

桃红芩连汤对脓毒症大鼠心肌高迁移率族蛋白 B1 的影响

顾忠民 林绍彬 刘才俊 齐心欣

摘要 目的 观察脓毒症大鼠心肌高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、肌钙蛋白 I (Tn I) 的水平,探讨桃红芩连汤治疗脓毒症心肌损伤机制。**方法** 48 只清洁级健康雄性 Wistar 大鼠随机分成假手术组 (Sham 组)、脓毒症模型组 (CLP 组)、脓毒症中药治疗组 (ZY 组),每组 16 只。于手术后 24、48 h 分别检测 TNF- α 、IL-6、Tn I、HMGB1 浓度,光镜观察心肌病理变化。**结果** 与 Sham 组比较,CLP 组在 24、48 h TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 水平均显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);与 CLP 组同期比较,ZY 组 24、48 h 时 TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 浓度均明显下降,差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。光镜下 CLP 组和 ZY 组可见心肌损伤,CLP 组较 ZY 组损伤明显。**结论** 桃红芩连汤可降低脓毒症相关炎症因子水平,对心肌有保护作用。

关键词 桃红芩连汤;脓毒症;心肌细胞;高迁移率族蛋白 B1

Effect of Taohong Qinlian Decoction on HMGB1 in Septic Rat Cardiac Muscle GU Zhong-min, LIN Shao-bin, LIU Cai-jun, and QI Xin-xin Department of Intensive Care Unit, Fuzhou Second Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou (350007)

ABSTRACT Objective To observe the levels of high mobility group box-1 protein (HMGB1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, troponin I (Tn I) release in septic rats, and to explore the mechanism of Taohong Qinlian Decoction (TQD) in the treatment of septic myocardial injury. **Methods** A total of 48 healthy male Wistar rats of clean grade were randomly divided into the sham-operation group (Sham), the sepsis model group (CLP), and the TQD treatment group (ZY), 16 in each group. Concentrations of TNF- α , IL-6, Tn I, and HMGB1 expression were detected in each group at 24 and 48 h after operation. Pathological changes of cardiac muscle were observed under light microscope. **Results** Concentrations of TNF- α , IL-6, Tn I and HMGB1 at 24 and 48 h after operation were significantly higher in the CLP group than in the Sham group ($P < 0.01$). Concentrations of TNF- α , IL-6, Tn I, and HMGB1 at 24 and 48 h after operation were significantly lower in the ZY group than in the CLP group ($P < 0.05$). Myocardial injury occurred in the CLP and the ZY group under light microscope. And this injury was more severe in the CLP group than in the ZY group. **Conclusion** TQL could reduce the level of sepsis-related inflammatory cytokines and protect myocardium in septic rats.

KEYWORDS Taohong Qinlian Decoction; sepsis; myocardium; high mobility group box 1 protein

脓毒症是指微生物入侵机体感染后所致的全身性炎症反应综合征,脓毒症性心功能障碍是目前临床发病率和病死率较高的危重症,目前相关机制未

明^[1]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 随着其促炎效应的发现,这种晚期炎性介质成为危重医学研究的重要课题^[2]。目前脓毒症性心肌损害的西医治疗包括抗感染、抗休克、免疫调节等,但只是改善患者症状,其病死率仍居高不下。中医学认为脓毒症基本病机是正虚毒损、络脉瘀滞^[3],应活血化瘀、清热解毒。笔者在桃红四物汤及普济消毒饮基础上加減制定了桃红芩连汤,通过实验比较脓毒症大鼠给予中药桃红芩连汤治疗后相关炎症因子,如 HMGB1、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和心肌

基金项目:福建省科技厅 2014 重点项目 (No. 2014D029);福州市科技局项目 (No. 2013-S-123-1)

作者单位:厦门大学附属福州市第二医院重症医学科 (福州 350007)

通讯作者:顾忠民, Tel:15859100698, E-mail:0194654@sina.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 04. 0445

组织肌钙蛋白 I (Tn I) 的水平变化,探讨桃红芩连汤是否可减轻脓毒症炎症反应而起到保护心肌的作用,为脓毒症中医药治疗提供必要依据。

材料与方法

1 动物及分组 48 只清洁级健康雄性 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002,通过 SAS 软件 PROC PLAN 过程得出随机数字,按 1:1:1 随机分为 3 组,即假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)、脓毒症中药治疗组(ZY 组),每组 16 只。

2 药物 桃红芩连汤方剂组成为桃仁 9 g 红花 9 g 当归 9 g 川芎 9 g 赤芍 9 g 牡丹皮 9 g 连翘 12 g 蒲公英 15 g 黄连 6 g 黄芩 9 g,先用凉水浸泡 30 min,用水量为生药量的 8 倍,武火煎沸后文火煎 30 min,滤出药液,再加 6 倍水量煎沸后文火煎 20 min,滤出药液,合并 2 次煎液,置 70~80℃水浴中浓缩至 150 mL(相当于生药 0.64 g/mL),放于 4℃冰箱保存。

