文章编号:1000-5404(2007)10-0951-04

论著

青蒿素对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用

曹红卫[1],郭毅斌[1],魏利召[1],王 宁[1],曲 海[1],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(artemisinin, ART)对脓毒症大鼠肺组织损伤的影响。**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,动物分为正常对照组、CLP组和青蒿素治疗(ART)组,分别于CLP术后2、6、12、24、48、72 h活杀大鼠取肺组织,匀浆后动态浊度鲎试验法检测内毒素(lipopolysaccharide, LPS)水平,ELISA法检测TNF-α和IL-6的含量,实时荧光定量反转录聚合酶链反应(real-time RT-PCR)检测肺组织TNF-α和IL-6 mRNA的表达,光镜下观察肺组织的病理改变。**结果** CLP术后,ART组大鼠肺组织匀浆LPS、TNF-α和IL-6含量较CLP组明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),TNF-α和IL-6 mRNA的表达也显著低于CLP组($P<0.05$, $P<0.01$),24 h肺组织的病理损伤明显减轻。**结论** 青蒿素可能通过降低脓毒症大鼠肺组织局部的LPS水平,抑制和减少了TNF-α和IL-6等促炎细胞因子的表达和释放,进而减轻肺组织的损伤。

关键词: 青蒿素;脓毒症;盲肠结扎穿孔;细胞因子
中图法分类号: R282.71;R563.05;R631 **文献标识码:** A

Effect of artemisinin on lung injury in septic rats

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

Abstract: Objective To observe the effect of artemisinin (ART) on lung injury in septic rats. **Methods** Wistar rats were divided into control, cecal ligation and puncture (CLP), intragastric administration of ART groups. Sepsis was induced by CLP. At 2, 6, 12, 24, 48 and 72 h after CLP, the lung homogenate was collected to examine the concentration of LPS by kinetic turbidimetric limulus test, cytokines of TNF-α and IL-6 by ELISA. Meanwhile, the total mRNA in lung tissues was extracted to detect the expression of TNF-α and IL-6 mRNA by real-time RT-PCR and the histomorphology of lung tissues was observed by light microscope. **Results** In ART group, the concentration of LPS, TNF-α and IL-6 in lung homogenate were significantly decreased than those in CLP group ($P<0.05$ or $P<0.01$) and the expressions of TNF-α and IL-6 mRNA were distinctly lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). In addition, pathological injury of lung at 24 h was detectably improved after treated with ART. **Conclusion** ART might decrease LPS concentration, inhibit the expression and the releasing of proinflammatory cytokines in lung tissues so as to alleviate the pathological lung injury in septic rats.

Key words: artemisinin; sepsis; cecal ligation and puncture; cytokine

脓毒症(sepsis)是由感染引起的全身性炎症反应综合征,美国和欧洲的流行病学调查表明,脓毒症的发病率约为住院患者的2% ~11%,其中重症脓毒症和脓毒性休克患者病死率则高达20% ~50%以上[1],目前临床上仍缺乏有效的防治措施。

青蒿素(artemisinin, ART)又名黄蒿素,临床上主要用于治疗耐药的恶性疟疾[2,3]。研究表明,ART及其衍生物对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)引起的炎症反应具有一定的抑制作用,但作用机制不清楚[4]。本研究采用大鼠盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP)建立脓毒症大鼠模型,观察ART对脓毒症大鼠急性肺组织损伤的影响,旨在为其临床应用提供实验依据。

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11篇。电话:(023)68765466,E-mail:caohw@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:郑 江,电话:(023)68754435,E-mail:zhengj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-10-17;修回日期:2007-01-25

