

## 炎调方对脓毒症急性肺损伤大鼠肺组织髓过氧化物酶和丙二醛水平的影响

汪海慧, 沈晓红\*, 熊旭东

上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021

**摘要:** 目的 观察炎调方对脓毒症急性肺损伤 (ALI) 大鼠肺组织髓过氧化物酶 (MPO)、丙二醛 (MDA) 水平的影响。方法 清洁级健康雄性 SD 大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组、炎调方组、地塞米松组, 炎调方组 ig 9.9 g/kg 炎调方, 地塞米松组 ig 0.45 mg/kg 地塞米松, 每天给药 1 次, 连续给药 3 d。末次 ig 2 h 后采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症 ALI 模型, 分别于造模后 24 h 处死动物, 进行肺组织 HE 染色, 测定各组大鼠湿/干重比 (W/D), 肺组织 MPO、MDA 水平。结果 模型组大鼠肺组织损伤程度、MPO 及 MDA 水平较对照组及假手术组显著增高 ( $P < 0.01$ ), 炎调方组、地塞米松组肺组织损伤程度、MPO 及 MDA 水平较模型组显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。结论 炎调方可有效减轻脓毒症 ALI 大鼠的炎症及氧化应激反应。

**关键词:** 炎调方; 脓毒症; 急性肺损伤; 髓过氧化物酶; 丙二醛; 地塞米松

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)03-0394-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.03.012

## Influence of Yantiaofang on myeloperoxidase and malondialdehyde in lung tissue of rats with acute lung injury induced by sepsis

WANG Hai-hui, SHEN Xiao-hong, XIONG Xu-dong

Shuguang Hospital affiliated with Shanghai University of T.C.M., Shanghai 200021, China

**Abstract: Objective** To observe the influence of Yantiaofang on myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) in lung tissue of rats with acute lung injury induced by sepsis. **Methods** Male clean SD rats were randomly divided into control group, Sham group, model group, Yantiaofang group, and dexamethasone group. Rats of Yantiaofang group and dexamethasone group were fed respectively by 9.9 g/kg and 0.45 mg/kg dosage once daily for 3 d. After 2 h of the last administration, acute lung injury induced by sepsis model was reproduced in rats with cecal ligation and puncture (CLP). Each rat was tested after the 24 h when the CLP completed. Histopathological sections of the lung tissues of rats were stained by HE for the observation of histopathological changes. The ratio of W/D and the contents of MPO and MDA in lung tissue were also measured for the observation of inflammation. **Results** Compared with control group and Sham operation group, there was significant increase in the ratio of W/D, MPO and MDA in rat lung tissue of model group ( $P < 0.01$ ). On the other side, compared with model group, the ratio of W/D, MPO and MDA in rat lung tissue of Yantiaofang group and dexamethasone group were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Yantiaofang can effectively decrease the inflammation and oxidative stress in rats with acute lung injury induced by sepsis.

**Key words:** Yantiaofang; sepsis; acute lung injury; myeloperoxidase; malondialdehyde; dexamethasone

脓毒症 (Sepsis) 是由细菌感染所致的全身炎症反应综合征 (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), 是诱发多脏器功能障碍综合征 (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) 的重要原因。急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是

各种原因造成弥漫性肺间质及肺泡水肿, 而导致的急性低氧性呼吸功能不全。引起 ALI 的原因多样, 其中脓毒症被认为是造成 ALI 进展的最主要高风险因素<sup>[1]</sup>。肺组织髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 是主要存在于中性粒细胞和单核细胞中的一

收稿日期: 2015-07-12

项目基金: 国家自然科学基金资助项目 (81303105)

作者简介: 汪海慧 (1982—), 女, 博士, 主治医师, 研究方向为重症感染与急救。E-mail: wanghaihui1982@126.com

\*通信作者 沈晓红 (1974—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向为危重病与中医药临床疗效评价。E-mail: jczxshen@163.com

种代谢酶<sup>[2]</sup>, 其水平及活性变化可反映中性粒细胞的功能与活性状态, 反应肺组织的损伤程度<sup>[3]</sup>。丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 作为脂质过氧化标记物, 可用于评价机体的应激水平<sup>[4]</sup>, 在脓毒症时其水平可显著增加<sup>[5]</sup>, 并与脓毒症预后相关<sup>[6]</sup>。脓毒症 ALI 一直作为重症医学科中医药治疗的重点研究方向, 在长期临床观察的基础上, 认为其发病初期以实证为主, 温热邪毒侵犯肺及大肠为重要病机, 据此提出运用通腑活血、凉营解毒法进行治疗, 并创立炎调方。前期临床及动物实验表明, 炎调方具有凉血解毒、通腑活血之功效, 对脓毒症血清炎症因子的释放具有调控作用<sup>[7-9]</sup>。本研究制备脓毒症 ALI 大鼠模型, 观察炎调方对脓毒症 ALI 大鼠肺组织 MPO、MDA 水平的影响。

