

• 论著 •

痰热清注射液对内毒素所致全身炎症反应综合征
大鼠核转录因子- κ B 的调控作用刘德红¹, 邓 哲¹, 潘文群², 郑晓英¹, 周泽强¹, 赵中江¹

(1. 深圳市第二人民医院急诊科, 广东 深圳 518035; 2. 深圳市友谊医院检验科, 广东 深圳 518029)

【摘要】 目的 观察痰热清注射液对内毒素致全身炎症反应综合征(SIRS)大鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)的调控作用。方法 将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、SIRS 组和痰热清组, 每组 20 只。腹腔注射内毒素复制 SIRS 大鼠模型。建模成功后 2 h, 痰热清组腹腔注射痰热清注射液 4.5 ml/kg。各组于实验后 6 h 开胸取心脏血, 用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 NF- κ B 活性以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达。结果 与正常对照组[(31.06±16.34)、(76.26±16.88)、(45.37±9.64)ng/L]比较, SIRS 组大鼠 NF- κ B 活性[(87.52±36.72)ng/L]以及 TNF- α [(321.52±56.74)ng/L]和 IL-1 β [(136.76±19.68)ng/L]表达明显升高(P 均<0.01);与 SIRS 组比较, 痰热清组大鼠 NF- κ B 活性[(49.51±20.51)ng/L]以及 TNF- α [(183.46±30.64)ng/L]和 IL-1 β [(90.62±16.29)ng/L]表达明显降低(P 均<0.01)。SIRS 组大鼠 NF- κ B 活性与 TNF- α 和 IL-1 β 表达均呈明显正相关($r_1=0.67$, $r_2=0.43$, P 均<0.01)。结论 痰热清注射液可明显抑制 SIRS 大鼠的炎症反应, 其作用机制可能是抑制 NF- κ B 的活化。

【关键词】 痰热清注射液; 内毒素; 全身炎症反应综合征; 核转录因子- κ B; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素
中图分类号: R285.5; R364.5 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.02.007

Effect of Tanreqing injection (痰热清注射液) on activation of nuclear factor- κ B of rats with systemic inflammatory response syndrome induced by endotoxin LIU De-hong*, DENG Zhe, PAN Wen-qun, ZHENG Xiao-ying, ZHOU Ze-qiang, ZHAO Zhong-jiang. * Emergency Department, Shenzhen Second People Hospital, Shenzhen 518035, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To explore the effects of Tanreqing (TRQ) injection (痰热清注射液) on the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) of rats with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) induced by endotoxin. Methods Sixty Wistar rats were distributed into three groups randomly: normal control group, SIRS group and TRQ group treated by TRQ injection (each group, $n=20$). The animal model of SIRS was established by intraperitoneal injection of endotoxin. After successful establishment of the model for 2 hours, TRQ (4.5 ml/kg) was injected intraperitoneally in TRQ group. At 6 hours in the course of the experiment, thoracotomy was performed and blood samples were extracted from the heart; NF- κ B activity, the expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in all groups. Results Compared with the normal control group [(31.06±16.34) ng/L, (76.26±16.88) ng/L, (45.37±9.64) ng/L], the activity of NF- κ B [(87.52±36.72) ng/L] and the expressions of TNF- α [(321.52±56.74) ng/L] and IL-1 β [(136.76±19.68) ng/L] in the SIRS group were increased significantly (all $P<0.01$). Compared with the SIRS group, the activity of NF- κ B [(49.51±20.51) ng/L] and the expressions of TNF- α [(183.46±30.64) ng/L] and IL-1 β [(90.62±16.29) ng/L] in the TRQ group were decreased obviously (all $P<0.01$). In the SIRS group, there were significant positive correlations between the activity of NF- κ B and the expressions of TNF- α and IL-1 β , respectively ($r_1=0.67$, $r_2=0.43$, both $P<0.01$). Conclusion TRQ injection may significantly alleviate the inflammatory reaction of SIRS, and its mechanism is possibly related to the inhibition of NF- κ B activation.

