

## 基于HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B通路探讨桃仁承气汤调节肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态的作用机制

王丽辉\*, 孙治霞, 索红亮, 郭艳青, 袁彬, 李宗尚, 李莉  
(河南中医药大学 第二附属医院, 郑州 450002)

**[摘要]** 目的: 基于高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路研究桃仁承气汤调节肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态的作用机制。方法: 60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、甘草酸(HMGB1抑制剂,  $0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、桃仁承气汤( $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组、甘草酸+桃仁承气汤( $0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}+10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组, 每组12只。除假手术组外, 其余各组建立肠源性脓毒症大鼠模型, 各组分别以药物处理后, 采用苏木素-伊红(HE)染色检测各组大鼠小肠黏膜组织病理改变, 比较黏膜厚度、绒毛高度变化; 采用试剂盒检测各组大鼠小肠黏膜组织分泌型免疫球蛋白A(sIgA)含量, 血清二胺氧化酶(DAO)及D-乳酸水平; 检测各组大鼠肠道肌电活动, 比较小肠平滑肌慢波频率、慢波振幅; 检测各组大鼠肠道菌群, 比较大肠埃希菌、双歧杆菌和乳酸杆菌含量; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小肠组织中HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B通路蛋白HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65表达情况。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠小肠黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度, sIgA含量, 平滑肌慢波频率及振幅、肠道双歧杆菌及乳酸杆菌含量显著降低, 血清DAO及D-乳酸水平、肠道大肠埃希菌含量、小肠组织HMGB1, TLR4, MyD88及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达明显升高( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度, sIgA含量、平滑肌慢波频率及振幅、肠道双歧杆菌及乳酸杆菌含量升高, 血清DAO及D-乳酸水平、肠道大肠埃希菌含量、小肠组织HMGB1, TLR4, MyD88及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达降低( $P<0.05$ ); 与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较, 甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度, sIgA含量、平滑肌慢波频率及振幅、肠道双歧杆菌及乳酸杆菌含量升高, 血清DAO及D-乳酸水平、肠道大肠埃希菌含量、小肠组织HMGB1, TLR4, MyD88及NF- $\kappa$ B p65蛋白表达降低, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论: 桃仁承气汤可减轻小肠黏膜损伤, 调控肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态, 恢复肠道功能, 保持菌群平衡, 可能是通过下调HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B通路实现的。

**[关键词]** 桃仁承气汤; 高迁移率族蛋白B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路; 肠源性脓毒症; 肠道肌电活动; 微环境稳态

**[中图分类号]** R2-0;R289;R373.1;R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0078-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201239

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200407.2006.003.html>

**[网络出版日期]** 2020-4-8 9:26

### Study on Mechanism of Taoren Chengqitang in Regulating Intestinal Myoelectrical Activity and Microenvironment Homeostasis in Intestinal Sepsis Rats Based on HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B Pathway

WANG Li-hui\*, SUN Zhi-xia, SUO Hong-liang, GUO Yan-qing, YUAN Bin, LI Zong-shang, LI Li  
(Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the mechanism of Taoren Chengqitang in regulating intestinal myoelectric activity and microenvironment homeostasis in intestinal sepsis rats based on high mobility group protein 1(HMGB1)/Toll-like receptor 4(TLR4)/nuclear factor - $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) pathway. **Method:** The 60 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, glycyrrhizic acid (HMGB1 inhibitor,

**[收稿日期]** 20190824(007)

**[基金项目]** 河南省中医药科学研究专项(2018ZY2050)

**[通信作者]** \*王丽辉, 副主任医师, 从事脓毒症基础与临床研究, E-mail: lihuiwang972@163.com

0.03 g·kg<sup>-1</sup>) group, Taoren Chengqitang group (10 g·kg<sup>-1</sup>), glycyrrhizic acid+Taoren Chengqitang group (0.03 g·kg<sup>-1</sup>+10 g·kg<sup>-1</sup>), with 12 rats in each group. Except the sham operation group, the other groups established intestinal sepsis rat models, each group was treated with medicine, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the histopathological changes of small intestinal mucosa in rats of each group, the changes of mucosal thickness and villus height were compared, the levels of secretory immunoglobulin A (sIgA), diamine oxidase (DAO) and D-lactic acid in intestinal mucosa of rats were detected by kit, the intestinal myoelectrical activity of rats in each group was measured, the slow wave frequency and amplitude of small intestinal smooth muscle were compared, the intestinal flora of rats in each group was detected, the contents of *E. coli*, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* were compared, and the expressions of HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway proteins HMGB1, TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 in small intestinal tissues were detected by Western blot.

