

· 论著 ·

重楼总皂苷对脓毒症大鼠的保护作用研究

周满红 汪松 马璇岚 李堂江 刘同英 刘安平

【摘要】 目的 观察重楼总皂苷对脓毒症大鼠的保护作用并探讨其作用机制。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型,观察重楼总皂苷对 CLP 大鼠死亡率的影响。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测术后 2、6、12、24 和 48 h 大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平;光镜下观察 72 h 大鼠肺组织病理学变化。分离大鼠腹腔巨噬细胞(PM Φ),用 ELISA 检测重楼总皂苷对 LPS(100 μ g/L)诱导大鼠 PM Φ 释放 TNF- α 及 IL-1 β 的影响。结果 重楼总皂苷组大鼠死亡率明显低于模型组(50.0%比 85.0%, $P < 0.05$)。重楼总皂苷各浓度组血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平较模型组相应时间点明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肺组织病理学观察显示肺损伤程度较轻。体外实验表明,5、10、20 和 40 mg/L 重楼总皂苷均可显著降低 LPS 刺激 PM Φ 释放 TNF- α 和 IL-1 β 的水平(P 均 < 0.01);且各浓度组间 TNF- α 水平差异无统计学意义(P 均 > 0.05);而 5 mg/L 组 IL-1 β 水平显著高于 10 mg/L 组($P < 0.05$),但与 20 mg/L 组和 40 mg/L 组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。结论 重楼总皂苷能抑制 CLP 大鼠巨噬细胞活化并减轻肺损伤程度,对 CLP 大鼠具有保护作用。

【关键词】 重楼总皂苷; 脓毒症; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 脂多糖

Protective effects of rhizoma paridis total saponins (重楼总皂苷) on septic rats ZHOU Man-hong, WANG Song, MA Xuan-lan, LI Tang-jiang, LIU Tong-ying, LIU An-ping. Department of Emergency, The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective effect of rhizoma paridis total saponins (重楼总皂苷) and its mechanism on septic rats. **Methods** Septic model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP) in Wistar rats. Rhizoma paridis total saponins was administered to observe its protective effects on septic rats. Blood was collected to determine serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels at 2, 6, 12, 24 and 48 hours after operation by means of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of lung tissue were observed with light microscope at 72 hours after operation. The peritoneal macrophages (PM Φ) in rats were isolated and the release of TNF- α and IL-1 β in PM Φ after exposure to lipopolysaccharide (LPS, 100 μ g/L) were measured by ELISA. **Results** Mortality in the rhizoma paridis total saponins group was significantly lower than the CLP group (50.0% vs. 85.0%, $P < 0.05$). The levels of TNF- α and IL-1 β in serum were significantly lower than those of the CLP group at the same time ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The degree of inflammatory injury to the lung was much milder than that in the CLP group. In the in vitro experiment, it was shown that rhizoma paridis total saponins in concentrations of 5, 10, 20 and 40 mg/L could inhibit remarkably the release of TNF- α and IL-1 β from LPS-stimulated PM Φ of rats (all $P < 0.01$). The differences in TNF- α levels among the groups showed no statistically significant difference (all $P > 0.05$). The level of IL-1 β in 5 mg/L group was significantly higher than that of the 10 mg/L group ($P < 0.05$), but showed no difference with those of 20 mg/L and 40 mg/L groups (both $P > 0.05$). **Conclusion** Rhizoma paridis total saponins can protect the CLP rats by inhibiting the activation of rat PM Φ to release cytokines and ameliorating acute lung injury.

【Key words】 rhizoma paridis total saponins; sepsis; macrophage; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β ; lipopolysaccharide

严重创伤、大手术、休克、感染以及心搏、呼吸骤停复苏后常并发脓毒症(sepsis),已成为危重病医学的首要问题^[1]。对多器官功能障碍综合征(MODS)抗炎治疗途径的选择,由于从靶细胞活化至炎症细胞因子产生、释放这一过程中存在多处阻断环节,故针对这些环节可进行相应的干预^[2]。在国内,运用中

医药防治脓毒症及 MODS 已成为一个重要的发展方向^[3]。王今达教授等^[4]提出了重症感染性疾病治疗的新对策——采用中医药制剂对细菌、内毒素、炎症介质并治,并取得一定成效。因此,在对脓毒症治疗上应强调中西医结合治疗,并应进一步发掘新的中药方剂或某些中草药的有效成分,形成我国独特的防治脓毒症新措施^[5]。重楼为百合科植物云南重楼或七叶一枝花的干燥根茎,其药用历史悠久,以蚤休之名始载于《神农本草经》,具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效。现代药理研究发现,重楼活性

基金项目:贵州省科技基金资助项目(黔科合 J 字[2005]2075)

作者单位:563003 贵州遵义,遵义医学院附属医院急诊科

作者简介:周满红(1963-),男(汉族),山东省人,副主任医师,

Email:manhongzhou@sina.com.

