

HPA 轴抑制大鼠感染性休克模型的建立及四逆汤对该模型的作用*

代 蓉, 董柳慧, 石安华, 淤泽溥[△]

(云南中医学院基础医学院, 云南昆明 650500)

[摘 要] 目的: 复制 HPA 轴抑制大鼠感染性休克模型, 探讨四逆汤对该模型的影响。方法: 观察四逆汤对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型的影响, 测定血清 CORT、ACTH 含量、肾上腺指数。取大鼠肾上腺做组织学病理检查, 在 HPA 轴抑制模型基础上用 LPS (4mg/kg) 造成感染性休克模型, 观察四逆汤的作用, 记录休克前后血压变化。结果: 每天 1 次, 连续 14d, 皮下注射 10mg/kg 皮质酮, 血清 CORT 含量低于正常组 ($P < 0.05$); 与模型组比, 四逆汤高、低剂量组大鼠血清 CORT 含量升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 四逆汤高剂量组血清 ACTH 含量升高 ($P < 0.05$), 肾上腺重量增加 ($P < 0.05$), 四逆汤高、低剂量组均能改善 HPA 轴抑制大鼠肾上腺被膜皱缩, 球状带细胞、束状带细胞体积缩小、数目减少, 胞质内脂滴空泡增多的状况; 与模型组相比, 阳性组 (5mg/kgDEX)、四逆汤预防给药、治疗给药组, 能抑制 LPS (4mg/kg) 致感染性休克大鼠的血压下降 ($P < 0.01$)。结论: 四逆汤能改善 HPA 轴抑制状态, 能减轻长期外源性 GC 造成肾上腺萎缩程度; 改善 HPA 轴抑制感染性休克模型大鼠血压的下降。

[关键词] 四逆汤; HPA 轴抑制; 感染性休克; 动物模型

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)06—0001—06

近年来, 虽然抗感染治疗和器官功能支持技术取得了长足的进步, 但严重感染的病死率仍高达 30% ~ 50%^[1-2]。临床流行病学资料显示, 感染性休克是危重患者的主要死亡原因之一, 现已成为进一步提高危重症救治成功率的最大障碍^[3]。针对严重感染和感染性休克的发生率和病死率均居高不下, 提高对该症的认识、探索有效的治疗方法和药物, 无疑具有重要的理论价值及临床意义。

四逆汤是《伤寒论》中回阳救逆的著名方剂, 厥阴病之表热里寒、下利、大汗、手足厥冷等, 均可使用四逆汤治疗^[4-5]。多项临床及药理研究亦表明, 四逆汤对多种休克具有一定的治疗作用, 但以往开展的与其作用机制相关的药理研究主要集中于强心和改善微循环等方面展开, 尚不能很好解释其回阳救逆功效的科学内涵。

近年来的研究认为 HPA 轴作为脓毒症时神经内分泌系统重要的调控途径, 休克时 HPA 轴的负反馈调节机制受损, 可导致内分泌系统功能紊乱,

表现为相对性肾上腺皮质功能不全 (RAI), 调节肾上腺皮质的功能状态可能是感染性休克治疗的新途径。本研究从复制 HPA 轴抑制动物模型入手, 在 HPA 轴抑制动物模型复制成功的基础上, 再注射内毒素, 进一步复制成 HPA 轴抑制大鼠感染性休克模型。探讨四逆汤对该模型 HPA 轴的影响, 现将结果报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物

SD 大鼠, 清洁级, 体质量 (250 ± 20) g, 雄性。购自四川省医学科学院实验动物研究所, 动物合格证号: SCXK (川) 2009-16。实验前动物先适应性饲养 1 周, 给予标准普通饲料和充分的饮用水, 均为自由进食、自由饮水。饲养于云南中医学院实验动物室。

1.2 药品和试剂

四逆汤所用药材炙甘草、干姜购于昆明市中医院, 附子购于四川江油中坝附子科技发展有限公司。

* 基金项目: 云南省自然科学基金资助项目 (NO: 2008CC151)

