

## 藏药镰形棘豆水提取物对脓毒症大鼠细胞因子水平的影响

周瀛\*, 李衍飞

(青海大学附属医院肝胆胰外科, 西宁 810001)

**[摘要]** 目的:探讨镰形棘豆水提取物(EOF)对脓毒症大鼠血清细胞因子水平的影响。方法:采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备动物脓毒症模型,将雄性SD大鼠随机分为5组,正常对照组(6只)、假手术组(24只)、模型组(24只)、EOF低、高剂量组(0.5, 2 g·kg<sup>-1</sup>, 24只),于造模后灌服1次。于造模后2, 6, 12, 24 h取大鼠动脉血,采用ELISA测定血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-1(IL-1)水平。结果:相同时间点模型组TNF-α, IL-6, IL-10的水平均高于假手术组( $P < 0.01$ );EOF治疗组与模型组相比(除2 h外),TNF-α, IL-6的水平各时间点降低( $P < 0.05$ ), IL-10的水平升高( $P < 0.05$ );EOF高剂量与EOF低剂量相比(除2 h外),TNF-α, IL-6水平各时间点降低更明显( $P < 0.05$ ), IL-10的水平各时间点升高更明显( $P < 0.05$ )。结论:EOF能下调脓毒症大鼠TNF-α, IL-6的水平,上调IL-10的水平;EOF具有抗炎和免疫调节作用,有进一步开发为临床治疗脓毒症新药的潜在可能性。

**[关键词]** 藏药镰形棘豆水提取物;脓毒症;细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0214-04

## Influence of Water Extract from Tibetan Medicine *Oxytropis Falcata* Bung on Cytokine Expression and Lung Injury in Rats with Sepsis

ZHOU Ying\*, LI Yan-fei

(Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate water extract (EOF) intervention in septic rats, and to explore EOF on serum cytokines in septic rats. **Method:** The male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal control

**[收稿日期]** 2011-03-25

**[通讯作者]** \*周瀛,副教授,从事肝胆胰外科基础疾病研究, Tel:0971-6162564, 13709766677, E-mail: feigefly@yahoo. cn

内接种的人胃癌移植瘤生长的作用较弱。本实验结果表明,乙醇提取物的抗肿瘤作用高于多糖。可见,玉米的抗肿瘤成分除了多糖外,还有其他成分,并且其他成分的抗肿瘤作用可能较多糖更强。本研究还显示,玉米提取物在小鼠肿瘤治疗中无明显毒性,给药后的动物体质量未见降低。故玉米提取物既有抗肿瘤作用,又有毒性低的优点,值得将来进一步开发成为抗肿瘤药物或保健品。

**[致谢]** 龙井民康生物制品厂母海成提供受试物。

### [参考文献]

[1] 玉米的功效与作用: <http://www.3lian.com/zl/2010/07-05/17256.html>

[2] 昌友权,王维佳,杨世杰,等. 玉米须提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 营养学报, 2005, 27(6): 498.

[3] 马虹,高凌. 玉米须提取物ESM对K562和SGC细胞的作用[J]. 南京中医药大学学报, 1998, 14(1): 28.

[4] 吕冬霞,王晓丽,魏凤香,等. 玉米须多糖诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29(4): 28.

[5] Sancéau J, Poupon M F, Delattre O, et al. Strong inhibition of Ewing tumor xenograft growth by combination of human interferon-alpha or interferon-beta with ifosfamid[J]. Oncogene, 2002, 21(50): 7700.

[责任编辑 何伟]

group ( $n=6$ ), sham operation group ( $n=24$ ), model group ( $n=24$ ), EOF low dose ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group ( $n=24$ ) and high dose EOF ( $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) group ( $n=24$ ). Experimental model was established by cecal ligation and puncture (CLP), 2, 6, 12, 24 h after modeling blood was collected and double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 level. **Result:** In the model group TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 were higher than those in the sham group ( $P < 0.01$ ). EOF treatment group showed (except 2 h), TNF- $\alpha$  and IL-6 were decreased ( $P < 0.05$ ), and IL-10 increased ( $P < 0.05$ ). Compared with those in the model group. High dose EOF showed stronger effects, compared with those in the low dose EOF ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** EOF can reduce sepsis TNF- $\alpha$ , IL-6 expression; increase expression of IL-10 in rats with sepsis. EOF has anti-inflammatory and immunomodulatory effects. It might become new drug for clinical treatment of sepsis.

