

清毒汤对实验性重症肝损伤大鼠内毒素及 D-乳酸表达的影响

曹吴冰 高连印 车念聪 张秋云 杜宇琼 付修文 王融冰 罗佳佳

【摘要】 目的 观察清毒汤对实验性重症肝损伤大鼠丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、内毒素、凝血酶原活动度 (prothrombin activity, PTA) 及 D-乳酸表达的影响, 探讨该方治疗慢性重型肝炎内毒素血症的作用机制。**方法** 建立 TAA 致实验性大鼠重症肝损伤模型, 清毒汤干预后, 检测大鼠 ALT、内毒素、PTA 及 D-乳酸的表达水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠 ALT、内毒素、D-乳酸水平均显著升高 ($P < 0.01$), PTA 水平显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 清毒汤低、中剂量组及乳果糖组血清 ALT、内毒素、PTA 及 D-乳酸表达水平均有不同程度的改善 ($P < 0.05$), 清毒汤高剂量组除血清内毒素含量外各指标均明显改善 ($P < 0.05$); 与乳果糖组比较, 清毒汤中剂量组除 PTA 外各指标均不同程度降低 ($P < 0.05$), 低剂量组各指标均无明显差异 ($P > 0.05$), 高剂量组除 PTA 外各指标明显高于乳果糖组 ($P < 0.05$)。**结论** 清毒汤对实验性肝损伤大鼠有较好的改善肝损伤和降低内毒素表达的作用, 尤其中剂量组最为明显, 推测其作用机制可能与降低肠道通透性相关。

【关键词】 肝损伤; 内毒素; 硫代乙酰胺; 凝血酶原活动度; D-乳酸

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.015

Effects of Qingdu decoction on endotoxin and D-lactic acid expressions in the rats with experimental severe liver injury CAO Wu-bing, GAO Lian-yin, CHE Nian-cong, et al. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China

Corresponding author: GAO Lian-yin, E-mail: gly066@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Qingdu decoction on the expressions of alanine aminotransferase (ALT), endotoxin, prothrombin activity (PTA) and D-lactic acid in rats with severe liver injury and explore the mechanism of Qingdu decoction on treating Chronic severe hepatitis complicated with endotoxemia. **Methods** The severe liver injury rat model was induced by Thioacetamide (TAA), and treated with Qingdu decoction. And then the blood level of ALT, endotoxin, PTA and D-lactic acid were measured. **Results** The expression levels of ALT, endotoxin and D-lactic acid in the model group were significantly increased and PTA was significantly decreased compared to that of in the Normal Group ($P < 0.01$). Compared to the model group, the level of ALT, endotoxin, PTA and D-lactic acid in middle and low dose Qingdu decoction groups and Lactulose group were improved significantly ($P < 0.05$). All indexes expressions except endotoxin in the high dose Qingdu decoction group were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to the Lactulose group, all indexes expressions except PTA in the middle dose

基金项目: 北京市自然科学基金(7142023); 北京市教委课题(KM2011100025206)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学中医药学院[曹吴冰(硕士研究生)、高连印、车念聪、张秋云、杜宇琼、罗佳佳(硕士研究生)]; 首都医科大学校医院内科(付修文); 首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合科(王融冰); 中医络病研究北京市重点实验室(曹吴冰、高连印、车念聪、张秋云、杜宇琼、罗佳佳)

作者简介: 曹吴冰(1990-), 女, 2013 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: xk.bangbang@163.com

通讯作者: 高连印(1966-), 女, 博士, 硕士生导师。研究方向: 中医药防治慢性肝病机制研究。E-mail: gly066@sina.com

Qingdu decoction group were decreased significantly ($P < 0.05$). All indexes in the low dose group had no significant difference ($P > 0.05$), while all indexes expressions except PTA in the high dose group were significantly higher than the Lactulose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Qingdu decoction can improve liver injury and decrease endotoxin in rats with experimental hepatic injury complicated with endotoxemia, especially in the middle dose group. The mechanism could be related to the reduction of intestinal permeability.