**Result:** Compared with sham operated group, the villus height, mucosal thickness, sIgA content, slow wave frequency and amplitude of smooth muscle, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* contents in intestinal mucosa of model group rats were significantly decreased, and serum DAO and D-lactic acid levels, intestinal *E. coli* content, intestinal tissue HMGB1, TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 proteins were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the villus height, mucosal thickness, sIgA content, slow wave frequency and amplitude of smooth muscle, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* contents in intestinal mucosa of the Taoren Chengqitang group, glycyrrhizic acid group, and glycyrrhizic acid + Taoren Chengqitang group were significantly increased, and serum DAO and D-lactic acid levels, intestinal *E. coli* content, intestinal tissue HMGB1, TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 proteins were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the Taoren Chengqitang group and the glycyrrhizic acid group, the villus height, mucosal thickness, sIgA content, slow wave frequency and amplitude of smooth muscle, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* contents in intestinal mucosa of glycyrrhizic acid+Taoren Chengqitang group were significantly increased, and serum DAO and D-lactic acid levels, intestinal *E. coli* content, intestinal tissue HMGB1, TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 proteins were significantly decreased, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Taoren Chengqitang can alleviate intestinal mucosal injury, regulate intestinal myoelectrical activity and microenvironment homeostasis, restore intestinal function and maintain flora balance in intestinal sepsis rats, which may be achieved by down-regulating HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway.

**[Key words]** Taoren Chengqitang; high mobility group protein 1(HMGB1)/Toll-like receptor 4(TLR4)/nuclear factor kappa-B(NF- $\kappa$ B) pathway; intestinal sepsis; intestinal myoelectrical activity; microenvironment homeostasis

肠源性脓毒症作为重症监护室的常见危重病,是由肠道感染引发的一种全身性炎症反应,病情发展迅速,临床救治困难,发病率高、病死率高<sup>[1]</sup>,每年全世界超过数百万人患病,且呈逐年上升趋势,该病会引起患者免疫失调,累及全身多种器官,导致多器官衰竭,严重威胁患者生命健康,并造成家庭、社会沉重的经济负担<sup>[2-3]</sup>。脓毒症在中医中归于伤寒、温病范畴,毒邪内蕴、正气不足,以通腑温下、活血化瘀等为治疗原则<sup>[4]</sup>,桃仁承气汤出自《伤寒论》,是治疗温病血分证的代表方,行气通瘀、调理气血,可减轻脓毒症大鼠炎症反应,保护肠黏膜<sup>[5]</sup>,因而推测桃仁承气汤可能对肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态具有调节作用。高迁移率族蛋白

B1(HMGB1)/Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路介导免疫活化、细胞凋亡、氧化应激等多种生理、病理过程,参与机体炎症反应,是脓毒症致炎症介质过度释放的重要途径,还有学者研究证实,五味子碱B可通过下调该通路改善脂多糖(LPS)引起的脓毒症临床症状<sup>[6-7]</sup>,因此其认为HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B通路在脓毒症的治疗中具有关键的作用。但是关于桃仁承气汤是否能通过抑制该通路降低炎症反应,治疗脓毒症尚未可知。因此,本文通过建立肠源性脓毒症大鼠模型,探究桃仁承气汤对肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态的影响及其作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 67只SPF级雄性SD大鼠购自郑州大学实验动物中心,合格证号SCXK(豫)2018-0079,体质量(200±20)g,所有大鼠在清洁、安静、通风良好的环境中饲养,自然光照,温度为25℃,相对湿度为50%,自由饮食、饮水,定期更换垫料、添加饲料剂饮用水,经常清理、消毒鼠笼。本实验研究获得河南省中医院动物伦理委员会批准,批准号2018093。

