

• 基础实验研究 •

肠毒清口服液对全身性炎症反应综合症大鼠脾淋巴细胞增殖活性的影响

刘媛¹, 陈进凡¹, 杨育红¹, 杜玫^{2△}

(1. 甘肃省中医院检验科, 兰州 730050; 2. 甘肃省建筑职工医院检验科 730050)

摘要:目的 探讨中药肠毒清口服液对全身性炎症反应综合症(SIRS)的大鼠抗氧化能力、脾淋巴细胞增殖活性的影响, 从而为中药肠毒清口服液治疗 SIRS 提供实验依据。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组($n=8$)。用腹腔注射酵母多糖悬液造 SIRS 模型, 对照组和实验组分别给予 NS 和不同浓度肠毒清口服液灌胃。末次给药后第 3 天处死, 检测大鼠抗氧化能力、淋巴细胞增殖活性等。结果 治疗组和模型组均出现一般情况的恶化; 各组大鼠 SI、T-AOC、MDA 随着药物浓度的增加逐渐趋于 NS 组, 但是无统计学意义($P>0.05$); 实验组总 SOD 与 GSH-px 明显低于 NS 组($P<0.05$)。结论 高剂量的肠毒清口服液可能通过增强机体免疫, 缓解 SIRS。

关键词:全身炎症反应综合征; 淋巴细胞增殖活性; 大鼠; 肠毒清口服液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)03-0327-02

Effect of Changduqing oral liquid on the proliferation of lymphocytes in modle rats with systemic inflammatory response syndrome

Liu Yuan¹, Chen Jinfan¹, Yang Yuhong¹, Du Mei^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine Hospital of Gansu Province, Lanzhou 730050, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Architecture Staff-Worker Hospital of Gansu Province, Gansu, China)

Abstract: Objective To discuss the effect of Changduqing oral liquid on the anti-oxidative ability and proliferation of lymphocytes in model rats with systemic inflammatory response syndrome(SIRS) to provide experimental evidence for the treatment of SIRS. **Methods** 40 cases of healthy SD rats were randomly divided into five groups (8 cases for each group). Intraperitoneal injection of zymosan was performed to construct the model rats with SIRS. Control group and different experimental groups were treated with NS or different doses of Changduqing oral liquid by gavage. Rats were executed at the 3rd day after the last time for treatment, and anti-oxidative ability and proliferation of lymphocytes were detected. **Results** General condition deterioration could be demonstrated in both therapy group and model group. SI, T-AOC and MDA were increased with the augment of drug concentration, but without significant difference, compared with NS group ($P>0.05$). SOD and GSH-px of rats in experimental group were significantly lower than those of rats in NS group($P<0.05$). **Conclusion** High dose of Changduqing oral liquid could increase the immune function of rats to relief SIRS.

Key words: systemic inflammatory response syndrome; activation, lymphocytes; Sprague-Dawley rats; changduqing oral liquial

近年来,国内外对全身性炎症反应综合症(SIRS)和多器官功能衰竭(MODS)的研究正在深入,从 SIRS 的机制和治疗发展趋势来看,SIRS 的防治并不是仅仅在某个发病机制环节上实行单纯的阻断,而是需要整个免疫调节^[1]。有研究表明大黄、白头翁、厚朴均有抑菌和提高免疫力的作用^[2],丹参可以减轻组织或器官的炎症损伤^[1],笔者精选大黄、白头翁、厚朴、枳实、丹参、水蛭等 6 味药组成的复方制剂,采用现代工艺研制成肠毒清口服液^[2],通过建立 SIRS 动物模型利用六经辨论进行实验研究探讨肠毒清口服液对于 SIRS 的防治作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级 SD 大鼠 40 只,5~7 周龄,体重 160~200 g,雄性,恒温 22℃室内饲养,正常光照时间 8:00~20:00,无饮食饮水限制。

1.2 实验试剂及器材 肠毒清口服液(甘肃省中医院)、酵母多糖、液体石蜡、RPMI-1640 培养液、刀豆蛋白(ConA)、十二烷基硫酸钠(SDS)、MTT(四氮唑蓝)、SOD(超氧化物歧化酶)试剂盒、GSH(谷胱甘肽-过氧化物酶)试剂盒、MDA(丙二醛)试剂盒、T-AOC(总抗氧化能力)试剂盒等、生物安全柜、CO₂ 培养箱、高压灭菌器、干燥箱等。

