·实验研究·

牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠肺损伤转化生长因子-β_1 及其受体表达的影响

杜少辉[1] 徐志伟[2] 陈东风[2] 黎 晖[2] 李伊为[2] 廖 欣[1] 魏志军[1]

摘要 **目的** 观察牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠肺损伤转化生长因子-β_1 及其受体表达的影响。**方法** 静脉注射脂多糖内毒素(1.5mg/kg)、腹腔注射 D-氨基半乳糖(100mg/kg)造成内毒素休克模型,用牛珀至宝微丸干预处理,并用免疫组化方法检测转化生长因子-β_1 及其受体在肺组织内的表达。**结果** 牛珀至宝微丸可以使内毒素休克大鼠肺转化生长因子-β_1 及其受体表达增强,肺损伤减轻。**结论** 牛珀至宝微丸减轻内毒素休克肺损伤的机理可能与其增强肺组织转化生长因子-β_1 及其受体表达相关。

关键词 牛珀至宝微丸;内毒素休克;肺损伤;转化生长因子-β_1

Effect of Niupo Zhibao Pellet on Transforming Growth Factor-β_1 and Its Receptor's Expression in Endotoxic Shock Rats with Lung Injury DU Shao-hui, XU Zhi-wei, CHEN Dong-feng, et al *Department of Internal Medicine, Shenzhen Hospital Affiliated to Guangzhou TCM University, Guangdong (518033)*

Objective To observe the influence of Niupo Zhibao pellet (NZP) on transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) and its receptor's expression. **Methods** Endotoxic shock model was established by intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS) 1.5 mg/kg and intraperitoneal injection of D-galactosamine 100 mg/kg, and intervened by NZP, TGF-β_1 and its receptor's expression in lung tissue were detected by immunohistochemical method. **Results** NZP could enhance the TGF-β_1 and its receptor's expression in endotoxic shock lung tissue, and reduce the injury of lung. **Conclusion** The mechanism of NZP in reducing endotoxic shock lung injury is possibly related with its effect in enhancing the TGF-β_1 and its receptor's expression in lung tissue.

Key words Niupo Zhibao pellet; endotoxic shock; lung injury; transforming growth factor β_1

全世界每年约 30 万人患有感染中毒性休克,虽然抗生素已广泛应用并且有重症监护的支持,但其病死率仍高达 35%~60%,而对于病毒感染所致的休克病死率可能更高,内毒素休克及其所致的多脏器衰竭仍是临床面临的一个难题。脂多糖内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞外膜层的主要成分,是引起内毒素性休克的主要因素[1]。转化生长因子(transforming growth factor-β, TGF-β)具有免疫调节与损伤修复功能,在炎症反应及纤维化中起重要作用[2-4],我们前期的工作观察牛珀至宝微丸对内毒素休克肺损伤有改善作用[5],其机理是否与肺 TGF-β_1 及其受体的表达相关?为此,我们进行了以下实验研究。

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 39970914)、广东省中医药管理局项目(No. 98447)及深圳市科技局项目(No. 200004087)

作者单位:1. 广州中医药大学附属深圳医院内科(广州 518033);2. 广州中医药大学

通讯作者:杜少辉,Tel:13312991354;E-mail:dushaohui@163.net

万方数据

材料与方法

1 **动物** 健康普通级 SD 大鼠 48 只,体重220~250g,雌雄不限,雌鼠无孕,由广州中医药大学实验动物中心提供。

2 **试剂与药品** 脂多糖(0111:B_4)为 Sigma 公司产品。TGF-β_1 及其受体 TβRⅡ单抗、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒,均由 Santa Cruz 公司提供。牛珀至宝微丸(主要药物为水牛角、玳瑁、麝香、琥珀、血竭、藏红花、大黄、石菖蒲等,1g/支)由江西中医学院热病研究室提供(批号 9901),将微丸溶于水,制备成含生药量 1mg/ml 的口服液。

3 **分组与造模** 大鼠随机分成正常组、LPS 模型组、中药小剂量组、中药大剂量组,根据成人日服药量折算成大鼠灌胃剂量,牛珀至宝微丸剂量分别为 5mg/100g、10mg/100g,灌胃 1 周;对照组则给予等体积蒸馏水灌胃,连续 1 周。内毒素休克模型参照文献

