

中药复方热毒平提高中暑小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的机制探讨

罗炳德, 杨光, 李文, 张培, 谭庆, 邹飞

(南方医科大学热带医学卫生系高温医学研究室, 广东 广州 510515)

摘要: 目的 探讨中药复方制剂热毒平提高中暑内毒素血症小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的机制, 为该类药物在重症中暑治疗中的运用打下基础。方法 在干球温度 (34.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 (60 ± 5)% 的条件下建立小鼠中暑模型, 将40只小鼠随机分为热毒平组、西黄芪胶组、生理盐水组、高温对照组和正常对照组。采血并提取小鼠腹腔巨噬细胞, 用中性红法观察小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 流式细胞仪检测其凋亡情况, 试剂盒检测血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的值。结果 热毒平组小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力高于西黄芪胶组、高温对照组、生理盐水组 ($P < 0.001$), 与正常组相近; 凋亡百分率较其他三组有明显降低 ($P < 0.001$), 与正常组相近; 血中 TNF- α 的值低于西黄芪胶组、高温对照组、生理盐水组 ($P < 0.001$), 与正常对照组相近。结论 热毒平抗中暑内毒素血症的主要机制之一是在增强巨噬细胞吞噬能力, 降低 TNF- α 的含量, 减少巨噬细胞的凋亡中发挥重要作用。

关键词: 热毒平; 凋亡; 巨噬细胞; 吞噬作用; 内毒素血症; 中暑

中图分类号: R965; R135.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)06-0338-03

Mechanism of traditional Chinese herb medicinal compound Reduping enhancing phagocytosis of macrophages in abdominal cavity of mice with heat stroke

LUO Bing-de, YANG Guang, LI Wen, ZHANG Pei, TAN Qing, ZOU Fei

(School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: **Objective** To investigate mechanism of traditional Chinese herb medicinal compound Reduping, a novel endotoxin-antagonist, enhancing phagocytosis of macrophages in abdominal cavities of mice with endotoxemia in heat stroke and provide scientific evidence for clinical application of such medicine in treatment for heat stroke. **Method** Animal model with heat stroke was established in mice under dry bulb temperature of (34.5 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of (60 ± 5)%. Forty mice were randomly divided into five groups including Reduping group, Xihuangqijiao group, group with normal saline, heat stroke control group and normal control group. Blood specimens were collected and macrophages were extracted from the abdominal cavities of mice. Phagocytosis of macrophages was evaluated by neutral red method, and its apoptosis was observed with flow cytometry. Plasma level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured by a special reagent kit. **Result** Phagocytosis of mice was significantly stronger in Reduping group than that in the other three groups ($P < 0.001$), but similar to the control group. Percentage of apoptotic cells was significantly less in Reduping group than that in the other three groups ($P < 0.001$), but similar to the normal control group. Plasma level of TNF- α in Reduping group was significantly lower than that in the other three groups ($P < 0.001$), but similar to the normal control group. **Conclusion** One of the most important mechanism of Reduping against endotoxemia in heat stroke is to enhance the phagocytic function of macrophages, but decreased plasma level of TNF- α and depression of apoptosis of macrophages probably also played an important role in it.

Key words: Reduping; Apoptosis; Macrophage; Phagocytosis; Endotoxemia; Heat stroke

中药复方制剂热毒平是以治疗发热内毒素血症为目标研制的药物, 动物实验研究^[1]证明热毒平体外能直接灭活内毒素, 且对受内毒素攻击的小鼠有一定的保护作用, 同时还具有一定的抗菌、抗病毒的功效。根据中暑发病机理的内毒素学说, 我们将其应用于中暑

的治疗。实验^[2]证明它是一种治疗中暑的有效药物, 其重要起效机制为抗中暑内毒素血症。但热毒平抗中暑内毒素血症的途径, 至今尚乏详尽的论述。单核吞噬细胞系统是体内杀灭内毒素的主要途径之一^[3], 在机体内毒素的清除过程中发挥了重要的作用, 本文欲从巨噬细胞吞噬能力的变化入手, 进而探讨它的起效机制, 为这一类药物在中暑治疗中的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2005-04-20; 修回日期: 2005-09-08

