

凉血活血方对腹腔感染脓毒症大鼠 肠组织纤溶及胶原代谢的影响

鹿燕敏,李东华,王蓓,杨秀竹,薛小平,刘洪斌*

(天津市中西医结合急腹症研究所,天津医科大学南开临床学院,天津 300100)

[摘要] 目的:研究凉血活血方对腹腔感染脓毒症大鼠肠组织纤溶及胶原代谢的影响,探讨其作用机制。方法:Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,随机分为假手术组、模型组、凉血活血方治疗组。模型组大鼠以丝线结扎盲肠末端,针头穿孔,挤出少许粪便后关腹,制作腹腔感染脓毒症模型。治疗组于术后开始给予活血凉血方进行 ig 治疗,每日 1 次,连续治疗 72 h,假手术组和模型组给予等体积蒸馏水 ig。统计动物死亡率,ELISA 法测定存活大鼠肠组织的组织纤溶酶原激活物(t-PA),I 型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1),结缔组织生长因子(CTGF),成纤维细胞生长因子-10(FGF-10),I 型胶原,III 型胶原含量或活性。结果:凉血活血方治疗组动物死亡率为 25%,与模型组(65%)比较显著降低($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组 t-PA 水平显著降低($P < 0.01$),而 PAI-1,CTGF,FGF-10,I 型胶原,III 型胶原显著升高($P < 0.01$);与模型组相比,凉血活血方治疗组 t-PA 水平显著回升($P < 0.01$),而 PAI-1,CTGF,FGF-10,I 型胶原,III 型胶原水平显著降低($P < 0.01$)。结论:凉血活血方具有良好的纤溶调节、抗胶原增生作用,对腹腔感染脓毒症具有良好的治疗作用。

[关键词] 凉血活血方;腹腔感染脓毒症;纤溶;胶原代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0200-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1046.011.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:46

Effects of Liangxue Huoxue Formula on Fibrinolytic Function and Collagen Metabolism of Intestinal Tissue in Septic Rats

LU Yan-min, LI Dong-hua, WANG Qian, YANG Xiu-zhu, XUE Xiao-ping, LIU Hong-bin*

(Tianjin Institute of Acute Abdominal Diseases, Nankai Clinical College
of Tianjin Medical University, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** The present work was designed to study the effects of Liangxue Huoxue formula on fibrinolytic function and collagen metabolism of intestinal tissue in septic rats. **Method:** Fifty Wistar rats were divided into control, model and treatment group randomly. Sepsis model was established by cecal ligation and puncture (CLP) in rats. Rats in treatment group were administered orally with Liangxue Huoxue formula liquid extract once daily for 72 hours, while those in control and model group with same amount of distilled water. The survival rate was measured. The concentrations of tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), connective tissue growth factor (CTGF), fibroblast growth factor-10 (FGF-10), type I collagen and type III collagen in intestinal tissue were determined by ELISA method. **Result:** Liangxue Huoxue formula decreased the mortality to 25%, much lower than that in model group ($P < 0.05$). Compared with control group, the t-PA level was decreased ($P < 0.01$) while the expressions of PAI-1, CTGF, FGF-10, type I collagen and type III collagen in intestinal tissue were increased ($P < 0.01$) in model group. Liangxue Huoxue formula increased t-PA level ($P < 0.01$) and reduced the expressions of PAI-1, CTGF, FGF-10, type I collagen and type

[收稿日期] 20120515(002)

[基金项目] 天津市卫生局中医中西医结合基金项目(XK-07090)

[通讯作者] *刘洪斌, Tel:022-27435368, E-mail:jtss@sina.com

III collagen in intestinal tissue significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** The fibrinolytic function and collagen metabolism play an important role in the pathological process of multiple organ dysfunction in sepsis and Liangxue Huoxue formula has therapeutic effect on sepsis model by regulating the fibrinolytic function and collagen metabolism.

