

清热解毒化浊片对肠源性内毒素血症大鼠肝肺促炎因子 IL-8 及抗炎因子 IL-10 的影响*

毛娅男, 赵国荣[△], 连俊凯, 陈研焰, 李雄安, 何宜荣, 艾碧琛

(湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨清热解毒化浊片对肠源性内毒素血症(IETM)大鼠肝肺促炎因子 IL-8 及抗炎因子 IL-10 的影响。**方法** 采用高脂、糖、酒精复合因素干预 12 周建立 IETM 肝肺损伤大鼠模型。造模成功后,随机分为清热解毒化浊片组、模型组和正常组 3 组。经治疗 4 周后观察肝、肺组织病理学改变,采用全自动生化仪检测血清谷氨酰氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰氨基转移酶(GGT)、碱性磷酸酶(ALP)活性,动态浊度法检测血浆内毒素(LPS),免疫组化二步法测定 IL-8、IL-10 在肝肺组织中的表达。**结果** 光镜下观察,清热解毒化浊片组大鼠肝、肺组织炎症浸润情况明显改善。与正常组比较,模型组血清 ALT、AST、GGT、ALP 明显升高($P<0.01$, $P<0.05$),血浆 LPS 明显升高($P<0.01$);肝、肺组织 IL-8 表达明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,清热解毒化浊片组血清 ALT、AST、GGT、ALP 均明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),血浆 LPS 明显降低($P<0.01$);肝、肺组织 IL-8 明显降低($P<0.01$),肝、肺组织 IL-10 明显升高($P<0.01$)。**结论** 本实验表明清热解毒化浊片可通过降低血浆 LPS,促进抗炎因子 IL-10 的表达,降低炎症因子 IL-8 的表达,改善 IETM 所致的肝、肺损伤。

关键词: 清热解毒化浊片; 肠源性内毒素血症; 促炎因子; IL-8; 抗炎因子; IL-10

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2015)06-0017-04

正常情况下,机体肠道内存在由大量 G-细菌释放的内毒素(LPS),由于肠道粘膜的屏障作用,肝巨噬细胞(KC)的清除作用,LPS 很难进入体循环,当肠粘膜完整性破坏,KC 吞噬能力障碍时,大量 LPS 入血,形成内毒素血症,引发全身炎症反应,因 LPS 来自于肠道,故称为肠源性内毒素血症(IETM)。IETM 形成后可激活 KC 大量释放炎症因子,造成肝、肺炎性损伤^[1],IETM 是急性肝衰竭、急性肺损伤、肝肺综合征、全身炎症反应综合征发生的重要原因。临床对于 IETM 的治疗重点在于改善并发症,控制病情,尚无针对 IETM 疗效确切的药物。清热解毒化浊片为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,具有减轻炎症反应,保肝护肝作用^[2]。前期研究表明清热解毒化浊片可降低血浆内毒素水平,终止肝损伤的恶性循环,达到减轻肝脏炎症性反应的目的^[3]。本研究拟建立 IETM 肝肺损伤大鼠模型,进一步探讨清热解毒化浊片对肝肺

的保护作用。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 70 只,体质量为(200±10)g,由湖南中医药大学实验动物中心提供。许可证号:SYXK(湘)2013-0005,合格证号:43004700007002。

1.2 药物与饲料

清热解毒化浊片由湖南中医药大学第一附属医院提供(批号:20140605),52°红星二锅头由北京红星股份有限公司提供(批号:20140128),大鼠普通饲料及高脂高糖饲料由湖南斯莱克景达实验动物公司提供。高脂高糖饲料综合文献[4]配制方法上进行改进,其组成为:77.3%基础饲料+0.2%丙基硫氧嘧啶+2%胆固醇+10%猪油+0.5%胆盐+8%蛋黄粉+2%白糖。

1.3 试剂与仪器

鲎试剂盒由湖南中医药大学第一附属医院肝

* 基金项目: 湖南省教育厅重点项目(12A101);湖南省教育厅研究生创新课题(CX2015B322);湖南中医药大学中医临床基础重点学科资助;湖南省方剂学重点学科资助