3 试剂及仪器 大鼠 TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 ELISA 试剂盒均由英国 Abcam 公司生产,10%水合氯醛溶液(上海强顺化工有限公司),10%甲醛溶液(西陇化工股份有限公司),离心机(河北省安新县白洋离心机厂,型号 BFX5-320),酶标仪(美国 Awareness 公司,型号 Stat Fax 2100),光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号 BX51TF)等。

4 方法

4.1 模型制作 CLP 组和 ZY 组应用盲肠结扎穿孔法^[4]造模。即:术前所有大鼠在标准条件下适应性饲养 1 周,给以 10%水合氯醛 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉,在腹壁正中做一长 2 cm 的手术切口,拉出盲肠,盲肠中段用丝线结扎,在扎线下 0.5 cm 处用国产 25 号针头贯穿肠壁 1 次,形成漏口 2 处,回纳盲肠并逐层缝合关腹。Sham 组行 10%水合氯醛 3.5 mL/kg 麻醉后开腹、关腹,但不予盲肠结扎穿孔。3 组术毕均皮下注射平衡液 50 mL/kg 抗休克治疗,术后正常饮食、自由饮水。

4.2 给药方法 ZY 组按成人(60kg 体重)日用量 96 g 换算成大鼠等效剂量 10 g/(kg·d)(换算系数 6.25),再根据大鼠的实际体重计算出给药剂量 2 g/d,根据中药浓度计算出给药量约 3 mL。术前 1 h 予桃红芩连汤 3 mL 灌胃,术后 24、48 h 各中药灌胃

1 次,每次为 3 mL。CLP 组和 Sham 组术前 1 h 予生理盐水 3 mL 灌胃,术后 24、48 h 生理盐水灌胃 1 次,每次 3 mL。

4.3 标本采集 术后 24、48 h 3 组各取 8 只大鼠经水合氯醛麻醉后,开腹取腹主动脉血 2 mL,待自然凝固后于 1 h 内 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清置 -80℃冰箱保存以待测 TNF- α 、IL-6、Tn I;同时打开胸腔,分离心脏,取右心室部分心肌组织迅速放入 10%甲醛溶液中固定,常温保存以待病理检查;取左心室肌组织 100 mg 制成匀浆,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液置 -80℃冰箱保存以待测 HMGB1。

4.4 观察项目及检测方法

4.4.1 TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 浓度测定 按照说明书采用 ELISA 方法测定血清 TNF- α 、IL-6、Tn I 及心肌组织 HMGB1 浓度。

4.4.2 心肌组织病理 取 10%甲醛固定后的右心室心肌组织,石蜡包埋后常规切片,光学显微镜下观察心肌组织病理情况。

4.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用成组 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 制作脓毒症大鼠模型过程中,CLP 组死亡 2 只(术后 24 h 及 48 h 各死亡 1 只),ZY 组死亡 1 只(术后 48 h 死亡 1 只),Sham 组无死亡。死亡原因主要与实验鼠盲肠肿胀明显、流出粪便多、腹腔感染重、肠壁缺血时间长等因素有关。

2 各组 TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 浓度比较(表 1) 与 Sham 组比较,术后 24、48 h CLP 组 TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与 CLP 组同期比较,ZY 组 24、48 h TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 浓度均明显下降,差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组大鼠心肌组织变化比较(图 1) Sham 组大鼠心肌组织纤维束排列均匀,心肌细胞内横纹清晰可见,细胞间质无增宽、充血等病理改变;CLP 组可见心肌细胞肿胀、组织呈灶性颗粒样变性,甚至出现细胞间质增宽、渗出明显;而 ZY 组治疗后心肌细胞变性、肿胀有所减轻,未见细胞间质渗出改变。

表 1 各组大鼠术后 24、48 h TNF- α 、IL-6、Tn I 及 HMGB1 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	术后时间	TNF- α (ng/L)	IL-6(pg/mL)	Tn I (μ g/L)	HMGB1(μ g/L)
Sham	8	24 h	43.53 \pm 2.02	55.79 \pm 12.22	3.76 \pm 0.91	9.81 \pm 1.10
	8	48 h	44.68 \pm 2.36	59.01 \pm 13.05	3.33 \pm 0.66	9.26 \pm 0.86
CLP	7	24 h	66.32 \pm 3.28 *	122.39 \pm 46.88 *	9.62 \pm 0.91 *	28.91 \pm 1.65 *
	7	48 h	72.40 \pm 5.88 *	139.04 \pm 60.09 *	14.26 \pm 0.71 *	38.21 \pm 4.65 *
ZY	8	24 h	59.70 \pm 1.45 Δ	108.78 \pm 40.90 Δ	8.01 \pm 1.85 Δ	21.41 \pm 2.75 Δ
	7	48 h	57.63 \pm 2.76 Δ	94.11 \pm 28.72 Δ	7.36 \pm 0.98 Δ	19.30 \pm 2.05 Δ

