

# Xuebijing Regulate the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and the Level of GRmRNA of Adrenal in Septic Rats

Hongshan Li<sup>1\*</sup>, Shuzheng Liu<sup>2</sup>, Jieping Zhou<sup>1</sup>, Yukun Chang<sup>1</sup>, Jingyi Wang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ICU, Tangshan People Hospital, Tangshan Hebei

<sup>2</sup>ICU, The Second Hospital of Tangshan, Tangshan Hebei

Email: [iculihongshan@163.com](mailto:iculihongshan@163.com)

Received: May 29<sup>th</sup>, 2015; accepted: Jun. 22<sup>nd</sup>, 2015; published: Jun. 25<sup>th</sup>, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

**Objective:** To investigate the change of CORT and the level of GRmRNA of adrenal in CLP induced septic rats which were treated by Xuebijing, identify that Xuebijing can regulate the CORT and GRmRNA. **Methods:** 40 male rats were divided randomly into normal control group, sham group, saline group (Sepsis group), Xuebijing for treatment group. The model of sepsis was made by CLP. We observe the clinical manifestation of animal after CLP. We use the radio-immunity method to detect the levels of CORT; using the RT-PCR method to measure the level of GRmRNA in adrenal. **Results:** In Sepsis group, the plasma CORT concentration ( $29.74 \pm 1.65$  ng/ml) was significantly higher than that in the normal control group ( $7.56 \pm 0.89$  ng/ml,  $P < 0.01$ ) and Sham group ( $13.27 \pm 1.31$  ng/ml,  $P < 0.01$ ). In XBJ group, plasma CORT concentration ( $19.27 \pm 1.85$  ng/ml) was significantly lower than that in Sepsis group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between Normal control and Sham group ( $P > 0.05$ ). In Sepsis group, the level of the GRmRNA in the adrenal tissue ( $0.80 \pm 0.11$ ) was significantly lower than that in the normal control group ( $1.44 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ ) and the Sham group ( $1.15 \pm 0.11$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference between XBJ ( $1.08 \pm 0.10$ ) and Sepsis group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** In septic rats, the HPA axis was excessive activate. Xuebijing can decrease the level of CORT, increase the level of GRmRNA in adrenal, improve the excessive activate condition of HPA axis, and lessen the clinical manifestation.

## Keywords

Xuebijing, Sepsis, CLP, CORT, GRmRNA

\*通讯作者。

# 血必净对脓毒症大鼠皮质酮及肾上腺组织 GRmRNA 水平的影响

李宏山<sup>1\*</sup>, 刘淑正<sup>2</sup>, 周洁平<sup>1</sup>, 常玉坤<sup>1</sup>, 王静怡<sup>1</sup>

<sup>1</sup>唐山市人民医院重症医学科, 河北 唐山

<sup>2</sup>唐山市第二医院重症医学科, 河北 唐山

Email: [iculi hongshan@163.com](mailto:iculi hongshan@163.com)