收稿日期: 2012—10—28 修回日期: 2012—11—07

作者简介: 代蓉 (1976 ~), 女, 云南丽江人, 高级实验师, 主要从事药理学和中药药理学的实验教学工作。△通信作者: 淤泽溥, E-mail: yuzepu@126.com

司,地塞米松 (DEX),天津金耀氨基酸有限公司,批号:0901132;皮质酮,购于 INTERNATIONAL LABORATORY USA 公司;批号 349610;脂多糖 0111:B4,购于 sigma 公司,批号:029K4022。

ACTH 试剂盒,购于北京普尔伟业生物科技有限公司,批号:20100225;CORT 试剂盒,购于南京建成生物工程研究所,批号:EPE0576R。

1.3 实验用药的制备

采用《伤寒论》中四逆汤原始组方,按汉代剂量单位换算,四逆汤方为:炙甘草 31.2g,干姜 23.4g,附子 15g。实验用方药的制备按文献 [6-9] 所记载方法进行,药液浓缩成稠浸膏分装置于冰箱冷冻保存备用。

1.4 主要仪器

酶标仪: Molecular Device Corporation 型号为 340PC;放免仪:自动放免仪,中国科大中佳公司;RM6280 型多道生理信号采集处理系统:成都仪器厂。

2 方法和结果

2.1 四逆汤对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠的影响

参考文献 [10-11] 方法,雄性清洁级 SD 大鼠 80 只,体质量 200~250g,随机分为正常组、模型组、四逆汤高、低剂量组,每组 20 只。(1) 正常组:每天 1 次皮下注射等体积橄榄油,连续 14d;(2) 四逆汤高、低剂量组:低剂量为人用量的等效剂量,即 6.25g/kg;高剂量为人用量的 6 倍量,即 37.5g/kg。每天 1 次灌胃四逆汤,直至实验结束。第 4 天开始,在每天灌胃给药的同时,同模型组方法造模;(3) 模型组:按 10mg/kg 体质量皮下注射皮质酮 (Corticosterone, CORT),每天 1 次,连续 14d。各组动物自由摄食饮水。实验第 18 天,各组大鼠水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,37℃ 水浴放置 1h,3 000 转离心 15min,取上清液,-40℃ 保存待测。造模后,隔天记录各组大鼠体质量;参照文献方法 [10-11] 酶联免疫法测定各组大鼠血清 CORT 含量、放射免疫法测定大鼠血清促肾上腺皮质激素 (AdrenoCorticoTropic Hormone, ACTH) 含量;取各组大鼠肾上腺,计算肾上腺指数 (肾上腺指数 = 左右肾上腺质量之和 mg/大鼠体质量 g);取各组大鼠肾上腺,做病理组织学观察。实验结果见表 1、表 2:

表 1 四逆汤对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠 CORT、ACTH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量 /g · kg	CORT 含量 / (ng/mL)	ACTH 含量 / (pg/mL)
正常组		100.54 ± 3.80	33.00 ± 13.38
模型组		95.53 ± 4.18*	20.27 ± 8.55*
四逆汤 高剂量组	37.5	99.73 ± 3.61 [△]	38.25 ± 18.27 ^{△△}
四逆汤 低剂量组	6.25	103.32 ± 5.56 ^{△△}	22.49 ± 9.97

注:与正常组比,* $P < 0.05$,与模型组比[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

由表 1 可知,模型组 CORT、ACTH 含量比正常组降低 ($P < 0.05$),表明 HPA 轴抑制,CORT、ACTH 分泌减少;与模型组相比,四逆汤高剂量组大鼠血清 CORT、ACTH 含量升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),四逆汤低剂量组大鼠血清 CORT 含量也显著升高 ($P < 0.01$),提示四逆汤能够对抗 HPA 轴抑制状态。

