

• 研究报告 •

中药凉膈散对脓毒症大鼠凝血功能及炎性介质的影响

王东强 李志军 张平平 何文菊

300192 天津市第一中心医院中西医结合科

通讯作者:王东强, Email: wdqklm@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.015

基金项目:天津市卫生计生委科技基金重点项目(2015KR16);天津市卫生计生委中医中西医结合科研课题(2015044);国家中医药管理局“十二五”重点专科建设项目(2012-2);王今达学术思想研究室项目(201208)

Effect of Chinese medicine Liangge San on coagulation function and inflammatory mediators in rats with sepsis Wang Dongqiang, Li Zhijun, Zhang Pingping, He Wenju

Department of Integrated TCM & Western Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Wang Dongqiang, Email: wdqklm@sina.com

Fund program: Tianjin Municipal Key Project of Science and Technology of Health and Family Planning Commission (2015KR16); Tianjin Municipal Research Project of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Health and Family Planning Commission (2015044); "12th Five-Year" Key Specialty Construction Projects of State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China (2012-2); Wang Jinda Academic Thought Research Office Project (201208)

脓毒症是宿主对感染的特异性反应导致的威胁生命的器官功能障碍^[1],能诱发脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS)^[2]。国外住院患者中脓毒症发病率为6%~54%,病死率为20%~60%^[3-6],且二者仍呈逐年上升趋势^[7-8],成为世界范围内死亡和病危的主要原因。目前脓毒症发病机制仍未阐明,其治疗还没有根本性突破。然而,寻找具体的补救措施和治疗脓毒症的有效药物仍是当今研究的重点。研究表明,加味凉膈散能降低脓症患者白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、C-反应蛋白(CRP)水平,具有解毒抗炎作用^[9];同时加味凉膈散具有抑制脓症患者血小板活化及改善凝血功能的作用^[10]。因此,本研究旨在观察凉膈散对脓毒症大鼠死亡率、凝血功能及炎性介质的影响,以期对脓毒症治疗带来新的突破。

1 材料与方法

1.1 动物及分组:健康成年雄性Wistar大鼠,8~10周龄,体质量(250±10)g,由军事医学科学院卫生学环境医学研究所动物实验中心提供,许可证号:SCXK-(军)2009-003。按随机数字表法分为假手术(Sham)组($n=15$)、盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组($n=90$)、凉膈散治疗组($n=90$);后两组再分为术后24、48、72 h亚组($n=30$)。

1.2 模型制备及处理:采用CLP制备脓毒症大鼠模型^[11],术后经颈部皮下注射预加热的37℃生理盐水50 mL/kg补液;Sham组只翻动盲肠、不结扎穿孔。凉膈散治疗组术后灌胃凉膈散7.8 g·kg⁻¹·d⁻¹^[12],分2次给药,间隔12 h;CLP组、Sham组灌胃等量生理盐水。

1.3 观察指标及方法:术后24、48、72 h观察大鼠死亡率后取腹主动脉血,用全自动血球分析仪检测白细胞计数(WBC)、血小板计数(PLT);用全自动凝血仪检测凝血酶原时间(PT)和纤维蛋白原(FIB)含量;采用固相夹心酶联免

疫吸附试验(ELISA)检测血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平。

1.4 统计学方法:采用SPSS 19.0软件处理数据。首先进行正态性检验和方差齐性检验,服从正态分布采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验或 t' 检验;非正态分布则采用中位数(四分位数间距)[$M(Q_R)$]表示,组间比较采用非参数检验,配对资料用Wilcoxon秩检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 凉膈散对脓毒症大鼠死亡率的影响:Sham组大鼠均存活。CLP组大鼠24、48、72 h死亡率分别为36.7%、46.7%、73.3%,凉膈散治疗组分别为20.0%、36.7%、63.3%;两组各时间点死亡率差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。

2.2 凉膈散对脓毒症大鼠血常规、出血指标的影响(表1)