收稿日期: 2015年5月29日; 录用日期: 2015年6月22日; 发布日期: 2015年6月25日

## 摘要

目的: 探讨在血必净干预下, 脓毒症大鼠血浆皮质酮(CORT)水平以及肾上腺组织糖皮质激素受体(GR mRNA)水平的变化, 明确血必净对脓毒症大鼠CORT及GR mRNA的调节作用。方法: 选用健康雄性SD大鼠40只, 随机分为正常对照组(Normal group), 假手术组(Sham group), 模型组(Sepsis group)和血必净治疗组(XBJ group)四个组, 采用经典的盲肠结扎穿孔法(CLP)制作SD大鼠脓毒症模型。CLP术后6小时处死动物, 利用放射免疫法检测血浆皮质酮(CORT)水平; RT-PCR法检测肾上腺组织GRmRNA水平。结果: Sepsis组血浆CORT含量( $29.74 \pm 1.65$  ng/ml)明显高于Normal组( $7.56 \pm 0.89$  ng/ml,  $P < 0.01$ )及Sham组( $13.27 \pm 1.31$  ng/ml,  $P < 0.01$ ); XBJ组血浆CORT含量( $19.27 \pm 1.85$  ng/ml)明显低于Sepsis组( $P < 0.01$ ); Normal组与Sham组之间相比无统计学差异( $P > 0.05$ ); Sepsis组肾上腺组织GR mRNA含量( $0.80 \pm 0.11$ )明显低于Normal组( $1.44 \pm 0.07$ ,  $P < 0.01$ )和Sham组( $1.15 \pm 0.11$ ,  $P < 0.01$ ); XBJ组肾上腺组织GR mRNA含量( $1.08 \pm 0.10$ )和Sepsis组之间相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。结论: 脓毒症早期大鼠血浆CORT的水平是升高的, 而肾上腺组织GRmRNA水平是较低的; 血必净干预后能够降低血浆CORT的水平并且一定程度上能够提高肾上腺组织GRmRNA的水平, 减轻脓毒症大鼠的过度应激状态, 改善脓毒症大鼠的感染中毒症状。

## 关键词

血必净, 脓毒症, 盲肠结扎穿孔, 皮质酮, GRmRNA

## 1. 引言

脓毒症是由感染因素导致的全身性炎症反应综合征, 是临床创伤、烧伤和感染性疾病患者的常见并发症, 进一步发展可导致脓毒症性休克和多器官功能障碍综合征, 病死率高达 50%~60% [1]。严重创伤、休克及脓毒症可以迅速引发机体的应激反应, 激活神经内分泌系统, 接着动员全身的免疫系统参与应激, 以维护内环境的稳定[2]。有研究认为下丘脑—垂体—肾上腺轴(HPA)轴是神经—内分泌—免疫网络的枢纽。脓毒症时出现 HPA 轴的功能紊乱[3]。HPA 轴的激活引起糖皮质激素的释放, 而糖皮质激素需要通过糖皮质激素受体(GR)而发挥作用。因此糖皮质激素和 GR 在脓毒症发生过程中的作用显得尤为重要。王今达教授采用“三证三法”, 研制成功了血必净注射液[4]。血必净注射液是防治脓毒症/多器官功能障碍综合征(MODS)的临床药物[5], 然而尚缺乏血必净注射液对脓毒症 CORT 及 GR 方面的报道。本研究采用盲肠结扎穿孔法复制脓毒症大鼠模型, 观察血必净注射液对脓毒症早期大鼠皮质酮及肾上腺

组织 GRmRNA 水平的影响。

## 2. 对象和方法

### 2.1. 实验动物及模型制备

健康清洁级雄性 SD 大鼠 40 只(河北医科大学实验动物中心提供), 平均体重 283 g。24℃~26℃实验室内适应性饲养 1 周, 术前称重。按照 Chaudry 等[6]报道的方法行大鼠盲肠结扎穿孔术(CLP), 复制严重腹腔感染致脓毒症模型。动物术前称重、编号, 并禁食 12 h, 自由饮水。10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后固定, 常规消毒, 铺无菌洞巾。沿腹中线作一长约 1.5 cm 的切口, 逐层切开, 暴露盲肠并小心游离其盲端避免血管损伤, 生理盐水润湿盲肠表面, 将盲肠取出, 在距盲端 1 cm 处结扎, 用 16 号针头贯穿 3 次, 挤出少许肠内容物, 并留置一条宽 2 mm 的橡皮条贯通盲肠, 防止针孔闭合。然后将盲肠移入腹腔, 逐层缝合腹壁切口。术毕在股部皮下注射 50 ml/kg 林格平衡液抗休克。待动物清醒后可自由活动 and 饮水。假手术组只开腹翻动肠管后关腹。

