

清热解毒方对脓毒症大鼠静脉血细胞黏附分子的影响

杨秀竹, 杨静, 张艳萍, 刘洪斌*

(天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] 目的: 探讨清热解毒方对脓毒症大鼠血液中淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞黏附分子表达的影响。方法: 采用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症大鼠模型。将 Wistar 大鼠分为正常对照组、模型组、清热解毒方组(分为高、低两个剂量组), 采用流式细胞术分别观察各组血液中免疫细胞数量的变化和细胞表面黏附分子 CD11b/c, CD62L 和 CD54 表达的情况。结果: 模型组大鼠血细胞 CD11b/c, CD54 表达增高, 而 CD62L 表达降低, 与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 与模型组比较清热解毒方组 CD11b/c, CD54 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 CD62L 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。结论: 清热解毒方能调整血液中多种细胞黏附分子的异常表达, 改善机体的免疫状态。

[关键词] 清热解毒; 脓毒症; 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(2010)08-0166-03

Effects of Qingrejiedu Fang on Expression of Multiple Adhesion Molecules in Septic Rat Model

YANG Xiu-zhu, YANG Jing, ZHANG Yan-ping, LIU Hong-bin*
(Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Qingrejiedu Fang on expression of multiple adhesion molecules in septic rat model. **Method:** Using a sepsis model induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rat, the septic rats were treated with 2 different doses of Qingrejiedu Fang for 72 hours. The expressions of CD11b/c, CD62L and CD54 of circulating blood cells were determined by flowcytometry. **Result:** The expressions of CD11b/c and CD54 were increased significantly compared with the control group, while the CD62L was decreased. The Qingrejiedu Fang could reverse this tendency. **Conclusion:** The high expressions of adhesion molecules and their adhesive effects play an important role in the pathological process of multiple organ dysfunctions in sepsis and the Qingrejiedu Fang has therapeutic effects on septic model by regulating the expressions of multiple adhesion molecules.

[Key words] Qingrejiedu Fang; sepsis; adhesion molecules; flowcytometry

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、大手术和感染后常见并发症, 其本质为不同感染性因素所致失控性炎性反应。随着对脓毒症病理生理过程认识的加深和现代分子生物学技术的应用, 人们对于脓毒症的发病机制有了更深的了解。大量研究表明, 脓毒

症的发生与免疫功能紊乱密切相关^[1]。清热解毒方由大黄、黄芩、白头翁、败酱草等组成, 具有清热解毒凉血的功效, 临床应用效果良好, 本研究重点探讨该方对脓毒症大鼠血液中淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞黏附分子表达的影响, 观察清热解毒方对脓毒症的干预影响机制。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠由天津市实验动物中心提供, 动物饲养合格证为(07311), 雌雄各半, 体重(250 ±30)g。标准颗粒饲料喂养。

[收稿日期] 2009-11-30

[基金项目] 天津市科技攻关计划重大科技项目
(05YFGDSF02600)

[通讯作者] 刘洪斌, Tel: (022) 27435368; E-mail: jtss@sina.com

1.2 仪器 流式细胞仪 (BD Calibur, 美国); 电子天平 (SARTORINS, 德国); 高速低温离心机 (Laboratory Centrifuges 3K-30, 美国 Sigma)。

1.3 药物与试剂 清热解毒方由天津市急腹症研究所药物研究室提供, 批号 20081218。该方由大黄、黄芩、白头翁、败酱草等按一定比例配伍而成, 经浸泡、水煎后过滤, 浓缩定容至相当于含生药 $3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 方法

2.1 分组与给药 随机分为 4 组, 每组 6 只: 正常对照组, 模型组, 清热解毒方组 (低剂量组, 高剂量组)。

清热解毒方组自手术前 1 天开始给药, 连续 3 d, 1 次/d, 其中低剂量组剂量为生药 $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于临床用药的 9 倍), 高剂量组为生药 $24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于临床用药的 12 倍)。其他组等量生理盐水, 均 ig。

