

清脂胶囊对内毒素诱导的炎症介质水平的影响及时效关系

赵桂芝, 聂淑琴*, 杨庆, 翁小刚
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究清脂胶囊对饲喂高脂饲料及注射内毒素诱导的炎症小鼠模型炎症介质及血管活性物质水平的影响及经时变化。方法: 小鼠饲喂高脂饲料的同时给药 10d 后腹腔注射内毒素(LPS) 360 μ g/kg, 注射 LPS 后分别于 2, 4, 6h 眶血管丛取血测 C 反应蛋白(CRP), 白细胞介素-6(IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。注射 LPS 后 2, 6h 取抗凝血测血栓素 B₂(TXB₂), α -酮-前列腺素 F_{1 α} (α -ket α -PGF_{1 α}) 含量。结果: 在实验设定的各个时间点, 注射 LPS 后模型组中 TXB₂, α -ket α -PGF_{1 α} , CRP, IL-6, TNF- α 水平较正常组均有明显升高; 清脂胶囊可以明显降低 LPS 注射后 2h 和 6h 血浆中 TXB₂ 和 α -ket α -PGF_{1 α} 水平, 改善 6h TXB₂/ α -ket α -PGF_{1 α} 比值。明显降低模型小鼠 LPS 注射后 6h 血清中 IL-6, 4h 和 6h 血清中 CRP 的含量。结论: 清脂胶囊主要通过抑制花生四烯酸代谢途径生成的 TXB₂ 及 α -ket α -PGF_{1 α} 抑制内毒素诱导的炎症反应。

[关键词] 清脂胶囊; 内毒素损伤; C 反应蛋白; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6; 血栓素 B₂; α -酮-前列腺素 F_{1 α}

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)10-0039-04

Inhibition Effects of Qingzhi Capsule on Inflammatory Reaction Attacked by LPS

ZHAO Gui-zhi, NIE Shu-qin*, YANG Qing, WENG Xiao-gang

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To investigate the influence of Qingzhi Capsule on mediators of inflammation and vasoactive substances in the model of LPS attack with high fat diet in mice. **Methods:** With high fat diet and oral qingzhi capsule for 10 days, then induced by ip. LPS at the last day. The blood was collected immediately from ophthalmovascula clump, at 2, 4, 6h. To measure the level of CRP, IL-6 and TNF- α . At 2h and 6h the blood of mice was collected immediately from ophthalmovascula clump, To measure the level of plasma TXB₂ and α -k-PGF_{1 α} . **Results:** After ip. LPS in each time point, the level of CRP, IL-6, TNF- α , TXB₂ and α -K-PGF_{1 α} in model group have Obvious difference from the normal group; Qingzhi Capsule had strong effect on prevention of increasing TXB₂ and α -K-PGF_{1 α} , Results also indicated depressing of TXB₂/ α -K-PGF_{1 α} ratio in the mice. Qingzhi Capsule depressed the level of CRP at 4h and 6h in the mice with high fat diet and LPS attack, depressed the levels of IL-6 at 6h. **Conclusion:** Qingzhi Capsule inhibited the expression of inflammatory factors in the mice with high fat diet and LPS attack.

[Key words] Qingzhi Capsule; LPS attack; CRP; TNF- α ; IL-6; TXB₂; α -ket α -PGF_{1 α}

清脂胶囊是由我所研制的降脂新药, 由熟大黄、枸杞子和肉苁蓉组成, 药效学实验结果显示, 清脂胶

囊对预防和治疗高脂血症多项指标有突出药效, 对动脉粥样硬化有显著预防作用。越来越多的研究提示动脉粥样硬化过程是一个血管受损伤后的炎症反应过程, 炎症反应贯穿了动脉粥样硬化发生、发展的整个过程^[1]。本试验就清脂胶囊对饲喂高脂饲料加内毒素损伤小鼠模型血清中反应蛋白(CRP)、白细