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

青蒿素购自重庆市酉阳县武陵山制药有限公司，研磨后用0.5%的羧甲基纤维素钠配成悬浮液；鲎试剂和内毒素检查用水购于广东湛江安度斯生物有限公司；大鼠 TNF-α 和 IL-6 ELISA 试剂盒购于深圳晶美生物有限公司；SYBR RT-PCR 试剂盒购于大连宝生物工程有限公司；EDS-99 细菌内毒素测定系统由湛江正杰科学仪器有限公司提供；Light Cycler 实时荧光定量 PCR 扩增仪为瑞士 Roche 公司产品。

1.2 动物分组及给药

65 只雌性 Wistar 大鼠，体质量 220～250 g，购于本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心，合格证号：SCXK（渝）2003003。大鼠分为 3 组，其中正常对照组 5 只，CLP 组 30 只，ART 组 30 只。正常对照组不予 CLP 处理，乙醚麻醉后活杀取肺脏备用；CLP 组于术后给予 0.5% 羧甲基纤维素钠灌胃，7 ml/kg，2 次/d；ART 组于术后给予青蒿素混悬液灌胃，140 mg(7 ml/kg)，2 次/d；后 2 组动物于 CLP 术后 2、6、12、24、48、72 h 乙醚麻醉取肺组织。

1.3 CLP 大鼠的制备

手术当天清晨大鼠禁食，乙醚麻醉后取仰卧位，75% 乙醇消毒腹部，沿腹白线中段作一长 1.5 cm 的切口，剪开皮肤和肌层，探查腹腔分离盲肠；1 号丝线距盲端 1 cm 处（回盲瓣远端）结扎，16 号穿刺针在结扎处远端贯穿盲肠 3 次（呈三角形），针孔间距约 3 mm，并挤出少许内容物；盲肠回纳腹腔，逐层缝合关闭腹腔。

1.4 肺组织匀浆

取 0.1 g 的肺组织置于匀浆器，加入 1 ml 的生理盐水，匀浆器下端浸入盛有冰块的器皿中，上下转动匀浆捣杆研磨 3～5 次，将匀浆液置于离心管中，2 000 r/min 离心 20 min，取上清备用。

1.5 肺组织匀浆 LPS 水平检测

采用动态浊度法鲎试验检测肺组织匀浆的 LPS 水平，具体操作按 EDS-99 细菌内毒素测定系统说明书进行。

1.6 肺组织匀浆 TNF-α、IL-6 检测

采用 ELISA 法检测肺组织匀浆的 TNF-α 和 IL-6 水平。

1.7 肺组织 TNF-α、IL-6 mRNA 表达的检测

取肺组织 0.1 g 加入 1 ml Tripure，按照说明书操作要求提取总 RNA，分别用于 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达的检测。10 μl 的 RT 反应体系包括：5 × ExScript™ Buffer 2 μl、dNTP Mixture 0.5 μl（终浓度 0.5 mmol/L）、Oligo dT Primer 0.5 μl（终浓度 25 pmol）、ExScript™ RTase 0.25 μl（50 U）、RNase Inhibitor 0.25 μl（10 U）、Total RNA 1 μg；反应条件为 42 ℃ 15 min、95 ℃ 2 min。20 μl 的 PCR 反应体系包括：SYBR® Premix Ex *Taq*™ 10 μl、上游和下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μl、cDNA 模板 2.0 μl，dH_2O 7.2 μl。将上述反应液加入 PCR 反应用毛细管，离心后轻轻放入 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 反应，每个标本做 3 复孔，反应条件：预变性 95 ℃ 10 s；PCR 反应为 95 ℃ 5 s→55 ℃ 20 s→72 ℃ 15 s，45 循环；融解曲线分析为 95 ℃ 0 s→65 ℃ 15 s→95 ℃ 0 s，1 循环。大鼠 TNF-α、IL-6 和 β-actin 扩增引物序列如下：TNF-α 序列：上游引物 5′-GGGGCCTCCAGAACTCCA-3′，下游引物 5′-TGGGCTACGG-GCTTGTCA-3′，扩增产物长度 217 bp；IL-6 序列：上游引物 5′-TGTTCTCAGGGAGATCTTGG-3′，下游引物 5′-TCCAGGTAGA-AACGGAACTC-3′，扩增产物长度 204 bp；β-actin 序列：上游引物 5′-CTGGAGAAGAGCTATGAGCTG-3′，下游引物 5′-AATCTC-CTTCTGCATCCTGTC-3′，扩增产物长度 246 bp。以 TNF-α、IL-6 与 β-actin 的比值作为 TNF-α、IL-6 mRNA 的定量值。