## 1 材料

### 1.1 动物

50 只清洁级健康雄性 SD 大鼠, 体质量 (200~220) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (沪) 2008-0016, 饲养于清洁级动物房内, 温度 23 °C, 湿度 50%, 12 h 照明, 动物自由进食饮水。

### 1.2 药物及主要试剂

炎调方由桃仁、生大黄、芒硝、玄参、赤芍、当归等药物组成, 所有药物均为符合《中国药典》2015 年版规定并加工炮制合格的饮片, 由上海中医药大学附属上海市中医医院中药房提供。煎煮方法: 以 10 倍体积的蒸馏水浸泡饮片 30 min, 先用武火煮桃仁、玄参、赤芍、当归, 沸腾后改用文火煎煮 20 min, 再加入大黄继续煎煮 10 min 后熄火取药液; 第二煎加入相当于饮片 6 倍体积的蒸馏水, 用武火煎煮至沸腾后改文火煎煮 20 min, 熄火取药液, 两次药液混合, 用四层无菌纱布过滤, 最后纳入芒硝并充分溶解, 将药液浓缩成含生药 1.0 g/mL 的棕色透明液体, 置 4 °C 冰箱保存备用<sup>[8]</sup>。

注射用地塞米松磷酸钠 (马鞍山丰原制药有限公司, 批号 140612-1, 每支 5 mg); MPO 和 MDA 检测试剂盒 (上海富勒生物科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

DENLEY DRAGON Wellscan MK 2 全自动多功能酶标仪 (芬兰 Thermo 公司); TGL-168 离心机 (上海安亭科学仪器厂); LEICA HI1220 烘片机、LEICA RM2035 旋转切片机、LEICA ASP300 自动脱水机、LEICA EG1160 石蜡包埋机 (德国徕卡仪

器公司)。

## 2 方法

### 2.1 脓毒症 ALI 模型的制备

采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症 ALI 大鼠模型<sup>[10]</sup>: 大鼠经 10% 水合氯醛 (0.5 mL/kg) 麻醉后, 以腹正中作一 1.5 cm 长的切口, 找到盲肠, 在其根部结扎, 用 5 mL 注射器针头穿通 3 次, 轻挤出少量肠内容物, 留置 2 mm 皮瓣防止针孔闭合, 还纳盲肠于腹腔, 逐层缝合腹壁切口, 术毕 sc 生理盐水 (30 mL/kg) 抗休克<sup>[7-8]</sup>。假手术组经麻醉后开腹, 轻轻翻动肠道后关腹。

### 2.2 动物分组及给药

大鼠按随机数字表分为 5 组: 对照组、假手术组、模型组、炎调方组、地塞米松组, 每组 10 只, 适应性饲养 1 周。炎调方组 ig 炎调方 (生药量为 9.9 g/kg, 按原方临床剂量换算为动物等效剂量<sup>[7-8,14]</sup>), 地塞米松组 ig 地塞米松 (0.45 mg/kg), 给药体积为 10 mL/kg, 每天给药 1 次, 连续给药 3 d。对照组、假手术组、模型组 ig 等体积生理盐水。末次 ig 2 h 后, 进行 CLP 手术, 术后 24 h 取材。

### 2.3 生物样本的采集与指标检测

**2.3.1 生物样本的采集** ip 10% 水合氯醛麻醉处死大鼠后, 沿大鼠左右肋软骨迅速打开胸腔, 快速取出左右肺, 冰上切取左、右肺组织。

**2.3.2 肺湿/干重比 (W/D) 的测定** 取左肺测定肺湿/干重比 (W/D)。用滤纸吸去组织多余水分后称重 (湿重), 后置于 60 °C 烤箱内干烤 72 h, 再次称重 (干重), 计算肺湿/干重比 (W/D)。

**2.3.3 肺组织 HE 染色** 右肺用冰生理盐水冲洗表面, 取 1/3 组织标本, 经甲醛固定后, 常规石蜡包埋、切片、二甲苯脱蜡, 再经各级乙醇至水洗, 苏木素、伊红染色后常规脱水, 透明, 封片。

**2.3.4 MPO 及 MDA 水平检测** 剩余肺组织以生理盐水制备成 10% 匀浆, 按照 MPO 和 MDA 检测试剂盒说明书操作, 分别在 460 和 532 nm 处测吸光度 (A) 值, 根据标准品计算肺组织中 MPO 和 MDA 水平。