**1.2 药物及试剂** 桃仁承气汤由大黄15g,芒硝6g,桃仁9g,当归9g,赤芍9g,牡丹皮9g组成,以上中药均由河南省中医院中药房提供,经河南省中医院中药房副主任药师赵旭鉴定为正品,参照《温病条辨》中的煎煮方法煎煮:将药物加入5倍的蒸馏水浸泡2h,文火煎煮0.5min,过滤收集药液,再次在药渣中加入同样的蒸馏水再次煎煮,过滤收集药液,然后混合2次药液并浓缩的1g·mL<sup>-1</sup>的药液。甘草酸(上海恒斐生物科技有限公司,批号SG8600);曙红亚甲蓝琼脂(EMB)(上海恒斐生物科技有限公司,批号LA2220);乳酸菌选择性琼脂(LBS)(上海君瑞生物技术有限公司,批号UFP0289);亚硫酸铋琼脂(BS)[赫澎(上海)生物技术有限公司,批号HPBIO-BS874];血清二胺氧化酶(DAO)检测试剂盒(上海晶抗生物工程有限公司,批号JK-(a)-2773);D-乳酸检测试剂盒[孟成科技(上海)有限公司生产,批号K667];大鼠分泌型免疫球蛋白(SIg)A酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,兔源HMGB1,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),核纤层蛋白B1(Lamin B1),TLR4,髓样分化因子88(MyD88)及NF-κB p65一抗,羊抗兔二抗(美国Abcam公司,批号分别为ab157735,ab79823,ab181602,ab194109,ab214185,ab2064,ab16502,ab150077);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号P1200);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒,BCA试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0028,P0011,C0105)。

**1.3 仪器** 1X70型倒置显微镜(日本Olympus公司);BL-420F型生物机能实验系统(成都泰盟软件有限公司);XELx800型酶标仪(美国Perkin Elmer公司);Centrifuge 5424R型低温高速离心机(德国Eppendorf股份公司);RM2035型轮转切片机,EG1160型包埋机,HI1220型烤片机(德国Leica公司);Mini PROTEAN型蛋白电泳仪及转膜仪(美国

Bio-Rad公司);2500凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);BSA224S-CW型电子天平(德国Sartorius公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备及分组给药** 以盲肠结扎穿孔法建立脓毒症大鼠模型<sup>[8]</sup>,以40mg·kg<sup>-1</sup>的剂量腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉大鼠,将其以仰卧位固定在操作台上,铺巾消毒,开腹分离盲肠,在距盲肠末端1/3处结扎,并以18号针头于盲肠末端穿孔,使少许肠内物流至腹腔后逐层缝合,观察大鼠活动,当其出现精神萎靡、少动、心率加快,血压下降视为造模成功,共造模55只,将造模成功的48只大鼠随机分为模型组、甘草酸组、桃仁承气汤组、甘草酸+桃仁承气汤组,每组12只。另取12只SD大鼠仅分离盲肠远端,不做结扎与穿孔,设为假手术组。

参照文献将桃仁承气汤配制为1g·mL<sup>-1</sup>的溶液,以生理盐水溶解甘草酸配制为0.003g·mL<sup>-1</sup>的溶液<sup>[9]</sup>,造模成功后,桃仁承气汤和甘草酸分别以10g·kg<sup>-1</sup>和0.03g·kg<sup>-1</sup>的剂量灌胃<sup>[5,10]</sup>,灌胃体积为10mL·kg<sup>-1</sup>;模型组和假手术组以10mL·kg<sup>-1</sup>的生理盐水灌胃,连续灌胃3周。

**2.2 检测大鼠肠道肌电活动** 末次给药24h后,各组大鼠麻醉后开腹,于距离回盲部约2cm处的回肠上置入银针电极,测量电极置于肠壁浆肌层,参考电极置于皮下,以BL-420F生物机能实验系统记录肠道平滑肌电活动,扫描速度设为1.0s/div,电增益为500mV,时间常数为3s,高频滤波为20Hz,共记录30min。

**2.3 检测大鼠肠道菌群及收集标本** 肠道肌电活动检测结束后,以无菌方法取各组大鼠盲肠内容物0.1~0.2g,稀释1×10<sup>6</sup>倍,然后各取菌液50μL接种在EMB平板,LBS平板及BS平板上,分别用于鉴定、计数大肠埃希菌、乳酸杆菌和双歧杆菌,置于37℃培养48h后,观察结果并计算菌落数。

