

# 通腑活血法对脓毒症肺损伤保护作用的机制研究

王晶, 余伟清, 奚小土, 刘云涛

广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510120

**[摘要]** 目的: 探讨通腑活血法对脓毒症大鼠肺组织的保护作用及机制。方法: 雄性 SD 大鼠 100 只, 随机分成正常对照组 ( $n=10$ )、模型组 ( $n=15$ )、JAK2 抑制剂 (AG490) 组 ( $n=15$ )、Stars 抑制剂 (RPM) 组 ( $n=15$ )、桃核承气汤高、中、低剂量组 ( $n=15$ )。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制动物模型, 桃核承气汤组于术前 0.5 h 和术后 6 h 按 1.0 g/kg、2.0 g/kg、3.0 g/kg 剂量灌胃, 正常对照组、模型组、AG490 组和 RPM 组相同时点灌胃等容积蒸馏水。大鼠造模术后 24h 处死动物, 并采集血清、肺组织标本, PCR 检测相关指标, 光镜观察病理组织学改变。结果: 各组大鼠进行肺组织病理形态学评分, 桃核承气汤中剂量组及大剂量组大鼠肺组织的受损程度均明显减轻, 与模型组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。模型组大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 含量明显较正常对照组高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。桃核承气汤中剂量组与大剂量组 HMGB1 表达水平较模型组明显减少 ( $P < 0.05$ )。模型组大鼠肺组织 HMGB1mRNA 的表达明显比正常对照组大鼠高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。桃核承气汤中剂量组及大剂量组 HMGB1mRNA 的表达较模型组明显减少 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, RPM 组、AG40 组、桃核承气汤中、大剂量组的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6 (IL-6) 的水平明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 桃核承气汤可减轻脓毒症大鼠肺组织的炎症损伤, 其机制可能与下调 JAK/STAT 信号通路活性, 从而减少 HMGB1mRNA 表达, 进而下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等炎症因子的水平有关。

**[关键词]** 脓毒症; 肺损伤; JAK/STAT 信号通路; 通腑活血法; 高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)

**[中图分类号]** R631 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2015) 08-0266-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2015.08.122

## Preventive Mechanism of Therapy of Unblocking Bowels and Activating Blood for Lung Injury of Sepsis Pyohemia Rats

WANG Jing, YU Weiqing, XI Xiaotu, LIU Yuntao

**Abstract:** Objective: To explore the preventive mechanism of Chinese medicine (CM) with the action of unblocking bowels and activating blood for lung tissue of sepsis pyohemia rats. Methods: One hundred male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 7 groups, namely normal group, model group, JAK2 inhibitor (AG490) group, STAT inhibitor (RPM) group, and low-, medium-, and high-dose *Taohe Chengqi Tang* (TCT) groups. Animal models were established by cecal ligation and puncture (CLP). The low-, medium-, and high-dose TCT groups were given gastric gavage of TCT in the dose of 1.0g/kg, 2.0g/kg, 3.0g/kg respectively half hour before CLP and 6 hours after CLP. Other groups were given gastric gavage of the same volume of distilled water at the same time. Twenty-four hours after modeling, the rats were sacrificed for obtaining serum and lung tissue. The associated indexes were measured by polymerase chain reaction (PCR), and pathologic changes in lung tissue were observed under microscope. Results: The severity of lung tissue damage was reduced in the medium- and high-dose TCT groups ( $P < 0.05$  compared with that in the model group). The content and the mRNA expression level of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in the model group were higher than that in the normal group ( $P < 0.05$ ), and medium and high dose of TCT had an effect on reducing the content and mRNA expression level of HMGB1 ( $P < 0.05$  compared with those in the model group). The contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) in RPM group, AG40 group and medium- and high-dose TCT groups were decreased ( $P < 0.05$  compared with those in the model group). Conclusion: TCT can relieve the inflammation of lung issue, and the mechanism may be related to decreasing the levels of inflammation factors of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  through down-regulating the activities of JAK/STAT pathway to decrease

**[收稿日期]** 2015-01-01

**[基金项目]** 广东省科技计划项目 (20130319c)

**[作者简介]** 王晶 (1970-), 女, 副主任医师, 主要从事急危重症的临床与基础研究。

**[通讯作者]** 刘云涛, E-mail: iamliuyuntao@163.com。

expression of HMGB1.

