌、生南星外用均可麻醉末梢神经, 配以乳香、没药活血止痛, 肉桂、草拔温通血脉并加强麻醉效果, 便于在无痛下穿刺注药和剪切标本送检。甘石丹粉中的石膏、东丹消炎防腐, 冰片引诸药渗透并起收敛作用, 全方共奏生新促愈作用, 使创面速愈。

第四军医大学唐都医院泌尿外科男性专科(西安 710038)

(收稿: 1995—12—25 修回: 1996—03—06)