中方法制作[6],即动物于实验前 12h 禁食,自由饮水,实验时腹腔注射 10%(W/V)水合氯醛(0.3ml/kg)麻醉,分离右颈总动脉,插 PE50 管,BL-410 生理仪观察并记录血压变化,待 10～20min 血压稳定后记录血压并定为记录 0 点。除正常组外,其余各组于尾静脉注射 LPS(1.5mg/kg),腹腔注射 D-氨基半乳糖(100mg/kg),正常组注射等量生理盐水。各组动物于造模 4h 后处死。

4　TGF-β_1 及其受体 TβRⅡ免疫组化反应

4.1　切片制备　大鼠开胸,经升主动脉插管,先用生理盐水 150ml 冲去血管中血液,继而灌注含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(PBS,pH 7.4) 350ml,注毕立即取肺置于相同的新鲜灌注液中固定至组织块沉底,洗去表面的固定液,再取肺组织,继之梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋,石蜡切片,片厚 10μm,HE 染色。

4.2　TGF-β_1 及其受体 TGF-βRⅡ免疫组化反应采用 SABC 法[7]。

4.3　免疫组化染色　同一组片中除用 SABC 法外,另分别用正常山羊血清和 PBS 代替 TGF-β_1 及其受体 TβRⅡ一抗作孵育,其余步骤同 SABC 法,用以检查 TGF-β_1 及其受体 TβRⅡ免疫反应的特异性。

5　统计学方法　切片在光镜的统一放大倍数下(10×20),每只动物随机选 10 张切片,统计其阳性细胞数。所得数据用 SPSS 软件进行统计学处理,均数间两两比较采用 t 检验。

结　　果

1　各组大鼠肺组织 HE 染色结果　正常组大鼠细支气管周围偶有炎细胞浸润,肺泡完整。LPS 组大鼠肺泡腔内有炎性渗出物,大量炎细胞浸润,细支气管收缩闭锁,肺间质增厚,肺泡壁毛细血管扩张充血,腔内有微血栓形成。两中药组大鼠肺泡腔内有炎性渗出物,炎细胞浸润,与模型组比较,渗出减少,水肿减轻,肺间质基本正常,肺泡完整。

2　各组大鼠肺组织 TGF-β_1 免疫组化染色结果　模型组 TGF-β_1 阳性细胞染色浅、表达部位较局限,主要在肺泡腔和肺间质;在肺泡腔内可见胞体圆形,体积较大的巨噬细胞 TGF-β_1 表达阳性;Ⅱ型肺泡 TGF-β_1 表达呈弱阳性,阳性细胞呈立方形,位于Ⅰ型细胞之间;肺间质细胞呈区域性阳性反应,肺泡隔增厚。两中药组 TGF-β_1 阳性细胞染色深,在肺泡腔和肺间质广泛表达,在肺泡腔内可见巨噬细胞 TGF-β_1 表达呈强阳性,阳性细胞胞体呈圆形,胞质染色深,数量多;Ⅱ型肺泡细胞 TGF-β_1 表达呈强阳性,阳性细胞呈立方形,位于Ⅰ型细胞之间,数量多,分布广泛;在肺泡隔内亦见巨噬细胞 TGF-β_1 表达呈强阳性,胞体呈圆形,核小;在肺间质可见大量炎细胞 TGF-β_1 表达呈阳性,主要为中性粒细胞、单核细胞,中性粒细胞 TGF-β_1 表达呈阳性,核呈分叶状;单核细胞 TGF-β_1 表达呈阳性,核呈肾形(见表 1)。

表 1　各组大鼠肺 TGF-β_1 免疫组化染色结果比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	阳性细胞数 (个)	总细胞计数 (个)	阳性率 (%)
正常	12	160±25	300±12	53.0±3.8
模型	12	120±20	300±10	40.0±1.6**
中药小剂量	12	225±25	300±13	75.0±2.5*△
大剂量	12	280±30	300±16	93.0±2.5*△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△$P<0.01$

3　各组大鼠肺组织 TGF-βRⅡ免疫组化染色结果　为进一步证实 TGF-β_1 在内毒素肺损伤中的作用,我们同时检测了其受体是否表达,结果 TβRⅡ表达与 TGF-β_1 类似。TβRⅡ阳性反应定位于细胞膜和细胞质。LPS 组在肺泡腔内可见胞体大,圆形的巨噬细胞 TβRⅡ表达呈阳性;在肺间质内可见胞体较小、圆形的巨噬细胞 TGF-βRⅡ表达呈弱阳性,肺泡隔增厚。两中药组 TβRⅡ阳性细胞染色深,表达部位广泛,主要在肺泡腔、肺泡隔和肺间质。在肺泡腔内可见胞体大、呈圆形巨噬细胞 TβRⅡ表达强阳性;Ⅱ型肺泡细胞 TβRⅡ呈强阳性,胞体近似立方形,数量多;在肺泡隔内亦见胞体呈圆形的巨噬细胞 TβRⅡ表达呈强阳性;在肺间质广泛分布大量 TβRⅡ阳性细胞(见表 2)。