【Key words】 Liver injury; Endotoxin; Thioacetamide; Prothrombin activity; D- lactic acid

慢性重型肝炎(chronic severe hepatitis, CSH)是由多种因素引起严重的肝脏损害,其具有起病急、病情重、进展快、并发症多等特点,其病死率约为 50%~90%^[1-2]。研究表明,慢性重型肝炎可引起肠道通透性增加,诱发肠源性内毒素血症,其发生率高达 100%^[3]。清毒汤是国家级名老中医王融冰治疗肝病肠源性内毒素症的经验方,前期研究证实清毒汤临床治疗本症安全有效,本研究拟建立硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)致实验性大鼠重症肝损伤模型,通过观察清毒汤对模型大鼠丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、内毒素、凝血酶原活动度(prothrombin activity, PTA)及 D-乳酸的影响,进一步研究清毒汤通过降低肠道通透性治疗肝损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体质量 180~200 g,清洁级,动物许可证号:SCXK(京)2012-0001,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,饲养于首都医科大学动物实验科学部 SPF 级动物室,实验期间,动物自由摄食、饮水,各组大鼠均喂普通饲料。

1.2 药物与试剂

清毒汤组成:大黄 10 g、枳实 10 g、厚朴 10 g、生地 12 g、茜草 9 g,上述药物购自北京同仁堂,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,4℃冰箱保存备用。乳果糖购自北京科奥科技有限公司,生产批号:ka0009454;硫代乙酰胺购自北京科奥科技有限公司,生产批号:S0646;凝血酶试剂盒购自美国贝克曼公司;内毒素试剂盒购自南京建成生物工程研究所;D-乳酸试剂盒购自 BioAssay Systems(美国博士公司)。

1.3 主要仪器

凝血分析仪(ACL-TOP700,美国贝克曼公司),Multiskan MK3 酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公

司),日立 7600 生化仪。

1.4 造模分组及给药

大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为正常组和造模组。前 8 周造模组给予 12 mg/kg 的 TAA 灌胃。第 9 周开始,将 TAA 剂量调整为 36 mg/kg。同时,将造模组随机分为模型组、乳果糖组、清毒汤(高、中、低剂量)组。各中药组每天 1 次灌服清毒汤浓缩液,剂量为 11.9 g/kg、5.95 g/kg、2.98 g/kg。乳果糖组每天 1 次灌服 3.5 mL/kg 乳果糖。正常组和模型组给以同等容积的生理盐水灌服作为对照。所有组连续给药至第 12 周。

1.5 标本制备

第 12 周末,大鼠禁食 12 小时后,用 10% 水合氯醛按 3.5 mL/100 g 体质量腹腔注射麻醉,仰卧位固定,打开腹腔,观察肝脏的色、质、形态和体积。于腹主动脉无菌取血,3 mL 注射于抗凝管,2 小时内送检;剩余血注射于无菌真空采血管,3000 rpm 离心 10 分钟后,取上清分装,-80℃保存备用。取部分肝置入 4% 多聚甲醛和电镜液中,置-4℃冰箱保存。

1.6 指标检测

ALT 采用全自动生化检测仪检测,凝血酶原活动度采用全自动凝血仪检测,内毒素采用酶联免疫吸附法检测,D-乳酸采用比色法检测,各项指标检测均严格按照试剂盒说明执行。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各指标经正态检验,符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA);ALT、PTA、D-乳酸组间方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验;内毒素组间方差齐性,采用 LSD 检验。各种检验的显著性水平均设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能血清学结果

与正常组比较,模型组大鼠血清 ALT 活性浓度

显著升高($P<0.01$);与模型组比较,乳果糖组及清毒汤低、中剂量组大鼠血清 ALT 活性浓度均显著下降($P<0.01$),清毒汤高剂量组 ALT 明显下降($P<0.05$)。与乳果糖组比较,清毒汤中剂量组 ALT 明显下降($P<0.05$),清毒汤低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。清毒汤高剂量组 ALT 显著高于乳果糖组($P<0.01$)。提示清毒汤具有降低实验性肝损伤大鼠血清 ALT 活性浓度的作用,其中中剂量组效果比乳果糖组更明显,低剂量组效果与乳果糖组相当,高剂量组效果比乳果糖组较差。结果见表 1。

表 1 各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶活性浓度的比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	ALT(U/L)
正常组	8	40.20±7.68
模型组	8	135.75±4.56 ^a
乳果糖组	8	68.05±8.77 ^c
清毒汤低剂量组	8	77.85±10.65 ^c
清毒汤中剂量组	8	52.76±8.47 ^{cd}
清毒汤高剂量组	8	102.40±33.6 ^{bc}