收稿日期: 2015-10-12

作者简介: 毛娅男(1985-),女,湖南张家界人,在读博士研究生,主要从事中西医结合肝病证治研究。

[△]通信作者: 赵国荣, E-mail: zhaogurong116@sina.com

病检测室提供,生化检测试剂盒由湖南中医药大学生化检测中心提供,IL-8、IL-10 兔抗鼠抗体均由武汉博士德生物工程有限公司提供,通用型 PV-9000 试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。罗氏全自动生化分析仪(罗氏公司生产),RT-6000 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司),Motic B5 显微成像系统(麦克奥迪实业集团公司),电热恒温箱(上海精宏实验设备有限公司),电热恒温干燥烤箱(北京中兴伟业仪器有限公司),石蜡切片机、摊片机(天津市久圣医疗电子仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备

综合文献[5-6]方法并加以改进,予高脂高糖饲料喂养大鼠,同时每天按 10mL/kg 剂量予 52°二锅头灌胃 1 次,并每周称大鼠体质量,根据体质量调整白酒剂量。以血液生化指标及肝、肺组织病理切片判断造模成功与否。

2.2 分组及给药

取 SD 大鼠 70 只,随机分为空白组(10 只)和造模组(60 只)。造模组大鼠按 2.1 方法进行造模。模型成功后,将造模组大鼠随机分为模型组(10 只)、清热解毒化浊片组(10 只),清热解毒化浊片组按 0.081g/mL 灌胃,模型组及正常组予等容积蒸馏水灌胃,每组动物灌胃量均为 1mL/100g·d⁻¹,连续给药 4 周。

2.3 取材及指标检测

末次给药结束后,禁食不禁水 12h,次日清晨,腹主动脉采血,3 000r/min,离心 10min,取血清,采用罗氏分析仪分别检测血清 ALT、AST、GGT、ALP 的含量,动态浊度法检测血浆 LPS 含量。同时,迅速摘取肝、肺脏,在肝、肺脏最大叶,距边缘 5mm 处取小块肝、肺组织,部分用 10%甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肝、肺组织病理学改变,部分用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,利用免疫组化 PV 二步法检测肝、肺组织中 IL-8、IL-10 含量,采用光学显微镜和全自动图像获取系统 Olympus DP71 在高倍镜视野(×400)下随机选取 5 个区域,测量并记录每个视野阳性染色的平均灰度值,作为该片的代表值,再计算该组的平均灰度,进行统计学比较。

2.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件处理。计量资料数据按

均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肝、肺组织病理学改变

正常组大鼠肝小叶轮廓清晰,肝细胞以中央静脉为中心向四周呈放射状排列。模型组可见肝小叶结构破坏,呈点、片状坏死,肝细胞水肿明显,胞质中可见大小不等、数量不一的圆形脂肪空泡,小叶中央静脉周围和汇管区有炎性细胞浸润。清热解毒化浊片组肝细胞轻微肿胀,结构较疏松,部分肝细胞内线粒体疏松,结构欠清晰。结果见图 1。

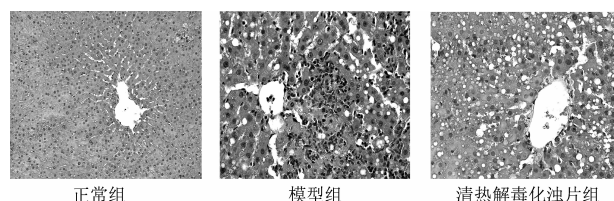


图 1 各组大鼠肝组织病理学形态观察(HE 染色×400)

正常组大鼠肺泡隔间距小,肺泡形态完整未见明显炎细胞浸润。模型组肺泡隔间距明显增宽,肺泡形态挤压,明显炎细胞浸润,有间质水肿可能。清热解毒化浊片组肺泡隔间距较正常组的增宽,肺泡形态完整可见少量炎细胞浸润。结果见图 2。

