

清热解毒方对急性细菌性腹膜炎大鼠 血清内毒素及细胞因子的影响

薛小平, 李东华, 张浩, 崔乃强*

(天津市南开医院急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] 目的: 观察清热解毒方对腹腔感染大鼠血清内毒素及细胞因子水平的影响。方法: Wistar 大鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、清热解毒方组、头孢克肟组, ig1 次, 给药 30 min 后大肠杆菌 ip 造成大鼠急性细菌性腹膜炎模型, 于 6, 12, 18, 24 h 后分别检测各组动物血浆内毒素, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α), IL-6, IL-10 水平。结果: 造模后模型组大鼠血清内毒素, TNF- α , IL-6, IL-10 较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 清热解毒方组与头孢克肟组上述指标较模型组明显降低。结论: 清热解毒方能有效降低大肠杆菌腹腔感染大鼠血清内毒素及 TNF- α , IL-6, IL-10 水平。

[关键词] 清热解毒方; 腹腔感染; 内毒素; 细胞因子

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)06-0176-03

Experimental Study on the Effect of Qingre Jiedu Fang on the Levels of Endotoxin and Cytokines in Rats with Acute Intra-abdominal Infection

XUE Xiao-ping, LI Dong-hua, ZHANG Hao, CUI Nai-qiang*

(Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Qingre Jiedu Fang (QRJD Fang) on the secretion of endotoxin, TNF- α , IL-6 and IL-10 in intra-abdominal infection rats. **Method:** After giving 30 min of i. g QRJD Fang or cefixime (ANT), rat model of acute bacterial peritonitis was set up. Endotoxin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) in serum were determined respectively in 6h, 12h, 18h, 24h after acute bacterial peritonitis in the four groups (control group, model, QRJD Fang group, ANT group). **Result:** Compared with the control group, serum endotoxin, TNF- α , IL-6 and IL-10 in the model were increased obviously ($P < 0.01$), while the indexes in QRJD Fang group and ANT group were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** QRJD Fang could obviously inhibit the secretion of inflammatory cytokines, such as endotoxin, TNF- α , IL-6 and IL-10 in the acute intra-abdominal infection rats.

[Key words] Qingre Jiedu Fang; intra-abdominal infection; endotoxin; cytokine

腹膜炎是外科临床常见病之一, 它可造成肠屏障的破坏, 使肠道中的细菌和内毒素移位入血, 形成肠源性内毒素血症^[1], 腹腔感染过程中大量激活的炎性细胞释放多种内源性介质, 包括促炎细胞因子和抗炎细胞因子^[2-4]。清热解毒方由大黄、黄芩、白头翁、败酱草等中药组成, 治疗急腹症疗效确切。本实验通过急性细菌性腹膜炎大鼠模型, 观察腹腔

感染过程中外周血内毒素和细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-10 的变化, 研究清热解毒方对这些因素的影响以及对脏器的保护作用。

1 材料

1.1 药物与试剂 清热解毒方中药制剂由天津市中西医结合急腹症研究所药研室制备成含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓缩煎剂, 批号 20061212; 生理盐水为大象制药有限公司生产; 头孢克肟 (每粒 50 mg) 由天津华津制药厂生产, 批号 060701; TNF- α , IL-6, IL-10 ELISA 试剂盒, 美国 Rapid Bio 公司, 批号分别为 013256, 013796, 013528; 血浆内毒素试剂盒厦门市

[收稿日期] 2009-11-30

[基金项目] 天津市科技攻关计划重大科技项目
(05YFGDSF02600)

[通讯作者] * 崔乃强, Tel: (022)27435367

鲨试剂有限公司,批号 061127。

1.2 动物 健康 Wistar 大鼠(由军事医学科学院四所动物室提供,动物饲养合格证号为 DD20013),雌雄不限,体重(200 ± 10)g。标准颗粒饲料喂养 1 周后开始实验。

1.3 仪器 半自动生化分析仪(Unifast-2 analyzer, 荷兰);电子天平(SARTORINS, 德国);超低温冰箱(Bio-Freezer 8525, 美国 Forma Scientific 公司);722 光栅分光光度计(上海市自动化仪器三厂);高速低温离心机(Laboratory Centrifuges 3K-30, 美国 Sigma)。

