

大承气汤介导肝脏、胆汁、血浆灭活内毒素的实验研究

田在善 李东华 沈长虹 吴咸中

(天津市中西医结合急腹症研究所 300100)

摘要 以鲎试剂定量测定法进行的体内、外实验证实:去芒硝大承气汤、胆盐对 LPS 有直接灭活效应;正常大鼠经口投予大承气汤(DT)后,其血浆对外加 LPS 灭活能力增强;经口投予 DT 于肠源性内毒素血症(EETM)模型大鼠后,肝组织血流量(ml/100g/min)和肝胆汁流率增加,其肝胆汁对外加 LPS 的灭活能力增强。

关键词 大承气汤 胆盐 内毒素脂多糖(LPS) 肝组织血流量

Experimental Study on Inactivating LPS of Liver, Bile, and Plasma Mediated by Dachengqi Decoction

*Tian Zaishan, Li Donghua, Shen Changhong, Wu Xianzhong
(Tianjing Institute of Integration of Traditional and Western
Medicine in Acute Abdominal Diseases, 300100)*

Abstract: In this study, Dachengqi Decoction without Mirabilite and bile salts was observed to have direct inactivating effect on LPS, which was measured by Tachypleus Amebocyte Lysate quantitative test in vitro. when normal rats were administered with DT orally, the inactivating ability of the plasma on LPS was increased. When DT was administered to the model rats with enterogenous endotoxemia (EETM), the hepatic regional blood flow (ml/100g/min), bile flow and the bile inactivating ability on LPS has been improved greatly.

Key Words: Dachengqi Decoction, bile salts, LPS, hepatic regional blood flow

我们先前的实验研究已证明大承气汤(DT)对肠源性内毒素血症(EETM)大鼠致损的心、肝、肾、肺功能具有改善作用^[1,2],为进一步探讨DT抗内毒素(LPS)的作用途径,本文着重观察了DT对EETM模型大鼠肝组织血流量(ml/100g/min)、肝胆汁流率以及肝胆汁对外加LPS灭活能力的影响,并对经口投予DT的正常大鼠血浆对外加LPS灭活效力做了测定。

1. 材料

1.1 药物 大承气汤药味组成、生药鉴定、购自单位、煎制方法、浓度同前文^[3];去芒硝大承气汤的制备方法同前文^[2]。

1.2 试剂 LPS同前文^[1];去氧胆酸钠(Deoxycholic Acid Sodium Salt, Sigma No. D-6750);牛磺胆酸钠(Sodium taurocholate, 英国 Ward Blenkinsop & Co. LTD);鲎试剂盒(Ⅱ)定量检测微量内毒素(Tachypleus Amebocyte Lysate Kit),上海市医学化验所,批号 950202,等。

1.3 仪器 电解式组织血流计(RBF-1),日本, TOKAI IRIKA Co. LTD); COBUS MIRA PLUS 全自动生化分析仪等。

1.4 动物 Wistar 大鼠,体重 $120 \pm 5\text{g}$,雌雄兼用。购自国家医药管理局天津药物研究院动物房。

2. 方法

2.1 去芒硝DT、胆盐体外灭活LPS实验
实验前精确称取一定量去氧胆酸钠(DCA)、牛磺胆酸钠(TCA),溶于无热原水中,分别配成0.2%,0.15%,0.1%,0.05%4个浓度;去芒硝DT以无热原水依次稀释成1.2%,0.6%,0.3%,0.15%4个浓度;LPS以无热原水配成50pg/ml溶液。实验设3组管:U管(不同浓度的药液0.1ml+LPS溶液0.1ml);B管(不同浓度的药液0.1ml+无热原水0.1ml);S管(LPS溶液0.1ml+无热原水0.1ml)。其余设管按鲎试剂测定法要求进

行。每个被试药均设3个重复管。共孵(37℃)1h后,以鲎试剂定量法测LPS活性,并计算出各浓度药液对外加LPS的灭活百分率。实验结果采用F检验进行统计学处理。

2.2 对EETM模型大鼠肝组织血流量、肝胆汁流率及肝胆汁对外加LPS灭活率的测定 按前文造模、给药(水)、设组^[1]。大鼠以乌拉坦皮下麻醉后背位固定,在无菌条件下,以未启用过的硬膜外管行总胆管插管,连续收集3h的肝胆汁,精确计量;随即以电解式组织血流计针型测定电极插入肝叶的固定区,参考电极置腹部切口皮下,测肝组织血流量;取收集到的肝胆汁按无热原实验操作要求,取部分胆汁以无热原水经倍比稀释后,各浓度的胆汁溶液再以Tris缓冲液进一步做5倍稀释,去蛋白后,做LPS定量测定;U管(胆汁稀释液0.1ml+LPS溶液0.1ml);B管(相应浓度的胆汁稀释液0.1ml+无热原水0.1ml);S管(LPS溶液0.1ml+无热原水0.1ml)。其余设管按鲎试剂定量测定法要求进行。测定并计算各稀释度胆汁对外加LPS的灭活率。另取一部分胆汁按3倍容量加入无水乙醇,60℃加热去蛋白,上清液以自动分析仪(终点法)做总胆汁酸(TBA)量测定。

