文章编号:1000-5404(2005)17-1769-04

论著

青蒿素对脓毒症大鼠的保护作用

曹红卫[1],郭毅斌[1],王 宁[1],魏利召[1],王 俊[2],周 红[2],郑 江[1] (第三军医大学:[1]西南医院综合实验研究中心,[2]基础医学部药理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察青蒿素对脓毒症大鼠的保护作用并探讨其作用机制。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)制作大鼠脓毒症模型,观察青蒿素对CLP大鼠死亡率的影响,ELISA法检测术后2、6、12、24、48和72 h大鼠血清LPS、TNF-α和IL-6水平;光镜和透射电镜观察72 h大鼠肠粘膜形态学的变化;分离大鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ),ELISA法检测青蒿素对LPS(100 ng/ml)及热灭活大肠杆菌(3.5×10^7 CFU/ml)刺激PMΦ释放TNF-α及IL-6的影响。**结果** 青蒿素组大鼠死亡率低于模型组($P<0.05$),CLP术后血清LPS、TNF-α和IL-6水平较模型组降低($P<0.05$或$P<0.01$),肠粘膜的损伤程度减轻;青蒿素对LPS和热灭活大肠杆菌刺激PMΦ释放TNF-α和IL-6具有显著的抑制作用并呈量效关系($P<0.01$)。**结论** 青蒿素能抑制CLP大鼠巨噬细胞活化并减轻肠粘膜损伤,对CLP大鼠具有保护作用。

关键词: 青蒿素;脓毒症;巨噬细胞;细胞因子
中图法分类号: R-332; R284.1; R631 **文献标识码:** A

Protective effects of artemisinin on septic rats

CAO Hong-wei[1], GUO Yi-bin[1], WANG Ning[1], WEI Li-zhao[1], WANG Jun[2], ZHOU Hong[2], ZHENG Jiang[1] ([1]Research Center of Medical Laboratory, Southwest Hospital, [2]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the biological activity and mechanism of artemisinin on septic rats. **Methods** Septic model was established by cecal ligation and puncture (CLP) in Wistar rats. Artemisinin was administrated to observed its protective effects on septic rats. Blood was collected to examine serum lipopolysaccharide (LPS), TNF-α and IL-6 after 2, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 h by kinetic turbidimetric limulus test and ELISA. The morphological changes of intestinal mucosa were observed with light microscope and transmission electron microscope. The peritoneal macrophages (PMΦ) in rats were isolated and the release of TNF-α and IL-6 in PMΦ after exposure to LPS (100 ng/ml) and heat-killed *E. coli* were detected by ELISA. **Results** Mortality in the artemisinin group was significantly lower than the septic group ($P<0.05$). The concentrations of LPS, TNF-α and IL-6 in serum were significantly lower in the artemisinin group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The degree of inflammatory injury of intestinal mucosa was much milder in the artemisinin group than in the septic group. In addition, artemisinin could inhibit remarkably the release of TNF-α and IL-6 in LPS-stimulated and heat-killed *E. coli* PMΦ of rats *in vitro* ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Artemisinin protects the septic rats by inhibiting the release of cytokines.

Key words: artemisinin; sepsis; macrophages; cytokine

脓毒症(sepsis)是严重创伤、休克和外科大手术后常见的并发症,也是临床感染性危重患者的主要死亡原因之一。流行病学调查表明,脓毒症的病死率约30%~40%,其中重症脓毒症和脓毒性休克患者则高达50%以上[1]。目前对脓毒症的治疗大多是以抗生素为主的综合治疗,尚缺乏有效的防治措施。已证实G-菌外膜的内毒素(lipopolysaccharides, LPS)是介导脓毒症的主要病原分子之一[2],因此,寻找LPS拮抗药物对脓毒症的病理生理机制研究及其治疗具有重要的意义。

青蒿素(artemisinin, ART)是从中药青蒿中分离

作者简介:曹红卫(1970-),女,湖南省湘潭市人,硕士,主管技师,主要从事创伤后炎症反应的调控措施方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68765466
通讯作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:zhengj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-02-04;修回日期:2005-06-11