2 方法

2.1 模型制备 无菌条件下,将 2 mL 人工胃液(组成:盐酸、生理盐水、胃蛋白酶)注入大鼠左下腹腔,2 h 后再将菌液(由密度为 1 × 10⁸ 个/mL 大肠杆菌混悬液与 10% BaSO₄ 牛肉汤按 1:1 配制而成)按 10 mL·kg⁻¹, 左下腹 ip, 制成腹膜炎模型,对照组仅 ip 等体积按 1:1 比例配制的生理盐水与 10% BaSO₄ 牛肉汤的混合液。

2.2 动物分组及给药 将大鼠随机分为空白对照组、模型组、清热解毒方组和头孢克肟组,每组 32 只。除空白组外,各组均于造模前 30 min 一次性预防给药,清热解毒方 18 g 生药·kg⁻¹ig, 头孢克肟 20 mg·kg⁻¹ig。

2.3 动物处理及标本采集 分别于造模后 6, 12, 18, 24 h 用 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹, ip)麻醉动物,各时间点每组 8 只动物,无菌条件下腹主动脉取血 5 mL,部分进行肝素处理检测血浆内毒素,其余离心后取血清按照试剂盒说明操作,检测 TNF-α, IL-6 及 IL-10。

2.4 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件包进行方差分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对血清内毒素水平的影响 模型组较正常组明显升高,术后 6 h 开始升高,24 h 至高峰。清热解毒方组和头孢克肟组较模型组血清内毒素水平组明显下降,差异有统计学意义。结果见表 1。

表 1 清热解毒方对大鼠血浆内毒素水平的影响(Eu·L⁻¹, $\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 h	12 h	18 h	24 h
正常	—	0.066 ± 0.016	0.063 ± 0.014	0.060 ± 0.012	0.066 ± 0.014
模型	—	0.274 ± 0.021 ²⁾	0.180 ± 0.015 ²⁾	0.249 ± 0.022 ²⁾	0.313 ± 0.019 ²⁾
清热解毒	18.0	0.234 ± 0.301 ³⁾	0.103 ± 0.017 ⁴⁾	0.099 ± 0.016 ⁴⁾	0.207 ± 0.044 ⁴⁾
头孢克肟	0.02	0.284 ± 0.041 ³⁾	0.150 ± 0.040 ⁴⁾	0.153 ± 0.033 ⁴⁾	0.224 ± 0.036 ⁴⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (下同)。

3.2 对血清 TNF-α 水平的影响 模型组 TNF-α 水平较正常组明显升高,6 h 达高峰,其后逐渐下降。清热解毒方组较模型组各个时间点均有明显降低,而头孢克肟组在 6, 24 h 下降较显著。结果见表 2。

表 2 清热解毒方对大鼠血浆 TNF-α 含量的影响(pg·mL⁻¹, $\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 h	12 h	18 h	24 h
正常	—	25.16 ± 4.64	24.77 ± 5.92	26.75 ± 7.49	25.73 ± 5.42
模型	—	178.13 ± 21.08 ²⁾	141.66 ± 11.86 ²⁾	135.71 ± 14.58 ²⁾	108.78 ± 11.68 ²⁾
清热解毒	18.0	134.83 ± 9.97 ⁴⁾	106.12 ± 12.33 ⁴⁾	86.82 ± 11.72 ⁴⁾	57.08 ± 8.17 ⁴⁾
头孢克肟	0.02	154.64 ± 14.20 ⁴⁾	136.00 ± 13.36 ³⁾	127.33 ± 11.41 ³⁾	86.59 ± 7.50 ⁴⁾

3.3 对血清 IL-6 水平的影响 模型组 IL-6 水平较正常组明显升高,造模后 18 h 达到高峰后开始下降。清热解毒方组与头孢克肟组较模型组各个时间点均下降,差异有统计学意义。结果见表 3。

表 3 清热解毒方对大鼠血浆 IL-6 含量的影响(pg·mL⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 h	12 h	18 h	24 h
正常	—	82.77 ± 3.62	85.63 ± 6.22	81.74 ± 9.86	89.72 ± 10.21
模型	—	141.60 ± 9.77 ²⁾	175.78 ± 13.05 ²⁾	281.84 ± 19.31 ²⁾	228.49 ± 11.74 ²⁾
清热解毒	18.0	121.98 ± 9.72 ³⁾	155.41 ± 11.36 ³⁾	192.27 ± 11.16 ⁴⁾	141.71 ± 15.10 ⁴⁾
头孢克肟	0.02	138.84 ± 10.46 ³⁾	160.23 ± 13.62 ³⁾	268.71 ± 13.65 ³⁾	201.15 ± 16.19 ³⁾

