

血必净注射液及其药代标示物对脓毒症大鼠炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 表达的影响*

孙梦杰¹, 屠亚茹¹, 欧阳慧子², 常艳旭¹, 何俊¹

(1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381)

摘要: [目的] 研究血必净注射液及其药代标示物对脓毒症大鼠炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8) 和白细胞介素-10 (IL-10) 表达的影响。 [方法] 30 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、血必净组、药代标示物组、左氧氟沙星组 (阳性对照组), 静脉注射给药后采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症大鼠模型, 并于给药后 5 h 于大鼠眼眶静脉取血, 离心取上清液。将取得的上清液采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 分别检测 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 的含量。 [结果] 血必净组、左氧氟沙星组和药代标示物组在给药 5 h 后, 脓毒症模型大鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-8 有显著降低。 [结论] 血必净注射液及其药代标示物能够显著抑制因炎症刺激造成的炎症因子的过度分泌。

关键词: 血必净注射液; 药代标示物; 脓毒症; 炎症因子

中图分类号: R285.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-9043(2018)01-0013-03

脓毒症是机体出现严重感染时引起的全身性炎症反应^[1], 病情严重时可发展为感染性休克、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 和多器官功能障碍综合征 (MODS)^[2], 是重症监护患者最常见的死亡原因, 病死率高达 20%~80%^[3-4]。

血必净注射液是王今达教授以血府逐瘀汤为基础研制出的中药复方注射液, 主要由红花、赤芍、川芎、丹参、当归 5 种中药组成^[5], 含有尿苷、没食子酸、鸟苷、丹参素钠、芍药苷、原儿茶醛、阿魏酸、丹酚酸 B、红花黄色素 A、洋川芎内酯 I、和洋川芎内酯 H 等有效成分^[6]。药理研究表明, 血必净具有调控炎症反应、抗氧化应激、改善凝血功能、保护内皮细胞、改善微循环、调节免疫功能等药理作用^[7]。目前, 血必净注射液已普遍应用于脓毒症及其并发症的治疗, 可以明显改善脓毒症患者的症状, 减少患者的痛苦^[8]。在本课题组之前开展的血必净注射液药代动力学研究中发现, 大鼠静脉注射血必净注射液

后, 其血浆中羟基红花黄色素 A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、阿魏酸、迷迭香酸、绿原酸、丹参素 9 种化合物具有良好的药代动力学属性, 最终确定为血必净注射液的药代标示物。研究表明, 血必净注射液能降低脓毒症中炎症因子水平^[9], 为确定血必净注射液及其药代标示物是否具有相同的药理作用, 本实验采用 ELISA 法分别考察血必净及各给药组对脓毒症大鼠血浆中 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 的影响。

1 试药与动物

1.1 试药 对照品羟基红花黄色素 A (MUST-12081605)、芍药苷 (MUST-16041901)、芍药内酯苷 (MUST-15091008)、氧化芍药苷 (MUST-15033010)、苯甲酰芍药苷 (MUST-15091010)、阿魏酸 (MUST-15091605)、迷迭香酸 (MUST-16040512)、绿原酸 (MUST-15041814) 和丹参素 (MUST-15082714) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司。血必净注射液 (1602191) 购自天津红日药业股份有限公司。盐酸左氧氟沙星注射液 (15101231) 购自扬子江药业集团有限公司。生理盐水 (6G95G6) 购自中国大冢制药有限公司。TNF- α ELISA 检测试剂盒 (569m0914)、IL-1 ELISA

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81303140, 81503457)。
作者简介: 孙梦杰 (1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。

通讯作者: 何俊, E-mail: hejun673@163.com。

检测试剂盒(368m0914)、IL-6 ELISA 检测试剂盒(385m0914)、IL-8 ELISA 检测试剂盒(386m0914)和 IL-10 ELISA 检测试剂盒(371m0914)均购自天津安诺瑞康生物技术有限公司。

1.2 动物 健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 级别 SPF 级, 体质量(240±10) g。购自北京华阜康实验动物科技有限公司。

2 方法

2.1 药代标示物溶液的配制 精密称取各对照品适量, 配置成混合对照品(每毫升含羟基红花黄色素 A 700 μg、芍药苷 1 045 μg、芍药内酯苷 17 μg、氧化芍药苷 44 μg、苯甲酰芍药苷 26 μg、阿魏酸 30 μg、迷迭香酸 12.5 μg、绿原酸 4.3 μg、丹参素 5.7 μg)。混合对照品中各成分含量与血必净注射液中一致。

