

·方药研究·

连术颗粒对大鼠肠黏膜屏障的保护作用

刘 珺¹ 徐选福¹ 杨文娟¹ 郭传勇¹ 颜乾麟²

(1. 同济大学附属第十人民医院消化科, 上海市闸北区延长中路301号, 200072; 2. 同济大学中医研究所)

[摘要] **目的** 探讨连术颗粒对内毒素血症肠炎大鼠肠黏膜屏障功能的保护作用。**方法** 将SD大鼠50只随机分为5组,即正常组、模型组(予蒸馏水)、连术颗粒高(3.6g/kg)、中(1.8g/kg)、低(0.9g/kg)剂量组,每组10只。每日灌胃2次,连续3天。末次灌胃后1h除正常组外其余各组采用脂多糖(LPS)腹腔注射造模。记录各组累计大便次数,4h后麻醉取血检测血电解质、红细胞压积、血浆一氧化氮、二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸浓度,取肠道组织观察小肠IgA浆细胞染色情况及小肠黏液SIgA含量。**结果** 造模4h内模型组腹泻次数明显高于正常组($P<0.01$),而连术颗粒各剂量组较模型组腹泻次数有所改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、血糖、红细胞压积,模型组较正常组有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),连术颗粒各剂量组有不同程度的改善;血浆NO、DAO、D-乳酸,模型组较正常组均升高(均 $P<0.01$),连术颗粒各剂量组较模型组均降低(均 $P<0.01$)。**结论** 中药连术颗粒对LPS引起的大鼠肠黏膜损伤有明显的保护作用,主要表现在降低炎症反应的强度,保护肠黏膜机械屏障,减低肠道通透性和提高黏膜免疫功能。

[关键词] 内毒素;肠炎;连术颗粒;肠黏膜

Effect of Lianzhu Granule on Gut Barrier Function in Rats

LIU Jun¹, XU Xuanfu¹, YANG Wenjuan¹, et al.

(Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Lianzhu Granule on gut barrier function in rats suffered from endotoxaemia enteritis. **Methods** Fifty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups: Normal control group, model group, Lianzhu Granule 3.6g/kg, 1.8g/kg and 0.9g/kg groups, 10 in each. Rat models of intestinal catarrh were established by injecting lipo polysaccharide (LPS) via the peritoneal injection after gastric infusion twice a day for 3 days. The times of diarrhea, Na^+ , K^+ , Cl^- , hematocrit, nitric oxide (NO), diamine oxidase (DAO), D-Lactate density in the blood, the IgA plasma cell (PC) and SIgA content of small intestine were measured 4 hours after LPS injection. **Results** The times of diarrhea in the model group were significantly higher than those of the normal control group ($P<0.01$), while those of the Lianzhu Granule groups were lowered ($P<0.05$ or $P<0.01$). The levels of glucose, Na^+ , K^+ , Cl^- and hematocrit in the model group were lower than those of the normal control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while those of Lianzhu Granule groups were significantly improved. The levels of NO, DAO and D-lactate of the model group were higher than those of the normal control group ($P<0.05$), while those of Lianzhu Granule groups were significantly lower ($P<0.01$). **Conclusion** Lianzhu Granule has a protective function for intestinal mucosa impairment caused by LPS through decreasing the intensity of inflammatory reaction to protect the gut mechanical and immune barriers.

Key Words Endotoxin; Enteritis; Lianzhu Granule; Intestinal mucosa

连术颗粒系著名中医学家颜德馨教授用于治疗湿热泄泻的经验方。主要由黄连、苍术、白头翁等组成,临床初步研究表明,该药能安全有效治疗急性细菌性、病毒性腹泻。但体外实验验证其对常见的肠道致病菌杀伤作用较弱^[1]。本研究通过动物体内实验探讨连术颗粒对内毒素大鼠肠炎模型肠道黏膜炎症反应强度、肠黏膜机械屏障和免疫屏障的影响,来探讨连术颗粒抗

感染机制。

1 材料和方法

1.1 动物

SD大鼠50只,体重250~300g,雌雄各半,由复旦大学医学院动物实验中心提供(合格证号:SCXK沪2002-0002)。

1.2 药物

连术颗粒为院内制剂,主要由白头翁450g,黄连150g,苍术450g,马齿苋750g组成,加糊精制成颗粒,上海雷允上药业有限公司协助生产,批号YL050001,5g/包,每克含生药1.8g。