得到的抗疟有效单体，临床上主要用于治疗耐药的恶性疟疾。研究表明青蒿素及其衍生物对 LPS 诱导的炎症反应具有一定的抑制作用，但作用机制不清楚[3]。本研究采用大鼠盲肠结扎穿孔术（cecal ligation and puncture，CLP）制备脓毒症模型，旨在观察青蒿素对脓毒症模型大鼠的保护作用，并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

青蒿素粉剂购于重庆酉阳县武陵山制药有限公司，LPS O55:B5 购于 Sigma 公司；鲎试剂购于广东湛江安度斯生物工程公司；大鼠 TNF-α 和 IL-6 检测试剂盒购于深圳晶美公司；RPMI1640 及低内毒素血清为美国 Hyclone 公司产品。EDS-99 细菌内毒素测定系统购于湛江正杰科学仪器有限公司；Model 550 酶联分析仪为美国 BIO-RAD 公司产品；无热源 96 孔培养板为美国 Corning 公司产品。

1.2 动物模型与分组

1.2.1 CLP 模型制备 Wistar 大鼠，体质量（210 ± 20）g，由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。大鼠 CLP 模型制备方法参照文献[4]，大鼠以 1% 戊巴比妥钠（40 mg/kg）腹腔注射麻醉，沿腹中线作一条长 1.5 cm 的切口，探查取出盲肠，1 号丝线距盲端 1 cm 处结扎，用 16 号针在盲肠上穿通 3 次形成盲肠漏，将盲肠还纳腹腔，逐层缝合腹壁切口。术后皮下注射生理盐水 3 ~ 4 ml/100 g 体质量。

1.2.2 动物分组及处理 将 CLP 大鼠 40 只随机分为 CLP 组和青蒿素组，每组 20 只，观察青蒿素对 CLP 大鼠的 3 d 保护率。另将 65 只 CLP 大鼠随机分为 3 组：正常对照组（5 只），麻醉后活杀；CLP 组（30 只），分别于 CLP 术后 2、6、12、24、48 和 72 h 活杀；青蒿素组（30 只），于 CLP 术后灌胃给予青蒿素，每次剂量为 140 mg/kg，2 次/d，分别于术后相同时相点活杀；大鼠活杀后无菌取心脏血，72 h 取肠粘膜行组织学检查。

1.3 青蒿素对 LPS 及热灭活大肠杆菌诱导的大鼠腹腔巨噬细胞（PMΦ）释放 TNF-α 和 IL-6 的影响

1.3.1 热灭活大肠杆菌的制备 大肠杆菌 25922 为本实验室保存。参照文献[5]，挑取琼脂板上单个大肠杆菌接种于 5 ml 的 LB 培养液中，置于 37 ℃恒温摇床 180 r/min 培养 12 h，再加入 500 ml 新鲜培养液继续培养 12 h，离心 5 min 收集细菌（1 000 r/min），生理盐水洗涤 1 次后调整菌液浓度为 1.5×10^9 CFU/ml，置于 100 ℃水浴 30 min 备用。

1.3.2 大鼠 PMΦ 的分离与处理 Wistar 大鼠 3 只，雌雄不拘。参照文献[6]，麻醉条件下脱臼处死后，浸泡于 75% 乙醇中 5 ~ 10 min，剪开腹部皮肤暴露腹膜，向腹腔注入生理盐水约 20 ml，轻揉腹部，沿腹白线剪开一小口，吸取腹腔液，离心 10 min（1 000 r/min），洗涤 2 次后用 RPMI1640（含 10% 的新生牛血清）调整细胞数至 1×10^6/ml，加入至 48 孔聚苯乙烯培养板中，每孔 0.5 ml；加入不同浓度的青蒿素（终浓度 0、5、10、20、40 μg/ml），2 h 后加入 LPS（终浓度 100 ng/ml）或热灭活杆菌（终浓度 3.5×10^7 CFU/ml），细胞于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中孵育 4 h，取上清待测 TNF-α 和 IL-6 浓度。

