DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.018
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
664 2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)06-0664-03

三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞产生NO和TNF的作用

罗中华,蔡绍丽,何保斌,陈希炜,刘 敬,周 新 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究三七皂甙对烧伤小鼠巨噬细胞(MΦ)的NO产生和TNF分泌的调理作用。方法 450只昆明种小白鼠分成对照组(18只)、单烫组(108只)和治疗组(324只)。治疗组腹腔注射三七皂甙液,并分为大剂量组(三七皂甙液100 mg/4 h)、中剂量组(50 mg/4 h)和小剂量组(25 mg/4 h)。单烫组和治疗组分6、14、26、50、74、98 h观察时相点。用Griess反应法检测MΦ的NO产生量,以生物活性法测定MΦ的TNF分泌量。结果 三七皂甙能使烫伤小鼠MΦ的NO产生量从(96.2±13.1)nmol/10^6MΦ降至(22.1±6.2)nmol/10^6MΦ、MΦ分泌TNF的量降低55%。结论 三七皂甙对降低烧伤小鼠MΦ产生NO和MΦ分泌TNF均有显著的作用。

关键词:三七皂甙;烧伤;巨噬细胞;一氧化氮;肿瘤坏死因子
中图法分类号:R644;R285.5 文献标识码:A

Effect of *Panax pseudoginseng* saponins on the modulating of nitric oxide and TNF production by macrophages in scalded mice

LUO Zhong-hua, CAI Shao-li, HE Bao-bin, CHEN Xi-wei, LIU Jin, ZHOU Xin (Burn Research Institute, Southwestern hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To explore the effects of *Panax pseudoginseng* saponins (PS) on the nitric oxide production and TNF secretion by macrophages. Methods A total of 450 mice were divided into control (18), scalded (108) and treated (324) groups. PS were given intraperitoneally with differet doses, nomely large dose 100 mg/4 h, moderate dose 50 mg/4 h and small dose 25 mg/4 h. Production of NO by HΦ was determined with Griess reaction technique and secretion of TNF by MΦ with biological activity technique at different time points. Results Compared with scalded control, PS could decrease the amount of nitric oxide from (96.2±13.1) nmol/10^6MΦ to (22.1±6.2) nmol/10^6MΦ, and TNF to 55% of the control. Conclusion *Panax pseudoginseng* saponins might play important role in modulating the amount of nitric oxide and TNF produced by macrophage.

Key words traditional Chinese medicine; burn; macrophages; nitric oxide; tumor necrosis factor

严重烧伤后并发全身性感染和多器官功能衰竭的主要原因之一,是伤后机体免疫防御系统功能紊乱、巨噬细胞(MΦ)活化。活化的MΦ可产生、分泌大量的一氧化氮(Nitric Oxide,NO)。大量的NO可影响机体特异性和非特异性免疫功能反应,如促进TNF过度升高、反馈抑制抗原提呈功能等。为探讨中药对MΦ活化的调理作用。我们在过去研究的基础上[1],观察了三七皂甙(Saponins of *Panax pseudoginseng*)对烫伤小鼠MΦ产生、分泌NO和TNF的影响。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型

取体重21~23 g的昆明种小白鼠,于背部去毛后,用1.035×10^5 Pa压力的蒸汽进行烫伤,烫伤时间为10 s,烫伤面积16%,深度经病理切片证实为Ⅲ度。烫伤后立即于腹腔补给生理盐水2.0 ml抗休克,并分笼饲养。

1.2 药物

三七皂甙购于云南植物药厂。批号:980528

基金项目:军队"九五"指令性课题(96L042-5)
作者简介:罗中华(1958—),男,四川省兴文县人,副主任技师,主要从事烧伤免疫方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68754148-8009
收稿日期:2000-12-04;修回日期:2001-03-24

1.3 实验分组及给药方法

1.3.1 实验分组

1.3.1.1 正常对照组 小鼠总数为18只。小鼠不烫伤,以生理盐水代替药物于腹腔注射。

1.3.1.2 单烫组 小鼠总数为108只,分6个时相点进行实验,各时相点小鼠数为18只。小鼠烫伤后以生理盐水代替药液于腹腔注射,并根据时相点的不同分别在6、14、26、50、74、98 h活杀小鼠。

1.3.1.3 治疗组 小鼠总数为324只,根据用药剂量的不同将其分为大剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)、中剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)和小剂量组(小鼠数为108只,各时相点为18只)。并按照不同时相点分别在伤后6、14、26、50、74、98 h活杀小鼠(为使药物充分吸收,故在用药后2 h活杀小鼠)取样本进行实验。

