

羟基红花黄色素A对脓毒症小鼠外周血促炎/抗炎因子的影响

王金平¹, 王平³, 陈润桦³, 赵佩研², 黄泽愉³, 吴汉伟², 吴建龙¹

(深圳市第二人民医院 1. 药学部, 2. 中心实验室, 广东 深圳 518035; 3. 深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057)

摘要:【目的】观察羟基红花黄色素A(HSYA)对脓毒症小鼠外周血炎症介质的影响,探讨其治疗脓毒症的作用。【方法】将NIH小鼠随机分为对照组、假手术组、脓毒症模型组、HSYA组,每组24只。采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制备脓毒症小鼠模型,分别于CLP术前12h、手术时、术后12h尾静脉给予HSYA120mg/kg/次,对照组、假手术组、模型组给予等体积生理盐水注射液。观察动物一般情况改变,检测血常规、血生化及血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子(TNF- α)的含量及mRNA表达水平,培养外周血细菌负荷量。【结果】术后24h,模型组动物出现竖毛、肛门残留粪便等;与对照组、假手术组、HSYA组相比,模型组小鼠全血白细胞计数(WBC)、血小板水平(PLT)明显下降,血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、IL-6、IL-10、TNF- α 含量及mRNA表达明显升高,细菌负荷量明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】HSYA对脓毒症小鼠具有治疗作用,可减少脓毒症时细菌入血,减轻炎症介质导致的损伤,抑制亢进的炎症反应。

关键词:脓毒症;羟基红花黄色素A;炎症介质;细菌负荷

中图分类号:R9

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)05-0665-05

Effect of Hydroxysafflor Yellow A on Pro/Anti-Inflammatory Cytokines in Peripheral Blood with Sepsis in Mice

WANG Jin-ping¹, WANG Ping³, CHEN Run-hua³, ZHAO Pei-yan², HUANG Zhe-yu³,
WU Han-wei², WU Jian-long¹

(1. Department of Pharmacy, 2. The Central Laboratory Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China;

3. Department of Pharmacology and Toxicology, Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518035, China)

Correspondence to: WU Jian-long, E-mail: wjl06@163.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effect of HSYA on pro/anti-inflammatory cytokine's levels and mRNA expression in peripheral blood of mice with sepsis. 【Methods】 Dividing NIH mice into four groups, as normal group, sham group, CLP group and HSYA group, 24 mice in each group. The CLP sepsis mouse model was established. HSYA (120 mg/kg) were injected intravenously at 12 h before the operation, and 0 h and 12 h following CLP, and other groups were given normal saline. observed the animals behavior changes, measured the levels WBC, PLT, ALT, AST, BUN in serum, detected the levels and mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF- α in peripheral blood. cultured of peripheral blood bacteria loads. 【Results】 24 h after surgery, mice in CLP group appeared furring, feces residues on anus etc. compared to normal group, sham group and HSYA group, WBC, PLT, ALT, AST, BUN, levels and mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF- α showed significant increases, it was also found that bacterial load was significant increased in model group. 【Conclusions】 HSYA has a therapeutic effect in mice with sepsis, can reduce bacteria into the blood, and inhibit inflammatory mediators which caused tissue damage.

Key words: sepsis; hydroxysafflor yellow a; inflammatory cytokine; bacterial load

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(5): 665-669]

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 国家自然科学基金(81503320); 深圳市科创委基础研究(JCYJ20150330102401101)

作者简介: 王金平, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 临床药学与药理学, E-mail: 787079848@qq.com; 吴建龙, 通信作者, 博士, 主任药师,

研究方向: 临床药学与药理学, E-mail: wjl06@163.com

机体在脓毒症的发生、发展过程中,促炎因子及抗炎因子大量释放,导致了脓毒症患者的免疫功能紊乱。脓毒症早期机体产生代偿性抗炎因子以克服炎症反应,但随后发展为过度的抗炎反应,表现为免疫功能抑制,甚至造成所谓的“免疫麻痹”状态,从而使机体不能有效调控特异性的免疫反应以抵抗病原体的感染,进而导致感染播散,多器官衰竭甚至死亡^[1-2]。血必净注射液属国家中药保密品种,是国内唯一经SFDA批准的治疗脓毒症和多器官功能障碍综合征的药物^[3]。针对血必净注射液治疗脓毒症的作用机制是目前研究的焦点问题,然而,由于其成分复杂,作用靶点较多,其确切作用机制难以阐明。其主要成分之一羟基红花黄色素A已被证明具有显著的抗炎和抗氧化损伤的作用^[4]。HSYA可抑制脂多糖和缺氧诱导的IL-6、IL-2等炎性因子表达,也通过抑制胞浆核转录因子NF- κ B激活及炎性因子转录水平的表达,而发挥抗炎作用^[5]。但HSYA单独用于治疗脓毒症的作用及机制国内外未见报道。为了更好的探讨HSYA治疗脓毒症的作用,筛选药物作用靶点,本研究以盲肠结扎穿孔法制备脓毒症小鼠模型,观察HSYA对脓毒症的治疗作用及对脓毒症时促炎/抗炎因子平衡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及给药

