

中药热毒清对内毒素 DIC 家兔血浆肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 6 水平影响的研究*

吴朝栋¹ 李鸣真¹ 张艳萍¹ 林宝英¹ 罗 明² 徐丽君¹

内容提要 通过 Elisa 检测内毒素 DIC 家兔血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 水平变化, 并观察中药热毒清注射液对 TNF- α 、IL-6 水平的影响。结果发现, 模型组血浆 TNF- α 、IL-6 水平显著升高, 其升高水平和组织、器官的损害程度相一致。运用热毒清作为防治处理后, TNF- α 、IL-6 水平显著降低, 组织、器官的损害也相应较轻。以上结果提示 TNF- α 、IL-6 参与 DIC 发病机制, 中药热毒清通过降低 TNF- α 、IL-6 水平可能对 DIC 具有防治作用。

关键词 肿瘤坏死因子 α 白细胞介素 6 热毒清 弥散性血管内凝血

Effects of Reduqing Injection on Plasma TNF- α and IL-6 Levels in Rabbits with Endotoxin-induced DIC Wu Chao-dong, Li Ming-zhen, Zhang Yan-ping, et al *Institute of Integrated Traditional and Western Medicine, Tongji Medical University, Wuhan (430030)*

Plasma TNF- α and IL-6 levels of endotoxin-induced DIC in rabbits were measured by ELISA methods. Simultaneously, the effects of Reduqing (RDQ) on TNF- α and IL-6 were also studied. The results showed that TNF- α and IL-6 levels increased markedly in model group, which were confirmed with obvious damage of tissue or organ. Co-administration of RDQ could reduce plasma TNF- α and IL-6 levels, together with mild tissue or organ damage. These results indicated TNF- α and IL-6 might be involved in pathogenesis of endotoxin-induced DIC, RDQ might be used in preventing or treating DIC through mechanism of reducing TNF- α and IL-6 levels.

Key words tumor necrosis factor- α , interleukin-6, Reduqing, disseminated intravascular coagulation

DIC 是败血症常见的并发症之一, 与休克、多器官功能衰竭等一起成为败血症等重症革兰氏阴性细菌感染性疾病难治的原因。研究表明内毒素(LPS)是革兰氏阴性细菌的核心成分, 并且, 其毒性作用是内毒素本身所诱生的一系列细胞因子及炎症介质如白细胞介素 I (IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白三烯类 (LTs)、血小板活化因子 (PAF) 而介导的^①。本研究观察了内毒素 DIC 家兔血浆 TNF- α 和 IL-6 水平的变化以及中药热毒清注射液对它们的影响, 并对此作了初步探讨, 以期中药治疗感染性疾病提供一些新的依据。

材料与方 法

1 材料

动物 健康日本大耳白兔, 雄性, 体重 1.8~2.2 kg, 由同济医科大学医学实验动物中心提供。

药物 100%热毒清注射液(由金银花、大青叶等组成)由本所制剂室生产, 批号 931111。地塞米松磷酸钠注射液 5 mg/ml, 湖北宜昌制药厂生产, 批号 930703。

主要试剂 冻干精制 E.Coli.O₁₁₁B₄ 内毒素, 1 mg/支, 上海生物制品研究所生产, 批号 931201。TNF- α 检测盒由北京邦定生物医学公司提供, 批号 940101。IL-6 标准检测盒 (Genzyme 公司产品, Cambridge, MA, USA) 由美国 Monsanto 公司 Wun TC Ph D 惠赠。

* 国家中医药管理局资助部分课题

1. 同济医科大学中西医结合研究所(武汉 430030); 2. 第二军医大学长海医院中医科

主要仪器 国产高速冷冻离心机, 国产 DG-3022 A 型酶联检测仪。

2 方法

2.1 动物分组 32 只动物随机分为 4 组, 即模型组、热毒清组、地塞米松组和正常对照组, 每组 8 只。制作 DIC 模型方法参照文献^[2]并稍作修改, 即两次注射 LPS, 用量分别为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重, 其中正常组家兔在实验开始时同时经耳缘静脉间隔 12 h 注射生理盐水(NS)3 次, 每次 5 ml/kg 体重。根据预备实验血浆 TNF 水平出现 3 次高峰, 即第 1 次注射 LPS 后 2 h 及第 2 次注射 LPS 后 6 h 和 12 h, 本次实验各动物在实验前 24 h 及第 2 次注射 LPS 后 12 h 经兔耳中央动脉取血, 4°C 低温分离血浆, 标本冻存于 -30°C 待检。第 2 次取血后即刻经颈动脉放血处死动物, 取肺、肝、肾及肠肉眼观察病变, 并取肝左叶组织以 10% 福尔马林液固定, 制作切片光镜检查。