1.3.2 给药方法

在小鼠烫伤后补给生理盐水抗休克的同时,开始于腹腔注射三七皂甙液,大剂量组每只小鼠注射100 mg,中剂量组每只注射50 mg,小剂量组每只注射25 mg,每间隔4 h注射1次。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 MΦ的分离、纯化及培养

按照不同时相点活杀小鼠,以冷的RPMI1640液冲洗腹腔,取腹腔细胞分离,纯化MΦ后悬浮于含10%小牛血清的RPMI1640液中待用。

取终浓度1.5×10^6/ml上述分离的MΦ 1.0 ml加入24孔细胞培养板,一式三孔。置37 ℃ 5%CO_2下孵2 h,去上清,以去

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

除非粘附细胞, 使MΦ纯度在95%以上。每孔加入1.0 ml含10%灭活小牛血清、16 mmol/L HEPES、2.0 mmol/L谷氨酰胺、10 μg/ml LPS、1.14 mmol/L L-精氨酸等的RPMI1640液。再置37 ℃ 5%CO_2下孵24 h。取上清以备NO及TNF浓度的测定。

1.4.2　NO浓度的测定[1,2]　取上述细胞培养上清100 μl加于96孔细胞培养板中, 一式三孔。并以RPMI 1640液作空白对照。每孔加入新鲜配制的Griess液(将对氨基苯磺酰胺溶于10%的磷酸中, 配成20 g/L的浓度。用双蒸水将N-萘乙二胺盐酸配成2 g/L的浓度。将所配液体避光存于4 ℃冰箱内。每次临用前将二者按体积比1∶1配成Griess液)100 μl。轻轻混匀, 避光室温置10 min后, 用酶标测定仪检测每孔550 nm处的吸光度(A_{550})。以三孔均数作为样本A_{550}。用双比稀释法, 稀释$NaNO_2$标准液为100、50、25、12.5、6.25、3.125 μmol/L。同样用Griess液测定其A_{550}。以$NaNO_2$浓度为横轴, A_{550}为纵轴, 绘制标准曲线, 并计算出标准曲线的回归方程。通过回归方程得出各样本细胞培养上清中的NO浓度, 并以此表示MΦ产生NO的量。

1.4.3　TNF测定　参照文献[4~5]方法略加改进。

1.4.3.1　将培养增殖良好的L929细胞用RPMI 1640细胞培养液调细胞浓度为1×10^6/ml, 分别加入96孔细胞培养板中, 100 μl/孔, 一式三复孔。于37 ℃ 5%CO_2孵箱中孵24 h, 去上清, 加入上述细胞培养上清(以含放线菌素D 2 μg/ml的RPMI1640液按1∶200稀释)100 μl。置37 ℃ 5%CO_2孵箱中孵24 h。并以含放线菌素D 2 μg/ml的RPMI 1640液作为空白对照。

1.4.3.2　弃去细胞培养上清, 于每孔加入10 mmol/L的活细胞染色素结晶紫染色10 min。用生理盐水洗3次后, 每孔加入1.0 ml细胞溶解液(0.1 mol/L NaH_2PO_4与无水乙醇1∶1等量混合), 轻轻混匀, 室温放10 min。于酶标检测仪测定595 nm处的吸光度(A_{595}), 按下式计算样本的细胞杀伤率, 并以此值表示样本的TNF浓度。

细胞杀伤率=1−样本A_{595}/对照A_{595}

1.5　统计学处理

所有数据均经华西医科大学的医用统计程序进行处理, 结果用$\bar{x}\pm s$表示, 并以q检验(Newman-Keuls法)作差异显著性分析。

2　结果

2.1　三七皂甙对烫伤小鼠MΦ产生NO的影响

正常小鼠的MΦ产生NO量为(11.80±2.66) nmol/10^6 MΦ。单烫组小鼠MΦ产生NO在6 h就显著高于正常对照组小鼠, 至14 h和26 h逐步升高, 至50 h又有所回落, 至74 h又反弹上升更高, 到本实验结束时为最高。经用三七皂甙大剂量治疗组, 从实验数据上看有所降低, 但无统计学意义($P>0.05$)。用中剂量和小剂量药物组, 用药6次到26 h, 对伤鼠MΦ产生NO具有显著的降低作用($P<0.05$)。并且, 随时间延长用药次数的增加, 其疗效更佳。结果见表1。

表1　三七皂甙对烫伤小鼠MΦ产生NO的影响(nmol/10^6MΦ)和分泌TNF的调理作用(杀伤率%)($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of *Panax pseudoginseng* Saponins on NO production (nmol/10^6 MΦ) and TNF secretion (kill rate %) of macrophages in scalded mice ($\bar{x}\pm s$)

