

大承气汤对内毒素引致肺损伤保护作用 作用的实验研究

田在善 沈长虹 李东华 李继坤 吴咸中
(天津市中西医结合急腹症研究所 300100)

摘要 体外实验表明,去芒硝大承气汤具有抑制内毒素对肺泡巨噬细胞过度诱生 TNF、IL-1、IL-6 的作用;以大承气汤(DT)经口投予肠源性内毒素血症大鼠,其肺灌洗液中总磷脂、白蛋白水平、表面张力值、肺泡单核/巨噬细胞 NBT 吞噬百分率、肺组织 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值均较模型组明显不同,而呈显著的保护效应。

关键词 大承气汤 肠源性内毒素血症 细胞因子 支气管-肺泡灌洗液

Protective Effect of Dachengqi Decoction on Lung Injury Induced by LPS in Rats

Tian Zaishan, Shen Changhong, Li Donghua, Li Jikun, Wu Xianzhong
(Tianjin Institute of Integration of Traditional and
Western Medicine in Acute Abdominal Diseases, 300100)

Abstract: Experimental results showed that Dachengqi Decoction (DT) without Mirabilite could inhibit the excessive inducing effect of LPS on TNF, IL-1, IL-6 of pulmonary macrophage in vitro. When DT was administered orally to rats with enterogenous endotoxemia(EETM), the total phospholipid level, albumin level, surface tension value of BALF, the phagocytosis percentage to NBT by pulmonary alveolar monocyte/macrophage and the ratio of 6-Keto-PGF_{1α}/TXB₂ in lung tissue were all improved as compared with the model group, indicating that DT has protective effect against EETM.

Key words: Dachengqi Decoction, enterogenous endotoxemia, cytokine, bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

前文已报告大承气汤(DT)对肠源性内毒素血症(EETM)大鼠出现的心、肝、肾生化功能的损害具有保护效应。《伤寒论》也曾叙及到“喘冒不能卧者,有燥屎也,宜大承气汤”,指出了 DT 对这一病理过程的治疗意义。作者等实验研究曾证实,次碳酸铋便秘模型大鼠可出现肺的损害,而加用 DT 则呈保护效应^[1]。临床上以 DT 治疗严重创伤呼吸窘迫综合征(RDS)证实有效^[2]。为此,本文目的旨在以 EETM 大鼠模型和肺泡巨噬细胞(PAM)体外实验方法观察 DT 对 EETM 时肺损伤的保护功效。

1 材料

1.1 药物 大承气汤,药味组成、煎煮方法、生药鉴定、购自单位同前报^[3];去芒硝大承气汤(供体外测细胞因子实验用),惟方剂中去芒硝,水煎醇沉法制得 100%水溶液,临用前经孔径 0.45μm 微孔滤膜滤过后应用。

1.2 试剂 造模用试剂同前报。氯化硝基四氮唑蓝,上海前进试剂厂;前列腺素系列放射免疫分析试剂药盒,中国人民解放军总医院兴华生物新技术开发中心;TNF_α 高度敏感的瘤细胞株 WeHi164.13;IL-6 依赖的 T 细

胞株 KD₈₃;IL-1 依赖的细胞株 LRBM₃₃-IA₅; 细胞因子标准品:人重组白细胞介素-1 (hrIL-1, 100U/ml)、人重组白细胞介素-6 (hrIL-6, 1000U/ml); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Sigma, 20395); 无酚红 DMEM 培养基; 10%NCS-RPMI1640 培养基; 盐酸异丙醇混合液(浓 HCl: 异丙醇 1: 300v/v)等。

1.3 仪器 JZHY-180 表面张力仪; CO₂ 孵箱; 倒置显微镜; 超净工作台; 酶标仪等。

1.4 动物 Wistar 大鼠体重 120±5g, 雌雄兼用, 购自国家医药管理局天津药物研究院动物房。

2 方法

2.1 体外实验 正常大鼠乌拉坦麻醉后, 背位固定, 腹主动脉放血致死, 70%酒精全身消毒, 移入超净台, 在无菌条件下以灭菌生理盐水行支气管-肺泡灌洗 (bronchoalveolar lavage BAL), 5ml × 3 次, 汇集 BAL 液, 1700r/min 离心 7min, 弃上清, 用 Hank's 缓冲液洗细胞一次, 加入适量的 10%MCS-RP-MI1640 培养基, 调整细胞数至 1 × 10⁶/2ml, 然后加入 24 孔板中。每孔 2ml, 置 CO₂ 孵箱中培养过夜, 翌日弃去非贴壁细胞, 做 TNF_α, IL-1, IL-6 检测^[1]。设 4 组: 10%NCS-RP-MI1640 对照组; LPS (内毒素脂多糖) 组; LPS + 去芒硝 DT 组 (C); LPS 与去芒硝 DT 预先共孵 (37 C, 20min) 组 (D)。加用的 LPS 浓度为 1mg/ml, 加用的去芒硝 DT 浓度为 100%, 培养液为 10%NCS-RPMI1640。每孔总容量为 2ml, LPS 的终浓度为 10μg/ml, 去芒硝 DT 终浓度分别为 1%, 0.5%, 0.25%。LPS 刺激时间为 72h。每组设 3 孔。