成分具有抗肿瘤、镇静、镇痛、止血等作用,尤其具有抑菌、消炎作用^[6]。本研究中重点探讨重楼的主要有效成分重楼总皂苷对脓毒症模型大鼠的保护作用及其机制,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料:药材购于贵州省务川县中药材市场,经遵义医学院药化教研室鉴定为云南重楼。在遵义医学院药化教研室提取分离,经化学检识为皂苷成分重楼总皂苷。选择 8 周龄清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 200~250 g,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK-2002008。

1.2 实验动物分组及模型制备:参照 Chaudry 等^[7]报道的盲肠结扎穿孔术(CLP)方法制备大鼠脓毒症模型,行 CLP 后立即于大鼠背部皮下注射生理盐水 30~40 ml/kg,以补充术中丢失的体液。制模后的动物按下列方法处理。

1.2.1 实验 1:将 40 只 CLP 大鼠按随机数字表法分为模型组和重楼总皂苷组,每组 20 只,观察重楼总皂苷对 CLP 大鼠的 3 d 保护率。

1.2.2 实验 2:将 66 只 CLP 大鼠按随机数字表法分为 3 组:正常对照组(6 只),麻醉后活杀;模型组(30 只),分别于术后 2、6、12、24 和 48 h 活杀;重楼总皂苷组(30 只),于 CLP 后予重楼总皂苷灌胃,每次 40 mg/kg,每日 2 次,分别于术后相应时间点活杀。活杀大鼠后无菌取心脏血待测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)含量,72 h 取肺行组织病理学检查。

1.2.3 实验 3:大鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ)的分离、纯化和培养:大鼠术前禁食 12 h,乙醚麻醉,脱白处死后浸泡于体积分数为 75%的乙醇中 5~10 min,剪开腹部皮肤暴露腹膜,向腹腔内注入生理盐水约 20 ml,轻揉腹部,沿腹白线剪开一小口,吸取腹腔液,离心 10 min,洗涤 2 次后用含质量分数为 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10⁹/L 后加入至聚苯乙烯培养板中,每孔 0.5 ml。按随机数字表法分为空白对照组、脂多糖(LPS)组及重楼总皂苷 5、10、20 和 40 mg/L 组,每组 6 个复孔。重楼总皂苷各组加入相应浓度药物后 2 h 分别加入终浓度为 100 μg/L 的 LPS。空白对照组只加入大鼠 PMΦ 及生理盐水;LPS 组只加入相同浓度及量的大鼠 PMΦ 和 LPS。于 37 ℃、体积分数为 5%的 CO₂ 培养箱中孵育 24 h,收集上清液于 -20 ℃保存待测 TNF-α、IL-1β 浓度。

1.3 检测指标及方法:血清及上清液 TNF-α、IL-1β 浓度检测采用酶联免疫吸附法(ELISA),按试剂盒说明书操作步骤进行。肺组织常规脱水、石蜡包埋、苏木素-伊红(HE)染色、封固、切片,光镜下观察组织病理学变化。

1.4 统计学处理:计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料用百分比表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重楼总皂苷对 CLP 大鼠的保护作用:模型组大鼠 3 d 死亡率为 85.0%(17/20),重楼总皂苷组 3 d 死亡率为 50.0%(10/20),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 重楼总皂苷对 CLP 大鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 水平的影响(表 1):模型组血清 TNF-α 和 IL-1β 水平较正常对照组明显增高(P 均 < 0.01),分别于术后 24 h 和 6 h 达到高峰;重楼总皂苷组血清 TNF-α 和 IL-1β 水平明显下降,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 TNF-α 和 IL-1β 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(h)	动物数	TNF-α (ng/L)	IL-1β (ng/L)
正常对照组		6	56.72 ± 3.87	57.15 ± 20.27
模型组	2	6	105.34 ± 3.65 ^a	125.73 ± 13.32 ^a
	6	6	128.39 ± 5.23 ^a	208.28 ± 14.81 ^a
	12	6	126.17 ± 2.45 ^a	156.19 ± 10.13 ^a
	24	6	191.64 ± 12.45 ^a	134.81 ± 6.38 ^a
	48	6	136.83 ± 9.12 ^a	115.45 ± 12.56 ^a
重楼总皂苷组	2	6	45.34 ± 4.23 ^c	97.46 ± 9.38
	6	6	67.25 ± 6.16 ^c	135.37 ± 7.17 ^c
	12	6	79.62 ± 2.57 ^b	105.56 ± 6.59 ^b
	24	6	132.77 ± 8.15 ^b	91.32 ± 15.21 ^b
	48	6	103.68 ± 10.38 ^b	85.44 ± 13.91 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组同期比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.3 重楼总皂苷对 LPS 诱导大鼠 PMΦ 释放 TNF-α、IL-1β 的影响(表 2):空白对照组上清液中仅有少量 TNF-α、IL-1β 表达。LPS 处理可致 PMΦ 上清液中 TNF-α、IL-1β 过度表达(P 均 < 0.01)。重楼总皂苷各浓度组上清液中 TNF-α、IL-1β 水平均较 LPS 组显著降低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。各浓度重楼总皂苷组间 TNF-α 水平差异无统计学意义;重楼总皂苷 5 mg/L 组 IL-1β 水平显著高于重楼总皂苷 10 mg/L 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),与重楼总皂苷 20 mg/L 组及 40 mg/L