2.2 检测方法 TNF- α : 包被抗 TNF- α 单抗的 PVC 板分别加不同浓度的标准品及血浆样品, 室温孵育、洗涤后加辣根过氧化物酶标记的抗 TNF

- α 多克隆抗体, 孵育、洗涤后加 OPD/ H_2O_2 反应显色, H_2SO_4 终止反应后于酶联仪 492 nm 处测 OD 值, 根据标准曲线确定样品 TNF- α 含量, 灵敏度 100 pg/ml。IL-6 检测类似, 加标准品及样品处理后, 加生物素标记的抗 IL-6 多克隆抗体, 37°C 孵育、洗涤后加辣根过氧化物酶标记的亲合素, 孵育、洗涤后加 TMB/ H_2O_2 反应显色, 终止后于 450 nm 处测 OD 值。

结 果

1 一般情况 模型组动物在第 2 次注射内毒素后均先后出现拒食、嗜睡、体重下降, 部分动物出现寒颤及气急。两治疗组上述变化则较轻, 正常组无上述变化。

2 血浆 TNF- α 、IL-6 水平变化 见附表。除正常组外, 其他 3 组动物血浆 TNF- α 、IL-6 水平与实验前比较均有不同程度的升高, 以模型组最显著, 与两治疗组相比有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。相关性分析示模型组 TNF- α 与 IL-6 水平呈正相关, 相关系数 $r = 0.759$ ($P < 0.05$)。

附表 各组动物血浆 TNF- α 、IL-6 水平变化比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm S$)

组别	兔数	TNF- α		IL-6	
		实验前	实验后	实验前	实验后
模型	8	206.3 $\pm$ 60.9	1293.8 $\pm$ 395.9 *	404.0 $\pm$ 163.2	2083.1 $\pm$ 581.1 *
热毒清	8	226.8 $\pm$ 65.3	570.9 $\pm$ 106.2 * Δ	413.1 $\pm$ 133.9	924.4 $\pm$ 169.6 * Δ
地塞米松	8	197.1 $\pm$ 70.2	599.3 $\pm$ 131.7 * Δ	432.5 $\pm$ 136.9	987.5 $\pm$ 230.5 * Δ
正常	8	200.9 $\pm$ 62.1	212.1 $\pm$ 62.1	389.4 $\pm$ 170.2	408.8 $\pm$ 174.7

注: 与本组实验前比较, * $P < 0.01$; 与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$

3 病理学观察 模型组肝脏明显肿大, 可见斑片状坏死灶, 肺脏可见灰白坏死灶及出血点, 肾脏肿大, 肠胀气明显。两治疗组肝脏轻度肿大, 偶见斑点状坏死灶, 肺脏未见出血灶, 肾脏轻度肿大, 肠胀气不明显。正常组无上述变化。肝组织切片 HE 染色示模型组肝脏汇管区明显瘀血, 大量炎性细胞浸润及 Kupffer 细胞增生, 肝小叶结构破坏, 有较多出血灶及点状或片状坏死灶; 肝窦及中央静脉瘀血。两治疗组以肝细胞变性为主, 瘀血较轻, 少见出血灶。Mallory 纤维素染色示模型组血管及肝窦内血栓形成; 两治疗组肝组织血管内偶见血栓形成, 肝窦内极少见血栓形成。正常组无上述变化。

讨 论

我们发现, 在模型组及两治疗组中, 血浆 TNF

- α 和 IL-6 水平的升高与组织、器官的损害程度相一致, 即血浆 TNF- α 和 IL-6 的水平愈高, 则组织、器官的损害亦愈重。其中模型组肝组织内可观察到较多的出血灶及血管、肝窦内有血栓形成。这种结果提示上述机制的存在。经相关分析发现, TNF- α 和 IL-6 水平呈正相关, 可能与 TNF- α 、IL-6 之间的协同作用有关^[3]。

糖皮质激素能调节细胞因子的合成和释放, 这种作用和糖皮质激素给予的时间有关, 与 LPS 同时给予则糖皮质激素可抑制 TNF- α 、IL-6 的合成^[4]。基于此, 我们在评价药物的治疗作用时, 于两次注射 LPS 同时给予地塞米松, 并于第二次 LPS 注射前 12 h 预注射 1 次, 发现血浆 TNF- α 、IL-6 水平明显降低, 并且组织、器官的损伤相应减轻, 这一结果提示用地塞米松降低 TNF- α 、IL-6 水平的同时, 对

DIC 家兔也具有防治 TNF- α 、IL-6 介导的损害作用。我们研究发现热毒清处理后和地塞米松具有同样的效果,提示热毒清可能和地塞米松有类似的作用机制。我们以往类似研究表明热毒清具有清除氧自由基⁽⁵⁾,保护线粒体、稳定溶酶体膜等作用⁽⁶⁾,据此,我们推测,上述保护作用可能是热毒清降低 TNF- α 、IL-6 水平,或者阻断和(或)抑制 TNF- α 、IL-6 合成作用的结果,从而防治家兔内毒素性 DIC,详细机制有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Flad HD, Loppnow H, Rietschel ET, et al. Agonists and antagonists for LPS-induced cytokines. *Immunobiol.* 1993;187:303.

