

• 基础研究 •

重楼总皂苷对多发骨折-脂多糖两次打击模型大鼠血清细胞因子水平的影响

周满红, 贺华经, 潘勇, 单立婧, 马懿, 刘洋
(遵义医学院附属医院急诊科, 贵州 遵义 563003)

【摘要】 目的:探讨重楼总皂苷(RPTS)对多发骨折-脂多糖两次打击模型大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平的影响。方法:68 只 Wistar 大鼠随机分成 5 组,除空白对照组外,其余各组按多发骨折-脂多糖两次打击模型标准制模。制模成功后 1 h,除空白对照组和模型对照组外各组予以不同浓度的 RPTS 灌胃,干预后 6 h 采血,以 ELISA 法检测血清中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度。**结果:**大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度,模型对照组与空白对照组相比较明显升高 ($P<0.001$),而 RPTS 各干预组与模型对照组相比较却明显下降 ($P<0.001$),差异均有统计学意义。**结论:**重楼总皂苷可以降低多发骨折-脂多糖两次打击模型大鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 水平。

【关键词】 重楼总皂苷; 骨折; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6

Effects of rhizoma paridis total saponins on levels of cytokines in blood serum of two-hit rat model induced by multiple fractures and lipopolysaccharide ZHOU Man-hong, HE Hua-jing, PAN Yong, SHAN Li-jing, MA Yi, LIU Yang. Department of Emergency, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of rhizoma paridis total saponins (RPTS) on the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) in blood serum of two-hit rat model induced by multiple fractures and lipopolysaccharide. **Methods:** Sixty-eight Wistar rats were randomly divided into five groups. The models were made in four groups (except the blank control group) in accordance with the standard of two-hit animal model induced by multiple fractures and lipopolysaccharide. At 1 hour after models made, the rats in RPTS groups were given rhizoma paridis total saponins with different concentrations by intragastric administration. Six hours later, the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the blood serum of all rats were detected by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). **Results:** The concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in blood serum of rats in the model group were remarkably higher than those in the blank control group ($P<0.001$), and these in the RPTS groups were remarkably lower than those in the model group ($P<0.001$). **Conclusion:** RPTS can decrease the levels of TNF- α and IL-6 and IL-1 β in the blood serum of rats subjected to two-hit induced by multiple fractures and lipopolysaccharide.

Key words Rhizoma paridis total saponins; Fractures; Tumor necrosis factor-alpha; Interleukin-1 beta; Interleukin-6
Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2008, 21(9):662-664 www.zggszz.com

Moore 等^[1]于 20 世纪 90 年代提出的“两次打击理论”认为严重多发骨折等创伤作为第 1 次打击使机体处于中等状态的全身炎症反应,此时如果增加感染因素第 2 次打击,则可放大业已存在的炎症状态而发生过度的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 最终继发多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 因而病死率大大增加,其已日益成为危重病医学的首要问题。已证实 G-菌细胞壁外膜上的内毒素 (endotoxin, ETX) 的主要成分脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 是介导脓毒症的主要病原分子之一^[2], 其可在炎症过程中诱导巨噬细

胞 (macrophage) 活化, 从而引起肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 及白细胞介素-6 (IL-6) 等大量作为炎症介质的细胞因子释放, 这些细胞因子具有多种活性, 并协同作用, 从而促使炎症过程的发生和发展^[3], 形成过度的炎症反应, 最终导致脓毒症, 并发展为 MODS。因此, 寻找 LPS 拮抗药物用以减少 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等细胞因子释放, 从而阻止多发骨折等严重创伤向脓毒症方向发展, 具有重要的意义。重楼为百合科植物云南重楼 [Paris polyphylla Smith var. yunnanensis (Franch) Hand Mazz] 或七叶一枝花 [Paris polyphylla Smith var. chinensis (Franch) Hara] 的干燥根茎。主产于云南、四川及贵州等地。其药用历史悠久, 具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效。现代药理研究发现, 重楼活性成分具有抗肿瘤、镇静镇痛、止血等作用, 尤其是抑菌消炎作用^[4]。我们在前期体

基金项目:贵州省科学技术基金资助(编号:黔科合 J[2005]2075)
通讯作者:周满红 Tel:0852-8608728 E-mail:manhongzhou@sina.com

外实验研究^[5]中发现,重楼的主要有效成分重楼总皂苷(rhizoma paridis total saponins, RPTS)可以抑制由 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β 的活性。而在体内其是否能对 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等作为炎症介质的细胞因子有所影响,尚未见报道。本实验旨在研究重楼总皂苷对多发骨折-脂多糖两次打击模型大鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的影响,并探讨其作用机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 药材来源 重楼购于贵州省务川县中药材市场,经遵义医学院药化教研室鉴定为 Paris polyphylla Smith var.yunnanensis(Franch)Hand Mazz. 在遵义医学院药化教研室提取分离,经化学检识为皂苷成分,即重楼总皂苷。

1.2 仪器 5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司生产),SANYO ULTRA LOW 超低温冰箱等。