2.3 经口投予DT的正常大鼠其血浆对外加LPS灭活率的测定 取自由饮水、禁食16h的大鼠30只,均分2组,即给药组与对照组。给药组大鼠按1g/100g体重经口投予DT,对照组则以等容量蒸馏水代之。投药后3h,在乌拉坦腹腔麻醉下,腹主动脉取血,肝素抗凝,分离血浆供用。即取一定量血浆以无热原水做8倍稀释后,再取一定量按鲎试剂定量法常规要求以Tris溶液行5倍稀释,加热离心,取上清液0.1ml+LPS溶液(25pg/ml)0.1ml为U管;上清液0.1ml+无热原水0.1ml为B管;LPS溶液(25pg/ml)0.1ml+无热原水0.1ml为S管。其余设管按鲎试剂测定法要求进行。以鲎试剂定量法测LPS活

性并计算出对外加 LPS 的灭活百分率。

以上各实验结果均以 t 检验做统计学处理。

3 结果

3.1 胆盐、去芒硝 DT 体外 LPS 灭活效应的观察表明去芒硝 DT, DCA, TCA 均具有强大的灭活 LPS 能力, 只当去硝芒 DT 在 0.15% 浓度, DCA、TCA 在 0.05% 浓度时, 其 LPS 灭活率才较前三个浓度呈明显减弱, 但仍呈明显的灭活效应。(见表 1)

3.2 EETM 模型大鼠肝组织血流量、肝胆汁流率及肝胆汁对外加 LPS 灭活率的影响。

3.2.1 DT 对 EETM 模型大鼠肝组织血流量、肝胆汁流率的影响 表明大鼠造模后肝组织血流量较正常组明显减少, 而造模同时

经口投以 DT, 则能明显改善肝血循环, 其血流量较模型组明显为高; DT 治疗组肝胆汁分泌量较模型组明显为高。(见表 2)

表 1. DCA, TCA, 去芒硝 DT 对外加 LPS 的灭活率($\bar{x} \pm s$)

药物	浓度(%)	灭活率
去芒硝 DT	1.2	91.0 ± 2.25
	0.6	90.1 ± 0.90
	0.3	89.2 ± 1.32
	0.15	38.4 ± 1.32 ^{△△}
DCA	0.2	97.7 ± 0.00
	0.15	96.9 ± 0.63
	0.1	96.9 ± 0.63
	0.05	51.9 ± 0.77 ^{△△}
TCA	0.2	97.1 ± 0.55
	0.15	96.9 ± 0.63
	0.1	97.5 ± 1.15
	0.05	59.6 ± 1.73 ^{△△}

与其他三个浓度比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 DT 对肠源性内毒素血症模型大鼠肝组织血流量、肝胆汁流率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝组织血流量 (ml/100g 组织/min)	肝胆汁流率	
			ml/只/3h	ml/100g 体重/3h
正常组(N)	10	87.7 ± 42.6	1.15 ± 0.63	0.89 ± 0.48
模型组(M)	10	54.2 ± 14.7*	1.08 ± 0.38	0.90 ± 0.33
DT 治疗组(D)	10	69.2 ± 12.4 [△]	1.59 ± 0.48 [△]	1.21 ± 0.34 [△]

N/M 比较: * $P < 0.05$; D/M 比较: $\Delta P < 0.05$

3.2.2 EETM 模型大鼠投予 DT 其肝胆汁对外加 LPS 灭活率的影响 表明 DT 治疗组的肝胆汁对外加 LPS 的灭活能力最强, 模型组最差, 正常组较模型组稍强。说明大鼠虽

经造模处理但同时经口投予 DT, 其胆汁对外加 LPS 的灭活能力仍极大地被增强。(见表 3)