表 2 四逆汤对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠肾上腺指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量 /g · kg	肾上腺指数
正常组		0.116 ± 0.0260
模型组		0.083 ± 0.0170*
四逆汤高剂量组	37.5	0.110 ± 0.0480 [△]
四逆汤低剂量组	6.25	0.0892 ± 0.0195

注:与正常组比,* $P < 0.05$,与模型组比[△] $P < 0.05$

由表 2 可见,模型组与正常组肾上腺指数比较,肾上腺指数明显减轻 ($P < 0.01$),提示长时间外源性给予皮质酮,能使肾上腺萎缩;四逆汤高剂量组与模型组肾上腺指数比较,肾上腺指数增加 ($P < 0.05$),提示四逆汤高剂量能减轻皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠肾上腺萎缩。

2.2 四逆汤对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠感染性休克模型的影响

参考文献 [10, 12-13],清洁级雄性 SD 大鼠 70 只,体质量 250~270g。随机分为 7 组:即正常组、模型组、阳性组、四逆汤预防给药高、低剂量组、四逆汤治疗给药高、低剂量组,每组 10 只。

(1) 正常组: 每天 1 次皮下注射等体积橄榄油, 连续 14d; (2) 四逆汤预防给药高、低剂量组: 高低剂量的设置同前, 每天 1 次灌胃四逆汤, 直至实验结束。第 4 天开始, 在每天灌胃给药的同时, 同模型组方法造模; (3) 模型组、阳性组、四逆汤治疗给药高、低剂量组: 按 10mg/kg 体质量皮下注射皮质酮, 每天 1 次, 连续 14d。各组动物自由摄食饮水。实验第 18 天, 四逆汤预防给药高、低剂量组动物灌胃四逆汤 1 次, 2h 后各组大鼠水合氯醛麻醉, 动物仰位固定在手术台上, 分离左侧颈总动脉, 取一内充 0.3% 肝素生理盐水的聚乙烯导

管, 插入左颈总动脉, 此动脉导管与压力换能器相连。用 RM6280C 型多道生理记录仪记录动脉血压。稳定半小时, 记录基础血压, 各组动物腹腔注射 LPS (4mg/kg)。注射 LPS 后, 阳性组腹腔注射 DEX (5mg/kg) 1 次, 四逆汤治疗组灌胃四逆汤 1 次 (1mL/100g)。记录注射 LPS 后 3h 血压。参考文献 [12-13] 标准, 若平均动脉压下降幅度超过基础血压值的 20%, 且持续 20min 以上, 可认为实验性感染性休克模型成功建立。记录注射 LPS 前基础血压, 及注射 LPS 后 3h 血压值。结果见表 3。

表 3 四逆汤对 HPA 轴抑制感染性休克模型大鼠平均动脉压的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	给 LPS 前血压 /mmHg A	给 LPS 后血压 /mmHg B	血压下降率/% (A - B) / A * 100
正常组		92.10 ± 17.53	67.65 ± 15.22	26.87 ± 4.88
模型组		87.85 ± 35.52	60.28 ± 28.33	34.79 ± 11.69 ^{**}
DEX 组	5mg/kg	93.10 ± 16.79	71.15 ± 11.34	22.99 ± 9.60 ^{△△}
预防高剂量组	37.5g/kg	100.01 ± 40.60	83.40 ± 30.06	14.91 ± 5.05 ^{△△}
预防低剂量组	6.25g/kg	76.50 ± 18.36 [#]	60.70 ± 16.12	20.90 ± 5.74 ^{△△}
治疗高剂量组	37.5g/kg	105.23 ± 32.23	92.54 ± 26.80	11.71 ± 1.31 ^{△△}
治疗低剂量组	6.25g/kg	101.53 ± 19.27	86.02 ± 8.80	14.08 ± 6.89 ^{△△}

