

雄各半, 各组灌胃 50 度沙河王酒 0.34 ml/20 g, 观察记录各动物翻正反射消失时间, 并立即依据不同组别分别灌药, 记录每组翻正反射恢复时间。结果见表 3。

表 3 保肝解酒冲剂对小鼠翻正反射恢复时间的影响($\bar{X} \pm S$)

组别	动物数 (n)	翻正反射恢复时间 (min)	t	P
空白组	10	288 ± 64.54		
阳性对照组	10	± 226.6 ± 42.14	2.519	< 0.05
号高剂量组	10	197.4 ± 83.89*	2.706	< 0.05
低剂量组	10	224.1 ± 45.4	2.56	< 0.05
高剂量组	10	128.2 ± 60.62* *	5.707	< 0.01
低剂量组	10	180.6 ± 77.11*	3.77	< 0.01

以上数字表明, 各组翻正反射恢复时间与空白对照组相比, 均有显著性差异, 其中尤以 号高剂量组, 低剂量组作用明显, 从给药各剂量组与阳性对照组相比, 除 号高剂量组与之相比有非常显著性差异 ($P < 0.01$) 外, 其余各组与阳性对照组相比, 均无差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

祖国医学认为, 酒为辛热之品, 少饮通行血脉, 过饮则燔气血、助湿热、损脏腑、变生它疾。依据祖国医学

理论, 并结合饮酒后诸多证候表现, 我们认为酒性辛热悍烈, 进入体内必先伤脾胃, 蒸腾气血, 蒙扰清窍, 故头晕目眩、舌蹇神乱。同时脾胃运化受阻, 中焦气机紊乱, 而使湿聚痰生。所以说酒伤人体主要病位在脾胃、肝胆, 主要病机变化为湿热、血热、气逆、风动, 日久甚而痰阻、血瘀。

在此理论指导下确立的保肝解酒冲剂功效醒脾养肝、解酒毒、止烦渴, 临床上不仅能改善因饮酒过量而出现的一系列不良反应, 更能预防醉酒。本次实验结果表明, 保肝解酒冲剂在预防小鼠醉酒和缩短已醉小鼠反正反射恢复时间方面皆具有很好的疗效, 为该药临床提供了理论依据。

从分组实验结果来看, 说明保肝解酒冲剂的疗效同剂量呈正比关系; 同时从 、 号药物的疗效来看, 各项实验结果均表明 号优于 号, 提示保肝解酒冲剂在制剂方法上醇提优于水提。

参考文献

- 1 罗忠友. 解酒冲剂的实验研究. 中药通报, 1998; 13(4): 28
- 2 章文炽. 枳葛饮等解酒作用的实验研究. 中国药理学杂志, 194; (3): 137
- 3 黄敬耀. 醉翁乐的药理实验研究. 江西中医学院学报, 1997; (9): 77

(收稿日期: 2001-05-08)

油酸导致 ARDS 大鼠肺泡巨噬细胞分泌细胞因子及生脉散的调节作用

麻晓鹏 肖 东

(广东省深圳市儿童医院 518026)

韩 娟

(天津中医学院 300193)

摘 要 目的: 观察生脉对 ARDS 大鼠肺泡巨噬细胞分泌细胞因子调节作用。方法: 健康 Wistar 大鼠 45 只, 随机分成对照组、油酸组和生脉治疗组, 各 15 例。采用尾静脉注入油酸法复制 ARDS 模型。分离和培养大鼠肺巨噬细胞, 采用 MTT 法测定培养液中的 TNF、IL-1 的活性。结果, 油酸组 TNF、IL-1 活性高于对照组, 生脉治疗后 TNF、IL-1 分泌减少。结论: 油酸导致 ARDS 大鼠肺泡巨噬细胞分泌大量细胞因子, 生脉散可起到下调作用。

关键词: 油酸 ARDS 细胞因子 生脉散

中图分类号: R289.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-7145(2001)03-0027-03