12周龄雄性SPF级NIH小鼠96只,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证:SCXK(粤)2013-0002;饲养于深圳市药品检验研究院屏障环境动物实验室,实验动物使用许可证:SYXK(粤)2016-0157。小鼠适应环境3d后,随机分为对照组、假手术组、模型组、羟基红花黄色素(HSYA)组,每组24只。HSYA组的建立方法根据文献报道,将HSYA溶解于生理盐水注射液中,以120 mg/kg BW剂量,分别于CLP模型建立前12 h,手术时,手术后12 h共尾静脉注射给药3次。对照组、假手术组、模型组给予等体积生理盐水注射液。

1.2 脓毒症小鼠模型的建立

采用盲肠结扎穿孔法(CLP)制备脓毒症小鼠模型,各组动物实验前禁食12 h、自由饮水,术前称体质量,按2 mL/kg BW剂量,腹腔注射2.5%戊巴比妥钠麻醉后固定,铺无菌孔巾,沿中下腹正中

线切口1 cm,暴露腹腔脏器,将盲肠提出,7号丝线距盲肠根部0.3 cm,血管弓内结扎盲肠,避免肠梗阻和肠坏死。用18号无菌针头贯穿盲肠3次,使肠内容物流出,避免伤及肠壁系膜血管,然后将盲肠放回腹腔,逐层缝合腹部切口。假手术组仅开腹翻动盲肠后关腹。术毕动物皮下注射生理盐水10 mL/kg抗休克,术后自由饮水。分别至术后相应时点留取标本并处死。整个实验过程在室温22~25℃环境进行,并让小鼠自由饮水。

1.3 血清炎性因子检测

各组于CLP术后24 h,2.5%戊巴比妥钠麻醉,眼球取血,每组取6只小鼠的血液用EDTA抗凝管收集,采用XT-2000i型全自动血液分析仪(日本SYSMEX)检测血常规,每组取12只小鼠的血液用干燥管收集,静置20 min后,Allegra X-12R离心机(美国贝克曼)重力加速度2130 $\times g$ 离心10 min,取上清。采用DXC800自动生化分析仪(美国贝克曼)测定ALT、AST、Cr、BUN。按ELISA试剂盒(购于深圳市欣诚医疗器材有限公司)提供的实验步骤检测各组外周血清IL-6、IL-10、TNF- α 水平的变化。

1.4 RT-PCR检测外周血炎性因子mRNA的表达

采用异硫氰酸胍一步法提取各组小鼠外周血中总RNA,紫外分光光度计定量。取1 μ g RNA在逆转录酶的作用下合成cDNA。以 β -actin为内对照基因扩增细胞因子基因。所用引物序列如下。 β -actin(内对照基因,268 bp)forward primer: 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACATCAA-3', reverse primer: 5'-ACTCAT CGTACT CCTGCT TG CTGA-3'; IL-6(156 bp), forward primer: 5'-TGGAGT CACAGA AGGAGTGGCTAA-3', reverse primer: 5'-TCTGACCACAGTGAGG AATGTCCA-3'; IL-10(289 bp), forward primer: 5'-GAAAACAGAGCTTC ACCATGCTTGG-3', reverse primer: 5'-TTTGAGT-GTCACGTACGCT TCTA TGC-3'; TNF- α (349 bp), forward primer: 5'-TTCTGTCCCTTTCACACTCAC TGG-3', reverse primer: 5'-TTGGTGGTTTGCTACGAC-GTGG-3';采用Bio-Rad iCycler Iq system进行定量RT-PCR。PCR反应体系为25 μ L,反应条件:预变性95℃,30 s;95℃ 30 s,62℃ 45 s;72℃ 90 s,36 cycles;根据Ct值分别计算IL-6、IL-10、TNF- α 基因mRNA的相对表达量。相对表达量(F)= $2^{-[\Delta C_t(NF-\kappa B)-\Delta C_t(\beta\text{-actin})]}$,以RQ值表示。

