

清热解毒化浊片对 ETM 兔肝组织 CD14 及 TNF- α 、IL-1 表达的影响

赵国荣^{1*}, 张 衍², 何宜荣^{1*}, 艾碧琛¹, 肖碧跃¹, 贺又舜¹, 左亚杰³, 熊 焰¹, 陈兰玲³, 尹周安¹

(1.湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208; 2.广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023;

3.湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 探讨清热解毒化浊片对内毒素血症(Endotoxemia, ETM)模型兔肝功能、肝组织 CD14 和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)的影响。**方法** 将 21 只新西兰大耳白兔随机分为正常组、模型组、清热解毒化浊片组(清化组), 每组 7 只。将模型组及清化组兔沿耳缘静脉注射大肠杆菌内毒素(LPS, 10 μ g/kg), 于造模后 2 h 干预, 灌胃后 2 h 心脏采血检测家兔的肝功能、TNF- α 和 IL-1 的变化, 采肝组织检测 CD14 及观察肝脏病理形态。**结果** (1)与模型组比较, 清化组 ALT、AST 上升($P<0.05$), 肝组织 CD14 表达及血清 TNF- α 、IL-1 下降($P<0.05$); (2)模型组肝细胞排列结构紊乱, 有炎性细胞浸润, 且出现空泡样改变, 清化组及正常组改变不明显。**结论** 清热解毒化浊片能下调 ETM 模型兔 CD14、TNF- α 和 IL-1 的表达, 具有多靶点、多效应的干预作用, 推测其有阻断早期 LPS 诱导信号通路的作用。

〔关键词〕 内毒素血症; 清热解毒化浊片; CD14; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1; 茵陈; 黄芩; 滑石

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.006

Effect of Qingre Jiedu Huazhuo Tablets on Expression of CD14 in Liver Tissue, TNF- α and IL-1 of ETM Rabbits

ZHAO Guorong^{1*}, ZHANG Kan², HE Yirong^{1*}, AI bichen¹, XIAO Biyue¹, HE Youshun¹, ZUO Yajie³, XIONG Yan¹,
Chen Lanling³, YIN Zhouan¹

(1.College of TCM, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2.The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530023, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the effect of Qingre Jiedu Huazhuo (QJH) tablets on the expression of CD14, TNF- α and IL-1 in liver tissue of ETM rabbits. **Methods** The 21 New Zealand big-eared rabbits were randomly divided into normal group, model group, QJH tablets group, 7 in each group. The ear edge of model group and QJH group was given intravenous injection of 10 μ g/kg endotoxin. After 2 hours of modeling, the rabbits were given intervention. Then, the liver function, TNF- α and IL-1 were tested. The CD14 in liver tissue was determined and the pathological morphology was observed. **Results** (1) Compared with the model group, the ALT and AST of QJH tablets group were increased ($P<0.05$). The CD14 expression in liver tissue and serum TNF- α and IL-1 were decreased ($P<0.05$). (2) The liver cell array structure of model group was disorder with inflammatory cells infiltration and a cavity change, but the changes in QJH tablets group and blank group were not obvious. **Conclusion** Qingre Jiedu Huazhuo tablets with multi-point target and multi-effects can decrease CD14, TNF- α and IL-1 in ETN rabbits, suggesting the tablets have an effect on the signaling pathway induced by LPS in the early days.

〔Keywords〕 endotoxemia; Qingre Jiedu Huazhuo tablets; CD14; TNF- α ; IL-1; oriental wormwood; radix scutellariae; talc

研究团队前期对清热解毒化浊片(简称化浊片)进行了大量临床及实验研究,证实其不仅可用于治疗病毒性肝炎肝损伤,还可清除内毒素^[1-3]。本实验以

内毒素血症(Endotoxemia, ETM)兔为研究对象,观察清热解毒化浊片对家兔肝功能、CD14、TNF- α 、IL-1 及肝脏病理形态的影响,以期为该药临床运用

〔收稿日期〕 2015-12-06

〔基金项目〕 湖南省教育厅重点项目资助(12A101);湖南中医药大学中医临床基础重点学科资助;湖南中医药大学校级青年基金(校行科学[2013]4号)资助。

〔通讯作者〕 * 赵国荣,女,二级教授,主任医师, E-mail:zhaoguarong1116@sina.com; 何宜荣,男,讲师,主治医师, E-mail:260124907@qq.com。

提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级新西兰大耳白兔,雌雄不限,体质量 1.8–2.5 kg,由长沙市东创实验动物科技服务部提供。动物许可证号:SCXK(湘)2009–0012。

1.1.2 药物 清热解化浊片(湖南中医药大学第一附属医院制剂室提供,批号:20100908),规格为 0.3 g/片,成人一般剂量为 10 片/次,3 次/d,一天剂量为 9 g。根据《中医科研设计与统计学》^[4]将清热解化浊片配制成浓度为 0.04 g/mL 的药液(下称药液)。兔灌胃量为 0.4 g/kg。药液放 4 °C 冰箱保存。

