

黄芪参附注射液对脂多糖致肺损伤大鼠 Th1/Th2 细胞因子干预作用的实验研究

★ 朱黎红¹ 任自力¹ 石亚洁¹ 祝晓² (1. 浙江中医药大学附属广兴医院 杭州 310007; 2. 浙江中医药大学 杭州 310053)

关键词: 脂多糖; 大鼠; 肺损伤; IFN- γ ; IL-4; 黄芪参附注射液
中图分类号: R 285.5 文献标识码: A

多器官功能障碍综合征(MODF)发病急, 炎症介质瀑布样释放, 导致细胞免疫功能的抑制。目前认为 MODF 免疫抑制阶段存在急性虚症与 Th 细胞失衡相关^[1,2], 大部分的实验证明急性肺损伤(ALI)时存在 Th1 细胞向 Th2 细胞漂移, 影响 ALI 结局的是过度和持久的宿主防御反应而不是促使损害产生的病因^[3]。本实验通过黄芪、参附的预防治疗, 观察组织形态学、支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IFN- γ 、IL-4 等指标, 探讨扶正固本的中药是否通过调整 Th 细胞失衡对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤起到预防作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, 体质量(207 ± 10)g, 30 只由浙江中医药大学动物实验中心提供。

1.2 药物 脂多糖(LPS, 美国 sigma 055: B₅ 公司); 参附注射液(10ml/支, 雅安三九制药有限公司); 黄芪注射液(10 ml/支, 成都地奥九泓制药厂)。

1.3 主要试剂和仪器 大鼠 IFN- γ 、IL-4 ELISA 试剂盒(深圳晶美生物公司); OLYMPUS BX50 显微摄像系统(日本 OLYMPUS 公司); 酶标测试仪(芬兰 Labsystems 公司); FA2104 电子分析天平(上海天平仪器厂)。

2 方法

2.1 实验分组及处理 30 只大鼠随机分成 5 组: 生理盐水组(NS), 肺损伤组(ALI), 黄芪组(HQ), 参附组(SF)、黄芪加参附组(HQ+SF)。NS 组和 ALI 组给予生理盐水 2 ml 腹腔注射, HQ 组给予黄芪 1 ml/只腹腔注射, SF 组给予参附 1 ml/只腹腔注

射, HQ+SF 组给予黄芪 1 ml 加参附 1 ml/只腹腔注射, 每日上午给药一次。

2.2 造模 整个实验共 7 天, 实验第 7 日, 于腹腔注射 2 小时后, 除 NS 组外, 各组给予 LPS 5 mg/kg 尾静脉注射, NS 组给予等量生理盐水尾静脉注射。

2.3 标本收集与检测 造模 12 小时后, 以 50 g/L 异戊巴比妥钠 1 mg/kg 腹腔注射麻醉, 分离腹主动脉采血后分离血清, 分离气管, 行气管插管, 右肺中叶 10% 甲醛固定, 逐级酒精脱水, 石蜡切片, HE 染色, 左肺 2 ml $\times$ 3 次行支气管肺泡灌洗, 血清、BALF 离心后上清液 -20℃ 冻存。

2.4 观察指标 照 IFN- γ 、IL-4 ELISA 试剂盒使用说明检测 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 含量, 光镜下观察肺组织病理变化, 观察肺泡、间质炎性改变、出血和肺水肿的程度。每种改变以 0~3 级评分(正常 0 分; 轻度改变 1 分; 中度改变 2 分; 重度改变 3 分), 以每组标本的均值作为该组的肺损伤评分^[4]。

2.5 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件包进行统计, 各组数据采用均数 $\pm$ 标准差表示, 用单因素方差分析。

3 结果

3.1 大体观察 ALI 组肺组织肺体积增大, 表面肿胀明显, 脏层胸膜张力较高, 呈暗红色, 甚至紫褐色, 可见包膜下点片状出血, 切面疏松, 可见大量血性泡沫样液体; 治疗各组肺组织表面肿胀明显减轻, 未见紫褐色, 略有暗红色, 切面血性泡沫样液体明显减少。

3.2 病理组织学观察 光镜观察显示 ALI 组大鼠

肺间质弥漫性出血,肺泡腔内大量红细胞渗出和炎症细胞浸润,部分切片可见灶状肺不张,透明膜形成。中药治疗各组肺间质及肺泡毛细血管扩张、出血炎症细胞浸润程度均减轻。各组肺损伤评分均值:ALI组(3.0分)显著高于NS组(0.3分);HQ组(1.5分)、SF组(1.7分)、HQ+SF组(1.5分)较ALI组明显减低。

3.3 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 的含量 见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 浓度比较($\bar{x} \pm s$, pg·ml⁻¹)

组别	n	IFN- γ	IL-4
NS 组	6	81.04 $\pm$ 4.76	22.70 $\pm$ 1.28
ALI 组	6	55.55 $\pm$ 4.69*	32.07 $\pm$ 2.48*
HQ 组	6	100.32 $\pm$ 4.67* Δ	33.59 $\pm$ 3.75*
SF 组	6	55.69 $\pm$ 3.99*	34.01 $\pm$ 1.17*
HQ+SF 组	6	150.54 $\pm$ 9.16* $\Delta\blacktriangle$	30.95 $\pm$ 2.33*

