

# 清毒汤对重症肝损伤大鼠肠道黏膜通透性的影响

罗佳佳 高连印 金双 车念聪 张秋云 杜宇琼 付修文

**【摘要】 目的** 观察清毒汤对重症肝损伤大鼠肠道黏膜通透性的影响,探讨该方治疗慢性重型肝炎(chronic severe hepatitis,CSH)的作用机制。**方法** 建立硫代乙酰胺(thioacetamide,TAA)致重症肝损伤大鼠模型,以清毒汤进行干预治疗,采用血液生化法、ELISA法、Western Blot法,观察其对该模型大鼠肝功能的总胆红素(total bilirubin,TBIL)、谷草转氨酶(aspartate transaminase,AST)和反映肠道黏膜通透性的二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)、闭锁连接蛋白-1(zonula occludens-1,ZO-1)及肠组织白细胞介素(interleukin,IL)-1 $\beta$ 、IL-6的影响。**结果** (1)与模型组相比较,乳果糖组及清毒汤小、中剂量组大鼠中TBIL、AST、DAO含量显著性下降( $P<0.01$ );ZO-1蛋白的表达水平在所有治疗组中均有显著性升高( $P<0.01$ );乳果糖组、清毒汤中剂量组IL-1 $\beta$ 、IL-6的含量均显著性降低( $P<0.01$ );(2)与乳果糖比较,清毒汤中剂量组TBIL、AST、DAO、IL-1 $\beta$ 含量明显下降( $P<0.05$ )及ZO-1表达水平显著性升高( $P<0.01$ );清毒汤小剂量组中IL-6呈明显下降( $P<0.05$ );清毒汤大剂量组中AST、DAO有显著性统计学差异( $P<0.01$ )。**结论** 清毒汤能降低重症肝损伤大鼠肠道黏膜的通透性,从而改善肝功能,其作用机制可能是减少有害物质穿过肠道黏膜屏障,进而减少其通过肠肠循环途径而加重肝损伤的发生机率。

**【关键词】** 肠道黏膜通透性; 重症肝损伤; 清毒汤; 硫代乙酰胺

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.002

**Effect of Qingdu decoction on intestinal mucosal permeability in rats with severe liver injury** LUO Jiajia,GAO Lianyin,JIN Shuang,et al. Department of Traditional Chinese Medicineclinical basis, College of TCM,Capital Medical University, Beijing 100069, China  
Corresponding author:GAO Lianyin,E-mail:gly066@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of Qingdu decoction on intestinal mucosal permeability in rats with severe liver injury, and to explore the mechanism of it to treat chronic severe hepatitis (CSH). **Methods** Severe liver injury model was establish by thioacetamide (TAA), and Qingdu decoction was used to treat them, then blood biochemical method, ELISA, Western Blot was used

基金项目:北京市自然科学基金(7142023);北京市教委首都中医药研究专项(16ZY01)

作者单位:100069 北京,首都医科大学中医药学院中医临床基础学系[罗佳佳(硕士研究生)、高连印、金双、车念聪、张秋云、杜宇琼、付修文],中医络病研究北京重点实验室[罗佳佳(硕士研究生)、高连印、金双、车念聪、张秋云、杜宇琼、付修文]