1.8 肺组织学检查

肺组织标本采集后固定于 10% 的甲醛溶液，常规脱水、石蜡包埋、HE 染色、封固，光镜下观察组织病理变化。

1.9 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 ART 对 CLP 大鼠肺 LPS 含量的影响

正常对照组大鼠肺 LPS 含量极低；CLP 术后 2 h 大鼠肺组织 LPS 水平升高，12 h 达到高峰，其后逐渐下降，ART 组大鼠肺 LPS 水平高峰期推后，且升高幅度较 CLP 组小，在多个时相点，LPS 水平显著低于 CLP 组（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1）。

2.2 ART 对 CLP 大鼠肺组织 TNF-α 和 IL-6 含量影响

正常对照组大鼠肺组织中 TNF-α 和 IL-6 浓度较低，分别为（17.44 ± 6.16）pg/mg 及（44.52 ± 10.21）pg/mg，CLP 术后大鼠肺组织的 TNF-α 和 IL-6 含量逐渐升高，分别于 6 h 和 12 h 达到高峰，72 h 降至接近正常水平；ART 组 TNF-α 和 IL-6 的水平与 CLP 组相似，但峰值明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$）（表 1）。

表 1 ART 对 CLP 模型大鼠肺 LPS、TNF-α 和 IL-6 水平的影响（$n=5$）

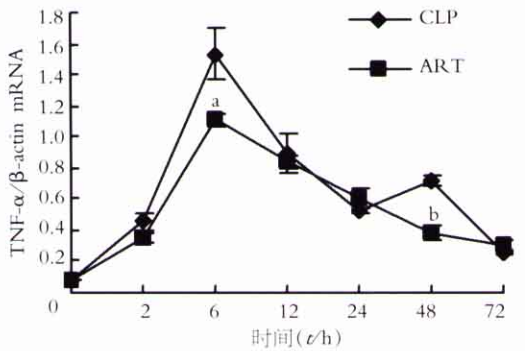
组别	时间（t/h）	LPS（EU/mg）	TNF-α（pg/mg）	IL-6（pg/mg）
正常对照组	0	0.1 ± 0.06	17.44 ± 6.16	44.52 ± 10.21
CLP 组	2	0.58 ± 0.13	49.76 ± 11.40	61.26 ± 9.04
	6	0.75 ± 0.13	63.66 ± 7.14	73.97 ± 6.28
	12	1.72 ± 0.14	49.44 ± 10.08	93.61 ± 4.81
	24	1.33 ± 0.25	42.18 ± 10.44	65.35 ± 8.10
	48	1.43 ± 0.17	38.26 ± 3.30	62.74 ± 3.82
	72	0.50 ± 0.14	32.20 ± 2.67	54.82 ± 5.06
ART 组	2	0.37 ± 0.11[a]	31.67 ± 3.34[b]	58.95 ± 8.71
	6	0.48 ± 0.08[a]	51.20 ± 7.20[a]	63.11 ± 7.35[a]
	12	0.87 ± 0.16[b]	40.90 ± 4.79	79.32 ± 7.278[b]
	24	1.12 ± 0.13	32.18 ± 3.60	56.64 ± 6.36
	48	0.79 ± 0.25[b]	28.76 ± 5.54[a]	50.80 ± 3.23[b]
	72	0.35 ± 0.12	22.90 ± 2.72[b]	49.54 ± 6.47

