

编号:1005-6947(2006)09-0672-04

· 基础研究 ·

# 雷公藤内脂醇对脓毒症大鼠免疫平衡的调节作用

赵永福, 孙万日

(郑州大学第一附属医院 普通外科, 河南 郑州 450052)

**摘要:** **目的** 探讨雷公藤内脂醇对脓毒症大鼠血清促炎与抗炎介质的调节作用。**方法** 90只SD大鼠随机分为3组, 每组30只; 假手术组(A组), 脓毒症模型组(B组)和雷公藤内脂醇治疗组(C组)。A组除不结扎也不刺穿盲肠外, 余操作同B组。B组开腹后显露盲肠, 根部结扎并刺穿肠壁2次, 然后关腹, B组成功后不做任何处理。C组在盲肠结扎和穿孔后立即用雷公藤内脂醇(0.05 mg/mL)腹腔注射0.2 mg/kg, 每隔8h追加1次。各组大鼠在术后6, 12, 24h分批处死, 每批10只。取下腔静脉血检测血清中TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10和TGF- $\beta$ 的水平, 并取肝、肾组织行HE及电镜检查。**结果** A组血清中炎症介质水平各时点无明显差异, 肝肾功能与形态的变化不明显。B, C组炎症介质水平和抗炎介质水平均显著升高, 肝肾功能与形态出现损伤性变化; C组较B组血中两者水平明显降低, 肝肾功能与形态损伤减轻。**结论** 雷公藤内脂醇能降低脓毒症大鼠炎症介质水平, 即对免疫平衡有调节作用, 并减轻肝肾损伤。

**关键词:** 脓毒症/病理生理学; 雷公藤内脂/药理学

**中图分类号:** R631.3; R284.1 **文献标识码:** A

## Immunoregulation of triptolide on sepsis in rats

ZHAO Yong-fu, SUN Wan-ri

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the immunoregulation of triptolide on inflammatory mediators of septic rats. **Methods** Ninety SD rats were randomly allocated into three groups: sham operation group (group A), sepsis group (group B) and treatment group with triptolide (group C). There were 30 rats in each group. In group A rats, the abdomen was opened without any other treatment. Sepsis rat model was induced by exposure of caecum and puncturing it, then the abdomen was closed. In group C, triptolide (0.05 mg/mL) was given by intraperitoneal injection (0.2 mg/kg, Q8h) after caecum punctured. The rats were killed at 6h, 12h and 24h after operation. Then serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and TGF- $\beta$  were determined at the three time periods (10 rats for each time period). Tissues from liver and kidney were obtained to observe the changes under microscope and electron microscope. **Results** There was no difference between levels of inflammatory mediators at the three time periods in group A, and the functional and morphologic changes of liver and kidney were not significant. Levels of inflammatory mediators were significantly higher in group B and C than those in group A. Pathological changes in liver and kidney were milder in group C than those in group B. **Conclusions** Triptolide can lead to down-regulation of levels of inflammatory mediators, exert a modulatory effect on immune balance and alleviate pathological damage of liver and kidney in septic rats.

**Key words:** Sepsis/physiopathol; Triptolide/pharm

**CLC number:** R631.3; R284.1

**Document code:** A

收稿日期:2006-04-29; 修订日期:2006-06-28。

作者简介:赵永福,男,河南镇平人,郑州大学第一附属医院教授,主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者:赵永福 电话:0371-66862121; E-mail:sunwanri2000@126.com。

全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti inflammatory response syndrome, CARS)之间的平衡决定了机体内环境的稳定性,决定了感染、创伤的后果。严重感染造成脓毒血症的危险性在于机体出现多器官功能障碍综合征(MODS),MODS实际上是SIRS和CARS平衡失调的结果。雷公藤内脂醇(triptolide)是植物雷公藤有效成分,已广泛应用于临床,具有抗炎和免疫抑制作用,对各种免疫细胞及免疫介质有重要的调节作用,有研究<sup>[1-3]</sup>其具有双向免疫调节作用,认为它能够恢复两者间的平衡,从而达到治疗的目的。本实验旨在探讨雷公藤内脂醇对脓毒症大鼠血中炎症介质的影响及抑制炎症的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性SD大鼠90只,体重250~300g,购自河南省实验动物中心。雷公藤内脂醇,购自福建省医科所植化室,纯度>99.99%,雷公藤内脂醇无菌蒸馏水配制,浓度0.05mg/mL。