【Key words】 Tanreqing injection; endotoxin; systemic inflammatory response syndrome; nuclear factor- κ B; tumor necrosis factor; interleukin

目前针对全身炎症反应综合征(SIRS)的抗细

基金项目: 广东省深圳市科技项目(2005035)

作者简介: 刘德红(1973-), 男(汉族), 湖北省人, 医学硕士, 主治医师, 发表论文 10 篇, Email: dhlh@126.com.

胞因子治疗, 虽然相关的动物实验及临床前期研究提示了潜在的临床应用价值^[1-2], 但在随后的临床试验中并没有得到预期中的成功, 不能有效降低患者病死率^[3]。在多器官功能障碍综合征(MODS)的防

治研究中,运用中医药理论及方法可能具有其独特的功效^[4]。本课题组拟研究痰热清注射液对 SIRS 大鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)活性以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达的影响,探讨痰热清注射液的免疫调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制备:雄性 Wistar 大鼠 60 只(由南方医科大学实验动物中心提供),体重 220~250 g,按随机数字表法分成正常对照组、SIRS 组、痰热清组,每组 20 只。用戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠。SIRS 组和痰热清组动物参照文献^[5]方法腹腔注射大肠杆菌内毒素(E. Coli O55B5,购自美国 Sigma 公司)20 mg/kg 制备 SIRS 动物模型。待模型复制成功后 2 h,痰热清组大鼠腹腔注射 4.5 ml/kg 痰热清注射液(由上海凯宝药业有限公司提供),SIRS 组给予等量无菌生理盐水。各组于实验 6 h 开胸取心脏血 1 ml,按文献^[6]所述方法分离血清和外周血单个核细胞,于-80℃冻存备检。

1.2 检测指标及方法:参照 Schrum 等^[7]方法提取外周血单个核细胞的总蛋白;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测外周血单个核细胞 NF- κ B 活性及血清 TNF- α 和 IL-1 β 的表达,试剂盒购于深圳晶美生物工程有限公司,操作方法按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理:所得数据以均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 11.5 软件处理,多组均数比较用方差分析,NF- κ B 活性与 TNF- α 及 IL-1 β 表达相关性用 Pearson 相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 NF- κ B 活性及 TNF- α 、IL-1 β 表达比较(表 1);SIRS 组 NF- κ B 活性及 TNF- α 和 IL-1 β 表达明显高于正常对照组(P 均 <0.01);痰热清组中 NF- κ B 活性及 TNF- α 和 IL-1 β 表达均明显低于 SIRS 组(P 均 <0.01)。

表 1 痰热清注射液对 SIRS 大鼠 NF- κ B 活性及 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	NF- κ B(ng/L)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)
正常对照组	20	31.06 $\pm$ 16.34	76.26 $\pm$ 16.88	45.37 $\pm$ 9.64
SIRS 组	20	87.52 $\pm$ 36.72 ^a	321.52 $\pm$ 56.74 ^a	136.76 $\pm$ 19.68 ^a
痰热清组	20	49.51 $\pm$ 20.51 ^b	183.46 $\pm$ 30.64 ^b	90.62 $\pm$ 16.29 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与 SIRS 组比较,^b $P<0.01$

2.2 NF- κ B 与 TNF- α 、IL-1 β 的相关性:SIRS 组大鼠 NF- κ B 活性与 TNF- α 和 IL-1 β 均呈明显正相关($r_1=0.67, r_2=0.43, P$ 均 <0.01)。

3 讨论

SIRS 是指机体对各种严重刺激或打击包括感染、缺氧、创伤、坏死和再灌注引起的全身失控性炎症免疫反应。SIRS 发生时,启动或活化体内各种炎症细胞、补体系统、凝血和纤溶系统,释放多种炎症介质,在体内相互作用呈失控状态,并逐级放大,加重组织、器官的进一步损害,最终发展至 MODS。