1.1.3 主要试剂与仪器 (1)试剂 大肠杆菌内毒素(*Escherichia coli* 0111:B4,美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:118K4052)、鲎试剂盒(美国 ACC 北京科德角生物技术有限公司代理,批号:249018)、兔 Anti-NF-kBp65(批号:306428)、SABC 免疫组化染色试剂盒(兔 IgG 批号:SA1022)、DAB 显色剂试剂盒(批号:AR1022)、抗体稀释液(批号:C-0007)均购自武汉博士德生物工程有限公司。(2)仪器 MK3 酶标仪,芬兰 LABSYSTBA 集团;TDZ5–4.0 多管架自动平衡离心机,长沙天创仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模^[5] 将 21 只兔随机分为 3 组,即正常组、模型组、清热解化浊片组(简称清化组),每组 7 只。家兔正常饲养 3 d,每天测量肛温 3 次,取平均值为基础体温,并记录各组家兔的一般情况^[6],第 3 天开始造模,将模型组、清化组按 10 μ g/kg 经耳缘静脉注射内毒素,正常组注入同体积无菌生理盐水。

1.2.2 药物干预及标本采集 根据前期实验^[6–7],造模后至 2 h 每 20 分钟测量体温 1 次,并记录开始发热时间,兔在 2 h 内,体温升高,心率、呼吸增快,耸毛、发抖、喷嚏。造模 2 h 时,清化组用清热解化浊片药液 10 mL/kg 灌胃 1 次;正常组与模型组分别以 10 mL/kg 温开水灌胃 1 次。灌胃后同样每 20 分钟测 1 次体温,并记录各组兔症状、体征。

灌胃后 2 h,清化组体温下降,心率、呼吸恢复正常,耸毛、发抖、喷嚏等消失,但与之相对应的模型组体温仍在升高,心率、呼吸恢复加快,耸毛、发抖、喷嚏等症仍存,此时对正常组、模型组、清化组兔进行心脏采血,每只兔分别用肝素钠抗凝管两支各取血 3 mL 用于检测肝功能、TNF- α 、IL-1。取血完毕后,从耳缘静脉注入乌拉坦 3 mL/kg,在麻醉状态下取肝脏右下叶组织,备做病理形态、免疫组化检测 CD14。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肝功能测定 由湖南中医药大学第一附属医院检验科测定。

1.3.2 TNF- α 、IL-1 检测 将各组血清标本,按照试剂盒说明书进行 TNF- α 、IL-1 检测。

1.3.3 免疫组化检测 CD14 将切片脱蜡至水。按照盒试剂盒说明书进行相关操作。最后苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化后自来水冲洗 10–15 min,脱水、透明、封片、400 倍光学显微镜下观察拍片。用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析得出 CD14 的平均光密度值。

1.3.4 肝细胞 HE 染色 取肝脏右叶组织,以 4%多聚甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋切片,然后使用平推式切片连续切片,切片载入载玻片后予行 HE 染色,染色时间为 10 min 左右,切片厚度约 5 μ m,400 倍光学显微镜下随机选取 3 个视野观察拍片。

1.4 统计学处理

实验数据以 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。全部计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,首先进行正态性、方差齐性检验。满足正态性者,不同组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),并进行组间的多重比较;方差齐时选择 LSD 法,方差不齐时选择 Dunnett T3 法;不满足正态性时选择秩和检验。以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 清热解化浊片对家兔内毒素血症肝功能的影响

造模后,模型组与正常组比较,模型组 ALT、AST 均下降,差异有统计学意义($P<0.05$);治疗后,清化组与模型组比较,清化组 ALT、AST 均上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 清热解化浊片对肝功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7, U/L$)

组别	ALT	AST
正常组	55.2 \pm 3.49	50.3 \pm 4.25
模型组	49.6 \pm 4.83 [△]	45.2 \pm 3.82 [△]
清化组	56.7 \pm 1.2 [▽]	49.6 \pm 2.1 [▽]

注:与正常组比,△ $P<0.05$;与模型组比,▽ $P<0.05$ 。

2.2 清热解化浊片对家兔内毒素血症肝脏组织 CD14 及血清细胞因子的影响

造模后,模型组与正常组比较,模型组肝脏组织 CD14、血清 TNF- α 、IL-1 水平均上升,差异有统计学意义($P<0.05$);经过治疗后,清化组与模型组比较,清化组肝脏组织 CD14、血清 TNF- α 、IL-1 水平均下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见表 2。

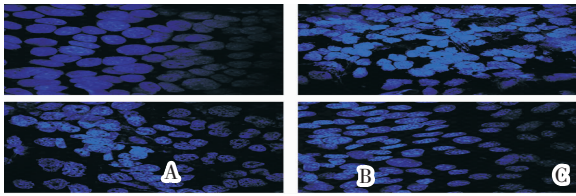
从免疫组化图中可见,正常组肝脏没有 CD14

表2 清热解毒化浊片对肝脏组织 CD14 以及

组别	血清 TNF- α 、IL-1 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=7$)		
	CD14	TNF- α (ng/L)	IL-1 (ng/L)
正常组	1.17 \pm 0.29	56.7 \pm 8.4	4.40 \pm 0.96
模型组	2.56 \pm 0.22 [△]	75.8 \pm 16.3 [△]	9.94 \pm 2.40 [△]
清化组	1.28 \pm 0.41 [▲]	58.7 \pm 7.0 [▲]	5.30 \pm 1.01 [▲]