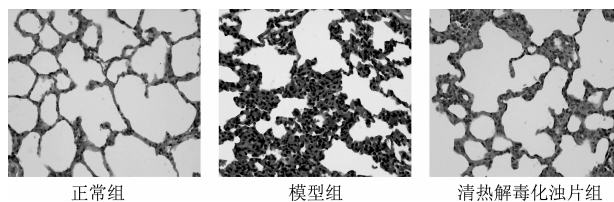


图 2 各组大鼠肺组织病理学形态观察(HE 染色×400)

3.2 清热解毒化浊片对大鼠血清 ALT、AST、GGT、ALP,血浆 LPS 的影响

与正常组比较,模型组具有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),提示造模成功。经治疗后,与模型组比较,清热解毒化浊片组血清 ALT、AST、GGT、ALP 均明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果见下页表 1。

3.3 清热解毒化浊片对大鼠肝、肺组织 IL-8、IL-10 的影响

与正常组比较,模型组大鼠肝、肺组织 IL-8 表达存在显著性差异($P < 0.01$)。经治疗后,与模型组比较,清热解毒化浊片组肝、肺组织 IL-8 表达明显降低($P < 0.01$),IL-10 表达升高($P < 0.05$)。结果见下页表 2、图 3-4、图 5-6。

表 1 各组大鼠 ALT、AST、GGT、ALP、LPS 的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	GGT/(U/L)	ALP/(U/L)	LPS/(EU/mL)
正常组	30.50±5.90	68.30±9.60	1.88±0.05	50.33±18.35	0.033±0.006
模型组	221.0±14.10 ^{△△}	204.40±20.00 ^{△△}	5.25±0.84 [△]	95.60±2.10 ^{△△}	0.045±0.006 [△]
清热解毒化浊片组	58.90±5.70 ^{###}	95.60±2.10 ^{###}	4.01±0.49 [#]	71.00±11.63 [#]	0.035±0.009 [#]

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

表 2 各组大鼠肝、肺组织 IL-8、IL-10 表达的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-8		IL-10	
	肝	肺	肝	肺
正常组	125.52±24.60	134.67±35.97	100.06±10.92	88.17±29.81
模型组	400.15±35.97 ^{△△}	355.57±76.18 ^{△△}	105.26±11.02	131.14±24.70
清热解毒化浊片组	131.15±27.69 ^{###}	164.11±29.94 ^{###}	110.04±15.29 [#]	240.78±62.40 [#]

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

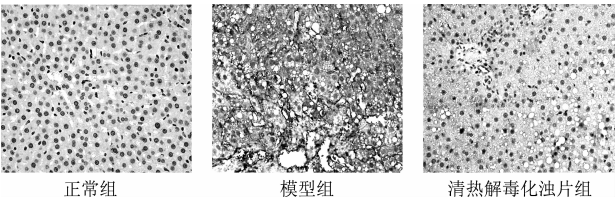


图 3 各组大鼠肝组织 IL-8 阳性表达观察(免疫组化×400)

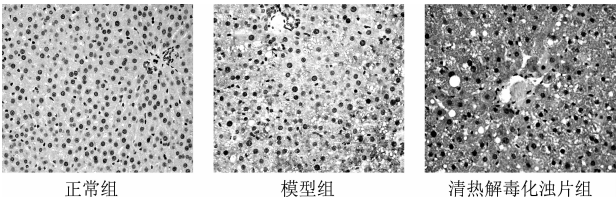


图 5 各组大鼠肝组织 IL-10 阳性表达观察(免疫组化×400)

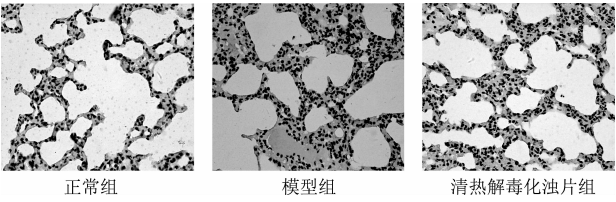


图 4 各组大鼠肺组织 IL-8 阳性表达观察(免疫组化×400)

