

温肾潜阳法对脓毒症相关性 ARDS 大鼠肺组织的保护作用

高培阳 何成诗 赵文 张传涛 张雪梅

610072 四川成都, 成都中医药大学附属医院重症医学科

通讯作者: 高培阳, Email: 1028377832@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.05.010

【摘要】 目的 研究温肾潜阳法对脓毒症相关性急性呼吸窘迫综合征(ARDS)大鼠肺组织的保护作用。方法 80 只健康雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组和复苏合剂低、中、高剂量组, 每组 16 只。采用在 5 min 内经尾静脉注射内毒素脂多糖(LPS)3 mg/kg 的方法复制大鼠急性肺损伤(ALI)模型, 正常对照组给予等体积生理盐水。制模后复苏合剂低、中、高剂量组分别给予中药复苏合剂(制附子 30 g、生牡蛎 30 g、干姜 15 g、麻黄 15 g、炙甘草 10 g)2.625、7.875、10.500 g/kg 灌胃, 正常对照组和模型组灌胃等体积生理盐水。于给药后 24 h 和 48 h 每组取 8 只大鼠观察肺组织病理学改变, 并进行肺损伤评分, 实验结束后计算大鼠存活情况。结果 给药后 48 h, ALI 模型组大鼠存活率较正常对照组明显降低[18.7% (3/16) 比 100.0% (16/16)], 复苏合剂低、中、高剂量存活率均较 ALI 模型组明显升高[50.0% (8/16)、75.0% (12/16)、93.7% (15/16) 比 18.7% (3/16), 均 $P < 0.05$]。正常对照组大鼠肺组织无明显病理学改变, ALI 模型组肺组织可见大量渗出、出血, 复苏合剂高、中、低剂量组大鼠肺组织炎症渗出、出血改变明显好转。给药后 24 h、48 h ALI 模型组肺损伤评分均较正常对照组明显升高(给药后 24 h: 7.83 ± 0.60 比 2.89 ± 4.23 ; 给药后 48 h: 7.33 ± 0.88 比 3.00 ± 0.28), 复苏合剂各药物组均较 ALI 模型组明显降低, 且以复苏合剂高剂量组的降低程度较低、中剂量组更显著[给药后 24 h(分): 3.37 ± 0.32 比 6.00 ± 0.44 、 4.63 ± 0.50 ; 给药后 48 h(分): 3.25 ± 0.25 比 5.25 ± 0.25 、 3.50 ± 0.50]。结论 温肾潜阳法能改善脓毒症相关性 ARDS 大鼠的肺组织损伤, 促进已损伤肺组织恢复, 最终改善 ARDS 大鼠预后。

【关键词】 温肾潜阳法; 脓毒症相关性急性呼吸窘迫综合征; 大鼠; 疗效

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81373836)

The protective effect of warming kidney and subsiding yang traditional Chinese medicine method on lung tissues of rats with acute respiratory distress syndrome associated with sepsis Gao Peiyang, He Chengshi, Zhao Wen, Zhang Chuantao, Zhang Xuemei

Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, Sichuan, China

Corresponding author: Gao Peiyang, Email: 1028377832@qq.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect of warming kidney and subsiding yang traditional Chinese medicine (TCM) method on lung tissues of rats with acute respiratory distress syndrome (ARDS) associated with sepsis. **Methods** Eighty healthy male Wistar rats were divided into normal control group, model group and low, medium and high dose Fusuheji groups by random number table, 16 rats in each group. The acute lung injury (ALI) model was established by injecting lipopolysaccharide (LPS) 3 mg/kg into a rat caudal vein within 5 minutes, and the normal control group was given the same volume of normal saline. Then the low, medium and high dose TCM groups were given low, medium and high dose Fusuheji TCM mixture (the ingredients of the mixture: radix aconite lateralis preparata 30 g, oysters 30 g, ginger 15 g, ephedra 15 g, licorice 10 g) 2.625, 7.875, 10.500 g/kg intragastric administration respectively. Equal volume of saline was given to the normal control group and model group by gavage. At 24 and 48 hours after respective administration, 8 rats were taken from each group to observe the pathological changes of lung tissues and score the lung injury. The rates of survival of rats were calculated after the experiment in various groups. **Results** After administration for 48 hours, the survival rate of rats in model group was obviously lower than that of the normal control group [18.7% (3/16) vs. 100.0% (16/16)], the low, middle and high dose Fusuheji groups' survival rates were all significantly higher than the rate of ALI model group [50.0% (8/16), 75.0% (12/16), 93.7% (15/16) vs. 18.7% (3/16), all $P < 0.05$]. There were no pathological changes in the lung tissues of rats in the normal control group, large amounts of exudates and hemorrhages were present in the lung tissues of ALI model group, and the inflammatory, exudative and hemorrhagic changes of lung tissues in the high, middle and low dose Fusuheji groups were obviously improved. After administration for 24 hours and 48 hours, the lung injury scores in the ALI model group were higher than those in control group (after administration for 24 hours: 7.83 ± 0.60 vs. 2.89 ± 4.23 ; after administration for 48 hours: 7.33 ± 0.88 vs. 3.00 ± 0.28), the scores of lung injury of any Fusuheji drug group were significantly lower than those of ALI model group, and the degrees of decrease were more marked in high dose Fusuheji group than those in low and middle dose Fusuheji groups (after administration for 24 hours: 3.37 ± 0.32 vs. 6.00 ± 0.44 , 4.63 ± 0.50 ; after administration for 48 hours: 3.25 ± 0.25 vs. 5.25 ± 0.25 , 3.50 ± 0.50). **Conclusion** The warming kidney and subsiding yang TCM method can improve the lung tissue injury in ARDS associated with sepsis in rats, promote the damaged lung tissue to recover, and ultimately the prognosis of ARDS rats is getting better.