NF- κ B 作为一种机体细胞内普遍存在的核转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点,其不仅参与介导了免疫应答、病毒复制、细胞凋亡和增殖等多种基因的表达调控,而且在调节炎症反应的基因中起关键作用。已证实 NF- κ B 可高效诱导多种细胞因子(如 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、粒-巨噬细胞集落刺激因子)、黏附分子[如细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、内皮细胞黏附分子-1(ECAM-1)]、趋化因子和急性相反应蛋白的基因表达,同时对参与炎症反应放大与延续(即级联瀑布效应)的多种酶基因表达也具有重要的调控作用^[8]。NF- κ B 及其抑制因子 I κ B mRNA 对 MODS 患者预后有判断作用^[9]。NF- κ B 基因剔除(p50^{-/-}或 p65^{-/-})小鼠对细菌、真菌感染及内毒素攻击后炎症反应缺失,特异或非特异免疫应答受抑,表现为 T、B 淋巴细胞对丝裂原的增殖反应显著受抑;B 淋巴细胞产生特异性抗体能力丧失;体内 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症介质水平降低^[10]。Paterson 等^[11]发现 SIRS 患者中性粒细胞、巨噬细胞中 NF- κ B 活化增多,且在死亡前明显增高,增高程度与存活时间呈负相关;同时发现 SIRS 患者外周血 IL-6、IL-8、ICAM-1 的浓度升高。Foulds 等^[12]研究发现,术后发生 MODS 的患者外周血炎症细胞 NF- κ B 水平明显高于未发生 MODS 患者,死亡患者 NF- κ B 水平高于存活患者。这些研究表明,NF- κ B 在 SIRS/MODS 的发生发展中发挥了重要作用。本研究也发现,在 SIRS 时 NF- κ B 活性以及 TNF- α 和 IL-1 β 表达明显高于正常对照组,且 NF- κ B 活性与 TNF- α 和 IL-1 β 表达均呈明显正相关,也说明 NF- κ B 活化导致 TNF- α 和 IL-1 β 表达的升高。

既然炎症介质在 SIRS 的发生发展中起如此重要的作用,那么,从理论上推测,抗细胞因子治疗通过阻断炎症介质作用的各个环节,清除过多的促炎症介质,阻断或干扰机体过度的炎症、凝血反应,可能使人体的促炎机制和抗炎过程、促凝和纤溶过程趋于平衡,从而减弱了机体的损害,有效改善 SIRS 患者的预后^[13]。目前的抗介质治疗研究主要

集中在各种促炎因子的抗体受体、拮抗剂、竞争性受体拮抗剂上,如 TNF 的单克隆抗体、可溶性的 TNF 受体、IL-1 受体拮抗剂(IL-1Ra)、IL-6 单克隆抗体等,尽管有少数观点认为在严格选择病例的前提下,这些针对单一介质的治疗或多或少是有益的,但多数观点认为在这方面的临床试验结果是令人失望的^[14]。所以发现新的抗炎症反应药物和新的抗炎靶点是我们当前治疗 SIRS 的关键和难点。

运用中药制剂对 SIRS 进行免疫干预是一个研究方向。痰热清注射液是由黄芩、熊胆粉、山羊角、金银花、连翘组成的中药制剂。有文献报道,痰热清对感染等所致急性肺损伤、肺炎炎性渗出和微血管损伤的低氧血症等病理状态有明显的改善作用,可减少急性呼吸窘迫综合征(ARDS)等并发症的发生,同时有调节免疫功能的作用,可降低 TNF- α 、IL-8 水平而升高血清 IL-4 水平,减少内毒素的产生和吸收,减轻炎症介质所致的炎症反应,减少 MODS 的发生^[15-16]。临床发现痰热清注射液对脑卒中后并发的肺部感染有明显的疗效^[17]。本研究发现,痰热清注射液对内毒素所致 SIRS 大鼠的 NF- κ B 活性以及 TNF- α 和 IL-1 β 的表达有明显的抑制作用,其作用机制尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] Aiura K, Gelfand JA, Burke JF, et al. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist prevents Staphylococcus epidermidis-induced hypotension and reduces circulating levels of tumor necrosis factor and IL-1 beta in rabbits[J]. Infect Immun, 1993, 61(8): 3342-3350.
- [2] Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, et al. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists[J]. J Immunol, 1993, 151(3): 1548-1561.
- [3] Fry DE. Sepsis syndrome[J]. Am Surg, 2000, 66(2): 126-132.
- [4] 姚咏明, 盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思[J]. 中国危重病