1.3 试剂与仪器

脂多糖(LPS),美国Sigma公司,500mg/支;NAD-甘氨酸肼缓冲液、D-乳酸脱氢酶(D-lactic dehydrogenase, D-LDH),辣根过氧化物酶、邻联茴香胺(O-dianisidine)、尸胺(cadaverine)等均为Sigma公司产品;一氧化氮(NO)试剂盒,南京建成生物工程研究所;大鼠IgA单克隆抗体(anti-rat IgA mAb, a-chain special),美国Santa Crus公司;SIgA试剂盒,Bethy公司。DU-7型紫外线可见分光光度计,美国Beckman公司;2000医学图像分析软件,成都泰盟科技有限公司。

1.4 动物分组及内毒素血症腹泻模型建立

参照文献[2]方法。实验采用成组设计,健康SD大鼠50只,随机分为5组,每组雌雄各半,正常组、模型组、连术颗粒低剂量组(0.9g/kg)(低剂量组)、中剂量组(1.8g/kg)(中剂量组)、高剂量组(3.6g/kg)(高剂量组)。每组10只。将连术颗粒用蒸馏水配制成低、中、高浓度的混悬液灌胃,每日2次,每次2ml,正常组用蒸馏水代替,给药时间为72h。末次灌胃前12h禁食不禁水,末次给药后1h,每只腹腔注射LPS30mg/kg体重,正常组用生理盐水代替。4h后终止实验。

1.5 检测指标

1.5.1 一般情况 实验期间动态观察大鼠的一般情况及造模后4h累计大便次数。

1.5.2 血电解质、NO、二胺氧化酶(DAO)和D-乳酸检测 2%戊巴比妥全麻后腹主动脉采血,按NO试剂盒说明书操作,检测血浆NO浓度。采用分光光度法^[3]检测血浆DAO;采用以Brandt等^[4]方法,检测血D-乳酸含量。并检测血清Na⁺、K⁺、Cl⁻、血糖及红细胞压积。

1.5.3 肠黏膜形态学观察 各组大鼠处死后,立即在回肠瓣10cm处取回肠5cm,纵行剖开生理盐水洗净,100ml/L甲醛固定,苏木精-伊红染色,用于光镜检测,观察肠绒毛结构改变。

1.5.4 小肠IgA浆细胞测定 组织石蜡切片采用免疫组织化学染色ABC法,绒毛固有层内胞浆染成棕黄色的为IgA阳性浆细胞,用2000医学彩色图像分析软件对染色结果每例任选5个视野进行分析,计数(个/

4mm)。

1.5.5 小肠黏液SIgA含量测定 动物处死后立即取近段空肠5cm以下小肠15cm,用冷蒸馏水和磷酸盐缓冲液(ABS)依次流动冲洗后平铺于滤纸上,纵向剪开,暴露黏膜面,4℃PBS冲洗,用清洁载玻片轻轻刮掉黏膜表面黏液,用微量注射器收集刮取物0.5ml,然后用4.5mlPBS稀释并小心搅拌,使其完全溶解,3000r/min,4℃离心10min,收集上清液,-70℃储藏备用,SIgA的测定采用生物素-抗生物素标记的酶联免疫检测法,结果用mg/L表示。

1.6 统计学方法

采用SPSS12.0软件进行统计分析,定量数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和多重比较等。

2 结果

2.1 一般情况观察及大便累计次数结果

表1示,注射LPS后,正常组一直保持正常情形,主要表现为无腹泻、体毛平顺,食欲正常,精神活跃。模型组和治疗组,主要表现为体温升高,口渴喜饮、毛发蓬松,蹒跚懒动,食欲不振。用药后4h内出现不同程度的稀便,造模组与正常组比较,腹泻次数明显增加($P < 0.01$);连术各剂量组均较模型组腹泻次数明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);且低剂量组与高剂量组差异有统计学意义($P < 0.01$),中、高剂量组组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 大鼠造模4h内累计大便次数比较(次, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	大便次数
正常组	10	12.40±3.20
模型组	10	36.70±5.23*
低剂量组	10	20.20±4.23*△△
中剂量组	10	28.50±4.06*△△
高剂量组	10	32.10±5.11*△

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血电解质、血糖及红细胞压积比较

表2示,模型组血清Na⁺、K⁺、Cl⁻及血糖值与正常组比较均明显降低,红细胞压积则明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示模型组存在电解质紊乱情

