

犀角地黄汤加味通过 NF- κ B 信号通路对败血症导致的炎症和肺损伤的影响

周洁¹, 毕建朋²

1. 驻马店市中心医院 新生儿科, 河南 驻马店 463000

2. 郑州大学附属儿童医院, 河南省儿童医院, 郑州儿童医院 泌尿外科, 河南 郑州 450000

摘要:目的 研究犀角地黄汤加味对败血症导致的炎症和肺损伤的影响, 探讨其对核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的调控作用。方法 制备败血症小鼠模型, 测量血清中乳酸脱氢酶 (LDH) 反映败血症小鼠的器官损伤程度; HE 染色观察败血症小鼠肺组织病理学变化; 酶联免疫吸附法测定肺组织中细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、小鼠巨噬细胞炎症蛋白-2 (MIP-2) 水平; 免疫组化法检测肺组织中粒细胞分化抗原-1 (Gr-1) 的阳性表达; TUNEL 法分析败血症小鼠肺中的 TUNEL 阳性细胞数量; Western blotting 法检测肺组织中 NF- κ B p65 蛋白表达。结果 犀角地黄汤加味减轻了败血症小鼠的炎症反应和肺损伤程度, 以及嗜中性粒细胞浸润。犀角地黄汤加味显著减少了败血症小鼠肺中的 TUNEL 阳性细胞数量。结论 犀角地黄汤加味可以减轻败血症导致的炎症和肺损伤, 可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路发挥作用。

关键词: 犀角地黄汤; 败血症; 核转录因子- κ B; 炎症; 肺损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)06-1395-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.06.020

Effect of Xijiao Dihuang Decoction on inflammation and lung injury induced by pediatric sepsis through NF- κ B signaling pathway

ZHOU Jie¹, BI Jian-peng²

1. Department of Pediatrics, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Urology, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Henan Children's Hospital, Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Xijiao Dihuang Decoction on inflammation and lung injury caused by sepsis in children and explore its regulatory effect on NF- κ B signaling pathway. **Methods** The mice model with pediatric sepsis was established. Lactate dehydrogenase was used to detect organ damage and inflammation in sepsis mice. HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue in sepsis mice. Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), and MIP-2 content were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression of Gr-1 in lung tissues was determined by immunohistochemistry. the number of TUNEL-positive cells in the lungs of sepsis mice was analyzed by TUNEL method; Western blotting was used to detect the expression of NF- κ B p65 in lung tissue. **Results** The addition of Xijiao Dihuang Decoction reduced inflammation and lung injury, as well as neutrophil infiltration in septicemic mice. In addition, Xijiao Dihuang Decoction significantly reduced TUNEL-positive cells. **Conclusion** Xijiao Dihuang Decoction can reduce inflammation and lung injury caused by sepsis in children by inhibiting NF- κ B signaling pathway.

Key words: Xijiao Dihuang Decoction; sepsis; NF- κ B; inflammation; lung injury

小儿败血症是全球患儿死亡的第三大原因, 死亡率为 26%, 它的特点是不受控制的炎症反应, 高达 40% 的败血症患儿出现呼吸系统并发症^[1-2]。尽管支持治疗和抗生素的有效性有所改善, 但没有针对小儿败血症炎症反应及肺损伤的特定药物。通过最近几年的研究表明, 核转录因子- κ B (NF- κ B) 在机体的炎症反应过程中发挥重要作用^[3]。败血症中许

多增加炎症反应的刺激均可导致 NF- κ B 的激活, NF- κ B 的激活又可促进许多炎症蛋白的表达^[4]。犀角地黄汤加味由水牛角、生地黄、牡丹皮、赤芍、大青叶、黄连、紫花地丁、野菊花、金银花、生石膏、半枝莲等药物组成。有研究^[5]指出, 犀角地黄汤治疗全身炎症反应综合征、败血症、糖尿病周围神经病变、重症肝炎等疑难杂症和急危重症等有较

收稿日期: 2018-07-25

作者简介: 周洁 (1983—), 女, 主治医师, 研究方向为新生儿及早产儿急危重症的治疗。E-mail: sic884602@163.com

大的临床实用价值。本研究将探究犀角地黄汤加味对败血症导致的炎症和肺损伤的治疗作用,并探讨其是否通过 NF- κ B 通路发挥作用。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级 1~2 周雄性 BALB/c 小鼠,购自郑州大学实验动物中心,小鼠在无菌消毒、室温 25~27 °C、湿度 45% 的安静空间中饲养。