表 2　各组大鼠肺 TβRⅡ免疫组化染色结果比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	阳性细胞数 (个)	总细胞计数 (个)	阳性率 (%)
正常	12	155±15	300±15	52.0±1.5
模型	12	125±10	300±15	42.0±1.2*
中药小剂量	12	245±30	300±18	82.0±2.0*△
大剂量	12	275±35	300±22	92.0±2.0*△

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△$P<0.01$

讨　　论

LPS 通过刺激体内多种细胞,合成和释放各种细胞因子,再通过旁分泌或体循环作用于其他组织细胞,引起全身炎症反应综合征而发生休克、多器官功能衰竭甚至死亡。肺是多器官衰竭的首发器官,急性肺损伤是休克并发的常见危症,而肺纤维化占急性肺损伤病死率的 40%～70%[1,8]。TGF-β 是由多种细胞分泌的具有多重生物学效应的细胞因子,5 种亚型之间有较高的同源性及相似的功能,其中以 TGF-β_1 所占比

正方数据

例最高、活性最强。TGF-β 有三种类型受体,广泛分布于细胞表面,而 TGF-βR Ⅱ 在细胞内信号转导中起关键作用。TGF-β 不但能调节细胞的生长与分化,而且还具有免疫调节与损伤修复功能,因此,在急性肺损伤炎症反应及其纤维化中起重要作用。TGF-β 在炎症初期虽可募集炎症细胞和促进前炎症细胞因子生成,但在炎症反应中其抑制作用更为突出[2-4]。20 世纪 80 年代国外有报道内毒素可减轻博莱霉素所致的肺纤维化[9],并提出免疫抑制可能是其机理。本实验在病理组织中观察到内毒素休克时可见肺纤维化形态学改变,这与目前共识的急性肺损伤早期发生纤维化的新观点一致,并且 TGF-βR Ⅱ 表达与 TGF-β_1 一致;与此相反的是 TGF-β_1 在博莱霉素等所致的肺纤维化表达往往增强[10],TGF-β_1 在内毒素所产生的肺纤维化与博莱霉素等所致的肺纤维化表达之不同,探讨其机理对包括 SARS 在内各种因素所致急性肺损伤纤维化的认识可能有一定意义。

牛珀至宝微丸是根据清代何廉臣《重订广温热论》所载犀珀至宝丹而化裁,何氏称其"此丹大剂通瘀直达心窍,又能上清脑络,下降浊阴,专治一切时邪内陷血分,瘀塞心房,不省人事"。本方是在中医"三宝"之一的至宝丹基础上增加了通瘀开窍、辟秽化浊的功能,并且为了使其更有利于体内吸收,本课题组将其改为微丸剂型。本课题组在国家"七五"攻关中医急症项目中从事流行性出血热的临床研究时,认识到感染性休克的中医病理基础是内闭外脱证,其中内闭主要为瘀、热、湿互结,并依此而选用牛珀至宝微丸用于临床,取得了较好的疗效[11]。以后在动物实验中证实牛珀至宝微丸对内毒素休克所致的肝、肺、肾损伤有明显改善作用[5,11-14],其机理与下调诱导型一氧化氮合酶表达相关,而诱导型一氧化氮合酶在内毒素的刺激下,可持续大量产生一氧化氮,其作用于巯基而使与能量代谢或抗氧化有关的酶失活,并可抑制非血红素铁-硫酶,干扰能量代谢,间接或直接损伤 DNA,与超氧阴离子反应生成毒性更强的 $ONOO^-$,造成细胞和组织的死亡[15-17]。TGF-β_1 可抑制细胞因子和氧、氮基因的生成,诱导细胞因子拮抗剂的表达,改变细胞黏附分子的表达以及抑制免疫球蛋白的分泌等;并对炎症所致的损伤修复有促进作用。有报道使用 TGF-β_1 可抑制内毒素休克时一氧化氮的产生[18]。牛珀至宝微丸可增强 TGF-β_1 表达,在肺泡巨噬细胞尤其明显,表明可使 TGF-β_1 一方面可作为抗炎递质抑制炎症因子如诱导型一氧化氮合酶的级链放大,使全身炎症反应得到遏制;另一方面在 Ⅱ 型肺泡细胞及肺间质的强表达,通过参与组织修复而减轻炎症所致的损伤。说明牛珀至宝微丸治疗内毒素肺损伤的机理与调节 TGF-β_1 表达相关。

万方数据

参 考 文 献

1 Glauser MP, Zanetti G, Baumgarther JD, et al. Septic shock: pathogenesis. Lancet 1991;338(8769):732—736.

2 Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. Sci 2002;31;296(5573):1646—1647.