1.3 动物模型的建立 将酵母多糖和液体石蜡混合,磁力搅拌器搅拌 15 min 混匀制成悬液,100℃水浴 80 min 灭菌,制成浓度为 100 mg/mL 的酵母多糖-石蜡悬液(ZPS),冷却后放入 4℃冰箱备用,临用前 40℃水浴及高频搅拌 15 min 后注药。SD 大鼠实验前 12 开始禁食,但不禁水,实验前 1~2 h 称重并测肛温。SIRS 模型判断标准:注射 ZPS 后较注射前肛温升高或降低 1℃、WBC 增加 1 倍或减少 50%、呼吸频率超过正常值 2 倍或动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)较正常降低 25%、心率较对照值增加 50%^[3]。

1.4 实验分组 将 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 8 只:生理盐水(NS)为正常组[腹腔注射(ip)灭菌 NS+灌胃(ig)0.4 mL NS];模型组(ip 750 mg/kg ZPS+ig 0.4 mL NS);低剂量组(ip 750 mg/kg ZPS+ig 0.4 mL 低剂量肠毒清);中剂量组(ip 750 mg/kg ZPS+ig 0.4 mL 中剂量肠毒清);高剂量组(ip 750 mg/kg ZPS+ig 0.4 mL 高剂量肠毒清),连续 3 d,2 次/天,以上各组末次给药后在常规饲养条件下观察 3 d。

1.5 抗氧化能力检测 SD 大鼠乙醚麻醉,采血,3 000 r/min 离心 15 min 分离血清,-20℃保存待用,血清总 SOD、GSH-px、MDA、T-AOC 按各试剂盒说明操作,紫外分光光度计测吸

△ 通讯作者, E-mail: sjzgyym@163.com。

光度。

1.6 淋巴细胞增殖活性的检测 MTT 法检测脾淋巴细胞增殖情况。末次给药后第 3 天处死大鼠,无菌取脾,常规制成淋巴细胞悬液,用含有小牛血清的 RPMI-1640 调细胞浓度为 $5\times 10^5/\text{mL}$,取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液接种于 96 孔培养板中,实验孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ ConA(终浓度为 5 mg/L),对照孔加 $10\text{ }\mu\text{L}$ RPMI-1640。各组设 3 个复孔,将培养板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中 60 h,培养结束前 4 h 取出加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT,继续培养 4 h 后取出加入含 0.04% HCl 的 SDS $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,次晨于酶标仪 570 nm 处测 OD 值,并计算刺激指数(SI):SI=实验孔 OD/对照孔 OD^[4-7]。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 分析,计量资料用方差分

析或 K-S 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 动物症状、体征 NS 组大鼠 ip 灭菌 NS 后一般状况没有明显的变化,模型组大鼠 ip ZPS 24 h 后出现呼吸加粗、加快、心率加快、肛温明显增加,表示造模成功。48 h 后出现腹部包块、口鼻血性分泌物等。解剖后可见腹腔内不同程度的脏器粘连,肺部充血明显,治疗组情况相似,中剂量和高剂量较轻。

2.2 抗氧化指标 各组大鼠 MDA 和 T-AOC 差异无统计学意义;低剂量组总 SOD 明显低于 NS 组和模型组($P<0.05$);高剂量组 GSH-px 明显低于 NS 组和模型组($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠抗氧化指标 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	MDA(nmol/L)	总 SOD(U/mL)	T-AOC(U/mL)	GSH-px(酶活力单位)
NS 组	8	3.46 ± 1.15	181.46 ± 14.57	7.45 ± 7.15	1297.79 ± 146.54
模型组	6	3.89 ± 1.38	169.70 ± 14.11	5.61 ± 5.00	$1125.58\pm 177.53^*$
低剂量组	6	5.29 ± 2.83	$135.85\pm 24.8^{* \#}$	7.44 ± 3.90	$886.79\pm 119.750^*$
高剂量组	7	3.92 ± 1.18	179.30 ± 14.67	7.35 ± 0.00	$612.36\pm 201.90^{* \#}$

*: $P<0.05$,与 NS 组比较;#: $P<0.05$,与模型组比较。

2.2 淋巴细胞增殖活性 除高剂量组之外其余试验组大鼠 SI 都大于 NS 组,模型组 SI 大于低剂量组和高剂量组,但都没有统计学意义,NS 组 SI 与高剂量组接近,见表 2。

表 2 各组大鼠 SI 计算结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	SI
NS 组	1.07 ± 0.31
模型组	1.45 ± 1.04
低剂量	1.34 ± 0.33
中剂量	1.66 ± 0.86
高剂量	1.06 ± 0.37

3 讨 论

腹膜是人体内面积最大的上皮组织,受到感染或非感染因素刺激时,易于诱发 SIRS。夏肖萍等研究显示注射 750 mg/kg ZPS,能有效诱导大鼠发生 SIRS,且多次试验结果均相似^[8]。因此本次试验用 ip 750 mg/kg ZPS 造模。各试验组大鼠在给药期间表现不同程度的发热、呼吸加粗等症状,随着给药时间的延长,高剂量组大鼠肛温逐渐趋于正常。