基金项目: 军队“十五”指令性课题 (01L051)

作者简介: 罗炳德 (1952-), 男, 河南人, 教授, 博士生导师。

研究方向为发热的病理生理学。

1.1.1 实验样品 热毒平药粉系沈阳飞龙制药公司生产[批号:国卫药准字(1999)Z-76号],每克相当于原生药 25 g,淡黄色极细疏松粉末,无吸潮性,实验中以药粉量作为给药剂量。西黄芪胶系上海试剂厂生产(批号:F20040210)。实验用具经严格消毒灭菌处理,溶液均用无热源水于无菌条件下配制。称取西黄芪胶 1 g,用双蒸水配成 0.5%胶体液备用,精密电子天平称取热毒平 1 g 用西黄芪胶液溶解至 10 ml,煮沸 30 min 灭菌,冰箱储存。

1.1.2 实验动物及分组 昆明种小鼠,一级,雌雄各半,体重 18~22 g,购于南方医科大学实验动物中心。按文献[2]报道,随机分为热毒平组、西黄芪胶组、生理盐水组、高温对照组和正常对照组,每组 8 只。

1.1.3 实验器材 动物实验器材及人工热气候模拟舱。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 中暑内毒素血症模型的建立 模型的建立及灌胃给药剂量按文献[1]报道,给药 0.5 h 后将热毒平组、西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组同时放入人工热气候模拟舱 2 h。舱内干球温度(34.5±0.5)℃,湿度(60±5)%。

1.2.2 中性红法检测巨噬细胞吞噬功能^[4] 动物采血后脱髓法处死,75%酒精浸泡 5 s,用加肝素的冷 RPMI-1640 液灌洗腹腔,洗出液 1 000 r/min 离心 10 min,去上清,沉淀以无血清 RPMI-1640 培养液重悬 2 次,台盼蓝染色计数。用含小牛血清 RPMI-1640 培养液调整巨噬细胞数为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,吸取 100 μl 细胞悬液加至 96 孔细胞培养板中,置 37℃、5%CO₂ 孵箱培养 2 h 后,去除培养液,加入 0.072%中性红溶液,100 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 。60 min 后弃去孔内中性红,用预温的 37℃生理盐水充分洗涤 2 次,加入细胞溶解液(无水乙醇:0.1 mol/L 冰醋酸=1:1) 200 μl ,室温混匀 30 min, Bio-Rad680 型酶标仪检测波长为 570 nm 处的吸光值。上述巨噬细胞吞噬中性红的量反映了它的吞噬功能,结果以酶标仪 A 值表示。

1.2.3 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的检测 眼球采血,用 ELISA 试剂盒(购自北京晶美生物工程有限公司)检测小鼠血中 TNF- α 的值。严格按说明书操作。

1.2.4 腹腔巨噬细胞凋亡的检测 腹腔巨噬细胞制备同上。每只小鼠取 1×10^6 个细胞,用 PBS 漂洗 2 次,400 目筛网过滤 2 次,离心去除 PBS,70%乙醇(4℃) 700 μl 固定。检测前,再用 PBS 漂洗 3 次,加入 PI(碘化丙啶,浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 染色剂 15~20 min 后,用流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.5 统计学处理 所获结果用 SPSS10.0 处理,统计方法有单向方差分析,各组均数的多重比较 Tamhane's T 2 法。

2 结果

2.1 巨噬细胞的吞噬能力

热毒平组腹腔巨噬细胞吞噬中性红的量明显高于其他 3 组,差异具有显著性($P < 0.001$)。同时,正常对照组与西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组的差异亦有显著性($P < 0.001$)。西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组之间以及热毒平组与正常对照组之间的差异无显著性。见表 1。

2.2 血浆 TNF- α 的含量变化

热毒平组的值低于西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组,其差异具有显著性($P < 0.001$),其均数值略高于正常对照组。详见表 1。