1.4 血清 LPS 及细胞因子水平检测

血清 LPS 采用动态浊度法鲎试验，具体操作按 EDS-99 细菌内毒素测定系统说明书进行；血清及细胞上清的 TNF-α 和 IL-6 检测采用 ELISA 法，具体操作按晶美公司 TNF-α 和 IL-6 检测试剂盒内说明书进行。

1.5 肠粘膜组织学检查

①光镜观察：常规脱水、石蜡包埋、HE 染色、封固，光镜下观察组织学变化。②电镜观察：取肠粘膜组织约 1 mm × 1 mm × 3 mm，置 2.5% 戊二醛中固定，二甲胂酸钠缓冲液漂洗后锇酸固定，系列浓度乙醇脱水后常规包埋，制成超薄切片供透射电镜观察。

1.6 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 青蒿素对 CLP 大鼠的保护作用

CLP 组大鼠 3 d 死亡率达 80%，青蒿素治疗组大鼠 3 d 死亡率 30%（$P < 0.05$）。

2.2 青蒿素对 CLP 大鼠血浆 LPS、TNF-α 和 IL-6 水平的影响

CLP 大鼠血清 LPS，TNF-α 和 IL-6 水平明显增高，分别于术后 12、24、12 h 达到高峰；青蒿素治疗组大鼠血清 LPS，TNF-α 和 IL-6 高峰时水平明显下降，与 CLP 组相比有显著差异（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），结果见表 1。

表 1 青蒿素对 CLP 大鼠血浆 LPS、TNF-α 和 IL-6 水平的影响（$n = 5$）

Tab 1 Effect of artemisinin on levels of LPS, TNF-α and IL-6 in serum of septic rats（$n = 5$）

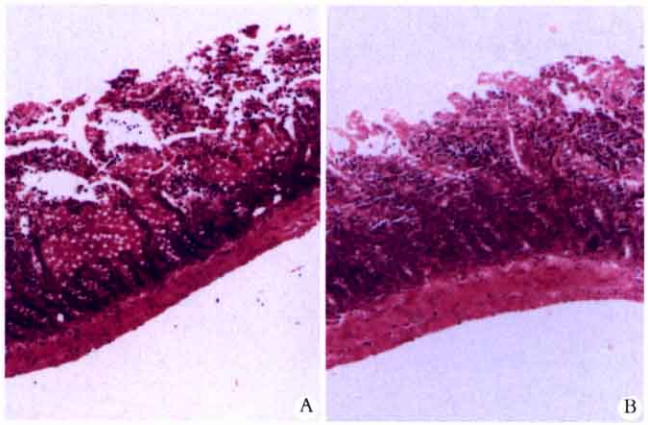
Group	Time(h)	LPS (EU/ml)	TNF-α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
CLP	2	14.21 ± 1.76	112.3 ± 15.1	84.5 ± 11.3
	6	9.32 ± 1.02	139.4 ± 16.8	179.2 ± 25.6
	12	42.35 ± 6.28	129.1 ± 13.4	209.3 ± 26.7
	24	12.91 ± 1.37	244.7 ± 32.9	137.1 ± 22.1
	48	10.31 ± 1.27	156.2 ± 15.8	89.1 ± 15.4
	72	5.12 ± 0.66	62.9 ± 11.6	66.1 ± 11.1
Artemisinin	2	2.73 ± 0.36 **	42.3 ± 9.8 **	66.8 ± 11.2
	6	11.26 ± 2.15	89.3 ± 12.8 *	79.1 ± 15.8 **
	12	28.23 ± 5.12 *	110.6 ± 14.7	140.2 ± 21.3 **
	24	14.18 ± 1.92	143.7 ± 21.3 **	112.9 ± 15.1
	48	9.73 ± 1.09	184.2 ± 23.7	98.1 ± 13.4
	72	3.61 ± 0.52	70.6 ± 12.1	71.9 ± 12.8
Control	0	0.16 ± 0.08	54.3 ± 8.9	54.1 ± 18.7

