

# 西藏小型猪大肠埃希菌感染性腹泻模型的建立及葛根芩连汤对其作用分析

凌霄, 项煜强, 陈飞龙, 谭晓梅\*

(南方医科大学 中医药学院, 广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515)

**[摘要]** **目的:**建立大肠埃希菌(*Escherichia coli*)感染哺乳期西藏小型猪腹泻模型,研究葛根芩连汤(GQT)治疗婴幼儿*E. coli*感染性腹泻作用机制。**方法:**按照体重灌胃不同剂量的*E. coli*,灌胃后每3 h进行体重,体温,和腹泻状况的观察并收集粪便进行*E. coli*计数;分别设置阳性药蒙脱石散组(93.5 mg·kg<sup>-1</sup>),GQT高、中、低剂量组(含生药12.1,6.05,1.21 g·kg<sup>-1</sup>),给药3 d,每天2次。每次给药后观察腹泻指数、体重变化,统计生存率,检测粪便中*E. coli*菌落数,血液白细胞数(WBC),酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和白细胞介素-6(IL-6)含量。**结果:***E. coli*剂量为1×10<sup>9</sup> CFU·kg<sup>-1</sup>时,6 h仍为水样泻,粪便*E. coli*计数>1×10<sup>11</sup> CFU·g<sup>-1</sup>,无明显自愈倾向;GQT低剂量组可显著抑制腹泻,中、高剂量组无明显止泻作用;高、中、低剂量组可显著降低粪便*E. coli*和血液WBC的数量,抑制血清TNF-α和IL-6的表达。**结论:**当*E. coli*灌服剂量为1×10<sup>9</sup> CFU·kg<sup>-1</sup>时,6 h仍为水样泻,且粪便*E. coli*计数>1×10<sup>11</sup> CFU·g<sup>-1</sup>,则判定造模成功;GQT可通过抗炎和抑制*E. coli*的增殖减轻*E. coli*感染哺乳期小型猪腹泻。其抗炎作用可能与减少炎症因子TNF-α和IL-6有关。

**[关键词]** 葛根芩连汤; 大肠埃希菌腹泻; 哺乳期小型猪; 止泻; 抗炎

**[中图分类号]** R22;R24;R256.3;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0125-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030125

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171113.1605.030.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-13 16:05

## Mechanism of Gegen Qinlian Tang in an *Escherichia coli*-infected Diarrhea Model of Tibetan Miniature Pigs

LING Xiao, XIANG Yu-qiang, CHEN Fei-long, TAN Xiao-mei\*

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceuticals, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the *Escherichia coli*-infected diarrhea model of suckling Tibetan mini-pigs, in order to study the mechanism of Gegen Qinlian Tang (GQT) on *E. coli*-infected diarrhea in infants. **Method:** The mini-pig diarrhea model was established through oral administration with pathogenic *E. coli*. The animals were divided into control group (Montmorillonite powder, 93.5 mg·kg<sup>-1</sup>), low-dose group (1.21 g·kg<sup>-1</sup>), middle-dose group (6.05 g·kg<sup>-1</sup>) and high-dose group (12.1 g·kg<sup>-1</sup>). Fecal *E. coli* count and white blood cell count were detected after each administration, and the serum tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. The diarrhea index, weight change and survival rate were observed. **Result:** When the dose of *E. coli* was 1×10<sup>9</sup> CFU·kg<sup>-1</sup>, the watery diarrhea was maintained at 6 h, the count of fecal coliform was higher than 1×10<sup>11</sup> CFU·g<sup>-1</sup>, and there was no obvious trend of self-cure. High, medium and low-dose GQT groups showed significant reduction in fecal *E. coli*