表 1 各组小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力和 TNF- α 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 吞噬能力(A 值) | TNF- α (pg/ml) |
|-------|---|---------------------------|----------------------------|
| 热毒平组 | 8 | 0.473±0.045 | 54.25±1.63 |
| 生理盐水组 | 8 | 0.262±0.029 ^{*#} | 205.91±16.01 ^{*#} |
| 西黄芪胶组 | 8 | 0.233±0.030 ^{*#} | 211.26±7.17 ^{*#} |
| 高温对照组 | 8 | 0.261±0.029 ^{*#} | 227.64±12.02 ^{*#} |
| 正常对照组 | 8 | 0.465±0.039 | 51.81±2.53 |

与热毒平组比, * $P < 0.001$, 与正常对照组比, # $P < 0.001$

2.3 巨噬细胞凋亡百分率

流式细胞仪检测热毒平组与正常对照组凋亡百分率低于其他 3 组,其差异具有统计学意义。见表 2。

表 2 各组小鼠腹腔巨噬细胞凋亡百分率 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 凋亡百分率(%) |
|-------|---|--------------------------|
| 热毒平组 | 8 | 11.72±1.31 |
| 西黄芪胶组 | 8 | 58.45±5.45 ^{*#} |
| 生理盐水组 | 8 | 57.87±5.77 ^{*#} |
| 高温对照组 | 8 | 58.70±4.27 ^{*#} |
| 正常对照组 | 8 | 8.27±1.47 |

与热毒平组比, * $P < 0.001$, 与正常对照组比, # $P < 0.001$

3 讨论

中暑时,当体温升高到一定程度,肠道内毒素大量进入血液循环,导致中暑内毒素血症^[3]。内毒素刺激人单核巨噬细胞,释放 TNF- α 等细胞因子,这些细胞因子与高温共同作用,引起机体体温调节障碍,心血管功能紊乱,呼吸衰竭,直至死亡^[9]。

单核巨噬细胞吞噬内毒素是体内清除内毒素的主要途径^[3],高温时巨噬细胞的吞噬功能受到抑制,导致体内清除内毒素的功能下降^[7],这可能是造成中暑内毒素血症的重要原因。本实验证明热毒平能提高巨噬细胞的吞噬能力,这必然会提高其杀灭内毒素的能力,对中暑的治疗产生积极的效果。这也应是热毒平

抗中暑内毒素血症的重要机制之一。

热毒平提高巨噬细胞吞噬能力的机制, 至今尚不清楚。本实验显示热毒平在阻断由 $\text{TNF-}\alpha$ 所诱导的巨噬细胞凋亡中扮演了重要的角色。 $\text{TNF-}\alpha$ 是由内毒素激活巨噬细胞所释放的细胞因子^[8], 它不仅参与引起发热、休克等病理过程, 而且还是诱导细胞凋亡的“死亡信号”。细胞凋亡是一种不同于病理性坏死的细胞死亡形式, 是细胞在一定的生理或病理条件下, 受内在基因调控, 通过主动的生化过程而自杀死亡的现象。它是机体删除过度增生的、机体不再需要的或已发生突变的细胞, 以及清除攻击自身组织的免疫细胞, 从而保持细胞处于正常的动态平衡的重要形式。但各种刺激因素引起的过度凋亡会对机体产生不利影响^[9, 10]。 $\text{TNF-}\alpha$ 能与特异性的死亡受体 TNFR1 结合, 引起细胞内贮存 Ca^{2+} 释放, 使细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高, 继而激活 caspase 酶, 导致细胞凋亡^[11]。凋亡细胞增多时, 必然导致组织器官的功能下降和损伤。实验中西黄芪胶组、生理盐水组和高温对照组的 $\text{TNF-}\alpha$ 含量升高, 巨噬细胞出现严重的凋亡, 吞噬能力明显下降, 而热毒平组的 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量与正常对照组相近, 巨噬细胞的凋亡率较低, 吞噬能力提高, 这一方面证明了 $\text{TNF-}\alpha$ 与巨噬细胞凋亡的关系, 另一方面也说明了抗由 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的巨噬细胞凋亡是热毒平提高巨噬细胞吞噬能力的重要手段。