2.2 按前文方法造模、给药、设组。于造模后 3h 及 24h, 行 BAL, 每次 5ml 共 3 次, 汇集 BAL 液, 离心, 上清液做如下测定: 用表面张力仪做表面张力测定; 经消化后加磷显色剂, 以卵磷脂为标准品做磷脂含量测定; 用溴甲

酚绿法进行白蛋白含量测定。离心后试管底层细胞团块做 NBT 吞噬百分率测定。

2.3 同上造模、给药、设组。于造模 3h 后, 同上麻醉、放血, 随即剪取一块肺组织, 冻存, 使用前列腺素系列放射免疫分析试剂盒进行 6-Keto-PGF_{1α} 和 TXB₂ 测定。

统计学处理: 2.1 实验结果采用 F 检验; 2.2、2.3 实验结果采用 t 检验。

3 结果

3.1 内毒素对大鼠 PAM 诱生细胞因子及 DT 对其影响的体外实验 结果见表 1。体外 PAM 受到 LPS 刺激后可引发 TNF, IL-1, IL-6 细胞因子的过度分泌, 而当按终浓度为 1%, 0.5% 加入去芒硝 DT 时, 则 LPS 对上述细胞因子的诱生呈全面的减弱效应; 如预先将 LPS 与去芒硝 DT 共孵后再加至 PAM 培养基时减弱效应更强。

表 1 内毒素对大鼠肺泡巨噬细胞诱生细胞因子及去芒硝大承气汤的抑制效应 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF _α (%)	IL-1(U/ml)	IL-6(U/ml)
对照组	0.3 ± 0.4	5.3 ± 2.5	15.0 ± 2.6
LPS 组	43.8 ± 1.7*	71.0 ± 2.6*	101.3 ± 12.5*
Ca 组	37.7 ± 0.4 [△]	19.0 ± 3.0 [△]	11.6 ± 3.1 [△]
Cb 组	38.5 ± 0.7 [△]	39.6 ± 7.5 [△]	14.6 ± 0.6 [△]
Cc 组	45.1 ± 0.9	70.6 ± 1.5	98.0 ± 6.1
Da 组	28.4 ± 2.3 ^{△#}	14.6 ± 2.5 [△]	
Db 组	32.2 ± 1.4 ^{△#}	21.6 ± 3.1 ^{△#}	
Dc 组	33.7 ± 0.9 ^{△#}	25.3 ± 4.5 ^{△#}	

C 组为 LPS + 去芒硝 DT; D 组为预先共孵的 LPS + 去芒硝 DT。a, b, c 表示去芒硝 DT 的浓度分别为 1%, 0.5%, 0.25% 与对照组比较 * P < 0.01; 与 LPS 组比较 [△]P < 0.01; 相应浓度的 C, D 组间比较 # P < 0.01

3.2 对 EETM 模型大鼠 BAL 实验

3.2.1 DT 对 EETM 模型大鼠 BAL 液表面张力值、白蛋白和磷脂水平的影响结果见表 2, 3。

表明造模大鼠 BAL 液的磷脂含量较正常对照组明显减少, 表面张力值及白蛋白水平则较正常对照组升高, 而 DT 治疗组对上述诸指标的异常改变均呈明显的保护作用。

(见表 2,3)

表 2 大承气汤对造模 3 小时大鼠 BAL 液表面张力值、白蛋白和总磷脂水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	表面张力 (dyn/cm)	白蛋白 ($\mu\text{g/ml}$)	总磷脂 ($\mu\text{g/ml}$)
正常组(N)	53.9±5.4	26.8±6.7	8.3±2.4
模型组(M)	58.3±2.1*	123.6±47.5***	4.4±1.0***
DT 治疗组(D)	53.5±3.5^^	57.9±22.9^^^	7.8±1.9^^^
M/N 比较	* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001;		
D/M 比较	△P<0.05, △△P<0.01, △△△P<0.001;		
n=10 (下表均同)			

表 3 大承气汤对造模 24 小时大鼠 BAL 液表面张力值、白蛋白和总磷脂水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	表面张力 (dyn/cm)	白蛋白 ($\mu\text{g/ml}$)	总磷脂 ($\mu\text{g/ml}$)
正常组(N)	53.9±5.4	26.8±6.7	8.23±2.4
模型组(M)	60.5±3.1**	36.8±8.4***	3.5±1.0***
DT 治疗组(D)	55.8±3.5△△	27.4±7.1△	5.8±2.4△

