

桃核承气汤对脓毒症大鼠不同脏器组织损伤的影响^{*}

杨荣源,王大伟,李际强^{**},刘云涛,黄宏强

(广东省中医院 广州 510120)

摘要:目的:观察桃核承气汤对脓毒症大鼠不同脏器组织的影响。方法:将雄性清洁级SD昆明大鼠100只随机分为正常对照组、模型对照6h组、模型对照12h组、桃核承气汤6h组和桃核承气汤12h组。正常对照组不作任何处理,其余组别采用经典的盲肠结扎穿孔法(CLP)复制脓毒症动物模型,模型组每只大鼠每天按1 mL/100 g体质量灌胃给予生理盐水,核承气汤组每只大鼠每天按1 mL/100 g体质量予桃核承气汤药液灌胃,7天后造模。大鼠造模成功后6h、12h分别采集肺、心脏、肾、肝、小肠组织标本,光镜和电镜观察各组不同组织病理形态学改变情况。结果:与同时点模型组比较,桃核承气汤组大鼠肺、心、肾组织病理形态学改变不明显,桃核承气汤12h组大鼠肝、小肠组织病理形态学变化比较明显,两组病理形态学评分比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:桃核承气汤对CLP脓毒症大鼠肝、小肠组织具有保护作用,其作用机制尚待进一步研究。

关键词:桃核承气汤 脓毒症 脏器保护 组织损伤

doi: 10.11842/wst.2013.09.011

中图分类号:R965

文献标识码:A

脓毒症(Sepsis)发生发展过程中,受严重感染、创伤、大手术等因素刺激,直接或间接地均存在肠道功能不全、肠屏障功能的损害,由此造成肠道细菌及内毒素大量移位至肠道外,通过横向移位和纵向移位,对机体的邻近及远隔器官造成损害,引发全身炎症反应综合征(Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)和多脏器功能障碍综合征(Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS)的发生。目前,脓毒症及其诱发的多器官功能障碍仍然是临床治疗中颇为棘手的难题。从中医视角认识、治疗脓毒症成为研究的重点方向。基于微循环障碍和肠道菌毒移位这两个脓毒症关键的病理生理改变,我们认为“血瘀腑实”是促使脓毒症进展为MODS的主要原因,早期应用活血化瘀、通腑攻下

(而不是传统的清热解毒)可能及时纠正上述病理改变,达到预防和治疗SIRS,并最终阻止其向MODS演化的目的。

因此,本研究重点观察具备活血化瘀、通腑攻下两方面功效的桃核承气汤对盲肠结扎穿孔结(Cecal Ligation and Puncture, CLP)脓毒症大鼠肺、心、肾、肝、小肠组织损伤的影响,希望明确桃核承气汤对脓毒症大鼠脏器的保护作用,为桃核承气汤应用于脓毒症的临床治疗提供实验基础和依据。

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℃恒温浓缩成每mL含生药1g的药液备用。所有药物由广东省中医院中心

收稿日期:2013-03-29

修回日期:2013-04-16

^{*} 广东省自然科学基金委博士启动项目(9451040701003687)通腹活血法对脓血症大鼠TLR4信号通路作用的研究,负责人:李际强。

^{**} 通讯作者:李际强,主任医师,主要研究方向:中西医结合急救、热病(感染病)的研究。

药房提供。

1.2 实验动物及分组

体质量 200~240 g 实验用雄性清洁级 SD 昆明大鼠(合格证号:2008A010,由中山大学实验动物中心提供),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),每组各 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/100 g 体质量灌胃给予生理盐水(贵州天地药业有限公司,批号:0803007A,规格:500 mL/瓶。),连续给药 7 天。TH:每只大鼠每天按 1 mL/100 g 体质量予桃核承气汤药液灌胃,连续 7 天。

1.3 动物模型制备

采用经典的盲肠结扎穿孔法(CLP)复制脓毒症动物模型^[1]。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 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;腹腔补液 1 mL/只,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,分离各脏器组织,留取肺、心、肾、肝、小肠组织,置于含 10%甲醛溶液中固定,经脱水、透明、浸蜡、包