**Keywords :** Sepsis pyohemia ; Lung injury ; JAK/STAT signal pathway ; Therapy of Unblocking bowels and activating blood ; High mobility group box- 1 protein (HMGB1)

脓毒症(sepsis)是由感染或有高度可疑感染灶引起的全身炎症反应综合征(SIRS),具有十分复杂的病理生理过程,主要涉及免疫、微循环、凝血、肠道、肺脏等多个系统,急性肺损伤是其中最关键的病理生理改变。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)是一种重要的“晚期”炎症介质,具有直接的毒性作用甚至致死效应<sup>[1]</sup>。有研究报道,气管内给予 HMGB1 可引起小鼠严重肺损伤,腹腔注射大剂量 HMGB1 可致小鼠死亡,而 HMGB1 抗体对动物具有明显的保护效应<sup>[2]</sup>。最近研究发现, JAK 激酶(Janus Kinase) 信号转导和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)即 JAK/STAT 可能作为信号转导的受体参与了 HMGB1 基因表达的转导过程,通过抑制 JAK/STAT 直接或间接下调 HMGB1 mRNA 表达,抑制 HMGB1 的合成、释放,从而减轻脓毒症急性肺损伤<sup>[3-5]</sup>。

本研究拟通过观察具有通腑泻下、活血化瘀的经方桃核承气汤对脓毒症大鼠模型肺组织 HMGB1、血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)水平的影响,探讨桃核承气汤对脓毒症大鼠过度炎症反应的抑制作用,同时通过与 JAK/STAT 特异性抑制剂治疗组相对照,观察 2 者 HMGB1 含量以及 HMGB1 mRNA 的相对表达量,探讨通腑活血法对脓毒症大鼠肺组织的保护作用机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 药物制备** 桃核承气汤由桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草按 2:2:1:1:1 组成,所有药物由广东省中医院中心药房提供。上述药物适量水煎,头煎 20 min,二煎 30 min,分别滤取药液,合并两次药液,在 60℃ 恒温条件下浓缩成含生药 1 g/mL 的药液备用。

**1.2 动物分组及处理** 体重 200~220 g 雄性 SD 大鼠 100 只,随机分成 7 组。正常对照组( $n=10$ ),模型组( $n=15$ )[行盲肠结扎穿孔术(CLP)]; JAK2 抑制剂 - AG490 处理(AG490)组( $n=15$ )[于术前 0.5 h 皮下注射 8.0 mg/kg 的 AG490,行 CLP]; Stars 抑制剂 - 雷帕霉素(RPM)处理(RPM)组( $n=15$ )[于术前 0.5 h 皮下注射 0.4 mg/kg 的 AG490,行 CLP]; 桃核承气汤高、中、低剂量组( $n=15$ )[术前 0.5 h 和术后 6 h 按 3.0 g/kg、2.0 g/kg、1.0 g/kg 剂量灌胃,行 CLP]。正常对照组、模型组、AG490 组和 RPM 组术后 6 h 灌胃等容积蒸馏水。CLP 复制动物模型。大鼠术前 12 h 禁食,可自由饮水。用 10% 水合氯醛 0.3 mL/kg 麻醉后,常规消毒皮肤,在腹中线偏下方行约 2 cm 切口,开腹后小心分离盲肠,用 3 号线结扎回肠盲肠瓣,避免结扎回肠及盲肠系膜血管。用 18 号针头在盲肠穿刺 3 个孔,避开血管,挤出少许粪便并还纳腹腔,逐层关腹。术后立

即腹腔注射生理盐水 20 mL/kg 抗休克,可自由饮水,禁食。术后 24 h,分别将实验各组大鼠按造模先后顺序头部脱臼处死。迅速剪开腹部缝线,探索分离下腔静脉,取血约 5 mL 备用(其中 2 mL 置于含抗凝剂的硬质塑料管中,其余的置于不含抗凝剂的硬质塑料管中,分别作为炎症介质、细胞因子检测之用);分离各脏器组织,留取肺组织 2 份,1 份置于含 10% 甲醛溶液的塑料瓶中,留作病理切片行病理形态学观察;另一份置于 -80℃ 低温冰箱留作检测 mRNA 表达。