2.2.1 WBC:CLP组术后24 h WBC即明显低于Sham组;随时间延长WBC逐渐升高,但各时间点仍明显低于Sham组(均 $P<0.05$);凉膈散治疗组各时间点WBC也低于Sham组,但术后24 h WBC明显高于CLP组($P<0.05$),48 h、72 h WBC与CLP组比较差异无统计学意义。

2.2.2 PLT:CLP组和凉膈散治疗组PLT均随时间延长逐渐升高。CLP组术后24 h PLT即明显低于Sham组,48 h、72 h明显高于Sham组(均 $P<0.05$);而凉膈散治疗组术后各时间点PLT与CLP组比较差异均无统计学意义。

2.2.3 PT:CLP组和凉膈散治疗组PT随时间延长逐渐缩短。CLP组术后24 h、48 h PT明显高于Sham组,72 h明显低于Sham组(均 $P<0.05$);而凉膈散治疗组术后各时间点PT均高于CLP组,24 h差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2.4 FIB:CLP组和凉膈散治疗组FIB呈先升高后降低趋势,48 h达峰值。与Sham组比较,CLP组24 h、72 h FIB显著降低,48 h显著升高(均 $P<0.05$);而凉膈散治疗组术后

表1 凉膈散对脓毒症大鼠术后各时间点血常规、出凝血指标及血清细胞因子水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	WBC ($\times 10^9/L$)	PLT ($\times 10^{12}/L$)	PT (s)	FIB (g/L)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-6 (ng/L)
Sham组	15	3.97 \pm 0.23	5.89 \pm 0.40	11.42 \pm 0.35	1.87 \pm 0.14	57.91 \pm 2.72	592.29 \pm 121.57	292.13 \pm 85.42
CLP 24 h组	19	1.69 \pm 0.19 ^a	5.34 \pm 0.25 ^a	12.07 \pm 0.33 ^a	1.84 \pm 0.16 ^a	66.78 \pm 8.79 ^a	700.20 \pm 111.41 ^a	280.68 \pm 81.60 ^a
CLP 48 h组	16	2.13 \pm 0.26 ^a	6.18 \pm 0.28 ^a	11.61 \pm 1.91 ^a	2.08 \pm 0.58 ^a	51.33 \pm 1.96 ^a	397.75 \pm 75.07 ^a	295.11 \pm 137.72 ^a
CLP 72 h组	8	2.56 \pm 0.11 ^a	6.27 \pm 0.25 ^a	11.26 \pm 0.32 ^a	1.85 \pm 0.52 ^a	51.06 \pm 1.64 ^a	173.27 \pm 54.80 ^a	233.76 \pm 81.25 ^a
凉膈散 24 h组	24	2.03 \pm 0.19 ^{ab}	5.25 \pm 0.48	12.85 \pm 1.13 ^{ab}	1.83 \pm 0.11	52.79 \pm 3.25 ^b	436.11 \pm 114.08 ^{ab}	215.97 \pm 27.08 ^{ab}
凉膈散 48 h组	19	2.25 \pm 0.25	6.17 \pm 0.34	11.87 \pm 0.54	2.06 \pm 0.20 ^a	45.75 \pm 8.53	406.34 \pm 205.56 ^a	266.25 \pm 71.49
凉膈散 72 h组	11	2.55 \pm 0.12 ^a	6.36 \pm 0.27 ^a	11.41 \pm 0.82	1.83 \pm 0.11	50.39 \pm 2.84 ^a	105.44 \pm 35.15	127.16 \pm 52.19 ^a

注: Sham为假手术, CLP为盲肠结扎穿孔术, WBC为白细胞计数, PLT为血小板计数, PT为凝血酶原时间, FIB为纤维蛋白原, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-1 β 、IL-6为白细胞介素-1 β 、-6;与Sham组比较,^a $P < 0.05$;与CLP组同期比较,^b $P < 0.05$

各时间点 FIB 均较 CLP 组降低,但差异均无统计学意义。

2.3 凉膈散对脓毒症大鼠血清细胞因子水平的影响(表1)