[**Key words**] water extract of tibetan medicine oxytropis falcata bung; sepsis; cytokine

脓毒症(sepsis)是严重创伤、烧伤、休克、大手术和感染后常见并发症,是由于感染而导致的全身性炎症反应综合征(SIRS)的临床表现,其本质为不同感染性因素所致失控性炎症反应<sup>[1]</sup>。细胞因子(cytokine)在脓毒症的发生发展和预后方面发挥着重要作用。其中IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ 尤为重要,它们的水平与脓毒症严重程度和预后有关。

目前尚没有藏药镰形棘豆水提取物(EOF)对脓毒症细胞因子表达影响的实验研究报告,镰形棘豆化学成分及药理作用的研究才刚刚开始,为了更好地开发利用这一丰富的藏药资源,本实验探讨镰形棘豆水提取物对脓毒症大鼠血清中细胞因子表达的影响。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 镰形棘豆药材2009年6月购于青海贵德县,植物原料阴干后,粉碎,过筛,放入密闭玻璃干燥器内保存。镰形棘豆水提取液:镰形棘豆粗粉30 g加入8倍量水浸泡30 min煮,煮沸15 min后过滤。于40~50℃浓缩至含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。给药前将总提取物(低、高剂量分别相当于人用量的5, 20倍)用0.5% CMC-Na溶液研匀,制得混悬液供药理实验使用,给药剂量以含生药量表示<sup>[2]</sup>。细胞因子TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10检测试剂盒购自上海沪尚生物科技有限公司(美国GDB公司原装产品,进口分装)。

**1.2 动物** 6~8周龄雄性SD大鼠由青海省地方病研究所提供(动物合格证号2009-10-144),体重180~220 g。实验前适应性饲养7 d(温度18~22℃,湿度40%~60%),喂食鼠颗粒饲料和自来水,实验前禁食12 h。

**1.3 仪器** -70℃低温冰箱(日本三洋株式会社)

社),各种微量加样器(德国Eppendorf公司),721型可见分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司)。

## 2 方法

**2.1 脓毒症模型制作** 参照Wichterman和Baker<sup>[3-4]</sup>描述的方法,大鼠用苯巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip麻醉,术前12 h禁食,自由饮水,腹腔局部脱毛,腹部中线切开1.5~2.5 cm,开腹后显露盲肠,用4号丝线在距盲肠根部1 cm处(回盲瓣远端)结扎盲肠,避免损伤肠系膜血管,并用20号针刺穿肠壁2次,挤出少许粪便,然后逐层关腹,sc 1 mL生理盐水,术中和术后死亡大鼠及时补足。

**2.2 分组与给药** 大鼠102只随机分为5组:正常对照组(6只)不做手术,于实验时抽取腹主动脉血;假手术组(24只)仅行单纯腹腔切开缝合;模型组(24只);EOF低、高剂量( $0.5, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,各24只)组于造模后即单次灌服。除正常组外,其余动物均于造模后2, 6, 12, 24 h分批抽取腹主动脉血,每批6只。

**2.3 检测指标** 大鼠腹主动脉血经促凝离心后取血清( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min),置-70℃低温冰箱保存待测。ELISA法测定TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10(按照试剂测定盒操作说明书进行)。

**2.4 统计学方法** 采用SPSS 11.5软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验,显著性检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果

EOF对模型大鼠血清TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10水平的影响(表1~3)。

表1~3显示,相同时间点模型组TNF- $\alpha$ , IL-6和IL-10的水平均高于假手术组( $P < 0.01$ );EOF治

疗组与模型组相比(除 2 h 外), TNF- $\alpha$ , IL-6 的水平各时间点降低 ( $P < 0.05$ ), IL-10 的水平升高 ( $P < 0.05$ ); EOF 高剂量与 EOF 低剂量相比(除 2 h 外),

TNF- $\alpha$ , IL-6 的水平各时间点降低更明显 ( $P < 0.05$ ), IL-10 的水平各时间点升高更明显 ( $P < 0.05$ )。