注: 与正常组比^{**} $P < 0.01$; 与模型组比^{△△} $P < 0.01$; 与治疗高剂量比[#] $P < 0.05$

由表 3 可知, 模型组动物注射 LPS 后, 平均动脉压下降率超过 20%, 且下降率高于正常组 ($P < 0.01$), 可认为感染性休克模型复制成功。四逆汤预防组及治疗组平均动脉压下降率均低于模型组 ($P < 0.01$), 提示四逆汤对感染性休克大鼠有一定的保护作用。

2.3 病理组织学检查

2.3.1 组织蜡块制备及 HE 染色

前一实验中留取的肾上腺标本取材后置于 10% 甲醛溶液中固定 24h 后取出, 水冲洗 30min, 梯度酒精脱水, 浸蜡 3h, 即制成蜡块。切成 4μm 厚的切片烤干备用。将烤干备用的切片置于 60℃ 烤箱烤热后于 100% 二甲苯中脱蜡 25min; 梯度酒精和蒸馏水水化后苏木精染色 5 ~ 15min, 温水冲洗 5min 蓝化, 盐酸酒精分化, 伊红复染 5 ~ 20s; 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

2.3.2 结果

各组大鼠肾上腺病理切片观察, 见图 1 ~ 图 8。

2.4 统计学处理

以上实验结果, 计量资料数据以均数 ($\bar{x}$) ± 标准差 (s) 表示, 数据符合正态分布、方差齐的数据进行方差分析; 计量资料不符合正态分布, 则用秩和检验; 计数资料数据进行 χ^2 检验, 或者用 Fisher 精确概率法; 等级资料用秩和检验。

3 讨论

近年来对中药四性的基础研究表明, 温热药有增强 HPA 轴的作用。沈自尹院士在对肾本质的研究中证实: 肾阳虚的病理改变主要在下丘脑, 温补肾阳的药物可直接作用于下丘脑, 提高促 CRH 的表达水平, 调节下丘脑 - 垂体 - 肾上腺 - 胸腺轴的受抑状态。基于四逆汤所主治病症与感染性休克之间的相似之处及其在临床上所表现出的抗休克作用, 温热药对 HPA 轴受抑制模型大鼠的肾上腺皮质轴的异常变化具有良好的纠正作用和我们前期实验结果, 我们认为: 四逆汤主要通过改善于感染性休克时受抑制的 HPA 轴功能而发挥抗休克作用。

本研究通过复制了 HPA 轴抑制动物模型和 HPA 轴抑制大鼠感染性休克模型，考察四逆汤对该模型 HPA 轴的影响。

正常情况下，CORT 分泌的增加是 ACTH 刺激的结果，在皮质酮所致 HPA 轴抑制的状态下，血中较高水平的皮质酮可对 ACTH 的分泌产生负反馈抑制，导致 ACTH 分泌减少，模型组 CORT、ACTH 含量比正常组降低 ($P < 0.05$)，CORT、ACTH 分泌减少，说明大鼠 HPA 轴抑制，皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型复制成功。给予高低剂量的四逆汤后，能够对抗 HPA 轴的抑制状态，高剂量组大鼠血清 CORT、ACTH 含量均升高，低剂量组大鼠血清 CORT 含量也显著升高，ACTH 虽也有所升高，但差异无统计学意义。四逆汤改善 HPA 轴抑制状态的机理还有待进一步研究。