[**Key words**] Liangxue Huoxue formula; sepsis; fibrinolytic function; collagen metabolism

脓毒症、感染性休克及多器官功能障碍综合征是临床急症危重病,病死率高,而腹腔感染是引起上述疾病的重要原因。新近研究发现,凝血-纤溶功能异常是腹腔感染脓毒症病理过程中的重要环节^[1-5]。在急性期,生理性抗凝机制的紊乱和纤维蛋白溶解的下调,使血液处于高凝状态,微血栓形成造成微血管栓塞,弥散性血管内凝血,进一步发展可诱发严重脓毒症及脓毒性休克。在恢复期,由于腹腔炎症的后遗效应——胶原合成代谢的亢进以及纤维蛋白溶解的减少又可以导致严重的腹腔粘连,伤口的不良愈合以及继发感染灶的形成。本实验旨在研究凉血活血方对腹腔感染脓毒症大鼠肠组织纤溶及胶原代谢的影响,探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级Wistar大鼠50只,雌雄各半,体重210~230g,由中国药品生物制品检定所动物中心提供,动物合格证号SCXK(京)2005-0004。

1.2 药物 凉血活血方浸膏(由红藤、赤芍、牡丹皮、元胡组成,比例为4:3:3:2)由三九现代中药有限公司提供。流浸膏的制备方法为:取上述处方饮片,加8倍量水,浸润0.5h,加热至沸,保持微沸2h。药汁趁热过滤后,第2次加水6倍量,微沸1h,药汁趁热过滤,合并2次药汁,减压浓缩至相当于“4g生药/g浸膏”的浓度。

1.3 试剂与仪器 大鼠组织纤溶酶原激活物(t-PA),I型纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1),结缔组织生长因子(CTGF),成纤维细胞生长因子-10(FGF-10),I型胶原,III型胶原ELISA检测试剂盒(由美国Usclife公司提供);全蛋白提取试剂盒及蛋白定量检测试剂盒(南京凯基生物技术有限公司);ST-360型酶标仪(上海科华科技公司产品)。

2 方法

2.1 模型制备 实验前12h禁食、不限水,实验时以10%水合氯醛按1mL·kg⁻¹剂量ip进行麻醉,无菌条件下开腹,分离盲肠,在距其末端2cm处以1号丝线结扎,再用18号针头在盲肠末端穿孔2处,并挤出少许粪便,将盲肠放回腹腔后逐层关腹。假手术组于分离盲肠末端时,不进行结扎、穿孔。

2.2 分组与给药 将Wistar大鼠50只,雌雄各半,随机分为假手术组(10只),模型组(20只),凉血活血方治疗组(20只)。凉血活血方治疗组在造模后给予凉血活血方浸膏的蒸馏水稀释药液ig,生药剂量为24g·kg⁻¹,每日1次,给药体积为16mL·kg⁻¹,假手术组和模型组给予等体积蒸馏水ig,连续治疗72h,共给药3次。

2.3 标本取材与处理 治疗72h后,麻醉状态下,开腹手术剪取末段回肠组织,生理盐水充分冲洗清洁,-80℃冻存备用。

2.4 检测指标

2.4.1 死亡率观察 观察动物死亡情况,计算72h死亡率。

2.4.2 末段回肠组织t-PA,PAI-1,CTGF,FGF-10,I/III型胶原检测 取冻存肠组织100mg,加入全蛋白提取裂解液1mL,以组织匀浆器进行匀浆,按说明书提取组织总蛋白。上述指标采用ELISA法检测,按试剂盒说明以酶标仪进行检测,结果以组织的蛋白含量进行校正,组织蛋白含量采用Bradford法进行测定。

2.5 统计学方法 采用SPSS 11.0统计软件对实验数据进行分析,死亡率之间差异采用卡方检验;多组计量资料采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 死亡率 模型组72h动物死亡率为65%,凉血活血方治疗组72h死亡率为25%,较模型组明显降低($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组动物72h死亡率

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	死亡数 /只	存活数 /只	死亡率 /%
假手术	-	10	0	10	0
模型	-	10	13	7	65
凉血活血	24	20	5	15	25 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 各组末段回肠组织t-PA,PAI-1,CTGF,FGF-10,I/III型胶原水平 与假手术组相比,模型组t-PA水平显著降低($P < 0.01$),而PAI-1,CTGF,

表 2 各组动物末段回肠组织 t-PA, PAI-1, CTGF, FGF-10, I/Ⅲ型胶原检测($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	t-PA /U·mg ⁻¹	PAI-1 /U·mg ⁻¹	CTGF /pg·mg ⁻¹	FGF-10 /pg·mg ⁻¹	I 型胶原 /pg·mg ⁻¹	Ⅲ型胶原 /ng·mg ⁻¹
假手术	-	10	0.86 ± 0.15	0.57 ± 0.09	79.7 ± 7.7	13.0 ± 2.1	136.6 ± 24.7	18.3 ± 3.4
模型	-	7	0.31 ± 0.14 ¹⁾	4.26 ± 0.38 ¹⁾	349.7 ± 52.3 ¹⁾	46.2 ± 9.4 ¹⁾	584.5 ± 38.7 ¹⁾	64.1 ± 5.8 ¹⁾
凉血活血	24	15	1.20 ± 0.22 ²⁾	1.73 ± 0.21 ²⁾	102.7 ± 16.5 ²⁾	17.7 ± 2.8 ²⁾	223.7 ± 41.6 ²⁾	27.6 ± 6.1 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.01。