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CLP 组比较

2.3 ART 对 CLP 大鼠肺组织 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达的影响

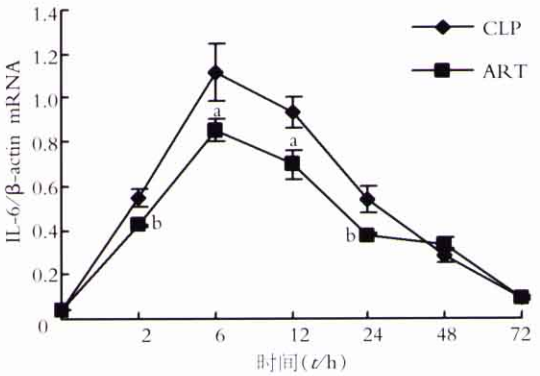
正常对照组大鼠肺组织中 TNF-α 和 IL-6 mRNA 均为低水

平表达，其与 β-actin 的比值分别为(0.082 147 ± 0.003 200)和(0.038 3 ± 0.002 5)。CLP 术后，肺组织 TNF-α 和 IL-6 mRNA 表达迅速升高，6 h 达到高峰，其后 IL-6 mRNA 表达逐渐下降，TNF-α 则于 48 h 再次轻度上升，呈双峰图形，至 72 h 二者均下降接近正常水平；ART 组 TNF-α 和 IL-6 的表达与 CLP 组相似，但峰值明显降低，ART 组的 TNF-α mRNA 水平在术后 6 h 和 48 h 显著低于 CLP 组，在 2 ~ 24 h 阶段 IL-6 mRNA 的水平显著低于 CLP 组($P<0.05$，$P<0.01$)(图 1，2)。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CLP 组比较

图 1　ART 对 CLP 模型大鼠肺 TNF-α mRNA 表达的影响　($n=3$)

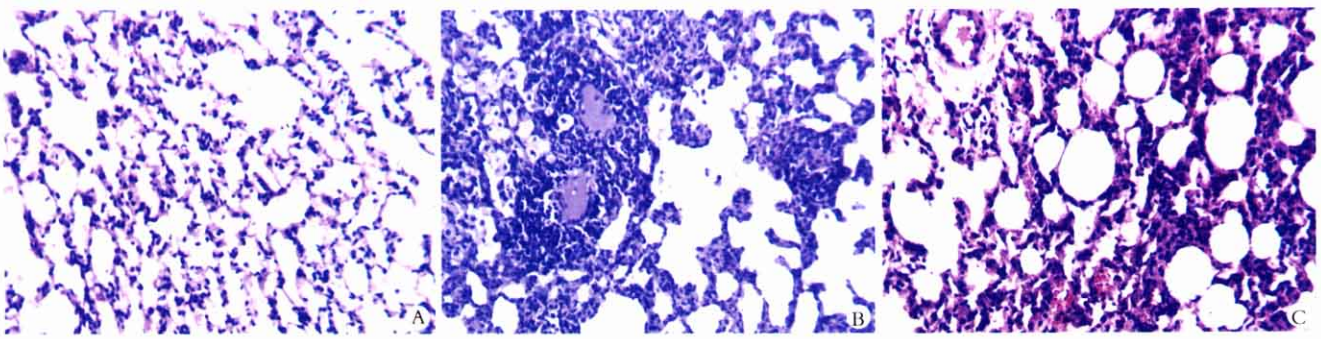


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 CLP 组比较

图 2　ART 对 CLP 模型大鼠肺 IL-6 mRNA 表达的影响　($n=3$)

2.4　ART 对 CLP 大鼠肺组织病理改变的影响

正常对照组肺泡间隔无增宽，肺泡腔内无炎症细胞及浆液渗出；CLP 组 24 h 时相点损伤最为严重，表现为不同程度的肺泡扩张，肺泡腔内浆液渗出及炎性细胞浸润，肺泡隔断裂，间隔增宽、充血，伴有大量炎性细胞浸润；ART 的治疗明显减轻 CLP 大鼠肺组织的病理损伤，术后 24 h 仅见间隔增厚伴少量炎性细胞浸润(图 3)。