### 2.2. 动物分组及给药

将 40 只大鼠随机分为正常对照组(Normal)、假手术组(Sham)、模型组(Sepsis)和血必净治疗组(XBJ)4 组, 每组 10 只。血必净治疗组于 CLP 术后经静脉注射血必净注射液(天津红日药业股份有限公司生产) 4 ml/kg [7] [8]; 模型组于 CLP 术后经静脉注射生理盐水, 量同血必净治疗组。各组均于 CLP 术后 6 小时留取血液标本待测。

### 2.3. 观察内容及检测方法

#### 2.3.1. 观察大鼠 CLP 术后的一般情况

有无精神萎靡、嗜睡、寒颤、竖毛、活动迟缓等, 腹水情况及腹腔肠管等脏器形态学改变。

#### 2.3.2. 大鼠血浆 CORT 的检测

在 CLP 术后 6 小时以 10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 打开胸腔, 剪开心包, 用 5 ml 注射器心尖部采血 4 ml, 迅速置于肝素抗凝管, 充分混匀, 置于冷冻离心机中, 4℃、3000 rpm, 离心 15 min, 取上清液即血浆分装于 EP 管中, -20℃保存, 待测。放射免疫法测定血浆中 CORT 的水平, 严格按照试剂盒说明书步骤检测(北京福瑞工程公司提供)。

#### 2.3.3. 大鼠肾上腺组织中 GRmRNA 水平的测定

实验结束即刻于 2 min 内分离出肾上腺组织, 立即放入液氮中保存。检测采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法。冰上组织匀浆一步法总 RNA 提取试剂(Trizol)提取组织总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度含量, 并进行 RNA 电泳鉴定其完整性, 以 Oligo (dT)为引物逆转录成 cDNA 后进行 PCR。引物设计: 从网址 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 的 Genebank 中检出大鼠的 GR 基因 cDNA 序列, 以 B-actin 作为内参照(见表 1)。PCR 产物经质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后 BioImage 凝胶分析系统进行半定量分析(以目的基因的灰度值/内参照的灰度值)。Marker 为 2000 bp。

## 2.4. 统计学处理

数据统计分析采用 SPSS12.0 版软件包(SPSS Company, Chicago, Illinois, USA)进行, 比较各组血浆 CORT、水平和肾上腺组织 GRmRNA 的变化, 实验结果以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 采用组间比较的 t 检验作显著性测定。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3. 结果

#### 3.1. CLP 术后观察

在 CLP 后 2~3 小时大鼠可自由饮水, 6~8 小时出现精神倦怠、躁动、寒战、腹胀、眼角分泌物增多、竖毛等表现, 各组动物处死后剖腹见腹腔积有血性渗出液, 盲肠肿胀变黑、发生粘连, 空肠肠管胀气等表现, 依据 William [9] 的研究符合脓毒症早期表现, 制模成功。

#### 3.2. 各组大鼠血浆中 CORT 水平及肾上腺组织 GR mRNA 水平检测结果(表 2)

与 Normal 和 Sham 组相比, Sepsis 组血浆中 CORT 水平明显升高( $P < 0.01$ ); 与 Sepsis 组相比, XBJ 组血浆中 CORT 水平明显下降( $P < 0.05$ )。与 Normal 和 Sham 组相比, Sepsis 组肾上腺组织 GRmRNA 水平明显降低( $P < 0.01$ ); 而与 Sepsis 组相比, XBJ 组肾上腺组织 GRmRNA 水平明显升高( $P < 0.05$ ) (电泳图见图 1)。

### 4. 讨论

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、大手术和感染后常见并发症, 其本质为不同感染因素所致失控性炎症反应, 如细菌、真菌、病毒及其毒性产物等均可诱发脓毒症。脓毒症是 ICU 患者的主要死亡原因之一, 对其发病机制的探讨一直是重症医学领域的研究热点。然而迄今为止, 我们对于脓毒症时机体的炎症反应机制还没有充分阐明, 而神经-内分泌-免疫网络调节理论的形成与出现为脓毒症发病机制的进一步认识提供了契机, 神经-内分泌-免疫网络可能在脓毒症的发生发展中起着重要的调控作用[10]。在神经内分泌免疫网络研究中, 下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴备受关注。

