

• 论著 •

加减陷胸桃承汤合参麦注射液对急性呼吸窘迫综合征大鼠细胞凋亡的影响

马超英¹, 夏红梅², 耿 耘¹

(1. 西南交通大学药学院, 四川 峨眉山 614202; 2. 江西新余高专, 江西 新余 336500)

【摘要】 目的: 观察加减陷胸桃承汤合参麦注射液对盲肠结扎穿孔术(CLP)后急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型大鼠的治疗作用, 并探讨其机制。方法: 采取 CLP 造成大鼠 ARDS 模型, 分别以加减陷胸桃承汤(桃承组)、参麦注射液(参麦组)、加减陷胸桃承汤合参麦注射液(合方组)预处理动物, 进行对照观察。于 3、6、12 和 24 h 采血进行血气分析, 于 3 h 和 12 h 取肺组织检测细胞凋亡情况。结果: 模型组随时间延长, 动脉血氧分压(PaO₂)逐渐下降, 动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)逐渐上升, 与治疗组及假手术组比较差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。用药各组 PaO₂ 均较模型组升高, 但仍低于假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中参麦组与合方组回升幅度较桃承组大, 差异均有显著性(P 均 < 0.05); 随着时间的延长, 桃承组、参麦组和合方组之间 PaCO₂ 水平变化不明显, 但均较模型组明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与假手术组比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。模型组细胞凋亡明显增加, 与假手术组比较差异有极显著性(P 均 < 0.01); 用药各组细胞凋亡表达较模型组明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 与假手术组比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。结论: 加减陷胸桃承汤与参麦注射液均有升高 CLP 后 ARDS 模型大鼠 PaO₂、降低 PaCO₂ 的作用, 且有一定的协同作用; 其机制可能与其减轻肺组织细胞凋亡有关。

【关键词】 加减陷胸桃承汤; 参麦注射液; 急性呼吸窘迫综合征; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)04-0195-03

Effects of modified Xianxiong Taocheng decoction (加减陷胸桃承汤) combined with Shenmai injection (参麦注射液) on cell apoptosis in acute respiratory distress syndrome MA Chao-ying¹, XIA Hong-mei², GENG Yun¹. 1. School of Pharmacy, Southwest Jiaotong University, Emeishan 614202, Sichuan, China; 2. Jiangxi Xinyu High School, Xinyu 336500, Jiangxi, China

【Abstract】 **Objective:** To explore the therapeutic effect of modified Xianxiong Taocheng decoction (MXXTCD, 加减陷胸桃承汤) and Shenmai injection (参麦注射液) in acute respiratory distress syndrome (ARDS) rats induced by cecal ligation and perforation, and to approach the pathogenic mechanism. **Methods:** ARDS model was induced by cecal ligation and perforation. Rats were randomly divided into five groups: sham-operation group, model group, pretreatment groups which were pretreated with combined MXXTCD and Shenmai injection, MXXTCD only, and Shenmai injection only, respectively. At 3, 6, 12 and 24 hours after model was established, the arterial blood gas analysis of rats was performed, and at 3 and 12 hours, the apoptosis of lung tissue expression was measured respectively. **Results:** The level of arterial partial pressure of oxygen (PaO₂) in model group decreased and arterial partial pressure of carbon dioxide (PaCO₂) increased gradually followed the time, and the differences were significant compared to those of the other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). PaO₂ in pretreatment groups was higher than that of the model group but lower than that of the sham-operated group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the reversed extend of MXXTCD group combined Shenmai injection as well as Shenmai injection group was higher than that of MXXTCD group (both $P < 0.05$). The changes of PaCO₂ in the pretreatment groups were not significant, and the difference was not obvious compared with the sham-operated group, but it was lower compared with the model group (all $P < 0.01$). Apoptosis expression in the lung tissue was increase in model group (both $P < 0.01$). The expression was little in sham-operation group. Levels of the other groups were notably different from model group, but had no significant difference compared with sham-operated group. **Conclusion:** MXXTCD and Shenmai injection can heighten the level of PaO₂, decline the level of PaCO₂ and the rate of apoptosis, abate lung injury.

