引用:李慧,陈俊生,汪磊,张云松. 清瘟败毒饮对脓毒症大鼠炎症反应和脏器损伤的影响[J]. 湖南中医杂志,2022,38(1):161-164.

清瘟败毒饮对脓毒症大鼠炎症反应和脏器损伤的影响

李　慧[1],陈俊生[2],汪　磊[1],张云松[1]
(1. 山东中医药大学附属医院,山东　济南,250011;
2. 山东中医药大学,山东　济南,250355)

[**摘要**]　目的:观察清瘟败毒饮对脓毒症大鼠炎症反应和脏器损伤的影响。方法:将 80 只大鼠随机分为模型组、西药组及中药高、低剂量组,每组各 20 只。采用盲肠结扎穿刺术进行造模。西药组灌胃盐酸小檗碱 0.27 mg/kg,中药高剂量组灌胃清瘟败毒饮 4.6 g 生药/kg,中药低剂量组灌胃清瘟败毒饮 2.3 g 生药/kg,模型组灌胃等量 0.9%氯化钠注射液。1 次/d,连续 3 d。观察比较各组大鼠进食、活动、皮毛色泽等一般情况,血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-17A(IL-17A)水平以及大鼠肺脏、肝脏组织病理情况。结果:模型组出现寒战、呼吸加快、活动度降低、皮毛倒立、精神萎靡等情况,中药高、低剂量组大鼠的一般情况优于模型组;与模型组比较,中药高、低剂量组和西药组均可降低血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17A 水平($P<0.05$),但中药高、低剂量组与西药组比较,指标差异无统计学意义($P>0.05$)。中药高、低剂量组肺脏、肝脏组织病理损伤程度较模型组改善。结论:清瘟败毒饮可以抑制脓毒症模型大鼠炎症反应,减轻脏器损伤。

[**关键词**]　脓毒症;炎症反应;脏器损伤;清瘟败毒饮;实验研究
[**中图分类号**]R285.5　　[**文献标识码**]A　　DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2022.01.040

Effect of Qingwen Baidu decoction on inflammatory response and organ injuries in rats with sepsis

LI Hui[1], CHEN Junsheng[2], WANG Lei[1], ZHANG Yunsong[1]
(1. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, Shandong, China;
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China)

[**Abstract**]　Objective: To investigate the effect of Qingwen Baidu decoction on inflammatory response and organ injuries in rats with sepsis. Methods: A total of 80 rats were randomly divided into model group, Western medicine group, and high- and low-dose traditional Chinese medicine (TCM) groups, with 20 rats in each group, and cecal ligation and puncture were performed for modeling. The rats in the Western medicine group were given berberine hydrochloride 0.27 mg/kg by gavage, those in the high- and low-dose TCM groups were given Qingwen Baidu decoction by gavage at a dose of 4.6 and 2.3 g/kg (crude drug), respectively, and those in the model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage, once a day for 3 consecutive days. The above groups were compared in terms of general status (food intake, activity, and fur color), serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10, and interleukin-17A (IL-17A), and lung/liver histopathology. Results: The rats in the model group had the conditions of chill, accelerated breathing, reduced activity, hair upside down, and lethargy, and the high- and low-dose TCM groups had a better general status than the model group; compared with the model group, the high- and low-dose TCM groups and the Western medicine group had significant reductions in the serum levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-17A ($P<0.05$), while there were no significant differences in these indices between the high- and low-dose TCM groups and the Western medicine group ($P>0.05$). The high- and low-dose TCM groups had

基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(2017-038)
第一作者:李慧,女,医学硕士,主治医师,研究方向:急诊、危重症的临床研究

significant improvement in lung/liver histopathology compared with the model group. Conclusion: Qingwen Baidu decoction can inhibit inflammatory response and alleviate organ injuries in rats with sepsis.