HPA 轴是机体主要的应激管理系统。HPA 轴在脓毒症早期活化并引起 CRH 的释放, CRH 进一步促进 ACTH 分泌, 血中肾上腺皮质激素升高, 儿茶酚胺、血浆催乳素、胰高血糖素水平上升, 甲状腺素、胰岛素、生长激素、血管加压素水平下降。本研究中也证明脓毒症大鼠血浆中 CORT 水平是升高的, 以

**Table 1.** The GR and B-actin gene sequence of rats

**表 1.** 大鼠 GR 及 B-actin 的基因序列

β-actin 产物长度为 270bp	
上游引物序列	5'-AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC-3'
下游引物序列	5'-TCT GAG CTG TGG TGG TGA AG-3'
大鼠 GR 引物 605bp	
上游引物序列	5' TTC AAC GTC TGC AAC TGG GTG 3'
下游引物序列	5' TGC TGA GAA AGG GAT GCT GTA TT 3'

**Table 2.** The level changes of CORT n plasma and GR mRNA of adrenal of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ , n = 40)

**表 2.** 各组大鼠血浆 CORT 及肾上腺组织 GR mRNA 水平的变化( $\bar{x} \pm s$ , n = 40)

Group	CORT (ng/ml)	GRmRNA
Normal group	7.56 ± 0.89	1.44 ± 0.07
Sham group	13.27 ± 1.31	1.15 ± 0.11
Sepsis group	29.74 ± 1.65	0.80 ± 0.11
XBJ group	19.27 ± 1.85	1.08 ± 0.10

注: XBJ group compare to Sepsis group:  $p < 0.05$ ; Sham group compare to Sepsis group:  $P < 0.01$ ; Sham group compare to Normal group:  $P > 0.05$ .

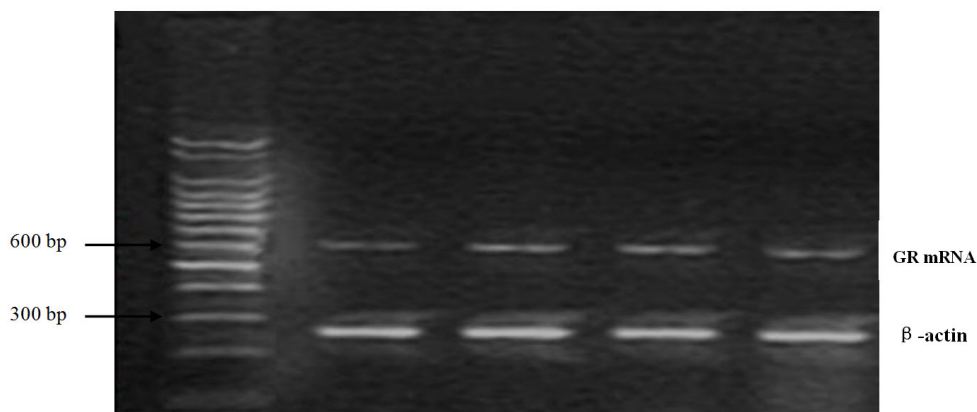


Figure 1. Expression of GRmRNA in renal tissues

图 1. 肾上腺组织 GRmRNA 表达图

此表明脓毒症时 HPA 轴处于过度激活的状态。糖皮质激素是脓毒症时最重要的应激激素之一，有研究表明糖皮质激素可抑制脓毒症时机体的细胞免疫状态[11]，其通过靶细胞 GR 的介导发挥重要生物学效应。GR 广泛存在于哺乳动物的有核细胞中，其在肝细胞中的表达最为丰富。GR 的激活能显著抑制机体炎症介质的释放，保护器官功能[12]。大量糖皮质激素与糖皮质激素受体结合形成的糖皮质激素-受体复合物可有效抑制糖皮质激素受体基因的转录，从而使糖皮质激素受体 mRNA 减少，糖皮质激素受体水平下降[13]。本研究中我们也观察到脓毒症早期大鼠肾上腺组织 GRmRNA 水平较正常时有明显的降低。