埋、切片后,观察病理形态学变化。

1.5 检测指标和方法

采用光镜和电镜观察肺、心、肾、肝和小肠组织的病理形态学改变,参考文献进行病理形态学评分^[2]。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件分析数据。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组生化指标检测

与同时时间点模型组比较,桃核承气汤 6 h 组血清白细胞含量及血尿素氮水平均明显下降(*P*<0.05);桃核承气汤组 12 h 组血清白细胞含量及血尿素氮、肌酐、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶水平亦明显降低(*P*<0.05)。具体见表 1。

2.2 桃核承气汤对脓毒症大鼠不同脏器组织病理形态学评分的影响

与同时时间点模型组比较,桃核承气汤组大鼠肺组织、心脏组织、肾组织病理形态评分差异均无统计学意义;与同时点模型组比较,桃核承气汤 12 h 组大鼠肝组织、小肠组织病理形态学评分差异有统计学意义(*P*<0.05)。

2.3 桃核承气汤对脓毒症大鼠不同组织病理形态学的影响

2.3.1 肺组织病理形态学改变

正常对照组:肺组织中肺泡结构清晰,肺泡腔及支气管腔未见明显炎症细胞及浸出物,有少量红细胞,偶见少量炎性细胞;模型 6 h/12 h 组:大部分肺泡结构正常,少数肺泡间隙轻度增宽,炎症细胞

表 1 各组大鼠常规生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	白细胞 WBC($\times 10^9/L$)	尿素氮 BUN	肌酐 CREA	丙氨酸转氨酶 ALT	天冬氨酸转氨酶 AST
正常对照组	20	7.65±1.63	7.41±1.32	38.11±6.91	38.78±6.75	94.18±11.28
模型 6 h 组	12	17.99±6.96	10.14±3.22	45.80±10.42	95.78±19.97	187.67±52.47
模型 12 h 组	12	21.33±7.18	12.15±2.92	55.60±7.96	122.95±25.66	196.45±20.14
桃核承气汤 6 h 组	15	12.43±3.35	8.78±1.71	43.15±10.18	66.62±22.27*	121.43±19.63*
桃核承气汤 12 h 组	15	12.48±3.72*	9.02±1.79*	46.40±7.41*	88.20±23.30*	138.35±31.03*

注:与同时时间点模型组比较,**P*<0.05。

渗出,以中型粒细胞和淋巴细胞为主;桃核承气汤 6 h/12 h 组:与同时点模型组比较有一定改善,但并不明显。具体见图 1。

2.3.2 心脏组织病理形态学改变

正常对照组:心肌细胞结构基本正常,心肌纤维肌丝束排列基本整齐,间质无明显水肿;模型 6 h/12 h 组:心肌细胞结构基本正常,心肌纤维肌丝束排列基本整齐,间质无明显水肿,偶见炎症细胞浸润;桃核承气汤 6 h/12 h 组:与同时点模型组比

较变化不明显。具体见图 2。

2.3.3 肾组织病理形态学改变

正常对照组:肾脏结构基本正常,未见明显的炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞完好;模型 6 h/12 h 组:可见少量肾组织轻、中度炎症细胞浸润,局灶性肾小管上皮损伤;桃核承气汤 6 h/12 h 组:与同时点模型组比较有一定改善。但变化不明显。具体见图 3。

2.3.4 肝组织病理形态学改变

正常对照组:肝小叶结构完整,肝细胞形态结

表 2 各组大鼠不同脏器组织病理形态学评分($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肺组织	心脏组织	肾组织	肝组织	小肠组织
正常对照组	20	0.19±0.24	0.10±0.22	0.13±0.33	0.00±0.00	0.13±0.22
模型 6 h 组	12	0.70±0.43	0.50±0.50	0.88±0.60	1.50±0.50	2.13±0.60
模型 12 h 组	12	0.75±0.66	0.81±0.35	1.06±0.63	3.00±0.00	2.88±0.33
桃核承气汤 6 h 组	15	0.44±0.46	0.50±0.50	0.75±0.43	1.40±0.49	1.63±0.48
桃核承气汤 12 h 组	15	0.56±0.39	0.38±0.48	0.56±0.46	2.50±0.50*	2.13±0.60*