### 1.2 实验方法

1.2.1 腹腔感染和早期脓毒症模型制作 苯巴比妥钠40mg/kg腹腔内注射麻醉动物,参照Wichterman和Baker<sup>[4-5]</sup>描述的方法制备上述病理模型:腹部中线切开3cm;开腹后显露盲肠,在其根部用丝线结扎并用20号针刺穿肠壁2次,然后关腹。

1.2.2 动物分组 90只大鼠被随机分为3组,每

组30只;即假手术组(A组),脓毒症模型组(B组)和雷公藤内脂醇治疗组(C组)。A组除不结扎盲肠,不刺穿盲肠外,余操作同B组。B组模型成功后不做任何处理;C组在盲肠结扎并穿孔后立即腹腔注射雷公藤内脂醇(0.2mg/kg),并每隔8h追加1次,共3次。

1.2.3 检测指标 各组大鼠在术后6,12,24h分批处死,每批10只,取下腔静脉血,全自动生化分析仪测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和肌酐(Cr)水平;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血中炎症介质肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ),白介素1(IL-1),白介素10(IL-10),转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )水平,并取肝、肺组织行病理检查。

### 1.3 统计学处理

所有数值变异均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。应用SPSS 10.0分析软件统计,采用重复数据方差分析及单因素方差分析,显著性检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 血清ALT的变化

A组各时间点检测结果无显著差异(均 $P > 0.05$ ),B,C组12h点血清ALT水平明显上升,12h后各时点高于A组( $P < 0.05$ );12,24h时点B组显著高于C组( $P < 0.05$ )(表1)。

### 2.2 血清Cr变化

B,C组血清Cr水平24h较A组明显上升,24h时点B组显著高于C组( $P < 0.05$ )(表1)。

表1 各组血清ALT和Cr的变化(U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	术后6h		术后12h		术后24h	
		ALT	Cr	ALT	Cr	ALT	Cr
A	10	41.25 $\pm$ 9.84	31.23 $\pm$ 6.10	49.67 $\pm$ 11.24	25.50 $\pm$ 6.56	52.33 $\pm$ 10.38	29.245 $\pm$ 6.22
B	10	51.72 $\pm$ 8.10	30.46 $\pm$ 5.30	142.20 $\pm$ 30.33 <sup>1),2)</sup>	38.25 $\pm$ 8.08 <sup>1)</sup>	544.60 $\pm$ 101.52 <sup>1),2)</sup>	66.52 $\pm$ 14.67 <sup>1),2)</sup>
C	10	52.52 $\pm$ 10.23	32.38 $\pm$ 7.12	92.50 $\pm$ 15.64	33.25 $\pm$ 10.68	349.76 $\pm$ 48.64	43.20 $\pm$ 10.32 <sup>1)</sup>

注:1)与A组比, $P < 0.05$ ;2)与C组比, $P < 0.05$

### 2.3 血清炎症介质水平的变化

2.3.1 血清TNF- $\alpha$ 水平 A组各时点之间TNF- $\alpha$ 水平无统计学差异;B组各时点均高于A组( $P < 0.05$ );12,24h明显高于C组(表2)。

2.3.2 血清IL-1 $\beta$ 水平 IL-1 $\beta$ 水平B组12h后各时点高于A组( $P < 0.05$ );12,24h时点均明显高于C组(表2)。

表2 不同时点各组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的变化 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	术后 6h		术后 12h		术后 24h	
		TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
A	10	60.62 $\pm$ 10.16	44.91 $\pm$ 6.17	65.74 $\pm$ 12.46	40.36 $\pm$ 7.22	67.44 $\pm$ 11.45	51.80 $\pm$ 6.14
B	10	315.41 $\pm$ 30.14 <sup>1)</sup>	118.26 $\pm$ 17.21 <sup>1)</sup>	425.31 $\pm$ 52.20 <sup>1),2)</sup>	221.27 $\pm$ 32.27 <sup>1),2)</sup>	568.13 $\pm$ 61.70 <sup>1),2)</sup>	286.36 $\pm$ 31.26 <sup>1),2)</sup>
C	10	312.25 $\pm$ 32.12	96.26 $\pm$ 16.21	319.32 $\pm$ 36.24	118.30 $\pm$ 26.18	342.20 $\pm$ 44.55	141.47 $\pm$ 20.56

注:1)与 A 组比,  $P < 0.05$ ;2)与 C 组比,  $P < 0.05$

2.3.3 血清 IL-10 水平 A 组各时点之间 IL-10 水平无统计学差异;12h 后 B 组各时点均高于 A 组 ( $P < 0.05$ ),24h 较 C 组明显升高(表 3)。