1.2 实验药物

犀角地黄汤加味提取物由郑州大学药学院提供。

1.3 试剂与仪器

细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)、IL-1 β 检测试剂盒为美国 Thermo 公司产品;ELISA 试剂盒购自北京百奥生物科技有限公司;乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (上海通善生物科技有限公司);巨噬细胞炎症蛋白-2 (MIP-2) ELISA 试剂盒 (南京森贝伽生物科技有限公司);光学显微镜下 (BD Bioscience 公司);TUNEL 试剂盒 (Roche Diagnostics 公司, Indianapolis)。

2 方法

2.1 犀角地黄汤加味提取物的制备

将组方药材水牛角 (30 g, 先煎 45 min)、生地黄 (12 g)、牡丹皮 (9 g)、赤芍 (24 g)、大青叶 (20 g)、黄连 (8 g)、紫花地丁 (20 g)、野菊花 (10 g)、金银花 (20 g)、生石膏 (30 g)、半枝莲 (30 g), 按传统方法将中药用 8 倍量水浸泡 60 min, 武火煎沸 (15 min)、文火煎煮 (40 min), 滤过, 滤渣加 4 倍量水, 煎煮 20 min; 去渣合并水煎液, 浓缩至 300 mL (生药质量浓度为 0.5 mg/mL), 浓缩液 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 4 °C 保存备用。

2.2 败血症动物模型的制备和分组

60 只雄性清洁级 5~7 日龄 BALB/c 小鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、犀角地黄汤加味高剂量 (生药 40 g/kg) 组、犀角地黄汤加味低剂量 (生药 10 g/kg) 组。每组 15 只。待给药时分别采用无菌蒸馏稀释水犀角地黄汤加味提取物, 各组 ig 给药, 每天 1 次, 连续 14 d。小鼠败血症动物模型制备参考文献方法^[6], 犀角地黄汤加味组于造模前 2 h 给药 1 次。造模后 24 h 摘眼球取血并处死动物, 取肺组织, 测定各项指标。

2.3 血清乳酸脱氢酶 (LDH) 测定

将血样以 7 000 $\times$ g 离心 10 min, 并将收集的血清储存于 -80 °C。根据说明书使用商业测定试剂盒

测定 LDH 水平。

2.4 酶联免疫吸附法测定肺组织中 IL-1 β 、IL-6 和 MIP-2 水平

将冷冻的肺组织样品粉碎成粉末, 粉碎好的样品加入蛋白裂解液裂解 30 min 后, 低温超声提取 10 min, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用于后期检测。应用 ELISA 试剂盒完成检测过程, 严格按照说明书进行, 利用酶标仪测定肺组织中 IL-1 β 、IL-6 和 MIP-2 水平。

2.5 肺组织病理学观察

小鼠处死后, 取出肺置于 10% 的甲醛溶液中固定, 然后常规脱水、石蜡包埋、切片 (厚度 4 μ m), 组织切片进行 HE 化学染色、用光学显微镜观察肺损伤程度。

2.6 免疫组化检测粒细胞分化抗原-1 (Gr-1)

进行 Gr-1 的免疫组织化学检测以评估肺中的中性粒细胞浸润情况。肺组织切片先恢复至室温, 后置于 60 °C 恒温箱内熔蜡, 90~120 min; 二甲苯脱蜡至水; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 切片放入枸橼酸盐 (柠檬酸盐) 微波加热至 80~90 °C, 后降温至 30 °C; PBS 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 在每张切片上滴加去离子水 (3% H₂O₂), 使其完全覆盖在组织上, 在室温环境下孵育 10 min; PBS 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 滴加封闭血清, 在室温环境下孵育 20 min; 倾去封闭血清, 给予一抗, 放置 4 °C 冰箱过夜。第 2 天, PBS 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 滴加二抗工作液, 在室温环境下孵育 20 min; PBS 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 在室温环境下孵育 15 min; PBS 浸泡 2 min $\times$ 3 次; 滴加稀释好的 DAB 显色试剂, 在光学显微镜下随时观察阳性反应的变化。一蒸水冲洗 20 min, 苏木素复染 15 s, 一蒸水冲洗 30 min, 脱水, 中性树胶封片, 高倍显微镜下观察。