各组大鼠腹主动脉采血2mL,4℃,3000r·min<sup>-1</sup>离心20min,取上清液保存在-80℃冰箱中备用。处死大鼠后解剖分离出小肠组织,剪取约1g储存于-80℃冰箱中备用,剩余组织以生理盐水漂洗,4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,采用切片机做病理切片备用。

**2.4 HE染色观察大鼠小肠组织病理形态** 选出2.3项中完整典型的切片,经二甲苯脱蜡、高浓度到低浓度酒精浸泡后,以HE染色试剂盒染色,具体参照说明书的步骤进行,再次脱水、透明后封片,在光

学显微镜下观察肠黏膜组织病理变化, 任选5个视野拍照。

**2.5 ELISA 检测大鼠小肠黏膜组织 sIgA 含量及血清 DAO, D-乳酸水平** 按 2.3 项下小肠组织剪碎后, 加入蛋白裂解液, 以匀浆机制备为匀浆液, 4 °C, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液约 200 μL (剩余上清液储存于 -80 °C 冰箱中备用), 以 sIgA ELISA 试剂盒检测小肠黏膜组织 sIgA 含量, 按 2.3 项下的血清在 4 °C 解冻, 分别以 DAO 检测试剂盒, D-乳酸检测试剂盒检测血清 DAO, D-乳酸水平, 具体参照说明书步骤进行。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠小肠组织 HMGB1/TLR4/NF-κB 通路蛋白的表达** 以蛋白提取试剂盒分别提取 2.3 项下剩余小肠组织中细胞质及细胞核中的总蛋白, 并以 BCA 试剂盒分别测得其中蛋白浓度, 具体参照说明书的步骤进行, 各组取含有相同质量总蛋白的样品液进行电泳, 转移蛋白至 PVDF 膜上, 加入 5% 脱脂奶粉, 室温封闭 2 h, 根据目的蛋白分子质量截取蛋白条带置于小盒中, 分别加入兔源 HMGB1, GAPDH, Lamin B1, TLR4, MyD88 及 NF-κB p65 一抗, 稀释倍数均为 1: 2 000, 4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 加入羊抗兔二抗 (1: 1 000), 室温孵育 2 h 后, 以增强化学发光法显色, 以凝胶成像系统拍照, 并以 Quantity One 软件分析各组蛋白相对表达量。

**2.7 统计学分析** 所有数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

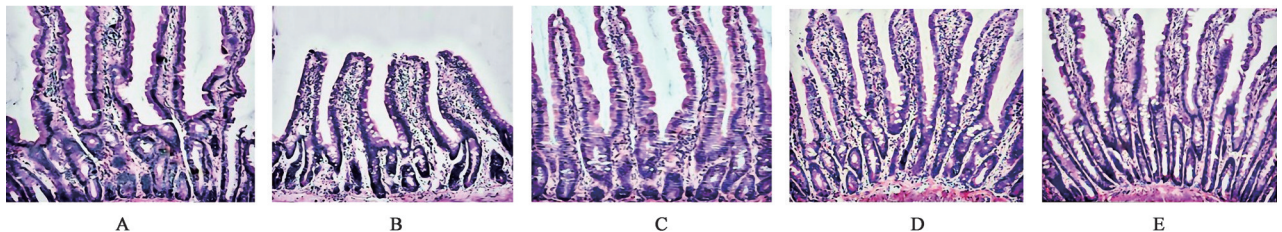
**3.1 对大鼠小肠黏膜组织病理形态的影响** 假手术组大鼠小肠黏膜组织结构正常、完好。与假手术组比较, 模型组大鼠小肠黏膜上皮细胞坏死, 绒毛受损、塌陷、排列紊乱, 黏膜厚度、绒毛高度明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织黏膜厚度、绒毛高度升高 ( $P < 0.05$ ); 与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较, 甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织黏膜厚度、绒毛高度升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 1, 图 1。