【Key words】 Warming kidney and subsiding yang method; Acute respiratory distress syndrome associated with sepsis; Rat; Curative effect

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81373836)

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是由感染、手术、输血、创伤等严重打击导致肺泡毛细血管障碍引起的高蛋白性肺水肿, 以急性发作的严重低氧血症为临床表现。1994 年, 美国和欧洲共识会议制订了 ARDS 和急性肺损伤 (ALI) 临床诊断标准^[1], 2011 柏林会议对 ARDS 定义进行了更新, 并按氧合指数 (PaO₂/FiO₂) 分为轻、中、重 3 级^[2]。ARDS 发病急骤、病情危重, 病死率高^[3-4]。成人流行病学数据显示, ARDS 发病率为 1.5/10 万~7.5/10 万, 轻、中和重度 ARDS 患者的病死率分别高达 27%、32% 和 45%^[2]。脓毒症常导致多器官功能障碍, 而肺又常首当其冲受到损伤, 且肺损伤发生早, 发生率最高^[5]。针对目前 ARDS 发病率和病死率高的特点, 临床治疗措施仍以机械通气对症支持为主^[6], 迫切需要更广泛、更深入地开展 ARDS 发病机制和防治方法的研究, 特别是脓毒症相关性 ARDS 患者。脂多糖 (LPS) 等多种因素可诱导中性粒细胞等炎症细胞的黏附和聚集, 继而引起肺泡内皮损伤和毛细血管渗漏。肺泡内皮损伤和毛细血管渗漏是 ARDS 发生的中心环节, 减轻内皮细胞损伤及毛细血管渗漏是治疗 ARDS 的关键^[5, 7]。但目前对于减轻内皮损伤、修复毛细血管渗漏的方法仅局限于激素、限制液体入量、治疗原发病等, 且均未收到满意的效果。

本研究结合中医药治疗 ARDS 的临床经验, 观察温肾潜阳法对 ARDS 模型大鼠肺毛细血管渗漏的影响, 为临床提高 ARDS 疗效、降低病死率提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 健康 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 80 只, 体质量 220~250 g, 购自成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK(川)2015-030。将动物按随机数字表法分为正常对照组、模型组和复苏合剂低、中、高剂量组, 每组 16 只。采用在 5 min 内经尾静脉注射 LPS 3 mg/kg 的方法复制大鼠 ALI 模型, 正常对照组给予等体积生理盐水。

本实验中所有动物处置方法均符合动物伦理学标准。

1.2 给药方法: 复苏合剂低、中、高剂量组分别给予中药复苏合剂 [制附子 30 g、生牡蛎 30 g、干姜 15 g、麻黄 15 g、炙甘草 10 g, 所有药材均由成都中医药大学药学院中药学 (国家重点学科) 实验室进行药物质量控制及熬制, 使用前用生理盐水溶解稀释] 2.625、7.875、10.500 g/kg 灌胃。正常对照组和模型组制模后灌胃等体积生理盐水。