### 2.4 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 18.0 统计软件, 组间均数比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 一般情况观察

对照组和假手术组大鼠形态、饮食、呼吸、活

动量无明显异常，大便正常；模型组大鼠术后精神萎软，体毛竖立、凌乱，活动少，呈蜷缩状，眼鼻处分泌物多，不欲饮食，呼吸频率增快，腹部膨隆，无大便；炎调方与地塞米松组大鼠术后精神状况、活动量及眼鼻分泌物好于模型组。

### 3.2 肺组织损伤情况

**3.2.1 肺组织病理染色** 对照组及假手术组肺组织形态、结构正常，肺泡量多，其腔内清晰，肺泡间隔无明显水肿、炎症等病理改变；模型组可见肺间质水肿明显，炎症细胞大量浸润，肺泡明显减少，肺组织实变明显；炎调方及地塞米松组与模型组比较，损伤范围较小，肺泡量较多，肺间质水肿及炎

性细胞浸润减轻，肺实变减轻。结果见图1。

**3.2.2 肺组织 W/D 值的测定** 模型组肺组织 W/D 值较对照组及假手术组明显升高，差异显著 ( $P < 0.01$ )；炎调方组及地塞米松组肺组织 W/D 值较模型组明显降低 ( $P < 0.01$ )；地塞米松组肺组织 W/D 值较炎调方组降低 ( $P < 0.05$ )。结果见表1。

### 3.3 肺组织中 MDA、MPO 水平测定

模型组 MPO 水平明显高于对照组及假手术组 ( $P < 0.01$ )；炎调方及地塞米松组 MDA、MPO 水平较模型组均有不同程度的下降 ( $P < 0.05$ )，而炎调方与地塞米松组 MDA、MPO 水平差异不显著。结果见表2。

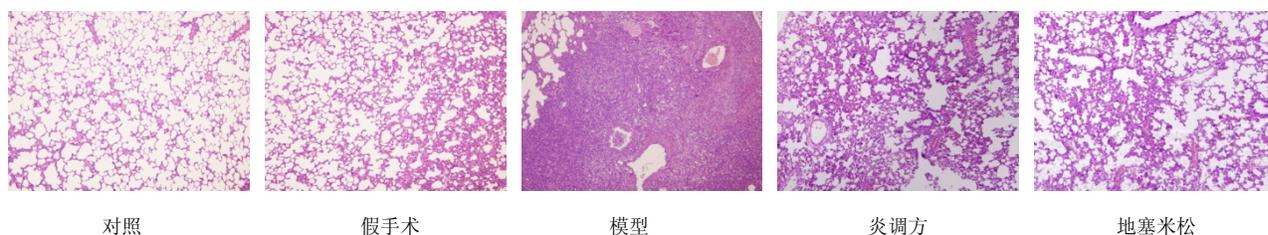


图1 各组大鼠肺组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of lung tissue of rats in each group

表1 各组大鼠肺组织 W/D 值比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Comparison of W/D value in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	W/D
对照	—	3.722 ± 0.125
假手术	—	3.939 ± 0.103
模型	—	6.297 ± 0.155 <sup>***</sup>
炎调方	9900	5.303 ± 0.128 <sup>△△</sup>
地塞米松	0.45	4.884 ± 0.097 <sup>△△☆</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组比较: <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 与炎调方组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs sham group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs Yantiaofang group

表2 各组大鼠肺组织 MDA 和 MPO 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Comparison of MDA and MPO levels in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	MDA/(nmol·mL <sup>-1</sup> )	MPO/(U·g <sup>-1</sup> )
对照	—	1.493 ± 0.962	1.255 ± 0.101
假手术	—	1.739 ± 0.131	1.579 ± 0.102
模型	—	4.458 ± 0.426 <sup>**###</sup>	3.383 ± 0.361 <sup>**###</sup>
炎调方	9900	2.488 ± 0.177 <sup>△</sup>	1.998 ± 0.153 <sup>△</sup>
地塞米松	0.45	2.100 ± 0.103 <sup>△△</sup>	1.624 ± 0.159 <sup>△△</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组比较: <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs sham group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group