注:与同时间点模型组比较,* $P<0.05$ 。

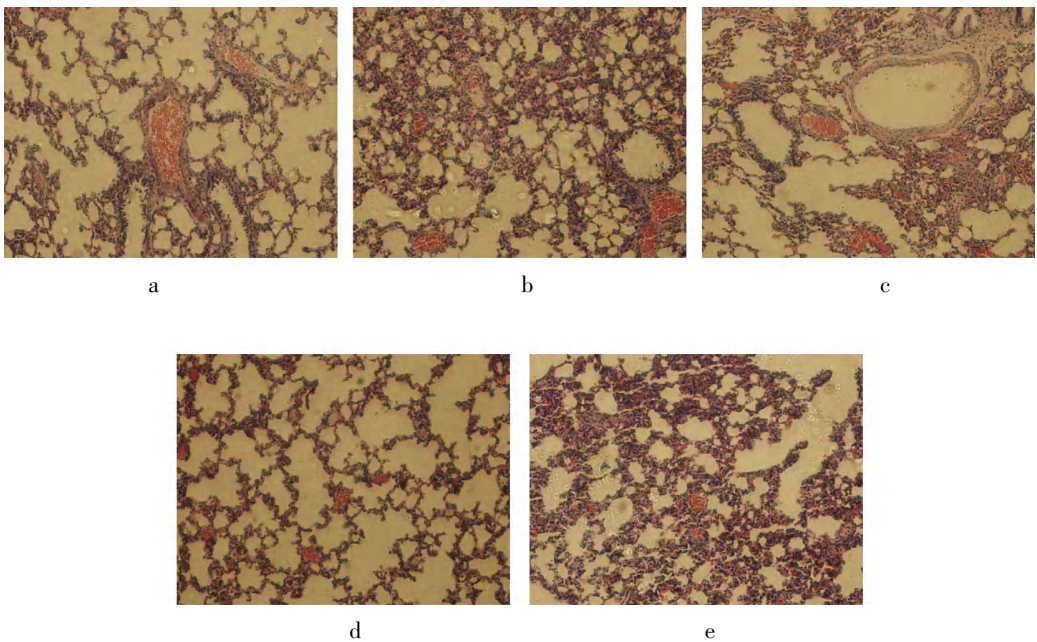


图 1 肺组织 HE 染色

注 a.正常对照组 b/c.模型 6 h/12 h 组 d/e.桃核承气汤 6 h/12 h 组。

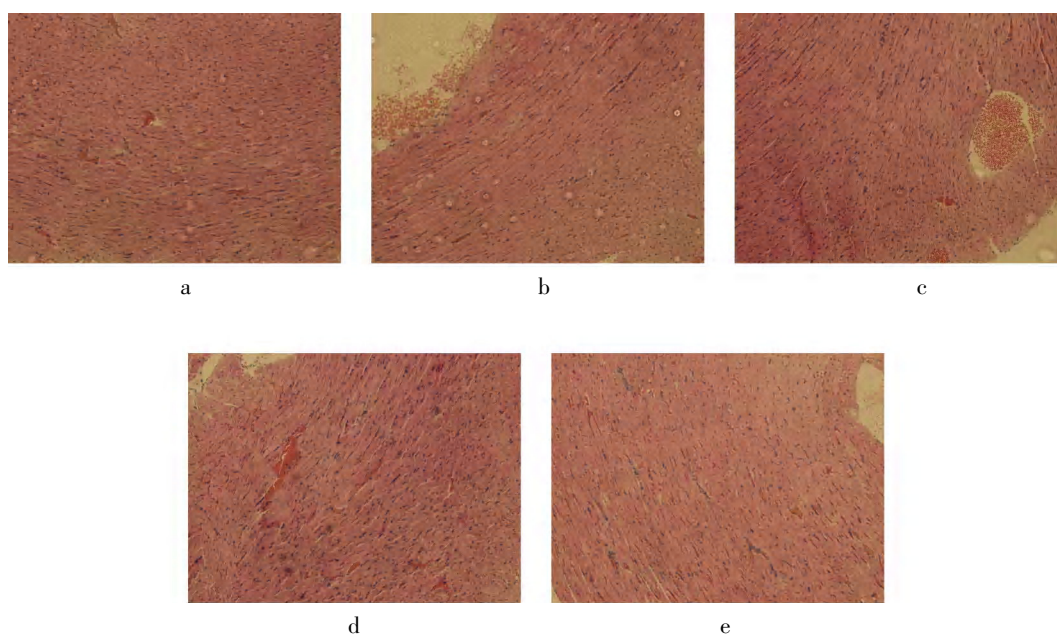


图2 心脏组织 HE 染色

注 a.正常对照组 b/c.模型 6 h/12 h 组 d/e.桃核承气汤 6 h/12 h 组。

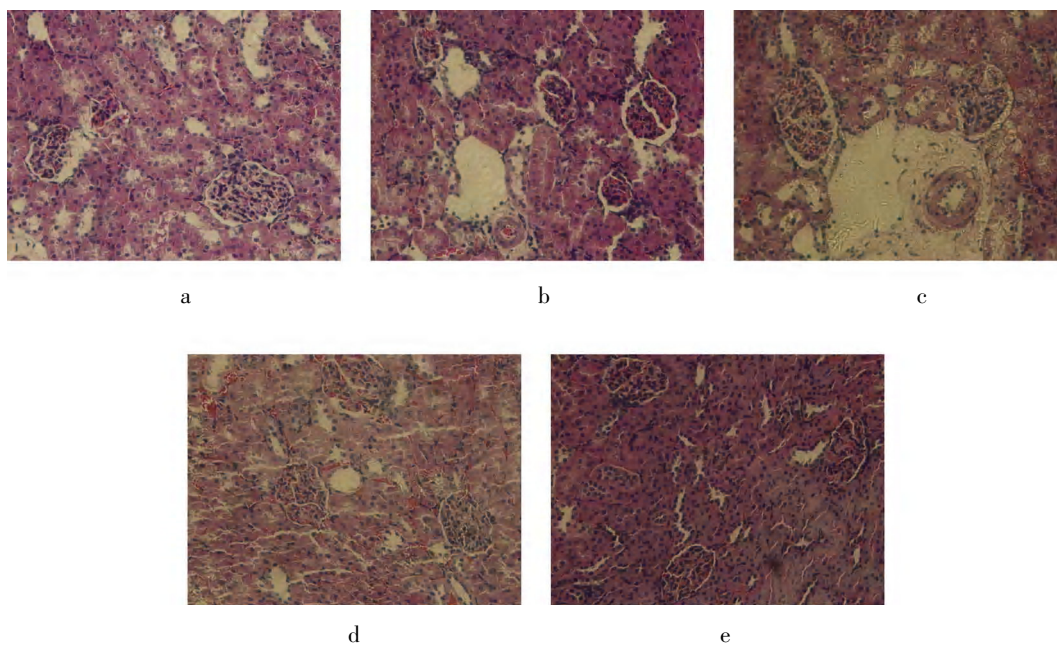


图3 肾脏组织 HE 染色

注 a.正常对照组 b/c.模型 6 h/12 h 组 d/e.桃核承气汤 6 h/12 h 组。

构正常,肝窦清晰,偶可见有胞浆疏松、水肿或血管周围少许炎性细胞浸润现象;模型 6 h 组: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;模型 12 h 组: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;桃核承气汤 6 h 组:肝组织受损程度较模型 6 h 组轻,但效果并不十分明显;桃核承气汤 12 h 组:肝组织受损程度较模型 12 h 组明显减轻。

