

益气化痰解毒方治疗内毒素致 ARDS 大鼠的炎症作用研究

黄瑞音 李雁 李昕 王谦 骆长永 程森 万茂婷 刘丽杰 吴元德 王欣

【摘要】 目的 探讨益气化痰解毒方(以下简称“复方”)对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱发大鼠急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的保护作用及对炎症因子的影响。**方法** 50 只雄性健康 SD 大鼠随机等分为 5 组,每组 10 只。5 组大鼠按动物饲养标准进行适应性喂养 1 周。中药低、中、高剂量组,分别给予复方低、中、高剂量灌胃,每天 1 次,模型组及空白对照组每天予蒸馏水灌胃,每天灌胃量为 1 mL/100 g,除空白对照组外其余 4 组 7 天后尾静脉注射 LPS (2 mg/kg)造模,空白对照组及造模 4 组 16 小时麻醉下处死。取肺组织及腹主动脉血,进行大鼠肺大体病理、病理组织光镜观察,并检测血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6 及肺组织中 p65 蛋白含量。**结果** 与空白对照组比较,模型组 TNF- α 升高($P < 0.05$)。与模型组比较,低剂量组大鼠血清中 TNF- α 无明显降低($P > 0.05$),中药中、高剂量 TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$),但高、中剂量组之间无明显差距($P > 0.05$)。与空白对照组比较,模型组 IL-1 β 升高($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量组 IL-1 β 降低($P < 0.05$),中与高剂量组 IL-1 β 水平明显降低($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型组 IL-6 升高($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量组 IL-6 明显降低($P < 0.05$),中剂量组 IL-6 水平显著降低($P < 0.05$),高剂量组 IL-6 水平明显降低($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型组 p65 升高($P < 0.05$);与模型组比较,低剂量组 p65 明显降低($P < 0.05$),中剂量组 p65 水平显著降低($P < 0.05$),中药高剂量组 p65 水平降低($P < 0.05$)。**结论** 益气化痰解毒复方能减轻内毒素致 ARDS 大鼠肺组织损伤,具有一定的预防保护作用,可能与降低大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平,抑制 NF- κ B 通路激活,减轻炎症反应有关。在一定范围内,提高复方的给药剂量,可以增强作用效果。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 炎症; 益气化痰解毒

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.02.003

Study on the therapeutic effect of Yiqi Huayu Jiedu recipe on endotoxin induced ARDS rats

HUANG Ruiyin, LI Yan, LI Xin, et al. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: LI Yan, E-mail: 13011097949@126.com

【Abstract】 Objective To study protective effect of Yiqi Huayu Jiedu recipe on acute respiratory distress syndrome (ARDS) rats induced by lipopolysaccharide and to observe the influence of inflammatory factor. **Methods** 50 healthy male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n = 10$). All rats were fed for one week to adapt the environment. The rats were intragastric administration with

基金项目: 北京中医药大学 2015 年度自主课题(2015-JYB-JSMS059); 北京中医药大学东直门医院横向课题(广东骏丰频谱有限公司项目)(HX-DZM-2015002)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院急诊科(黄瑞音、李雁、刘丽杰), 教育处(李昕), 呼吸科(程森); 北京朝阳区中医医院内二科(黄瑞音); 北京中医药大学第一临床医学院[骆长永(硕士研究生)、万茂婷(硕士研究生)], 基础医学院(王谦); 北京协和医学院(吴元德); 广东骏丰频谱有限责任公司(王欣)

作者简介: 黄瑞音(1989-), 女, 硕士, 住院医师。研究方向: 中西医结合急诊方向。E-mail: eagle2003@foxmail.com

通信作者: 李雁(1967-), 女, 硕士, 主任医师, 教授。研究方向: 中西医结合急诊。E-mail: 13011097949@126.com

corresponding drug. The ARDS model was injected with LPS (2mg/kg) after 7 days. The rats were sacrificed after 16 hours of modeling. Lung tissue was collected to observed the pathology organization, and the TNF- α , IL-1 β , IL-6, p65 protein in serum were detected. **Results** TNF- α : compared with the blank control group, serum TNF- α of rats in the model group was increased ($P<0.05$). Compared with the model group, TNF- α of low dose of Chinese medicine group was decreased non-significantly, TNF- α of medium and high dose of Chinese medicine group was decreased significantly ($P<0.01$), but there was no significant between two groups; Compared with the blank control group, IL-1, IL-6 and p65 protein of model group rats was increased ($P<0.05$). Compared with the model group, IL-1, IL-6 and p65 protein of Chinese medicine groups were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Yiqi Huayu Jiedu recipe can reduce the lung tissue injuries of ARDS rats induced by LPS, and can reduce the level of TNF- α , IL-1 β , IL-6, can inhibit the NF- κ B pathway activation and reduce inflammation reactions. In a certain range, improve the dosage of compound, and enhance the effect.