表 3 EETM 模型大鼠投予 DT 后其肝胆汁对外加 LPS 灭活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肝胆汁倍比稀释度					
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
正常组(N)	10	44.6 ± 17.0	22.1 ± 19.2	2.3 ± 6.7	0	0	0
模型组(M)	10	26.5 ± 15.0*	1.04 ± 2.44**	0	0	0	0
DT 治疗组(D)	10	62.8 ± 6.95 ^{△△△}	50.6 ± 13.6 ^{△△△}	32.1 ± 23.6 ^{△△△}	19.0 ± 19.4 ^{△△}	11.5 ± 14.8 [△]	1.0 ± 3.16

N/M 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; D/M 比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

3.2.3 DT 对 EETM 模型大鼠肝胆汁中的总胆汁酸(TBA)含量测定 表明单位时间(3h)泌出的 TBA 量以 DT 治疗组为最高, 不仅显著高于模型组, 且也显著高于正常组。但

以 TBAmM/L 计算, 则三组间未见有显著性差异。说明 DT 治疗组可增加单位时间里泌出的 TBA 量, 但不增加肝胆汁中 TBA 的浓度。(见表 4)

表 4 DT 对肠源性内毒素血症模型大鼠肝胆汁中总胆汁酸含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TBA ($\mu\text{M}/\text{只}/\text{h}$)	TBA ($\mu\text{M}/100\text{g}/3\text{h}$)	TBA (mM/L)
正常组(N)	10	9.36 \pm 5.07	7.22 \pm 3.93	8.55 \pm 0.45
模型组(M)	10	8.68 \pm 3.23	7.21 \pm 2.79	8.03 \pm 0.88
DT组(D)	10	13.50 \pm 3.82 Δ	10.38 \pm 2.73 $\Delta\Delta$	8.12 \pm 0.61

D/M 比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

3.3 正常大鼠经口投予 DT 后其血浆对外加 LPS 灭活率的影响 表明正常大鼠经口投予 DT 3h 后, 血浆对外加 LPS 的灭活能力较对照组明显增强。

表 5 正常大鼠经口投予 DT 后血浆对外加 LPS 灭活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	对外加 LPS 的灭活率
对照组	15	20.7 \pm 7.2
给药组	15	35.7 \pm 10.5 ***

与对照组比较: $*** P < 0.001$

4 讨论

DT 的荡涤肠腑, 峻下热结的临床功效早已为古代医家长期医疗实践所证实。近 30 年来由于将其用于急腹症治疗, 对其治疗机理进行了广泛而深入的研究^[3,4]。由此推测, DT 的峻下热结作用对于逐除肠道菌毒(LPS)、防治 EETM 可能具有重要意义。胆盐具有灭活菌毒(LPS)的功效^[5,6]。如将小鼠总胆管结扎 1 周后, 肠道 G⁻ 菌激增 100 倍, 并有肠粘膜微绒毛水肿及上皮细胞与固有层分离表现^[7], 梗阻性黄疸病人常并发内毒素血症(ETM), 此时外引流手术对防止 ETM

无效, 而内引流手术则可明显降低 ETM 的术后发生率, 其起效机理与胆盐进入肠腔有关^[8]。本实验结果表明, 模型大鼠给予 DT 后, 在胆汁胆盐浓度无明显变化的情况下, 肝胆汁流率明显增加, 这提示入肠的胆盐量亦因之明显增多; 加之给药后的肝胆汁对外加 LPS 的灭活能力又被极大地增强, 故实际上藉入肠胆盐灭活肠道 LPS 的能力可增强达十数倍之多。正常血浆对 LPS 有一定的灭活能力, 而投予 DT 后的血浆, 对外加 LPS 的灭活能力增强, 推测与用药后血浆中有一定浓度的活性药物有关。

参考文献

- [1] 田在善, 郑治纲, 李东华, 等. 中国实验方剂学杂志 1996;2(5):34
- [2] 田在善, 沈长虹, 李东华, 等. 中国实验方剂学杂志 1997;3(1):12
- [3] 田在善, 沈长虹, 李东华, 等. 中国中药杂志 1993;18(3):170
- [4] 田在善. 天津中医 1994;11(2):43
- [5] Floch MH, Binder HJ, Filburn B. et al. The American Journal of Clinical Nutrition 1972; 25:1418.
- [6] Cahill CJ, Pain JA, Bailey ME. Surgery, Gynecology and Obstetrics. 1987;165:519.
- [7] Deitch EA, Sittig K, Li M. et al. Am. J. Surg. 1990;159(1):79
- [8] Wait RB and Kahng KU. Am. J. Surg. 1989; 157:256.

(收稿: 1996-05-07)