2.3.5 小肠组织病理形态学改变

正常对照组 :小肠各层结构清晰 ,粘膜表层完整 ,腺体排列整齐 ;模型 6 h 组 :小肠组织有炎症细

胞浸润 ,部分肠腔有大量炎症渗出物 ,小肠绒毛顶端上皮脱落及毛细血管充血 ;模型 12 h 组 :大部分小肠组织肠粘膜斑片状缺失、糜烂 ,肠壁组织有坏

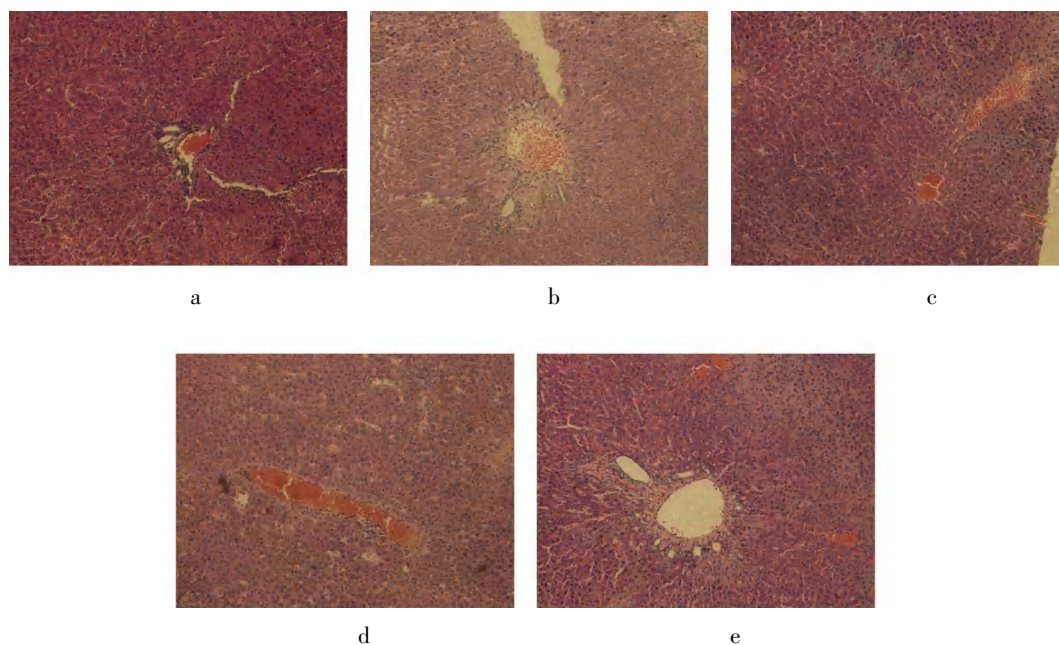


图 4 肝组织 HE 染色

注 a.正常对照组 b/c.模型 6 h/12 h 组 d/e.桃核承气汤 6 h/12 h 组。

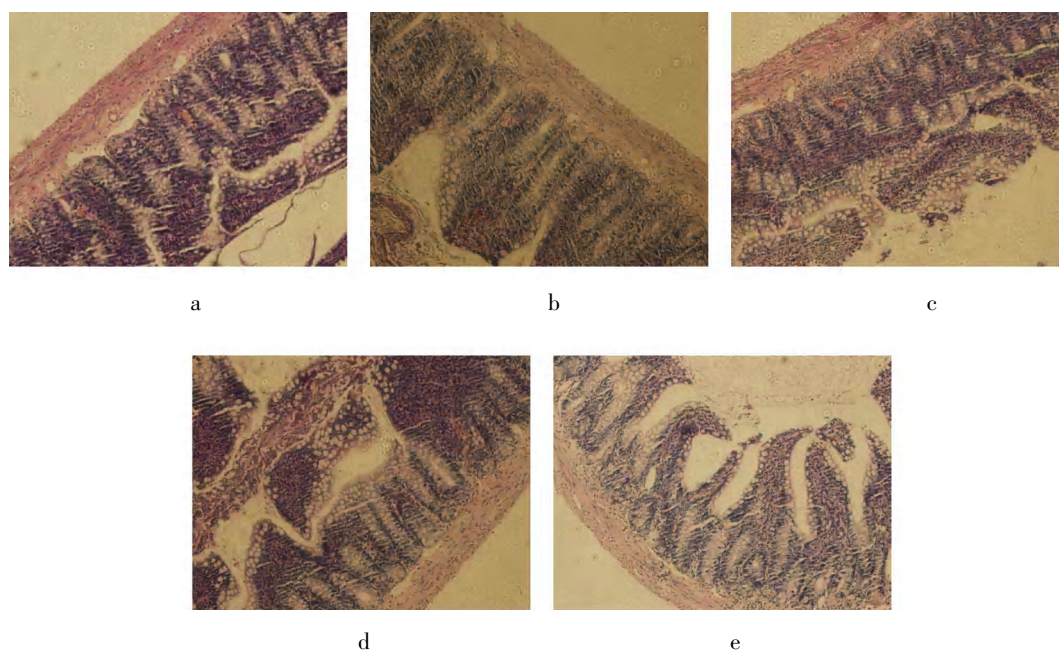


图 5 小肠组织 HE 染色

注 a.正常对照组 b/c.模型 6 h/12 h 组 d/e.桃核承气汤 6 h/12 h 组。

死、出血,且只残留少许正常腺体;桃核承气汤 6 h 组:肠组织受损程度较模型 6 h 组轻,但效果并不十分明显;桃核承气汤 12 h 组:小肠组织多为绒毛顶端上皮脱落及毛细血管充血,肠腔内有大量炎症渗出物,少量呈现肠粘膜斑片状缺失、糜烂,偶有肠壁组织坏死、出血现象,组织受损程度较模型 12 h 组明显为轻。

3 结论

桃核承气汤能减轻 CLP 脓毒症大鼠肝组织、小肠组织的炎症反应,修复受损的组织细胞,恢复其正常形态结构,进而保护肝脏和小肠组织。

4 讨论