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* CLP

2.3 光镜、电镜下肠粘膜的变化

光镜下 CLP 组肠粘膜上皮细胞排列紊乱，脱落，变性坏死改变明显（图 1A）；青蒿素组肠粘膜上皮细胞排列相对整齐，变性坏死程度明显减轻（图 1B）。透射电镜下 CLP 组肠粘膜细胞微

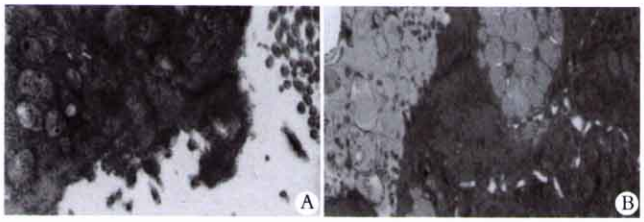
绒毛有不同程度脱失，线粒体肿胀，内质网扩张（图 2A）；青蒿素组损害明显减轻，微绒毛减少，细胞器无明显改变（图 2B）。



A：CLP；B：Artemisinin

图 1　肠粘膜病理改变（HE ×200）

Fig 1　Pathological changes of intestinal mucosa（HE ×200）



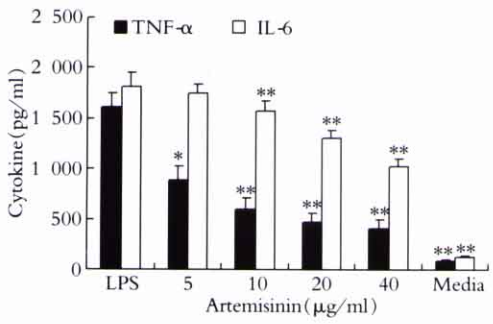
A：CLP；B：Artemisinin

图 2　肠粘膜透射电镜改变（TEM ×7 000）

Fig 2　Ultrastructural changes of intestinal mucosa（TEM ×7 000）

2.4　青蒿素对 LPS 和热灭活大肠杆菌诱导的大鼠 PMΦ 释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用

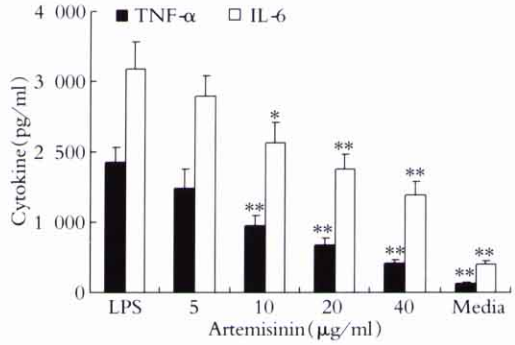
青蒿素在各实验浓度对 LPS 和热灭活大肠杆菌诱导的小鼠 PMΦ 释放 TNF-α 和 IL-6 具有显著的抑制作用，其抑制作用呈剂量-效应关系（图 3、4）。



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* LPS

图 3　青蒿素对 LPS 诱导的大鼠 PMΦ 释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Fig 3　Artemisinin inhibited TNF-α and IL-6 release from PMΦ of rats induced by LPS in a dose-dependent manner（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs E. coli*

图 4　青蒿素对热灭活大肠杆菌诱导的大鼠 PMΦ 释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

Fig 4　Artemisinin inhibited TNF-α and IL-6 release from PMΦ of rats induced by heat-killed *E. coli* in a dose-dependent manner（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

3　讨论

肠道的细菌和 LPS 移位在脓毒症发生和发展过程中起重要作用。严重的创伤应激和低血容量休克时，肠道缺血和再灌流损伤导致肠粘膜屏障功能障碍，肠内细菌和 LPS 进入机体，激活各种炎症反应细胞如单核巨噬细胞导致细胞活化、过量地产生和释放炎性介质（如 TNF-α、IL-1 和 IL-6 等），产生致死性的生物学效应[2]。LPS 及炎症介质一方面持续上调组织 LPS 受体的表达，另一方面则导致肠粘膜损伤，从而在 LPS-受体-炎症介质之间形成一正反馈环，通过瀑布效应致使炎症反应不断放大和加重，最终导致脓毒症和多器官功能衰竭甚至死亡[7]。

