

清胆汤联合胆道减压内引流对急性重症胆管炎大鼠肝功能和炎症因子的影响

季成春^{1,2*} 刘 金³ 陈海龙²

(1. 沈阳市肛肠医院, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 9 号, 110002;

2. 大连医科大学; 3. 沈阳市儿童医院)

* 通讯作者: jccemail@sina.com, 13840256638

[摘要] 目的 探讨清胆汤联合胆道减压内引流对急性重症胆管炎(ACST)大鼠的作用及其机制。方法 48 只 SD 大鼠开腹手术制备 ACST 模型,并随机分为 ACST 组、清胆汤组、减压组、清胆汤+减压组各 12 只。造模后 6h 清胆汤组给予清胆汤灌胃,减压组行胆道减压内引流术并给予生理盐水灌胃,清胆汤+减压组行胆道减压内引流术并给予清胆汤,造模后 48h 取材。计算各组大鼠死亡率,检测各组大鼠血常规、肝功能、血清内毒素(LPS)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,光镜下观察肝脏病理变化。结果 ACST 组死亡率最高,与其相比清胆汤组死亡率差异无统计学意义($P>0.05$),而减压组及清胆汤+减压组则显著降低($P<0.01$)。减压组和清胆汤+减压组大鼠与 ACST 组比较,血常规和肝功能各指标均明显好转($P<0.05$ 或 $P<0.01$);清胆汤组肝功能各指标明显高于减压组和清胆汤+减压组($P<0.01$)。与 ACST 组比较,其他各组 LPS、TNF- α 水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且清胆汤+减压组 LPS 水平低于减压组($P<0.05$)。结论 清胆汤联合胆道减压内引流能显著降低 ACST 大鼠死亡率、改善肝功能,可能与降低血清 LPS、TNF- α 有关。

[关键词] 急性重症胆管炎;减压引流;清胆汤

Effect of Qingdan Decoction Combined with Biliary Decompression on the Liver Function and Inflammatory Factors in Acute Cholangitis Severe Type Rats

Ji Chengchun^{1,3}, Liu Jin², Chen Hailong³

(1. Shenyang Anorectal Hospital, Liaoning Province 110002; 2. Dalian Medical University; 3. Shenyang Children's Hospital)

ABSTRACT Objective To observe the efficacy and mechanism of Qingdan Decoction (Gallbladder-Clearing Decoction) combined with biliary decompression for acute cholangitis severe type (ACST). **Methods** The ACST models were established with laparotomy preparation on 48 SD rats. The rat models were randomized into the ACST group, Qingdan Decoction group, decompression group and Qingdan Decoction+decompression group, with 12 in each. Six hours after modeling, the Qingdan Decoction group was given intragastric administration of Qingdan Decoction, the decompression group was given biliary decompression and drainage and intragastric administration of saline, and the Qingdan Decoction+decompression group was given biliary decompression and drainage and Qingdan Decoction. The tissues were drawn after 48 hours. The mortality of rats was calculated. The blood count, liver function, lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected. The pathological changes of the liver were observed by light microscope. **Results** The mortality in the ACST group was the highest, but with no significant difference between Qingdan Decoction group ($P>0.05$). The mortality in the decompression group and Qingdan Decoction+decompression group was significantly lower ($P<0.01$). Comparing with the ACST group, the blood count and liver function in the decompression group and Qingdan Decoction+decompression group was significantly improved ($P<0.05$ or $P<0.01$). The liver function indicators in the Qingdan Decoction group were significantly higher than those in the decompression group and Qingdan Decoction+decompression group ($P<0.01$). Comparing with the ACST group, the levels of LPS and TNF- α were significantly decreased in the other groups ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the decrease was more significant in Qingdan Decoction+decompression group than that in the decompression group ($P<0.05$). **Conclusion** Qingdan Decoction combined with biliary decompression can obviously lower the mortality and improve the liver function of rat with ACST. The mechanism might be related with the decrease of the level of serum LPS and TNF- α .