1.3 观察指标

1.3.1 大鼠存活情况: 实验过程中记录各组大鼠的存活情况。

1.3.2 肺组织病理学观察: 给药后 24 h 和 48 h, 每个时间点每组取 8 只大鼠进行后续样品采集和相关指标检测。取大鼠肺组织 (厚度一般不超过 0.5 cm) 置于 10% 的甲醛水溶液中固定, 常规石蜡包埋、切片, 二甲苯脱蜡, 经各级乙醇至水洗, 盐酸乙醇分化 30 s (提插数下), 自来水浸泡, 常规脱水、透明、封片。光镜下观察肺组织病理学改变。

1.3.3 肺损伤评分标准: ① 炎症为炎症细胞浸及观察到肺组织比例 < 25% 评为 1 分, 25%~50% 评为 2 分, > 50%~75% 评为 3 分, > 75%~100% 评为 4 分; ② 出血为红细胞占所观察到肺泡比例 < 25% 评为 1 分, 25%~50% 评为 2 分, > 50%~75% 评为 3 分, > 75%~100% 评为 4 分; ③ 渗出为渗出液占所观察到肺泡比例 < 25% 评为 1 分, 25%~50% 评为 2 分, > 50%~75% 评为 3 分, > 75%~100% 评为 4 分; ④ 肺间隔断裂为肺间隔纤维断裂占可观察肺组织比例 < 25% 评为 1 分, 25%~50% 评为 2 分, > 50%~75% 评为 3 分, > 75%~100% 评为 4 分。

1.4 统计学方法: 使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验; 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活情况 (表 1): 给药后 48 h, ALI 模型组大鼠存活率较正常对照组明显降低, 复苏合剂低、中、高剂量均较模型组明显升高 (均 P < 0.05)。

表 1 各组大鼠存活情况

组别	动物数 (只)	存活率 [% (只)]
正常对照组	16	100.0 (16)
ALI 模型组	16	18.7 (3) ^a
复苏合剂低剂量组	16	50.0 (8) ^b
复苏合剂中剂量组	16	75.0 (12) ^b
复苏合剂高剂量组	16	93.7 (15) ^b

注: 与正常对照组比较, ^aP < 0.05; 与 ALI 模型组比较, ^bP < 0.05

2.2 肺组织病理学观察 (图 1): 正常对照组大鼠肺组织无明显病理学改变, 模型组大鼠肺组织可见大量渗出、出血, 复苏合剂低、中、高剂量组肺组织炎症渗出、出血改变较模型组明显好转。

2.3 各组大鼠不同时间点肺损伤评分比较 (表 2): 给药后 24、48 h 模型组大鼠肺损伤评分均较正常对

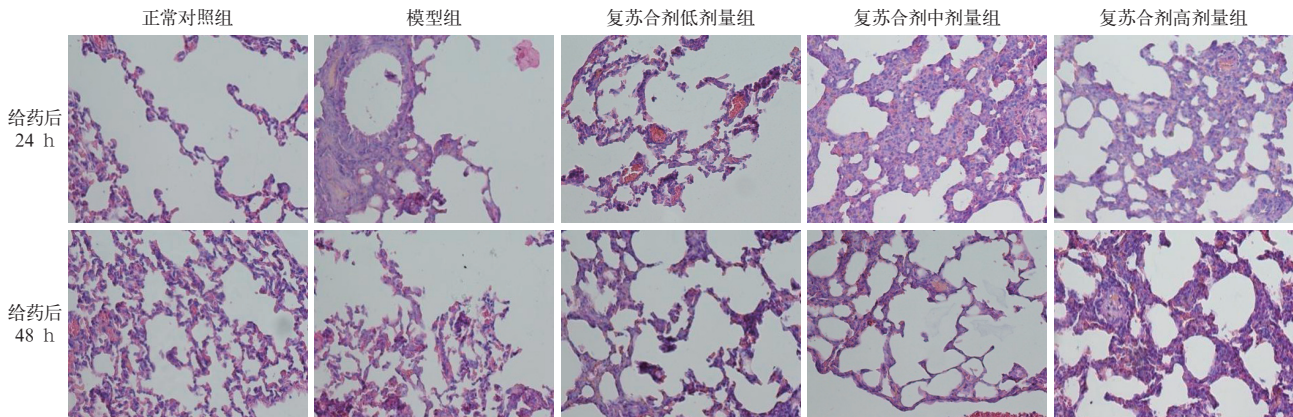


图 1 给药后不同时间点各组大鼠肺组织病理学观察(HE 染色 中倍放大)