3.4 对血清 IL-10 水平的影响 模型组 IL-10 水平较正常组明显升高,24 h 达到高峰。18 h 和 24 h 时,

清热解毒方组较模型组有明显降低。头孢克肟组较模型组在 6,24 h 降低作用显著。结果见表 4。

表 4 清热解毒方对造模大鼠血浆 IL-10 含量的影响($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6 h	12 h	18 h	24 h
正常	—	46.57 ± 8.16	51.73 ± 7.93	41.36 ± 6.49	43.38 ± 26
模型	—	49.05 ± 7.53 ¹⁾	85.17 ± 10.38 ²⁾	153.80 ± 7.84 ²⁾	222.55 ± 16.61 ²⁾
清热解毒	18	41.52 ± 13.59 ³⁾	64.65 ± 8.16 ³⁾	113.37 ± 8.95 ⁴⁾	141.50 ± 7.05 ⁴⁾
头孢克肟	0.02	33.29 ± 8.79 ⁴⁾	81.03 ± 7.86	143.77 ± 6.62 ³⁾	151.61 ± 7.41 ⁴⁾

4 讨论

腹腔感染时产生大量相关细胞因子和炎症介质,根据其作用及产生时间可分为两类,一类为前炎细胞因子或早期细胞因子,如 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 等,主要介导组织损伤;另一类为抗炎症细胞因子或远期细胞因子如 IL-4, IL-10 等,可平衡前者的损伤效应,起一定的保护作用,炎症反应一旦失去控制,将产生严重后果^[5]。

为探讨腹腔感染时机体的变化,作者观察了血循环内毒素及细胞因子 TNF- α , IL-6, IL-10 的水平。腹膜炎时异常浓度的内毒素和细胞因子在血流中的存在,提示这些介质可能与器官的损伤相关。肝脏枯否细胞以及肺泡吞噬细胞是细胞因子的重要来源,亦是脂多糖的主要靶细胞,脓毒症早期内毒素激活这些细胞产生的促炎细胞因子和抗炎细胞因子可能对脏器产生直接损伤作用^[6]。实验结果证明,宿主体内的内毒素、TNF- α , IL-6 以及 IL-10 水平与细菌感染性疾病的严重程度相关,而清热解毒方可以有效降低血清内毒素及细胞因子水平而减轻脏器损伤。

祖国医学重视整体观,其阴阳平衡和脏腑理论认为,“阴平阳秘”是维持机体各脏腑系统功能平衡的生理学基础。其对机体调控和疾病诊疗的整体观恰恰与现代免疫调节治疗方法相吻合,为防治腹膜炎开辟了一条新的途径。尽管中药的许多治疗机制尚不能很好地用现代医学理论加以全面的解释,但

其疗效本身表明了其实用价值,其机制很可能是全面的调控,即真正发挥了“免疫调节”的作用。

[参考文献]

[1] Schoeffel U, Jacobs E, Ruf G, *et al.* Intraperitoneal macro-organisms and the severity of peritonitis [J]. *Eur J Surg*, 1995, 161(7): 501.

[2] Elizabeth D E, Papanthanasoglou R N, Jan A, *et al.* Expression of critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival [J]. *Crit Care Med*, 2001, 29: 709.

[3] Suzuki Y, Lu Q, Xu DZ, *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase activity is inhibited in cultured intestinal epithelial cells by endotoxin or nitric oxide [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 15(5): 871.

[4] Yang R, Han X, Uchiyama T, *et al.* IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 285(3): 621.

[5] 于泳浩, 崔乃强, 傅强, 等. 大承气颗粒对重型脓毒症促炎-抗炎反应平衡的影响 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2004, 10(6): 409.

[6] Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, *et al.* Trauma: the role of the innate immune system [J]. *World J Emerg Surg*, 2006, 20(1): 15.

(责任编辑 何伟)

(上接第 175 页)

本身的复杂性和病证结合模型的确定性。更多的思考将促进中药治疗疼痛的研究向更深一步发展。

[参考文献]

[1] 王绵之. 方剂学讲稿 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 266, 137, 285, 376.

[2] 陈小野. 实用中医证候动物模型学 [M]. 北京: 北京医

科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993: 178, 202, 261, 302.

[3] 李军兰, 方肇勤. 气虚证动物模型造模方法综述 [J]. *上海中医药大学学报*, 2004, 18(3): 56.

[4] 梁毅, 方碧琴, 等. 血虚证小鼠模型制作及评价 [J]. *湖南中医杂志*, 2001, 23(9): 3.

[责任编辑 何伟]