注:与 Sham 组同期比较, * $P < 0.01$; 与 CLP 组同期比较, $\Delta P < 0.05$

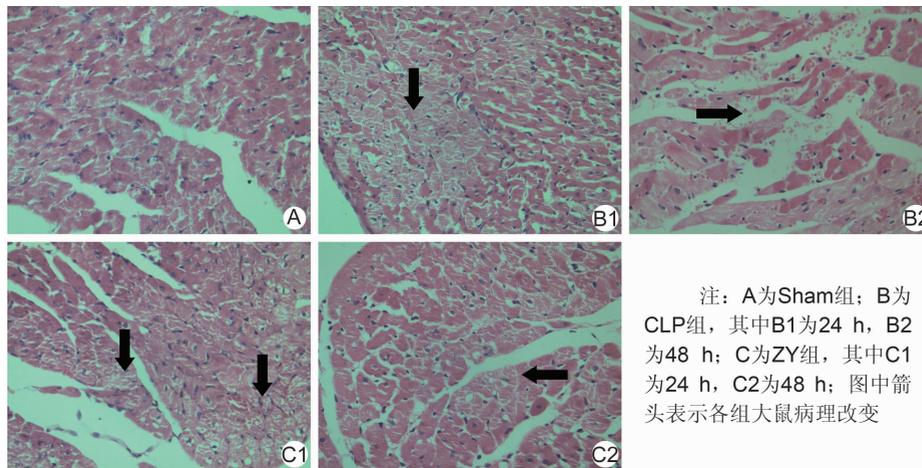


图 1 各组大鼠心肌组织光镜结果 (HE 染色, $\times 400$)

讨 论

脓毒症属中医学“热病”范畴。中医学者认为脓毒症属“正虚邪实”。刘清泉^[3]提出脓毒症乃邪毒入侵(严重感染)导致邪热炽盛,热入营血,血热互结,瘀热阻络,最终气血失调,血流瘀滞,瘀毒互阻脉道,脉络失和。本着活血化瘀、清热解毒原则,笔者在桃红四物汤及普济消毒饮基础上加减制定了桃红芩连汤。方中选用桃仁、红花、当归、川芎、赤芍、牡丹皮、连翘、蒲公英、黄连、黄芩组成桃红芩连汤。该方以祛瘀为核心,辅以养血行气、清热解毒。方中以破血之品桃仁、红花为主,活血化瘀;以甘温之当归补血、活血;川芎活血行气、调畅气血,以助活血之功;赤芍、牡丹皮凉血散瘀,连翘、蒲公英、黄连、黄芩清热解毒,使瘀毒祛、新血生、气机畅,化瘀生新、清热解毒是该方的显著特点。现代研究认为桃仁、红花、当归、川芎、赤芍、牡丹皮具有抗炎,扩血管,改善微循环,抗休克作用;连翘、蒲公英、黄连、黄芩具有抗多种病原微生物、抗内毒素、抗炎症反应作用^[5,6]。然而其是否能够减轻脓毒症大鼠心肌炎症反应从而产生心肌的保护效果,国内外尚未见报导。

目前研究认为,心肌抑制是严重脓毒症和脓毒性休克的常见并发症和死亡危险因素之一。脓毒症性心肌损害与心肌细胞低氧、线粒体损伤以及炎症失衡、免

疫调节紊乱等因素有关。其中多种炎性细胞因子参与了变化,包括 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 ET-1 等^[7],它们既是脓毒症发生发展的重要促炎因子,同时也可以直接抑制心肌收缩造成心肌损伤,其水平增高常提示感染严重、预后差,故降低促炎细胞因子的水平有重要意义。本研究发现 CLP 组 TNF- α 和 IL-6 水平明显增高,同期心肌病理损伤改变明显,随着病情延长其浓度增高,这些提示 TNF- α 和 IL-6 参与了脓毒症心肌的持续损害。而 ZY 组 TNF- α 和 IL-6 水平较 CLP 组有显著下降,心肌病理损伤改变较轻,提示桃红芩连汤可下调其水平而减轻脓毒症性心肌损害。