FGF-10, I 型胶原, Ⅲ型胶原水平显著升高 (P < 0.01); 与模型组相比, 凉血活血方治疗组 t-PA 水平显著回升 (P < 0.01), 而 PAI-1, CTGF, FGF-10, I 型胶原, Ⅲ型胶原水平显著降低 (P < 0.01)。见表 2。

4 讨论

纤维蛋白溶解系统是人体最重要的抗凝系统, 对保持血管壁的正常通透性, 维持血液的流动状态和组织修复起着重要作用。主要由四部分组成: 纤溶酶原、纤溶酶原激活物、纤溶酶、纤溶酶原激活抑制物。其中 t-PA 和 PAI-1 是纤溶系统的主要调节因子, t-PA 能选择性地激活纤溶酶原形成纤溶酶, 继而催化纤维蛋白水解。PAI-1 是 t-PA 主要的生理性抑制剂, PAI-1 能快速与 t-PA 结合, 使 t-PA 失活。二者在纤溶系统激活过程中起着相互拮抗的作用^[6]。脓毒症时过度的凝血和纤溶系统的抑制是相伴随的。

研究表明脓毒症早期以炎症因子增高、凝血和纤溶受抑为特征, 恢复期则以胶原合成代谢的亢进以及纤溶的减少为特征^[7]。手术引起腹膜损伤后, 局部出现炎症反应, 腹膜间皮细胞释放出大量的纤维蛋白, 同时, 巨噬细胞释放大成纤维细胞生长因子 (FGF-10)、结缔组织生长因子 (CTGF)、内皮细胞生长因子、转化生长因子、肿瘤坏死因子, 血小板亦向损伤部位聚集并活化, 释放出较多血小板生长因子。这些细胞因子刺激组织中的纤维母细胞转化成纤维细胞, 合成大量胶原纤维, 如 I, Ⅲ型胶原, 导致组织损伤的修复和腹膜粘连的形成。另一方面, 炎性细胞和受伤的间皮细胞产生纤溶酶原激活抑制物, 导致纤维蛋白溶解作用降低, 最终形成永久性纤维粘连和一系列并发症。

大量研究证实了中医药在腹腔感染及腹腔粘连治疗方面的应用价值, 特别是活血化瘀类中药在此类疾病中的应用^[8-11]。中医研究认为血瘀是腹腔感染脓毒症的主要病机之一, 因此活血化瘀是治疗此病的主要方法^[12]。凉血活血方由红藤、赤芍、牡丹皮、元胡组成, 方中红藤具有清热解毒和活血化瘀的

作用, 为治疗肠痈腹痛的要药, 配以牡丹皮、赤芍, 进一步加强了活血化瘀的作用, 佐以元胡可加强活血止痛的作用^[13]。

本研究结果显示, 应用凉血活血方可显著降低动物死亡率; 同时可显著恢复受抑制的 t-PA 水平, 降低 PAI-1 水平, 改善纤溶, 防止微小血栓形成, 改善微循环, 保护脏器功能, 另一方面, 可加速腹腔内及肠组织纤维蛋白分解, 减少腹腔内纤维蛋白沉积, 有利于后期减少粘连的形成; 此外, 凉血活血方还显著减少了肠组织 I、Ⅲ型胶原的分泌及 CTGF, FGF-10 的表达, 推测与抑制成纤维细胞、炎性细胞胶原分泌刺激因子的释放, 从而减少胶原分泌有关。

综上所述, 凉血活血方具有良好的纤溶调节、抗胶原增生作用, 可能是其治疗腹腔感染脓毒症的机制之一。

[参考文献]

[1] Wang L, Bastarache J A, Ware L B. The coagulation cascade in sepsis [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14 (19):1860.

[2] van Veen S Q, Levi M, van Vliet A K, et al. Peritoneal lavage with activated protein C alters compartmentalized coagulation and fibrinolysis and improves survival in polymicrobial peritonitis [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34 (11):2799.