2.2 模型制备 实验前 12 h 禁食、不限水, 术前以 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 无菌条件下开腹, 分离盲肠, 在距其末端 2 cm 处以 1 号丝线结扎, 再用 18 号针头在盲肠末端穿孔, 将盲肠放回腹腔后逐层关腹。假手术组于分离盲肠末端时, 不进行结扎、穿孔。连续观察 48 h, 自由饮水。

2.3 检测指标 麻醉后抽取各组大鼠下腔静脉血, 肝素钠抗凝, 流式细胞术检测。取 $100 \mu\text{L}$ 抗凝全血, 加入相应的荧光抗体染色 30 min, 溶血素裂解红细胞, 10 min 后加入 pH 7.2 的 PBS 缓冲液洗涤细胞, 最后每个上样管中加入 $200 \mu\text{L}$ PBS 缓冲液重悬细胞, 用流式细胞仪检测各种细胞阳性率及平均荧

光强度 (MFI)。

2.4 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件包进行方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞数量的影响 模型组大鼠血液淋巴细胞占外周血细胞的比例显著降低, 中性粒细胞的数量明显升高, 与正常组比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。清热解毒方淋巴细胞和单核细胞数量与模型组比较有明显升高, 而清热解毒方中性粒细胞与模型组比较明显降低。见表 1。

3.2 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞表面黏附分子 CD11b/c 的影响 模型组大鼠血液淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞 CD11b/c 的表达均有显著升高。清热解毒方中淋巴细胞和中性粒细胞比例的失常得到了不同程度的改善。见表 2。

3.3 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞 CD62L 的影响 模型组大鼠血液淋巴细胞、单核细胞和中性粒细胞 CD62L 的表达有明显的降低。清热解毒方高剂量组可以在一定程度上恢复中性粒细胞 CD62L 的表达 ($P < 0.05$)。而清热解毒方低剂量组无明显作用。见表 3。

3.4 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞 CD54 的影响 模型组大鼠淋巴细胞和单核细胞 CD54 的表达均有显著升高。清热解毒方两个剂量组表达强度有不同程度的下降 ($P < 0.05$)。而中性粒细胞 CD54 的表达在治疗前后无明显变化。见表 4。

表 1 清热解毒方对大鼠下腔静脉血中免疫细胞数量的影响 (% , $\bar{x} \pm s$ $n = 6$)

组别	剂量/生药 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
假手术	-	$26.62 \pm 6.21^{2)}$	5.24 ± 0.48	$14.89 \pm 0.81^{2)}$
模型	-	7.81 ± 1.96	3.91 ± 0.65	35.56 ± 7.93
清热解毒方	18	$30.26 \pm 2.44^{2)}$	$7.05 \pm 1.20^{1)}$	$5.05 \pm 1.11^{2)}$
	24	$21.25 \pm 1.56^{2)}$	$15.46 \pm 2.08^{2)}$	$16.70 \pm 7.17^{1)}$

注: 与模型组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞表面黏附分子 CD11b/c 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/生药 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	百分比/%			平均荧光强度/MFI		
		淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
假手术	-	$8.04 \pm 1.23^{1)}$	$63.39 \pm 12.15^{1)}$	94.51 ± 0.94	96.00 ± 9.93	$137.86 \pm 14.25^{2)}$	$116.21 \pm 15.12^{1)}$
模型	-	13.57 ± 0.71	91.62 ± 9.77	98.29 ± 0.89	99.10 ± 12.14	235.99 ± 39.57	276.26 ± 95.88
清热解毒方	18	$1.75 \pm 1.82^{2)}$	$53.97 \pm 14.89^{2)}$	96.45 ± 1.83	111.71 ± 12.95	217.61 ± 46.82	220.37 ± 1.48
	24	$2.48 \pm 1.14^{2)}$	$65.42 \pm 1.41^{2)}$	98.44 ± 0.72	100.56 ± 11.16	$145.77 \pm 25.12^{2)}$	$121.79 \pm 10.57^{1)}$

表 3 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞表面黏附分子 CD62L 的影响(柳±s, n=6)