Keywords acute cholangitis severe type; decompression and drainage; Qingdan Decoction

急性重症胆管炎(acute cholangitis of severe type, ACST)又称急性梗阻性化脓性胆管炎,是胆道感染中最严重的一种疾病,具有发病急、病情重、

变化快、并发症多、死亡率高等特点。胆道梗阻后继发细菌感染是 ACST 发病的根本原因,而由此引起的脓毒症,即由感染引起的全身炎症反应综合征

(SIRS)及进一步发展出现的多器官功能不全综合征(MODS)是导致患者死亡的主要原因^[1]。近年来,随着中西医结合研究的不断发展,中药对该病的作用越来越受到重视。本研究旨在探讨清胆汤联合胆道减压内引流对 ACST 大鼠的作用及其机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物

健康 SD 大鼠 48 只,普通级,雌雄各半,体重(300±30)g,由大连医科大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(辽)2004-0017。

1.2 药物及菌液

清胆汤组成:茵陈 30g,金钱草 30g,栀子 15g,黄芩 15g,木香 15g,枳实 15g,柴胡 15g,延胡索 20g,大黄 15g(后下),芒硝 10g(冲),由大连医科大学附属第一医院中药局提供并调节为每毫升含原生药 1g。实验细菌为大肠杆菌 O111B4(由中国药品生物制品检定所提供菌株),经复活、传代后,将细菌接种到营养琼脂培养基上,37℃培养 18h 后用生理盐水冲下菌落,再用毛细滴管移至离心管中,1000 r/min 离心 10 min,弃上清,再加适量生理盐水混匀,依上述方法再离心 1 次,即可得到较高纯度的活菌。然后生理盐水稀释,用 McFarland 标准管进行比浊测定(标准管由中国药品生物制品检定所提供),使菌液浓度相当于 3×10^{12} CFU/L,置 4℃保存,18h 内使用。

1.3 主要试剂及仪器

内毒素(LPS)定量检测试剂盒,上海伊华临床医学科技公司,批号:20040101;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)放免检测试剂盒,解放军总医院科技开发中心放免研究所,批号:040726;sysmex kx-21N 全自动血液分析仪,日本东亚公司;日立 7170s 全自动生化分析仪,日本 HITACHI 公司;Nikon MOD-EL YS100 显微镜,日本尼康公司;PYX-DHS-40X50-BS-II 隔水式电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂。硅胶管,长 3 cm,外径 0.12 cm,内径 0.1 cm,远端(置入十二指肠端)剪成斜面,近端(置入胆总管端)连接 1.0 cm 左右的麻醉用硬膜外导管,前端亦剪成斜面。

1.4 动物分组及给药

48 只大鼠采用随机数字表法分为 4 组各 12 只。ACST 组:开腹手术制备 ACST 模型后关腹,造模后 48h 取材。清胆汤组:开腹手术制备 ACST 模型后关腹,造模后 6h 开始给予清胆汤灌胃给药,

剂量为每只每次 1 ml/100 g,每日 2 次,共给药 4 次,造模后 48h 取材。减压组:造模后 6h,行胆道减压内引流术后关腹,并给予等量生理盐水灌胃,方法同清胆汤组,造模后 48h 取材。清胆汤+减压组:造模后 6h,行胆道减压内引流术后关腹,并给予清胆汤治疗,给药剂量、方法同清胆汤组,造模后 48h 取材。

1.5 ACST 大鼠模型的制备

参考文献[1]。用 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔内注射麻醉,常规备皮消毒,铺无菌洞巾。取上腹正中切口进腹,显露肝脏下缘,找到并提起十二指肠,显露肝十二指肠韧带,找到走行于其浅面的胆总管,分别在胆总管距左右肝管汇合点约 0.6 cm 和 1.4 cm 处下面穿两条 1 号丝线,先结扎远端,轻轻牵引该线,提起胆总管,在距左右肝管汇合点约 1.0 cm 处开一小口,向近端插入引流管,深度 0.6 cm,用预留丝线固定可靠后,向管内缓慢注入菌液 0.2 ml(注射时间不少于 30 s)。用小血管夹夹闭硅胶管中段,碘伏消毒远端。在距十二指肠近端约 3 cm 处于浆肌层做一荷包缝合,用 12 号针头在荷包缝合内的肠壁上戳一小孔,将硅胶管远端插入十二指肠,收紧缝线固定可靠,另取 1 号丝线一端结扎固定于小血管夹上,另一端缝合固定于腹壁切口缘中点,全层缝合关腹。术后给予 5%葡萄糖盐水代替饮用水。