1.3 药品及检测试剂 Lipopolysaccharides(LPS) from Escherichia Coli O55:B5 购于美国 Sigma 公司。大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 法检测试剂盒购于深圳晶美公司。

1.4 实验动物模型制作及分组 健康 Wistar 大鼠 68 只,雌雄各半,8 周龄,体质量 200~250 g,清洁级,由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK-2002008。随机分为 5 组,空白对照组(10 只,不予任何处理),模型对照组(10 只,不予重楼总皂苷处理),重楼总皂苷干预组(RPTS I、II、III 组,各 16 只,分别予以重楼总皂苷 2.5、5 及 10 mg/kg 干预)。大鼠术前禁食 12 h,禁饮 8 h,以 2% 苯巴比妥钠(0.1 ml/100 g 体质量)腹腔注射麻醉成功后,仰卧平台固定。除空白对照组外,其余各组大鼠均用咬骨钳离断双侧股骨,6 h 后又予腹腔内注射 LPS 5 mg/kg 行 2 次打击,随后每只大鼠予以复苏疗法(3 ml 生理盐水背部皮下注射)。制模成功后 1 h,除模型对照组外,RPTS I、II、III 3 组参照文献方法^[6]分别予以重楼总皂苷 2.5、5 及 10 mg/kg 水溶液一次灌胃。药物干预后 6 h,5 组大鼠均予断头法采血各 2 ml,予冷冻离心机离心 10 min(4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min),取上清液,超低温冰箱-20 $^{\circ}$ C 保存,待测 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度。

1.5 观察指标与生化测定方法 血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度测定采用酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述,采用

SPSS 11.5 统计软件处理实验数据,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度比较,见表 1。各组总体比较,TNF- α 值, $F=379.71, P<0.001$; IL-1 β 值, $F=277.05, P<0.001$; IL-6 值, $F=210.70, P<0.001$ 。模型对照组血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度与空白对照组比较明显升高,差异有统计学意义($P<0.001$)。重楼各干预组血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度与模型对照组比较明显下降,差异有统计学意义($P<0.001$)。重楼各干预组之间血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

多发骨折等严重创伤时,肠道缺血和再灌注损伤导致肠黏膜屏障功能障碍,肠内细菌及内毒素等进入血液^[7],客观上对机体造成两次打击。G-菌细胞壁外膜上的内毒素的主要成分 LPS 是介导脓毒症的主要病原分子之一,其可在炎症过程中诱导各种炎症反应细胞如巨噬细胞的活化,从而引起 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等大量作为炎症介质的细胞因子释放,这些细胞因子协同作用,从而促使炎症过程的发生和发展,形成致死性的过度的炎症反应,最终导致脓毒症并发展为 MODS,甚至死亡。因此,在脓毒症的病理生理过程中,活化的巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等细胞因子起到了关键性的作用。抑制巨噬细胞的活性,将会减少这些细胞因子的产生,进而减轻由它们带来的局部或全身的炎症损害^[8],从而阻止多发骨折等严重创伤向脓毒症及 MODS 方向发展,以降低其病死率。

本实验结果表明,模型对照组血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度与空白对照组相比较明显升高,提示多发骨折-脂多糖两次打击用以观察大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度变化的模型制作成功。重楼各干预组血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度与模型对照组相比较明显下降,提示重楼总皂苷对多发骨折-脂多糖两次打击所致大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 浓度升高有较好的抑制作用,这与我们的前期研究相吻合。在我们的前期体外实验研究中证实重楼总皂苷可明显抑制由 LPS 诱导的大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 及 IL-1 β 的活性,提示重楼总皂苷可以下调 TNF- α 、IL-1 β 等作为炎症介质的细胞因子的水平,从而在一定程度上抑制炎症的发生和发展,避免形

表 1 重楼总皂苷对多发骨折-脂多糖两次打击模型大鼠血清细胞因子水平的影响($\bar{x}\pm s, \text{pg/ml}$)

Tab.1 Effects of rhizoma paridis total saponins on levels of cytokines in blood serum of rats subjected to two-hit induced by multiple fractures and lipopolysaccharide ($\bar{x}\pm s, \text{pg/ml}$)

组别	鼠数(只)	TNF- α	IL-1 β	IL-6
空白对照组	10	129.66 \pm 6.23	509.05 \pm 25.85	430.14 \pm 41.04
模型对照组	10	515.59 \pm 18.36 [*]	2 017.00 \pm 296.78 [*]	1 194.90 \pm 174.06 [*]
重楼总皂苷组 I	16	419.83 \pm 34.30 [*]	648.08 \pm 51.12 [*]	459.78 \pm 43.62 [*]
重楼总皂苷组 II	16	437.85 \pm 26.73 [*]	608.15 \pm 72.57 [*]	430.53 \pm 35.53 [*]
重楼总皂苷组 III	16	448.55 \pm 21.41 [*]	601.78 \pm 64.86 [*]	444.73 \pm 41.90 [*]