【Key words】 Respiratory distress syndrome; Inflammation; Yiqi Huayu Jiedu recipe

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床常见的急危重症之一, 发病机制复杂, 治疗效果不佳, 是世界性的公共卫生难题, 其死亡率高达 32% ~ 55%^[1]。临床上主要采用呼吸支持疗法, 复张塌陷的肺泡, 缓解呼吸窘迫, 改善全身缺氧情况。在药物治疗方面, 一般采用糖皮质激素、一氧化氮吸入、肺表面活性物质及对症治疗, 但均无可靠的循证医学证据。而中医药几千年来发展中, 留下浩繁的文献, 其中记载的暴喘、喘证、肺衰等与本病密切相关。越来越多的中医学者开始将传统的中医理论与现代研究方法相结合, 对本病进行研究, 并取得一定进展。本研究采用北京中医药大学东直门医院杜怀棠教授经验方益气化痰解毒方 (以下简称“复方”), 干预内毒素致 ARDS 大鼠动物模型, 探讨复方对 ARDS 大鼠的的预防效果及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 50 只, 8 周龄, 体质量 (200 \pm 10) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号为 SCXK (京) 2012-0001。饲养于北京中医药大学东直门医院实验动物中心屏障实验室, 温度 22 ~ 24 $^{\circ}$ C, 湿度 50% ~ 70%, 普通颗粒饮食, 分笼饲养, 自由饮水, 适应性喂养 1 周后开始实验。全部动物实验得到北京中医药大学东直门医院实验动物福利与伦理委员会批准, 批准号: 14-47。

1.2 仪器及试剂

HC · TP11B · 10 架盘药物天平 (北京医用天平厂); SC-3612 低速离心机 (安徽中科中佳科学仪器

有限公司); BH2 生物显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); 分光光度计尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; 紫外分析仪北京尚柏生物公司。

1.3 药品与试剂

内毒素 (li popolysaccharide, LPS) (Escherichia coli, 美国 Sigma 公司产品, 批号 L2880, 100 mg); 复方药物组成: 黄芪 30 g、三七 10 g、赤芍 15 g、炒枳实 12 g、金银花 15 g, 均购于北京中医药大学东直门医院中药房, 中药颗粒为首创药业集团提供; 白细胞介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β) ELISA 试剂盒 (批号: A102453)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号: A106893)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)、ELISA 试剂盒 (批号: A106897) 均购于艾博抗 (上海) 贸易有限公司; 肺组织病理 HE 染色切片由北京中医药大学东直门医院病理室制作。

1.4 动物分组及造模

按随机数字表法将 50 只动物分为 5 组 ($n=10$), 即空白对照组、模型组, 中药低、中、高剂量组, 分别称重并记录。适应性喂养 1 周后开始灌胃给药, 低剂量组即 6.1 g/(kg · d) (给药剂量为生药剂量); 中剂量组即 12.2 g/(kg · d) (给药剂量为生药剂量); 高剂量组即 24.4 g/(kg · d) (给药剂量为生药剂量)。空白组和模型组均灌服等量蒸馏水, 每天灌胃量为 1 mL/100 g。每天 1 次, 连续 7 天。以上药物均由蒸馏水配制, 存放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中。第 7 天灌胃后 6 小时, 大鼠不禁食不禁水, 中药低、中、高剂量组、模型组一次性尾静脉注射内毒素 LPS 溶液 (2 mg/kg), 空白对照组不予 LPS, 16 小时后 5 组全部麻醉后处死。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肺大体病理观察 充分暴露胸腔,摘取完整左肺,以 10% 多聚甲醛固定,肉眼观察肺脏的病理变化,包括瘀血程度、肿大程度、被膜色泽等。

1.5.2 肺组织镜下病理学观察 充分暴露胸腔,摘取全肺,分离右下肺,以 10% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片和 HE 染色,制作 HE 染色病理切片。分离右中肺,以液氮固定保存。肺组织病理 HE 染色切片由北京中医药大学东直门医院病理室制作。在光学显微镜下观察大鼠肺泡间隔变化、炎症细胞浸润程度、肺毛细血管充血水肿状况等组织形态学变化。