2.3.4 血清 TGF- $\beta$  水平 TGF- $\beta$  水平 12h 后各时点高于 A 组 ( $P < 0.05$ ),也明显高于 C 组 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

表3 血清 IL-10 及 TGF- $\beta$  水平 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	术后 6h		术后 12h		术后 24h	
		IL-10	TGF- $\beta$	IL-10	TGF- $\beta$	IL-10	TGF- $\beta$
A	10	28.15 $\pm$ 4.82	56.45 $\pm$ 12.20	30.45 $\pm$ 4.46	54.36 $\pm$ 10.22	38.44 $\pm$ 4.45	30.80 $\pm$ 10.14
B	10	32.52 $\pm$ 5.76	64.58 $\pm$ 10.52	57.75 $\pm$ 6.54 <sup>1)</sup>	78.87 $\pm$ 18.37 <sup>1),2)</sup>	88.13 $\pm$ 8.90 <sup>1),2)</sup>	113.77 $\pm$ 28.95 <sup>1),2)</sup>
C	10	33.65 $\pm$ 5.38	66.30 $\pm$ 14.67	40.97 $\pm$ 6.71	59.32 $\pm$ 14.72	42.20 $\pm$ 6.55	45.98 $\pm$ 12.17

注:1)与 A 组比,  $P < 0.05$ ;2)与 C 组比,  $P < 0.05$

## 2.4 肝肾形态学改变

2.4.1 肝脏 大体观察:A 组肝脏各时点均正常;B 组与 C 组 12h 时表现为颜色稍暗,其余变化不明显。光镜下:A 组肝组织肝索排列正常,肝细胞无变性、萎缩、坏死,无炎症细胞浸润。B 组 6h 可见肝细胞水肿,肝细胞索排列紊乱,以 24h 明显;C 组对应各时点相应减轻。电镜下:A 组各时点肝组织超微结构正常;B 组表现为肝细胞线粒体肿胀、嵴排列紊乱、消失,内质网肿胀,细胞浆内空泡变性,尤以 12,24h 明显;C 组对应各时点较 B 组相应减轻(图 1-2)。

2.4.2 肾脏 大体观察:A 组各时点均正常;B 组

与 C 组 12h 表现为颜色变暗紫色,质地稍硬,其余变化不明显。光镜下:A 组各时点肾小球、肾小管正常,肾小管上皮细胞无变性、萎缩、坏死或炎细胞浸润,管腔无扩张。B 组可见肾近曲小管细胞肿胀,管腔消失,部分小管上皮坏死,炎性细胞浸润,尤以 24h 明显;而肾小球变化不大。C 组对应各时点较 B 组相应减轻。电镜下:A 组各时点肾超微结构正常。B 组肾小球在各时点变化不明显;在 12h,24h 时点近曲小管细胞内出现大空泡变性,细胞极度肿胀,可见细胞坏死,微绒毛水肿,线粒体肿胀,嵴排列紊乱、消失;远曲小管质膜内褶受压、线粒体肿胀。C 组对应各时点较 B 组相应减轻(图 3-4)。

图1 B 组 12h 点肝脏组织:肝细胞萎缩,肝窦显著扩张(HE  $\times$  400)

图2 C 组 12h 点肝脏组织:肝细胞水肿,肝窦受压(HE  $\times$  400)

图3 B 组 12h 点肾脏组织:肾小管破坏,炎细胞浸润(HE  $\times$  400)

图4 C 组 12h 点肾脏组织:肾小管上皮细胞水肿(HE  $\times$  400)

### 3 讨论

在 SIRS 的发生发展过程中,随着炎症介质的大量释放,抗炎症因子的合成和释放也相应启动,并可能在 SIRS 后期成为优势反应<sup>[6-8]</sup>。这些抗炎因子在抑制炎症反应的同时也抑制机体对病原体的免疫作用,特别是抑制细胞免疫功能,导致了所谓的代偿性抗炎症反应综合征(CARS)。本研究结果可见,脓毒症大鼠发病后不仅体内 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  明显升高,而且免疫抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  也明显增高;随着病情的进展,肝、肾功能相继出现损害。提示这些因子参与了大鼠病情的发展。由此推测脓毒症病程中亦存在一个 CARS 的病理过程。