肠道菌毒移位是脓毒症关键的病理生理改变之一,而菌毒纵向移位的临床意义最大。当肠道内毒素经门静脉和淋巴系统两条途径移位入体循环,即可造成肠源性内毒素血症,随之刺激炎症介质、细胞因子的大量释放,引发 SIRS 和 MODS。有研究发现,CLP 术后大鼠肠道屏障功能被破坏,引起急性肝、肺等脏器剧烈的炎症反应和组织功能损伤^[3]。另外,脓毒症内毒素血症时全身的高凝、低纤溶状态和众多炎性介质的作用使微循环功能受损,导致组织、细胞缺氧,代谢产物淤积,进而使重要脏器功能受损。

本研究通过对大量的临床资料研究,提出热毒内蕴、内陷营血、腑气不通是脓毒症的主要病理基础,瘀血阻络贯穿脓毒症始终^[4]。中医之阳明腑实证、血瘀证与肠源性内毒素血症之间存在着内在联系。阳明腑实证时,燥热之邪与肠中糟粕相结而成燥屎,影响腑气通降,继而热毒内盛、淤血阻滞、气阴两虚。这与肠源性内毒素血症之肠屏障损害,细菌过度繁殖,大量细菌内毒素移位,导致 SIRS、MODS 的病理过程十分相似。大量实践证明,通腑攻下法治疗肠源性内毒素血症取得良好的疗效。如大承气颗粒可以通过促进肠蠕动、保护肠屏障、减少肠道内毒素和细菌移位、抑制肠源性内毒素血症、调节神经-内分泌-免疫网络、调控各炎性介质和细胞因子的产生及分泌、抑制过度炎症及过度免疫反应、清除氧自由基、降低 NO 的产生及活性等机制达到对 SIRS 和 MODS 的预防和治疗^[5]。血瘀证在脓毒