1.5 细菌培养

各组于CLP术后24 h, 2.5%戊巴比妥钠麻醉, 75%酒精消毒眼部, 重复3次, 眼球取血, 每组收集6只小鼠的血液, 分别取血1 μ L、10 μ L、100 μ L, 稀释在100 μ L生理盐水里, 接种在5%胰酪胨大豆羊血琼脂培养基上, 所有的培养基在37度孵育24 h, 然后计算菌落数(CFU/mL)。计数结果按如下方法计分: 0 = 未见菌落(CFU = 0); 1 = 1 ~ 10 CFU; 2 = 11 ~ 100 CFU; 3 = 101 ~ 1 000 CFU; 4 = 1 000+ CFU。

1.6 统计学方法

本研究中涉及到的所有数据均为连续型变量, 所以计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)描述, 采用单因素方差分析比较对照组、假手术组、模型组以及HSYA组各组总体差异, 并采用Turkey方法进行两两比较。本研究中所有的统计分析均采用SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA)软件完成, 检验水准设定为0.05。

2 结果

2.1 动物一般情况观察

对照组, 假手术组小鼠精神状态良好, 活动正常。模型组小鼠表现出精神萎靡, 活动减少, 肛门有粪便残留, 竖毛。打开腹腔后可见腹腔积液, 结扎部位内容物为灰黑色或墨绿色。HSYA组小鼠精神状态明显好于模型组, 活动可, 无竖毛, 肛门无粪便残留。打开腹腔口未见腹腔积液。结扎部位内容物为白色。

2.2 HSYA对脓毒症小鼠血常规的影响

模型组小鼠在造模后24 h与对照组、假手术组和HSYA组相比, 全血白细胞计数(WBC)明显

降低, 血小板水平(PLT), 淋巴细胞计数(LYMPH), 中性粒细胞计数(NEUT)明显下降, 差异有统计学意义, $P < 0.05$, HSYA组与对照组和假手术组相比, WBC、PLT、LYMPH、NEUT水平虽然有降低, 但无明显统计学差异($P > 0.05$; 表1)。

2.3 HSYA对脓毒症小鼠血生化的影响

模型组小鼠在造模后24 h与对照组、假手术组和HSYA组相比, 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); HSYA组与对照组和假手术组相比, ALT、AST、BUN虽有升高, 但无明显统计学差异($P > 0.05$)。模型组血清肌酐(Cr)虽然有所升高, 但各组之间但无统计学差异($P > 0.05$; 表2)。

2.4 HSYA对脓毒症小鼠血清炎症因子含量的影响

模型组小鼠在造模后24 h与HSYA组相比, IL-6、IL-10、TNF- α 含量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$; 表3)。

2.5 HSYA对脓毒症小鼠外周血炎症因子mRNA表达水平的影响

双CT值法是Real-Time qPCR技术相对定量中的一种, 通过计算相对表达量RQ值可以得出目的基因在各个样本之间的相对表达。由图1可知, 模型组小鼠在造模后24 h与HSYA组相比, IL-6、IL-10、TNF- α mRNA表达量明显升高差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 HSYA对脓毒症小鼠外周血细菌负荷量的影响

模型组小鼠在造模后24 h与对照组、假手术组和HSYA组相比, 外周血细菌负荷量明显增多, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 外周血细菌负荷单因素方差分析, 总体: $F = 48.77$, $P = 0.000$ ($P < 0.05$; 图2)。

表1 各组小鼠血常规结果比较

Table 1 Routine blood parameters in each group

($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Group	WBC/($10^9/L$)	PLT/($10^9/L$)	LYMPH/($10^9/L$)	NEUT/($10^9/L$)
Control	3.49 \pm 0.72	5744 \pm 632.2	2.94 \pm 0.58	0.29 \pm 0.05
Sham	3.86 \pm 0.83	5880 \pm 716.8	2.36 \pm 0.49	0.22 \pm 0.01
CLP	1.23 \pm 0.52 ¹⁾	3911 \pm 610.3 ¹⁾	0.60 \pm 0.25 ¹⁾	0.06 \pm 0.01 ¹⁾
HSYA + CLP	2.98 \pm 0.63 ²⁾	5033 \pm 736.5 ²⁾	1.97 \pm 0.21 ²⁾	0.17 \pm 0.02 ²⁾
<i>F</i>	182.93	541.75	215.61	22.53
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

1) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to control group or sham group. 2) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to model group.