1.5.3 酶联免疫法 (ELISA) 检测血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平 10% 水合氯醛溶液 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉大鼠,打开腹腔,暴露腹主动脉,取腹主动脉血 4 mL,立即沿管壁注入肝素化的试管中,经 3000 rpm 低温离心 20 分钟后,取血清置于 -80℃ 冰箱中保存。往预先包被 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 抗体的包被微孔中,分别依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (optical density, OD),分别计算样品浓度。

1.5.4 免疫印迹实验法 (western blot) 检测肺组织中 p65 水平 按试剂盒说明书操作,采用 Quantity One 软件进行图像灰度分析,计算 p65 的相对表达量。

1.6 统计学处理

使用 SPSS 20.0 统计软件包进行数据处理。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,用方差分析进行多组均数比较,组间两两比较采用 LSD 法检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白对照组大鼠精神状态良好,活动敏捷,

反应迅速,毛发光亮柔顺。模型组大鼠精神状态差,活动较少,反应较迟钝,喜卧,毛色晦暗、枯黄、光泽度较差,口唇爪甲紫绀,排泄稀溏便。治疗组大鼠均有类似模型组的表现,但程度相对较轻。

2.2 肺组织大体观察结果

空白对照组大鼠肺组织未见明显异常改变,体积未增大,无水肿,色泽红润,无瘀血;模型组大鼠肺组织体积增大、水肿,色泽暗红、表面可见散在分布的大小不等的暗红色斑点状病灶;低剂量组大鼠肺组织体积增大、水肿,色泽暗红,表面有少量散在分布的点状暗斑;中剂量组大鼠肺组织肿胀不明显,体积增大不明显,色略暗红,出血点不明显;高剂量组大鼠肺组织体积未见明显增大,肿胀不明显,色略暗,表面无明显出血点。见图 1。

2.3 肺组织病理观察结果

空白对照组肺组织病理可见肺泡结构清晰、完整;模型组可见肺泡欠清晰、结构遭到破坏,肺间质水肿、肺泡壁增厚,肺泡腔缩小,且肺泡腔内可见大量炎性渗出物及红细胞,支气管腔内也可见大量分泌物,毛细血管壁充血水肿;低剂量组、中剂量组、高剂量组均较模型组改善,且改善情况逐渐明显。见图 2。

2.4 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较

与空白对照组比较,模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,中药低剂量组 TNF- α 无明显降低 ($P>0.05$),IL-1 β 、IL-6 降低 ($P<0.05$);而中剂量与高剂量组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 均显著降低 ($P<0.05$),但高剂量与中剂量组之间均无明显差异 ($P>0.05$)。见表 1。

2.5 各组大鼠肺组织中 p65 水平比较

与空白对照组相比,模型组 p65 升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,中药低、中、高剂量组 p65 明显降低 ($P<0.05$),但中药低、中、高剂量三组之间无明显差异 ($P>0.05$)。见表 2、图 3。



图 1 各组肺组织大体观察图

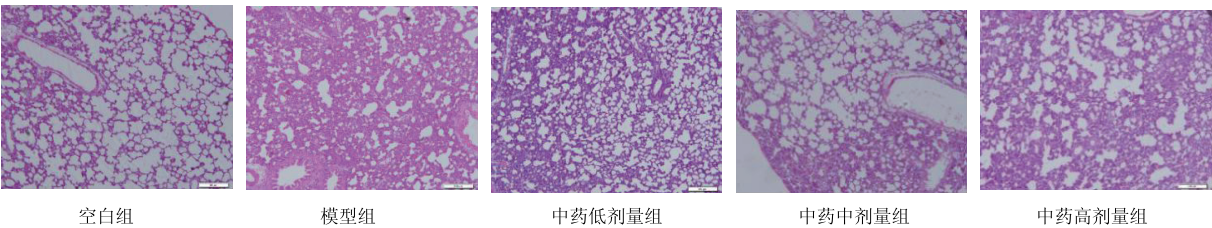


图 2 各组肺组织病理观察图(×20 倍)

表 1 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α	IL-1β	IL-6
空白对照组	10	20.54±1.62	285.71±42.13	24.28±4.08
模型组	10	23.76±1.58 ^a	417.48±68.88 ^a	31.58±8.26 ^a
低剂量组	10	21.38±1.47	355.39±112.24 ^b	24.59±3.76 ^b
中剂量组	10	17.31±4.11 ^b	321.39±87.68 ^b	24.56±6.13 ^b
高剂量组	10	16.36±3.95 ^b	305.47±54.02 ^b	24.67±5.11 ^b