2.7 TUNEL 分析

将小鼠肺组织细胞涂片如上所述进行露水和再水化, 并在室温下浸入 20 mg/mL 蛋白酶 K 20 min。将组织样品用 TUNEL 试剂盒染色并用碘化丙啶 (DAPI) 处理。在荧光显微镜下凋亡细胞呈绿色, 并在每张切片 5 个视野以 2 003 倍率计数。计算凋亡细胞的平均数。

2.8 Western blotting 检测肺组织中 NF- κ B p65 表达

依照各试剂盒说明书要求, 提取小鼠肺组织的总蛋白和核蛋白, 将等量的蛋白 (30 μ g), 在 10% 的 SDS-PAGE 中以 90 V 恒电压电泳, 切取目的条带。300 mA 低温条件下转膜。在脱脂奶粉封闭液中常温

封闭 2 h。分别用小鼠 NF- κ B p65 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，将膜取出，在 TBST 中充分洗涤。洗膜后，加入 HRP 标记的相应二抗，常温孵育 1 h。将膜取出，在 TBST 中洗涤后，使用 ECL 试剂曝光。底片经扫描仪扫描后，确定目的条带的相对吸光度值。

2.9 统计分析

统计学分析应用 SPSS 15.0 分析系统，计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析 (F 检验和 q 检验)；计数资料的比较采用 Chi-square χ^2 检验。

3 结果

3.1 对败血症小鼠器官损伤和炎症因子水平的影响

通过测定血清 LDH，评估败血症引起的器官损伤

程度。与模型组相比，犀角地黄汤加味组小鼠血清中 LDH 水平明显降低 ($P < 0.05$)。测定肺组织中 IL-1 β 和 IL-6 水平以评估与败血症相关的全身性炎症反应程度。与模型组相比，犀角地黄汤加味组小鼠肺组织中 IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.2 对败血症小鼠肺组织病理损伤的影响

通过 HE 染色观察肺组织结构。如图 2 所示，光镜下可见，对照组肺内的各级结构是完整的，几乎没有炎性细胞浸润；模型组肺泡上皮细胞肿胀，肺间质及肺泡腔内大量炎性渗出，毛细血管明显扩张和充血，微血栓形成；犀角地黄汤加味高、低剂量组中肺水肿、肺间质及肺泡出血渗出均减轻。

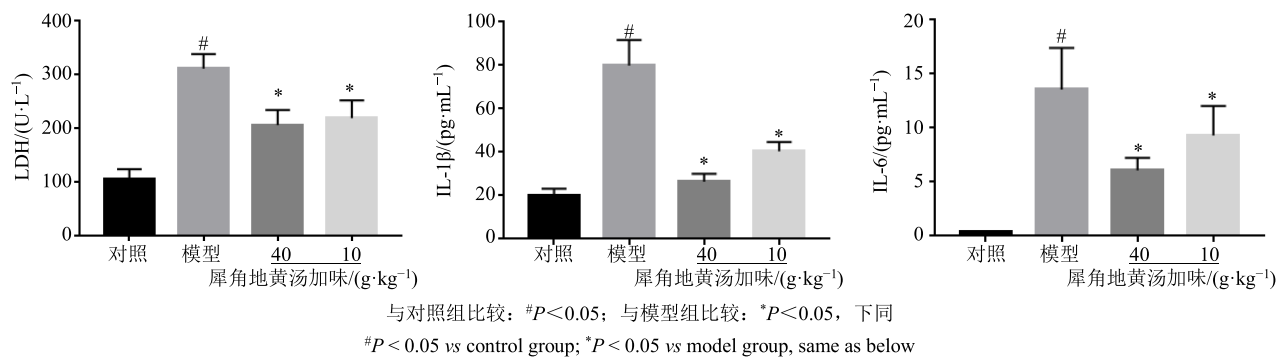


图 1 犀角地黄汤加味对败血症小鼠血清 LDH 及肺组织中 IL-1 β 及 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

Fig. 1 Effects of Xijiao Dehuang Decoction on levels of LDH in serum, IL-1 β and IL-6 in lung tissue of septic mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