表2 各组小鼠血生化分析结果比较

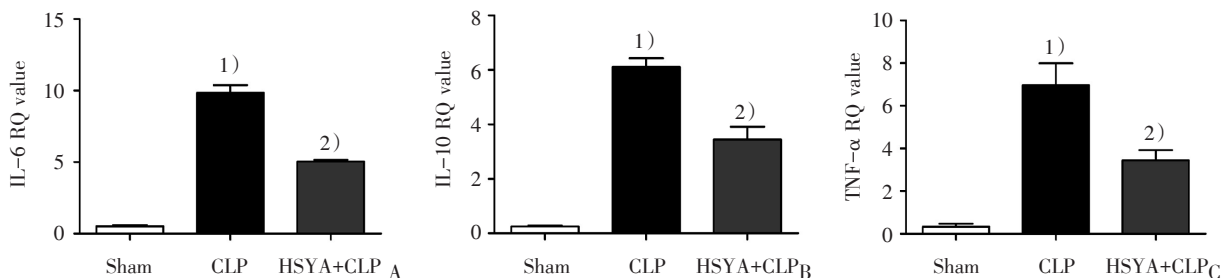
Groups	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	BUN/(mmol/L)	Cr/(μ mol/L)
Control	27.13 \pm 5.27	56.91 \pm 8.32	4.20 \pm 1.57	18 \pm 5.67
Sham	24.35 \pm 5.13	58.54 \pm 9.67	4.80 \pm 1.83	19 \pm 5.98
CLP	53.56 \pm 7.65 ¹⁾	140.23 \pm 13.10 ¹⁾	8.3 \pm 2.53 ¹⁾	20 \pm 6.47
HSYA+CLP	33.34 \pm 4.38 ²⁾	71.35 \pm 9.51 ²⁾	6.6 \pm 2.34 ²⁾	17 \pm 5.26
<i>F</i>	73.82	59.81	40.31	0.65
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.61

1) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to control group or sham group. 2) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to model group

表3 各组小鼠血清炎症因子水平比较

Groups	IL-6(ng/mL)	IL-10(ng/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-6/IL-10
Sham	2.56 \pm 0.34	0.58 \pm 0.12	1.93 \pm 0.25	4.41
CLP	156.82 \pm 23.51 ¹⁾	19.85 \pm 8.54 ¹⁾	36.20 \pm 11.55 ¹⁾	7.85
HSYA+CLP	86.57 \pm 20.13 ²⁾	13.18 \pm 7.23 ²⁾	15.87 \pm 9.53 ²⁾	6.57
<i>F</i>	161.62	63.74	110.13	
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	

1) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to control group or sham group. 2) Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to model group.



HSYA (120 mg/kg) was intravenously injected at 12 h before the operation, and 0 h and 12 h after CLP operation. mRNA levels of (A) IL-6 (B) IL-10 and (C) TNF- α were detected 24 h after CLP. 1): Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to control group or sham group. 2): Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to model group. $n = 6$, data was shown as $\bar{x} \pm s$.

图1 各组小鼠外周血炎症因子mRNA表达水平

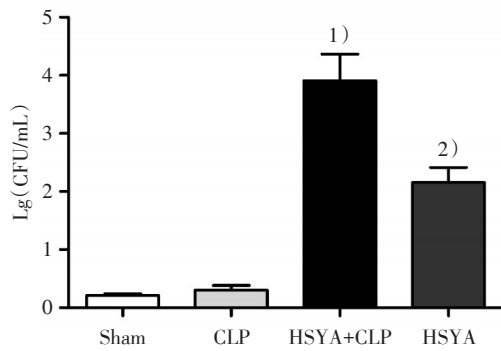
Fig.1 The mRNA expression of cytokines in peripheral blood in each group

3 讨论

盲肠结扎穿孔法(CLP)制备的脓毒症模型具有高度的稳定性和可重复性,已成为进行脓毒症研究模型制备的“金标准”^[6]。本实验选用了CLP模型进行了脓毒症的研究,对实验动物的血常规及血生化进行了检测,研究表明,模型组动物全血白细胞计数、淋巴细胞计数、中性粒细胞计数明

显降低,血小板水平明显下降,血清ALT及BUN水平升高,与对照组,假手术组、HSYA组相比均具有统计学差异。初步提示HSYA对脓毒症小鼠具有保护作用,推测其可能具有治疗脓毒症的作用。

当机体发生脓毒症时,由于肠黏膜缺血缺氧,细胞毒作用等,可致肠道内细菌大量入血,通过对各组动物外周血进行细菌培养发现,HSYA可明显少脓毒症时细菌入血。初步证明了HSYA具有治疗脓毒症的作用。脓毒症时促炎因子和抗



HSYA (120 mg/kg) was intravenously injected at 12 h before the operation, and 0 h and 12 h after CLP operation. The bacterial number in peripheral blood in each group were detected after CLP. 1): Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to control group or sham group. 2): Denotes significant differences ($P < 0.05$) compared to model group. $n = 6$, data was shown as $\bar{x} \pm s$.