TnI 是心肌坏死时的特异性标志物,近来发现许多重症患者均存在血清 TnI 升高,一项 Meta 分析表明,血清 TnI 升高可见于 60% 左右冠脉无异常的重症患者,其中脓毒症患者 TnI 升高的发生率可达 40% ~ 60%^[8],但目前相关研究仍较少。本实验发现 CLP 组大鼠 TnI 水平明显高于 Sham 组,提示 CLP 组存在心肌损伤,其符合病理改变。随着炎症发展,TnI 水平也逐步增高,提示脓毒症心肌损害持续存在。目前研究发现严重脓毒症和脓毒症性休克患者,常常出现心肌受损,而 TnI 持续增高往往提示预后不良^[9],因此积极控制其水平有望改善预后。本实验发现 ZY 组 TnI 水平有显著下降,伴随心肌病理损伤减轻,故提示桃红芩连汤可有效减轻心肌炎

症损伤而改善病情变化。

目前研究认为 HMGB1 作为新的晚期炎症因子存在于多种非特异性炎症过程中,组织细胞的坏死、损伤均可使 HMGB1 释放至细胞外;其参与了脓毒症发病过程,是内毒素致死效应的重要晚期炎症介质。新近研究发现其可能成为新型心肌抑制因子参与了脓毒症心肌损伤过程^[10],但相关研究仍少。本实验发现 CLP 组大鼠心肌组织病理损伤显著,同期 HMGB1 水平增高明显,提示 HMGB1 参与了脓毒症心肌损伤过程;而 ZY 组 HMGB1 水平有显著下降同时伴随心肌病理改变减轻,提示中药可通过抑制其表达水平而减轻心肌损害。本研究发现 CLP 组大鼠 48 h HMGB1 水平较 24 h 组有所增高,提示其表达存在一定时间依赖性。目前实验观察到脓毒症大鼠心肌组织中 HMGB1 mRNA 相对含量随时间点逐步改变,12 ~ 24 h 开始增高,48 h 时达到高峰,并持续至 72 h,提示脓毒症发生时, HMGB1 在大鼠心肌组织中具有时间依赖的高表达,可能会造成晚期大鼠心功能抑制^[11]。本研究提示 ZY 组 48 h HMGB1 水平较同期 CLP 组有明显下降,提示桃红芩连汤可持续抑制 HMGB1 表达而起到减轻脓毒症心肌损伤作用。

综上本研究提示脓毒症 TNF- α 、IL-6 等相关炎症因子表达增强,参与了脓毒症心肌损害。HMGB1 作为一重要的晚期炎症因子介导了心肌病理损伤。桃红芩连汤通过降低脓毒症时炎症因子水平而起到减轻心肌损害、保护心肌的作用。

参 考 文 献

- [1] Pulido JN, Afessa B, Masaki M, et al. Clinical spectrum, frequency, and significance of myocar-

dial dysfunction in severe sepsis and septic shock [J]. Mayo Clin Proc, 2012, 87(7): 620-628.

- [2] 饶小龙,孙航,吴传新. HMGB1 在脓毒症中的致病机制及靶向治疗前景[J]. 生理科学进展, 2014, 45(6): 458-461.
- [3] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识[J]. 北京中医, 2007, 26(4): 198-200.
- [4] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture[J]. Shock, 2005, 24(1): 52-70.
- [5] 李翊,彭代银. 桃红四物汤药理学研究进展[J]. 安徽医院, 2011, 15(5): 529-531.
- [6] 张保国,程铁峰,刘庆芳. 普济消毒饮药效及临床研究[J]. 中成药, 2010, 32(1): 117-120.
- [7] 田慈,谢苗荣. 脓毒症心肌损伤机制的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(2): 148-150.
- [8] Jozwiak M, Persichini R, Monnet X, et al. Management of myocardial dysfunction in severe sepsis[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32(2): 206-214.
- [9] Tiruvoipati R, Sultana N, Lewis D. Cardiac troponin dependently predict mortality in critically sepsis[J]. Emerg Med Australas, 2012, 24(2): 151-158.
- [10] Xu H, Su Z, Wu J, et al. The alarm in cytokine, high mobility group box 1, is produced by viable cardiomyocytes and mediates the lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction via a TLR 4/phosphatidylinositol 3-kinase gamma pathway[J]. J Immunol, 2010, 184(3): 1492-1498.
- [11] 岳生妣,董湘玉,倪倩. 高迁移率族蛋白 B1 mRNA 在脓毒症大鼠心肌组织的表达及意义[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(2): 175-178.

(收稿:2015-04-08 修回:2015-11-24)

《中国中西医结合杂志》荣获中国科协精品科技期刊项目

按照《中国科协精品科技期刊工程项目实施方案(2015—2017)》,通过项目申报,资格审查及专家评审,分别评选出精品科技期刊 TOP50 项目 50 项,学术质量提升项目 120 项,数字出版建设项目 11 项,集群(联盟)建设项目 11 项,出版人才培养项目 2 项,精品科普期刊项目 5 项,共 199 项。《中国中西医结合杂志》进入 TOP50 项目。