表 1 桃仁承气汤对大鼠小肠黏膜形态的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 1 Effect of Taoren Chengqitang on morphology of small intestinal mucosa in rats ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	绒毛高度	黏膜厚度 /μm
假手术	-	166.01±13.63	260.06±20.03
模型	-	100.23±10.72 <sup>1)</sup>	170.62±12.93 <sup>1)</sup>
桃仁承气汤	10	133.49±12.02 <sup>2)</sup>	216.13±15.26 <sup>2)</sup>
甘草酸	0.03	132.92±12.38 <sup>2)</sup>	215.36±15.02 <sup>2)</sup>
甘草酸+桃仁承气汤	10+0.03	164.36±13.45 <sup>2,3,4)</sup>	259.01±20.06 <sup>2,3,4)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与桃仁承气汤组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ; 与甘草酸组比较<sup>4)</sup> $P < 0.05$  (表 2-5 同)。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 桃仁承气汤组; D. 甘草酸组; E. 甘草酸+桃仁承气汤组 (图 2 同)

图 1 桃仁承气汤对大鼠小肠黏膜组织病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Taoren Chengqitang on histopathology of small intestinal mucosa in rats (HE, ×200)

**3.2 对大鼠小肠黏膜组织 sIgA 及血清 DAO, D-乳酸水平的影响** 与假手术组比较, 模型组大鼠小肠黏膜组织 sIgA 明显降低, 血清 DAO, D-乳酸水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织 sIgA 升高, 血清 DAO, D-乳酸水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较, 甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠黏膜组织 sIgA 升高, 血清 DAO, D-乳酸水平降低 ( $P < 0.05$ )。

见表 2。

**3.3 对大鼠肠道肌电活动的影响** 与假手术组比较, 模型组大鼠小肠平滑肌慢波频率和慢波振幅明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠平滑肌慢波频率和慢波振幅明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较, 甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠平滑肌慢波频率和慢波振幅明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

表 2 桃仁承气汤对大鼠小肠黏膜组织 sIgA 及血清 DAO、D-乳酸水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 2 Effect of Taoren Chengqitang on SIgA and serum Dao, D-lactate levels in small intestinal mucosa of rats( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	sIgA/mg·L <sup>-1</sup>	D-乳酸/mg·L <sup>-1</sup>	DAO/U·L <sup>-1</sup>
假手术	-	26.45±2.13	7.83±0.70	18.92±1.83
模型	-	11.21±1.02 <sup>1)</sup>	12.95±1.27 <sup>1)</sup>	32.23±2.35 <sup>1)</sup>
桃仁承气汤	10	18.86±1.53 <sup>2)</sup>	10.32±0.97 <sup>2)</sup>	24.84±1.91 <sup>2)</sup>
甘草酸	0.03	18.74±1.51 <sup>2)</sup>	10.41±0.95 <sup>2)</sup>	24.98±1.83 <sup>2)</sup>
甘草酸+桃仁承气汤	10+0.03	25.91±2.03 <sup>2,3,4)</sup>	8.03±0.64 <sup>2,3,4)</sup>	18.21±1.79 <sup>2,3,4)</sup>

表 3 桃仁承气汤对大鼠肠道肌电活动的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 3 Effect of Taoren Chengqitang on intestinal myoelectric activity in rats( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	慢波频率/Hz	慢波振幅/mV
假手术	-	16.39±1.46	0.39±0.06
模型	-	10.81±0.86 <sup>1)</sup>	0.12±0.02 <sup>1)</sup>
桃仁承气汤	10	13.43±1.15 <sup>2)</sup>	0.25±0.03 <sup>2)</sup>
甘草酸	0.03	13.38±1.22 <sup>2)</sup>	0.23±0.04 <sup>2)</sup>
甘草酸+桃仁承气汤	10+0.03	16.01±1.43 <sup>2,3,4)</sup>	0.36±0.05 <sup>2,3,4)</sup>

表 4 桃仁承气汤对大鼠肠道菌群的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 4 Effect of Taoren Chengqitang on intestinal flora in rats( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	大肠埃希菌	双歧杆菌	乳酸杆菌
假手术	-	6.18±0.42	10.19±0.71	8.31±0.62
模型	-	13.03±0.61 <sup>1)</sup>	2.91±0.27 <sup>1)</sup>	1.61±0.16 <sup>1)</sup>
桃仁承气汤	10	9.58±0.53 <sup>2)</sup>	6.01±0.43 <sup>2)</sup>	4.52±0.34 <sup>2)</sup>
甘草酸	0.03	9.39±0.51 <sup>2)</sup>	6.13±0.52 <sup>2)</sup>	4.61±0.36 <sup>2)</sup>
甘草酸+桃仁承气汤	10+0.03	6.92±0.44 <sup>2,3,4)</sup>	9.97±0.63 <sup>2,3,4)</sup>	8.01±0.59 <sup>2,3,4)</sup>