作者简介:罗佳佳(1988-),女,2014级在读硕士研究生。研究方向:中医药防治慢性肝病内毒素血症机制研究。E-mail:lj9199@163.com

通信作者:高连印(1966-),女,博士,副教授,硕士生导师。研究方向:中医药防治慢性肝病内毒素血症机制研究。E-mail:gly066@126.com

to observe the effect of total bilirubin (TBIL), aspartate aminotransferase (AST) which reflect liver function, and diamine oxidase (DAO), blocking binding protein-1 (ZO-1) and interleukin of intestinal tissue (IL-1, IL-6) which reflect intestinal mucosal permeability of this model rats. **Results** (1) Compared with the model group, the level of TBIL, AST, DAO in the lactulose group, the low and medium dose groups of *Qingdu* decoction were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); the expression level of ZO-1 protein in all treatment groups were significantly increased ( $P < 0.01$ ); the level of IL-1 $\beta$  and IL-6 in lactulose group and the *Qingdu* decoction medium dose group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ); (2) Compared with the lactulose group, the level of TBIL, AST, DAO, IL-1 $\beta$  in the *Qingdu* decoction medium dose group was decreased obviously ( $P < 0.05$ ), the expression level of ZO-1 was increased significantly ( $P < 0.01$ ); IL-6 in the *Qingdu* decoction low dose group was decreased obviously ( $P < 0.05$ ); AST, DAO in the *Qingdu* decoction high dose group had significantly statistical difference ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** *Qingdu* decoction can improve the function of liver by reducing permeability of intestinal mucosa of severe liver injury rats. The mechanism may be related to reduce harmful substances passing through intestinal mucosal barrier and enterohepatic circulation which can increase the incidences of hepatic injury.

**【Key words】** Intestinal mucosal permeability; Severe liver injury; *Qingdu* decoction; Thioacetamide

重症肝损伤以大量肝细胞坏死为特征,属于临床急危重症范畴。近年来,国内外相关研究表明<sup>[1-2]</sup>,重症肝损伤患者常伴有肠道黏膜通透性异常升高,导致肠内有害物质可以通过“肠肝轴”<sup>[3]</sup>进一步加重肝损伤。清毒汤是王融冰教授采用“通肠治肝”方法治疗重症肝炎的经验方,且临床研究显示<sup>[4]</sup>,该方治疗慢性重型肝炎(chronic severe hepatitis, CSH)安全、有效。本研究通过观察清毒汤对重症肝损伤大鼠血清总胆红素(total bilirubin, TBIL)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)和反映肠道黏膜通透性的二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、闭锁连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)及肠组织白细胞介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6的表达水平变化,了解该方对此类模型大鼠肠道黏膜通透性的影响,进而探讨该方治疗慢性重型肝炎的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量( $190 \pm 10$ )g,清洁级,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001,由北京维通利华实验技术有限公司提供,饲养于首都医科大学动物实验中心 SPF 级动物房,明暗交替时间为 12 小时,各组大鼠均自由饮水进食。

### 1.2 实验试剂和仪器

清毒汤药物组成:大黄 10 g、厚朴 10 g、枳实 10 g、茜草 9 g、生地黄 12 g,上述药物均购自北京同仁堂,由首都医科大学动物室煎制,制备成生药含

量 1.5 g/mL 的水煎剂,于 4℃ 冰箱保存备用。硫代乙酰胺与乳果糖均购自北京科奥科技有限公司,生产批号分别为 S0646、ka0009454; IL-1 $\beta$ 、IL-6 ELISA 试剂盒购自 MultiSciences,生产批号分别为 20160315214、20163254158; ZO-1 抗体购自 Santa cruz,生产批号:SC-8146; DAO 购自南京建成生物工程研究所。

日立 7600 生化仪; Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Fisher Scientific, USA); 电热恒温培养箱(DH4000A, 天津泰斯特); 高速冷冻离心机(XIANGYI); Image Pro 6.0 (Media Cybernetics 公司)。

### 1.3 造模及给药

所有大鼠在动物房进行适应性喂养一周后,随机分为正常组与造模组。本实验采用硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导大鼠肝重度损伤模型<sup>[5]</sup>。前 8 周造模组予以 TAA 12 mg/(kg · d)进行灌胃,并在第 8 周末将所有造模组随机分为模型组、乳果糖治疗组、清毒汤治疗组(小剂量、中剂量、大剂量组)。从第 9 ~ 12 周,除正常组外,所有组大鼠予以 TAA 的量增加至 36 mg/(kg · d),乳果糖组则给予 3.5 mL/(kg · d)的乳果糖;清毒汤小、中、大剂量组给予清毒汤生药剂量分别为 2.98 g/(kg · d)、5.95 g/(kg · d)、11.9 g/(kg · d)。造模及治疗期间,正常组给予等容积的生理盐水灌胃作为对照。所有动物在实验条件下自然饮食,在造模第 12 周末夜间禁食。