表 1 EOF 对模型大鼠血清 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

ng · L<sup>-1</sup>

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$				
			0 h	2 h	6 h	12 h	24 h
对照	6	-	27.03 ± 7.43				
假手术	24	-	-	28.78 ± 2.26 <sup>2)</sup>	30.32 ± 2.47 <sup>2)</sup>	28.65 ± 3.80 <sup>2)</sup>	28.24 ± 7.85 <sup>2)</sup>
模型	24	-	-	87.61 ± 5.29	117.89 ± 10.10	98.56 ± 6.63	36.96 ± 5.86
EOF	24	0.5	-	84.43 ± 7.07	92.16 ± 8.10 <sup>1)</sup>	71.45 ± 6.90 <sup>1)</sup>	34.99 ± 5.25
	24	2.0	-	83.66 ± 4.22	42.20 ± 2.31 <sup>1,3)</sup>	41.67 ± 3.33 <sup>1,3)</sup>	29.71 ± 4.23 <sup>1,3)</sup>

注:与同时点模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; EOF 高剂量与低剂量组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 2~3 同)。

表 2 EOF 对大鼠血清 IL-6 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

ng · L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6				
		0 h	2 h	6 h	12 h	24 h
对照	-	122.40 ± 7.08	-	-	-	-
假手术	-	-	122.50 ± 6.95 <sup>2)</sup>	125.28 ± 4.70 <sup>2)</sup>	127.18 ± 3.85 <sup>2)</sup>	123.18 ± 7.10 <sup>2)</sup>
模型	-	-	239.44 ± 15.68	325.68 ± 14.09	572.79 ± 17.06	390.71 ± 19.92
EOF	0.5	-	235.06 ± 17.09	305.09 ± 13.06 <sup>1)</sup>	431.97 ± 19.14 <sup>1)</sup>	362.22 ± 11.80 <sup>1)</sup>
	2.0	-	236.87 ± 10.55	212.21 ± 8.50 <sup>1,3)</sup>	324.19 ± 4.76 <sup>1,3)</sup>	222.69 ± 6.23 <sup>1,3)</sup>

表 3 EOF 对大鼠血清 IL-10 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

ng · L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-10				
		0 h	2 h	6 h	12 h	24 h
对照	-	128.31 ± 18.72	-	-	-	-
假手术	-	-	130.33 ± 14.72 <sup>2)</sup>	132.36 ± 15.71 <sup>2)</sup>	135.19 ± 10.21 <sup>2)</sup>	133.81 ± 11.41 <sup>2)</sup>
模型	-	-	209.71 ± 7.25	231.16 ± 10.88	443.36 ± 1.41	283.46 ± 16.26
EOF	0.5	-	205.60 ± 10.24	234.61 ± 13.80 <sup>1)</sup>	469.28 ± 15.11 <sup>1)</sup>	305.50 ± 16.87 <sup>1)</sup>
	2.0	-	204.87 ± 10.55	252.21 ± 8.50 <sup>1,3)</sup>	494.19 ± 4.76 <sup>1,3)</sup>	322.69 ± 6.23 <sup>1,3)</sup>

#### 4 讨论

脓毒症的病理生理过程较为复杂,当人体被病原微生物侵入后,促炎症/抗炎反应、凝血/纤溶系统、免疫系统的激活和抑制等构成了一个复杂的网络系统,彼此相互联系、相互影响。其中,炎症介质的触发、增强和放大效应是脓毒症病理变化的核心之一,脓毒症整个病理生理过程就是伴随炎症因子的发生和消长的过程。

TNF- $\alpha$  是炎症反应的最初启动者,当细菌或脂多糖进入机体后,在早期显著增高。本实验显示,大鼠在造模后 2 h TNF- $\alpha$  便开始升高,6 h 达到高峰。TNF- $\alpha$  能激活细胞因子的级联反应,诱导其他细胞

因子如 IL-1, IL-6, IL-8 等的产生及刺激次级炎症介质(血小板激活因子、前列腺素、一氧化氮和白三烯等)产生<sup>[5]</sup>,刺激花生四烯酸的代谢和脂类介质的产生,促进微血栓形成等,导致失控性炎症反应。在脓毒症中, TNF- $\alpha$ , Fas 配体 (FasL)、颗粒酶以及肾上腺糖皮质激素是引发细胞凋亡加速的主要诱导物,并且通过激活细胞浆内的一种被称作 caspase 的蛋白实现<sup>[6]</sup>。在炎症早期, TNF- $\alpha$  已经将机体免疫功能下调,使外周成熟淋巴细胞明显减少,部分脓毒症患者的白细胞计数下降证实了这一点。本实验结果表明, EOF 能下调脓毒症大鼠血清 TNF- $\alpha$  的水平,阻止了 TNF- $\alpha$  在脓毒症中数量积累的生物活性,可