**[收稿日期]** 20170720(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81374049)

**[第一作者]** 凌霄,博士,从事中药体内过程的研究,E-mail:tanglima@126.com

**[通信作者]** \*谭晓梅,博士,研究员,从事中药新制剂及中药复方配伍规律研究,Tel:020-61648265,E-mail:txm@fimmu.com

count and blood white blood count, and inhibition of the expressions of serum TNF- $\alpha$  and IL-6. Low-dose group showed significant inhibition of diarrhea, and middle and high-dose groups had no obvious antidiarrheal effect. **Conclusion:** When the dose of *E. coli* was  $1 \times 10^9$  CFU $\cdot$ kg $^{-1}$ , the feces were still watery at 6 h, and the *E. coli* count of fecal was higher than  $1 \times 10^{11}$  CFU $\cdot$ g $^{-1}$ , which proved that the *E. coli*-infected diarrhea mini-pig model was successfully established. GQT could relieve *E. coli*-infected diarrhea among suckling pigs by resisting inflammation and inhibiting the proliferation of *E. coli*. The anti-inflammatory effect may be related to the reduction of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-6.

[ **Key words** ] Gegen Qinlian tang; *Escherichia coli* diarrhea; suckling mini-pig; antidiarrheal; anti-inflammation

近年来,由于抗生素滥用导致耐药性问题日益凸显,中药由于其疗效好,耐药性低,在感染性疾病的治疗中受到越来越多的关注。探索中药在感染性腹泻中的作用及其机制,进一步推广其在临床中的应用成为当下研究热点之一<sup>[1-6]</sup>。葛根芩连汤源于汉代张仲景《伤寒论》,为肠道感染性腹泻常用复方,尤其治疗小儿感染性腹泻疗效突出,但关于其病-证对应的药理研究鲜有报道。诸多学者对于葛根芩连汤(GQT)抗炎、止泻、体外抑菌、抗病毒等作用进行研究,止泻、抗炎作用多采用药物致泻、致炎模型<sup>[7-17]</sup>。王新等<sup>[18]</sup>采用小鼠感染大肠埃希菌(*Escherichia coli*)模型对葛根芩连汤进行研究,实验中仅有死亡率和体温 2 个指标,另外小鼠和人类婴幼儿生理有较大差异。刘茜明等<sup>[19-20]</sup>采用巴马小型猪对葛根芩连汤的研究,模型为抗生素致泻。以上研究存在与感染性腹泻致病因素不同的模型、动物对致病菌敏感性不足等问题。因此,建立婴幼儿肠道感染性腹泻病理模型是开展相关研究的关键。小型猪是大型杂食类哺乳动物,且在胃肠道生理构造上与人类差异较小,使之成为消化系统疾病研究的理想模型<sup>[21]</sup>。此外,小型猪对多种肠道病原体如 *E. coli*,志贺菌,轮状病毒等易感<sup>[22-25]</sup>。因此本实验拟建立 *E. coli* 感染哺乳期小型猪腹泻模型,并开展葛根芩连汤对其作用的研究,明确其作用机制。本研究以期对婴幼儿感染性腹泻的药物研究提供理想模型。

## 1 材料

**1.1 动物** 选取 7~10 d 龄,SPF 级雄性西藏小型猪,体重 1.0~1.5 kg,合格证号 SCXY(粤)2011-0015,南方医科大学实验动物中心提供,在 SPF 级实验室中适应性饲养 3 d,控制环境温度在(25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,相对湿度在(65 $\pm$ 10)%和 12 h/12 h 光/暗周期,每日按时(2 h/次)用婴幼儿配方奶粉人工哺乳,观察记录小型猪体重,体温,采食状况及排便状

况观察。人工哺乳 3 d 后,选取其中健康,无腹泻症状的小型猪作为实验动物。所有的研究严格按照中国实验动物委员会制定指南进行,整个动物实验方案经过南方医科大学动物实验伦理委员会批准(编号 L2016040)。

