

桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用及机制

杨荣源, 黄宏强, 刘云涛, 王大伟, 李际强

广东省中医院, 广东 广州 510120

[摘要] 目的: 观察桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用及机制。方法: 将大鼠 100 只随机分为正常对照组 (NC)、模型 6 h 组 (MC6h)、模型 12 h 组 (MC12h) 和桃核承气汤 6 h 组 (Th6h)、桃核承气汤 12 h 组 (Th12h), 每组 20 只。NC 不作任何处理, MC 每只大鼠每天按 1 mL/100 g 体重灌胃给予生理盐水, Th 每只大鼠每天按 1 mL/100 g 体重予桃核承气汤药液灌胃, 7 天后造模。大鼠造模成功后 6 h、12 h 分别采集血清、肝组织标本, 行一般生化检查及病理染色, 电镜观察肝组织改变情况。结果: ①与 NC 比较, MC6h 和 MC12h 谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 水平明显升高, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 与同时间点 MC 比较, Th6h、Th12 h 实验大鼠的血清 ALT 和 AST 水平均降低, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。②与 NC 比较, MC6h 和 MC12h 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6) 和内毒素 (LPS) 的水平明显升高, 差异均有非常显著性意义 ($P < 0.01$); 与同时间点 MC 比较, Th6h、Th12 h TNF- α 、IL-6 和 LPS 的水平均降低, 差异有显著性或非常显著性意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。③Th12h 大鼠肝脏组织的受损程度明显减轻, 与 MC12h 比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。光镜和电镜观察 MC12h 大部分肝组织细胞严重水肿, 肝细胞点灶性坏死, 汇管区淋巴细胞浸润。结论: 桃核承气汤可减轻脓毒症大鼠肝组织炎症损伤, 其机制可能与减少 TNF- α 、IL-6、LPS 等炎症因子和体内 LPS 的水平有关。

[关键词] 脓毒症; 桃核承气汤; 肝损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 06-0210-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.06.099

Hepatic Protective Effect and Mechanism of *Taohe Chengqi* Decoction in Sepsis Rats

YANG Rongyuan, HUANG Hongqiang, LIU Yuntao, et al

Abstract: objective: To observe the protective effect and mechanism of *Taohe Chengqi* decoction on liver tissue in rats with sepsis. **Methods:** A total of 100 male clean Kunming SD rats were randomly divided into five groups, the normal control group (NC), the model 6h group (MC6h), the model 12h group (MC12h), *Taohe Chengqi* decoction 6h group (Th6h) and *Taohe Chengqi* decoction 12h group (Th12h), 20 in each group. The normal control group had no treatment. Each rat of model group was given saline 1mL/100g (body weight) per day through gastrogavage. The rat of *Taohe Chengqi* decoction group was given *Taohe Chengqi* decoction 1mL/100g (body weight) per day through gastrogavage. The modeling lasted 7 days. Serum and liver tissue specimens were collected respectively at 6 h and 12 h after the modeling, and were observed by biochemical examination, pathological dyeing and electronic microscopy. **Results:** The levels of serum aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in MC6h group and MC12h group were increased ($P < 0.01$ compared with those in the NC group at the same time point). The levels of serum ALT and AST in Th6h group and Th12h group were lower than those in the MC group at the same time point ($P < 0.05$). The levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and lipopolysaccharide (LPS) in MC6h and MC12h groups were higher than those in the NC group at the same time point ($P < 0.01$). Rats in Th6h and Th12h groups had lower serum TNF- α , IL-6 and LPS levels than MC groups at the same time point ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The damage of liver tissue in Th12h group was relieved obviously ($P < 0.05$ compared with that in MC12h group at the same time point). MC12h group had severe edema of liver tissue and spotty necrosis of liver cells, infiltration of lymphocytes into portal area. **Conclusion:** *Taohe Chengqi* decoction can reduce the liver inflammatory damage of rats with sepsis, and the mechanism may be related with decreasing inflammatory factors of TNF- α , IL-6 and LPS level.