## 4 讨论

研究表明，氧化应激在 ALI 的发生发展过程中起着重要的作用。MPO 是一种亚铁血红素酶，其为髓细胞的特异性标志，主要存在于中性粒细胞中，可催化氯离子生成次氯酸和具有氧化能力的自由基，从而启动脂质过氧化反应<sup>[11]</sup>。MDA 是自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的产物，可反应组织的过氧化程度<sup>[12]</sup>。当机体处于炎症及氧化应激状态时，体内产生的氧化物超过机体的抗氧化能力，即会产生组织损伤。

脓毒症 ALI 发生率及病死率高，对人类健康造成重大威胁。近年来随着抗生素的不断面世及治疗方法日趋多样化，仍未能明显改善其预后。既往脓毒症的研究多集中在炎症反应方面，近年来，氧化应激在脓毒症发展过程中所起的作用越来越受到人们的重视。脓毒症在中医学理论体系中并无相应的病名，根据症状体征和疾病演变过程，脓毒症当属中医学“温病”“热病”范畴。脓毒症 ALI 则属于中医“喘证”、“暴喘”、“喘脱”范畴。诸多临床研究证明中药联合西医疗疗脓毒症 ALI 比单纯西医疗疗效果显著，且已有研究表明中药可改善机体氧化应激状态，减轻机体损伤的严重程度<sup>[13]</sup>。

炎调方由大黄、芒硝、桃仁、赤芍、玄参、当归等组成,方中大黄、芒硝、桃仁清热、通腑、活血为君药;赤芍、玄参清营、凉血、滋阴,为臣药;当归活血补血为佐药。全方配伍共奏通腑清营活血之功。本研究显示,炎调方能减轻脓毒症肺组织病理变化,降低肺组织 W/D,降低脓毒症大鼠肺组织中 MPO 及 MDA 水平,减轻脓毒症 ALI 大鼠的炎症及氧化应激反应,与地塞米松作用相似。由此揭示炎调方除了前期研究证实的可通过减少炎症因子的释放,减轻组织损伤以外<sup>[14]</sup>,其减轻氧化应激反应可能也作为另一个途径改善脓毒症肺组织损伤,其作用机制可作进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Bersten A D, Edibam C, Hunt T, *et al.* Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian states [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 165(4): 443-448.
- [2] Gu J D, Hua F, Mei C R, *et al.* HapMap-based study on the association between MPO and GSTP1 gene polymorphisms and lung cancer susceptibility in Chinese Han population [J]. *Acta pharmacol Sin*, 2014, 35(5): 636-644.
- [3] 张丹, 胡质毅, 黄萍, 等. 安宫牛黄丸对脓毒症大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 基因表达及髓过氧化物活性的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(1): 27-30.
- [4] 樊涛, 张宇, 蒋洪丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者肺组织丙二醛、白细胞介素 8、肿瘤坏死因子  $\alpha$  水平及吸烟的影响 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(3): 218-222.
- [5] Welss S L, Deutschman C S. Elevated malondialdehyde levels in sepsis-something to 'stress' about [J]. *Crit Care*, 2014, 18(2): 125.
- [6] 罗成, 沈娜. 黄芪多糖对 CLP 诱导的脓毒症小鼠急性肝损伤 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(11): 1641-1646.
- [7] 沈晓红, 何淼, 熊旭东, 等. 炎调方对脓毒症大鼠肺热休克蛋白 70 和核因子- $\kappa$ B 的调控作用 [J]. 上海中医药大学学报, 2013, 27(3): 69-72.
- [8] 施荣, 熊旭东, 李淑芳等. 炎调方对脓毒症大鼠血清炎症因子的调控作用 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(3): 397-398.
- [9] 何淼, 熊旭东, 沈晓红, 等. 炎调方对脓毒症急性呼吸窘迫综合征(热炽营血症)患者血细胞因子的影响 [J]. 中国中医急症, 2013, 22(7): 1097-1099.
- [10] Chaudry I H, Wichterman K A, Baue A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. *Surgery*, 1979, 85(2): 205-211.
- [11] 张婷, 单可人. 髓过氧化物酶多态性与疾病氧化应激的研究进展 [J]. 山东医药, 2009, 49(33): 108-109.
- [12] 杨翠萍, 杨晓金, 田真真. 槐定碱对 ALI 小鼠肺组织 SOD, MDA 及 TLR4 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 180-183.
- [13] 郭璠. 丹红注射剂对急性冠脉综合征患者的血浆 NO, MPO 及 MDA 浓度的影响 [J]. 心血管康复医学杂志, 2014, 23(1): 89-91.
- [14] 沈晓红, 熊旭东, 彭文波. 加味炎调方对脓毒症大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 的调控作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(6): 1241-1243.