A：正常对照组；B：CLP 组(24 h)；C：ART 组(24 h)

图 3　大鼠肺组织的病理学变化　(HE × 200)

3　讨论

腹腔感染是造成脓毒症及其相关病理过程如脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome，MODS)的重要原因，在脓毒症引起的 MODS 中，最常见的是呼吸系统的损害[5]。大鼠 CLP 术后，腹腔感染导致肠黏膜屏障功能损伤，大量细菌和 LPS 移位进入各个组织器官。肺脏是遭受 LPS 攻击的首要器官之一，进入肺的 LPS 一方面可直接损伤肺内皮细胞，另一方面可激活单核巨噬细胞系统，诱导多种促炎细胞因子(如 TNF-α、IL-1 和 IL-6 等)的合成与释放，造成肺组织的病理损害[6]。

中医中药治疗脓毒症在我国有悠久的历史，体外实验已观察到金银花、连翘、黄芩、青蒿等 20 余种单味中药具有抗菌作用，其中，青蒿水煎剂对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、痢疾杆菌、结核杆菌等有一定的抑菌作用[7]。ART 是从黄花蒿叶中分离到的具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物，文献[8]报道倍半萜内酯类化合物具有广泛的生物及药理学活性，主要表现在抗菌、抗炎、抗肿瘤及抗过敏反应等方面。在前期的研究中，我们发现 ART 可减轻脓毒症大鼠的肠黏膜损伤，减少血浆 LPS 水平[9]。本研究结果显示，ART 组大鼠肺组织匀浆的 LPS 水平低于 CLP 组，这可能与 ART 对脓毒症大鼠肠黏膜损伤的保护及肠源性 LPS 移位减少有关。

LPS 是引发脓毒症的主要病原分子，其导致脓毒症的机制特征为失控性的炎症反应，即造成促炎细胞因子的大量释放。其中 TNF-α 是目前已知的最早释

放的重要促炎因子，在脓毒症发展过程中可激活细胞因子级联效应，诱发IL-6及其他炎症介质的合成与释放。细胞因子主要有内分泌、旁分泌和自分泌等方式，其生物学效应需要通过到达组织局部与其效应细胞上的受体结合才能显现出来，因此检测局部组织的细胞因子水平更能准确反映组织局部的炎症反应程度。

本研究的结果表明，ART对脓毒症大鼠肺组织TNF-α和IL-6的蛋白及基因表达均具有抑制作用，并可减轻肺组织的病理学损伤，提示ART可能通过减轻肺组织局部的炎症反应改善脓毒症大鼠的肺损伤。而ART对肺组织炎症介质合成与分泌的抑制，笔者推测可能与肺组织局部LPS水平的降低有关，即ART通过胞外途径减少炎症反应细胞的活化；此外，NF-κB是LPS诱导炎症反应细胞产生细胞因子的重要环节，有报道证实，多种倍半萜内酯化合物能抑制IκB的降解和NF-κB的核转运，可选择性地烷基化NF-κB的p65亚基上的半胱氨酸的巯基，从而抑制DNA与NF-κB的结合，调节前炎症因子、细胞黏附分子及基因编码的免疫受体等的表达。因此，不能排除ART通过抑制NF-κB的活化，即胞内效应抑制肺组织的炎症反应细胞活化，该机制的明确还有待于进一步的体外实验研究。

综上所述，青蒿素可能通过降低肺组织的LPS的水平，减少局部炎症介质的合成与释放，进而减轻脓毒症大鼠肺组织的炎症性损伤。

参考文献：

[1] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, *et al*. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000[J]. N Engl J Med, 2003, 348(16): 1546-1554.