1.6 减压内引流方法

参考文献[1],大鼠造模后 6h 乙醚麻醉,常规消毒铺无菌洞巾,拆除原切口中点处缝线一到两针,找到固定血管夹的丝线,顺丝线可找到引流管及小血管夹,用镊子固定引流管,牵拉丝线取下血管夹后,如上法关腹。

1.7 观察指标及方法

①造模后 48h 统计各组大鼠的死亡率。②造模后 48h 乙醚麻醉后无菌操作下腹主动脉采血 1 ml 注入抗凝管,检测血常规,包括白细胞(WBC)、血小板(PLT),采用全自动血液分析仪检测。③采血 4 ml 注入离心管中,室温静置 30 min,2000 r/min 离心 10 min,取血清用于检测肝功能,包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、直接胆红素(DBiL)、间接胆红素(IBiL),采用全自动生化分析仪检测。④鲎试剂偶氮基质显色法检测血清 LPS 水平,放射免疫法检测血清 TNF- α 水平,实验步骤参照试剂盒说明书。⑤抽血后取出肝右叶,切成约 1.5 cm × 1.0 cm ×

0.5 cm 大小的组织块置于 4% 多聚甲醛溶液(用 pH7.4 PBS 溶液配制)中固定。大体:取标本时观察肝脏的大体病理变化,有无肿大、瘀血、脓肿及胆总管扩张程度。光镜:肝组织固定 24 h 后,常规脱水、透明、石蜡包埋,切片厚 4 μ m,70℃ 烤片 30 min,常规脱蜡水化(二甲苯、梯度酒精)HE 染色,普通光学显微镜观察。

1.8 统计学方法

数据以 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,结果进行方差分析;计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠 48 h 死亡率比较

ACST 组死亡 6 只占 50.0%,减压组死亡 4 只占 33.3%,清胆汤组死亡 5 只占 41.7%,清胆汤+减压组死亡 3 只占 25.0%。ACST 组死亡率最高,与其相比清胆汤组死亡率差异无统计学意义($P>0.05$),而减压组及清胆汤+减压组则显著降低($P<0.01$),减压组与清胆汤+减压组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组大鼠血清 LPS 与 TNF- α 水平比较

表 1 示,与 ACST 组比较,其他各组 LPS 及 TNF- α 均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且清胆汤+减压组 LPS 水平低于减压组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 LPS、TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	LPS(EU/ml)	TNF- α (ng/ml)
ACST 组	6	0.2988 $\pm$ 0.1297	2.279 $\pm$ 0.937
减压组	8	0.1245 $\pm$ 0.0185**	1.451 $\pm$ 0.417*
清胆汤组	7	0.1276 $\pm$ 0.0497**	1.619 $\pm$ 0.543*
清胆汤+减压组	9	0.1021 $\pm$ 0.0122** Δ	1.351 $\pm$ 0.540**

注:与 ACST 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与减压组比较, $\Delta P<0.05$

2.3 各组大鼠肝脏病理形态学比较

大体观察:ACST 组大鼠胆总管明显扩张达 3~5 mm,肝脏肿大、瘀血,有较多出血点,严重者肝脏表面可见小脓肿,数目、大小不等;减压组大鼠胆总

管无明显扩张,肝脏轻度肿大,个别肝脏表面可见小脓肿,但较 ACST 组数目少、面积小;清胆汤组肝脏大体观察与 ACST 组无明显区别;清胆汤+减压组无胆总管扩张,肝脏肿大及瘀血不明显,肝脏表面无脓肿或脓点。