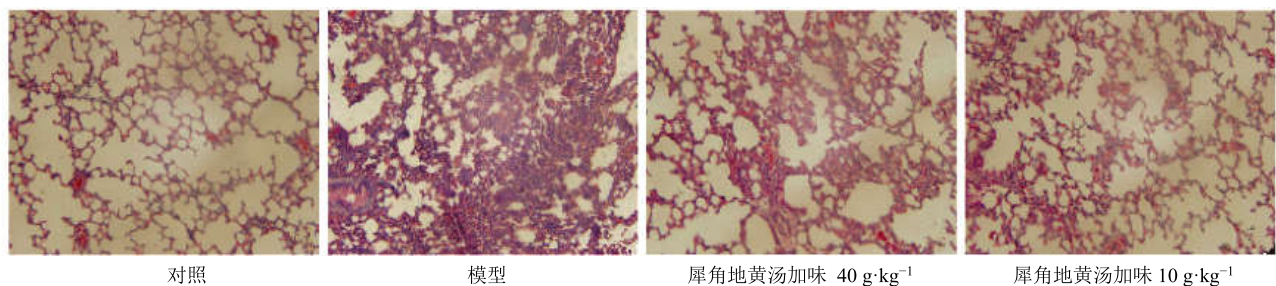


图 2 各组肺组织 HE 染色 (×200)

Fig. 2 HE staining of lung tissue for each group (×200)

3.3 对败血症小鼠肺部炎症和嗜中性粒细胞浸润的影响

通过测定肺组织 MIP-2 水平和肺组织中 Gr-1 阳性细胞来评估肺中的嗜中性粒细胞浸润情况。败血症模型小鼠肺组织中 MIP-2 和 Gr-1 的水平较对照组明显升高 ($P < 0.05$)；而犀角地黄汤加味高、低剂量组肺组织中 MIP-2 和 Gr-1 的水平较模型组明显降低 ($P < 0.05$)，结果见图 3。

3.4 对败血症小鼠肺中 TUNEL 阳性细胞数量的影响

如图 4 所示，在对照组中未检测到 TUNEL 阳

性细胞，模型组中 TUNEL 阳性细胞的数量明显增加 ($P < 0.05$)。然而，与模型组相比，犀角地黄汤加味组中的 TUNEL 阳性细胞数量显著减少 ($P < 0.05$)，统计结果见图 5。

3.5 对败血症小鼠肺组织 NF- κ B p65 蛋白表达的影响

Western blotting 结果 (图 6) 表明，模型组小鼠肺组织中 NF- κ B p65 水平比对照组显著上升 ($P < 0.05$)，犀角地黄汤加味低、高剂量组可减少 NF- κ B p65 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$)。

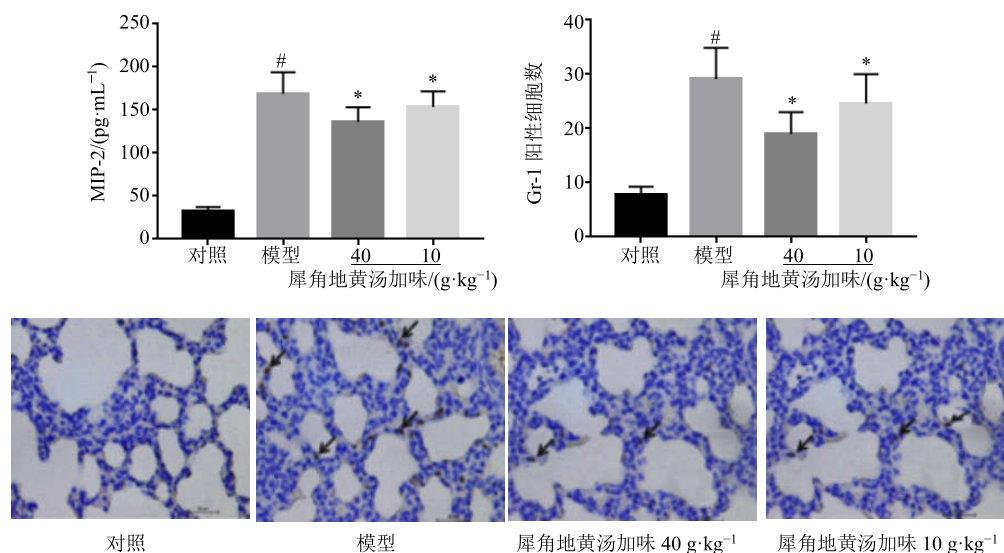


图 3 犀角地黄汤加味对败血症小鼠肺部炎症和中性粒细胞浸润的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 3 Effects of Xijiao Dehuang Decoction on pulmonary inflammation and neutrophil infiltration in septic mice ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