### 1.4 标本制备

上述各组大鼠在第 12 周末禁食 12 小时后,采

用 10% 的水合氯醛以 3.5 mL/100g 的给药量进行腹腔注射麻醉。于腹主动脉无菌取血, 3000 rpm, 4℃, 离心 10 分钟, 取其上清液分装, -80℃ 冰箱保存备用。肝、肠组织分装于冻存管内, 用液氮进行速冻, 随后将组织移至 -80℃ 冰箱存放。

### 1.5 指标检测

血清中 TBIL、AST、DAO 含量采用日立 7600 生化仪进行测定。结肠组织中 ZO-1 采用 Western Blot 法; IL-1 $\beta$ 、IL-6 采用 ELISA 法检测, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 计量数据以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 组间比较采用方差分析进行, 若组间方差齐, 采用 LSD 检验, 如结肠组织 ZO-1; 若组间方差不齐, 采用 Tamhane's T2 检验, 如血清 TBIL、AST、DAO、结肠组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义,  $P<0.01$  为有显著统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 血清 TBIL、AST、DAO 的变化情况

与正常组相比较, 模型组血清中 TBIL、AST 和 DAO 的含量均呈显著性增高 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比较, 乳果糖组与清毒汤小、中剂量组大鼠中 TBIL、AST、DAO 含量显著性下降 ( $P<0.01$ ); 与乳果糖比较, 清毒汤中剂量组 TBIL、AST、DAO 含量明显下降 ( $P<0.05$ ), 但小剂量组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 1、表 2。

DAO 属于血清检测指标之一, 由于同一批动物的血清要用于测多个不同的指标, 所以在检测时可以根据具体需要自行分配, 并且血清指标只需要每组大于或等于 6 只即有统计可行性, 所以此组实验为 8 只。

表 1 各组大鼠血清 TBIL、AST 的变化情况比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	TBIL ( $\mu\text{mol/L}$ )	AST (U/L)
正常组	10	1.18 $\pm$ 0.76	103.47 $\pm$ 14.55
模型组	10	21.79 $\pm$ 5.02 <sup>a</sup>	336.91 $\pm$ 54.39 <sup>a</sup>
乳果糖组	10	4.87 $\pm$ 1.53 <sup>c</sup>	180.72 $\pm$ 28.68 <sup>c</sup>
清毒汤小剂量组	10	5.03 $\pm$ 1.17 <sup>c</sup>	185.04 $\pm$ 24.88 <sup>c</sup>
清毒汤中剂量组	10	2.91 $\pm$ 0.48 <sup>cd</sup>	141.42 $\pm$ 10.66 <sup>cd</sup>
清毒汤大剂量组	10	9.79 $\pm$ 4.57 <sup>c</sup>	250.52 $\pm$ 42.91 <sup>bc</sup>

注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P<0.05$ , <sup>c</sup> $P<0.01$ ; 与乳果糖组相比, <sup>d</sup> $P<0.05$ , <sup>e</sup> $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠血清 DAO 的变化情况比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

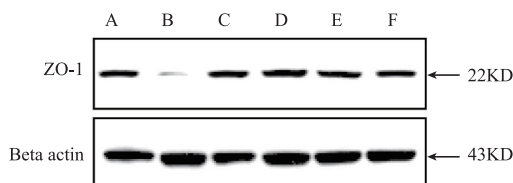
组别	n	DAO (U/L)
正常组	8	3.89 $\pm$ 2.21
模型组	8	22.69 $\pm$ 4.14 <sup>a</sup>
乳果糖组	8	11.51 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>
清毒汤小剂量组	8	11.60 $\pm$ 0.47 <sup>b</sup>
清毒汤中剂量组	8	9.19 $\pm$ 1.35 <sup>bc</sup>
清毒汤大剂量组	8	12.97 $\pm$ 0.39 <sup>bd</sup>