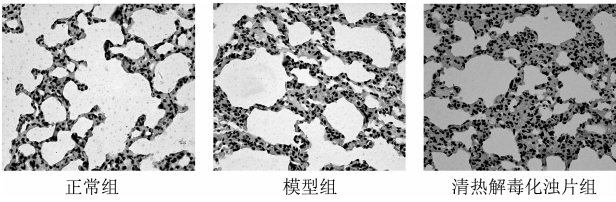


图 6 各组大鼠肺组织 IL-10 阳性表达观察(免疫组化×400)

4 讨论

中医尚无相应病名的论述与记载,据研究 G-细菌所引起的疾病类似湿热病证的特点,而湿热病患者血浆内毒素水平升高^[7],可见 IETM 的中医病因病机与湿热浊毒有关。过食肥甘、嗜酒贪杯,致脾失健运,湿浊内生,湿久酿热,热久蕴毒,湿热浊毒胶着,热蒸湿动,弥漫脏腑经络,出现各脏腑的湿热症状。因此,中医治疗 IETM 重点在于清热解毒,祛湿化浊。清热解毒化浊片由茵陈、滑石、木通、豆蔻仁、藿香、泽泻、黄芩、薄荷、连翘等组成,其中茵陈、木通、泽泻、滑石利湿化浊,导湿热从小便而出;藿香、豆蔻芳香化湿,导湿从表而解;黄芩、连翘、薄荷清热解毒,透热外达。全方分消上下,透达内外,共奏清热解毒、利湿化浊之效。临床发现,清热解毒化浊片对于湿热内蕴证患者有良好的治疗作用^[8]。本实验

通过高脂高糖、酒精等复合因素建立 IETM 肝、肺损伤大鼠模型,经清热解毒化浊片治疗后,肝、肺损伤减轻,提示 IETM 的形成与中医湿热浊毒密切相关。

多项研究认为 IETM 是肝、肺损伤,肝肺综合征形成的病理基础。IETM 引发肝脏“二次打击”,从而激活 KC 释放炎性介质如 TNF- α 、IL-1、IL-8 等,一方面炎性因子随血流入肺脏,导致肺脏炎性损伤;另一方面由于肝的解毒能力下降,被激活的肺内巨噬细胞代偿性清除 LPS,同时分泌大量活性物质如 NO、CO、TNF- α 、IL-1、IL-8 及其他的炎性介质,加重肺脏损伤^[9-10]。据文献报道,降低 LPS 水平,可直接拮抗 IETM 效应,达到减轻肝、肺炎性损伤的目的^[11],而前期研究发现清热解毒化浊片有降低患者血浆内毒素水平的作用。本研究通过复合因素建立 IETM 致肝、肺损伤大鼠模型,血浆 LPS 水平升高($P<$

0.05),血清 ALT、AST、GGT、ALP 明显升高($P<0.01$, $P<0.05$),肝、肺组织出现炎性浸润、结构破坏等病理学改变,提示造模成功。经清热解毒化浊片治疗后血浆 LPS 明显降低($P<0.01$),血清 ALT、AST、GGT、ALP 均明显降低($P<0.01$, $P<0.05$),肝、肺组织炎性细胞浸润减轻,结构较前清晰,与文献报道一致,提示清热解毒化浊片可减轻因 IETM 所致的肝、肺炎性损伤,其作用机制与降低血中 LPS 水平有关。