2. 陆付耳,李鸣真,叶望云,等.热毒清抗内毒素损伤线粒体的实验研究. *同济医科大学学报* 1990;19:237.
3. Nolan JP. Intestinal endotoxin as mediators of hepatic Injury-An idea whose time has come again. *Hepatology* 1989;10:887.
4. Baroer AE, Coyle SM, Marano MA, et al. Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine response to endotoxin in man. *J Immunol.* 1993;150:1999.
5. 陆付耳,邓泽明,侯安继,等.热毒清对内毒素所致家兔 DIC 氧自由基代谢的影响. *同济医科大学学报* 1993;22(增刊):52.
6. 李鸣真,叶望云,皇甫永穆,等.“热毒清”抗内毒素所致溶酶体和线粒体损伤的实验研究. *中西医结合杂志* 1989;9(6):412.

(收稿:1994-09-26 修回:1995-02-14)

丹桂散对窦房结恢复时间的影响

孙长春 姚映芷

1993 年 1 月~1994 年 1 月,笔者用自制丹桂散治疗窦房结功能低下或窦房结恢复时间延长患者 32 例,通过食道心房调搏术检查,获得较好的疗效。

临床资料 32 例患者中住院 28 例,门诊 4 例,其中男 25 例,女 7 例,年龄 22~62 岁,平均 47.6 岁,病程 0.5~7 年,平均 2.4 年。临床表现以乏力、头晕、胸闷为主,其中 6 例有黑朦、晕厥史。诊断为冠心病 12 例,高血压病 11 例,疑及病毒性心肌炎 2 例,其余 7 例原因不明。体表心电图均示窦性心动过缓,心率 46~62 次/min。4 例作 24 h 动态心电图检查,心率 41~92 次/min,5 例作阿托品试验,除 1 例心率>90 次/min 外,其余为阳性。

使用苏州市吴县车坊电子仪器厂生产的 CF-3 型心脏电生理程控刺激仪,采用 S₁S₁ 分级递增刺激法,其最长的 S₁-P 即为窦房结恢复时间,如停止调搏后出现的是逸搏心律,则为窦结恢复时间>窦房结恢复时间。窦房结恢复时间<1450 ms 为正常值。本资料 32 例均>1450 ms,其中有 2 例窦结恢复时间>窦房结恢复时间,最长为 2200 ms,最短为 1480 ms,平均为 1804 ms。

治疗方法 患者于检查后 3 日内服用本院自制药丹桂散(由丹皮、丹参、桂枝、人参组成,按 2:2:1:1 之比例,经烘烤粉碎过筛后装成胶囊),每

粒胶囊重约 1.5 g,每次服用 3 粒,每日 3 次,2 周为 1 个疗程。服用本品期间,停用其他有关药物,服用 1~4 个疗程后,复查窦房结恢复时间。

结 果 32 例患者经治疗后,有 2 例窦房结恢复正常,20 例较前缩短(最多缩短 220 ms),2 例窦结恢复时间>窦房结恢复时间者停止调搏后亦出现窦性心律,7 例患者较治疗前延长,1 例无变化。治疗后窦房结恢复时间平均为 1766.3 ms,较治疗前缩短 37.7 ms,治疗前后比较,有显著性差异($P<0.05$)。窦房结恢复时间缩短的同时,患者的基础心率均有所增加,增加 4~12 次/min,且心悸、胸闷、头晕等症状有明显改善,有 2 例未再出现黑朦、晕厥。

体 会 窦房结恢复时间是以时间的形式反映窦房结的自动起搏功能,其特异性和敏感性都较高。窦房结恢复时间延长,在一定程度上总是提示窦房结功能障碍,临床上以心动过缓所引起的症状为主要表现形式,病情严重者须植入人工心脏起搏器。本病中医辨证主要责之于心气(血)不足、心阳虚弱、心血瘀阻。丹桂散中丹皮、丹参养血活血,桂枝、人参益气通阳,可以调节植物神经功能,兴奋交感神经,改善血液循环,对冠状动脉硬化和窦房结纤维化有治疗作用,可以避免或延缓植入人工心脏起搏器。治疗期间,未发现该药有毒副作用。由于病例尚少,其远期疗效有待进一步观察。

(收稿:1994-07-04 修回:1995-02-05)