以改善脓毒症预后。

IL-6 由单核-巨噬细胞、T 细胞和内皮细胞分泌。在早期脓毒症阶段免疫过度激化,大量 IL-6 在 TNF- $\alpha$  诱导下释放。IL-6 既有致炎作用又有抗炎作用<sup>[7]</sup>:在脓毒症导致特异性免疫抑制的同时,非特异性免疫系统功能亢进则由另外一些促炎细胞因子所导致,如 IL-1, IL-6, 粒细胞克隆刺激因子(G-CSF)等,IL-6 可以延缓白细胞的凋亡;IL-6 是一种多效性促炎症细胞因子,还可促进氧自由基释放,促进抗体产生,促进急性炎症反应,并引起发热。也有一学者认为 IL-6 是 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的反调控/抗炎因子,具有抑制炎症反应的作用。故检测血中 IL-6 的水平能在一定程度上代表炎症的严重程度及预后情况。本实验结果表明,大鼠在造模后 2 h IL-6 便开始升高,12 h 达到高峰。EOF 能下调脓毒症大鼠 IL-6 的水平,减轻炎症反应。

IL-10 是主要的抗炎性细胞因子之一,对全身炎症反应综合征/代偿性抗炎反应综合征(CARS)的平衡具有双向调节作用,IL-10 对炎症免疫应答主要起抑制作用。这种作用可能是通过抑制内毒素或脂多糖诱导激活的单核细胞、巨噬细胞、TH 细胞释放炎症性细胞因子来实现的,能抑制巨噬细胞抗原呈递,抑制巨噬细胞活化及继发的细胞免疫反应,抑制 NF- $\kappa$ B, P70S6 激酶活化,从而抑制多种基因转录,减少 IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  等促炎症细胞因子的分泌。另外 IL-10 还能下调单核/巨噬细胞增殖和激活,抑制细胞介导的免疫反应,上调体液免疫来减轻炎症反应和减少脓毒症的发生。王祖耀等<sup>[8]</sup>研究认为,IL-10 能降低腹腔感染和早期脓毒症炎症性细胞因子水平,对炎症有一定抑制作用,但它作为一种细胞因子也参与了炎症反应的过程,对炎症的形成起一定作用,所以它的抗炎作用并不明显,可能有潜在的临床应用价值。

藏药镰形棘豆化学成分较多<sup>[9]</sup>,含有 57 种成分,绝大部分为醇、酯、酮、酸类化合物。近年来实验研究分析认为镰形棘豆提取物有抑菌作用,镇痛,抗炎作用,祛痰作用,抑制免疫系统作用,止血作用,细胞毒活性作用,抑制人癌细胞株增殖的作用和毒副作用。镰形棘豆具有抗炎作用,本实验结果提示,镰形棘豆水提取物可能通过下调脓毒症大鼠 TNF- $\alpha$ , IL-6 的水平,上调 IL-10 的水平而发挥抗炎作用。

#### [参考文献]

- [1] 姚咏明,盛志勇. 重视对脓毒症本质的探讨[J]. 中华急诊医学杂志,2005,14(3):185.
- [2] 童丽,袁冬平,李文渊,等. 藏药镰形棘豆药效学实验研究[J]. 四川中医杂志,2008,26(6):53.
- [3] Wichterman K A, Baue A E, Chaudry H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal [J]. Surg Res,1980,29:189.
- [4] Baker C C, Chaudry I H. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model[J]. Surgery,1992,94(2):331.
- [5] 施荣,熊旭东,李淑芳. 乌司他丁调控脓毒症大鼠 TNF- $\alpha$  与 IL-6 及 IL-10 水平的研究[J]. 抗感染医药,2009,6(1):17.
- [6] 周彤,伍晓汀. 激素替代治疗在脓毒症治疗中的地位 and 作用[J]. 中国全科医学杂志,2005,8(19):1627.
- [7] Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. N Engl J Med,2003,348:138.
- [8] 王祖耀. 白介素 10 在腹腔感染和早期脓毒症对阻止炎症细胞因子释放作用的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志,2000,7(5):291.
- [9] 郑尚珍,确生,许先芳. GC-MS 联用法测定镰形棘豆石油醚浸提物的化学成分[J]. 西北师范大学学报,2003,29(2):51.

[责任编辑 何伟]