3.2.2 DT 对 EETM 模型大鼠肺泡单核/巨噬细胞 NBT 吞噬百分率的影响 造模 3h 和 24h, 模型组大鼠肺泡单核/巨噬细胞对

表 5 大承气汤对模型(3h)大鼠肺组织 6-keto-PGF_{1α}、TXB₂ 水平及二者比值的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	TXB ₂ (pg/mg)	6-keto-PGF _{1α} (pg/mg)	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
正常组(N)	634±225	813±177	1.34±0.27
模型组(M)	1100±757	867±300	0.91±0.33**
DT 治疗组(D)	506±205△	711±121	1.60±0.67△△

4 讨论

在内毒素引发多脏衰(MSOF)病理过程中,肺常是最先被致损的器官之一。如给大鼠静注 LPS 可直接引发肺损伤^[5]。正常犬滴注 TNF_α 后,肺功能明显减退,病理上出现成人呼吸窘迫综合征(ARDS)样的肺损伤改变;脓毒症患者血浆 TNF_α 水平增高,且其增高与 ARDS 的发病有关^[6]。我们的实验结果表明,体外培养的 PAM 在受到 LPS 刺激后,其诱生 TNF_α、IL-1、IL-6 等细胞因子的能力被极大地增强,当同时加入去芒硝 DT 时,则明显降低其过度诱生的作用。肺表面活性物

NBT 的吞噬百分率较正常对照组明显增高,DT 治疗可抑制其增高变化,间接提示这与造模大鼠肺泡单核/巨噬细胞由于内毒素的刺激过量产生超氧化阴离子 O₂⁻ 有关,而 DT 治疗则有阻遏 O₂⁻ 过量产生的作用。(见表 4)

表 4 大承气汤对模型大鼠肺泡单核/巨噬细胞 NBT 吞噬百分率的影响($\bar{x}\pm s$)

组 别	NBT 吞噬百分率	
	3 小时	24 小时
正常组(N)	12.5±2.0	12.51±2.04
模型组(M)	21.5±3.0***	21.47±3.11***
DT 治疗组(D)	14.6±1.8△△△	14.1±2.8△△△

3.3 DT 对 EETM 模型大鼠肺组织 6-keto-PGF_{1α}、TXB₂ 水平及二者比值的影响 造模 3h 后,模型组大鼠肺组织 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值较正常对照组明显降低,而 DT 治疗组则明显纠正了肺组织上述比值的改变。(见表 5)

质(PS)是肺内特有的生理性抗损伤因子^[7],其主要成分是磷脂,约占 PS 的 80~90%。增加肺泡液层中 PS 水平和降低表面张力是避免肺不张、维持肺泡正常功能的重要条件,也是预防 ARDS 发生的物质基础^[8]。超氧自由基在致肺损伤中起重要作用。Gerberick et al^[9] 对大鼠 PAM 培养证实, O₂⁻ 的产量与 NBT 还原之间呈密切的平行关系,因二者发生机制一致,故抑制 PAM 对 NBT 的吞噬百分率,证示 O₂⁻ 的生成量减少。LPS 的许多有害作用还通过局部和全身的花生四烯酸(AA)的环加氧酶途径而产生。肺的血管总

面积很大,PGI₂是血管组织AA的主要代谢产物;肺实质组织则是TXA₂的丰富来源。正常时肺组织占优势的是PGI₂,因此纠正二者生成量的紊乱、增大PGI₂/TXA₂的比值,反映了肺组织损害的减轻^[10]。基于上述大承气汤对肠道LPS移位致损肺脏的保护效应,结

参考文献

- [1]田在善,沈长虹,李东华等. 天津中医 1992; (4): 19
- [2]刘福成,薛芳,崔志永等. 河北中医 1994; 16 (5): 2
- [3]田在善,沈长虹,李东华等. 中国中药杂志 1993; 18(3): 170
- [4]李会强,姚智,赵瑾莹等. 天津第二医学院学报 1993; 9(3): 4
- [5]孙耕耘,毛宝龄,吕宝璋. 中国病理生理杂志 1993; 9(5): 622

合临床上采用大承气汤治疗ARDS的良好疗效^[2],我们认为古代医家很可能是基于阳明病时,通过泻下可迅速消除喘满证候,而喘满证的消除成为确立“肺合大肠”理论的最直接依据。为此我们认为移位的肠道内毒素很可能是“肺”与“大肠”相表里的介导体。

- [6]孙耕耘摘. 《国外医学》呼吸系统分册 1992; 12 (2): 107
- [7]罗自强,孙秀泓. 生理科学进展 1995; 26(2): 166
- [8]丁自强. 生理科学进展 1992; 23(2): 141
- [9]Gerberick GF, Jaffe HA, Willoughby JB. et al. J Immunol. 1986; 137(1): 114
- [10]王兴鹏,徐家裕,袁耀宗. 中国结核和呼吸杂志 1994; 17(1): 60

(收稿:1996-05-07)