2.3.1 TNF- α : CLP 组术后时间延长 TNF- α 逐渐下降, 24 h TNF- α 显著高于 Sham 组, 48 h、72 h 则显著低于 Sham 组(均 $P < 0.05$); 凉膈散治疗组各时间点 TNF- α 均低于 CLP 组, 24 h 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3.2 IL-1 β : CLP 组和凉膈散治疗组 IL-1 β 呈逐渐降低趋势。CLP 组术后 24 h IL-1 β 显著高于 Sham 组, 48 h、72 h 则显著低于 Sham 组(均 $P < 0.05$); 凉膈散治疗组 24 h IL-1 β 显著低于 CLP 组, 48 h、72 h 差异均无统计学意义。

2.3.3 IL-6: CLP 组和凉膈散治疗组 IL-6 呈先升高后降低趋势, 48 h 达峰值。CLP 组 24 h、72 h IL-6 显著低于 Sham 组, 48 h 则显著高于 Sham 组(均 $P < 0.05$); 而凉膈散治疗组 24 h IL-6 显著低于 CLP 组, 48 h、72 h 差异无统计学意义。

3 讨论

脓毒症可引起器官功能障碍,其病理生理机制远较感染及其伴随的炎症反应更为复杂^[1]。全身炎症反应综合征(SIRS)与代偿性抗炎反应综合征(CARS)的免疫内稳态失衡是脓毒症重要发病机制^[13],其病理生理机制非常复杂,常涉及全身多个系统,防治重点是通过多靶点阻断过度释放的炎性介质,抑制激活的炎性细胞,尽可能恢复炎性介质与内源性抑制物的平衡^[13-15]。目前对脓毒症的治疗还未根本解决,其发病率仍以每年 1.5% 的速率增加^[16-17],病死率以每年 1.5%~8.0% 的速率增加^[6],仍是危重病学的最大威胁之一^[18]。因此,寻找具体的补救措施和治疗脓毒症的有效药物仍是当今研究的重点^[19-20]。脓毒症中医辨证分型以瘀毒内阻为主^[21]。近年研究发现,加味凉膈散能有效降低脓毒症大鼠血清降钙素原(PCT)、CRP 水平^[22];黄增峰等^[23]研究也发现中药治疗脓毒症具有独特优势。本实验显示,凉膈散可显著延长脓毒症大鼠的生存时间,降低术后死亡率。

在脓毒症病程早期,骨髓往往是最早受累的器官之一,具体表现为外周血中有形成分异常。本实验发现,脓毒症组大鼠早期 WBC 即较 Sham 组显著降低,且随术后时间延长呈逐渐增高趋势。分析其原因可能为:①脓毒症时骨髓往

往是较早受累的器官之一,严重感染时,机体不能适应突发打击发生骨髓抑制,使白细胞生成受限,随后骨髓抑制缓解,逐渐恢复造血功能并向外周释放白细胞以抵御感染,使外周血 WBC 升高。②脓毒症早期机体产生并释放大量的炎性介质,趋化中性粒细胞向炎症部位游走,活化的中性粒细胞黏附于血管内皮细胞上,聚集形成微小血栓,致使短时间内大量白细胞被消耗,而中心血白细胞不能得到及时、足够的补充,使外周血 WBC 锐减,当外周消耗减少而中心血白细胞补充作用增强时 WBC 又回升。③脓毒症出现非特异性免疫系统过度活化的同时存在特异性免疫系统功能障碍,出现以细胞反应性降低或无反应状态为特征的免疫麻痹。脓毒症时,在内毒素以及单核细胞、内皮细胞表达的组织因子作用下,凝血系统激活外源性凝血途径,消耗大量凝血因子,导致纤溶亢进,使凝血因子合成减少,引起 PT、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)延长,PLT、FIB 减少。本实验发现,凉膈散治疗组术后 24 h PT 较 CLP 组显著延长,考虑凉膈散在脓毒症大鼠早期发挥了抑制机体高凝状态的作用。