[3] van Veen S Q, Cheung C W, Meijers J C, et al. Anticoagulant and anti-inflammatory effects after peritoneal lavage with antithrombin in experimental polymicrobial peritonitis [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(11):2343.

[4] van Veen S Q, Meijers J C, Levi M, et al. Effects of intra-abdominal administration of recombinant tissue plasminogen activator on coagulation, fibrinolysis and inflammatory responses in experimental polymicrobial peritonitis [J]. *Shock*, 2007, 27(5):534.

[5] Savioli M, Cugno M, Polli F, et al. Tight glycemic control may favor fibrinolysis in patients with sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(2):424.

侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎大鼠组织热休克蛋白 70 mRNA 及 NF- κ B p65 表达的影响

赖象权¹, 何本求^{2*}, 杨斌², 肖成¹, 王子明¹, 朱东东¹, 杨倩²

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:运用荧光实时定量 PCR(real-time PCR)研究侗药五味止泻汤对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织热休克蛋白(HSP70)mRNA 和核因子(NF)- κ B p65 表达的影响,探讨其在发病中作用机制。方法:将 60 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,侗药五味止泻汤低、中、高剂量组(5.5, 11, 22 g·kg⁻¹)和美沙拉嗪(0.5 g·kg⁻¹)组,共 6 组,每组 10 只。采用 2,4,6-三硝基苯磺酸和乙醇灌肠法制备 UC 大鼠模型,观察各组大鼠结肠炎疾病活动指数(DAI),10 d 后取结肠组织评价黏膜损伤程度,采用免疫组化染色(SABC 法)检测结肠组织 NF- κ B p65 表达情况;运用荧光实时定量 PCR(real-time PCR)检测结肠组织中 HSP70 mRNA 的表达变化。结果:侗药五味止泻汤能降低大鼠结肠 DAI 及组织损伤评分($P < 0.01$),提高大鼠 HSP70 mRNA 水平($P < 0.01$),并且降低 NF- κ B p65 的表达($P < 0.01$)。结论:侗药五味止泻汤治疗 UC 的作用机制可能与通过提高保护性蛋白 HSP70 mRNA 水平表达和抑制 NF- κ B p65 的激活有关。

[关键词] 侗药五味止泻汤; 溃疡性结肠炎; HSP70 mRNA; 核因子- κ B p65; 荧光实时定量 PCR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0203-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1222.027.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 12:22

Influences of Dongyao Wuwei Zhixie Decoction on Expression of HSP70 mRNA and NF- κ B p65 in the Ulcerative Colitis Rats

LAI Xiang-quan¹, HE Ben-qiu^{2*}, YANG Bin², XIAO Cheng¹, WANG Zi-ming¹, ZHU Dong-dong¹, YANG Qian²

(1. First Hospital Affiliated to Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550001, China; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

[收稿日期] 20120415(001)

[基金项目] 贵州省中医药管理局课题(QZYY2011-02);贵州省贵阳市科技局项目(筑科合同[2011103]号)

[第一作者] 赖象权,副教授,从事中医药对肛肠疾病的研究与治疗,少数民族医药治疗肛肠疾病的研究, Tel: 13984193998 E-mail: gyxc163@163.com

[通讯作者] * 何本求,研究生, Tel: 18798089227, E-mail: hbq2000@qq.com

- [6] 韩纪举,魏然,陈彬,等. 血液 t-PA 和 PAI-1 水平及活性与血液流变学指标的相关性分析[J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14:160.
- [7] 邢金,于金海. 腹膜粘连的发生及预防[J]. 中国社区医师, 2009, 11(208):51.
- [8] 邝婉容,曾煦欣,杨安平,等. 丹参防治术后粘连的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2009, 18(14): 17.
- [9] 尚晓滨,吴咸中,邱奇. 活血化瘀中药对清解通下中药增效作用的实验研究 III—对粘连相关细胞因子影响的实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(3):250.
- [10] 陈达成,张翼冠,张海港. 三七总皂苷对小鼠术后腹膜粘连的影响[J]. 医药导报, 2008, 27(10):1147.
- [11] 刘清泉,朱雪琦,王蕾. 血必净注射液对脓毒症大鼠存活率和肝肾功能影响的研究[J]. 中国中医急症, 2008, 17(2):203.
- [12] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识[J]. 北京中医, 2007, 26(4):198.
- [13] 刘洪斌,吴咸中,李东华,等. 凉血活血方对脓毒症大鼠白细胞系列黏附分子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1):44.

[责任编辑 聂淑琴]