Time (h)	n	Control		Scalded group		Large dose group		Moderate dose group		Small dose group	
		NO	TNF	NO	TNF	NO	TNF	NO	TNF	NO	TNF
6	18	11.8±2.7	0.138±0.031	58.6±18.5	0.313±0.091	56.2±6.9	0.301±0.081	58.2±10.2	0.311±0.100	57.2±9.9	0.308±0.112
14	18	11.8±2.7	0.138±0.031	80.0±16.8	0.561±0.125	66.3±9.2	0.552±0.111	62.3±11.8	0.503±0.131	65.0±8.5	0.523±0.130
26	18	11.8±2.7	0.138±0.031	86.5± 8.2	0.506±0.103	78.2±15.4	0.500±0.112	33.6± 6.5*	0.510±0.123	31.3±7.6*	0.530±0.151
50	18	11.8±2.7	0.138±0.031	55.3±6.3	0.653±0.138	51.5±6.1	0.631±0.128	28.6±5.3*	0.328±0.101*	26.2±6.3*	0.500±0.126
74	18	11.8±2.7	0.138±0.031	89.6±10.3	0.665±0.150	81.6±16.0	0.610±0.135	23.6± 5.3*	0.281±0.081*	22.4±5.8*	0.330±0.091*
98	18	11.8±2.7	0.138±0.031	96.2±13.1	0.668±0.151	88.3±11.0	0.608±0.129	22.1±6.2*	0.262±0.062*	22.3±6.0*	0.283±0.081*

*: $P<0.05$ *vs* scalded group

2.2　三七皂甙对烫伤小鼠MΦ分泌TNF的调理作用

小鼠烫伤后MΦ分泌TNF在各时相点检测, 均有显著的升高, 并且是逐步升高, 到本实验结束时为本实验最高, 经大剂量三七皂甙治疗的组从数据上看各时相点与单烫组比较有所降低, 但经统计学处理差异不显著。经用中剂量三七皂甙治疗到50 h后与单烫组比较有显著的降低作用, 并且, 随用药时间的延长, 作用更好。而小剂量组用药到74 h和98 h对MΦ TNF的分泌也有显著的降低作用, 其它时相点未见显著的影响。

3　讨论

烧伤后患者出现感染和多脏器功能障碍, 乃至死亡的主要原因之一是伤后巨噬细胞(MΦ)功能异常[6]。异常的MΦ过度产生分泌多种生物活性介质, 如NO、TNF、IL-1、IL-12、PGE_2等, 这些过量的活性介质加重了伤后机体免疫防御系统的紊乱; 如伤后MΦ过度产生分泌的NO, 不但直接参与了机体的特异性和非特异性免疫反应, 并且还通过与白介素、TNF、PGE_2等免疫介质相互作用而更广泛的影响着机体的免疫系统功能, 导致患者免疫功能严重受损[7~9]。目前对受损紊乱的MΦ功能的临床治疗, 国内外均未有一种切实有效的措施, 若能找到一种能调理伤后紊乱的MΦ功能的药物, 这对防治伤后感染和多脏器功能衰竭等并发症的发生、发展, 以及降低烧伤患者死亡率均有重要意义。中医中药是我国的医学宝藏, 有许多具有调理机体紊乱的MΦ功能的药物, 有待用现代科学理论和方法去发掘、去研究。为寻找能调理紊乱的MΦ功能的有效中草药, 我们在过去实验基础上观察了中药三七皂甙对烫伤小鼠MΦ产生NO和分泌TNF的调理作用。结果显示, 小鼠烧伤后MΦ的NO产生在6 h就显著高于正常小鼠($P<0.05$), 到伤后16和26 h逐步升高, 至50 h有所回落, 此后继续升高, 到本实验结束时为最

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

高。经用中药大剂量(100 mg)治疗的组,各时相点均未见有显著的调理作用($P>0.05$)。用中剂量(50 mg)和小剂量(25 mg)的治疗组,用药到50 h后对烫伤小鼠MΦ的NO产生有显著的降低和调理作用,并且,随用药时间延长和用药次数增加,其作用更显著。但是,到本实验结束也无法将烫伤小鼠MΦ的NO产生恢复到正常的水平。烫伤小鼠MΦ分泌TNF,在伤后6 h显著高于正常小鼠,并且,随致伤时间的延长,逐渐升高。用100 mg三七皂甙治疗的组,对烫伤小鼠MΦ过度产生分泌而升高的TNF未见显著的降低作用。应用50 mg三七皂甙的治疗的组,用药到50 h后,对过度升高的TNF有显著的降低作用。25 mg的药物治疗组,用药到74 h对过度升高的TNF也有显著的降低作用。50 mg和25 mg的三七皂甙治疗组用药到本实验结束,虽然,未能使过度升高的TNF恢复到正常小鼠水平,但也可使之降低3倍左右。通过实验,我们认为中药三七皂甙对烧伤小鼠紊乱的MΦ功能具有较好的治疗疗效。该研究国内外目前未见相同报道,故本研究对中药应用于烧伤临床调理受损的MΦ功能提供了理论依据。