2.2 动物模型的分组与建立

2.2.1 分组 实验大鼠随机分成 5 组, 即空白组、模型组、血必净组、药代标示物组、左氧氟沙星组, 每组 6 只。血必净组及药代标示物的给药剂量均为 10 mL/kg 左氧氟沙星组的给药剂量为 0.83 mL/kg, 空白组给予生理盐水(10 mL/kg), 分别于造模前给药。

2.2.2 模型的建立 实验采用盲肠结扎穿孔导致腹腔感染的方法来制备脓毒症大鼠模型。方法如下: 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(4 mL/kg), 待麻醉后沿腹中线切开 2.0 cm 左右进入腹腔, 游离出盲肠, 生理盐水浸润后取出, 在距盲肠远端 1/3 处结扎, 用 9 号针头贯通盲肠远端穿刺 2 次, 并挤出少量粪便, 回纳, 10~0 手术缝线逐层缝合伤口。造模后在大鼠皮下注射 37℃生理盐水(50 mL/kg)抗休克。

2.3 血浆样品的采集 各实验组大鼠在静脉注射给药 5 h 后, 分别于大鼠眼眦静脉取血并置于肝素化塑料管中, 用 6 000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清置于-70℃冰箱储存备用。

2.4 ELISA 试剂盒检测 将取得的上清液用 ELISA 法按照检测试剂盒说明书分别检测 TNF-α、IL-1、

IL-6、IL-8 和 IL-10 的含量。

2.5 统计学处理 实验数据用 SPSS 18.0 软件进行分析, 实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较若方差齐采用 LSD 法, 若方差不齐采用 Dunnett's T3 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

与生理盐水对照组比较, 模型组在造模 5 h 后炎症因子 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 显著升高($P<0.05$)。与模型组比较, 血必净组、左氧氟沙星组和药代标示物在给药 5 h 后, 炎症因子 TNF-α、IL-1 和 IL-8 有显著降低($P<0.05$), 而炎症因子 IL-6 和 IL-10 无统计学差异, 结果见表 1。表明血必净注射液的药代标示物同样能够显著抑制因炎症刺激造成的炎症因子的过度分泌, 对治疗脓毒症有很好的疗效。

4 讨论

从西医角度来看, 脓毒症的发病原因主要是炎症和凝血功能障碍^[10], 机体患脓毒症时, 炎症细胞分泌大量的炎症因子导致炎症的发生。西医临床上多用抗生素、营养支持、重症监护治疗等方式进行治疗^[11], 但是脓毒症的死亡率仍然很高^[12]。为了降低脓毒症的病死率, 目前大多采用中西医结合治疗的方法, 并且取得了良好的临床效果^[13]。从中医角度来看, 脓毒症的发病病机为正虚毒损, 络脉瘀滞^[14], 在外部刺激下, 瘀血、毒热、机体正气不足、痰湿内阻, 导致经脉运行不畅, 脏器损伤^[15]。血必净注射液是根据“四证四法”的辨证治疗原则研制出的复方制剂, 即: 活血化瘀法治疗瘀血; 清热解毒法治疗毒热; 扶正固本法治疗正气不足; 通里攻下法治疗痰湿内阻^[16]。临床研究表明, 血必净注射液可减少脓毒症患者的病死率, 缩短在重症加强护理病房的时间^[17-18]。

本实验结果表明, 脓毒症模型大鼠静脉注射血必净注射液和其药代标示物 5 h 后, 大鼠血清中 IL-1、TNF-α 和 IL-8 水平显著性降低, 而 IL-6、IL-10 的分泌有降低的趋势, 但无统计学差异。说明血

表 1 血必净及其药代标示物对脓毒症大鼠血清中炎症因子水平影响

pg/mL

组别	n	TNF-α	IL-1	IL-6	IL-8	IL-10
生理盐水对照组	6	27.73±1.69	145.29± 9.26	79.29±13.68	563.15±38.43	116.93± 2.65
模型组	6	38.78±5.18*	222.01±14.26*	111.51± 3.34*	863.19±34.50*	163.12±17.83*
血必净组	6	26.97±4.26 [#]	158.40± 1.87 [#]	95.94±12.46	667.09±31.06 [#]	141.59±10.91
左氧氟沙星组	6	27.01±2.26 [#]	159.32±13.32 [#]	101.49± 9.29	664.34±23.89 [#]	158.84±16.113
药代标示物组	6	26.79±1.63 [#]	155.22±12.31 [#]	98.24± 4.32	630.62±30.96 [#]	148.14± 5.403