注:与 NS 组比较,* $P < 0.01$;与 ALI 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 HQ 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

4 讨论

内毒素血症时机体炎症反应的同时伴有抗炎反应发生,且早期以炎症反应为主,晚期以抗炎反应为主。实验证明,内毒素休克 ALI 时存在 Th1 向 Th2 漂移机制,表现为 ALI 时存在 IFN- γ 含量逐渐降低,而 IL-4 含量则持续升高,且 IFN- γ 下降较 Th2 细胞因子上升更明显^[5],说明机体普遍存在细胞免疫功能低下,表现为抗炎反应增强。此时治疗的重点应促进 Th0 向 Th1 细胞分化,同时下调 Th2 通路,重建细胞免疫功能,恢复促炎/抗炎平衡。

Th1/Th2 失衡与中医本质有着一定关系,一些学者提出中医证的本质是细胞因子,认为其基本发病机制是由于细胞因子网络的平衡紊乱^[6]。Th1/Th2 平衡与传统的阴阳学说——“阴平阳秘,精神乃治;阴阳离绝,精气乃决”相吻和。目前认为 MODS 免疫抑制阶段存在急性虚证,它与中医传统理论“久病多虚”的虚证不同,是致病因素导致机体短时间内出现阴阳、气血、脏腑功能迅速虚衰的证候^[2]。同时动物实验也证明,阴阳失调模型小鼠的 Th1/Th2 类细胞因子表达均呈抑制状态,阴虚与阳虚的差别在于 Th1 类细胞因子 IFN- γ 表达的抑制程度不同^[7]。因此对于急性虚证严重免疫抑制的患者仅降低促炎细胞因子是不够的,还应该全面调理其免疫功能,选用相应的方药进行扶正固本治疗,主动调节宿主防御反应,恢复机体内环境的动态平衡,应当是中西医结合治疗急性危重病思路和方法的方向。

本实验观察到 HQ、SF、HQ+SF 组肺病理结果显示肺损伤程度明显减轻,说明 HQ、SF、HQ+SF 对急性肺损伤都有防治作用。观察 BALF 中 IFN- γ 、IL-4 发现:与 ALI 组比较,HQ 组有明显提高 IFN- γ 水平的作用,单独使用 SF 组 IFN- γ 、IL-4 与 ALI 组比较均无统计学意义,但病理提示肺损伤有改善,提示 SF 通过其他途径防治肺损伤。HQ+SF 组 IFN- γ 水平较 HQ、SF、ALI 组明显升高($P < 0.01$),考虑与中药有效成分较复杂,各种中药配伍产生不同效果有关。各组 IL-4 水平与 ALI 组比较无统计学意义,提示这几组扶正固本的中药对抗炎因子无明显作用,仅通过增强 Th1 细胞因子而影响 Th1/Th2 平衡。本实验中我们提前一周预防性给药体现了中医药把预防、保健、养生融于一体的“治未病”传统精神,对有倾向的易感人群预防性使用扶正固本的中药调理,对防止急性肺损伤发生,减轻损伤发生后的程度有明显作用。有观点认为应用 IFN- γ -1b 能提高单核细胞 HLA-DR 的表达,同时能促进单核细胞分泌 IL-6 和 TNF α 以对抗代偿性抗炎反应,但炎症反应为主时应用 IFN- γ -1b 可能出现的感染加重,导致感染性休克。本实验使用上调 IFN- γ 的中药前期治疗而未见感染加重表现,可能与中药的双向调节作用有关,需更多时相点实验观察证实。

参考文献

- [1] Shimada H, Moriwaki Y, Kurosawa H, et al. Inflammatory mediator and organ dysfunction syndrome[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1998, 99: 490.
- [2] 王兵, 张畔. 多器官功能障碍综合征中急性虚证发病与辅助 T 淋巴细胞 1/2 平衡之间的关系与治疗对策[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(1): 58-61.
- [3] Headley AS, Tolley E, Meduri GU, et al. Infection and inflammatory response in acute respiratory distress syndrome [J]. Chest 1997; 111 (56): 1306-1321.
- [4] Nishina K, Mikawa K, Takao Y, et al. ONO-5046, an elastase inhibitor, attenuates endotoxin induced acute lung injury in rabbits[J]. Anesth Analg, 1997, 84: 1097-1103.
- [5] 邱海波, 蒋雄武, 周韶霞, 等. T 辅助淋巴细胞的功能变化在急性肺损伤中的意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1): 19-21.
- [6] 申维玺. 再论中医证的本质是细胞因子[J]. 中医杂志, 2002, 43 (12): 888-890.
- [7] 姚成芳, 蔡生业, 王丽, 等. 阴虚与阳虚动物模型中 Th1/Th2 类细胞因子表达的差异性[J]. 山东中医杂志, 2004, 23(3): 166-168.

(收稿日期: 2007-06-25)