3.5 对大鼠小肠组织中 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠小肠组织中 HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠

3.4 对大鼠肠道菌群的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肠道大肠埃希菌的含量明显升高,双歧杆菌和乳酸杆菌的含量明显降低( $P<0.05$ );与模型组比较,桃仁承气汤组、甘草酸组、甘草酸+桃仁承气汤组大鼠肠道大肠埃希菌的含量降低,双歧杆菌和乳酸杆菌的含量明显升高( $P<0.05$ );与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较,甘草酸+桃仁承气汤组大鼠肠道大肠埃希菌的含量降低,双歧杆菌和乳酸杆菌的含量明显升高( $P<0.05$ )。见表 4。

小肠组织中 HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达明显降低( $P<0.05$ );与桃仁承气汤组、甘草酸组分别比较,甘草酸+桃仁承气汤组大鼠小肠组织中 HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达降低( $P<0.05$ ),见表 5,图 2。

表 5 桃仁承气汤对大鼠小肠组织中 HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 5 Effect of Taoren Chengqitang on HMGB1, TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 protein expression in small intestine of rats( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HMGB1/GAPDH	TLR4/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF- $\kappa$ B p65/Lamin B1
假手术	-	0.12±0.02	0.15±0.03	0.09±0.02	0.23±0.03
模型	-	1.26±0.24 <sup>1)</sup>	0.93±0.19 <sup>1)</sup>	1.05±0.22 <sup>1)</sup>	1.81±0.23 <sup>1)</sup>
桃仁承气汤	10	0.75±0.16 <sup>2)</sup>	0.42±0.10 <sup>2)</sup>	0.51±0.12 <sup>2)</sup>	0.95±0.11 <sup>2)</sup>
甘草酸	0.03	0.76±0.15 <sup>2)</sup>	0.43±0.09 <sup>2)</sup>	0.52±0.11 <sup>2)</sup>	0.94±0.12 <sup>2)</sup>
甘草酸+桃仁承气汤	10+0.03	0.18±0.04 <sup>2,3,4)</sup>	0.16±0.04 <sup>2,3,4)</sup>	0.15±0.05 <sup>2,3,4)</sup>	0.24±0.03 <sup>2,3,4)</sup>

#### 4 讨论

本文通过采用以盲肠结扎穿孔法建立脓毒症大鼠模型,结果显示,模型组大鼠小肠黏膜上皮细

胞坏死,绒毛受损、塌陷、排列紊乱,黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度显著降低,表明大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡,黏膜组织结构受损,肠黏膜机械屏障被

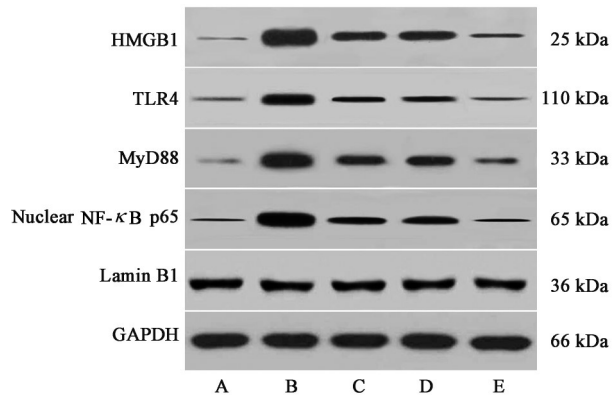


图2 大鼠小肠组织中HMGB1, TLR4, MyD88, NF-κB p65蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of HMGB1, TLR4, MyD88, NF-κB p65 protein expression in rat small intestine