Keywords: Sepsis; *Taohe Chengqi* decoction; Liver injury

[收稿日期] 2014-02-22

[基金项目] 广东省自然科学基金项目 (编号: 9451040701003687); 广东省中医药局课题 (编号: 2008122)

[作者简介] 杨荣源 (1976-), 男, 副主任医师, 主要从事呼吸系统疾病及感染性疾病的研究。

[通讯作者] 李际强, E-mail: lijiajiangzhen@163.com。

脓毒症(Sepsis)是由严重感染引起的全身炎症反应综合征,是重症监护患者死亡的主要原因。研究证实,抑制炎症介质和细胞因子的释放,可有效保护肝脏组织细胞、维持器官功能^[1]。桃核承气汤是《伤寒论》治太阳蓄血证的主方,现代临床将其引申用于化脓性阑尾炎、胰腺囊肿术后高热、肝硬化腹水并消化道出血等急危重症的治疗,认为桃核承气汤是治疗热结下焦、高热出血等急危重症的良方^[2]。实验研究发现,桃核承气汤对提高局部炎症大鼠免疫力具有一定作用,还可通过减轻局部炎症反应修复受损的组织结构^[3-4]。据此,本研究采用盲肠结扎穿孔法(CLP)建立脓毒症大鼠模型,以桃核承气汤进行早期干预,观察桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用,探讨其作用机制,为脓毒症的临床治疗开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 药物制备 桃核承气汤由桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草按 2:2:1:1:1 组成,适量水煎,头煎 20 min,二煎 30 min,分别滤取药液后合并,60℃恒温浓缩成含生药 1g/mL 的药液备用。所有药物由广东省中医院中心药房提供。

1.2 动物及分组 体重 200~240 g 实验用清洁级雄性 SD 昆明大鼠(合格证号:2008A010,由中山大学实验动物中心提供),共 100 只。随机分为正常对照组(NC)、模型 6 h 组(MC6h)、模型 12 h 组(MC12h)和桃核承气汤 6 h 组(Th6h)、桃核承气汤 12 h 组(Th12h),每组 20 只大鼠。NC:不作任何特殊处理,常规饲养 7 天。MC:每只大鼠每天按 1 mL/100g 体重灌胃给予生理盐水(贵州天地药业有限公司,批号 0803007A,规格:每瓶 500 mL),连续给药 7 天。Th:每只大鼠每天按 1 mL/100 g 体重予桃核承气汤药液灌胃,连续 7 天。

1.3 动物模型制备 采用 CLP 复制脓毒症动物模型^[5]。大鼠术前 12 h 禁食,可自由饮水。取仰卧位,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液(0.15 mL/100 g)麻醉,沿腹中线附近区域剪除体毛;75%乙醇消毒后铺孔巾,沿腹中线作一长约 1.5 cm 的切口,剪开皮肤和肌层;探查腹腔分离盲肠(注意避免损伤肠系膜血管),1 号丝线距盲端 0.5 cm 结扎;12 号穿刺针在结扎处远端贯穿盲肠 2 次(呈三角形),针孔间距约 0.3 cm,并放入导流条;将盲肠回纳腹腔,逐层缝合关闭腹腔;每只腹腔补液 1 mL,分笼饲养,禁食。

1.4 样品采集 造模后 6 h 和 12 h(NC 为实验当天所有动物脓毒症造模完毕后),分别将实验各组大鼠按造模先后顺序头部脱臼处死。迅速剪开大鼠腹部缝线,探索分离下腔静脉,取血约 5 mL 备用(其中 2 mL 置于含抗凝剂的硬质塑料管中,其余的置于不含抗凝剂的硬质塑料管中,分别作为常规生化、细胞因子、内毒素检测之用);分离各脏器组织,留取肝脏组织,置于含 10% 甲醛溶液的塑料瓶中,留作病理切片行病理形态学观察。

1.5 检测指标和方法 ①生化指标检测:采用常规生化方法检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)。②肝脏组织病理形