血必净注射液的主要有效成分包括红花黄色素 A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛。文献报道，血必净注射液能在体内有效拮抗内毒素，抑制体内多种炎症介质的病理生理作用，恢复受到抑制的免疫反应，对应激性脏器损伤具有良好的保护作用[2]。本研究以经典的盲肠结扎穿孔法(CLP)来复制脓毒症的模型，CLP6 小时后测得血浆中 CORT 水平明显升高而肾上腺组织 GRmRNA 水平明显降低。这些改变都说明此时 HPA 轴处于过度激活的状态。而应用血必净治疗后血浆中 CORT 水平较模型组有明显的降低，肾上腺组织 GRmRNA 水平升高，这说明血必净能够改善脓毒症大鼠 HPA 轴过度激活的状态，减轻脓毒症大鼠的感染中毒症状，为临床治疗早期脓毒症提供了理论依据。其具体机制还有待我们在今后的研究中去探讨。

## 参考文献 (References)

- [1] Xin, L., Juan, C., Xin, C.Z., et al. (2009) Targeting CpG DNA to screen and isolate anti-sepsis fraction and monomers from traditional Chinese herbs using affinity biosensor technology. *International Immunopharmacology*, **9**, 1021-1031.
- [2] 姚咏明, 张庆红 (2012) 从神经内分泌途径认识脓毒症时免疫反应失调. *中国急救医学*, **32**, 97-100.
- [3] Flier, M.A., Rittirsch, D., Weckbach, S., et al. (2011) Disturbances of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and plasma electrolytes during experimental sepsis. *Ann Intensive Care*, **1**, 53.
- [4] 李志军, 任新生, 李银平等 (2012) “三证三法”及“菌毒炎共治”治疗脓毒症的研究进展. *中国中西医结合急救杂志*, **19**, 321-323.
- [5] Sun, J., Xue, Q., Guo, L., et al. (2010) Xuebijing protects against lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits. *Experimental Lung Research*, **36**, 211-218.
- [6] Chaudry, I.H., Wichterman, K.A. and Baue, A.E. (1979) Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*, **85**, 205-211.
- [7] 曹书华, 王今达 (2002) 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究. *中国危重病急救医学*, **14**, 489-491.
- [8] 张畔, 曹书华, 崔克亮等 (2002) 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究. *中国中*

中西医结合急救杂志, **9**, 21-23.

- [9] Hubbard, W.J., Choudhry, M., Schwacha, M.G., et al. (2005) Cecal ligation and puncture. *Shock*, **24**, 52-57.
- [10] 姚咏明, 刘辉, 盛志勇 (2006) 提高对神经-内分泌-免疫网络与创伤脓毒症的认识. *中华创伤杂志*, **22**, 561-564.
- [11] 刘娇, 董卫明, 高文蔚等 (2013) 糖皮质激素对烫伤后晚期脓毒症大鼠细胞免疫功能的影响. *武汉大学学报(医学版)*, **34**, 662-664, 669.
- [12] De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G. (2000) Mechanisms of anti-inflammatory action and of immunosuppression by glucocorticoids: Negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factors. *Journal of Neuroimmunology*, **109**, 16-22.
- [13] Song, L.N. (1994) Effects of retinoic acid and its dexamethasone on proliferation, differentiation and glucocorticoid receptor expression in cultured human osteosarcoma cells. *Oncology Research*, **6**, 111-114.