[**Keywords**] sepsis; inflammatory response; organ injuries; Qingwen Baidu decoction; experimental study

脓毒症是重症监护病房的主要疾病之一,其病死率为 30%~40%,可由感染、严重创伤、外科手术等原因引起,常见于慢性疾病或免疫力低下患者。脓毒症的高致病率和高病死率是全球急诊医学所共同面临的难点。脓毒症属中医学“温热病”范畴,其病机主要为热毒内蕴,脉络瘀阻,正气虚损,毒、热、瘀、虚及腑气不通皆可导致脓毒症[1]。清瘟败毒饮作为治疗温热病的经典名方,具有清热解毒、泻火凉血的功效,适用于温病热毒邪气内侵脏腑,外窜肌表,气血两燔之证。为进一步明确清瘟败毒饮在脓毒症炎症反应中的重要作用,本研究观察清瘟败毒饮对脓毒症大鼠炎症反应和脏器损伤的影响,现报告如下。

1 实验材料

1.1 *动物* 雄性 SD 大鼠 80 只,鼠龄 6~7 周,体质量 180~220 g,由山东省疾控中心提供,许可证号:SCXK(鲁)2019-1207,饲养于山东省疾控中心 SPF 级动物实验室。

1.2 *药物及试剂* 清瘟败毒饮(生石膏 50 g、生地黄 20 g、水牛角 9 g、黄连 10 g、知母 12 g、玄参 12 g、栀子 9 g、桔梗 9 g、黄芩 9 g、赤芍 9 g、连翘 9 g、牡丹皮 9 g、鲜竹叶 6 g、甘草 6 g)由山东中医药大学附属医院药房提供,经山东中医药大学药学院生药教研室鉴定为正品,按原方比例,加入 2000 ml 去离子水浸泡 1 h 后,煎煮 2 次,合并 2 次生药,纱布滤出,进行冷冻干燥,得到冻干粉,放入密封袋,在干燥器内密封保存。使用前水浴温热稀释,高剂量为 4.6 g 生药/kg,低剂量为 2.3 g 生药/kg。盐酸小檗碱片(青岛黄海制药有限责任公司,批准文号:国药准字 H37021111,规格:0.1 g/粒,批号:130941)。水合氯醛溶液,购自山东大学齐鲁医院,批号:130826。

ELISA Kit:Rat 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)(EK382/3-48,A38290911);Rat 白细胞介素-1β(IL-1β)(EK301B/3-48,A301B90421);Rat 白细胞介素-6(IL-6)(EK306/3-48,A30690741);Rat 白细胞介素-10(IL-10)(EK310/2-48,A31090324);Rat 白细胞介素-17A(IL-17A)(EK317/3-48,A31781035)。生产厂家均为联科生物。

1.3 *主要仪器* 超声细胞粉碎机(宁波新芝生物,JY92-Ⅱn);高速冷冻离心机(Heal Force,Neofuge15R);水浴锅(姜堰市天力医疗器械厂,TL-420D);全自动研磨仪(赛维尔生物,KH-Ⅲ);酶标检测仪(BioTeK,Epoch)。

2 实验方法

2.1 *动物分组* 将 80 只大鼠随机分为模型组、西药组及中药高、低剂量组(简称高、低剂量组),每组各 20 只。

2.2 *给药方法* 西药组灌胃盐酸小檗碱 0.27 mg/kg 体质量,高剂量组灌胃清瘟败毒饮 4.6 g 生药/kg 体质量,低剂量组灌胃清瘟败毒饮 2.3 g 生药/kg 体质量,模型组灌胃等剂量 0.9%氯化钠注射液。1 次/d,连续 3 d。

2.3 *模型制备* 末次给药 30 min 后采用盲肠结扎穿刺术进行造模。按 60 μl/10 g 体质量的剂量腹腔注射 5%水合氯醛麻醉后,将动物仰卧固定于手术板上,腹部手术区常规消毒与去毛,无菌条件下用手术刀沿腹正中线作一长约 2cm 切口,经切口进腹在回盲瓣远端分离并以 4 号丝线结扎 1/3 处盲肠。12 号针头盲肠末端穿孔,将盲肠放回腹腔,并逐层关腹。

2.4 *观察指标*

2.4.1 *一般情况* 观察造模后动物的一般情况,如进食状况、活动度、皮毛色泽、呼吸频率等。

2.4.2 *炎症因子* 造模 24 h 后,经腹主动脉取血,静置 30 min,离心取血清,于-80℃冰箱保存待测。采用 ELISA 法,严格按照试剂盒说明书操作,检测各组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-10、IL-17A 水平。