【Key words】 modified Xianxiong Taocheng decoction; Shenmai injection; acute respiratory distress syndrome; apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30160100)

作者简介: 马超英(1958-), 男(汉族), 山西黎城人, 医学硕士, 教授, 副主任医师, 主要从事中医药现代化的基础研究。

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是目前危重病急救医学的研究重点之一,由于目前尚缺乏较有效的治疗方法,故其病死率仍居高不下。近年来,我们采用泻热通瘀、逐水扶正法,以加减陷胸桃承汤合参麦注射液治疗 ARDS,取得了较好的临床疗效^[1-3]。本研究中拟通过观察加减陷胸桃承汤与参麦注射液治疗盲肠结扎穿孔术(CLP)所致 ARDS 大鼠动脉血气和肺组织细胞凋亡的变化,探讨其对细胞凋亡的影响,报告如下。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器:牛胰核糖核酸酶(Rnase A),由华美生物工程公司生产,批号为 4910010J;胎牛血清(FCS),由天津市川页生化制品有限公司生产;碘化丙啶(PI),购自上海复美生物公司,批号为 040604。美国 LaXington 公司 H600 血气分析仪,美国 Coulter 公司 EPICS(XL)流式细胞仪。

1.2 药物:加减陷胸桃承汤水煎剂,由西南交通大学药学院实验中心制备。组成:水牛角 30 g(先煎),大黄 30 g(后下),甘遂 3 g(研末冲),葶苈子 15 g,枳实 10 g,厚朴 10 g,丹参 30 g,赤芍 30 g,桃仁 15 g,生地 30 g,水蛭 3 g(研末冲),水煎浓缩至含生药 1.85 g/ml。每只大鼠按 10 ml/kg 灌服。参麦注射液由神威药业生产,批号为 20041205。

1.3 模型制备与动物分组:大鼠术前 12 h 禁食、不禁水。以质量分数为 3%的戊巴比妥钠 1.5 ml/kg 腹腔注射麻醉,仰卧位固定,腹部常规消毒后开腹提出盲肠,行 CLP,制备 ARDS 大鼠模型^[4],全部过程约 10 min。术后予食、水。健康成年清洁级 SD 大白鼠 200 只(由中国科学院上海实验动物中心提供),体重(250±20)g,雌雄各半,常规饲养。按完全随机法分为 5 组,每组再分为 3、6、12 和 24 h 4 个亚组,每个亚组 10 只大鼠。①假手术组:分别于术前 2、12 和 24 h 以生理盐水 10 ml/kg 灌胃。术中除盲肠不结扎、不穿孔外,其余处理同模型组。②模型组:术前 2、12 和 24 h 以生理盐水 10 ml/kg 灌胃。麻醉后行 CLP,术后立即经皮下注射生理盐水 5 ml/kg。③桃承组:术前 2、12 和 24 h 以加减陷胸桃承汤 10 ml/kg 灌胃,其余处理同模型组。④参麦组:术后立即皮下注射参麦注射液 5 ml/kg,其余处理同模型组。⑤合方组:术前 2、12 和 24 h 以加减陷胸桃承汤 10 ml/kg 灌胃,术后立即经皮下注射参麦注射液 5 ml/kg,其余处理同模型组。

各组均正常饲养,收集股动脉血,于相应时间点处死动物,取肺组织标本。

1.4 观察项目

1.4.1 一般情况及死亡率:从灌胃开始观察各组动物的精神、活动、呼吸、饮食、饮水、大便、毛发、皮肤色泽以及死亡情况,随时记录。

1.4.2 动脉血气:用血气分析仪检测术后 3、6、12 和 24 h 各组动物的动脉血氧分压(PaO₂)和动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)。