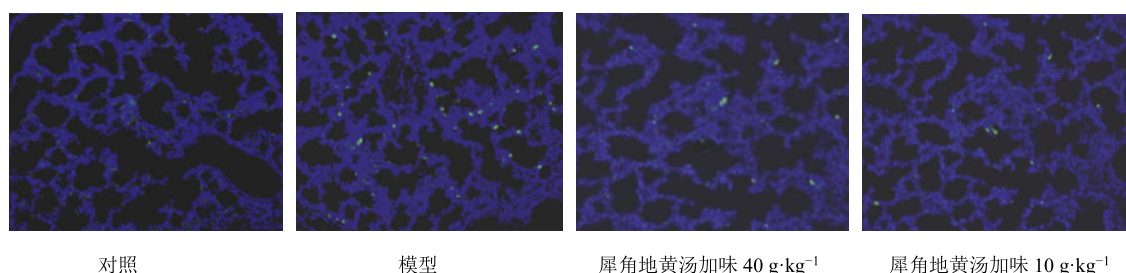


图 4 各组肺组织 TUNEL 染色

Fig. 4 TUNEL staining of lung tissue for each group

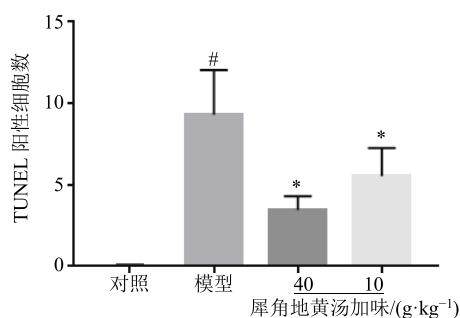


图 5 犀角地黄汤加味对败血症小鼠肺细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

Fig. 5 Effect of Xijiao Dehuang Decoction on apoptosis of pulmonary cells in septic mice ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

4 讨论

小儿败血症是一种高度炎症性疾病^[7-8], 最终导致感染性休克和多器官功能障碍, 这是由于炎症系统对病原体反应的不受控制的激活^[9-11]。败血症是病死率极高的临床急危重症, 其中死于急性肺损伤的占 30% 以上^[12-13]。中医对败血症的治疗具有独特的认

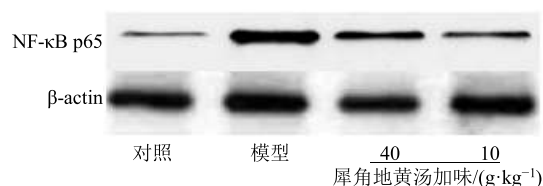


图 6 各组小鼠肺组织中 NF-κB p65 蛋白表达水平

Fig. 6 Expression level of NF-κB p65 in lung tissue of mice in each group

识, 犀角地黄汤加味在临床对败血症导致的炎症和肺损伤具有显著的治疗效果。犀角地黄汤加味由水牛角、生地黄、牡丹皮、赤芍、大青叶、黄连、紫花地丁、野菊花、金银花、生石膏、半枝莲等药物组成, 具有清热解毒的功效。水牛角、赤芍、牡丹皮等清热凉血、散血解毒, 生地黄凉血止血。本研究显示, 模型组 NF-κB p65 水平比正常组显著上升, 犀角地黄汤加味低、高剂量组可减少 NF-κB p65 水平的增加, 提示犀角地黄汤其主要通过影响 NF-κB 信号通路

的调控作用,改善败血症导致的炎症和肺损伤。本实验选取 NF- κ B 这条重要炎症信号传导通路为研究途径,研究犀角地黄汤加味通过抑制 NF- κ B 信号通路,从而减轻败血症导致的炎症和肺损伤。

NF- κ B 信号途径在败血症的发生发展中起着关键作用。NF- κ B 是在真核生物中普遍存在一种核转录因子,在细胞增殖、凋亡和分化以及炎症、免疫反应均中起到不容忽视的作用,NF- κ B 的调控,涉及到炎症细胞因子、趋化因子和生长因子等的基因的表达^[14-18]。在正常细胞中 NF- κ B 以没有活性的形式在细胞质内存在,与核转录因子 κ B 抑制因子(I κ B)形成复合体而被抑制,当收到细胞外信号,细胞因子、紫外线等刺激后,使其变为活化形式,随之转移到细胞核中,发挥促进基因转录的作用,从而增加了炎性细胞因子的表达,促进了败血症的发病进程^[19-20]。