照组明显升高,复苏合剂各药物组大鼠均较模型组明显降低,且以高剂量组大鼠的降低程度更显著,但中、高剂量组间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间点肺损伤评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺损伤评分(分)	
		给药后 24 h	给药后 48 h
正常对照组	8	2.89 ± 4.23	3.00 ± 0.28
模型组	8	7.83 ± 0.60 ^a	7.33 ± 0.88 ^a
复苏合剂低剂量组	8	6.00 ± 0.44 ^b	5.25 ± 0.25 ^b
复苏合剂中剂量组	8	4.63 ± 0.50 ^b	3.50 ± 0.50 ^{bc}
复苏合剂高剂量组	8	3.37 ± 0.32 ^{bc}	3.25 ± 0.25 ^{bc}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与复苏合剂低剂量组,^c $P < 0.05$

3 讨论

脓毒症是宿主对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能不全,相当于感染 + 序贯器官衰竭评分(SOFA) > 2 分,是临床危重病患者死亡的重要原因之一。由于肺循环具有压力和阻力均较低的特点,在脓毒性休克的发病过程中,肺较其他器官更容易受到损伤,且 ARDS 出现早,发生率高,呈现出逐渐增加的趋势^[8]。发生脓毒症相关性 ARDS 时,由于肺内以炎症细胞(中性粒细胞、巨噬细胞)浸润为主导的炎症反应失控,导致肺泡毛细血管膜损伤和通透性增加,继而引起肺泡渗出液中富含蛋白质的肺水肿及透明膜形成,并伴有肺间质纤维化。输血相关性肺损伤的病理机制也表现为炎症细胞侵入导致的肺泡塌陷^[9]。治疗脓毒症相关性 ARDS 的关键在于修复已经损伤的肺泡毛细血管膜,以及降低其通透性。但到目前为止,还没有找到疗效比较确切的药物。在临床工作中,结合 ARDS 的病理改变,运用中医药辨证论治的方法,不断摸索、总结发现,采用中西医结合方法治疗脓毒症相关性 ARDS 可以

取得较好的疗效^[10]。本课题组通过长期反复筛选、总结而制成的复苏合剂能明显改善患者肺水相关指数^[11-12]。

本研究选择具有温肾潜阳的复苏合剂治疗脓毒症相关性 ARDS 大鼠,结果显示,复苏合剂能明显提高脓毒症相关性 ARDS 大鼠的存活率,尤其是中、高剂量复苏合剂疗效更显著。病理学观察显示中、高剂量复苏合剂均能明显改善 ARDS 大鼠肺组织的病理学改变,而且给药后 24 h 即效果显著,复苏合剂低剂量组给药后 48 h 有明显疗效,而复苏合剂高剂量组效果较中、低剂量组明显。以上结果均显示复苏合剂对脓毒症相关性 ARDS 有明确疗效,且给药后 24 h 就可产生效果,给药 48 h 后效果更好,复苏合剂起效时间早,且随着用药次数增加效果更佳。而复苏合剂中、高剂量组的效果较低剂量组更好,说明随着剂量的增加效果更明显。本研究结果与临床经验相吻合。

传统中医学认为,脓毒性休克属于“厥脱症”的范畴,为阳气欲绝之症,临床治疗以温阳益气为大法,但疗效欠佳。临床上脓毒性休克患者均会出现不同程度水肿,故认为其属于中医学水饮病的范畴,其发病机制认为是各种阴邪直接损耗阳气(阴邪直中),或温邪耗伤阴精,阴损及阳,导致全身阳气虚衰,特别是心、肺、脾、肾阳气虚衰,失于温化、固摄作用,水溢脉外积聚而成水肿,甚者阳气欲绝、肢体逆冷。肾为全身阳气之本,单纯温阳益气不易起效,而应“温之”“潜之”,“雷龙之火才能安于龙窟”,全身阳气才能得以补充,阳气的温化和固摄才能得以实施,水液才能归于常道,而休克也才能得以纠正。