注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与乳果糖组相比, <sup>c</sup> $P<0.05$ , <sup>d</sup> $P<0.01$ 。

### 2.2 结肠组织 ZO-1 蛋白的表达水平

与正常组相比, 模型组大鼠结肠组织中 ZO-1 蛋白的表达量呈显著性降低 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, ZO-1 蛋白的表达水平在所有治疗组中均有显著性升高 ( $P<0.01$ ); 与乳果糖组比较, 清毒汤中剂量组的 ZO-1 含量显著性升高 ( $P<0.01$ )。见图 1、表 3。

Western Blot 法在外文文献中只需要满足每组大于或等于 3 只即可, 而在中文文献中要求满足每组大于或等于 5 只即可, 所以此组为 5 只。



注: A: 正常组; B: 模型组; C: 乳果糖组; D: 清毒汤小剂量组; E: 清毒汤中剂量组; F: 清毒汤大剂量组

图 1 各组大鼠结肠组织 ZO-1 蛋白的表达

表 3 各组大鼠结肠组织 ZO-1 蛋白的表达水平比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	结肠 ZO-1 表达水平
正常组	5	0.61 $\pm$ 0.07
模型组	5	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
乳果糖组	5	0.29 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
清毒汤小剂量组	5	0.33 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
清毒汤中剂量组	5	0.49 $\pm$ 0.08 <sup>bc</sup>
清毒汤大剂量组	5	0.31 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>

注: 与正常组相比, <sup>a</sup> $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>b</sup> $P<0.01$ ; 与乳果糖组相比, <sup>c</sup> $P<0.01$ 。

### 2.3 结肠组织白细胞介素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达水平

与正常相比较, 模型组结肠组织白细胞介素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达水平均呈显著性增高 ( $P<0.01$ ); 与模型组相比较, 乳果糖组、清毒汤中剂量组 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量均呈显著性降低 ( $P<0.01$ ); 与乳果糖组

比较,清毒汤中剂量组的 IL-1 $\beta$  及小剂量组的 IL-6 呈明显下降 ( $P<0.05$ ),但大剂量组无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见表 4。

若为血清指标,那么需要每组大于或等于 6 只才有统计可行性。组织指标每组只数的选定要求则没有血指标高,所以该结肠组织白细胞介素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 每组的只数为 6 只。

表 4 各组大鼠结肠组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的表达水平 ( $\bar{x}\pm s$ , (pg/mL))

组别	n	结肠 IL-1 $\beta$	结肠 IL-6
正常组	6	4.19 $\pm$ 2.73	77.47 $\pm$ 24.78
模型组	6	138.55 $\pm$ 14.75 <sup>a</sup>	653.09 $\pm$ 125.26 <sup>a</sup>
乳果糖组	6	49.58 $\pm$ 7.27 <sup>c</sup>	227.06 $\pm$ 56.14 <sup>c</sup>
清毒汤小剂量组	6	80.14 $\pm$ 24.96 <sup>b</sup>	394.24 $\pm$ 67.85 <sup>bd</sup>
清毒汤中剂量组	6	25.42 $\pm$ 9.87 <sup>cd</sup>	196.69 $\pm$ 41.36 <sup>c</sup>
清毒汤大剂量组	6	93.85 $\pm$ 30.32	374.99 $\pm$ 122.15 <sup>b</sup>

注:与正常组相比,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与乳果糖组相比,<sup>d</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