2.4.3 *脏器组织病理学* 将处死后的大鼠肺脏、肝脏取下,迅速放入液氮中冷冻保存 48 h,切成 0.5 cm 厚的薄块,石蜡包埋,HE 染色,在光学显微镜下观察各组大鼠各脏器组织的病理改变情况。并请 2 位病理科医师对所查看切片进行病理学评估。

2.5 *统计学方法* 应用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析,数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较运用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 *各组大鼠一般生活状态比较* 造模后大鼠苏醒延迟,醒后精神萎靡,身体蜷缩,基本不活动,进

食进水减少,对外界反应迟钝,呼吸频率加快,被毛蓬松少光泽,大便稀软。模型组最早出现寒战、呼吸加快、活动度降低、皮毛倒立、精神萎靡等表现。造模 24 h 后,造模大鼠均出现口鼻部分泌物增多,活动大幅度减少,皮毛光泽度减低,高、低剂量组大鼠生理状况优于模型组。随着时间的延长大部分大鼠出现皮温低,肌力减弱,眼周血性分泌物,停止进食进水,排泄稀水样便、色黄、腥臭味。3 只(模型组 2 只、西药组 1 只)大鼠出现呼吸急促,对被动仰卧无反抗,排泄物呈黏液状,量多,最终死亡。考虑大鼠体质差,炎症反应剧烈是其死亡的主要原因。

3.2　各组大鼠血清炎症因子比较　与模型组比较,各给药组大鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17A 水平均下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);高、低剂量组与西药组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表 1)

表 1　各组大鼠血清炎症因子比较($\bar{x}\pm s$,pg/ml)

组别	只数	剂量(g 生药/kg 体质量)	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-10	IL-17A
模型组	18	-	285.92±4.56	42.43±3.62	107.29±3.25	92.22±6.31	90.85±5.32
西药组	19	2.7×10^{-4}	145.82±4.32[a]	30.33±4.29[a]	95.99±4.62[a]	90.66±5.33	72.75±4.61[a]
高剂量组	20	4.6	165.36±5.32[ab]	33.55±5.31[ab]	83.86±2.03[ab]	87.36±7.52	75.86±4.22[ab]
低剂量组	20	2.3	188.62±3.63[ab]	36.21±6.74[ab]	90.35±5.04[ab]	88.32±8.21	82.23±3.55[ab]

注:与模型组比较,[a]$P<0.05$;与西药组比较,[b]$P>0.05$。

3.3　各组大鼠肺、肝组织病理情况比较　光镜下发现肺组织、肝组织病理改变最为明显。1)肺组织。模型组:肺组织布局杂乱,肺泡膨胀不全、融合或塌陷,间隔明显增厚,可见大量炎性细胞浸润,肺泡腔内红细胞渗出,毛细血管扩张、淤血。各给药组镜下发现炎性细胞浸润较少,毛细血管扩张、淤血明显较轻(见图 1)。2)肝组织。模型组:肝细胞结构紊乱,出现水肿、变性、坏死,肝小叶及汇管区见炎性细胞浸润、淤血;西药组:轻度肝细胞水肿;中药组:肝细胞水肿明显改善,虽可见炎性细胞浸润,但情况均较模型组改善明显。(见图 2)