组间比较差异无统计学意义(P 均 >0.05)。

表 2 重楼总皂苷对 LPS 诱导大鼠 PM Φ 释放 TNF- α 、IL-1 β 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)
空白对照组	6	31.86 \pm 1.48	65.68 \pm 3.78
LPS 组	6	114.40 \pm 7.85 ^d	348.50 \pm 34.84 ^d
重楼总皂苷 5 mg/L 组	6	68.66 \pm 13.46 ^e	143.06 \pm 27.63 ^e
重楼总皂苷 10 mg/L 组	6	47.16 \pm 8.69 ^e	79.36 \pm 25.91 ^{ef}
重楼总皂苷 20 mg/L 组	6	52.85 \pm 19.64 ^e	94.05 \pm 46.67 ^e
重楼总皂苷 40 mg/L 组	6	50.10 \pm 6.98 ^e	84.15 \pm 29.04 ^e

注:与空白对照组比较,^d $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^e $P < 0.01$;
与重楼总皂苷 5 mg/L 组比较,^f $P < 0.05$

2.4 肺组织病理学改变(彩色插图 1):光镜下观察,正常对照组肺组织结构完整,无出血、水肿。模型组可见大量炎性细胞浸润,肺泡壁结构破坏、肺间质水肿,片状出血灶、肺泡腔和间质可见大量红细胞。与模型组比较,重楼总皂苷组肺泡结构损伤轻微,间质水肿、炎性细胞浸润和出血均显著减轻。

3 讨论

严重创伤、大手术、休克、感染和心搏、呼吸骤停复苏后等严重疾病时,肠道缺血和再灌注损伤导致肠黏膜屏障功能障碍,肠内细菌及内毒素等进入血流。革兰阴性(G⁻)菌细胞壁外膜上内毒素的主要成分 LPS 是介导脓毒症的主要病原分子之一^[8],其可在炎症过程中诱导各种炎症反应细胞如巨噬细胞的活化,从而引起 TNF- α 、IL-1 β 等大量炎症介质的释放,这些炎症介质协同作用,促使炎症过程发生发展,形成致死性的过度炎症反应,最终导致脓毒症并发展为 MODS,甚至死亡^[9]。因此,在脓毒症的病理生理过程中,活化的巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 等炎症介质起到了关键性的作用。抑制巨噬细胞的活性,将会减少这些炎症介质的产生,进而减轻由它们带来的局部或全身炎症损害。

本实验结果表明,重楼总皂苷能明显降低 CLP 大鼠的死亡率,并显著减少其体内主要炎症介质 TNF- α 和 IL-1 β 释放;体外细胞培养也证实重楼总皂苷可明显抑制 LPS 诱导大鼠 PM Φ 释放 TNF- α 和 IL-1 β ,提示重楼总皂苷对 CLP 大鼠的保护作用可能与其抑制巨噬细胞的活性,减少 TNF- α 和 IL-1 β 等炎症介质的产生有关。重楼总皂苷也许可以从源头上调控 TNF- α 、IL-1 β 等炎症介质的水平,从而在一定程度上抑制炎症的发生发展,避免形成过度的炎症反应和脓毒症,进而减轻由过度炎症反应带来的局部或全身损害。重楼总皂苷各浓度组间 PM Φ 释放 TNF- α 差异无统计学意义,表明重楼总皂苷浓