1.4.3 肺组织细胞凋亡:磷酸盐缓冲液(PBS)的配制:NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 3.6 g, KH₂PO₄ 0.24 g,加双蒸水 800 ml 溶解,用 27.4 mmol/L 盐酸和 NaOH 调 pH 值为 7.4,并加双蒸水定容至 1 000 ml。质量分数为 0.5%的胰酶和体积分数为 10%的 FCS 均由上述 PBS 稀释。样品处理:肺组织剪碎,加入 0.5%胰酶 2 ml, 37℃恒温孵育箱中消化 1 h,孵育过程中经常振荡试管以使其充分接触胰酶,取出试管下段混浊液,加含 10% FCS 的 PBS 2 ml 混匀以终止反应,使用 300 目网过滤,1 200 r/min(离心半径 5.94 cm)离心 3 min,弃上清液,加 2 ml PBS 振荡,1 200 r/min 离心 3 min,弃上清液,重复操作 1 次,加入体积分数为 70%的冷乙醇 2 ml, 4℃固定过夜,离心,冷 PBS 2 ml 重悬细胞,1 200 r/min 离心 3 min,弃上清液,重复 1 次,加入 PI 50 μl,冰上避光放置 30 min, 300 目网过滤,用流式细胞仪分析,仅检测 3 h 和 12 h 值。

2 结果

2.1 一般表现:假手术组动物术后一般表现基本正常。模型组动物术后精神萎靡,行动迟缓,呼吸困难,不进食、水,小便和大便量少,且随着时间的延长而逐步加重;后期多数动物鼻腔内出现血性泡沫状分泌物;24 h 死亡率达 60%。用药各组动物术后精神欠佳,活动较少,呼吸稍急促,口唇无紫绀,鼻腔内无血性分泌物,呼吸困难程度稍轻,进食及饮水量较术前减少,大便和小便量多,且随着时间的延长有所加重,但未见鼻腔内出现血性泡沫状分泌物;24 h 平均死亡率达 30%,合方组仅为 20%。

2.2 血气分析(表 1):假手术组各时间点 PaO₂ 和 PaCO₂ 差异均无显著性。模型组随时间延长, PaCO₂ 明显升高, PaO₂ 明显降低(P 均 <0.05),与假手术组相应时间点比较,差异亦均有极显著性(P 均 <0.01),说明 ARDS 大鼠模型复制成功。合方组 6、12 和 24 h 与 3 h 比较, PaO₂ 下降, PaCO₂ 升高,差异均有显著性(P 均 <0.05)。与模型组同时间点比较,桃承组、参麦组与合方组 PaO₂ 升高及 PaCO₂ 下降均较明显,其中以合方组 PaO₂ 升高最明显;与假手术

表 1 各组动物不同时间点 PaO₂ 和 PaCO₂ 的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Changes of PaO₂ and PaCO₂ at different time points in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

mm Hg

组别	PaO ₂				PaCO ₂			
	3 h	6 h	12 h	24 h	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	11.14±5.08	10.03±0.87	10.83±0.75	11.02±2.34	55.68±6.20	55.79±3.80	56.83±3.07	55.98±5.42
模型组	5.33±1.97**△	5.09±1.03**	4.57±1.08**	3.98±1.15**	68.03±13.04**△	69.20±7.87**	70.53±3.30**	72.42±7.56**
桃承组	7.67±3.20**	6.87±2.16**	5.50±2.59**	5.21±2.78**	58.10±7.22*	57.74±5.23*	57.17±4.59*	59.75±5.45*
参麦组	7.98±5.29**▲	6.79±3.58*	8.00±1.83**	7.06±1.58**▲	58.51±11.09*	59.74±6.54*	60.73±3.08*	61.25±4.32*
合方组	9.67±4.41**▲▲	9.07±3.21**	8.53±1.81**▲	8.11±2.45**	56.45±9.36△	58.63±6.70*	59.76±5.70*	60.43±7.42*

注:与假手术组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与桃承组比较:△ $P<0.05$;与同组 6、12 和 24 h 比较:△ $P<0.05$;1 mm Hg=0.133 kPa

组比较,各治疗组 PaO₂ 均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),PaCO₂ 与假手术组比较升高不明显。

2.3 肺组织细胞凋亡(表 2):模型组 3 h 和 12 h 肺组织细胞凋亡率均较假手术组明显升高(P 均 <0.01),且随着时间的延长,细胞凋亡率明显增加($P<0.05$)。桃承组、参麦组和合方组细胞凋亡率均较模型组明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且随着时间的延长,细胞凋亡率均明显增加,其中桃承组增加最为明显($P<0.01$),而合方组增加最少($P<0.05$),但 3 组间比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