注:与正常组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与乳果糖组比较:^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠血清内毒素含量结果

与正常组比较,模型组大鼠血清内毒素含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,乳果糖组及清毒汤低、中剂量组大鼠血清内毒素含量均显著下降($P<0.01$),清毒汤高剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。与乳果糖组比较,清毒汤中剂量组内毒素含量显著下降($P<0.01$),低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),高剂量组内毒素含量明显高于乳果糖组($P<0.05$)。提示大鼠实验性肝损伤内毒素血症模型造模成功,清毒汤具有降低实验性肝损伤大鼠血清内毒素含量的作用,其中中剂量组效果最明显,低剂量组效果与乳果糖组相当。结果见表 2。

表 2 各组大鼠血清中内毒素含量比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	内毒素(EU/L)
正常组	8	70.01±13.41
模型组	8	109.33±12.44 ^a
乳果糖组	8	92.33±4.56 ^b
清毒汤低剂量组	8	92.87±4.63 ^b
清毒汤中剂量组	8	76.93±7.58 ^{bd}
清毒汤高剂量组	8	101.87±1.69 ^c

注:与正常组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.01$;与乳果糖组比较:^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

2.3 各组大鼠凝血酶原活动度结果

与正常组比较,模型组大鼠 PTA 显著下降($P<0.01$);与模型组比较,清毒汤高剂量组及乳果糖组明显升高($P<0.05$),清毒汤低、中剂量组大鼠 PTA 显著升高($P<0.01$)。与乳果糖组比较,清毒汤各组 PTA 差异无统计学意义($P>0.05$)。提示清毒汤具有提高实验性肝损伤大鼠 PTA 的作用。结果见表 3。

表 3 各组大鼠凝血酶原活动度比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	PTA(%)
正常组	7	124.29±7.78
模型组	7	36.57±8.40 ^a
乳果糖组	7	62.43±14.22 ^b
清毒汤低剂量组	7	79.29±13.11 ^c
清毒汤中剂量组	7	94.14±23.91 ^c
清毒汤高剂量组	7	60.43±11.79 ^b

注:与正常组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与乳果糖组比较:^d $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠血清 D-乳酸含量结果

与正常组比较,模型组大鼠血清 D-乳酸含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,乳果糖组及清毒汤低、中剂量组大鼠 D-乳酸含量均显著下降($P<0.01$),清毒汤高剂量组 D-乳酸含量明显下降($P<0.05$)。与乳果糖组比较,清毒汤中剂量组 D-乳酸含量明显下降($P<0.05$),清毒汤低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$)。清毒汤高剂量组 D-乳酸显著高于乳果糖组($P<0.01$)。提示清毒汤具有降低实验性肝损伤大鼠血清 D-乳酸含量的作用,其中中剂量组效果比乳果糖组更明显,低剂量组效果与乳果糖组相当,高剂量组效果比乳果糖组较差。结果见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 D-乳酸含量比较($\bar{x}\pm s$)		
组别	<i>n</i>	D-乳酸(Mm/L)
正常组	8	0.41±0.14
模型组	8	1.65±0.31 ^a
乳果糖组	8	0.73±0.07 ^c
清毒汤低剂量组	8	0.79±0.15 ^c
清毒汤中剂量组	8	0.60±0.06 ^{cd}
清毒汤高剂量组	8	1.14±0.14 ^{bc}

注:与正常组比较:^a $P<0.01$;与模型组比较:^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与乳果糖组比较:^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

3 讨论

研究表明,肠源性内毒素是慢性重型肝炎发生

和病情加重的重要因素^[4]。肝组织损伤后产生大量炎性因子作用于肠道,一方面引起肠道菌群失调,另一方面损伤肠道黏膜屏障,造成大量内毒素由门静脉进入肝脏^[5],这些内毒素进一步刺激加重肝损伤。因此,修复肠道黏膜屏障,减少内毒素进入是阻断疾病进展的关键环节。

