

# 凉血活血方对脓毒症大鼠白细胞系列黏附分子表达的影响

刘洪斌<sup>\*</sup>, 吴咸中, 李东华, 王倩, 杨秀竹, 薛小平, 张艳萍  
(天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] 目的: 研究凉血活血方对脓毒症大鼠白细胞黏附分子表达的影响, 探讨其药理作用机制。方法: Wistar 大鼠 90 只, 雌雄各半, 随机分为假手术组(10 只)、模型组(20 只)、凉血活血方治疗组(分为大、中、小剂量组, 每组 20 只)。采用盲肠结扎穿孔法制作脓毒症模型, 造模同时分别进行灌胃治疗, 给予大、中、小剂量的活血凉血方浸膏, 观察 72h 动物死亡率; 在造模 72h 后腹主动脉取血抗凝, 溶血素处理后, 分别加入不同荧光素标记的 CD11b、CD31、CD54、CD62L 抗体, 经流式细胞仪检测白细胞表面 4 种黏附分子的表达情况; 行气管插管进行肺泡灌洗, 收集分离白细胞, 流式细胞术检测 4 种黏附分子的表达情况; 留取肝、肺及末段回肠组织, 检测髓过氧化物酶(MPO)活性。结果: 模型组大鼠血中及肺泡灌洗液中白细胞黏附分子 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达较假手术组显著增高; 大、中剂量凉血活血方治疗可显著降低模型大鼠血中及肺泡灌洗液中白细胞 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达, 显著降低肝、肺及末段回肠组织 MPO 活性; 凉血活血方大剂量组动物死亡率显著降低。结论: 脓毒症状态下白细胞黏附因子的异常高表达及其与血管内皮的黏附作用可介导多种脏器功能障碍, 活血凉血中药可通过抑制血管内皮系列黏附分子高表达而发挥治疗作用。

[关键词] 凉血活血中药; 脓毒症; 白细胞; 黏附分子; 流式细胞术

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)01-0044-04

## Effects of Liangxuehuoxue Formula on the Expression of Multiple Adhesion Molecules in Septic Rat Model

LIU Hong-bin<sup>\*</sup>, WU Xian-zhong, LI Dong-hua, WANG Qian, YANG Xiu-zhu, XUE Xiao-ping, ZHANG Yan-ping  
(Tianjin Institute of Acute Abdominal Diseases, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Liangxuehuoxue Formula on the the expression of multiple adhesion molecules in treating a cecal ligation and puncture (CLP) rat septic model. **Methods:** Using a sepsis model induced by

[收稿日期] 2008-06-10

[基金项目] 天津市科技攻关计划重大科技项目(O5YFGDSF02600); 天津市卫生局中医、中西医结合科研项目(07089)

[通讯作者] \* 刘洪斌, Tel(022) 27435368; E-mail: jtsstj1@yahoo.com.cn

CLP, the septic rats were treated with 3 different doses of liquid extract of Liangxuehuoxue Formula for 72 hours. The expressions of CD11b, CD31, CD54 and CD62L in leucocytes of circulating blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by flowcytometry. Myeloperoxidase (MPO) activity of lung, liver and intestinal tissues were examined. **Results:** The 72 h mortality of model group was 70% and the expressions of CD11b, CD31, CD54 and CD62L in leucocytes of circulating blood and BALF and MPO of lung, liver and intestinal tissues in model group were all increased significantly compared with sham operation group. The high dose of Liangxuehuoxue Formula decreased the 72 h mortality to 20%, significantly lower than that of model group. The high and middle doses of Liangxuehuoxue Formula reduced the CD11b, CD31, CD54 and CD62L expressions in leucocytes of circulating blood and BALF and MPO of lung, liver and intestinal tissues significantly. **Conclusions:** The high expressions of adhesion molecules and their adhesive effects on the endothelium play an important role in the pathological process of multiple organ dysfunctions in sepsis and the Liangxuehuoxue Formula has therapeutic effects on septic model by reducing the high expressions of multiple adhesion molecules.

[ **Key words** ] Liangxuehuoxue Formula; leucocytes; adhesion molecules; sepsis; flowcytometry

由严重腹腔感染引发的脓毒症常常导致全身炎症反应综合征(SIRS)甚至多器官功能障碍综合征(MODS),死亡率极高,目前尚无特效治疗<sup>[1]</sup>。根据中医理论,患者此阶段常常呈现热入营血,迫血妄行的证候,因而宜采用凉血活血的治则<sup>[2,3]</sup>。现代医学认为血管内皮损伤与白细胞激活在其发生机制中起重要作用,而白细胞的激活是由表达于白细胞和内皮细胞表面的黏附分子所调节<sup>[4,5]</sup>。本实验旨在研究凉血活血方对脓毒症大鼠血中白细胞黏附分子表达的影响,探讨其药理作用机制。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物** SPF级Wistar大鼠90只,雌雄各半,体重(210~230)g,由中国药品生物制品检定所动物中心提供,动物合格证号SCXK(京)2005-0004。