**1.3 检测指标和方法** 选择固定位置留取肺脏器组织,分别用光镜和电镜肺脏的病理形态学改变。RT-PCR 检测肺组织 HRIGB1 mRNA 表达(以  $\beta$ -Actin 为内参对照);蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肺组织 HMGB1 含量(与目标蛋白  $\beta$ -Actin 的蛋白条带灰度做对比,以蛋白条带灰度值判断);ELISA 检测血清炎症因子水平。

**1.4 统计学方法** 使用 SPSS11.0 软件建立数据库并进行统计分析。计量资料测定值以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较比较采用方差分析。

## 2 研究结果

**2.1 各组肺组织病理学改变比较** 见表 1、图 1。光镜下正常对照组肺组织结构完整、肺泡间隔无水肿、炎症,肺泡腔清晰;模型组肺泡大小不等,部分肺泡壁断裂呈气肿状,部分肺泡萎缩,肺泡壁增宽,肺泡毛细血管扩张,肺间质见多行核细胞浸润;RPM 组、AG490 组、桃核承气汤中剂量组、桃核承气汤大剂量组与模型组比较,渗出明显减少;桃核承气汤小剂量组与模型组比较无明显改变。进一步对各组大鼠进行肺组织病理形态学评分,桃核承气汤中剂量组及大剂量组大鼠肺组织的受损程度均明显减轻,与模型组比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组肺组织病理形态学评分比较( $\bar{x} \pm s$ ) 分

组别	n	病理形态学评分
正常对照组	10	0.24±0.34
模型组	15	3.14±0.45 <sup>①</sup>
RPM组	15	2.16±0.34 <sup>②</sup>
AG490组	15	2.09±0.23 <sup>②</sup>
桃核承气汤小剂量组	15	3.12±0.48
桃核承气汤中剂量组	15	2.34±0.26 <sup>②</sup>
桃核承气汤大剂量组	15	2.45±0.41 <sup>②</sup>