3 Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett 2002;82(1—2):85—91.

4 Marek A, Brodzicki J, Liberek A, et al. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions——a new diagnostic and prognostic marker? Med Sci Monit 2002;8(7):RA145—151.

5 黎 晖,杜少辉,李伊为,等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠肺损伤 NOS 表达的影响. 广州中医药大学学报 2002;19(4):312—314.
Li H, Du SH, Li YW, et al. Influence of Niu-po-zhi-bao pellet on NOS expression of lung in endotoxin shock rat. J Guangzhou Univ TCM 2002;19(4):312—314.

6 Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: A review of laboratory model and a proposal. J Surg Res 1980;29:189—196.

7 汪 谦. 现代医学实验方法. 北京:人民卫生出版社,1997:43—45.
Wang Q. Current medical experimental protocals. Beijing: People's Medical Publishing House,1997:43—45.

8 Marshall R, Bellingan G, Laureut G. The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. Thorax 1998;53:815—817.

9 Phan SH, Gantone JC. Inhitition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by lipopolysaccharide. Lab Invest 1984;50(5):587—591.

10 蔡后荣,戴令娟,郑培德,等. 肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子-β_1 和前胶原基因的表达. 中华医学杂志 2001;81(4):247—248.
Cai HR, Dai LJ, Zheng PD, et al. Expression of TGF-β_1 and procollagen gene in lung of rats after pulmonary fibrosis. Natl Med J China 2001;81(4):247—248.

11 万兰清,马超英,耿 耘,等. 开闭固脱法治疗感染性休克 106 例的临床与实验研究. 中国病理生理杂志 1994;10(增刊):60—63.
Wan LQ, Ma CY, Geng Y, et al. Clinical and experimental study of Kai-bi-gu-tuo therapy on 106 patients of septic shock. Chin J Pathophysiol 1994;10(sulp):60—63.

12 杜少辉,周大桥,张 悦,等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克蛋

白激酶 C 调控 NO 生成的影响. 中国中西医结合急救杂志 2002;9(4):189—193.
Du SH, Zhou DQ, Zhang Y, et al. Effect of Niu-po-zhi-bao pellet on nitric oxide expression regulated by protein kinase C induced by lipopolysaccharide. Chin J Integr Tradit West Med Intern Crit Care 2002;9(4):189—193.

13 张　悦,杜少辉,周大桥,等. 蛋白激酶 C 对内毒素休克大鼠肝损伤 iNOS 表达的调控. 中华肝胆外科杂志 2003;9(6):377—379.
Zhang Y, Du SH, Zhou DQ, et al. The expression of inducible nitric oxide synthase regulated by protein kinase C in injured rat liver induced by septic shock. Chin J Hepatobiliary Surg 2003;9(6):377—379.

14 李伊为,邓汝东,陈东风,等. 牛珀至宝微丸对内毒素休克肾组织 iNOS 表达的影响. 解剖学研究 2003;25(1):13—15.
Li YW, Deng RD, Chen DF, et al. Influence of Niu-po-zhi-bao pellet on iNOS expression in the kidney in endotoxin shock rat. Anat Res 2003;25(1):13—15.

15 Anggard E. Nitric oxide: mediator, murder and medicine. Lancet 1994;343:1199—1206.

16 Wong ML, Rettori V, Shekhlee A, et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. Nat Med 1996;2(5):581—584.

17 杜少辉,张　悦,魏志军,等. 蛋白激酶 C 对内毒素诱导的诱导型一氧化氮合酶基因表达的调控作用. 中华医学杂志 2002;82(21):1488—1492.
Du SH, Zhang Y, Wei ZJ, et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by protein kinase C. Natl Med J China 2002;82(21):1488—1492.

18 Perrella MA, Hsieh CM, Lee WS, et al. Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor beta. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93(5):2054—2059.