总 SOD、GSH-PX 是动物体内主要的抗氧化酶,它们的含量和活性影响机体内的活性氧自由基水平及脂质过氧化终末代谢产物 MDA;T-AOC 是衡量机体总抗氧化能力的指标,它的高低代表机体的总抗氧化能力^[9]。抗氧化的活性越高,说明机体清除氧自由基的能力越强,从而降低了因 SIRS 导致的氧自由基堆积引起的膜脂质的过氧化^[10-12]。试验过程中试验组大鼠注射 ZPS 造模,由于 SIRS 导致动物总 SOD、T-AOC、GSH-px 均低于 NS 组,从而使得脂质过氧化的代谢产物 MDA 在体内堆积,随着给药浓度的增加,机体总 SOD、T-AOC 逐渐趋于正常组,因此高剂量组的 MDA 水平接近 NS 组,提示高剂量的肠毒清口服液可以清除因 SIRS 导致的氧自由基的堆积,防止脂质过氧化,这与大黄等可以清除血浆、肝脏等组织中的

氧自由基等报道一致^[12]。

研究表明 SIRS 的反应需要机体整个免疫系统的调节^[1],而脾脏是人体最大的外周免疫器官,其产生的抗体在机体的防御和免疫应答中具有重要的意义^[13]。淋巴细胞增殖能力的强弱变化可作为判断免疫反应能力的一个重要指标^[14-15],本试验通过用 conA 在体外刺激淋巴细胞增殖活性,观察中药肠毒清口服液对 SIRS 的治疗作用,研究发现试验组的 SI 都大于 NS 组,而治疗组的 SI 均小于模型组,尤其是高剂量组,SI 基本趋于 NS 组的水平,表示通过肠毒清口服液的治疗,大鼠的淋巴细胞增殖活性基本恢复正常,提示中药肠毒清口服液可以通过调节免疫系统缓解 SIRS,这与大黄等可以增强免疫的报道一致^[2]。

综上所述,低剂量和中剂量的肠毒清口服液对 SIRS 基本没有作用,可能是由于药物的浓度较小或者是给药的时间较短所致,高剂量的肠毒清口服液可以调节 SIRS 机体的抗氧化能力,可能通过增加淋巴细胞增殖活性,增强机体免疫,缓解 ZPS 导致的 SIRS,阻止其进一步发展为 MODS,延长给药时间可能会使治疗效果更加明显。

参考文献

[1] 吴冬梅. 中医药防治 SIRS/MODS 研究进展[J]. 中国中医急症, 2008,17(4):526-527.

[2] 陈进凡、吴亮. 中药“肠毒清”对全身炎症反应综合征患儿血清 IL-2、IL-6、TNF 水平的影响[J]. 甘肃中医学院学报,2003,20(4):22-23.

[3] 曾萍,杨镒宇,吴伟康,等. 四逆汤对 SIRS 大鼠的早期干预[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(6):1222-1224.

[4] 赵嘉惠,张华屏,王春芳. MTT 法在检测细胞增殖方面的探讨[J]. 山西医科大学学报,2007,3(12):262-263.

[5] 李艾黎,马冬雪,孟祥晨. 乳杆菌对原代淋巴细胞 Th1/Th2 细胞平衡的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2011,27(4):389-391,394.

导致叶酸等维生素消耗增加,这些因素均可导致重症肝炎患者体内叶酸等维生素水平降低,提示重症肝炎患者体内 Hcy 水平增高很有可能与体内叶酸等维生素含量不足有关。有报道在炎症性肠病患者服用叶酸后,体内 Hcy 水平明显降低。

由于对重型肝炎的具体发病机制了解还远远不够,因此,重症肝炎患者血浆中的 Hcy 增高的原因是有待证明问题之一。中国重症肝炎患者血浆的 Hcy 水平及其影响因素也需要更深入的临床研究和调查^[21]。

参考文献

[1] Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6):1641-1654.

[2] Mato JM, Lu SC. Homocysteine, the bad thiol[J]. *Hepatology*, 2005, 41(7):976-978.

[3] 胡晓颖, 张晓光. 高同型半胱氨酸血症与疾病的关系[J]. *山东医药*, 2010, 50(1):114-115.

[4] 谢婧, 刘增长. 急性冠脉综合征伴高同型半胱氨酸血症患者血清 VEGF 与 MMP-9 水平检测及临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(13):1309-1310.

[5] 耿学川, 杜继臣, 李继荣, 等. 高同型半胱氨酸血症与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 13(8):1043-1045.