**1.2 药物与试剂** GQT 处方(葛根 15 g,黄芩 9 g,黄连 9 g,炙甘草 6 g)<sup>[26-27]</sup>,药材经南方医科大学中医药学院中药鉴定教研室刘传明副教授鉴定,分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* 的干燥根所制饮片(广州至信药业股份有限公司,批号 20150201),唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根所制饮片(广东省药材公司中药饮片厂,批号 20150304),毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根所制饮片(广东省药材公司中药饮片厂,批号 20151001),豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 的干燥根茎蜜炙饮片(康美药业股份有限公司,批号 150103001),4 味药经检验均符合 2015 年版《中国药典》一部各项下标准。样品的制备:取葛根 75 g,2 000 mL 水中浸泡 30 min,加热微沸 20 min,加入黄连 45 g,黄芩 45 g,炙甘草 30 g,一起煎煮 10 min,过滤后加入水 1 500 mL 煮沸 30 min,合并 2 次煎液,浓缩为流浸膏,冷冻干燥得冻干粉,冻干粉含生药 10 g $\cdot$ g $^{-1}$ 。*E. coli*(O8:K91:K88ac,中国兽药监察所,批号 CVCC1524);猪肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,猪白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒(北京诚林科技有限公司,批号分别为 E-50006,E-50023);LB 肉汤培养基(Beijing Solarbio Science & Technology Co. Ltd,批号 L8291);伊红美兰琼脂干粉培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司,批号 HB0107);蒙脱石散(先声药业有限公司,批号 07-150814)。

**1.3 仪器** HFsafe-1200 型 II 级生物安全柜(上海力申科学仪器有限公司),SPX-150B-8 型生化培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),HVE-50 型

高压灭菌锅(苏州国高电子有限公司), TS-200B 型恒温摇床(上海天呈实验仪器制造有限公司), Multiskan FC 酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

## 2 方法

**2.1 *E. coli* 致泻模型的建立<sup>[28]</sup>** 制备 *E. coli* 悬液浓度分别为  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>。选取健康小型猪, 按照体重分别以  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  CFU·kg<sup>-1</sup> 灌胃 *E. coli*, 灌胃后每 3 h 进行体重、体温和腹泻状况的观察并收集粪便进行 *E. coli* 计数, 判断造模效果并制定最优造模剂量。

**2.2 分组及给药** 选取 40 头健康 7~10 d 龄雄性西藏小型猪, 适应性饲养 3 d 后, 称重记录, 随机分为 5 组, 模型组, 阳性(蒙脱石散)组, GQT 高、中、低剂量组, 每组 8 头。每组动物按照 2.1 项下优选出的造模方法进行造模。选取造模成功的小型猪进行药效学实验。模型组服用生理盐水, 阳性组选用蒙脱石散, 给药量为临床等效量(93.5 mg·kg<sup>-1</sup>)。GQT 高剂量组(含生药 12.1 g·kg<sup>-1</sup>, GQT 临床等效量的 10 倍量), 中剂量组(含生药 6.05 g·kg<sup>-1</sup>, GQT 临床等效量的 5 倍量), 低剂量组(含生药 1.21 g·kg<sup>-1</sup>, GQT 临床等效量)。小型猪临床等效剂量 =  $X \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \times 70 \text{ kg} \times 0.32/12 \text{ kg} = 1.87 X \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ( $X \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  为人的临床剂量)。

**2.3 检测小型猪体重、腹泻指数和存活率** 造模成功后进行称重, 作为基础体重, 每次给药 3 h 后, 对每组小型猪进行称重, 将所得体重减去基础体重, 得到体重变化值。腹泻指数: 在每笼小型猪笼底垫上滤纸, 观察统计各组小型猪的稀便数和稀便级, 稀便率 = 稀便数/总便数  $\times 100\%$ , 腹泻指数 = 稀便率  $\times$  稀便级。每次给药后更换滤纸, 连续观察每次给药后 3 h 内的排便情况。稀便级的判断标准为 1 级糊状便, 直径  $\leq 2$  cm; 2 级稀糊状便,  $2 \text{ cm} < \text{直径} < 3 \text{ cm}$ ; 3 级水样便, 直径  $\geq 3 \text{ cm}$ 。干便和稀便的区分以滤纸有无污迹为标准。圆形污迹测直径, 椭圆形或不规则形测最长的直径和近似圆的直径, 两者取平均值。

**2.4 粪便 *E. coli* 菌落计数** 称取适量粪便置于 50 mL 无菌离心管中, 加入适量无菌生理盐水, 涡旋 3 min, 制成 1:10 的样品匀浆。将所得样品匀浆按照 10 倍系列稀释, 分别获得稀释倍数为  $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-10}$  的待测粪便悬液。每个稀释度接种 2 个无菌伊红美蓝平皿, 同时取无菌生理盐水 1 mL 加入无菌伊红美蓝平皿作空白对照。接种方法为稀释倒平板法。在细菌培养箱中 37 °C 培养 24 h 后, 选取菌落数在 15~150 CFU 的平板, 分别计数平板上出现的典型大肠菌群菌落进行计数。为简化数据表达, 将所得数据进行 log 转化后进行比较。