经过 HE 染色观察到模型组肺泡上皮细胞肿胀,肺间质及肺泡腔内大量炎性渗出,毛细血管明显扩张和充血,微血栓形成,病理改变显著;而经犀角地黄汤加味治疗后肺水肿、肺间质及肺泡出血渗出均减轻。免疫组织化学染色法检测了 Gr-1 的表达,其结果可以观察到模型组中 MIP-2 和 Gr-1 的含量较对照组明显升高;而犀角地黄汤加味组中 MIP-2 和 Gr-1 的水平明显降低。通过测定血清 LDH 观察到,与模型组相比,犀角地黄汤加味组 IL-1 β 和 IL-6 水平显著降低。TUNEL 检测结果显示,模型组中 TUNEL 阳性细胞的数量明显增加。然而,与模型组相比,犀角地黄汤加味组中的 TUNEL 阳性细胞显著减少。通过免疫蛋白印迹法可见,败血症小鼠模型组的 NF- κ B p65 表达与对照组相比明显增高,而经犀角地黄汤加味治疗后其表达量明显下降。以上结果说明,犀角地黄汤加味能够对 NF- κ B 的活化发挥抑制作用,而进一步调节各种细胞因子的表达,缓解败血症导致的炎症和肺损伤。故推测犀角地黄汤加味是通过抑制 NF- κ B 信号通路,减轻败血症导致的炎症和肺损伤。

参考文献

- [1] 王政力,余加林. 新生儿败血症诊断新进展 [J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(3): 236-241.
- [2] 赵凤霞,刘光辉,张 健. IL-6 和 IL-8 在诊断新生儿败血症中的价值研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(12): 1311-1315.
- [3] Lim J C, Golden J M, Ford H R. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Surg Int*, 2015, 31(6): 509-518.

- [4] Verani J R, McGee L, Schrag S J. Division of Bacterial Dis-eases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Prevention of perinatal group B streptococcal dis-ease-revised guidelines from CDC, 2010 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2010, 59(10): 1-36.
- [5] 李建杰. 犀角地黄汤临床应用体会 [J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(9): 89-90.
- [6] 王立燕,徐若男,韩根成,等. 实验性败血症小鼠模型的建立及评价 [J]. 中国实验血液学杂志, 2010, 18(3): 766-770.
- [7] 刘明月,郭琳瑛,张 琪,等. 小儿真菌性败血症的临床特征和危险因素分析 [J]. 北京医学, 2018, 40(2): 124-126.
- [8] 崔雪平. 124 例新生儿败血症的临床特点和病原学分析 [J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 271(7): 53-57.
- [9] 倪 倩,徐 丁,崔 毅. 核因子- κ B 对新生儿败血症的早期诊断价值 [J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(12): 1221-1222.
- [10] 潘 凤,史 源,李华强,等. 新生鼠败血症脾脏核因子- κ B P65 表达 [J]. 实用儿科临床杂志, 2003, 41(6): 426-427.
- [11] Sivanandan S, Soraisham A S, Swamam K. Choice and dura-tion of antimicrobial therapy for neonatal sepsis and meningitis [J]. *Int J Pediatr*, 2011, doi: 10.1155/2011/712150.
- [12] 潘 凤,史 源,李华强,等. 新生鼠败血症时核因子- κ B 的表达 [J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(8): 26-29.
- [13] 周亚妮,李 可,刘 丹. 基于 CLP 败血症小鼠中补体 C5a 与白细胞介素-6 相关性研究 [J]. 蚌埠医学院学报, 2017, 42(2): 148-150.
- [14] 陈亚利,欧阳军,孟晶茜,等. 姜黄素对高尿酸血症大鼠肾组织中 TGF- β 1、NF- κ B 表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2018, 53(3): 360-364.
- [15] Wynn J L, Scumpia P O, Winfield R D, *et al*. Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists [J]. *Blood*, 2008, 112(5): 1750-1758.
- [16] 徐家新,赵 武,诸宏伟,等. NICU 中新生儿败血症及呼吸机相关肺炎的病原菌及耐药性分析 [J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(2): 164-167.
- [17] 陈 伟,马 磊,杨立山. 甘草次酸对哮喘大鼠的抗氧化应激作用及 NF- κ B 信号通路的调控 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2016, 51(6): 762-765.
- [18] 王 红,李 珊. 早发型与晚发型新生儿败血症临床比较 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015, 50(2): 283.
- [19] Lawrence T, Fong C. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(4): 519-523.
- [20] 王金磊,李承德,孙宏伟,等. 黄芪多糖抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 489-493.