在机体遭受创伤和感染等多种恶性刺激情况下,

巨噬细胞(Macrophage, MP)的持续、过度激活, 导致

MP 分泌大量的细胞因子和其他介质,造成局部组织细胞和全身性损伤。抑制巨噬细胞过度活化,减少细胞因子过度分泌,可以保护脏器功能、降低死亡率^[1]。本实验组观察了肺泡巨噬细胞在 ARDS 时分泌细胞因子的变化,并探讨了生脉散的调节作用。

1 材料与方

1.1 实验动物与分组:

健康 Wistar 大鼠(购于军事医学科学院实验动物中心)45 只,体重 200~260 g,雌雄各半。在实验室用标准颗粒混合饲料(军事医学科学院实验中心提供)喂养 1 周后,随机分成对照组、OA 组(油酸组)和治疗组,各 15 例。对照组($n=15$):尾静脉注入生理盐水 0.04 ml/kg。OA 组(油酸组, $n=15$):尾静脉注入油酸 0.04 ml/kg,制作 ARDS 模型。治疗组($n=15$):在尾静脉注入油酸前 6 小时,用生脉散水煎液(1 g/ml)灌胃,1 ml/100 g/次。

1.2 材料:

1) 细胞株:测定 TNFa 用敏感的 L929 细胞株;HT-2 细胞株、Babic 小鼠胸腺细胞供 IL-1 检测使用。

2) 标准品:入重组白细胞介素-1(hrIL-1, $1 \times 10^5 \mu\text{g/ml}$)为美 DNAX 分子生物研究所赠送。

3) 四甲基偶氮唑(MTT, Sigma 公司)用无酚红 DMEM 培养溶解,使 MTT 浓度为 5 mg/ml,抽滤除渣,现用现配。

4) MRPI-1640 培养基(简称 1640)为 Gibco 公司提供,胎牛血清(NCS)为中国科学院血液病研究所产品。

2 方法及观测指标

2.1 静脉主油酸及生理盐水 6 小时后,麻醉开胸,直视下从左心室抽抗凝血,测 PaO_2 、 PaCO_2 ;再断头放血,取肺称重,计算肺系数(肺重量/体重 $\times 100$),对双肺近膈面组织作石蜡切片,HE 染色。

2.2 大鼠肺巨噬细胞的分离和培养:Wistar 大鼠,用 4% 的水合氯醛(7.5 ml/kg)经腹腔注射麻醉,无菌条件下解剖颈部分离气管至胸骨柄上缘。预置二道结扎线,于胸骨柄上缘用套管针刺,使套管深入至支气管分叉水平,结扎固定,穿刺部位以上气管用丝线结扎以防冲洗液倒灌。用生理盐水 4 ml 注入肺脏后,轻轻按摩胸部,回抽冲洗液,如此反复冲洗 4 次,抽出冲洗液注入离心管中。1700 转/分,离心 10 分钟后弃掉上清液,用 Haulks 液反复洗涤 3 次。甲紫和瑞氏染色证实为巨噬细胞,纯度 90%,苔盼兰色鉴定细胞成活率为 95%。将上述细胞悬浊液离心弃上清液,将沉淀的细胞用适量 1640 培养基混匀后置 37℃,5% CO_2 孵育箱内 12 小时,弃掉非贴壁细胞即可获得高纯度的大鼠肺泡巨

噬细胞。将巨噬细胞浓度调至 $1 \times 10^6 \text{ ml}$,分别加入 24 孔板内,置 37℃,5% CO_2 孵育箱内 48 小时,收集培养上清液,存放于 -24℃ 冰箱内待测。