[收稿日期] 2006-03-13

[通讯作者] * 聂淑琴, Tel: (010) 64065791; E-mail: nieshuqin@sina.com

胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量及血浆中血栓素 B₂(TXB₂), β -酮-前列腺素 F_{1 α} (β -Keto-PGF_{1 α})水平的影响进行研究,探讨清脂胶囊对此模型诱导的炎症因子水平影响及时效关系。

1 材料

1.1 动物与饲料 ICR 小鼠,雄性,体重 22 \pm 2g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,SPF 级,合格证号:SCXK(京)2002-0003,动物实验条件符合二级标准;普通饲料由北京九江口饲料厂加工,高脂饲料(胆固醇 1%,猪油 10%,胆盐 0.25%,胆酸钠 0.2%,基础饲料 88.55%)由中国人民解放军军事医学科学院试验动物中心加工;许可证号:SCXK(军)2002-0018 号。

1.2 药品与试剂 清脂胶囊由本所研制,中日友好医院加工,批号:1996.12。药物由大黄(*Rheum tanguticum* Maxim ex Balf. 青海产)、枸杞子(*Lycium barbarum* L. 宁夏产)、肉苁蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma 内蒙古产)按照 6:3:1 的比例组成。经提取浓缩,精制成棕褐色粉末,每 g 提取物相当于生药 2.5g,每 g 药粉含大黄酸不低于 4.44mg。阿司匹林由北京曙光药业有限公司生产,批号:H11021614。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)由北京东环联合化工厂生产,批号:971230。药物临用前用 0.5%的羧甲基纤维素钠配制成不同浓度的悬液。细菌内毒素(LPS)由 SIGMA 公司生产,大肠杆菌 055:B₅,批号:56H4096。IL-6 试剂盒(放免法),TNF- α 试剂盒(放免法),TXB₂ 试剂盒(放免法)和 β -Keto-PGF_{1 α} 试剂盒(放免法)均购自解放军总医院科技开发中心东亚免疫所,其中 IL-6 和 TNF- α 试剂盒生产批号:050826。TXB₂ 和 β -Keto-PGF_{1 α} 试剂盒生产批号:050923。CRP 试剂盒购自上海太阳生物技术有限公司,生产批号:723005。

1.3 仪器与设备 SZ-3 型半自动生化分析仪,北京中生生物高科技公司;索福 ST21 台式高速冷冻离心机,美国 DuPont 公司;SN-695B 型智能放免 γ 测量仪,上海核所日环光电仪器有限公司;HSS-IB 型恒温水浴,成都仪器厂,编号:498035。

2 方法

2.1 模型的建立^[2] ICR 雄性小鼠,按体重随机分为正常组、模型组、清脂胶囊 1.0g/kg、清脂胶囊 2.0g/kg、清脂胶囊 4.0g/kg 组,阳性药阿司匹林组 0.08g/kg。正常组喂饲普通饲料,其余各组喂饲高脂饲料。给药组自喂饲高脂饲料当天开始给药,按

0.2mL/10g 体重灌胃,每天 1 次,连续给药 10d;正常组、模型组灌胃 0.5% 羧甲基纤维素钠;动物每 4d 称重 1 次,第 9d 下午 4 时禁食,第 10d 灌胃给药 1 次,药后 1h 除正常组腹腔注射 0.9% 生理盐水,其余各组腹腔注射 LPS 360 μ g/kg,分别于注射内毒素后不同时间点摘眼球取血。

2.2 CRP^[3]、IL-6、TNF- α ^[4] 的测定 注射内毒素后 2,4,6h 后摘眼球取血,3500r/min 离心 15min,取血清用免疫浊度法测 CRP,放射免疫法测 IL-6, TNF- α 。

2.3 血栓素和 β -酮-前列腺素的测定^[5] 注射内毒素 2,6h 后摘眼球取血,使用 EDTA-2Na⁻ 消炎痛抗凝,3500r/min 离心 15min,用放免法测定血浆中 TXB₂ 和 β -Keto-PGF_{1 α} 含量。采用倍比稀释的方法把血浆用生理盐水稀释 2 倍测定,测定结果乘以相应稀释倍数得到最终浓度值,并计算 TXB₂/ β -Keto-PGF_{1 α} 比值。