注: 与生理盐水对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

必净注射液的药代标示物羟基红花黄色素 A、芍药苷、芍药内酯苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、阿魏酸、迷迭香酸、绿原酸、丹参素能够显著抑制因炎症刺激造成的细胞因子 IL-1、TNF- α 和 IL-8 的过度分泌,且作用相当,为进一步对血必净注射液药效成分的筛选提供了理论基础。

参考文献:

[1] Michael W, Stewart ML. Progression to macula off tractional retinal detachment after a contralateral intraoperative intravitreal bevacizumab injection for proliferative diabetic retinopathy[J]. Clinical ophthalmology (Auckland,N.Z.),2015, 25(9):409-411.
[2] 梁卫强,王丽聪. 糖尿病视网膜病变的防治进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2014,27(9):1763-1766.
[3] Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis[J]. Br J Anaesth,2011,107(1):57-64.
[4] Niemann JT, Garner D, Lewis RJ. Tumor necrosis factor alpha is associated with early postresuscitation myocardial dysfunction [J]. Crit Care Med,2004,32(8):1753-1758.
[5] 雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究-血必净的药效学观察[J]. 中国危重病急救医学,1997,9(12):720.
[6] 冀兰鑫,黄浩,姜民,等. HPLC 测定血必净注射液内 11 种主要成分[J]. 中国中药杂志,2010,35(18):2395.
[7] 王靓,郑云辉. 血必净注射液药理研究进展[J]. 临床医药实践,2016,43(7):542-544.
[8] 张继翱,李家瑞,乔佑杰,等. 血必净注射液治疗脓毒症急

性肾损伤的临床疗效及对炎症因子的影响[J]. 天津中医药,2016,33(1):13-17.
[9] 张淑文,孙成栋,文艳,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血清炎症介质及 Th1/2 的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2006,18(11):673-676,706.
[10] 陈华君,徐娜. 血必净注射液对脓毒症患者凝血功能的影响[J]. 现代医药卫生,2012,28(15):2293-2294.
[11] 吴彩军,刘朝霞,刘禹赓,等. 2008 年拯救严重脓毒症与感染性休克治疗指南[J]. 继续医学教育,2008,22(1):52-60.
[12] Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012 [J]. Crit Care Med, 2013,41(2):580-637.
[13] 金志元. 中西医结合治疗脓毒血症 45 例临床观察[J]. 新中医,2015,47(5):135-137.
[14] 胡云霞,王醒. 略论脓毒症中“毒”的形成与致病[J]. 中国中医急症,2013,22(4):599,606.
[15] 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.
[16] 曹书华,王今达,李银平. 从“菌毒并治”到“四证四法”-关于中西医结合治疗多器官功能障碍综合征辨证思路的深入与完善[J]. 中国危重病急救医学,2005,11(17):7-9.
[17] 杨锡燕. 血必净注射液治疗脓毒症 30 例临床观察[J]. 天津中医药,2006,23(2):92.
[18] 王月华,李妍. 脓毒血症发病机制研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(4):299-300,303.

(收稿日期:2017-09-15)

Effect of treatment with Xuebijing injection and its pharmacokinetics markers on serum inflammatory factor indude TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-10 in rats with sepsis

SUN Mengjie¹, TU Yaru¹, OUYANG Huizi², CHANG Yanxu¹, HE Jun¹

(1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China)

Abstract: [Objective] To study the effect of treatment with Xuebijing injection and its pharmacokinetics markers on serum inflammatory factor, indude serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10), in rats with sepsis. **[Methods]** Rats were divided into five groups (each 6 rats, $n=6$) i.e. blank operation, sepsis, sepsis with Xuebijing treatment, Xuebijing pharmacokinetics markers treatment, and levofloxacin treatment group (positive control group). After intravenous injection, sepsis was reproduced in rats by cecal ligation and puncture. Blood samples were collected at 5 h after administration via fossa orbitalis. The concentration of TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-10 was determined by enzyme linked immunoad sordent assay (ELISA). **[Results]** The study shows that the concentration of TNF- α , IL-1 and IL-8 were significantly increased in the group of sepsis with Xuebijing treatment, Xuebijing pharmacokinetics markers treatment, and levofloxacin treatment. **[Conclusion]** Xuebijing injection and its pharmacokinetics markers can inhibit the release of serum inflammatory factor in rats with sepsis.

Key words: Xuebijing injection; pharmacokinetics markers; sepsis; inflammatory factor