**1.2 药物** 凉血活血方浸膏(由红藤、赤芍、牡丹皮、延胡索组成,比例为4:3:3:2)由三九现代中药有限公司提供。流浸膏的制备方法为:取上述处方饮片,加8倍量水,浸0.5h,加热至沸,保持微沸2h。药汁趁热过滤后,第2次加水6倍量,微沸1h,药汁趁热过滤,合并2次药汁,减压浓缩至相当于“4g生药/g浸膏”的浓度。

**1.3 主要试剂与仪器** 小鼠抗大鼠CD11b-FITC、CD31-PE、CD54-PE、CD62L-PE单抗购自美国Pharmingen公司;溶血素购自美国BD公司;髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒由南京建成生物技术公司提供;蛋白定量检测试剂盒购自北京北方伟业发展有限公司;流式细胞仪为美国BD公司的FACScalibur型,AT-738型半自动生化仪为上海医用分析仪器厂

产品。

**1.4 模型制备** 实验前12h禁食、不限水,实验时以10%水合氯醛按 $1\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 进行ip麻醉,无菌条件下开腹,分离盲肠末端以3-0号丝线结扎,再用5号针头随机穿孔2处,将盲肠放回腹腔后逐层关腹。假手术组于分离盲肠末端,不进行结扎、穿孔。

**1.5 实验分组与给药** 将Wistar大鼠90只,雌雄各半,随机分为假手术组(10只)、模型组(20只)、凉血活血方治疗组(分为大、中、小剂量组,每组20只)。凉血活血方治疗组在造模同时给予凉血活血方浸膏的蒸馏水稀释药液ig,剂量分别为24,12,6生药 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,1次/d,给药体积均为 $16\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,假手术组和模型组给予等体积蒸馏水,连续给药72h。

**1.6 标本取材与处理** 给药72h后,各组动物经腹主动脉取血,EDTA抗凝,以备流式细胞分析;行气管插管,以冷生理盐水反复灌洗,每次4mL,共3次,回收全部灌洗液,PBS洗涤3次,收集白细胞;分别剪取部分肝、肺及末段回肠组织,-70℃冻存,备测MPO。

## 1.7 检测指标

**1.7.1 死亡率观察** 观察动物死亡情况,计算72h死亡率。

**1.7.2 肝、肺及末段回肠组织MPO检测** 按试剂盒说明书操作,结果以组织的蛋白含量进行校正,以 $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白表示。组织蛋白含量采用Bradford法测定。

**1.7.3 流式细胞术检测白细胞CD11b、CD31、CD54、CD62L表达** 取100 $\mu\text{L}$ 抗凝血,加入10%溶血素1

mL 以破坏红细胞, 轻轻混匀, 作用 10 min, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min, 弃上清, 沉淀以 2 mL PBS 重悬白细胞沉淀, 再次 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μL 含 0.5% 小牛血清的 PBS 重悬细胞沉淀, 每管中加入 1 种荧光抗体 10 μL, 轻轻混匀, 避光室温下孵育 15 min, 于流式细胞仪上进样检测, 以仪器配备的 Cell Quest pro 软件计算平均荧光强度 (MFI) 表示黏附分子表达量。肺泡灌洗液中白细胞调整浓度到 1 × 10<sup>6</sup>·mL<sup>-1</sup>, 取 100 μL, 加入荧光抗体 10 μL, 以下步骤同上, 平均荧光强度计算方法同上。

**1.8 统计学方法** 采用 SPSS11.0 统计软件对实验数据进行分析, 死亡率之间差异采用卡方检验; 均数之间的差异采用 One-Way ANOVA,  $P < 0.05$  被认为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 死亡率** 由表 1 可知, 模型组 72 h 动物死亡率为 70%, 凉血活血大剂量组 72 h 死亡率为 20%, 较模型组明显降低 ( $P < 0.05$ ); 中, 小剂量组 72 h 动物死亡率分别为 30% 和 40%, 与模型组无显著差异。