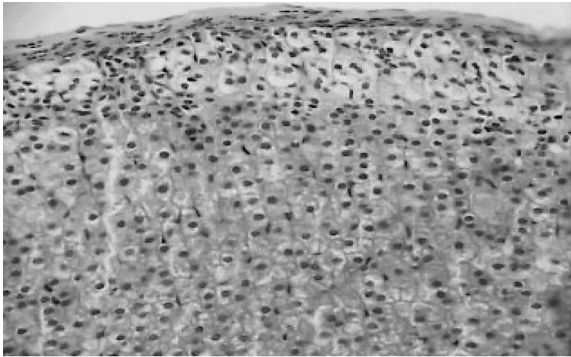


图 1 正常组肾上腺

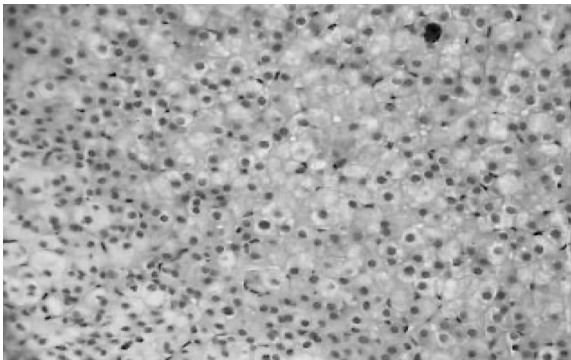


图 2 正常组肾上腺

图 1、图 2 正常组肾上腺，HE 染色， 10×40 ，被膜由薄层结缔组织构成，无皱缩。球状带细胞较小，锥形，细胞聚集成球团状。束状带细胞较大，多边形，胞质内含脂滴空泡。

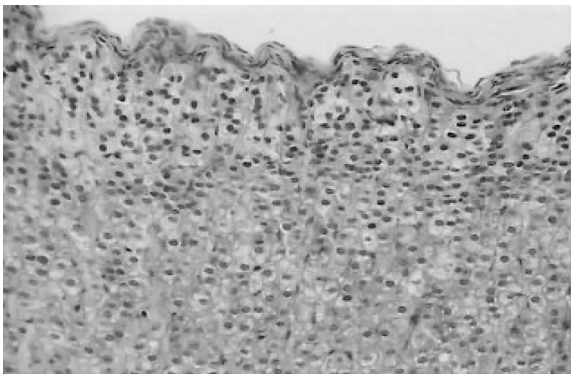


图 3 皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型组肾上腺

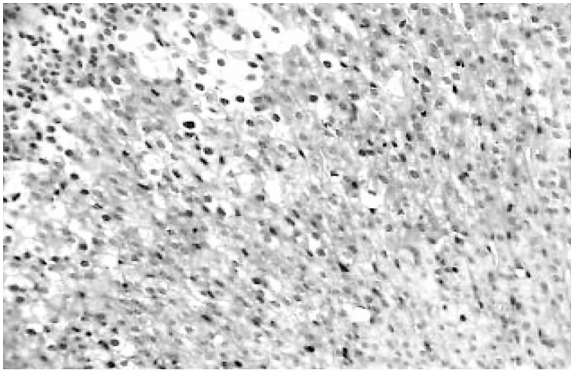


图 4 皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型组肾上腺

图 3、图 4 皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型组肾上腺，HE 染色， 10×40 ，被膜皱缩，球状带细胞、束状带细胞体积缩小、数目减少，胞质内脂滴空泡增多。

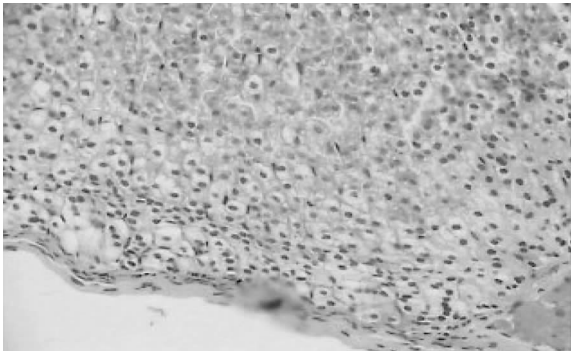


图 5 高剂量组肾上腺

图 5、图 6 四逆汤预防给药高剂量组对皮质酮致 HPA 轴抑制大鼠模型肾上腺的影响，HE 染色， 10×40 ，被膜皱缩、球状带细胞、束状带细胞体积缩小、数目减少、胞质内脂滴空泡增多的现象较模型组减轻。