(收稿:2003-10-02　修回:2004-03-24)

乌雷合剂治疗包虫病 120 例

刘振忠　李永祥　刘　梅　孙志萍　李增春

1993 年 1 月—2001 年 1 月,我们采用纯中药验方乌雷合剂治疗多脏器包虫病 120 例,现总结报告如下。

临床资料　所有患者均经 B 超或经 CT 检查证实,120 例,男 52 例,女 68 例;年龄 8~67 岁,平均 34 岁;病程 1~6 年,平均 1.6 年;单纯性肝包虫 95 例,肝腹包虫 18 例,肝肺包虫 7 例;囊性多房型 87 例,单房型 33 例;病例中曾接受过手术治疗者 86 例,手术次数:1 次者 14 例,2 次者 56 例,3 次者 15 例,8 次者 1 例;棘球蚴囊 > 10cm 者 33 例,6~9cm 者 75 例,棘球蚴囊 < 6cm 者 12 例。

治疗方法　乌雷合剂组成:乌药 10g　雷丸 10g　南瓜子 30g　槟榔 30g　牛尾草 30g,如有表实肥胖者可加丹参、桃仁、红花,气虚者加黄芪,血虚者加鸡血藤,每天 1 剂,先用半量 2 次煎汤内服,如无不良反应,3 天后加至全量继续服药。服药同时忌食高脂肪、高蛋白、高糖饮食。

结　果

1　疗效标准　临床治愈:B 超显示包虫囊壁内暗区可见不规则小强光点分布及囊壁皱缩,肺部 X 线片示囊壁皱缩呈块状阴影;单房型包虫囊肿无钙化,CT 表现为囊性病变,平扫可见等密度的囊壁,增强后囊壁轻度强化或显示不清,其余包虫囊壁可见局限性皱褶或不规则,多房型包虫囊肿 CT 可见多个子囊和程度不同的基质密度增高;增强扫描子囊充满囊腔,可见囊外囊;随访 0.5 年无复发。有效:B 超示囊腔暗区部分或大部分有小强光点分布。无效:用药 > 150 天,临床症状及体征、B 超检查包虫囊腔无改变。

2　疗效　120 例患者中,有 62 例服药 90 天临床治愈,42 例服药 120~150 天时临床治愈(其中有 32 例为囊性多房型包虫);有效 16 例。治愈的 64 例患者 2 年后随访,经 B 超、肺部 X 线片均显示囊壁变性皱缩塌陷。3 例经手术证实病理所见囊壁有一暗褐色沉淀线,囊壁纤维层断裂,角质层厚薄不均,生发层细胞浊肿明显,囊腔内有大量坏死物质及子囊。

3　不良反应　有 18 例患者服药后出现有恶心、呕吐,经服药后舌下含鲜姜片即可缓解,有 24 例患者服药后出现荨麻疹等过敏反应,可行抗过敏对症处理,仍可继续服药。服药期间患者的肝肾功能指标检查均正常。

讨　论　包虫病是人感染了棘球绦虫的幼虫(棘球蚴)所致的慢性地方性寄生虫病。棘球蚴侵入肝脏、肺脏所致患者有缓慢的腹部和肺部无痛性肿块,包虫病目前临床治疗手段仍以外科手术为首选方法,但术后包虫复发率为 10%。化疗药物治疗选用吡喹酮、丙硫咪唑,但不良反应大,同时还存在着抗药性和复发等问题,且服药时间长,效果不尽满意。乌雷合剂治疗包虫病疗程短,效果满意,不良反应少等特点。方中乌药、雷丸、槟榔和南瓜子均具有驱虫、杀虫、消积痞,缓解湿阻气滞、脘腹痞满、虫积腹痛的药效;红花、丹参、桃仁等具祛瘀止痛,活血通经,清湿热,祛　瘕痞块的协同功效。服药后病理组织学观察可见囊壁有一暗褐色沉淀线,从组织学损伤的角度看,镜下可见囊壁纤维层断裂,结构紊乱,角质层厚薄不均,条纹断裂,生发层滋养细胞浊肿明显,并有空泡形成,囊腔内有暗黄色大量坏死物质及子囊,未见有原头蚴等结构。说明乌雷合剂对棘球蚴囊壁组织有一定的损伤,对包虫病确有一定的疗效。对其疗效及中药有效成分尚需继续探讨,以利于临床治疗应用更方便。

作者单位:新疆石河子大学医学院(新疆 832000)

(收稿:2003-05-07　修回:2004-02-16)

万方数据