表 2 各组血白细胞 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达 ( $\bar{x} \pm s$ , MFI)

| 组别     | 剂量(g·kg <sup>-1</sup> ) | n  | CD11b                    | CD31                     | CD54                     | CD62L                    |
|--------|-------------------------|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组   | —                       | 10 | 8.9 ± 2.6 <sup>2)</sup>  | 4.5 ± 1.1 <sup>2)</sup>  | 2.5 ± 0.9 <sup>2)</sup>  | 4.1 ± 1.2 <sup>2)</sup>  |
| 模型组    | —                       | 6  | 69.4 ± 11.4              | 45.2 ± 9.6               | 35.7 ± 10.2              | 59.8 ± 8.2               |
| 凉血活血方组 | 24                      | 16 | 14.5 ± 3.5 <sup>2)</sup> | 7.9 ± 2.6 <sup>2)</sup>  | 6.8 ± 1.4 <sup>2)</sup>  | 8.3 ± 2.1 <sup>2)</sup>  |
|        | 12                      | 14 | 22.5 ± 5.7 <sup>2)</sup> | 13.6 ± 3.6 <sup>2)</sup> | 15.6 ± 2.9 <sup>2)</sup> | 16.9 ± 3.5 <sup>2)</sup> |
|        | 6                       | 12 | 53.5 ± 9.3               | 39.8 ± 8.4               | 27.7 ± 6.8               | 47.9 ± 9.2               |

表 3 各组肺泡灌洗液白细胞 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达 ( $\bar{x} \pm s$ , MFI)

| 组别     | 剂量(g·kg <sup>-1</sup> ) | n  | CD11b                   | CD31                    | CD54                    | CD62L                    |
|--------|-------------------------|----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 假手术组   | —                       | 10 | 2.3 ± 0.7 <sup>2)</sup> | 1.4 ± 0.3 <sup>2)</sup> | 2.3 ± 0.5 <sup>2)</sup> | 2.1 ± 0.3 <sup>2)</sup>  |
| 模型组    | —                       | 6  | 36.4 ± 9.3              | 25.3 ± 5.7              | 36.5 ± 9.4              | 42.8 ± 7.8               |
| 凉血活血方组 | 24                      | 16 | 4.6 ± 0.9 <sup>2)</sup> | 3.5 ± 0.6 <sup>2)</sup> | 3.8 ± 1.3 <sup>2)</sup> | 4.8 ± 1.3 <sup>2)</sup>  |
|        | 12                      | 14 | 6.9 ± 1.8 <sup>2)</sup> | 7.8 ± 1.8 <sup>2)</sup> | 6.8 ± 2.1 <sup>2)</sup> | 13.6 ± 4.8 <sup>2)</sup> |
|        | 6                       | 12 | 25.8 ± 8.7              | 19.9 ± 8.6              | 28.6 ± 8.8              | 34.9 ± 9.8               |

表 4 各组大鼠肝、肺及末段回肠组织 MPO 水平 ( $\bar{x} \pm s$ , U·mg<sup>-1</sup>)

| 组别     | 剂量                    |    | 肺组织                        | 肠组织                        | 肝组织                        |
|--------|-----------------------|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|        | (g·kg <sup>-1</sup> ) | n  |                            |                            |                            |
| 假手术组   | —                     | 10 | 87.3 ± 13.6 <sup>2)</sup>  | 43.4 ± 9.8 <sup>2)</sup>   | 32.5 ± 10.2 <sup>2)</sup>  |
| 模型组    | —                     | 6  | 675.4 ± 99.8               | 695.4 ± 87.5               | 745.3 ± 102.4              |
| 凉血活血方组 | 24                    | 16 | 145.5 ± 32.5 <sup>2)</sup> | 102.4 ± 16.2 <sup>2)</sup> | 159.3 ± 23.5 <sup>2)</sup> |
|        | 12                    | 14 | 345.6 ± 87.9 <sup>2)</sup> | 258.8 ± 78.3 <sup>2)</sup> | 342.2 ± 67.6 <sup>2)</sup> |
|        | 6                     | 12 | 546.8 ± 112.4              | 564.7 ± 98.6               | 548.6 ± 76.8 <sup>2)</sup> |

表 1 各组动物 72 h 死亡率

| 组别     | 剂量(g·kg <sup>-1</sup> ) | n  | 死亡数 | 死亡率 (%)          |
|--------|-------------------------|----|-----|------------------|
| 假手术组   | —                       | 10 | 0   | 0                |
| 模型组    | —                       | 20 | 14  | 70               |
| 凉血活血方组 | 24                      | 20 | 4   | 20 <sup>1)</sup> |
|        | 12                      | 20 | 6   | 30               |
|        | 6                       | 20 | 8   | 40               |

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.001$ (下同)。

**2.2 血及肺泡灌洗液中白细胞 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达** 模型组 72 h 大鼠血中白细胞及肺泡灌洗液白细胞表面 4 种黏附分子表达 (MFI) 较假手术组显著增强 ( $P < 0.001$ ); 凉血活血大, 中剂量组大鼠血中及肺泡灌洗液白细胞表面 4 种黏附分子表达较模型组显著降低 ( $P < 0.001$ ), 见表 2、3。