**2.5 小型猪血液白细胞计数** 吸取小型猪全血, 采用改良牛鲍氏血细胞计数板进行白细胞计数。在低倍镜下计数四角 4 个大方格的白细胞总数后按下述公式进行计数:  $\text{WBC} = N/4 \times 10 \times 20 \times 10^6 = N/20 \times 10^9$ , 其中  $N$  为 4 个大方格的白细胞总数, 为简化数据表达, 将所得数据进行 log 转化后进行比较。

**2.6 血液 TNF- $\alpha$  和 IL-6 含量测定** 采用 ELISA 法对猪血清中 TNF- $\alpha$  和 IL-6 进行含量测定。按照试剂盒说明书要求在酶标板中加入对照品与待测样品, 各样品均设置 3 孔, 37 °C 温育 30 min, 洗涤后, 加入生物素标记抗体工作液, 重复温育、洗涤后, 加入显色剂, 37 °C 避光 15 min 后加入终止液。采用酶标仪测定各孔吸光度  $A$ , 以对照品  $A$  和浓度绘制标准曲线, 进行 TNF- $\alpha$ , IL-6 的含量测定。

**2.7 统计学方法** 各组测定结果采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 用  $\bar{x} \pm s$  进行统计描述, 组间差异比较单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 *E. coli* 造模结果** 造模 3, 6 h 后, 各剂量组结果见表 1。灌胃剂量为  $1 \times 10^7$  CFU·kg<sup>-1</sup> 时, 小型猪在前 3 h, 有中等程度的腹泻, 体重略有下降, 但 6 h 后, 有明显的自愈倾向, 由糊状便变为软便; 剂量为  $1 \times 10^8$  CFU·kg<sup>-1</sup> 时, 也存在相似的现象; 当剂量为  $1 \times 10^9$  CFU·kg<sup>-1</sup> 时, 在未给药情况下, 腹泻状态持续

表 1 灌服不同剂量 *Escherichia coli* 3, 6 h 小型猪的体重变化及排便情况 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Weight and defecation of minipigs in 3, 6 h after oral administration with different dosage of *Escherichia coli* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量 /CFU·kg <sup>-1</sup>	体重变化/kg		粪便状况		菌落计数/CFU·g <sup>-1</sup>	
		3 h	6 h	3 h	6 h	3 h	6 h
空白	0	0.12 ± 0.11	0.27 ± 0.15	正常	正常	$1.32 \times 10^7 \pm 0.32 \times 10^7$	$1.64 \times 10^7 \pm 0.27 \times 10^7$
<i>E. coli</i>	$1 \times 10^7$	-0.19 ± 0.28	-0.21 ± 0.18	糊样便	软便	$2.45 \times 10^8 \pm 0.12 \times 10^8$	$2.14 \times 10^8 \pm 0.22 \times 10^8$
	$1 \times 10^8$	-0.25 ± 0.15	-0.31 ± 1.02	水样便	糊样便	$5.91 \times 10^{11} \pm 1.02 \times 10^{10}$	$6.01 \times 10^{10} \pm 2.12 \times 10^{10}$
	$1 \times 10^9$	-0.32 ± 0.16	-0.45 ± 1.67	水样便	水样便	$6.21 \times 10^{11} \pm 2.12 \times 10^{11}$	$8.41 \times 10^{11} \pm 1.92 \times 10^{11}$

6 h 以上,无明显自愈倾向,因此,选用  $1 \times 10^9$  CFU· $\text{kg}^{-1}$  作为后续实验的造模剂量。当小型猪灌服 *E. coli* 后 6 h 仍为水样泻,且粪便 *E. coli* 计数为  $1 \times 10^{11}$  CFU· $\text{g}^{-1}$  时,则判定造模成功。