3 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计方法用 SPSS 软件包中单因素方差分析和 *t* 检验比较差异的显著程度。

4 结果

4.1 注射 LPS 对血浆中 TXB₂、 β -Keto-PGF_{1 α} 及 TXB₂/ β -Keto-PGF_{1 α} 比值经时变化的影响 结果见表 1~2。模型组动物血浆中 TXB₂、 β -Keto-PGF_{1 α} 的含量在 2h 和 6h 两个时间点较正常组有显著性差异($P < 0.01$)。清脂胶囊 1g/kg, 2g/kg, 4g/kg 3 个剂量组以及阳性药阿司匹林组均明显抑制 TXB₂ 的升高,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。模型组和清脂胶囊组的 β -Keto-PGF_{1 α} 水平均出现升高趋势,其中模型组与正常组具有显著性差异($P < 0.01$),清脂胶囊 4g/kg 组及阿司匹林组均显著降低 2h β -Keto-PGF_{1 α} 含量,具有显著性差异,清脂胶囊 1g/kg 组及阿司匹林组均显著降低 6h β -Keto-PGF_{1 α} 含量,具有显著性差异($P < 0.01$)。在 2h LPS 导致 β -Keto-PGF_{1 α} 含量急剧升高,而且药物对 β -Keto-PGF_{1 α} 的降低作用不是很明显,但对 TXB₂ 的作用效果极显著,所以模型组在 2h TXB₂/ β -Keto-PGF_{1 α} 比值出现降低趋势,在 6h 药物表现出明显的调节 TXB₂/ β -Keto-PGF_{1 α} 比值的能力,阳性药阿司匹林和 3 个剂量的清脂胶囊均能显著降低其比值($P < 0.01$)。

4.2 清脂胶囊对注射 LPS 不同时间点血清中 TNF- α 、IL-6 和 CRP 含量经时变化的影响 结果见表 3~

表 1 清脂胶囊对小鼠炎症模型 2h 血浆中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 及 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 比值的影响

组别	n	剂量(g/kg)	TXB ₂ (pg/mL)	6-Keto-PGF _{1α} (pg/mL)	TXB ₂ /6-Keto-PGF _{1α} 比值
正常组	11	—	464.0 ± 122.7 ²⁾	585.0 ± 42.8 ²⁾	0.79 ± 0.19 ²⁾
模型组	12	—	2103.7 ± 195.3	3701.7 ± 256.6	0.57 ± 0.08
清脂胶囊组	11	1	1145.4 ± 183.8 ²⁾	3806.8 ± 244.5 ²⁾	0.30 ± 0.06 ²⁾
清脂胶囊组	11	2	866.6 ± 142.2 ²⁾	3635.3 ± 345.3	0.24 ± 0.04 ²⁾
清脂胶囊组	12	4	724.3 ± 156.8 ²⁾	3405.6 ± 302.9 ¹⁾	0.20 ± 0.04 ²⁾
阿司匹林组	12	0.08	99.6 ± 26.4 ²⁾	2030.6 ± 284.5 ²⁾	0.05 ± 0.02 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(下同)

表 2 清脂胶囊对小鼠炎症模型 6h 血浆中 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 及 TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 比值的影响

组别	n	剂量(g/kg)	TXB ₂ (pg/mL)	6-Keto-PGF _{1α} (pg/mL)	TXB ₂ /6-Keto-PGF _{1α} 比值
正常组	11	—	508.4 ± 127.6 ²⁾	1169.7 ± 145.4 ²⁾	0.35 ± 0.12 ¹⁾
模型组	12	—	852.8 ± 198.0	2229.7 ± 324.7	0.45 ± 0.12
清脂胶囊组	10	1	509.5 ± 125.1 ²⁾	1784.5 ± 354.6 ²⁾	0.29 ± 0.07 ²⁾
清脂胶囊组	10	2	525.5 ± 129.6 ²⁾	2082.3 ± 296.4	0.24 ± 0.06 ²⁾
清脂胶囊组	12	4	633.1 ± 104.0 ²⁾	2163.6 ± 333.8	0.25 ± 0.06 ²⁾
阿司匹林组	11	0.08	121.9 ± 46.4 ²⁾	1881.1 ± 274.1 ²⁾	0.07 ± 0.03 ²⁾