肝脏是人体的主要解毒器官,正常情况下,肝脏发挥免疫监视与调控的作用,可清除来自肠道的包括内毒素、氨、酚类在内的各种成分,并使之成为无毒或溶解度较大的物质,随胆汁或尿液排出体外。当肝脏功能由于病毒性、酒精性、药物性等致病因素而受到严重损伤时,肝脏解毒、灭活能力下降,导致排泄到肠道的毒物增加,致使肠腔黏膜下毛细血管及静脉扩张瘀血,进而出现肠黏膜充血、水肿、糜烂,肠道微生态系统失衡,肠道黏膜屏障功能遭到破坏,造成肠道通透性增加,进而引发肠腔内的革兰氏阴性细菌大量增殖、移位及大量内毒素释放入血,当血中的内毒素含量超过机体清除能力则形成肠源性内毒素血症。来自肠道的内毒素又会对肝脏造成“第二次打击”,加重肝损伤<sup>[6-7]</sup>,如此形成恶性循环,增加了重症肝损伤类疾病的治疗难度。因此,减少肠道黏膜损伤,降低其通透性对预防内毒素血症的产生,从而减轻肝脏损伤的方面具有极其重要的作用。尚有学者认为肠道黏膜屏障是维持机体内环境相对稳定的第一道防线<sup>[8-9]</sup>。

本实验结果显示,与正常组比较,模型组大鼠

血清 TBIL、AST、DAO 及其结肠组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的含量显著性升高 ( $P<0.01$ ),其结肠 ZO-1 蛋白的表达水平呈显著性降低 ( $P<0.01$ );与模型组相比较,所有治疗组(乳果糖组及清毒汤小、中、大剂量组)在血清 TBIL、AST、DAO 及结肠 ZO-1 蛋白的表达水平方面均有不同程度的改善;与乳果糖组相比较,在本次检验的所有指标中,清毒汤中剂量组改善效果尤为明显。故据此推测具有滋阴通腑、凉血化瘀功效的清毒汤可能是从通过针对重症肝损伤病机<sup>[10]</sup>的方面入手,改善肠道环境、保护肠道黏膜屏障,降低肠道黏膜通透性,从而减少内毒素的产生、吸收和促进内毒素的清除,进而减少其通过肝肠循环途径加重肝损伤的发生机率而达到改善肝功能的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Cariello R, Federico A, Sapone A, et al. Intestinal permeability in patients with chronic liver diseases: It's relationship with the aetiology and the entity of liver damage [J]. Digestive and Liver Disease, 2010, 42(3): 200-204.
- [2] 宋怀宇, 姜春华, 杨建荣, 等. 重度慢性乙型肝炎患者肠黏膜通透性的变化及相关因素分析 [J]. 山东医药, 2010, 50(25): 27-28.
- [3] Loguercio C, De Simone T, Federico A, et al. Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage? [J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(8): 2144-2146.
- [4] 王融冰, 刘军民, 吴云忠, 等. 清毒汤治疗肝病肠源性内毒素血症临床观察 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2004, 14(3): 135-137.
- [5] 高连印, 车念聪, 王融冰, 等. 清毒汤对 TAA 致肠源性内毒素血症大鼠肝脏库普弗细胞 CD14 和清道夫受体表达的影响 [J]. 北京中医药, 2011, 30(12): 947-948.
- [6] Nolan JP. The role of intestinal endotoxin in liver injury: a long and evolving history [J]. Hepatology, 2010, 52(5): 1829-1835.
- [7] Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11(5): 613-619.
- [8] 刘玉凤. DSS 所致的慢性实验性结肠炎加重 CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化及其机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [9] 林睿. 肠黏膜屏障损伤对自身免疫性肝炎患者枯否细胞免疫调节功能影响的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [10] 罗佳佳, 曹吴冰, 高连印. 重型肝炎肠源性内毒素血症的中药治法初探 [J]. 继续医学教育, 2015, 29(12): 155-156.

(收稿日期: 2016-07-12)

(本文编辑: 禹佳)