度只要达到 5 mg/L 即可达到抑制 LPS 诱导大鼠 PM Φ 释放 TNF- α 的目的,再增加浓度也不能增加其抑制效应。而重楼总皂苷对 LPS 诱导大鼠 PM Φ 释放 IL-1 β 的最佳浓度在 10 mg/L,再增加浓度并不能增加抑制 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞释放 IL-1 β 的效应。

重楼提取物的抗菌、抗炎作用机制仍不十分清楚。核转录因子- κ B(NF- κ B)可通过调控细胞因子的基因表达而参与体内炎症反应的发生发展,如果以 NF- κ B 作为靶点进行干预治疗,则可能会起到明显的抗炎效果。有文献报道,重楼皂苷类物质具有良好的清除自由基效果及抗氧化能力,尤其是具有抗脂质过氧化及保护 DNA 免受自由基氧化损伤的能力^[10];同时具有许多抗氧化剂抑制 NF- κ B 活化的作用^[11],进而在 mRNA 水平抑制 TNF- α 、IL-1 β 的生成,从而起到调控炎症反应的作用,有待进一步的研究来证实。

本实验结果还表明,重楼总皂苷能减轻 CLP 大鼠肺组织的损害,也许是其降低 CLP 大鼠死亡率的原因之一。

参考文献

- [1] Barriere SL, Lowry SF. An overview of mortality risk prediction in sepsis[J]. Crit Care Med, 1995, 23(2): 376-393.
- [2] 姚咏明, 盛志勇. MODS 抗炎治疗的反思[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 456-458.
- [3] 王今达. 开展中西医结合治疗急性危重病的思路和方法[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(6): 323-325.
- [4] 王今达, 雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(6): 323-325.
- [5] 盛志勇. 努力提高脓毒症的认识水平[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 131.
- [6] 欧阳录明, 黄晓敏, 吴兴无, 等. 中草药体外抗白色念珠菌的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2000, 7(3): 26-27.
- [7] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
- [8] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 885-891.
- [9] Sikora JP. The role of cytokines and reactive oxygen species in the pathogenesis of sepsis [J]. Pol Merkur Lekarski, 2000, 7(43): 47-50.
- [10] 高云涛, 杨利荣, 杨益林, 等. 重楼提取物体外清除活性氧及抗氧化作用研究[J]. 中成药, 2007, 29(2): 195-198.
- [11] Surh YJ, Chun KS, Cha HH, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation [J]. Mutat Res, 2001, 480-481: 243-268.

(收稿日期: 2007-11-23 修回日期: 2008-05-20)

(本文编辑: 李银平)

“5·12”四川汶川特大地震致挤压综合征截肢伴肺水肿 1 例抢救体会

(正文见526页)



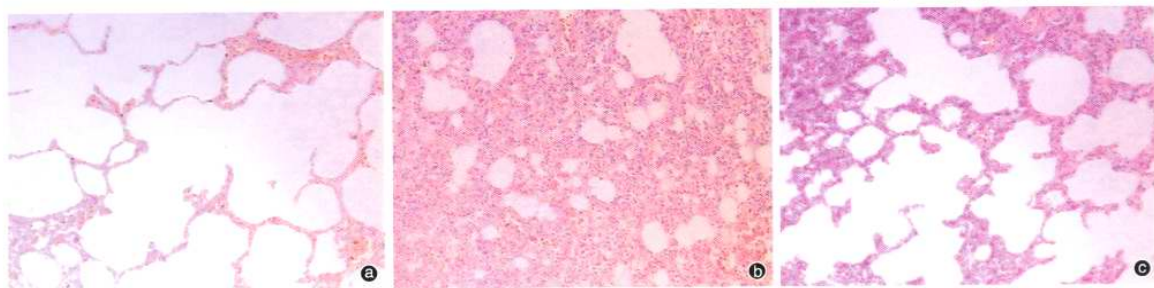
图1 患者入院3dX线胸片示双肺野内见云絮状影



图2 患者入院23dX线胸片示双肺弥漫分布性团块影

重楼总皂苷对脓毒症大鼠的保护作用研究

(正文见568页)



①:正常对照组, ②:模型组, ③:重楼总皂苷10 mg/L组

图1 各组大鼠肺组织病理学改变(HE, ×400)

欢迎订阅
欢迎投稿

中国中西医结合急救
CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE

中国危重病急救医学
CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE

中华医学会主办
邮发代号: 6-58
全年定价: 117.6元

中国中西医结合学会主办
邮发代号: 6-93
全年定价: 54元

刊社地址: 天津市和平区睦南道122号 邮编: 300050
请到当地邮局办理订阅手续, 也可到本刊发行部订阅
电话: 022-23042150 传真: 022-23306917 Email: cccm@em120m.com