表 3 清脂胶囊对炎症模型 2h 血清中 TNF-α、IL-6 和 CRP 含量的影响

组别	n	剂量(g/kg)	TNF-α(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	CRP(mg/L)
正常组	9	—	0.35 ± 0.04 ²⁾	175.5 ± 43.7 ²⁾	2.30 ± 0.33 ¹⁾
模型组	12	—	0.51 ± 0.09	274.8 ± 35.6	2.80 ± 0.42
清脂胶囊组	10	2	0.50 ± 0.07	243.6 ± 32.1	2.73 ± 0.48
清脂胶囊组	10	4	0.47 ± 0.05	267.6 ± 30.8	2.69 ± 0.31
阿司匹林组	10	0.08	0.46 ± 0.05	210.7 ± 39.9 ¹⁾	2.43 ± 0.21 ¹⁾

表 4 清脂胶囊对炎症模型 4h 血清中 TNF-α、IL-6 和 CRP 含量的影响

组别	n	剂量(g/kg)	TNF-α(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	CRP(mg/L)
正常组	9	—	0.35 ± 0.04 ²⁾	175.5 ± 43.7 ²⁾	2.30 ± 0.33 ¹⁾
模型组	12	—	0.69 ± 0.10	308.9 ± 45.6	2.66 ± 0.33
清脂胶囊组	10	2	0.67 ± 0.13	271.1 ± 54.9	2.39 ± 0.39
清脂胶囊组	10	4	0.65 ± 0.10	253.0 ± 58.5	2.30 ± 0.38 ¹⁾
阿司匹林组	10	0.08	0.57 ± 0.06 ¹⁾	230.0 ± 21.7 ²⁾	2.06 ± 0.28 ²⁾

表 5 清脂胶囊对炎症模型 6h 血清中 TNF-α、IL-6 和 CRP 含量的影响

组别	n	剂量(g/kg)	TNF-α(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	CRP(mg/L)
正常组	10	—	1.92 ± 0.38 ²⁾	87.4 ± 5.7 ²⁾	1.74 ± 0.57 ¹⁾
模型组	12	—	2.65 ± 0.76	108.9 ± 9.8	2.31 ± 0.65
清脂胶囊组	11	1	2.43 ± 0.57	94.2 ± 10.3 ²⁾	1.97 ± 0.30
清脂胶囊组	11	2	2.34 ± 0.66	90.5 ± 11.4 ²⁾	1.92 ± 0.57
清脂胶囊组	11	4	2.26 ± 0.57	88.5 ± 11.6 ²⁾	1.72 ± 0.58 ¹⁾
阿司匹林组	10	0.08	2.01 ± 0.50 ¹⁾	89.0 ± 14.8 ²⁾	1.36 ± 0.50 ²⁾

5. 腹腔注射 LPS 造模后 2, 4, 6h 血清中的炎症因子 TNF-α、IL-6 和 CRP 水平与正常组相比都有明显升高, 且有非常显著性差异 (P < 0.01)。清脂胶囊 3 个剂量组在 6h 时间点均能抑制 IL-6 的表达, 且有显著性差异 (P < 0.01), 在 2, 4h 两个时间点虽有降低趋势, 但无显著性差异。阳性药阿司匹林 3 个时间点均能抑制 IL-6 的表达, 差异具有显著性 (P < 0.01)。清脂胶囊大剂量组在 4, 6h 能明显抑制 CRP 含量的升高, 差异具有显著性 (P < 0.01), 阿司匹林 3 个时间点

均能明显抑制 CRP 的表达 (P < 0.01)。清脂胶囊对 TNF-α 水平无明显影响; 阳性药阿司匹林在 4, 6h 两个时间点均能明显抑制 TNF-α 的表达 (P < 0.05)。