青蒿素是从中药青蒿中提取的有过氧基团的倍半萜内酯药物，是一种高效、速效、低毒的抗疟药。但有关青蒿素的抗疟机制目前仍不十分清楚，其作用机制可能与诱导性一氧化氮合酶的合成、促炎因子的释放及核转录因子 NF-κB 的激活等变化有关[8]。目前脓毒症仍是临床医学的棘手难题，因此，研究青蒿治疗脓毒症的机制，对脓毒症的防治可能具有十分重要的价值。

本实验结果表明，青蒿素能明显降低 CLP 大鼠死亡率，显著减少其体内主要炎症介质 TNF-α 和 IL-6 的释放，体外细胞培养也证实青蒿素明显抑制细菌和 LPS 诱导大鼠 PMΦTNF-α 和 IL-6 的释放，提示青蒿素对 CLP 大鼠的保护作用可能与其抑制炎症介质 TNF-α 和 IL-6 有关。而青蒿素是通过何种机制抑制炎症反应细胞的活化，则有待于深入的研究。有资料表明倍半萜内酯化合物能削弱转录因子 NF-κB 的作用[9]，而我们前期的研究发现青蒿素并不具有杀菌和结合、中和 LPS 的活性（数据未显示），因此我们推测，青蒿素对细菌和 LPS 活化巨噬细胞的抑制作用可能发生

于胞内阶段的某个信号转导通路上。

本研究结果还显示，青蒿素可减轻 CLP 大鼠血浆 LPS 水平和肠粘膜损伤。由于 CLP 导致腹腔严重感染，大量细菌和 LPS 直接吸收和入血，LPS 启动的瀑布效应引起机体炎症反应失控，机体防御功能受损，对血浆 LPS 清除能力下降，可导致 LPS 出现再次升高，这是个互为因果的过程，此过程也包括炎性介质对组织器官如肠道、肺等的损伤。由于青蒿素抑制了巨噬细胞释放炎性介质，减轻炎症介质对肠粘膜等组织器官的损伤；同时，该作用也阻断炎症的级联反应，切断了 LPS-受体-炎症介质之间的正反馈环，加上肠粘膜障碍功能的改善也进一步减少肠道 LPS 的吸收入血，诸多因素而使循环 LPS 的水平降低。

综上所述，青蒿素通过抑制炎症反应细胞的活化，使机体的炎症反应处于一种低水平的状态，可能使组织器官的损伤得以减轻，但其对炎症反应细胞的具体调控机制还有待于深入研究。

参考文献：

[1] Angus D C, Linde Zwirble W T, Lidicker J, *et al*. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1303 - 1310.

[2] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 885 - 891.

[3] 梁爱华，薛宝云，李春英，等. 青蒿琥酯对内毒素诱导的一氧化氮合成的抑制作用[J]. 中国中药杂志，2001，26(11)：770 - 773.

[4] Scott J A, Mehta S, Duggan M, *et al*. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(10): 1426 - 1432.

[5] Omanwar S, Rizvi M R, Kathayat R, *et al*. A rabbit model of non-cirrhotic portal hypertension by repeated injections of *E. coli* through indwelling cannulation of the gastrosplenic vein[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(3): 417 - 422.

[6] 何亚萍，尹丙姣，李卓娅，等. TNF 受体封闭肽对大鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J]. 中国免疫学杂志，2003，19(6)：385 - 387，391.

[7] Abreu M T, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research[J]. J Pediatr, 2004, 144(4): 421 - 429.

[8] Aldieri E, Atragene D, Bergandi L, *et al*. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF-kB activation[J]. FEBS Lett, 2003, 552(2-3): 141 - 144.