2.3 细胞因子活性测定^[2]:TNFa 以细胞素效应百分比数表示,IL-1 用 $\mu\text{g/ml}$ 表示。

TNF 活性测定:采用 MTT 法进行测定。培养 L929 细胞株,使其达到最佳状态,离心(1700 r/min, 10 min,下同),调细胞数为 $1.5 \times 10^4/\mu\text{l}$,混匀后备用。在 96 孔板中加入已收集好的上清液(100 μl),并作 3 个复孔,同时作出两个阴性对照孔(加入 100 μl RPMI-1640 培养基)。将 L929 细胞悬液加入以上各孔中(100 μl /孔),将 96 孔板在 37℃,5% CO_2 孵育箱内孵育 40 小时。孵育后的 96 孔板离心,弃去上清液。在 96 孔板中加入 MTT 液 100 μl /孔,然后在 37℃,5% CO_2 孵育箱内孵育 4 小时。将 96 孔板离心,弃去上清液,加入盐酸异丙醇(1:300),振荡 15 min 后在酶标仪上测 OD 值,波长为 570 nm。结果以细胞毒效应百分比数表示。

计算公式:细胞毒效应(%) = $\left(\frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \right) \times 100$

IL-1 活性测定:取 Babic 小鼠胸腺细胞,调整浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$,加入 96 孔细胞培养板(50 μl /孔);加入 IL-1 标准品或样品,混匀后置 37℃,5% CO_2 孵育箱内孵育 24 小时。将上述培养板中各孔上清液取出 100 μl ,移入另一 96 孔板中,半 HT-2 细胞稀释成 $1 \times 10^5/\text{ml}$,加入 96 孔板中(100 $\mu\text{l}/\text{ml}$),置 37℃,5% CO_2 孵育箱内孵育 20 小时,其余步骤同 TNF 测定。用标准品(IL-1)的 OD 值做标准曲线,通过标准曲线计算出样品的 IL-1 活性,结果以 $\mu\text{g/ml}$ 表示。

2.4 统计学处理

所得结果经计算机 SPSS 统计学软件包进行方差分析。

3 结果

3.1 各组动物的 PaO_2 、 PaCO_2 测定结果 OA 组的动脉血 PaO_2 值明显低于对照组,而 PaCO_2 值高于对照组:见表 1

表 1 各组动物的 PaO_2 和 PaCO_2 测定结果(kPa) ($\bar{X} \pm S$)

	PaO_2	P	PaCO_2	P
对照组	12.22 \pm 0.31		4.03 \pm 0.15	
治疗组	12.11 \pm 0.36	< 0.05*	4.06 \pm	< 0.05*
油酸组	9.58 \pm 0.67	< 0.05#	4.58 \pm 0.27	< 0.05#

* 与对照组相比 # 与 OA 组相比

3.2 肺系数

OA 组 1.02 ± 0.06 , 高于对照组及治疗组 ($P < 0.05$)。如图 1

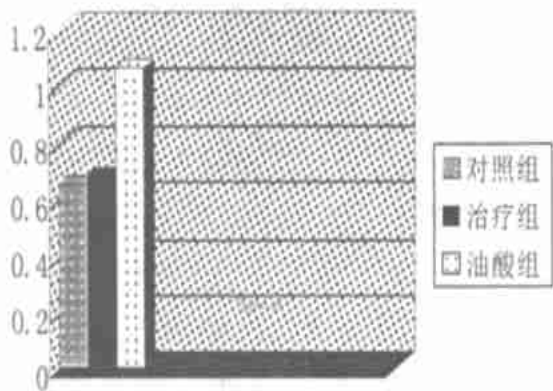


图 1 各组动物的肺系数

3.3 各组动物肺泡巨噬细胞分泌 IL-1 和 TNF α 的变化情况:

OA 组肺泡巨噬细胞分泌 IL-1、TNF α 的水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), 治疗组亦明显高于对照组, 但是明显低于 OA 组 ($P < 0.05$)。见表 2

表 1 各组动物肺泡细胞分泌 IL-1 和 TNF 的变化情况 ($\bar{X} \pm S$)

组别	n	IL-1 (μ ml)	TNF α (%)
对照组		22.6 ± 3.5	7.4 ± 1.3
OA 组	6	$150.2 \pm 10.7a$	$78.3 \pm 4.4a$
中药组	6	$69.3 \pm 7.4b,c$	$30.5 \pm 3.8b,c$