表 2 各组动物不同时间点肺组织细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Rate of cell apoptosis at different time points in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	3 h	12 h	P 值
假手术组	(1.045±0.213)%	(2.826±0.105)%	>0.05
模型组	(2.155±0.051)%**	(4.277±0.205)%**	<0.05
桃承组	(1.055±0.221)%**	(2.974±0.262)%**	<0.01
参麦组	(1.317±0.295)%**	(2.944±0.250)%**	<0.05
合方组	(1.420±0.214)%**	(2.782±0.227)%**	<0.05

注:与假手术组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨 论

临床和实验研究均表明,ARDS 必然伴发动脉血气的改变,主要为 PaO₂ 下降,PaCO₂ 可升高或降低,故血气分析可作为诊断和治疗的重要指标^[5]。本组动物制模后血气指标的变化说明了 ARDS 动物模型复制成功。本研究结果还表明,加减陷胸桃承汤和参麦注射液皆有明显改善低氧血症,提高血氧含量,降低 PaCO₂ 的作用。

大量研究显示,在 ARDS 中有复杂的细胞凋亡发生。首先,ARDS 时肺泡上皮细胞和内皮细胞过度凋亡,导致血管通透性增加、表面活性物质减少、弥漫性肺水肿。ARDS 时,肺泡-毛细血管膜广泛损伤所导致的肺水肿和微肺不张是 ARDS 发病的病理基础和中心环节。既往认为 ARDS 时肺部靶细胞的死亡方式是坏死。随着细胞凋亡在炎症性疾病领域研究的不断深入,人们已开始注意到一些致病因素

如脂多糖(LPS)、炎性细胞因子等可导致肺血管内皮细胞和肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡^[6]。研究表明,细胞凋亡可发生于 ARDS 的不同时期和阶段,ARDS 时,细胞凋亡是导致肺泡水肿、出血、萎陷、进行性呼吸困难等临床表现的原因之一^[7,8]。如能抑制细胞凋亡,将对肺组织起到一定的保护作用。

本实验中,假手术组各时间点细胞凋亡情况差异无显著性;用药各组 3 h 和 12 h 细胞凋亡率均显著低于模型组,其中合方组 3 h 细胞凋亡率虽然较高,但 12 h 后细胞凋亡率增加比例却最小,说明合方组随时间延长细胞凋亡率反有减少的趋势。相同时间点细胞凋亡在假手术组大鼠肺组织中仅有轻微表达,因为假手术组毕竟也经过了手术创伤;而模型组表达则明显上调,与假手术组比较差异有显著性;用药各组表达则与假手术组差异无显著性,较模型组显著下降,合方组 12 h 效果最明显。说明这 3 种治法均可以降低 ARDS 早期肺组织的细胞凋亡率,从而减轻肺组织损伤,而且两药合用具有协同作用。

参考文献:

- [1] 耿耘,马超英.中西医结合治疗成人呼吸窘迫综合征临床观察[J].江西中医学院学报,1997,9:3-4.
- [2] 马超英,耿耘,彭仁才,等.加减陷胸桃承汤合参麦针抗大鼠腹腔感染所致肺损伤的实验观察[J].中医杂志,2000,41:683-684.
- [3] 万兰清,卢卫,杨宁,等.急性肾功能衰竭 191 例研究报告[J].中国危重病急救医学,1992,4:162-163.
- [4] 万兰清,马超英,耿耘,等.开闭固脱法为主治疗流行性出血热休克 100 例临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,1996,3:151-154.
- [5] 钱桂生.急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望[J].解放军医学杂志,2003,28:97-101.
- [6] 苗玉良,邓小明,李金宝,等.α-黑色素细胞刺激素对二次打击急性呼吸窘迫综合征大鼠肺血管内皮细胞凋亡的影响[J].中国危重病急救医学,2004,16:596-598.
- [7] 农凌波,肖正伦.急性肺损伤的细胞凋亡与凋亡调控[J].国外医学呼吸系统分册,2002,22:149-151.
- [8] Bardales R H, Xie S S, Schaefer R F, et al. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type Ⅱ pneumocytes in acute lung injury[J]. Am J Pathol, 1996, 149: 845-852.

(收稿日期:2005-08-09 修回日期:2005-11-26)

(本文编辑:郭方)