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.001$;与模型对照组比较,^{*} $P<0.001$;各浓度重楼总皂苷组间比较,^{*} $P>0.05$

Notes: As compared with blank control group, ^{*} $P<0.001$; as compared with model control group, ^{*} $P<0.001$; as compared with different concentration groups of RPTS, ^{*} $P>0.05$

· 基础研究 ·

健脾益气法治疗严重软组织损伤的实验研究

陈逊文, 朱永展, 陈志维, 吴征杰, 何利雷

(广州中医药大学附属佛山中医院骨科, 广东 佛山 528000)

【摘要】目的:观察健脾益气法对严重创伤大鼠软组织修复过程中新生毛细血管和成纤维细胞的影响,进一步探讨依据“脾主四肢、肌肉”理论治疗严重创伤软组织损伤的作用机制。**方法:**采用股动脉放血结合刀割法制备严重创伤大鼠模型,然后将实验大鼠随机分为模型组、健脾组、活血化瘀组。在治疗后第 5、10、15 天于创面中心区取材,采用组织固定切片后行 CD31 和 PCNA 染色,运用多功能显微镜(ZEISS Axioskop2)观察肉芽组织中新生毛细血管和成纤维细胞,用 Image-ProPlus 图像分析软件对肉芽组织中新生的毛细血管和成纤维细胞进行定量分析。**结果:**治疗后第 5、10、15 天健脾组毛细血管和成纤维细胞的增殖明显高于模型组($P < 0.05$),同时毛细血管和成纤维细胞的增殖速度和胶原化速度都比模型组和活血化瘀组快。**结论:**健脾益气法能有效促进严重创伤后肉芽组织的生长,加速伤口的愈合,且比传统疗法在创伤早期单纯应用活血化瘀药疗效更好。

【关键词】 软组织损伤; 伤口愈合; 益气健脾; 活血祛瘀药

Experimental study on the treatment of serious soft tissue injuries with strengthening the spleen and replenishing qi

CHEN Xun-wen, ZHU Yong-zhan, CHEN Zhi-wei, WU Zheng-jie, HE Li-lei. Department of Orthopaedics, the Foshan Hospital Affiliated to Guangzhou University of TCM, Foshan 528000, Guangdong, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of Chinese drugs based on strengthening the spleen and replenishing qi treatment rule on neoformative capillaries and fibroblast during the soft tissue repair after serious trauma in rats, so as to explore the biological basis of the TCM theory “the spleen dominate extremities and muscles” applied to the treatment of soft tissue injuries. **Methods:** The model rats were established by bleeding from femoral artery and lancing method, and the rats were randomly divided into the control group, strengthening the spleen group and activating blood and resolving stasis group. The samples were got from the tissue of the wounded area at the 5th, 10th and 15th days after oral administration of the traditional Chinese medicine. After fixation and section, the tissues were stained by CD31 and PCNA staining. The amount of the capillaries and fibroblasts in the tissue of the wounded area were observed through multi-purpose microscope (ZEISS Axioskop2). Quantitative analysis was carried out on Image-ProPlus image analyzer. **Results:** The amount of the capillaries and fibroblasts in the wounded tissue in the strengthening the spleen group were larger than that in the control group at the 5th, 10th and 15th day. And the

基金项目:广东省中医药管理局资助项目(编号:101007)

通讯作者:何利雷 Tel:0757-82028597 E-mail:helilei_2001_0_0@163.com

成过度的炎症反应和脓毒症,进而减轻由过度的炎症反应带来的局部或全身的伤害。因此,重楼总皂苷可能在一定程度上可以阻止多发骨折等严重创伤向脓毒症及 MODS 方向发展,从而减小其病死率,这有待于作进一步研究来证实。

参考文献

- Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. Surg Clin North Am, 1995, 75: 275-277.
- Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, 2002, 420: 885-891.
- Sikora JP. The role of cytokines and reactive oxygen species in the pathogenesis of sepsis. Pol Merkur Lekarski, 2000, 7(43): 47-50.
- 武珊珊, 高文远, 段宏泉, 等. 重楼化学成分和药理作用研究进展. 中草药, 2004, 35(3): 344-347.
- 周满红, 杜文胜, 龙盛双, 等. 重楼总皂苷对脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 及 IL-1 β 的影响. 四川中医, 2008, 26(3): 14-16.
- Matsuda H, Pongpiriyadacha Y, Morikawa T, et al. Protective effects of steroid saponins from Paris polyphylla var. yunnanensis on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats: structural requirement for activity and mode of action. Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13(6): 1101-1106.
- 乔治, 黎沾良, 李基业, 等. 严重多发伤后肠道细菌移位的临床研究. 中国危重病急救医学, 2006, 1: 13-15.
- 王辉, 陈海, 范琦, 等. 大鼠肠巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子的规律及复方大承气汤影响的研究. 中国中西医结合外科杂志, 2003, 9(1): 6-9.

(收稿日期: 2008-05-20 本文编辑: 连智华)