注：与空白对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠肺组织中 p65 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	p65
空白对照组	10	22.21±1.86
模型组	10	35.89±5.95 ^a
低剂量组	10	15.67±10.68 ^b
中剂量组	10	9.89±2.87 ^b
高剂量组	10	21.44±5.60 ^b

注：与空白对照组比较，^a $P<0.05$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ 。

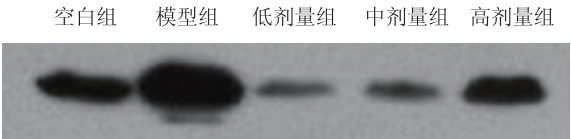


图 3 各组大鼠肺组织中 p65 含量

3 讨论

目前研究发现,炎症反应与 ARDS 的关系十分密切。炎性反应,特别是急性炎症反应在 ARDS 早期阶段有着重要的作用。机体受到损伤刺激后,释放大量的炎性因子,炎性因子激活巨噬细胞及中性粒细胞等效应细胞,在效应细胞的刺激下,导致肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤,发生肿胀变性坏死,而中性粒细胞的凋亡延迟,导致组织损伤,及肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡过多^[2]。

急性炎症反应过程中出现各种血浆蛋白和炎性细胞因子水平的变化,如肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β、白细胞介素6等细胞的促炎性因子表达上调,一方面启动了炎性级联反应,激活核转录因子,诱导细胞凋亡;另一方面抑炎性因子表达增加,促

进损伤修复。NF-κB 作为一种具有多向转录调节作用的核因子,广泛参与免疫、炎症、氧化应激等生理病理过程,是 ARDS 中重要的调控反应。由于炎症因子(如 TNF-α、IL-1β、IL-6)与 NF-κB 之间又能够相互激活^[3],导致 NF-κB 活化,并进一步刺激机体释放大量炎症相关性物质,炎症瀑布反应发生,加重肺部损伤。经典的 NF-κB 是 p65/p50 二聚体结构,p50 上含有与 DNA 结合的位点,p65 则主要参与基因转录的起始环节,同时也是 NF-κB 的主要活性形式,LPS 通过激活 NF-κB 诱发大量炎症因子释放成为 ARDS 发病的中心环节,NF-κB 是炎症反应的终末控制点^[4],而抑制 NF-κB 信号通路的激活,降低 NF-κB 的活性则有利于减少肺部炎症、水肿及肺泡细胞的坏死,从而降低肺损伤程度,故通过阻断 NF-κB 信号通路的激活,很有可能成为治疗 ARDS 的一个有效方案。

3.1 益气化痰解毒方的组方与配伍

ARDS 属于中医“暴喘”“肺衰”“喘证”等范畴,其发病在早期多表现为实证,中、晚期则多为虚证,但杜怀棠教授认为,“邪之所凑,其气必虚”,早期多以邪实为主,兼有气虚,而正气之盛衰与疾病进展密切相关,在疾病早期阶段补益正气,有利于抗邪外出,疾病恢复。

毒瘀内阻,气机壅闭是本病的关键病机,因此,杜怀棠教授根据多年临床经验研制了具有益气化痰,解毒平喘之功效的益气化痰解毒方。本方主要药物组成为黄芪、三七、金银花、炒枳实、赤芍等,以黄芪、三七为君药,金银花为臣药,炒枳实、赤芍等共为佐药。《神农本草经》将黄芪列入上品,认为其“味甘,微温”,具有“补虚,排脓止痛之功效”;《名医别录》认为黄芪“无毒”,并强调其益气。现代药理研究黄芪的主要成分为黄芪多糖,具有抗炎作用,可以抑制巨噬细胞合成,并抑制促炎因子 IL-1β、诱导型一氧化氮合酶、IL-6 的分泌,同时促进抗炎因子 IL-10 的释放,从而抑制炎症反应^[5]。三七具有活血化痰、益气补虚之功效,《本草纲目》中言“止血散

血,定痛”。现代药理研究表明,其主要成分是三七总皂苷,具有降低 ARDS 大鼠血清及肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量,缓解低氧血症^[6]。黄芪与三七二者共为君药,共奏益气化瘀之功效。

《名医别录》将金银花列为上品,并称其久服轻身,有延年益寿之功效,主要用于寒热身肿。在清朝,其解毒之功效被一致肯定^[7]。现代药理研究表明金银花具有抗炎,抗内毒素的作用^[8],且其对 TNF- α 、IL-6 均具有调控作用^[9]。以金银花为臣药,发挥其清热解毒、透营转气之功效,解同时协同黄芪、三七发挥本方益气化瘀解毒之功。