(上接第 337 页) 损害与出血性胃肠炎同为二甲基甲酰胺中毒时的诊断标准^[9], 表现为恶心、呕吐、腹胀、腹痛, 内窥镜可见胃及十二指肠黏膜充血、水肿、糜烂, 伴出血点。本实验各染毒组 ALT 活性明显增高说明肝损害明确。病理观察表明吸入高浓度 DMF 气体确可引起胃黏膜充血、出血、糜烂等病变, 胃黏膜损害程度随染毒剂量增加而趋于严重。不同浓度染毒组均有胃黏膜黏液减少, 黏液层变薄, 黏膜紊乱, 黏膜层血管高度扩张、充血明显。值得注意的是电镜观测到壁细胞和颈黏液细胞的细胞核均有破裂现象, 核内容物溢出核外, 颈黏液细胞核破裂使细胞的结构功能受损, 分泌的黏液量减少, 胃黏膜的黏液-碳酸氢盐屏障破坏, 发生出血、糜烂, 此可能为 DMF 导致胃黏膜损害的重要原因之一。胃泌素水平的减低, 导致胃黏膜的营养作用障碍, 可能加重 DMF 对胃的损害^[9]。低浓度组谷胱甘肽低于对照组且差异有显著性, 而中、高浓度组呈减少趋势, 但差

异无显著性, 这与其他实验所证明的 DMF 的摄入量越多毒性出现的时间就越晚一致^[7]。本实验尚无法判定 DMF 对胃黏膜血流、前列腺素及氧化损伤的影响, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓文龙, 徐嘉红, 王文烈, 等. 热毒平的抗内毒素作用研究 [J]. 中药药理与临床, 1995, 11 (2): 13-15.
- [2] 李文, 罗炳德, 杨光, 等. 热毒平抗中暑内毒素血症的作用研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18 (1): 44-46.
- [3] 张顺财. 内毒素基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 194-196.
- [4] 梁再赋, 李铁皮, 赵慕丽, 等. 肺疾患肺泡巨噬细胞功能的变化 [J]. 中国医科大学学报, 1995, 24 (1): 12-13.
- [5] 罗炳德, 闫文生, 万为人, 等. 实验性中暑兔血浆内毒素与血液学指标的变化 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 1999, 2 (4): 386.
- [6] 李泽, 罗炳德, 闫艳. 抗内毒素措施应用于中暑防治的展望 [J]. 中国公共卫生, 2000, 16 (8): 753.
- [7] 朱国标, 李素华, 丛桦. 高温及游泳对腹腔巨噬细胞的影响 [J]. 西南国防医药, 1994, (3): 141-142.
- [8] 张顺财. 内毒素基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 76-78.
- [9] Ucker DS. Death by suicide: One way to go in mammalian cellular development [J]. New Biol, 1991, (3): 102-103.
- [10] Walker PR, Simith C, Youdale YJL, et al. Topoisomerase II-reactive chemotherapeutic drugs induced apoptosis in thymocytes [J]. Cancer Res, 1991, (51): 1076-1078.
- [11] 张顺财. 内毒素基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 79.

异无显著性, 这与其他实验所证明的 DMF 的摄入量越多毒性出现的时间就越晚一致^[7]。本实验尚无法判定 DMF 对胃黏膜血流、前列腺素及氧化损伤的影响, 有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨水莲, 周蓓颖, 江朝强, 等. 职业性二甲基甲酰胺中毒的临床分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (4): 212-214.
- [2] 彭贵祖. 改良中性红清除法应用于大鼠胃黏膜血流测定 [J]. 江西医药, 2002, 37 (21): 10-12.
- [3] 张瑞, 郭文栋. 内源性一氧化氮预防大鼠乙醇性胃黏膜损伤的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (11): 1038-1040.
- [4] 赵旭东, 魏东芝, 万群, 等. 谷胱甘肽的简便测定法 [J]. 药物分析杂志, 2000, 20: 14-37.
- [5] GBZ85—2002. 职业性急性二甲基甲酰胺中毒诊断标准·附录 A [S].
- [6] 邵淑丽, 刘庆华, 徐兴军. 胃黏膜保护机制的研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报, 1998, 14 (3): 89-91.
- [7] 郭风华, 穆进军, 姚汝琳. 二甲基甲酰胺急性肝损伤与肝脏谷胱甘肽的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2001, 19 (6): 424-426.