破坏。sIgA是肠道相关淋巴组织产生的特异性免疫球蛋白,可阻碍革兰氏阴性菌与上皮细胞受体结合,同时刺激肠道黏液分泌并加速黏液层的流动,可有效阻止细菌黏附于肠黏膜,改变细菌结构、抑制细菌基因表达,在黏膜免疫中起到重要调节作用<sup>[13]</sup>;DAO是作为小肠黏膜上层绒毛中细胞酶,当小肠黏膜组织结构受损时,可大量进入血液,是反映肠黏膜屏障完整性和受损程度的一种指标<sup>[14]</sup>;D-乳酸是肠道细菌的酵解产物,因感染、缺血及创伤性休克引起肠道功能障碍均导致其血中浓度升高,可反映肠道通透性并可预测感染性休克的发生<sup>[15]</sup>;肠道平滑肌的电活动能直接反应肠道的蠕动情况,是评价肠道功能的重要指标,其中慢波是胃肠道平滑肌兴奋时的电活动,其频率及振幅与胃肠道平滑肌的收缩功能呈正相关<sup>[16]</sup>,模型大鼠小肠黏膜组织sIgA含量、平滑肌慢波频率及振幅、双歧杆菌及乳酸杆菌含量显著降低,肠道大肠埃希菌、血清DAO及D-乳酸水平明显升高,表明大鼠肠道免疫功能降低,肠道通透性升高,平滑肌的收缩功能受损,肠道蠕动减缓,肠道菌群紊乱,有益菌减少,致病菌增加,模型建立成功。

肠源性脓毒症的发病机制主要是肠黏膜机械屏障受损,使肠道通透性增加、肠道菌群移位、肠道免疫功能下降及肠道微生态环境失衡,进而导致全身严重炎症反应,最终导致多器官功能衰竭<sup>[11-12]</sup>,而中医理论认为外感热病导致气虚无力,瘀血阻滞是脓毒症发生的重要病理机制,其治疗应以行气通腑、活血化瘀为主;源自《伤寒论》的桃仁承气汤由大黄、芒硝、桃仁、当归、赤芍、牡丹皮组成,赤芍、牡丹皮可清热凉血,活血散瘀;桃仁、当归可活血化

瘀,润燥滑肠,芒硝可减轻肠道炎症反应,可用于治疗脓毒症<sup>[17-18]</sup>,本研究以桃仁承气汤处理脓毒症大鼠,结果显示,桃仁承气汤可升高小肠黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度,sIgA含量,平滑肌慢波频率及振幅、肠道双歧杆菌及乳酸杆菌含量,降低血清DAO及D-乳酸水平、肠道大肠埃希菌含量,表明桃仁承气汤可抑制肠内炎症,减轻肠组织病理损伤,增强肠道肌电活动,修复肠道内环境稳态,改善脓毒症大鼠肠道症状,进一步证实了桃仁承气汤对脓毒症的治疗作用,但其药理机制目前尚不清楚。

HMGB1/TLR4/NF-κB信号是体内调控炎症反应的重要通路,抑制其表达,可减轻机体炎症损伤,改善脓毒症大鼠临床症状<sup>[19-20]</sup>,因而,该信号是脓毒症的一个治疗靶点,但桃仁承气汤是否可通过抑制该通路阻止炎症发生,进而改善脓毒症症状目前还不知道,本文对此进行了探讨,结果显示,模型大鼠小肠组织HMGB1/TLR4/NF-κB通路相关蛋白HMGB1,TLR4,MyD88,NF-κB p65表达明显升高,经桃仁承气汤治疗后,肠道症状减轻,肠组织蛋白HMGB1,TLR4,MyD88,NF-κB p65表达降低,以桃仁承气汤及甘草酸联合处理模型大鼠,可进一步抑制HMGB1/TLR4/NF-κB通路表达,并升高小肠黏膜组织绒毛高度、黏膜厚度,sIgA含量,平滑肌慢波频率及振幅、肠道双歧杆菌及乳酸杆菌含量,表明甘草酸可增强桃仁承气汤下调HMGB1/TLR4/NF-κB通路的作用,进而增强其抗炎、增强肠道肌电活动、维持肠道内环境稳态、减轻脓毒症肠道临床症状的作用,桃仁承气汤与甘草酸联合应用具有协同作用,揭示桃仁承气汤可能通过下调HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路调节肠源性脓毒症大鼠肠道肌电活动及微环境稳态,恢复肠道平滑肌收缩功能及肠道正常菌群平衡。