光镜观察:ACST 组肝窦及小叶间胆管明显扩张,肝窦、肝细胞周围及汇管区有大量炎细胞浸润,肝细胞排列疏松紊乱,脂肪变性明显,有散在的点状或小片状坏死灶,坏死灶内大量炎细胞浸润;减压组肝窦及小叶间胆管无明显扩张,肝窦、肝细胞周围及汇管区均有炎细胞浸润,但数量较 ACST 组明显减少,肝细胞轻度脂肪变性,个别大鼠肝脏有点状坏死灶;清胆汤组肝脏病理与 ACST 组相比无改善反而有加重倾向,主要表现在坏死灶面积扩大,数量增加;清胆汤+减压组肝窦基本无扩张,肝细胞排列较整齐,仅少数肝细胞发生脂肪变性,个别大鼠肝脏有点状坏死灶。

2.4 各组大鼠血常规及肝功能比较

表 2 示,清胆汤组与 ACST 组比较,血常规及肝功能各指标差异均无统计学意义($P>0.05$),减压组和清胆汤+减压组大鼠与 ACST 组比较,WBC、ALT、DBiL 和 IBiL 均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 PLT 显著回升($P<0.01$)。清胆汤组肝功能明显高于减压组和清胆汤+减压组($P<0.01$);清胆汤+减压组大鼠与减压组比较,ALT 显著降低($P<0.05$)。

3 讨论

实验研究表明,胆道感染所致的多种细胞因子和炎症介质过度释放引起的脓毒症,在肝、肾、心、肺等多器官损害中起重要作用^[2-3]。目前临床上多在抗感染、抗休克的同时,采取急诊开腹手术治疗,此疗法虽然有效,但手术创伤往往使胆源性脓毒症所致的肝脏损害进一步加重,诱发或加重 MODS,风险极高。而采用中西医结合的治疗方法,即用中药清胆汤配合手术或内窥镜胆道减压引流及抗生素

表 2 各组大鼠血常规及肝功能比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	WBC($\times 10^9/L$)	PLT($\times 10^9/L$)	ALT(IU/L)	DBiL(μ mol/L)	IBiL(μ mol/L)
ACST 组	6	17.15 $\pm$ 7.18	133.75 $\pm$ 83.91	596.57 $\pm$ 190.26	69.36 $\pm$ 20.05	23.80 $\pm$ 8.01
减压组	8	12.90 $\pm$ 5.42*	209.43 $\pm$ 111.76**	255.00 $\pm$ 91.80*	2.28 $\pm$ 0.85**	2.00 $\pm$ 0.64**
清胆汤组	7	16.50 $\pm$ 4.39	160.63 $\pm$ 155.30	492.63 $\pm$ 232.42 $\Delta\Delta$	101.10 $\pm$ 34.31 $\Delta\Delta$	47.16 $\pm$ 15.99 $\Delta\Delta$
清胆汤+减压组	9	13.65 $\pm$ 5.66*	234.50 $\pm$ 91.97**	82.86 $\pm$ 32.02** $\Delta\Delta$	1.71 $\pm$ 0.22** Δ	0.84 $\pm$ 0.35** Δ

注:与 ACST 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与减压组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与清胆汤组比较, $\Delta P<0.01$

等药物,则极大地提高了治疗的安全性,在临床应用中取得了良好的治疗效果。本实验通过对 ACST 大鼠血 WBC、PLT,血清 ALT、DBiL、IBiL、LPS 及 TNF- α 的测定,对肝脏病理改变的观察,探讨了清胆汤联合胆道减压内引流对 ACST 大鼠的作用及可能机制,为临床应用中中西医结合方法治疗 ACST 提供了理论依据。

中医学认为 ACST 属“黄疸”、“胁痛”、“胆胀”等范畴,辨证多为肝胆湿热或胆腑郁热。其病机多因湿热侵袭、饮食不节、情志失调、虫积等致使肝郁气滞、胆失疏泄,郁久化热,煎熬胆汁,聚而为石,进一步使肝胆气机受阻。胆失通降,胆液不循常道外溢而发黄;胆腑不通,不通则痛。如邪热炽盛,与肠中糟粕相搏,则燥屎内结,腑气不通,发展为阳明腑实证。如邪热上扰心神,则神昏谵语,甚则狂乱不安。热盛日久,耗伤气阴,则出现亡阴或亡阳等危重证候。根据六腑以通为用的原则,选用清胆汤(大柴胡汤合茵陈蒿汤加减)以取其清热化湿、疏肝利胆、通里攻下之功效。方用茵陈、金钱草为主药,清热解毒、除湿退黄、利胆排石。配伍栀子、黄芩增强清泄三焦湿热、利胆退黄之功;木香、柴胡、延胡索疏肝、行气、止痛;枳实、芒硝、大黄通里攻下。