VS 对照组 a— $P < 0.01$ b—0.05

造模组 c— $P < 0.05$

4 讨论

油酸是毒性较强的脂肪酸, 所引起化学性炎症, 产生肺损伤, 故目前常用静注油酸来复制 ARDS 的病理特性是肺毛细血管通透性增加和肺间质水肿, 肺间质水肿是由于肺微血管通透性增加的结果^[3]。肺泡毛细血管通透性增加, 血浆及细胞成分渗入肺泡腔, 抑制肺表面活性物质; 肺泡腔内大量炎性细胞浸润, 激活的粒细胞释放 PL A₂、氧自由基及中性粒细胞趋化因子和各种炎症介质, 形成急性肺损伤的恶性循环。

在本实验发现, 模型组大鼠肺泡巨噬细胞分泌 IL-1、TNF 水平显著高于组, 表明在炎症的刺激下或肺脏损害释放的生物活性物质的刺激下, 肺泡巨细胞活化并释放大量的炎性细胞因子, 发挥局部效应。有实验

发现已经证实 AM 释放的 TNF 是引起 ARDS 的关键因子, 可以激活中性粒细胞, 使其细胞表面达白细胞分化抗原 CD11CD18 水平增高^[4], 同时刺激肺微血管内皮细胞, 增加其表面表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)^[5]。研究表明, PMN 黏附分子和血管内皮细胞表面黏附分子表达在趋化因子, 脂质介质作用下可发生上调^[6], 从而导致白细胞—内皮细胞间相互作用, 促进中性粒细胞的聚集、黏附和渗出, 释放大量活性氧和弹性蛋白酶, 对血管内皮细胞及肺泡上皮细胞产生损伤作用。可见肺泡巨噬细胞分泌细胞因子在肺泡局部的表达对肺损伤发生可能起重要作用。

生脉散为中医名方, 其中人参甘温, 补肺益气生津; 麦冬甘寒, 养阴清肺而生津; 五味子酸温, 敛肺止汗而生津。我们发现中药组大鼠肺泡巨噬细胞分泌细胞因子的水平显著低于 OA 组, 但高于对照组。可见生脉散具有显著的免疫调节效应, 抑制肺泡巨噬细胞过度活脂、减少炎症细胞的浸润。生脉散可能是通过局部和全身两种效应来达到其保护作用的。一方面, 活血清解灵可抑制 ARDS 大鼠肺泡巨噬细胞分泌 IL-1、TNF, 减轻对中性粒细胞的刺激和趋化、抑制肺微血管内皮细胞细胞间黏附分子和内皮白黏分子的表达, 减少局部中性粒细胞的聚集; 另一方面, 通过全身效应, 抑制 PMN 表面黏附分子的表达, 减少 PMN 在肺脏局部分聚集、黏附及渗出, 从而起到保护作用, 这可能是生脉散治疗急性肺损伤的分子生物学机制。

参考文献

- 1 Bellanti JA, et al. Cytonines and the immune response. Pedia Clin North AM 1994; 41: 597
- 2 李会强, 姚智, 卢奕, 等. IL-2, IL-6 及 TNF α MTT 检测方法的建立. 天津第二医院学报, 1993; 9(3): 4
- 3 Gioffi WC, Burlison DG, Pruitt BA. Leukocyte response to injury. Arch Surg 1993; 128: 260 ~ 267
- 4 McKay C, Gallagher G, Baxter JN, et al. Systemic complications in acute pancreatitis are associated with increased monocyte cytokine release. 1994; 35: 575
- 5 Okunura Y, Lroue IF, Fujiyama Y, et al. Effects of serine protease inhibitors on accumulation of poly-morphonuclear leukocyte in the lung induced by acute pancreatitis in rats. J-gastroenterol 1995; 30: 379 ~ 386
- 6 Tonnesen Mg, Aderson DC, Springter TA, et al. Adherence of neutrophils to cultured human microvascular endothelial cells, dependence upon the Mac-1, P150.95 Glycoprotein family. J Clin invest 1989; 83: 637 ~ 646

(收稿日期: 2001-05-18)