与正常对照组比较,① $P < 0.05$ ;与模型组比较,② $P < 0.05$

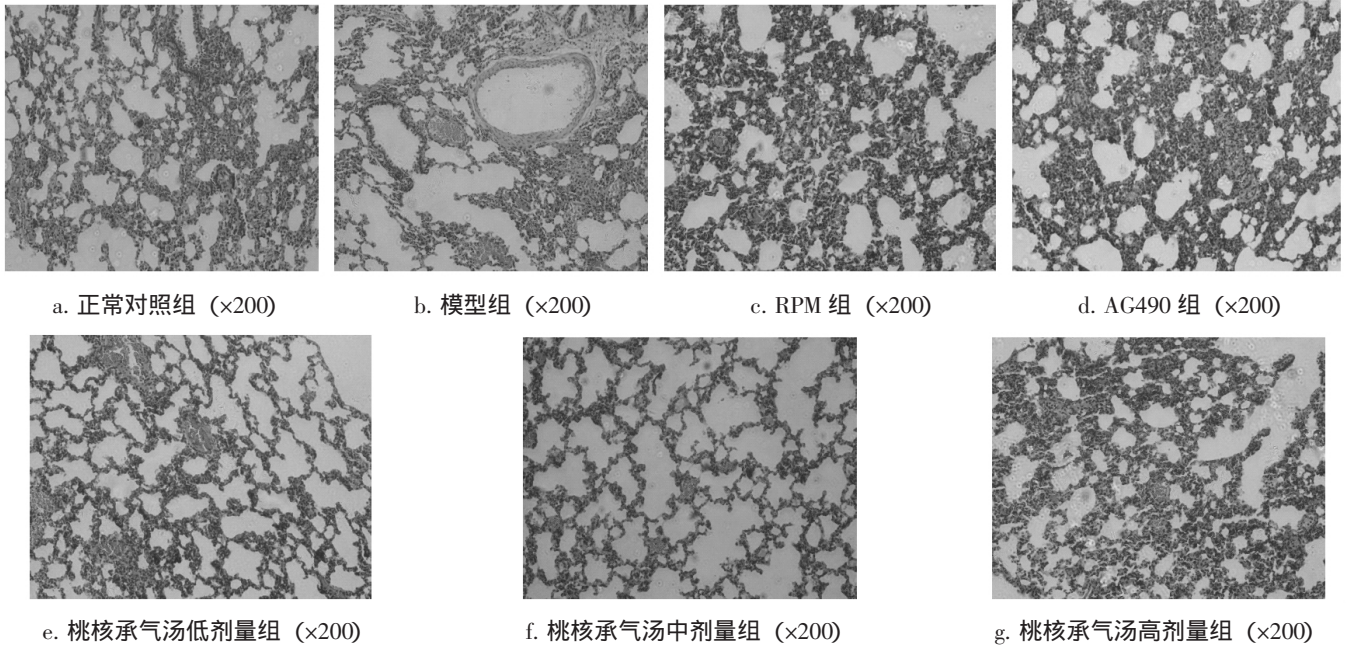


图 1 各组肺组织病理学光镜图

2.2 各组肺组织 HMGB1 表达比较 见表 2。模型组大鼠肺组织 HMGB1 含量明显较正常对照组高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。桃核承气汤中剂量组与大剂量组 HMGB1 表达水平较模型组明显减少( $P < 0.05$ )。

表 2 各组肺组织 HMGB1 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HMGB1 表达(相对灰度值)
正常对照组	10	0.43± 0.12
模型组	15	3.12± 0.04 <sup>①</sup>
RPM组	15	1.67± 0.05 <sup>②</sup>
AG490 组	15	1.70± 0.06 <sup>②</sup>
桃核承气汤小剂量组	15	3.09± 0.06
桃核承气汤中剂量组	15	1.70± 0.08 <sup>②</sup>
桃核承气汤大剂量组	15	1.74± 0.12 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

2.3 各组肺组织 HMGB1mRNA 表达比较 见表 3。模型组大鼠肺组织 HMGB1mRNA 的表达明显比正常对照组大鼠高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。桃核承气汤中剂量组及大剂量组 HMGB1mRNA 的表达较模型组明显减少( $P < 0.05$ )。

2.4 各组炎症介质、细胞因子表达水平比较 见表 4。与模型组比较, RPM 组、AG40 组、桃核承气汤中、大剂量组的 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的水平明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 3 各组肺组织 HMGB1mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	HMGB1 mRNA 表达量(相对表达量)
正常对照组	10	0.123± 0.012
模型组	15	0.865± 0.125 <sup>①</sup>
RPM组	15	0.477± 0.087 <sup>②</sup>
AG490 组	15	0.583± 0.139 <sup>②</sup>
桃核承气汤小剂量组	15	0.855± 0.134
桃核承气汤中剂量组	15	0.521± 0.105 <sup>②</sup>
桃核承气汤大剂量组	15	0.511± 0.112 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

表 4 各组炎症介质、细胞因子表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (ng/mL)
正常对照组	10	43.43± 15.90	32.67± 9.47	1.24± 0.12
模型组	15	116.45± 34.26 <sup>①</sup>	127.48± 25.32 <sup>①</sup>	9.34± 1.72 <sup>①</sup>
RPM组	15	84.21± 25.65 <sup>②</sup>	83.31± 23.45 <sup>②</sup>	7.21± 0.99 <sup>②</sup>
AG490 组	15	82.56± 30.21 <sup>②</sup>	79.47± 25.78 <sup>②</sup>	7.34± 1.01 <sup>②</sup>
桃核承气汤小剂量组	15	100.01± 24.56	96.23± 30.21	8.21± 0.78
桃核承气汤中剂量组	15	86.78± 24.65 <sup>②</sup>	90.26± 27.21 <sup>②</sup>	7.98± 1.21 <sup>②</sup>
桃核承气汤大剂量组	15	82.45± 27.65 <sup>②</sup>	87.33± 25.54 <sup>②</sup>	7.69± 1.43 <sup>②</sup>