中医学认为脓毒症相关性 ARDS 的发病机制为邪气耗伤肺肾之气,使肺失肃降、肾不纳气而容易出现死亡,结合 ARDS 的基本病理生理改变为肺泡

上皮细胞和肺毛细血管内皮通透性增加所致的肺水肿,故认为各种因素所致患者阳气不足、津液失化,以及阳气固摄不足,津溢脉外,最终导致水湿积聚肺脏而发为肺水肿。治法当应温肾潜阳、纳气平喘、通调水道。故以潜阳丹为基础加减而成复苏合剂,方中以附子、生牡蛎温肾潜阳,干姜温中,助附子温肾阳;肺为水之上源,以麻黄开宣肺气,通调水道,以助水液归于常道;炙甘草调和诸药,共奏温肾潜阳、纳气平喘、通调水道之功效。故复苏合剂通过温肾潜阳,补心、肺、脾、肾虚衰,调节三焦水道,温化、固摄水液,从而消除肺泡、肺间质水肿,改善大鼠肺组织的炎症、渗出、出血、断裂等,最终提高大鼠存活率。

综上所述,以温肾潜阳法组方的中药复苏合剂能改善脓毒症相关性 ARDS 大鼠的肺组织肺损伤,促进已损伤的肺组织恢复,最终改善 ARDS 大鼠预后,但其具体机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Sarnaik AP, Lih-Lai M. Adult respiratory distress syndrome in children [J]. *Pediatr Clin North Am*, 1994, 41 (2): 337-363.
- [2] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition [J]. *JAMA*, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [3] 乔良,刘志.按柏林新标准分析急诊脓毒症患者发生急性呼吸窘迫综合征的危险因素[J].*中华危重病急救医学*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
Qiao L, Liu Z. Analysis of the risk factors of acute respiratory distress syndrome of Berlin new definition in patients with sepsis in emergency department [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (7): 558-562. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.07.004.
- [4] 葛庆岗,姚智渊,王铁华,等.急性呼吸窘迫综合征发生及预后危险因素的多中心前瞻性队列研究[J].*中华危重病急救医学*, 2014, 26 (11): 773-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.002.
Ge QG, Yao ZY, Wang TH, et al. Risk factors of the occurrence and death of acute respiratory distress syndrome: a prospective multicenter cohort study [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (11): 773-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.002.
- [5] 李亚莉,李志军,王东强,等.毛细血管渗漏综合征的治疗进展[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (1): 77-78. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.01.025.
Li YL, Li ZJ, Wang DQ, et al. Progress in treatment of capillary leak syndrome [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2014, 21 (1): 77-78. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.01.025.
- [6] 刘大为.机械通气与急性呼吸窘迫综合征[J].*中华危重病急救医学*, 2010, 22 (3): 129-130. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.03.001.
Liu DW. Mechanical ventilation and acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2010, 22 (3): 129-130. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.03.001.
- [7] 王小红,董晨明,张红松.毛细血管渗漏综合征的研究进展[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2012, 19 (2): 123-125. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2012.02.025.
Wang XH, Dong CM, Zhang HS. Research progress of capillary leak syndrome [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2012, 19 (2): 123-125. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2012.02.025.
- [8] Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, et al. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock [J]. *Crit Care Med*, 1998, 26 (12): 2005-2009.
- [9] 龚艳杰,魏明,涂玲,等.输血相关急性肺损伤对大鼠血浆和肺组织血管生成素-2表达的影响[J].*实用检验医师杂志*, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
Gong YJ, Wei M, Tu L, et al. Expression of angiopoietin-2 in plasma and lung tissue of rats with transfusion-related acute lung injury [J]. *Chin J Clin Pathol*, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
- [10] 高培阳,王春霞,郑翔鸿.中西医结合治疗急性呼吸窘迫综合征疗效评价[J].*中国中医药信息杂志*, 2010, 17 (9): 73. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2010.09.036.
Gao PY, Wang CX, Zheng XH. Evaluation of therapeutic effect of integrated traditional Chinese and western medicine on acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J Inf TCM*, 2010, 17 (9): 73. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2010.09.036.
- [11] 王春霞,高培阳,谢莹,等.中药加味潜阳丹对感染性休克早期液体复苏时血管外肺水及相关因素的影响[J].*中国中西医结合杂志*, 2011, 31 (2): 200-203.
Wang CX, Gao PY, Xie Q, et al. Effect of modified Qianyang pellet on extravascular lung water and its correlated factors at the early fluid resuscitation stage of septic shock [J]. *CJITWM*, 2011, 31 (2): 200-203.
- [12] 高培阳,王春霞,郑翔鸿.复苏合剂对感染性休克血流动力学影响的研究[J].*中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (6): 337-339. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.06.006.
Gao PY, Wang CX, Zheng XH. A study on effect of resuscitation mixture on haemodynamics in patients with septic shock [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2010, 17 (6): 337-339. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.06.006.

(收稿日期:2017-06-13)