症发展过程中普遍存在,叶天士认为“凡大寒大热病后,脉络之中必有推荡不尽之瘀血”。无论是瘀热阻络,还是血虚夹瘀,或气虚无力运血,或气滞不能行血,均可导致气血失调、血流瘀滞、瘀血阻滞脉道,这与脓毒症脏器灌流不良、细胞及组织缺氧,以致组织器官功能受损的病理生理基础相符。研究表明活血化瘀中药能明显改善脓毒症大鼠的微循环,使处于微循环障碍病理状态下大鼠的微血管扩张,毛细血管开放数量增多,从而增加组织灌流量,阻断微循环障碍病理过程的进展^[6]。因此,活血化瘀法作为治疗脓毒症的主要治法之一,已广泛应用于临床,并取得一定的临床疗效^[6-7]。既往临床亦研究表明通腑活血法在改善脓症患者凝血功能方面具有确切的疗效^[8]。

本研究发现活血化瘀、通腑攻下之桃核承气汤对 CLP 脓毒症大鼠肝脏、小肠组织的保护作用最明显,其原因可能与肝和小肠的生理功能相关。桃核承气汤在《伤寒论》中主治太阳蓄血证,但当代医家邓铁涛教授认为其用不可拘泥于部位,临床上只要是瘀热内结、伴有可下之证,均可用之^[9]。因其主治病机乃瘀热互结于下焦,而临床脓毒症发展到一定阶段,邪热伤津耗液,每使血热互结而成腑实血瘀之证,二者病机十分吻合,故通腑活血之桃核承气汤对于脓毒症防治具有重要意义,值得深入探讨。

参考文献

- 1 Parker S J, Watkins P E. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*, 2001, 88(1):22~30.
- 2 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.中国比较医学杂志,2008,18(10):12~14.
- 3 曲海.盲肠结扎穿孔术致大鼠脓毒症模型的建立及其器官功能损伤的研究.昆明医学院硕士论文,2008.
- 4 杨荣源,方志坚,李际强.脓毒症辨治探析.上海中医药杂志,2009,43(3):45~46.
- 5 穆拉迪.大承气颗粒对肠源性内毒素血症的影响.天津:天津医科大学博士论文,2006.
- 6 刘英杰,王勇强,常文秀.常用活血化瘀中药方剂治疗脓毒症的机理.吉林中医药,2009,29(3):241~242.
- 7 朱玲,田雨,陈浩,等.脓毒方治疗重症脓毒症的临床研究.中国实验方剂学杂志,2009,15(9):207~208.
- 8 杨荣源,王大伟,黄宏强.通腑活血法对脓症患者凝血功能的影响.广州中医药大学学报,2009,26(4):321~324.
- 9 杨利.邓铁涛教授运用经方治验 4 则.新中医,2004,36(6):11~12.

Effect of *Tao-He Cheng-Qi* Decoction on Different Organ Injuries of Rats with Sepsis

Yang Rongyuan, Wang Dawei, Li Jiqiang, Liu Yuntao, Huang Hongqiang

(Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

Abstract: This study was aimed to observe the effect of *Tao-He Cheng-Qi* Decoction (THCQD) on tissue injury of different organs among rats with sepsis. A total of 100 *Kunming* male SD rats of clean grade were randomly divided into five groups, which were the normal control group, model 6 h control group, model 12 h control group, THCQD 6 h group and THCQD 12 h group. The normal control group received no treatment. The classic CLP method was applied in the establishment of sepsis rat model in other groups. Intragastric administration of saline 1 ml/100 g (weight) was given to each rat in the model group every day. Intragastric administration of THCQD 1 ml/100 g (weight) was given to each rat in the THCQD group every day. The model was established after 7 days. Tissue specimens of lung, heart, kidney, liver, and small intestine were collected at 6 h and 12 h after modeling, respectively. Pathomorphological changes of each group were observed by light microscopy and electron microscope. The results showed that compared with the model group at the same time point, pathomorphological changes of tissues of the lung, heart, kidney in THCQD group were not significant. However, pathomorphology of tissues of the liver and small intestine changed significantly in the THCQD 12h group. And there were statistical differences ($P < 0.05$) between two groups in the score of pathomorphology. It was concluded that THCQD had protective effect on tissues of the liver and small intestine among rats with sepsis. However, the mechanism is not clear and requires further research.

Keywords: *Tao-He Cheng-Qi* Decoction, sepsis, organ protection, tissue injury

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 汪 晶)