雷公藤是卫矛科雷公藤属木质藤本植物,主产于中国南部地区,其提取物的成分很复杂,雷公藤红素、雷公藤内脂酮、雷公藤内脂醇和雷公藤乙素是其活性成分。雷公藤植物本身亦有直接的抗炎作用,使炎症血管通透性增加、炎症细胞趋化、前列腺素 2 和其他炎症介质的产生和释出、血小板聚集及炎症后期的纤维增生等。尔后发现它尚能抑制 TNF 和 IL-1, IL-6, IL-8 等炎症介质的产生,抑制吞噬细胞的吞噬功能<sup>[1-3]</sup>。金枕等<sup>[9]</sup>在雷公藤多甙对重症急性胰腺炎(SAP)免疫调节的实验中发现,该甙类可以减轻 SAP 血清内毒素, TNF- $\alpha$  和 IL-1 水平;光镜下胰腺病理学评分好转,电镜下细胞损伤减轻。推测可能是雷公藤多甙阻断了炎症介质的级联效应,阻止了 SAP 的发生和发展。王贵明<sup>[10]</sup>也发现丹参与雷公藤多甙联合治疗 SAP,可显著降低血清淀粉酶、抑制炎症细胞因子的过度生成,组织受损程度明显减轻。

传统认为雷公藤是一种免疫抑制剂,现已发现其具有双向的免疫调节作用;小剂量能增加自然杀伤细胞的细胞毒活性,纠正 T 细胞亚群分布上的紊乱,调整免疫应答<sup>[11]</sup>。并发现,雷公藤内脂醇能抑制细胞内 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[12-15]</sup>。而 NF- $\kappa$ B 被认为是调节机体炎症反应的总源头。本研究显示雷公藤内脂醇不仅降低 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ,而且降低免疫抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平。本实验结果显示雷公藤内脂醇能同时降低血中促

炎和抗炎因子水平,减轻肝肾功能与形态的损害,即减轻脓毒症对机体损害,表现出明显的治疗作用。其作用机制尚需进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 曹敏,孙荣奇,吴达俊,等. 中药雷公藤的研究进展[J]. 中成药,1996,4(1):40-42.
- [2] Chang DM, Chang WY, Kuo SY, *et al.* The effects of traditional anti-rheumatic herbal medicines on immune response cells[J]. J Rheumatol, 1997,24(3):436-441.
- [3] Zhao G, Vaszar LT, Qiu D, *et al.* Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000,279(5):958-966.
- [4] Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH, *et al.* Sepsis and septic shock are view of laboratory models and a proposal[J]. J Surg Res, 1980,29(2):189-191.
- [5] Baker CC, Chaudry IH. Evaluation of factors affecting mortality rats after sepsis in a murine cecalligation and puncture model[J]. Surgery, 1922,94(2):331-335.
- [6] Bone RC, Sir Isaac Newton. Sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med, 1996,24(7):1125-1128.
- [7] 吴荣谦,徐迎新,宋旭华,等. 脓毒症小鼠肝损伤时的黏附分子基因表达[J]. 中国普通外科杂志,2000,15(5):297-300.
- [8] 程应东,梁平,张朝军,等. HSP70 基因转染对大鼠脓毒症早期外周血细胞因子的影响[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(3):190-193.
- [9] 金枕,倪泉兴,张群华,等. 雷公藤多甙对急性坏死性胰腺炎免疫调节作用的实验研究[J]. 中华普通外科杂志,2000,(5):283-285.
- [10] 王贵明,鲍民生. 丹参与雷公藤多甙联合治疗急性坏死性胰腺炎的实验研究[J]. 山西医科大学学报,2004,(1):15-17.
- [11] 王翠娣,郭玉璞. 雷公藤的有效成分、药理作用及临床应用[J]. 中国中西医结合杂志,1993,(13):507-509.
- [12] Lin N, Sato T, Ito A. Triptolide, a novel diterpenoid triepoxide from tripterygium wilfordii Hook f. suppresses the production and gene expression of pro-matrix metal oproteinases 1 and 3 and augments those of tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in human synovial fibroblasts[J]. Arthritis Rheum, 2001,44(9):2193-2200.
- [13] 刘浩,刘志红,章精,等. 雷公藤内酯醇降低 T 淋巴细胞核因子- $\kappa$ B 的活性[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,1998,(7):312-315.
- [14] Kim YH, Lee SH, Lee JY, *et al.* Triptolide inhibits murine-inducible nitric oxide synthase expression by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of nuclear factor-kappa B and c-Jun NH2-terminal kinase[J]. Eur J Pharmacol, 2004,494(1):1-9.
- [15] Zhang N, Xu YJ, Zhang ZX. Regulatory function of nuclear factor kappa B on lymphocyte proliferation and apoptosis in bronchial asthmatic rats and effect of triptolide on the regulation[J]. Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi, 2004,24(5):435-438.