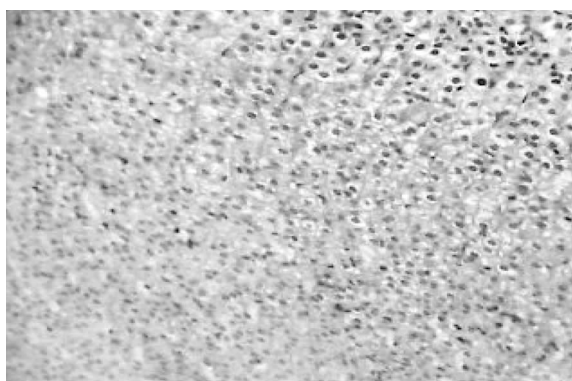


图6 高剂量组肾上腺

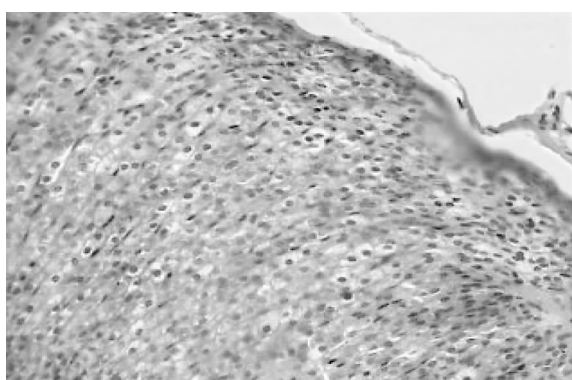


图7 低剂量组肾上腺



图8 低剂量组肾上腺

图7、图8四逆汤预防给药低剂量组对皮质酮致HPA轴抑制大鼠模型肾上腺的影响,HE染色,10×40,被膜皱缩、球状带细胞、束状带细胞体积缩小、数目减少、胞质内脂滴空泡增多的现象较模型组减轻。

实验中模型组肾上腺指数在皮质酮造模之后降低,提示长时间给予外源性糖皮质激素使肾上腺萎缩;文献报道^[10]皮质酮应用能诱导大鼠肾上腺皮质束状带细胞的大量调亡,减少球状带细胞的增殖

和迁移,束状带和网状带细胞体积变小,皮质酮造成肾上腺皮质萎缩可能与上述因素均有关系。四逆汤高剂量组与正常组肾上腺指数比较,减少不明显,并明显高于模型组,提示四逆汤高剂量能减轻皮质酮致HPA轴抑制大鼠肾上腺萎缩。四逆汤低剂量组肾上腺指数也高于模型组,虽然统计学上差异无显著性意义,但表现出减轻肾上腺萎缩的趋势。组织病理学结果(图1~图8)也表明:四逆汤高、低剂量组能改善肾上腺被膜皱缩状态,使球状带细胞、束状带细胞体积较模型组增大、数目增加。由上可见,四逆汤可从多方面干预皮质酮对肾上腺皮质的损害或抑制,表现出对抗皮质酮所致的大鼠HPA轴抑制。

在皮质酮致HPA轴抑制大鼠模型复制成功的基础上,给动物腹腔注射LPS复制HPA轴抑制大鼠感染性休克模型,为全面了解四逆汤的作用,增加了四逆汤预防给药组。结果,四逆汤预防组及治疗组平均动脉压下降率均少于模型组($P<0.01$),提示四逆汤对感染性休克大鼠有一定的保护作用。文献研究报道,四逆汤能显著改善内毒素性休克大鼠的微循环、抑制平均动脉压的降低^[14]。四逆汤能改善血压、保持心率、减轻内毒素引起的血液浓缩、抑制中性粒细胞数增加的作用,并在不同程度上提高内毒素处理动物的存活率^[15]。结合文献报道和本实验结果,我们认为四逆汤治疗感染性休克时,其作用靶点可能是在HPA轴。本实验用药是以炙甘草为君药的四逆汤,炙甘草用量较大,可以作为外源性糖皮质激素补充在感染性休克时HPA轴抑制所致的糖皮质激素相对不足。

本研究结果表明:四逆汤在感染中毒性休克伴肾上腺皮质功能不全时能纠正HPA轴的抑制状态,维持大鼠在应激状态下器官功能、内环境的稳定,从而对调节危重症应激反应和休克状态起重要治疗作用。

[参考文献]

- [1] 马涛,尤胜义. 淋巴细胞调亡,免疫抑制和脓毒症[J]. 国外医学·外科学分册,2005,32(1):35.
- [2] Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock [J]. Intensive Care Med, 2004, 30(4):536.
- [3] 姚咏明,盛志勇. 重视对脓毒症本质的探讨[J]. 中华急诊医学杂志,2005,14(3):185.