[2] Sela B. Defensins: peptides of innate immunity serving as first-line antimicrobial defense[J]. Harefuah, 2000, 139(3-4): 112-116.

[3] Warren H S, Glennon M L, Wainwright N, *et al*. Binding and neutralization of endotoxin by Limulus antilipopolysaccharide factor[J]. Infect Immun, 1992, 60(6): 2506-2513.

[4] 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.

[5] Severgnini M, Takahashi S, Rozo L M, *et al*. Activation of the STAT pathway in acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 286(6): L1282-L1292.

[6] 蒋建新，姚咏明，郑　江，等. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京：人民军医出版社，2004：198.

[7] 黄志杰，俞小平. 常用中药性味功能速查手册[M]. 武汉：湖北科学技术出版社，2002：458.

[8] Rungeler P, Castro V, Mora G, *et al*. Inhibition of transcription factor NF-kappaB by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action[J]. Bioorg Med Chem, 1999, 7(11): 2343-2352.

[9] 曹红卫，郭毅斌，王　宁，等. 青蒿素对脓毒症大鼠的保护作用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(17)：1769-1772.

（编辑　王　红）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)10-0954-01

经阴道胚胎减灭术3例

李玉艳，俞炽阳，王凤英，龙　玲　（第三军医大学西南医院妇产科生殖医学中心，重庆 400038）

随着辅助生殖技术的不断发展，促排卵药物的大量运用[1]，多胎妊娠率显著增加，引起产科并发症和新生儿并发症明显增加。我科生殖中心2006年首次出现三胎妊娠，均成功进行经阴道超声引导下胚胎减灭术（减胎术）共3例，现均已顺利生产。

病例1，35岁，因双侧输卵管不通行常规IVF-ET，移植3个胚胎，孕7周超声提示宫内三胚囊均见胎血管搏动，立即入院行黄体支持，抑制宫缩，持续3 d于2006年2月18日行经阴道多胎减胎术，缓慢置入阴道超声探头，确认胚囊、胚芽及胎血管搏动，选择离宫腔最近胚胎为拟减胚胎，选用17G单腔取卵针（澳大利亚COOK公司），沿导线准确快速进针至胎血管搏动处，轻轻旋转至心搏消失，抽出少许羊水及组织约1 ml，注入10%氯化钾注射液1 ml，等待约2 min，确认搏动消失后出针，纱布压迫穿刺点，术后维持黄体支持，24 h后超声复查见减胎胚囊明显变形，另两个胚囊正常，3 d后根据患者情况逐渐减少黄体酮用量，定期行产前检查均发育正常。2006年8月28日因孕37^{+1}周，双胎，妊娠期肝内胆汁淤积症行剖宫产术，娩出第一胎男婴2 570 g，第二胎女婴2 010 g，Apgar评分10分，手术顺利，术后随访均正常。

病例2，35岁，移植3个胚胎，孕7周发现宫内三胚囊，于2006年6月2日行减胎术，术前准备及手术处理与前例相同，手术顺利，术后定期检查发育均正常，于2006年12月20日因孕36^{+2}周，双胎，胎儿宫内窘迫，妊娠期肝内胆汁淤积症行剖宫产术，娩出第一胎女婴2 860 g，第二胎男婴3 385 g，Apgar评分10分，术中出血约800 ml，术后随访正常。

病例3，26岁，移植3个胚胎后发现宫内三胚囊，孕7周选用17G专用减胎针（澳大利亚COOK公司）减胎，术前准备及手术处理与前例相同，术中采用20G内芯行搏动区绞杀，手术顺利，术后阴道有少许血性分泌物，经止血对症处理，2 d后消

（下转958页）

作者简介：李玉艳（1972-），女，重庆市人，博士研究生，主治医师，讲师，主要从事生殖医学方面的研究。电话：(023)68765903

收稿日期：2007-01-22；修回日期：2007-03-22