与正常对照组比较, ① $P < 0.05$ ; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

## 3 讨论

在脓毒症进一步发展导致的多器官功能障碍综合征(MODS)中,肺组织往往是最先受累的器官,由此诱发的急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是临床上脓毒症患者致死的主要原因之一<sup>[7-11]</sup>。尽管当前器官功能支持取得了长足进步,但仍缺乏有效的具有肺功能保护作用的药物。

Kim JH等<sup>[12]</sup>采用盲肠结扎穿孔致严重腹腔感染模型结果显示,脓毒症时高度活化,且肝、肺、肠组织中STAT1、STAT3分别与相应器官HMGB1 mRNA表达呈显著正相关,初步提出两者之间可能存在一定的相关性。国内研究者发现,抑制JAK/STAT信号通路活化可以明显下调肝组织HMGB1 mRNA表达,并有助减轻CLP所致急性肝损伤<sup>[13-15]</sup>。本研究基于脓毒症发生发展过程中JAK/STAT信号通路的重要作用及对炎症标志物HMGB1的认识,探讨了通腑活血代表方(桃核承气汤)对脓毒症大鼠肺组织的保护作用及机制,发现其能减轻大鼠肺组织损伤;进一步研究结果表明,桃核承气汤对JAK/STAT信号通路有一定的调控作用,提示其可能通过作用于JAK/STAT信号通路,减少HMGB1 mRNA的表达,进而下调TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 等炎症因子水平。然而,通腑活血代表方剂桃核承气汤影响JAK/STAT通路活性的机制如何?除JAK/STAT信号通路外,其他信号通路在其中发挥着怎样的作用?这些问题仍有待在今后的研究中进一步探讨。

## [参考文献]

- [1] Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, et al. The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(4): 440-447.
- [2] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.
- [3] 杨岚,李蕾,陈国千.炎症介质高迁移率族蛋白B1的研究进展[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(4): 463-466.
- [4] 姚咏明,盛志勇.脓毒症信号转导机制的现代认识[J].

中国危重病急救医学, 2003, 15(1): 3-6.

- [5] 宋舟,张立艳,董海兵,等. JAK-STAT信号通路研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2012(6): 128-132.
- [6] Fang WH, Yao YM, Shi ZG, et al. The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury[J]. *Shock*, 2002, 17(4): 329-333.
- [7] Nuytinck H, Offermans X, Kubat K. Whole-body inflammation in trauma patient: an autopsy study[J]. *Arch Surg*, 1988, 123(12): 1519-1524.
- [8] Balk RA. Severe sepsis and septic shock. Definitions, epidemiology, and clinical manifestations[J]. *Crit Care Clin*, 2000, 16(2): 179-192.
- [9] Iscimen R, Cartin-Ceha R. Risk factors for the development of acute lung injury in patients with sciatic shock[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(5): 1518-1522.
- [10] Nathan C. Point of control in inflammation[J]. *Nature*, 2002, 6917(420): 846-852.
- [11] Sillgh S, Evans T. Organ dysfunction during sepsis[J]. *Intensive Care Medicine*, 2006, 32(3): 349-360.
- [12] Kim JH, Kim SJ, Lee IS, et al. Bacterial endotoxin induces the release of high mobility group box 1 via the IFN- $\beta$  signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2009, 182(4): 2458-2466.
- [13] 姚咏明,王松柏,咸力明,等.脓毒症大鼠多器官高迁移率族蛋白B1基因表达的信号机制与意义[J]. *中华外科杂志*, 2006(13): 916-920.
- [14] 王松柏,姚咏明,董宁,等. JAK/STAT通路介导脓毒症大鼠肝组织高迁移率族蛋白B1 mRNA表达的研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2003(3): 147-149.
- [15] 柳毅,陈国千,袁劲松,等. HMGB1在内毒素血症小鼠肝损伤中的作用[J]. *中国实验诊断学*, 2009(12): 1704-1707.

(责任编辑:骆欢欢)