态学观察:用光镜和电镜观察肝组织的病理形态学改变,参考文献^[6]进行评分。③白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度变化及其与内毒素(LPS)的检测:采用 ELISA 酶联免疫法:参照相关 ELISA 检测试剂盒说明书进行。于酶标仪上读取样品各孔的 OD 值,以吸光度 OD 值为 Y 轴,相应的标准品浓度为 X 轴作标准曲线,根据其 OD 值由标准曲线换算出 LPS、TNF- α 、IL-6 等炎症介质的含量浓度。

1.6 统计学方法 采用 SPSS18.0 统计软件分析数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能比较 见表 1。与 NC 比较,MC6h 和 MC12h ALT 和 AST 水平明显升高,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);与同时点 MC 比较,Th6h、Th12h 实验大鼠的血清 ALT 和 AST 水平均降低,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

组别	<i>n</i>	ALT	AST
NC	20	38.78 ± 6.75	94.18 ± 11.28
MC6h	12	95.78 ± 19.97	187.67 ± 52.47
MC12h	12	122.95 ± 25.66	196.45 ± 20.14
Th6h	15	66.62 ± 22.27	121.43 ± 19.63
Th12h	15	88.20 ± 23.30	138.35 ± 31.03

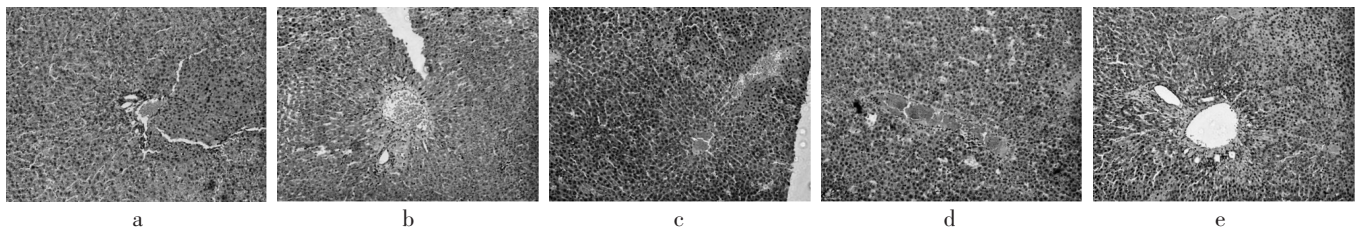
与 NC 比较,① $P < 0.01$;与同时点 MC 比较,② $P < 0.05$

2.2 各组大鼠肝组织病理形态学评分及改变 见图 1,表 2。Th12h 大鼠肝脏组织的受损程度明显减轻,与 MC12h 比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。光镜和电镜观察脓毒症大鼠肝组织病理形态学改变:MC6h:大部分肝小叶结构完整、小部分肝细胞水肿、炎症细胞轻微浸润;MC12h:大部分肝组织细胞严重水肿,肝细胞灶性坏死,汇管区淋巴细胞浸润;Th6h:肝组织受损程度较 MC6h 轻,但效果并不十分明显;Th12h:肝组织受损程度较 MC12h 明显减轻。

组别	<i>n</i>	病理形态学评分
NC	20	0.00 ± 0.00
MC6h	12	1.50 ± 0.50
MC12h	12	3.00 ± 0.00
Th6h	15	1.40 ± 0.49
Th12h	15	2.50 ± 0.50

与 MC12h 比较,① $P < 0.05$

2.3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 LPS 水平比较 见表 3。与 NC 比较,MC6h 和 MC12h TNF- α 、IL-6 和 LPS 的水平明显升高,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$);与同时点 MC 比较,Th6h、Th12h TNF- α 、IL-6 和 LPS 的水平均降低,差异有显著性或非常显著性意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。



a. 正常对照组；b. MC6h 组；c. MC12h 组；d. Th 6h组；e. Th12h 组

图1 肝组织病理形态学改变

表3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 LPS 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	LPS(EU/mL)
NC	20	39.86 \pm 10.97	32.86 \pm 9.95	0.92 \pm 0.68
MC6h	12	148.50 \pm 32.54	94.38 \pm 22.93	8.19 \pm 2.56
MC12h	12	124.38 \pm 27.68	127.38 \pm 25.51	23.00 \pm 7.27
Th6h	15	109.75 \pm 31.61	70.13 \pm 18.59	6.36 \pm 1.81
Th12h	15	87.00 \pm 19.13	94.88 \pm 14.44	14.60 \pm 4.97