- [4] 李宇航. 伤寒论“四逆辈”探讨 [J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18 (1): 9.
- [5] 徐润芝, 刘洪义. 四逆汤在《伤寒论》中应用的探讨 [J]. 桂林医学院学报, 1997, 10 (1): 87.
- [6] 刘世恩, 毛绍芳, 廖俊旭. 张仲景全书 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 2007.
- [7] 李顺保. 伤寒杂病论大全 [M]. 北京: 学苑出版社, 2000.
- [8] 于伯海. 伤寒金匱温病名著集成 [M]. 北京: 华夏出版社, 1997.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [10] 黄建华. 淫羊藿总黄酮调控 HPA 轴受抑大鼠肾上腺皮质细胞凋亡和再生的研究 [D]. 上海: 复旦大学华山医院, 2006.
- [11] 沈自尹, 吴志军. 淫羊藿总黄酮对皮质酮诱导免疫功能低下大鼠的保护作用及配伍研究 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23 (8): 1061 - 1063.
- [12] 齐宇洁, 樊寻梅. 不同剂量氢化可的松对早期脓毒性休克大鼠下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22 (6): 421.
- [13] 吴勇杰, 常珍梅. 促甲状腺激素释放激素对大鼠内毒素性休克的影响 [J]. 中国药理学通报, 1996, 12 (2): 149.
- [14] 王华东, 陆大祥. 内毒素性休克的分子机制与中药防治 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24 (1): 87.
- [15] Zhanghangjun. 四种“温里”方剂对大鼠内毒素性休克的保护作用 [J]. 和汉医药学杂志, 1999, 16 (4): 148.

(编辑: 迟 越)

HPA Axis Suppression and Septic Shock Model Established and the effects of Sini Decoction on it

DAI Rong, DONG Liu - hui, SI An - hua, YU Ze - pu

(Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan 650500)

[**ABSTRACT**] Objective: The hypothalamic - pituitary - adrenal (HPA) axis suppression and septic shock model was duplicated and the effects of Sini Decoction was evaluated on that. Methods: We evaluated the effects of Sini Decoction on HPA axis suppression model by determining the levels of serum corticosterone (CORT) and ACTH, calculating the index of adrenal gland and observing the pathologic changes of bilateral adrenal gland. Blood pressure measurement was made before and after HPA axis suppression and septic shock model duplicated. Results: After subcutaneous injection of CORT (10mg/kg) for fourteen days, once a day, serum CORT of model group was lower compared with normal group ($P < 0.05$). The large and small dose groups of Sini Decoction exhibited higher CORT than model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ACTH and the weight of adrenal gland increased in high dose group of Sini Decoction ($P < 0.05$). Pathologic examination showed, the shrinking of adrenal bilateral adrenal gland, sizes decreasing of zona glomerulosa and zona fasciculata cell and the increasing vacuoles in cell fat were improved in the low and high doses of Sini Decoction groups. In infectious shock model rats induced by LPS, blood pressure was decreased, however, it could be controlled in positive group (5mg/kgDEX), prophylactic and treatment groups of Sini Decoction ($P < 0.01$). Conclusion: Administration of Sini Decoction improved the suppression of HPA axis, relieved the bilateral adrenal gland atrophy due to exogenous GC and elevated the blood pressure of HPA axis suppression and septic shock model rats.

[**KEY WORDS**] sini decoction; HPA axis suppression; septic shock; animal model