**2.3 肝、肺及末段回肠组织 MPO 活性** 模型组 72 h 大鼠肝、肺及末段回肠组织 MPO 活性较假手术组显著增高 ( $P < 0.001$ ); 凉血活血大, 中剂量组大鼠肝、肺及末段回肠组织 MPO 活性较模型组显著降低 ( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

目前认为, 脓毒症的发生、发展与严重创伤、烧伤后机体免疫功能紊乱, 特别是非特异性免疫异常密切相关, 其中白细胞数量和功能的异常活化起了重要作用, 而白细胞的激活是由表达于白细胞和内皮细胞表面的黏附分子所调节, 可以说黏附分子的过高表达是 MODS 时导致器官功能损伤的重要步骤<sup>[6-10]</sup>。

白细胞表面黏附分子主要有 CD11b、CD31 等。

CD11b 属  $\beta 1$  整合素家族; CD31 和 CD54 属免疫球蛋白超家族类, 作为白细胞表面黏附分子-整合素的配体, 在白细胞与内皮细胞的后期牢固性黏附及穿越内皮细胞迁移的过程中起关键性作用。CD62L 属选择素家族, 它在白细胞沿血管内皮细胞的滚动、着边及早期黏附中起主要作用。

本研究利用流式细胞技术检测了脓毒症大鼠血及肺泡灌洗液中白细胞表面上述 4 种黏附分子的表达, 结果显示其表达均显著增强, 并与肝、肺、肠组织中的髓过氧化物酶(MPO) 活性增高趋势相一致, 后者是中性粒细胞在组织中浸润严重程度的灵敏指标。以上结果提示脓毒症大鼠血以及肺泡灌洗液中白细胞黏附分子的高表达与组织器官的损伤有密切关系。

中医理论认为严重腹腔感染并发全身炎症反应综合征(SIRS) 甚至多器官功能障碍综合征(MODS) 的病理机制为中焦失运, 气血郁闭, 病情进一步发展可相继出现热毒炽盛, 正虚邪陷, 热入营血, 以至亡阴亡阳等危象。在临床实践中, 除了抗生素及其他支持疗法外, 结合清热凉血活血中药的辨证论治, 对控制病情的发展有很大益处<sup>[2,3,11]</sup>。

凉血活血方由红藤、赤芍、牡丹皮、延胡索组成, 方中红藤兼有清热解毒和活血化瘀的作用, 为治疗肠痈腹痛的要药, 与牡丹皮、赤芍相配, 进一步加强了活血化瘀的作用, 佐以元胡可加强活血止痛的作用。

本研究结果显示, 大剂量凉血活血方治疗可显著降低动物死亡率; 大、中剂量凉血活血方治疗可显著降低模型大鼠血以及肺泡灌洗液中白细胞 CD11b、CD31、CD54、CD62L 表达, 肝、肺、肠组织中的髓过氧化物酶(MPO) 活性明显降低, 显示了良好的治疗作用, 提示凉血活血方可能通过下调脓毒症大鼠血中白细胞系列黏附分子表达, 降低白细胞的异常活化, 从而起到器官保护作用。

## [参考文献]

- [ 1 ] 廖秀玉, 林建东. 脓毒症与炎性细胞[J]. 医学综述, 2008, 14(2): 277-279.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] 史大卓, 谢仁明, 王永炎. 现代温热病卫气营血辩证的重新思考[J]. 中医杂志, 2005, 46(2): 86-87.
- [ 4 ] Zhang H, Zhi L, Mochhala SM, *et al.* Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(4): 894-905.
- [ 5 ] Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, *et al.* Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity[J]. *Shock*, 2006, 26(3): 254-261.
- [ 6 ] Zhao X, Dib M, Andersson E, *et al.* Alterations of adhesion molecule expression and inflammatory mediators in acute lung injury induced by septic and non-septic challenges[J]. *Lung*, 2005; 183(2): 87-100.
- [ 7 ] Mangell P, Mihaescu A, Wang Y, *et al.* Critical role of P-selectin-dependent leukocyte recruitment in endotoxin-induced intestinal barrier dysfunction in mice[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(5): 189-194.
- [ 8 ] Brown KA, Brain SD, Pearson JD, *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis[J]. *Lancet*, 2006, 368(9530): 157-169.
- [ 9 ] Maugeri N, Cerletti C, Donati MB, *et al.* Neutrophils and sepsis[J]. *Lancet*, 2006, 368(9542): 1153.
- [ 10 ] Nakagawa NK, Nogueira RA, Correia CJ, *et al.* Leukocyte-endothelium interactions after hemorrhagic shock/reperfusion and cecal ligation/puncture: an intravital microscopic study in rat mesentery[J]. *Shock*, 2006, 26(2): 180-186.
- [ 11 ] 岳茂兴, 戎亚雄, 史卫海, 等. 腹部外科脓毒症 368 例的临床救治[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(8): 685-688.