参考文献:

[1] 罗中华,黄文华,蔡绍丽,等.三七等四种中药对烫伤小鼠巨噬细胞功能的作用[J].中华医学杂志,1994,74(10):634-635.
[2] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway[J]. N Engl J Med, 1993, 329(12): 2 002-2 012.
[3] Koshland D E Jr. The molecule of the year[J]. Science, 1992, 258(10): 1 861-1 863.
[4] Marano M A. Serum cachectin tumor necrosis factor in critically ill patients with burns correlates with infecton and mortality[J]. Surg Gynec Obst, 1990, 170(1): 32-36.
[5] Flick D A, Gifford G E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor[J]. J Immunol Methods, 1984, 69(1): 167-171.
[6] O' Riordain M G, Collins K H, Pilz M, *et al*. Modulation of macrophage hyperactivity improves survival in a burn-sepsis model[J]. Arch Surg, 1992, 127(1): 125-157.
[7] Nussler A K, Billiar T R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase[J]. J Leukoc Biol, 1993, 54(1): 171-174.
[8] Xie Q W, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function[J]. Annu Immunol Rev, 1997, 15(1): 323-350.
[9] Marcinkiewicz J, Grabowsha A, Chain B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(4): 947-951.

(编辑 郭建秀)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2001)06-0666-01

老年糖尿病截瘫患者巨大褥疮的护理体会

Nursing for an aged paraplegic diabetic patients with extensive bedsore

尹芝华 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

我科1999年收治1例老年糖尿病截瘫伴臀部巨大褥疮患者,经全臀大肌肌皮瓣转位手术及术后精心护理,褥疮28 d痊愈。现将护理体会介绍如下。

1 病例介绍

患者,女,78岁。车祸伤致腰1、2骨折伴截瘫37 d入院。查体:神志清楚,体质较差,心肺无异常,腹股沟平面以下感觉及运动完全丧失,肌力0级。血压21.5/12.2 kPa,脉搏94次/min,血糖18.7 mmol/L、尿糖(++~+++)。骶尾部有一面积12 cm×18 cm大小Ⅳ度褥疮,骶骨部分坏死变黑,创面大量脓性分泌物。院外褥疮形成后曾给予抗感染和换药等治疗及护理,效果不佳,创面逐渐扩大。

2 治疗方法

入院后即给予全身支持及大剂量抗生素抗感染,同时胰岛素有效控制血糖,褥疮创面每日换药2~3次,并逐渐清除坏死组织,应用有效抗菌素局部湿敷。创面逐渐分泌物减少、肉芽形成,但创面大小无明显缩小。1周后行清创、右侧全臀大肌肌皮瓣转位完全修复褥疮创面。术后16 d痊愈拆线,皮瓣血运良好。术后随访3~6个月,皮瓣外形、质地均佳。

3 护理体会

饮食护理:1930年Cuthberson提出机体受到损伤后蛋白分解和氮丢失量增加,蛋白质储备减少[1]。同时,创伤后机体内分泌及代谢改变,机体处于高度消耗状态[2]。营养不足可延迟创面愈合,降低免疫力等。糖尿病饮食是治疗糖尿病的基本治疗方法,如不重视控制饮食,药物疗效不能巩固,既而出现饮食上一些矛盾。我们根据病人的病情(褥疮的消耗量)、生理需要及生活习惯制定相应的饮食方案,并根据身高、体征、性别算出摄入能量的标准,制定结构比例合理的膳食表。每餐称量,少食多餐,保证蛋白质、糖、脂肪、维生素及微量元素的合理供给。定时测量血糖,使其既控制了糖尿病,又有效补充了机体营养,为创面愈合提供了保障。血糖控制在5.6~11.2 mmol/L、尿糖

(下转669页)

作者简介:尹芝华(1970-),女,湖南省邵东县人,护师,主要从事骨科护理方面的研究。电话:(023)65318301-73076
收稿日期:2001-03-15;修回日期:2001-05-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net