5 讨论

试验证明清脂胶囊可以显著降低饲高脂饲料动物的全血黏度, 对大鼠热毒血瘀证模型的血液流变学指标有显著改善, 能明显降低血小板聚集率和全血黏度, 同时具有内皮细胞保护作用^[6], 能明显抑制 LPS 注射后引起的血小板减少^[7]。

内毒素即脂多糖(LPS)是革兰阴性菌外膜的重要组成部分,是介导系统性炎症反应综合症的主要启动因子。LPS 本身并不造成机体的严重损害,它主要通过促使巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞等释放大量的细胞因子,直接激活的细胞因子有 TNF、PLA₂ PKC JIL-6、前列腺素、氧自由基等,这些因子通过自分泌、旁分泌相互联系、相互影响,使病变得以发展^[8],而炎症过程最具有标志的因子是 CRP^[9]。花生四烯酸的代谢产物 PGs、TXs、LTs 是强烈的炎症介质,这些炎症介质在加重局部炎症的同时,还可通过循环引起炎症远端组织损伤,严重者导致多系统器官衰竭。TXA₂ 和 PGI₂ 的比例失衡可导致血栓形成和组织缺血的一系列生理机能的改变^[10]。

本次试验选用 LPS 作为主要造模药物,同时合用高脂饲料喂饲造成了炎症模型,考察中药复方清脂胶囊对花生四烯酸代谢产物以及相关炎症因子的影响。实验结果显示:对于注射内毒素及喂饲高脂小鼠的炎症模型中,能够激活花生四烯酸系统,在 2h 对 TXB₂ 系统影响最显著,而且药物也作用在这一环节,清脂胶囊可以明显抑制注射内毒素之后 2, 6h 的血浆 TXB₂ 水平,可明显降低 6h TXB₂/6-Keto-PGF_{1α} 的比值,阻止环氧化酶产物的生成,从而减轻炎症介质的进一步产生;本研究还验证本模型在激活花生四烯酸代谢系统的同时也引起实验设定的各个时间点小鼠血液中炎症因子 IL-6, TNF-α 和 CRP 水平明显增高,清脂胶囊对 IL-6(6h), CRP(4, 6h) 浓度有显著性降低,且呈现剂量依赖性。表明清脂胶

囊对由 LPS 诱导的炎症介质有一定的抑制作用。

清脂胶囊对 AS 的防治具有积极的作用,为 AS 的研究和治疗开拓了思路。

[参考文献]

- [1] 王娟,赵龙吟. 动脉粥样硬化过程中的炎症反应[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2004, 4(4): 238-242.
- [2] 聂淑琴,李铁林,薛宝云,等. 脂复康胶囊对家兔试验性高脂血症及动脉粥样硬化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(5): 23-25.
- [3] 齐志宏. C 反应蛋白与动脉粥样硬化的关系[J]. 北京医学, 2005, 27(4): 246-248.
- [4] 曲爱君,吴铁军,刘桂清. 大黄对 SIRS 和 MODS 患者肿瘤坏死因子 α 及白介素的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7(1): 43-45.
- [5] 陈龙,朱祖康,王丙云,等. 花生四烯酸代谢物在炎症中的作用. 国外畜牧科技[J]. 2000, 27(4): 31-34.
- [6] 史青,聂淑琴,杨庆. 清脂胶囊对热毒血瘀证大鼠内皮功能及血液流变学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10(1): 28-31.
- [7] 赵瑞,聂淑琴,杨庆,等. 清脂胶囊抑制血瘀证大鼠血小板活化作用机理分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 32-35.
- [8] 许文亮,郭新贵,徐延路,等. 冠心病患者血浆胆固醇与内皮素-1、C-反应蛋白及血小板可溶性 P 选择素相关研究[J]. 新医学, 2004, 35(6): 330-335.
- [9] 薛枫. 动脉粥样硬化发病机制研究的新进展,炎症反应学说[J]. 内科急危重症杂志, 2003, 9(2): 93-98.
- [10] Mong S, Chi-Rosso G, Miller J, et al. LeukotrienE B4 induces formation of inositol phosphates in rat peritoneal polymorphonuclear leukocytes[J]. Mol Pharmacol, 1986, 30: 235-242.