图2 各组小鼠外周血细菌负荷量

Fig.2 The bacterial number in peripheral blood in each group

炎因子的表达处于一种失衡状态,促炎因子和抗炎因子的水平高低与其病情严重程度及预后密切相关,其中,TNF- α 在脓毒症的发生、发展过程中是最先合成的炎症介质,也是最重要的炎症介质之一,同时是脓毒症的启动因子^[7]。机体受到有害刺激后,TNF- α 水平迅速升高,并很快达到一个峰值,进而诱导IL-6等多种炎症因子的产生,这些促炎因子之间相互作用后可形成许多正反馈,导致“炎症级联效应”的发生。多种炎症介质的失控性释放可引起全身性炎症和组织器官的损伤^[8-10]。本研究表明,模型组外周血IL-6、IL-10、TNF- α 的含量及mRNA表达水平明显升高,HSYA可明显降低外周血IL-6、IL-10、TNF- α 的含量及mRNA表达,差异有统计学意义。说明HSYA可抑制炎症介质的释放,减轻炎症介质导致的损伤。IL-6作为促炎因子,脓毒症时其水平持久过度的升高将导致全身炎症反应综合征,并伴随细胞免疫功能的抑制和死亡率的增加。为了防止炎症反应在最初阶段发挥有益作用后产生有害效应,免疫系统释放抗炎细胞因子,包括IL-10,因此IL-6/IL-10的比值是反应体内促炎/抗炎平衡的指标之一。在我们的研究中,HSYA组IL-6/IL-10的比值6.6,小于模型组(7.9),提示HSYA可抑制亢进的炎症反应,保护机体免受炎症损害,但其实脓毒症时机体的炎症反应是双向性的,IL-10的持续分泌可引起机

体免疫抑制,这也是本研究的局限之处,没有设立不同的观察时间点继续观察HSYA对IL-6/IL-10比值动态变化的影响,有必要进行进一步的研究。

参考文献

- [1] Chen S, He Y, Hu Z, et al. Heparanase mediates intestinal inflammation and injury in a mouse model of sepsis [J]. *J Histochem Cytochem*, 2017, 1(22): Epub ahead of print
- [2] Huang Y, Zhou M, Li C, et al. Picoside II protects against sepsis via suppressing inflammation in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12): 5519-5531.
- [3] 王金平,李雯,陈嘉怡,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠NF- κ B表达的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2014, 4(19): 385-388.
Wang JP, Li W, Chen JY, et al. Effect of xuebijing injection on liver gene expression of NF- κ B in septic rats [J]. *Clin J Clin Pharmacol Ther*, 2014, 4(19): 385-388.
- [4] Shujun J, Zhen S, Changyong L, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury by suppressing macrophage activation [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5): 2595-2608.
- [5] Dong F, Xue C, Wang Y, et al. Hydroxysafflor yellow A attenuates the expression of inflammatory cytokines in acute soft tissue injury [J]. *Sci Rep*, 2017, 11(7): 1-9.
- [6] Rios CE, Abreu AG, Braga Filho JA, et al. Chenopodium ambrosioides L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture [J]. *Front Microbiol*, 2017, 1(8): 1-7.
- [7] Drewry AM, Ablordeppey EA, Murray ET, et al. Comparison of monocyte human leukocyte antigen-DR expression and stimulated tumor necrosis factor alpha production as outcome predictors in severe sepsis: a prospective observational study [J]. *Crit Care*, 2016, 20(1): 334-344.
- [8] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, et al. Host innate immune responses to sepsis [J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 36-44.
- [9] Wu CL, Wu QY, Du JJ, et al. Calcium-sensing receptor in the T lymphocyte enhanced the apoptosis and cytokine secretion in sepsis [J]. *Mol Immunol*, 2015, 63(2): 337-342.
- [10] Fu H, Wang QS, Luo Q, et al. Simvastatin inhibits apoptosis of endothelial cells induced by sepsis through upregulating the expression of Bcl-2 and downregulating Bax [J]. *World J Emerg Med*, 2014, 5(4): 291-297.

(编辑 孙慧兰)