综上所述,桃仁承气汤可抑制HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路,减轻炎症反应,修复小肠黏膜组织损伤,恢复受损肠道免疫及蠕动功能,对肠黏膜屏障功能及肠道微环境稳态具有保护作用,下调HMGB1/TLR4/NF-κB信号表达可能是其治疗脓毒症的药理机制,为临床脓毒症的治疗提供了新的思路,但本文未使用通路激动剂进行对照验证,证据存在不足,更准确清楚的作用机制还需后续深入研究。

#### [参考文献]

[1] CAO Y, CHEN Q, WANG Z, et al. PLK1 protects

- against sepsis-induced intestinal barrier dysfunction [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):1055-1062.
- [ 2 ] TANG S Y, ZHANG S W, ZHANG J, et al. Effect of early fluid resuscitation combined with low dose cyclophosphamide on intestinal barrier function in severe sepsis rats [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(5):1254-1264.
- [ 3 ] LEE Y, LEE W, CHANG H H, et al. Testican-1, as a novel diagnosis of sepsis [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5):4216-4223.
- [ 4 ] 韦细连,徐冬雪,杜凤娇,等. “元气亏虚”和“补益元气”在脓毒症发病及治疗中的意义探讨 [J]. *中国中医急症*, 2019, 28(3):479-482.
- [ 5 ] 孙治霞,索红亮,王丽辉. 桃仁承气汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障及TLR9信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(7):29-35.
- [ 6 ] DONG L Y, CHEN F, XU M, et al. Quercetin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via downregulation of the HMGB1-TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(5):1273-1283.
- [ 7 ] XU J, LU C, LIU Z, et al. Schizandrin B protects LPS-induced sepsis via TLR4/NF- $\kappa$ B/MyD88 signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(4):1155-1163.
- [ 8 ] 李锦灵,黄树武,李舸,等. 大鼠脓毒症模型的凝血功能研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(2):224-229.
- [ 9 ] 赵志军,王守云,温井奎,等. 芪黄灌肠液联合复方甘草酸苷治疗肝性脑病临床观察 [J]. *陕西中医*, 2017, 38(6):720-721.
- [ 10 ] 朱虹,王灿晖,杨进,等. 桃仁承气汤对大鼠急性肾功能衰竭模型血液流变性及肾指数的影响 [J]. *中国中医急症*, 2006, 15(11):1261-1262.
- [ 11 ] ZHANG D W, HE J. Interleukin-6 is a key factor for immunoglobulin-like transcript-4-mediated immune injury in sepsis [J]. *J Intensive Care*, 2018, 6(1):22-27.
- [ 12 ] LI J L, LI G, JING X Z, et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model [J]. *J Int Med Res*, 2018, 46(6):2410-2422.
- [ 13 ] WILMORE J R, GAUDETTE B T, ATRIA D G, et al. Commensal microbes induce serum iga responses that protect against polymicrobial sepsis [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(3):302-311.
- [ 14 ] LING X, LING L P, WEI X D, et al. Protective effects of bifidobacterium on intestinal barrier function in LPS-induced enterocyte barrier injury of CaCo-2 monolayers and in a rat NEC model [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8):161635-161642.
- [ 15 ] LIU Y, JU M, PAN S, et al. Relationship between blood lactate level and the prognosis of patients with diabetic sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2017, 29(8):689-693.
- [ 16 ] 刘杰,费蕾,柳梅. 糖皮质激素对脓毒症休克大鼠肠道功能的保护作用 [J]. *内科急危重症杂志*, 2016, 22(1):72-73.
- [ 17 ] 高礼民. 桃仁承气汤结合西药治疗老年胸腰椎压缩性骨折后腹胀便秘40例临床观察 [J]. *中国民族民间医药*, 2018, 327(10):55-56.
- [ 18 ] 张寿清,李少英. 桃仁承气汤合犀角地黄汤治疗脓毒症临床观察 [J]. *深圳中西医结合杂志*, 2014, 24(1):55-57.
- [ 19 ] PAN L F, YU L, WANG L M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) regulates acute pancreatitis via inhibiting HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2):402-410.
- [ 20 ] LI H, QIU D, GAO Q, et al. Selectively activating melanocortin 4 receptor acts against rat sepsis-induced acute liver injury via HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2016, 32(8):1055-1059.

[责任编辑 孙丛丛]