表2 各组大鼠血电解质、血糖及红细胞压积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Na ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	血糖(mmol/L)	红细胞压积(%)
正常组	10	143.46±3.34	102.03±2.82	5.37±0.96	8.37±1.06	0.39±0.07
模型组	10	102.48±3.67**	98.40±1.42*	3.38±0.29**	4.99±1.23**	0.80±0.08**
低剂量组	10	123.24±3.00**△	105.48±3.05*△	6.06±0.68△	7.66±1.42△	0.58±0.06**△
中剂量组	10	140.35±3.19△	106.29±4.41**△	5.08±0.66△	8.49±1.84△	0.50±0.07**△
高剂量组	10	142.99±1.75△	106.05±3.27**△	3.96±0.79**	9.40±2.06△	0.33±0.03△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与内毒素模型组比较,△ $P < 0.01$

表3 各组大鼠血浆 NO、DAO、D-乳酸值、IgA 浆细胞计数及 SIgA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO($\mu\text{mol/L}$)	DAO($\mu\text{mol/L}$)	D-乳酸 ($\mu\text{g/ml}$)	IgA 浆细胞计数 (个/ μm^2)	SIgA 含量 (mg/L)
正常组	10	24.94 $\pm$ 3.38	0.82 $\pm$ 0.33	2.01 $\pm$ 0.32	0.94 $\pm$ 0.21	0.50 $\pm$ 0.09
模型组	10	79.74 $\pm$ 7.39**	2.48 $\pm$ 0.42**	5.63 $\pm$ 0.85**	0.73 $\pm$ 0.22*	0.22 $\pm$ 0.66**
低剂量组	10	56.31 $\pm$ 4.66** $\triangle\triangle$	1.91 $\pm$ 0.35** $\triangle\triangle$	4.90 $\pm$ 0.70** $\triangle$	1.15 $\pm$ 0.16* $\triangle\triangle$	0.37 $\pm$ 0.48** $\triangle\triangle$
中剂量组	10	48.59 $\pm$ 4.70** $\triangle\triangle$	1.43 $\pm$ 0.53** $\triangle\triangle$	4.00 $\pm$ 0.54** $\triangle\triangle$	1.16 $\pm$ 0.19** $\triangle\triangle$	0.59 $\pm$ 0.12* $\triangle\triangle$
高剂量组	10	38.13 $\pm$ 5.87** $\triangle\triangle$	1.33 $\pm$ 0.44** $\triangle\triangle$	3.11 $\pm$ 0.73** $\triangle\triangle$	1.39 $\pm$ 0.21* $\triangle\triangle$	0.44 $\pm$ 0.09 $\triangle\triangle$

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

况;高、中、低剂量组与模型组比较,除高剂量组血 K^+ 外, Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 及血糖值均有明显升高,红细胞压积有明显降低(P 均 <0.01),提示连术颗粒有纠正电解质紊乱的作用。

2.3 各组大鼠血浆 NO、DAO 和 D-乳酸值比较

表3示,血浆 NO、DAO 和 D-乳酸,模型组均明显高于正常组(P 均 <0.01);高、中、低剂量组血浆 NO、DAD 及 D-乳酸含量与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 肠黏膜形态学观察(HE, $\times 100$)

正常对照组回肠末端肠黏膜结构基本正常;模型组注射内毒素后即见肠黏膜轻度萎缩,绒毛不规整,间质水肿明显,局部可见肠壁变薄,黏膜明显萎缩,绒毛稀疏、倒伏,短缩、融合,上皮脱落;连术颗粒不同剂量组与模型组相比,肠黏膜病理改变明显减轻。

2.5 小肠 IgA 阳性浆细胞测定及小肠黏液 SIgA 含量测定($\times 200$)

IgA 浆细胞及阳性反应物散在分布于小肠绒毛、固有层、肠腺周围,绒毛的中部以下和肠腺周围较多。细胞呈圆形或椭圆形,细胞质呈强阳性反应(深棕色)。由于 IgA 浆细胞向肠腔分泌的 IgA 分布于绒毛黏膜表面和固有层内,免疫组化染色也呈阳性反应。模型组 IgA 浆细胞含量少于正常组,连术颗粒各剂量组均较模型组含量多。小肠 IgA 浆细胞测定结果显示模型组细胞数低于正常组($P<0.05$),连术颗粒各剂量组均高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且中剂量组与高、低剂量组间差异有统计学意义($P<0.05$),连术颗粒高、低剂量组之间差异无统计学意义;肠液 SIgA 含量结果模型组细胞数低于正常组($P<0.01$),连术颗粒各剂量组均高于模型组(P 均 <0.01)。