赤芍为活血凉血药,《本草纲目》中提到,“赤芍散邪,能行血中之滞”;《日华子本草》言赤芍可补气。现代药理学提出,赤芍总苷具有改善凝血功能的作用。研究表明,凝血纤溶系统的功能异常与 ARDS 的炎症反应在疾病发展过程中有着密切的关系,常具有相互促进的作用^[10]。改善凝血功能,不仅有利于改善瘀血状况,还可减轻炎症反应。枳实为理气药,《药性赋》中言其功用有四:“消心下痞塞之痰,泄腹中滯塞之气,推胃中隔宿之食,削腹内连年之积。”气血关系密切,气行则血行,理气可以活血,改善瘀血状态。大肠与肺互为表里,ARDS 的发生后除出现进行性呼吸困难、喘憋等肺气壅滞,气机不畅的表现外,还常表现为大便失调,腑气不通等大肠失于传导的症状,在治疗时肺肠同治可以提高其疗效。方中其他配伍药物具有抗氧化利水之功效。

3.2 益气化瘀解毒复方对 ARDS 大鼠炎症因子的影响

本实验结果显示:ARDS 大鼠肺组织病理学可见肺组织损伤,肺脏组织正常结构遭破坏,肺间质水肿,肺泡内可见炎症渗出物,血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α ,肺组织中 p65 蛋白表达均明显增加,而本方能够改善大鼠肺组织病理受损情况,并且可以显著降低血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及肺组织中 p65 蛋白表达含量,具有减轻炎症反应的作用,这可能是复方防治 ARDS 的有效途径之一。

本次实验中,中、高剂量组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 及肺组织中 P65 蛋白表达均较模型组有明显下降,表明本方在中剂量时就可达到预期疗效。但是中、高剂量组间比较无统计学差异,仅可看到下降趋势,考虑本方在中剂量时就可达到较满意疗效,增量增效并无明显证据。而低剂量组大鼠

血清中 TNF- α 较模型组并无明显下降,考虑低剂量的中药浓度在抑炎方面疗效并不理想。综上所述,中剂量是较为理想剂量,在今后实验中可以对中剂量的治疗效果及机制进行进一步的研究。

本实验中模型组大鼠炎症因子与 p65 含量均升高,而中药干预后均有所下降,考虑有三种可能:一方面,中药复方主要通过抑制炎症因子的产生,而减少 NF- κ B 通路激活,从而减轻炎症反应;另一方面,复方通过抑制 NF- κ B 通路激活,减少炎症因子释放;第三减轻炎症反应,中药复方有多靶点治疗的特点,复方是否在抑制了炎症因子产生的同时也阻断了 NF- κ B 通路的激活,这需要在接下来的实验中进行进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Frutosvivar F, Ferguson ND, Esteban A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. Critical Care Medicine, 2006, 27(4):327-336.
- [2] Perl M, Chung CS, Perl U, et al. Fas-induced Pulmonary Apoptosis and Inflammation during Indirect A cute Lung Injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(6):591-601.
- [3] Pulai JI, Chen H, Im HJ, et al. NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin ihigments[J]. J Immunol, 2005, 174(9):5781-5788.
- [4] Romay MC, Che N, Becker SN, et al. Regulation of NF- κ B signaling by oxidized glycer-o-phospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and-27a-5p in human aortic endothelial cells[J]. J Lipid Res, 2015, 56(1):38-50.
- [5] Lu J, Chen X, Zhang Y, et al. Astragalus polysaccharide induces anti-inflammatory effects dependent on AMPK activity in palmitate-treated RAW264.7 cells[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(6):1463-1470.
- [6] 陈宇清,荣令,周新.三七总皂苷对急性肺损伤大鼠血清和支气管肺泡灌洗液肿瘤坏死因子 α 、白介素6和白介素10水平的影响[J].实用心脑血管病杂志,2013,21(2):89-92.
- [7] 杨欣,李洪波,陈诚,等.金银花药性与功效的文献考证[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):220-222.
- [8] 雷玲,李兴平,白筱璐,等.金银花抗内毒素、解热、抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2012,(1):115-117.
- [9] 奚清.金银花提取物活性成分对甲型流感病毒肺炎小鼠免疫细胞因子表达影响的实验研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2008.
- [10] 宣国平,张琳,钟明媚,等.脂多糖致大鼠急性肺损伤模型取材时间选择[J].中华实用诊断与治疗杂志,2015,29(2):136-138.

(收稿日期:2016-10-22)

(本文编辑:董历华)