D-乳酸是胃肠道固有细菌代谢、裂解的产物,正常情况下很少能被吸收,体内亦没有快速降解的酶系统。当肠道细菌过度生长时可产生大量的D-乳酸,在肠黏膜通透性增加时进入血循环,使血中D-乳酸水平升高。因此监测其水平可及时反映肠黏膜损伤状况及肠黏膜通透性^[6]。研究表明^[7],乳果糖能通过降低肠道通透性,保护肠黏膜功能,从而明显地降低血清内毒素水平,对肝硬化的治疗具有较好的疗效^[8]。

根据慢性重型肝炎内毒素血症临床表现,当隶属于中医学“疫毒”“疫黄”“臌胀”“黄疸”等病症的范畴。国家级名老中医王融冰教授认为慢性重型肝炎内毒素血症的病位在肝及肠络,病机乃因虚致实,虚者肝体受损,多脏俱虚,实者乃毒瘀胶着,毒损肠络,据此提出“通肠治肝”的方法,并创制了清毒汤。清毒汤由《伤寒论》中的小承气汤化裁而来,其中大黄、枳实、厚朴清热解毒、通腑攻下,生地黄、茜草滋阴凉血。该方通过通腑攻下以降低肠道通透性,抑制内毒素的产生,从而阻断内毒素对肝脏的第二次打击,降低肝损伤。

本实验结果显示,模型组大鼠血清ALT、内毒素、D-乳酸水平较正常组显著提高,PTA显著下降。

经清毒汤治疗后,ALT、内毒素、D-乳酸均明显下降,PTA明显升高,尤其清毒汤中剂量组效果显著。提示清毒汤对TAA致实验性肝损伤大鼠具有保护肝脏,改善肝功能,减少血清中内毒素以及D-乳酸含量的作用。推测其机制是通过降低肠道通透性减少内毒素及D-乳酸入血,达到保护肝脏的作用,但是清毒汤从肠治肝的机制有待进一步探究。

参 考 文 献

- [1] 张文思,陈晓蓉. 中药灌肠治疗重型肝炎的临床研究现状[J]. 西部中医药,2015,28(1):134-137.
- [2] Laleman W, Verbeke L, Meersseman P, et al. Acute-on-chronic liver failure: current concepts on definition, pathogenesis, clinical manifestations and potential therapeutic interventions[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 5(4):523-537.
- [3] 汪承柏. 重视慢性肝炎内毒素血症的防治[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001, 11(4):193-194.
- [4] 刘慧敏,王宪波,常玉娟,等. 中西医结合治疗慢性重型肝炎随机对照试验的系统评价和meta分析[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(11):1211-1228.
- [5] 李坤,沈天白,李莹. 肠道菌群与慢性肝病的研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(6):377-380.
- [6] Petersen C. D-lactic acidosis[J]. Nutr Clin Pract, 2005, 20(6):634-645.
- [7] 季晓军,王伟军. 乳果糖对乙肝后肝硬化患者肝功能、炎症及肠道通透性水平的影响[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(9):1158-1161.
- [8] 徐红,李峥,金水忠. 乳果糖治疗乙型肝炎后肝硬化内毒素血症的疗效观察[J]. 中国临床新医学, 2011, 4(5):451-453.

(收稿日期: 2015-04-13)

(本文编辑:董历华)

· 信息之窗 ·

北京医学美容培训班举办通知

为学习交流医学美容及化妆品研发在临床和科研中的新经验、新技术、新成果,北京中西医结合学会医学美容专业委员会与《环球中医药》杂志社将于2016年1月8-9日在北京蟹岛会议中心联合举办北京医学美容培训班。北京协和医院左亚刚教授、北京友谊医院赵俊英教授、等十位名家作演讲报告。

征文:1、中医美容学的考证研究与文献整理研究;2、中西医医学美容学术研究新进展;3、中西医结合美容实践中的辩证论治思路、临床应用体会、验案总结分析;4、中医美容学与养生、保健、预防、康复等方面的研究;5、现代美容技术激光、整形医学与中医美容学的应用与研究;6、化妆品、保健品的开发与研究。

培训费用每人800元,学生400元,11月30日前报名700元。

欢迎从事中西医结合医学美容、激光、整形、健体、养生、中医调理、化妆品、保健品等临床和研发的技术人员、专家积极参加培训。

联系人:穆老师:010-65269860,18210073639,范老师:13651113871。