3 讨论

急性感染性肠炎,中医病机主要在于湿浊蕴盛,脾运失常,系由湿困脾胃所致。热邪、暑邪多挟湿而困阻脾胃,脾属中土,职司运化,其性喜燥恶湿,一旦湿伤脾胃,脾阳被蒙,运化失常,故对湿热泄泻之证当以清热燥湿为治疗要则,连术颗粒以清热燥湿之要药黄连作为主药,以清除湿热,解脾困之缚;但因脾受湿困而

脾阳被蒙,仅以清热燥湿,难以速求脾运恢复,故采用运脾燥湿之苍术,以温运脾阳,促使湿祛而脾健运,以弥补黄连之不足,黄连、苍术合用,具清热燥湿,温阳运脾之双重作用,此为治疗之妙。更用白头翁等以加大清热除湿之力,又具解毒止泻之功,诸药配伍,共奏醒脾化湿,清热解毒,理肠止泻之效,且临床效果显著。然而体外初步实验证明连术颗粒抗感染效果不明显^[1],为了进一步验证连术颗粒的作用机制,我们探讨了其对内毒素腹泻模型肠黏膜屏障的影响。

内毒素性肠炎的转归取决于肠道黏膜局部炎症反应和因内毒素的吸收而引起的全身炎症反应的总和。内毒素诱导的炎症反应过程中产生大量的炎症因子介导组织损伤,其中代表性的炎症因子是 NO。已知过量的 NO 是导致败血症、感染性休克、多脏器功能衰竭的重要因素之一,在内毒素刺激下产生过量的 NO,引起严重的肠黏膜组织损伤,甚至可能导致胃肠脏器官在内的多脏器功能损害^[5]。本实验连术颗粒各剂量组鼠血清平均含量显著低于对照组,可见连术颗粒对内毒素诱导的炎症反应有一定的抑制作用,其对内毒素性肠炎的治疗作用可能与抑制过量的 NO 产生有关。

肠黏膜组织的局部损伤是导致肠道通透性增加和腹泻的直接原因。通过对大鼠腹泻次数和血浆电解质的测定可以初步看出连术颗粒对大鼠的腹泻具有明显的治疗效应,表现为腹泻次数减少,电解质紊乱较轻微。在此基础上我们利用血浆 DAO 和 D-乳酸的测定作为评价肠道黏膜机械屏障通透性的代表性指标。其中 DAO 是主要存在于小肠黏膜上皮细胞内分子,当肠黏膜上皮损伤时可释放入血,导致血中 DAO 活性升高,因此是反映肠黏膜上皮细胞的损伤及肠屏障结构的破坏程度的理想指标。D-乳酸是细菌代谢产物,肠道菌群中多种细菌均可产生,哺乳动物自身既不产生,也不能或仅能缓慢代谢 D-乳酸。血中 D-乳酸的蓄积反映了肠黏膜通透性的增高以及肠道屏障功能情况。因此,检测血中 D-乳酸的蓄积情况可反映严重创伤、感染或某些胃肠病变时肠黏膜通透性的增高,且较之传统方法更易于检测^[6,7]。本研究中连术颗粒各剂量组均能有效降低内毒素血症大鼠血浆 DAO 和 D-乳酸

水平($P<0.01$)。这一结果表明, 连术颗粒能明显降低内毒素引起的大鼠肠道黏膜机械屏障的损伤, 抑制炎症导致的肠道黏膜通透性增加。

SIgA 是人类黏膜免疫的主要物质基础, 主要由胃肠淋巴组织合成, 主要存在于胃肠道、支气管和泌尿生殖道黏膜及其分泌产物中, 是黏膜局部免疫的最重要因素^[8]。本实验研究表明, 模型组 SIgA 含量较正常组降低, 经连术治疗后不仅光镜下黏膜充血、水肿糜烂及炎性细胞浸润明显减轻, 而且肠道 SIgA 含量有明显回升, SIgA 有强力的防御病原体侵害, 防止其对黏膜造成损害或通过黏膜进入机体, 因而防止炎症反应的发生。