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

阳性表达(图 1-A),模型组周围肝血窦及肝细胞有 CD14 阳性大量表达(图 1-B);清化组有少量 CD14 阳性表达(图 1-C)。

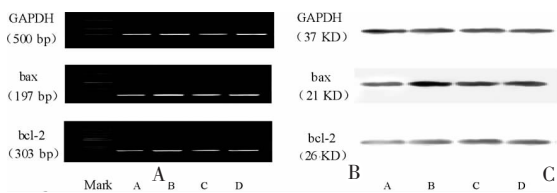


注:A、B、C 分别为正常组、模型组、清化组。

图1 肝脏组织 CD14 表达光镜图(免疫组化 $\times 400$)

2.3 清热解毒化浊片对家兔 ETM 肝损伤肝脏病理形态学的影响

正常组肝组织结构正常,未见变性、坏死炎细胞浸润(图 2-A);模型组肝细胞排列结构紊乱,有炎性细胞浸润,且肝细胞出现空泡样改变(图 2-B);清化组炎细胞浸润、肝细胞肿大及空泡样变性不明显(图 2-C)。



注:A、B、C 分别为正常组、模型组、清化组。

图2 肝脏病理形态学光镜图(HE $\times 400$)

3 结论

LPS 进入机体刺激并促发细胞上 TLR4 信号通路 CD14 等表达引起细胞内信号传递,编码一系列炎症因子,释放 TNF- α 、IL-1 等炎症介质。本实验中清化组的 CD14、TNF- α 、IL-1 较模型对照组明显降低,且有显著性差异,与正常组比较无显著性差异,说明清热解毒化浊片可以下调 CD14 的表达,减少 LPS 的识别及跨膜信号转导,从而使促炎因子 TNF- α 的表达减少,可避免后续细胞因子的瀑布式释放及抗炎/促炎失衡。清化组下游促炎因子 IL-1 的合成减少,也证实清热解毒化浊片对信号通路中 CD14、TNF- α 、IL-1 起到调控作用。

肝脏作为人体内唯一代谢内毒素的器官,内毒素及各种炎症介质直接或间接造成肝功能损伤,而出现肝功能改变,但因为此实验为急性试验,攻毒时间不长,故肝功能损伤不是很重。但从肝脏病理形态上发现其损伤还是较重,病理形态图片显示:模型组肝细胞排列结构紊乱,有炎性细胞浸润,且肝细胞出现空泡样改变。经过清热解毒化浊片治疗后清化组炎细胞浸润、肝细胞肿大及空泡样变性不明显。实验结果还显示,在内毒素血症早期使用清热解毒化浊片干预后,内毒素水平下降,肝细胞 ALT、AST 升高恢复活性,血浆内毒素及肝脏组织结构受损呈平行关系。由于清热解毒化浊片可使 CD14 表达下调,从而减少前炎症细胞因子生成与释放,内皮细胞激活受限,致使白细胞浸润和微血栓不能形成及炎症反应进一步放大被阻断;清化组 TNF- α 、IL-1 下降,ALT、AST 活性恢复升高。因此清热解毒化浊片治疗内毒素血症肝损伤调控 TLR4 信号通路是多靶点的整体调节。

在前期的实验研究中,无论是急性、慢性肝病,基本病机为“湿、热、毒、浊”^[2]。因此有人研究发现温病卫、气、营、血阶段中均存在内毒素血症^[7],并且与温病卫气营血辨证具有相关性^[6],故本研究攻毒后 2 h 相当于卫分证阶段,在该时期初期使用清热解毒,化浊利湿之法,以达到驱邪外出并促进机体自身免疫功能恢复的目的。清热解毒化浊片中有茵陈、滑石、黄芩三药清热利湿;石膏、藿香辟秽和中,宣湿浊之壅滞;白蔻仁芳香悦脾,令气畅而湿行;木通清利湿热,导湿热从小便而去;连翘、贝母清热解毒、散结消肿。诸药合用,重在清热利湿,使湿邪得去,热毒得清,气机调畅。

参考文献:

- [1] 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.
- [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、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] 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.
- [4] 贺石林,王健,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2003:20-21.
- [5] 艾碧琛,赵国荣,贺又舜,等.探讨内毒素血症兔复制卫气营血可能性的实验体会[J].中医药信息,2011,28(5):23-25.
- [6] 赵国荣,艾碧琛,贺又舜,等.内毒素血症兔症状、体征动态变化与卫气营血传变的相关性[J].中医杂志,2011,52(15):1305-1307.
- [7] 杨爱东,曾兰,屠燕捷,等.不同治法对内毒素血症小鼠肺组织细胞因子的影响[J].辽宁中医杂志,2007,34(3):358-360.

(本文编辑 杨瑛)