在脓毒症早期,机体释放促炎介质,如 TNF- α 、IL-1、IL-2、 γ -干扰素(IFN- γ)、IL-6 等以引起机体炎症反应。TNF- α 是炎症的最初启动者之一,关键作用是在炎症反应中激活细胞因子级联反应,其在血液循环中很早出现并迅速达到高峰。IL-1 β 既可以由 TNF- α 诱导产生,也可以通过内毒素刺激间接产生,升高后的 IL-1 β 与 TNF- α 协同共同刺激 IL-6 的产生。这些炎性因子之间的相互作用形成正反馈环,使炎症反应的持续加重。

感染和损伤引起的促炎反应最初是保护性的,但当刺激过于强烈,细胞因子产生过多时又可产生广泛的损伤作用,因此炎症反应过程中产生的细胞因子参与脓毒症早期的多器官损害。本实验结果显示,脓毒症早期(术后 24 h)CLP 组 TNF- α 水平明显升高,此时 IL-1 β 也达到最高值,而 IL-6 峰值出现的时间(术后 48 h)相对较晚;凉膈散治疗组(术后 24 h)TNF- α 、IL-1 β 水平也升高,但不如模型组升高明显,IL-6 也于 48 h 达高峰,但仍低于模型组。本实验发现

一种趋势:促炎细胞因子明显高表达,导致促炎/抗炎处于失衡状态,在脓毒症早期抗炎细胞因子不足以抗衡促炎细胞因子,造成促炎细胞因子产生失控,导致全身炎症反应失控,引起组织器官损伤。

综上,本研究发凉隔散能显著降低脓毒症大鼠的死亡率和血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症介质水平,改善微血管凝血及血管内皮细胞损伤,给脓毒症治疗带来新的希望。中医药治疗脓毒症有独特优势,以脓毒症发病机制为基础进行研究为脓毒症的治疗带来新的突破。