组别	剂量 /生药 g·kg ⁻¹	百分比 /%			平均荧光强度 /MFI		
		淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
假手术	-	87.26 ±5.64 ²⁾	32.24 ±9.82	89.42 ±0.25	1 089.91 ±99.07	923.93 ±14.62 ²⁾	836.57 ±2.65 ²⁾
模型	-	52.29 ±5.73	52.11 ±6.79	65.52 ±26.83	575.39 ±304.80	412.67 ±107.69	210.59 ±103.92
清热解毒方	18	40.11 ±42.43	41.20 ±11.56	96.90 ±2.62	462.67 ±83.30	193.88 ±53.73	309.72 ±106.15
	24	88.97 ±3.01 ¹⁾	39.51 ±8.01	99.28 ±0.22	530.18 ±121.97	524.84 ±71.12	482.33 ±57.84 ¹⁾

表 4 清热解毒方对大鼠血中免疫细胞表面黏附分子 CD54 的影响(柳±s, n=6)

组别	剂量 /生药 g·kg ⁻¹	百分比 /%			平均荧光强度 /MFI		
		淋巴细胞	单核细胞	粒细胞	淋巴细胞	单核细胞	粒细胞
假手术	-	9.85 ±1.54 ²⁾	48.69 ±1.46	6.15 ±2.65	68.18 ±3.09 ²⁾	229.89 ±20.97 ²⁾	53.77 ±4.14
模型	-	58.62 ±6.37	75.81 ±30.60	14.63 ±6.25	124.81 ±9.02	484.54 ±20.18	74.90 ±18.60
清热解毒方	18	32.00 ±5.08 ²⁾	93.94 ±2.26	30.72 ±14.21	63.42 ±3.47 ²⁾	278.06 ±70.48 ²⁾	67.03 ±1.67
	24	47.06 ±4.04	93.91 ±0.87	34.64 ±22.15	62.32 ±8.01 ²⁾	221.77 ±47.31 ²⁾	57.29 ±23.23

4 讨论

本实验采用经典盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型。该模型模拟临床急性肠穿孔和腹膜炎的发病过程,能很好的反映脓毒症的病理生理变化。

以往实验研究证实,清热解毒的方药具有拮抗内毒素的作用,不仅可以通过对内毒素结构的直接破坏使其生物学活性及免疫原性减弱或消失,还可以通过增强机体免疫吞噬能力来提高对内毒素的清除能力;同时可拮抗多种炎性介质,从而减轻器官的损伤程度^[2-3]。

黏附分子在炎症、免疫反应等多种生理病理过程中发挥重要作用。白细胞穿过血管内皮细胞间隙向炎症部位移行是炎症过程的重要特征,其分子基础在于白细胞与内皮细胞表面黏附分子的相互作用以及细胞因子等因素对黏附分子表达的调节^[4]。CD54 属于免疫球蛋白超家族成员之一,是一种单链糖蛋白,起白细胞和内皮细胞黏附作用。CD11b/c 属于整合素超家族,它与 CD54 互为配体,起稳固的黏附作用并在细胞与基质之间传导信息,影响细胞的形态和表型,调控细胞分化增殖、黏附、迁移和血栓形成等过程。CD62L 属于选择素家族,只表达于

白细胞表面,其主要功能是介导白细胞与内皮细胞的初始黏附和淋巴细胞归巢^[5]。清热解毒方具有清热解毒的功效,具有较好的临床效果。本研究发现脓毒症大鼠血细胞 CD11b/c, CD54 表达增高,而 CD62L 表达降低;清热解毒方能够逆转上述黏附分子的异常表达,提示清热解毒方调整免疫细胞的机能状态可能是其抑制脓毒症急性炎症的部分机理。

[参考文献]

- [1] 董月青,姚咏明,等. 脓毒症中细胞免疫紊乱的机制[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(10): 636.
- [2] 戴锡珍,高淑娟. 黄连解毒汤体外抗内毒素作用的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(5): 31.
- [3] 陈海龙,吴咸中,关凤林,等. 中医通里攻下法对多器官功能不全综合征时肠道屏障功能保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(2): 12.
- [4] Carlso T M, Harlan J M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules[J]. Blood, 1994, 84(7): 2068.
- [5] 周同. 细胞黏附分子的研究进展[J]. 上海免疫学杂志, 1995, 15: 58.

[责任编辑 何伟]