IL-8 是一种促炎症因子,能特异性地促进中性粒细胞的趋化、变形、脱颗粒、释放溶酶体酶等参与炎症反应,与多种炎症疾病的发生发展密切相关^[12]。当 IETM 形成后 LPS 即与 KC 中 TLR-4 受体结合导致 TLR-4 寡聚化而被激活,通过 MyD88 依赖和非 MyD88 依赖的两条途径触发一系列的信号级联反应,诱导 NF- κ B、AP-1 和 IRF-3 等转录因子磷酸化和核转位,上调 IL-8 的表达,大量 IL-8 释放入血,参与全身炎症反应^[13]。研究认为,降低 IL-8 的表达可减轻肝、肺组织的炎性损伤^[14-15]。本实验, IETM 致肝、肺损伤大鼠模型中,肝、肺组织炎性浸润, IL-8 表达水平明显升高($P<0.01$),经清热解毒化浊片治疗后肝、肺组织 IL-8 明显降低($P<0.01$),炎性损伤减轻,与文献报道一致,提示清热解毒化浊片具有降低 IL-8 水平,从而改善组织炎性损伤的作用。IL-10 是重要的抗炎因子,既能下调 T 淋巴细胞活性,抑制炎性细胞的激活、迁移和粘附,又可通过介导 IKK-b/NF- κ B 通路在转录水平上抑制炎症因子 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 等表达,改善炎症反应^[16]。本实验清热解毒化浊片组大鼠肝、肺组织均出现 IL-10 表达较其他组明显升高($P<0.01$),提示清热解毒化浊片可升高 IL-10 的水平,达到抗炎作用。

综上所述,清热解毒化浊片具有清热解毒、利湿化浊的功效,可治疗因 IETM 所致的浊毒蕴结,其作用机制与降低血浆 LPS 水平,促进抑炎因子 IL-10 的表达,降低促炎因子 IL-8 的释放,减轻肝、肺组织炎性损伤有关。

参考文献:

- [1] 杨喜艳,卢放根. 肠源性脂多糖的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2013,33(5):416-422.
- [2] 谢静,赵国荣,熊焰,等. 清热解毒化浊片对慢性病毒性肝

炎湿热内蕴证与肝郁脾虚证疗效的研究 [J]. 湖南中医学院学报,2003,23(6):33-35.

- [3] 赵国荣,曹军连,谢静,等. 不同剂量清热解毒化浊片对大鼠免疫性肝损伤治疗作用的对比研究 [J]. 中西医结合肝病杂志,2004,14(1):23-25.
- [4] 谢超敏,谭巧燕,饶子亮,等. 结合高脂饲料建立酒精性肝损伤大鼠模型的研究[J]. 实验动物科学,2009,26(3):11-13.
- [5] 刘庆丰,李中东,施孝金,等. 高脂血症非酒精性脂肪肝大鼠模型的建立[J]. 时珍国医国药,2013,24(1):171-172.
- [6] 王晓红,曹琦,李俊,等. 改良法大鼠酒精性脂肪肝模型的建立[J]. 安徽医科大学学报,2007,42(2):420-423.
- [7] 黄婉怡,王玉涛,王新华. 温病湿热证湿阻病机与红细胞特殊结构和功能的关系探讨 [J]. 广州中医药大学学报,2015,32(5):321-329.
- [8] 肖碧跃,赵国荣,艾碧琛,等. 清热解毒化浊片对病毒性肝炎肝损害疗效观察 [J]. 湖南中医药大学学报,2010,30(7):49-50.
- [9] Zhang HY, Han de W, Su AR, et al. Intestinal endotoxemia plays a central role in development of hepatopulmonary syndrome in a cirrhotic rat model induced by multiple pathogenic factors [J]. World J Gastroenterol,2007,13(47):6385-6395.
- [10] 杨勇,易斌,鲁开智. 肝肺综合征病理发生机制的研究进展[J]. 医学研究生学报,2013,26(10):1092-1094.
- [11] 贾建桃,张慧英,来丽娜,等. 丹参素对肝肺综合征大鼠肺脏的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志,2014,30(3):199-202.
- [12] 李瑶,吕德官,陈临溪. IL-8 及其受体药物与疾病的研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(3):310-314.
- [13] 陈怿,童华生,苏磊. 库普弗细胞在肠源性内毒素血症肝损伤中的作用[J]. 广东医学,2011,32(17):2350-2351.
- [14] 文秀芳,陈霞,邬海桥. 姜黄素通过抑制 TLR4 信号通路下调脂多糖诱导的肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8[J]. 云南中医学院学报,2013,36(6):45-48.
- [15] 冯芹,夏文凯,王现珍,等. 连翘苷元对四氯化碳大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2015,31(3):426-430.
- [16] 赵宁伟,殷志敏. 关于 IL-10 抗炎机制的研究[J]. 生命科学研究,2007,11(4):14-17.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 24 页)