急救医学, 1999, 11(8): 456-458.

- [5] 刘春峰, 李巍, 袁壮, 等. SIRS 大鼠心肌葡萄糖 6-磷酸酶活性的测定和线粒体形态变化[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3): 147-149.
- [6] 刘先胜, 徐水健, 张珍祥, 等. 哮喘患者外周血淋巴细胞蛋白激酶 C 活性变化的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(8): 461-464.
- [7] Schrum LW, Black D, Iimuro Y, et al. c-Jun does not mediate hepatocyte apoptosis following NF-kappaB inhibition and partial hepatectomy[J]. J Surg Res, 2000, 88(2): 142-149.
- [8] Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells[J]. Blood, 2001, 97(1): 46-55.
- [9] 高红梅, 常文秀, 李娜, 等. 核转录因子- κ B 及其抑制因子 mRNA 表达对多器官功能障碍综合征预后判断的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(1): 37-40.
- [10] Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, et al. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappaB leads to multifocal defects in immune responses[J]. Cell, 1995, 80(2): 321-330.
- [11] Paterson RL, Galley HF, Dhillon JK, et al. Increased nuclear factor kappa B activation in critically ill patients who die[J]. Crit Care Med, 2000, 28(4): 1047-1051.
- [12] Foulds S, Galustian C, Mansfield AO, et al. Transcription factor NF-kappaB expression and postsurgical organ dysfunction[J]. Ann Surg, 2001, 233(1): 70-78.
- [13] Minneci P, Deans K, Natanson C, et al. Increasing the efficacy of anti-inflammatory agents used in the treatment of sepsis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2003, 22(1): 1-9.
- [14] Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug[J]. Crit Care Med, 2002, 30(1 Suppl): S58-63.
- [15] 李澎涛. 痰热清注射液抗实验性急性肺损伤的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(1): 22-25.
- [16] 张黎莉, 李晨, 徐晓月, 等. 痰热清胶囊的主要药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(3): 37-40.
- [17] 何华. 痰热清注射液治疗急性脑卒中并发肺部感染临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 158.

(收稿日期: 2008-09-22 修回日期: 2008-11-27)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

关于开展“2009 年中国中西医结合学会科学技术奖”推荐、申报工作的通知

各有关单位: 2009 年中国中西医结合学会科学技术奖推荐、评审和奖励工作的有关事项通知如下:

- 1、各单位及个人向所在省、自治区、直辖市中西医结合学会或中国中西医结合学会各专业委员会申报。各省、自治区、直辖市中西医结合学会及中国中西医结合学会各专业委员会审核汇总, 组织专家初审后按分配数额推荐优秀项目。
- 2、中国科学院院士、中国工程院院士推荐的项目可直接申报我会。
- 3、卫生部、国家中医药管理局及有关部、委、局直属单位推荐的项目可直接申报我会。
- 4、解放军总后卫生部推荐的项目可直接申报我会。
- 5、医学科普作品的推荐名额不占分配数额。医学科普作品应是 2000 年以后(含 2000 年)公开出版发行 2 年以上的作品。
- 6、申报时间及联系人: 2009 年 3 月 20 日—4 月 30 日, 以邮寄日期为准。逾期一律不予受理。详情请登陆中国中西医结合学会网站 www.caim.org.cn。联系人: 施克明、毛平, 联系电话: 010-64025672, 传真: 010-84035154。

(中国中西医结合学会)