[9] Beekman A C, Wierenga P K, Woerdenbag H J, *et al*. Artemisinin-derived sesquiterpene lactones as potential antitumour compounds: cytotoxic action against bone marrow and tumour cells[J]. Planta Med, 1998, 64(7): 615 - 619.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1768 页）

原发性鼻腔恶性黑色素瘤初发症状不典型，临床上易误诊，其常见的症状有鼻出血，鼻塞、流涕，头痛，耳鸣，视觉模糊，嗅觉下降等。如有上述症状是提示肿瘤病灶范围已超出鼻腔。

鼻腔恶性黑色素瘤在 CT 平扫上无明确的特征，肿瘤常显示为一较大的软组织肿块，起自鼻腔侵犯至上颌窦或起自副鼻窦内，肿瘤向上蔓延可侵犯筛窦；骨破坏及粘膜浸润较常见，约 20% 的有区域淋巴结转移。增强后扫描时，恶性黑色素瘤大部分有中度至明显的强化。肿瘤在 CT 表现上均为软组织密度影且均无钙化征象。这与文献[5]报道一致。CT 在鼻部的价值主要用于诊断鼻腔鼻窦的恶性肿瘤，观察或了解病变的扩展和侵犯的范围、程度，显示邻近骨质结构受侵情况，为临床诊疗方案的确定提供客观依据。原发性鼻腔恶性黑色素瘤发生于单侧多见，侵犯到另一侧，发生于双侧者少见，本组病例中单侧者 8 例，双侧者 3 例，与文献报道基本一致。原发性鼻腔恶性黑色素瘤一般为黑褐色，表面光滑，息肉样，如在临床上行鼻腔检查见到黑色素的褐色"息肉"样变，在考虑到该病的可能[6]。

鉴别诊断原发性鼻腔恶性黑色素瘤主要与发生于鼻腔内的嗅神经母细胞瘤或外皮细胞瘤及鼻腔内的恶性淋巴瘤、鳞癌相鉴别。嗅神经母细胞瘤多位于鼻腔上部和筛窦，密度均匀，膨胀性生长的软组织肿块，可出现钙化而类似于骨化纤维瘤的表现[5]。

原发性鼻腔恶性黑色素瘤在 MRI 上具有一定的特异性。本组病例只有 1 例行 MRI 扫描，鼻腔内的肿物呈 T1W 外周呈环形的等信号，T2W 呈混杂等信号，增强后呈中度强化，由于本组病例未能全部行 MRI 扫描，不能作出该病在 MRI 上的影像特征，还有待于我们在今后的工作之中不断的去总结经验，力求探讨本病的影像特征表现。

总之，原发性鼻腔恶性黑色素瘤在 CT 影像上无明显的特征，其主要诊断的价值在于观察或了解病变的扩展和侵犯的范围、程度。显示邻近骨质结构的受侵情况，为临床治疗方案的确定提供客观依据和判断予后至关重要。当然，仅从 CT 图像上作出原发性鼻腔恶性黑色素瘤的诊断及与鼻腔内其它恶性肿瘤的鉴别诊断是非常困难的，CT 上常难以做到恶性肿瘤病理类型的诊断，对鼻腔和副鼻窦病变性质的诊断须依赖病理诊断[5]。

关键词：恶性黑色素瘤；鼻腔；CT；诊断价值

中图法分类号：R739.62　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 斯光晏，唐光才，吕惠熙. 鼻腔恶性黑色素瘤 4 例[J]. 中国临床医学影像杂志，2001，12(1)：72 - 73.

[2] 陆雪官，冯　炎，胡超苏. 八例鼻腔恶性黑色素瘤的诊断和放射治疗[J]. 中华放射肿瘤学杂志，2000，9(1)：66 - 67.

[3] Greco Crasto S, Soffietti R, Bradac G B, *et al*. Primitive cerebral melanoma: case report and review of the literature[J]. Surg Neurol, 2001, 55(3): 163 - 168.

[4] 董志伟，谷先铣. 临床肿瘤学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002. 500 - 508.

[5] 李树玲. 新编头颈肿瘤学[M]. 北京：科学技术文献出版社，2002. 60 - 61.

[6] 刘复生. 中国肿瘤病理学分类(上卷)[M]. 北京：科学技术文献出版社，2001. 379 - 380.

（编辑　尤　亮）