- [11] 邓凯文, 贺福元. 中药归经研究的现状及“穴药”法的提出[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(10): 1643-1648.
- [12] 周祯祥. 试论中药临床功效分类 [J]. 山东中医药大学学报, 2001, 25(4): 247-250.
- [13] 赵军宁, 鄢良春, 宋军. 建立以“功效”为核心的新型中药质量评价模式 [J]. 中药药理与临床, 2010, 26 (5): 158-161.
- [14] 刘杰, 李文. 中医基本物质属性初探[J]. 云南中医学院学报, 2012, 35(5): 19-21.
- [15] 王怀隐. 太平圣惠方[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1958: 1385-1387.
- [16] 李璆, 张致远原辑; 释继洪纂修; 张效霞校注. 岭南卫生方[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2012, 6: 1-5.
- (编辑: 陈柏君)

Analysis of Medicine Property of Herbs Produced in Guangdong Province

CHEN Yanfen¹, LU Jun²

(1. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;
2. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: 222 herbs contained in “Guangdong Province Traditional Chinese Medicine Standards” are sorted according to the pharmacy property. This paper summed up that the most medicinal parts are the whole plant and rhizome, some herbs are poisonous, the characteristics of these medicinal partial are bitter and cold, the meridian give priority to live and lung, the most effects has focus on dispelling wind, removing humid and eliminating hot. Characteristics of Guangdong herbal medicines need to be further excavated in the treatment of warm finishing disease, rheumatism and widely used in clinical treatment.

KEY WORDS: Lingnan region; Authentic ingredients; Medicine property; Guangdong province

(原文见第 17 页)

Effect of Qingre Jiedu Huazhuo Tablets on IL-8 and IL-10 in Rat Model of Liver and Lung Injuries Induced by Intestinal Endotoxemia

MAO Yanan, ZHAO Guorong, LIAN Junkai, CHEN Yanyan, LI Xiongan, HE Yirong, AI Bichen
(College of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: Objective To study effect of Qingre Jiedu Huazhuo tablets on IL-8 and IL-10 in rat model of liver and lung injuries induced by intestinal endotoxemia(IETM). **Methods** The rat liver model was established by feeding them high sugar, fat and liquor. The rats were randomly divided into 3 groups. Qingre Jiedu Huazhuo tablets were used to treat liver inflammatory model rat for 4 weeks. The content of blood serum alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), gamma glutamyltransferase(GGT), alkaline phosphatase(ALP) were measured by colorimetry, lipopolysaccharides(LPS) was measured by tachypleus amebocyte lysate (TAL), Pathologic change of liver was measured by a microscope, the two-step method of immunohistochemistry (IH) was adopted to test portein expression of liver and lung tissues interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10). **Results** Light microscopic inspection; the Qingre Jiedu Huazhuo tablets can suppress liver and lung inflammation. The expression of serum ALT, AST, GGT, ALP in model group were markedly higher than those in normal control group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The expression of plasma LPS was markedly higher too ($P < 0.01$); The expression of IL-8 in liver and lung were markedly higher than those in normal control group ($P < 0.01$). Compared with model group, the serum expression of ALT, AST, GGT, ALP were significantly lower in Qingre Jiedu Huazhuo tablets group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The expression of plasma LPS was markedly lower too ($P < 0.01$). Qingre Jiedu Huazhuo tablets can significantly reduce the gray sale of IL-8 ($P < 0.01$) and increase the gray sale of IL-10 ($P < 0.01$). **Conclusions** Qingre Jiedu Hua zhuo tablets can resist inflammatory injury, which mechanism may be associated with reduced promoting inflammatory cytokines IL-8 and LPS, release the anti-inflammatory cytokine IL-10 expression.

KEY WORDS: Qingre Jiedu Huazhuo tablets; intestinal endotoxemia; inflammatory cytokines; IL-8; anti-inflammatory cytokine; IL-10