本实验研究表明,单纯应用清胆汤的 ACST 大鼠血清 LPS、TNF- α 水平均明显下降,但死亡率、WBC、PLT 和 ALT 则无明显变化,肝脏病理变化无改善,且 DBiL 和 IBiL 升高,提示对于胆道完全梗阻的 ACST 大鼠单纯应用清胆汤,不但无益,反

而可能有害。究其原因可能是由于其利胆作用,增加了胆汁的分泌量,使本来已形成的胆道高压更加严重,进一步破坏胆血屏障,导致血清胆红素上升,加重了肝组织损伤。而清胆汤配合减压引流的 ACST 大鼠 PLT 显著回升,其他指标均显著低于 ACST 组,肝脏病理改变明显好转,与减压组相比 ALT 和 LPS 也明显降低。因此在临床上,应该根据患者的具体情况,合理选择应用利胆类中药。研究结果证明^[4-5],清胆中药能显著下调 LPS、TNF- α 等细胞因子和炎症介质水平,保护肝功能,防治 MODS,但要把握好适应症,应在保证胆道畅通,至少不是完全梗阻的情况下才能应用,对于胆道完全梗阻的患者应慎用。

参考文献

- [1]季成春.中西医结合方法治疗急性重症胆管炎大鼠肝损伤的实验研究[D].大连:大连医科大学,2005:12.
- [2]Gong JP, Liu CA, Wu CX, et al. Nuclear factor κ B activity in patients with acute severe cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(2): 346-349.
- [3]Zhang WZ, Chen YS, Wang JW, et al. Early diagnosis and treatment of severe acute cholangitis[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 150-152.
- [4]章学林,朱培庭,张静哲.中药治疗急性胆道感染的机理研究概况[J].中国中西医结合外科杂志,1999,3:48-49.
- [5]张霞.清热解毒中药拮抗内毒素研究[J].天津中医,1999,16(1):43-45.
- [6]陈小红,程德云,杨莉,等.缺氧大鼠血清和肺内 fractalkine 的变化[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(1):54-55.
- [7]Sukkar MB, Issa R, Xie S, et al. Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN- γ and TNF- α and regulation by TGF- β and corticosteroids[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): L1230-L1240.
- [8]Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640-644.
- [9]Lierat A, Su F, Norwicki M, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease(HMD) [J]. Life Sci, 2001, 70(3): 253-267.
- [10]王灵聪,蒋慧芳,朱佃香,等.姜黄素对 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞 CX3CL1 表达的干预作用[J].中国中医药科技,2010,17(6):517-524.

(收稿日期:2012-07-16;修回日期:2012-10-20)

[编辑:邓媛]

(上接第 508 页)

参考文献

- [1]韩力,时国朝.肺血栓栓塞症中炎症介质和细胞因子的作用[J].诊断学理论与实践,2006,5(6):537-540.
- [2]张斗霞,张丽梅,张凌,等.兔急性肺血栓栓塞症及尿激酶治疗中 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 的变化[J].华中科技大学学报(医学版),2005,34(1):37-40.
- [3]蔡斌,孙晨,王灵聪,等.姜黄素对急性肺栓塞大鼠的影响[J].浙江医学,2011,33(4):457-459.
- [4]Yoneda O, Imai T, Goda S, et al. Fractalkine mediated endothelial cell injury by NK cell[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4055-4062.
- [5]王蕾,李廷谦,向国霞,等.糖皮质激素对内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织 Fractalkine 表达的影响[J].四川大学学报(医学版),2006,37(2):250-253.
- [6]陈小菊,程德云,杨莉,等.缺氧大鼠血清和肺内 fractalkine 的变化[J].中华结核和呼吸杂志,2006,29(1):54-55.

(收稿日期:2012-07-23;修回日期:2012-12-10)

[编辑:洪涛]