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] 葛胜梅,胡振杰,刘丽霞,等.血必净对脓毒症患者凝血功能及肾功能影响的临床研究[J].*现代预防医学*, 2012, 39 (5): 1323-1324.
Ge SM, Hu ZJ, Liu LX, et al. Clinical study on the effect of Xuebijing injection on coagulation function and renal function in patients with sepsis [J]. *Mod Prev Med*, 2012, 39 (5): 1323-1324.
- [3] Ortíz G, Dueñas C, Rodríguez F, et al. Epidemiology of sepsis in Colombian intensive care units [J]. *Biomedica*, 2014, 34 (1): 40-47. DOI: 10.1590/S0120-41572014000100007.
- [4] Ogura H, Gando S, Saitoh D, et al. Epidemiology of severe sepsis in Japanese intensive care units: a prospective multicenter study [J]. *J Infect Chemother*, 2014, 20 (3): 157-162. DOI: 10.1016/j.jiac.2013.07.006.
- [5] Sakr Y, Elia C, Mascia L, et al. Epidemiology and outcome of sepsis syndromes in Italian ICUs: a multicentre, observational cohort study in the region of Piedmont [J]. *Minerva Anesthesiol*, 2013, 79 (9): 993-1002.
- [6] Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States [J]. *Crit Care Med*, 2013, 41 (5): 1167-1174. DOI: 10.1097/CCM.0b013e31827c09f8.
- [7] Rhee C, Gohil S, Klompas M. Regulatory mandates for sepsis care—reasons for caution [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370 (18): 1673-1676. DOI: 10.1056/NEJMp1400276.
- [8] Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, et al. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2012, 60 (6): 1070-1077. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2012.03989.x.
- [9] 王兵,邵蕾,徐春雷,等.加味凉隔散对早期脓毒症解毒抗炎攻邪安正作用观察[J].*辽宁中医杂志*, 2009, 36 (6): 941-942.
Wang B, Shao L, Xu CL, et al. Anti-inflammatory effects of modified Liangge San on earlier period of sepsis [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2009, 36 (6): 941-942.
- [10] 梁勇,曹书华,王勇强,等.加味凉隔散对脓毒症患者血小板活化及凝血功能影响的临床研究[J].*辽宁中医杂志*, 2010, 37 (7): 1289-1291.
Liang Y, Cao SH, Wang YQ, et al. Clinical trial of effects of modified liangge san on platelets activation and coagulation function in patients with sepsis [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2010, 37 (7): 1289-1291.
- [11] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4 (1): 31-36. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.
- [12] 施新猷.现代医学实验动物学[M].北京:人民军医出版社, 2008.
Shi XY. *Medical Laboratory Animal Science* [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2008.
- [13] 盛志勇.努力提高脓毒症的认识水平[J].*中华危重病急救医学*, 2003, 15 (3): 131-131. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2003.03.001.
Sheng ZY. Efforts to improve the level of awareness of sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2003, 15 (3): 131-131. DOI: cma.10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2003.03.001.
- [14] 潘爱军,邓艳如,杨田军,等.脓毒症患者外周血自然杀伤细胞的表型和功能及其临床意义[J].*中华危重病急救医学*, 2014, 26 (11): 827-831. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.012.
Pan AJ, Deng YR, Yang TJ, et al. Phenotype and functions of natural killer cells in septic patients and its clinical significance [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (11): 827-831. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.012.
- [15] Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock [J]. *N Engl J Med*, 2013, 369 (9): 840-851. DOI: 10.1056/NEJMr1208623.
- [16] 梁英健,张晓娟,李鑫,等.脓毒症患者血中组织因子、血管性血友病因子与肿瘤坏死因子- α 改变的临床意义[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (2): 104-106. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2012.02.013.
Liang YJ, Zhang XJ, Li X, et al. The clinical significance of changes of tissue factor, von Willebrand factor and tumor necrosis factor- α in plasma of patients with sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2012, 19 (2): 104-106. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2012.02.013.
- [17] 姚咏明,黎洁良.脓毒性休克与细胞因子[J].*中国实用外科杂志*, 2000, 20 (7): 433-435. DOI: 10.3321/j.issn.1005-2208.2000.07.022.
Yao YM, Li ZL. Pyogenic shock and cellular factors [J]. *Chin J Pract Surg*, 2000, 20 (7): 433-435. DOI: 10.3321/j.issn.1005-2208.2000.07.022.
- [18] 邱海波,周韶霞,杨毅,等.多器官功能障碍综合征的死亡危险因素分析及临床对策[J].*中华急诊医学杂志*, 2001, 10 (1): 13-16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2001.01.006.
Qiu HB, Zhou SX, Yang Y, et al. Multiple organ dysfunction syndrome: predictors of mortality and clinical therapeutic strategies [J]. *Chin J Emerg Med*, 2001, 10 (1): 13-16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2001.01.006.
- [19] Wenzel RP. Treating sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2002, 347 (13): 966-967. DOI: 10.1056/NEJMp020096.
- [20] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13 (3): 260-268. DOI: 10.1016/S1473-3099(13)70001-X.
- [21] 高洁,孔令博,刘斯,等.血必净注射液治疗脓毒症及多器官功能障碍综合征的前瞻性多中心临床研究[J].*中华危重病急救医学*, 2015, 27 (6): 465-470. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.010.
Gao J, Kong LB, Liu S, et al. A prospective multicenter clinical study of Xuebijing injection in the treatment of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (6): 465-470. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.010.
- [22] 张静姝,王勇强,王兵,等.加味凉隔散对脂多糖刺激小鼠血小板活化标志物及炎症因子释放的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (2): 133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.006.
Zhang JS, Wang YQ, Wang B, et al. The impact of modified Liangge powder on platelet activation markers and release of proinflammatory cytokine of mice by stimulation of lipopolysaccharide [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2015, 22 (2): 133-137. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.006.
- [23] 黄增峰,陈如康,黄学仄,等.参麦注射液对脓毒症患者器官功能保护作用的临床研究[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (5): 282-284. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.010.
Huang ZF, Chen RK, Huang XZ, et al. A clinic study on Shenmai injection for protection of organ functions in patients with sepsis [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2010, 17 (5): 282-284. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.010.

(收稿日期:2016-05-13)

(本文编辑:孙茜,李银平)