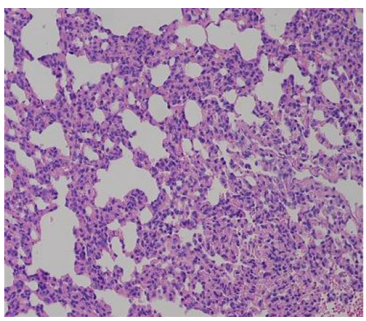

图 1-1　模型组

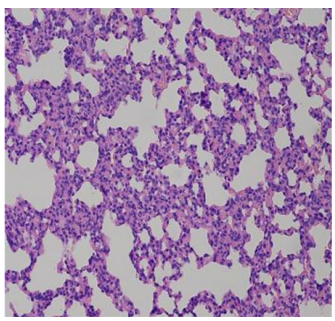

图 1-2　西药组

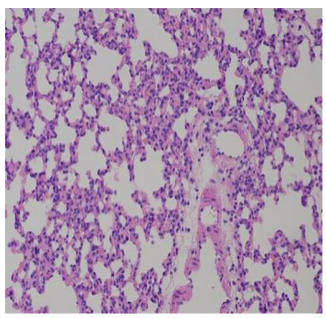

图 1-3　中药组

图 1　肺组织病理图

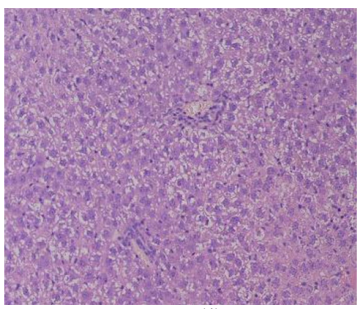

图 1-1　模型组

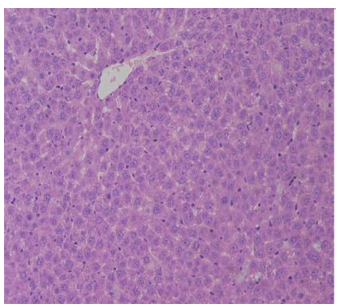

图 1-2　西药组

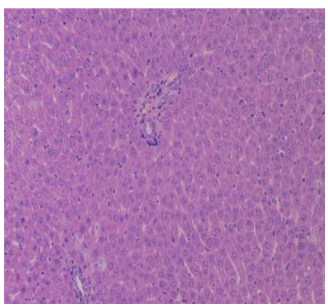

图 1-3　中药组

图 2　肝组织病理图

4　讨　　论

脓毒症是指因感染引起宿主反应失调而导致危及生命的器官功能障碍[2]。其发病机制复杂,涉及炎症反应、免疫抑制、凝血功能障碍等多个方面[3]。脓毒症会引起巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞等炎症细胞被相继激活,从而呈瀑布效应式释放大量 TNF-α、IL-6、IL-10 等炎症因子[4]。这些炎症因子的释放,导致了机体的过度炎症反应,导致

机体受到间接伤害[5]。促炎因子和抗炎因子在脓毒症发生发展的过程中起着重要作用。TNF-α 等是脓毒症早期细胞因子级联反应中起关键作用的炎性因子[6],能够引起肺毛细血管内皮细胞以及肺泡上皮细胞损伤,进而引起肺损伤[7]。TNF-α 水平也与肝脏疾病的严重程度呈正相关[8]。IL-1 和 IL-6 是 TNF-α 介导的细胞因子级联反应中的重要促炎因子,IL-1 通过 IL-1β 的表达启动炎症反应[9]。IL-1β、IL-6 通过诱导级联瀑布反应,从而引起过度的全身炎症反应[10]。IL-10 可调节机体多余的促炎细胞因子,对促炎细胞因子如 IL-6 等具有较强的抑制作用,可减少促炎细胞因子的释放,对脓毒症病情的控制和抑制远处脏器损伤有着重要作用,但血清 IL-10 水平过高,则诱导功能性免疫状态,易引发不可控的感染[11]。IL-17A 是 IL-17 家族中的一员,主要由辅助性 T 细胞(Th17)分泌,IL-17A 作为一种促炎因子,对炎症反应具有明显的放大作用,可促进粒细胞集落刺激因子、巨噬细胞炎症蛋白 2、单核细胞趋化蛋白等其他炎症因子的释放[12]。目前脓毒症脏器损伤的机制并不十分清楚,主要与炎症反应平衡失调、NF-κB 通路激活以及氧自由基清除障碍有关[13]。炎症反应存在于脓毒症的始终,早期出现的急性肺损伤、心脑血管损伤以及消化道反应,均是由于炎症因子过度反应造成的。