总之, 连术颗粒可拮抗 LPS 诱导内源性 NO 引起的败血症及感染性休克; 降低血浆 DAO、D-乳酸, 即能有效保护肠黏膜机械屏障; 且能增加肠道 SIgA 免疫屏障。然而, 本实验未阐明连术颗粒拮抗 LPS 的具体机制, 其是否参与肠黏膜屏障的增殖和凋亡及如何介导肠道免疫等问题尚未解决。此外, 连术颗粒是否对内毒素血症引起的肝、肺、肾脏损害也具有保护作用有待进一步研究。

参考文献

[1] 刘琨, 费鸿翔, 颜乾麟, 等. 连术颗粒解热抗菌实验研究[J].

同济大学学报(医学版), 2007, 18(6): 41-43.

[2] Liang YC, Liu HJ, Chen SH, et al. Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E₂[J]. World J Gastroenterol. 2005, 11(3): 357-361.

[3] 黎君友, 于燕, 郝军, 等. 分光光度法测定小肠和血二胺氧化酶活性[J]. 氨基酸与生物资源, 1996, 18(4): 18-30.

[4] Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, et al. Spectrophotometric assay for D-(-)-lactate in plasma [J]. Anal Biochem, 1980, 102(1): 39-46.

[5] 于振香, 左孟华, 彭丽萍, 等. 人参二醇皂苷对失血性休克-内毒素二次打击大鼠肺组织一氧化氮含量的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1): 7-9.

[6] 方雪玲, 方强, 骆建军. 生大黄对脓毒症患者血浆 D-乳酸及前降钙素表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(2): 128-130.

[7] Assadian A, Assadian O, Senekowitsch C, et al. Plasma D-lactate as a potential early marker for colon ischaemia after open aortic reconstruction [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2006, 31(5): 470-474.

[8] Hisajima T, Kojima Y, Yamaguchia A, et al. Morphological analysis of the relation between immunoglobulin A production in the small intestine and the enteric nervous system [J]. Neurosci Lett, 2005, 381(3): 242-246.

(收稿日期: 2008-03-26; 修回日期: 2008-06-28)

[编辑: 行之]

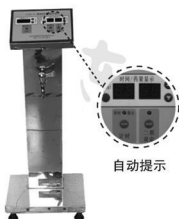
®
东华原医疗
DONGHUAYUAN MEDICAL



北京东华煎药机 国家重点课题煎药机 ——医好、药好，更要煎得好



2008年11月, 由北京东华原医疗设备有限责任公司承担的“国中医药科2007ZX03-5”中药煎药机组在北京通过验收, 该机在技术方面取得了革命性的突破, 实现了(自动)清洗、先煎后下、(自动)两煎、(自动)搅拌、药渣(自动)分离、文武火(自动)转换、(自动)加水计量、药物煎煮定时, 防干烧, 按药剂总量均分包装及饮片浸泡等十一项新功能。(摘自健康报)



JJS-1
(中药煎药定量加水机)
自动定量控制加水,
浸泡计时, 规范煎药流程



YBS250E
(自动液体均分包装机)
儿童、老人按剂量需要
自动均分包装, 无药液剩余



YFDX20B
(全自动两煎煎药机)
自动两煎、先煎后下、自动
搅拌, 自动清洗, 煎出率更高



YFY20C
(密闭两煎煎药机)
密闭煎煮, 自动完
成两煎, 经济实惠



YFY13/2B
(2+1电煎密闭组合系列)
自有滑动锁紧技术,
一键到位, 快速、便捷

- 煎药包装设备行业领军品牌, 煎药机和包装机行业标准起草的承担企业
- 十一年, 6000家医院, 40000家终端客户共同见证, 荣获药店欢迎品牌
- 自主推出9大系列, 30多个型号煎药包装设备, 拥有滑动锁紧和制动两煎技术
- 自动两煎煎药机(国中医药科2007ZX03-5)科研项目通过验收, 超越现有技术
- 在全国设立30多家分公司和办事处, 100多位维修工程师, 450多位服务人员
- 2009年“星级服务中国行”活动已经开始, 一个电话, 尽享“一站式”服务给您带来的便捷

北京东华原医疗设备有限责任公司

地址: 北京市中关村科技园昌平园振超路1号 邮编: 102200

咨询热线: 010-89718013-806/115/602

400-838-0258 800-810-0359

网址: www.donghuagroup.com (更多机型请来电咨询或见网站)

ki.net