[6] Oldenburg B, Van Tuyl BA, van der Griend R, et al. Risk factors for thromboembolic complications in inflammatory bowel disease: the role of hyperhomocysteinaemia[J]. *Dig Dis Sci*, 2005, 50(2):235-240.

[7] Mahmood A, Needham J, Prosser J, et al. Prevalence of hyperhomocysteinaemia, activated protein C resistance and prothrombin gene mutation in inflammatory bowel disease[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 17(5):739-744.

[8] 杨志娜, 田卫东, 宋明辉, 等. 高同型半胱氨酸血症与肾病综合征的关系[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(12):1453-1454.

[9] Ventura P, Rosa MC, Abbati G, et al. Hyperhomocysteinaemia in chronic liver diseases; Role of disease stage, vitamin status and methylenetetrahydrofolate reductase genetics[J]. *Liver Int*, 2005, 25

(1):49-56.

[10] 郭建军. 重症肝炎患者同型半胱氨酸水平观察[J]. *中国误诊学杂志*, 2009, 9(22):5362-5363.

[11] 张洪波. 肝病患者血浆同型半胱氨酸测定的临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(5):623.

[12] 石胜, 陈健勇, 黄华兴, 等. 血浆同型半胱氨酸水平与肝硬化严重程度的相关性分析[J]. *实用医学杂志*, 2004, 20(5):530-531.

[13] 王雪华, 梁伟, 白玉宾, 等. 中西医结合治愈重症乙型肝炎[J]. *中医药学报*, 2011, 39(1):99-101.

[14] 梁建新, 曾文铤, 朱科伦, 等. 68 例慢性重型乙型肝炎患者预后相关因素分析[J]. *广东医学*, 2006, 27(3):386-388.

[15] 阴斌霞, 王香玲, 赵丽华, 等. 重症肝炎患者血清同型半胱氨酸水平的变化[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(23):2182-2182.

[16] Hugel T, Cerny A. Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(6):361-371.

[17] Danese S, Sgambato A, Papa A, et al. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease[J]. *Am J Gastroenterol*, 2005, 100(6):886-895.

[18] Schroeksnadel K, Frick B, Winkler C, et al. Aspirin downregulates homocysteine formation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Scand J Immunol*, 2005, 62(1):155-160.

[19] 杨志娜, 田卫东, 崔征, 等. 血清同型半胱氨酸水平与慢性肾功能不全分期的相关性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(5):605-607.

[20] 肖桂荣, 孙新方, 宋建平, 等. 血浆叶酸、维生素 VB₁₂ 和同型半胱氨酸水平对 Alzheimer 病的影响[J]. *中华老年医学杂志*, 2006, 23(1):43-44.

[21] 阴斌霞, 王香玲, 赵丽华, 等. 重症肝炎患者同型半胱氨酸水平观察[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(6):774-777.

(收稿日期:2011-10-09)

(上接第 328 页)

[6] 刘民, 马华, 李柏青. MTT 法检测小鼠淋巴细胞增殖性反应探讨[J]. *中国实验动物学杂志*, 1999, 9(3):146-147.

[7] 周建军, 韩家炯, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法[J]. *中国医药工业杂志*, 1993, 24(10):455-456.

[8] 夏肖萍, 费春荣, 叶爱青. 葛根素对 SD 大鼠全身炎症反应综合征的治疗作用及其机制研究[J]. *浙江检验医学*, 2008, 2(6):24.

[9] 张艳艳, 李福昌. 日粮不同硒水平对 2~3 月龄肉兔生长性能、抗氧化指标和肉质的影响[J]. *动物营养学报*, 2010, 22(1):82-87.

[10] 李忠浩, 孔丽娟, 刘庆华, 等. 不同温湿指数下荷斯坦奶牛外周血抗氧化指标的变化及其与淋巴细胞凋亡的关系[J]. *福建农林大学学报*, 2008, 37(3):280-285.

[11] 王宏伟, 徐燕, 杨铁璇. 久泻灵冲剂对溃疡性结肠炎大鼠 GSH-Px、SOD 及 MDA 影响的实验研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2010,

(3):224-228.

[12] 吴可人. 大黄素对腹腔感染大鼠血浆清蛋白及细胞因子 TNF- α 、IL-6 的影响[D]. 浙江杭州:浙江大学, 2006.

[13] 陈慰峰, 金伯泉. 医学免疫学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:12-20.

[14] 姚伯程, 王怡云, 魏敏, 等. 淋巴细胞分离液对 T 细胞阳性花环或非 T 细胞阳性花环计数结果的影响[J]. *国际检验医学杂志*, 2011(1):1-2.

[15] Kontek R, Matlawska-Wasowska K, Kalinowska-Lis U, et al. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells in vitro[J]. *Acta Pol Pharm*, 2011, 68(1):127-136.

(收稿日期:2011-10-09)