脓毒症治疗难度大,临床实践表明清瘟败毒饮作为经典名方对脓毒症具有一定的治疗作用。本方由白虎汤、犀角地黄汤、黄连解毒汤三方加减组成,具有清热泻火、凉血解毒的功效。方中石膏、知母清阳明经火热;水牛角、生地黄、玄参、赤芍、牡丹皮清营凉血解毒;黄芩、黄连、栀子、连翘清热泻火解毒;竹叶清心除烦;桔梗载药上行。现代药理研究证明,本方具有抗病原微生物及其毒素、解热、抗炎、抗惊厥、抗凝血等作用。本研究采用清瘟败毒饮对脓毒症模型大鼠进行干预,探讨清瘟败毒饮对大鼠炎症反应和脏器损伤的影响。结果显示,以清瘟败毒饮灌胃后,各给药组大鼠的活动度和精神状态等一般生理状况优于模型组;各给药组血清 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17A 水平降低,与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。高、低剂量组与西药组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。组织病理结果可见,与模型组比较,中药组肺泡内渗出减少,炎性细胞浸润减轻;肝细胞水肿改善明显,炎性细胞浸润减少。这表明清瘟败毒饮可抑制脓毒症炎症反应,并减轻脓毒症大鼠肺脏、肝脏的组织损伤程度,说明经清瘟败毒饮干预后,一定程度上抑制了炎症反应,减少了脓毒症早期过度反应对器官功能的损伤。

综上所述,清瘟败毒饮可阻断脓毒症引发的炎症反应进展,抑制肺、肝细胞凋亡,减轻脏器组织损伤,对脓毒症大鼠具有保护作用。本研究方案涉及的样本量较少,且未研究清瘟败毒饮调控炎症反应的具体分子机制,尚存在一定的不足之处,希望在以后的研究中能够扩大样本量,进一步深入研究。

参考文献

[1] 霍雁,李淑芳. 脓毒症的病因病机及中医治疗进展[J]. 中国中医急症,2019,28(10):1874-1876.

[2] SINGER M,DEUTSCHMAN CS,SEYMOUR CW,et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock(sepsis-3)[J]. JAMA,2016,315(8):801-810.

[3] RIZZO AN,DUDEK SM. Endothelial glycocalyx repair:Building a wall to protect the lung during sepsis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2017,56(6):687-688.

[4] CHAUDHRY H,ZHOU J,ZHONG Y,et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis[J]. In Vivo,2013,27(6):669-684.

[5] 缪鹏,郁正亚. 脓毒症实验动物模型 CLP 与 CASP 进展[J]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(4):464-469.

[6] MENGES T,KONIG IR,HOSSAIN H,et al. Sepsis syndrome and death in trauma patients are associated with variation in the gene encoding tumor necrosis factor[J]. Crit Care Med,2008,36(5):1456-1462.

[7] LOMAS NEIRA J,PERL M,VENET F,et al. The role and source of tumor necrosis factor-α in hemorrhage-induced priming for septic lung injury[J]. Shock,2012,37(6):611-620.

[8] WANG JY,LIU P. Abnormal immunity and gene mutation in patients with severe hepatitis-B[J]. World J Gastroenterol,2003,9(9):2009-2011.

[9] CHEN J,XUAN J,GU YT,et al. Celastrol reduces IL-1beta induced matrix catabolism,oxidative stress and inflammation in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration in vivo[J]. Biomed Pharmacother,2017,91:208-219.

[10] INOUE K,TAKANO H,YANAGISAWA R,et al. Antioxidative role of interleukin-6 in septic lung injury in mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2008,21(3):501-507.

[11] FENG M,SUN T,ZHAO Y,et al. Detection of serum interleukin-6/10/18 levels in sepsis and Its clinical significance[J]. J Clin Lab Anal,2016,30(6):1037-1043.

[12] CHANG S,HSIAO Y,TSAI Y,et al. Interleukin-17 enhances cardiac ventricular remodeling via activating MAPK pathway in ischemic heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol,2018,122:69-79.

[13] LI J,XIA K,XIONG M,et al. Effects of sepsis on the metabolism of sphingomyelin and cholesterol in mice with liver dysfunction[J]. Exp Ther Med,2017,14(6):5635-5640.

(收稿日期:2021-04-16)