与 NC 比较, ① $P < 0.01$; 与同时点 MC 比较, ② $P < 0.05$,

③ $P < 0.01$

3 讨论

脓毒症是严重创伤、休克、术后常见的并发症, 进一步发展可导致脓毒症休克、多器官功能障碍综合征(MODS), 是临床危重患者的重要死亡原因之一。脓毒症时机体产生大量的炎症介质, 引起全身多个脏器的损伤, 减少或者控制过量炎症介质的释放, 减轻全身炎症反应综合征(SIRS)的严重程度是目前脓毒症防治研究的热点。

桃核承气汤在《伤寒论》中为下焦蓄血证而设。现代临床认为, 蓄血证乃诸多疾病病理过程中的一个中间环节, 既存在于外感热病中, 又见于内伤杂病中, 同时具备“热”与“瘀”的表现。常见的心脑血管、泌尿、生殖、肿瘤、损伤、妇科、急腹症、内毒素血症等多系统疾病中, 若某一个阶段存在血行不畅、血液淤滞之高凝状态、血栓前倾向等表现, 都与蓄血证有着类似之处, 可选用桃核承气汤加减治疗。实验研究亦证实活血化瘀在一定程度上能提高机体细胞抗氧化酶的活性, 降低脂质过氧化, 从而改善免疫麻痹、阻止炎症反应进一步发展、降低脓毒症脏器功能受损^[7]。笔者临床与实验研究表明, 桃核承气汤能改善脓毒症患者凝血功能, 减轻脓毒症大鼠小肠组织的炎症损伤^[8-9]。脓毒症时肝脏中枯否细胞(Kupfer Cell)可被 LPS、TNF- α 等激活, 释放 TNF- α 、干扰素(IFN)、IL-1、IL-6、氧自由基(OFR)、一氧化氮(NO)等炎症介质。研究证实这些细胞因子和炎症介质大量产生并相互作用, 形成网络, 并不断循环促进形成“瀑布样”炎症反应, 参与肝损伤及全身炎症反应的发生与发展, 而肝脏的结构和功能状态决定着疾病的发展, 肝细胞功能丧失可诱导 MODS 的发生。本研究表明,

桃核承气汤可降低 CLP 脓毒症大鼠血清 ALT 和 AST 水平, 同时减轻肝脏组织的损伤, 提示其对脓毒症大鼠肝脏组织有一定的保护作用。桃核承气汤能明显降低 CLP 脓毒症大鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 LPS 的水平, 提示其对肝脏的保护作用可能与减少炎症细胞因子表达及体内 LPS 水平有关。但桃核承气汤抑制炎症反应的具体作用靶点和对信号转导通路的影响, 有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 石庚生. 姜黄素对脓毒症小鼠肝脏炎症反应的抑制作用[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(18): 2721-2722.
- [2] 樊来应. 桃核承气汤加减治疗下焦瘀血危重症验案举隅[J]. 北京中医, 2004, 23(1): 36.
- [3] 王历, 李秀明. 桃核承气汤治疗热郁血瘀型盆腔炎大鼠的实验研究[J]. 中医学报, 2007, 35(5): 30.
- [4] 程梦琳, 邱明义, 陶春晖, 等. 桃核承气汤对大鼠肠缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(10): 689.
- [5] Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis [J]. Br J Surg, 2001, 88(1): 22-30.
- [6] 王宁, 周红, 郭毅斌, 等. 心导管留置术后盲肠结扎穿孔术(CLP)脓毒症动物模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(10): 12-14.
- [7] 郭昌星, 杨兴易, 林兆奋, 等. 血府逐瘀汤对全身炎症反应综合征患者氧自由基的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(4): 228-229.
- [8] 杨荣源, 王大伟, 黄宏强. 通腑活血法对脓毒症患者凝血功能的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 29(4): 321-324.
- [9] 刘云涛, 王大伟, 杨荣源, 等. 通腑活血法对脓毒症大鼠小肠组织的保护作用及机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(6): 645-648.

(责任编辑: 马力)