**3.2 GQT 对小型猪排便、体重、存活率的影响** 由于个别给药组腹泻较剧烈,尤其是模型组,实验过程中有小型猪由于腹泻,过度脱水最终死亡。在实验结束后,对各组动物存活状况进行了统计,结果见表

2。由于没有进行给药干预,模型组存活率最低,3 d 给药期结束后,存活率仅为 25%,蒙脱石散组存活率最高,实验结束时无动物死亡。GQT 低剂量组实验过程中死亡 1 头。值得注意的是 GQT 中、高剂量组,随着给药次数的增加,存活率反而下降,尤其是 GQT 高剂量组,在给药 3 d 内死亡 4 头小型猪,死亡率仅低于模型组,高于蒙脱石散组和 GQT 低剂量组。

表 2 GQT 对小型猪存活数记录的影响

**Table 2 Impact of GQT on survival number of minipigs after each administration in each group** 头

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	8	8	7	6	4	2
蒙脱石散	$9.35 \times 10^{-2}$	8	8	8	8	8	8
GQT	1.21	8	8	8	8	7	7
	6.05	8	8	8	7	6	6
	12.1	8	8	8	7	5	4

每次给药 3 h 后,对小型猪进行称重,和造模前体重比较,计算体重变化,并对排便的频率及小型猪存活率状态进行记录。各组小型猪体重变化见表 3。由模型组体重变化可知,随着病情的加深,腹泻小型猪体液丢失现象愈发严重,体重呈现明显的下降趋势,在 3 d 治疗期结束时,模型小型猪的体重较造模之前减少将近 30%。而蒙脱石散组和 GQT 低剂量组在给药第 1 天后,体重也呈下降趋势,但随着

给药次数的增加,小型猪体重变化趋于平稳,在给药 6 次后,蒙脱石散组和 GQT 低剂量组的小型猪体重已经开始恢复至造模前的体重。但值得注意的是,GQT 中、高剂量组的小型猪并没有随着给药次数的增加,减缓体重的减少,相反的是,随着给药次数的增加,GQT 中、高 2 个剂量组的小型猪体重同蒙脱石散组和 GQT 低剂量组相比显著性减少 ( $P < 0.01$ ),变化趋势和模型组一致。

表 3 GQT 对小型猪体重变化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3 Impact of GQT on weight change in minipigs plasma after each administration in each group ( $\bar{x} \pm s$ )** kg

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	$-0.01 \pm 0.09$	$-0.08 \pm 0.09$	$-0.22 \pm 0.10$	$-0.39 \pm 0.05$	$-0.45 \pm 0.11$	$-0.44 \pm 0.10$
蒙脱石散	$9.35 \times 10^{-2}$	$-0.04 \pm 0.10$	$-0.11 \pm 0.10$	$-0.13 \pm 0.06$	$-0.07 \pm 0.07^{1)}$	$-0.09 \pm 0.15^{1)}$	$-0.05 \pm 0.11^{1)}$
GQT	1.21	$-0.08 \pm 0.13$	$-0.09 \pm 0.07$	$-0.21 \pm 0.15$	$-0.18 \pm 0.12^{1)}$	$-0.13 \pm 0.12^{1)}$	$-0.06 \pm 0.12^{1)}$
	6.05	$-0.06 \pm 0.14$	$-0.08 \pm 0.06$	$-0.25 \pm 0.07$	$-0.30 \pm 0.04$	$-0.42 \pm 0.07^{2)}$	$-0.44 \pm 0.07^{2)}$
	12.1	$-0.02 \pm 0.10$	$-0.07 \pm 0.05$	$-0.20 \pm 0.08$	$-0.40 \pm 0.08^{2)}$	$-0.50 \pm 0.08^{2)}$	$-0.46 \pm 0.10^{2)}$

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与蒙脱石散组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 4, 5 同);例数见表 2 (表 4~8 同)。

每次给药后,各组小型猪的排便状况见表 4。由结果可知,模型组在整个实验过程中腹泻无明显好转,蒙脱石散组和 GQT 低剂量组和模型组相比,随着给药次数的增加,腹泻指数显著性下降 ( $P < 0.01$ )。GQT 中剂量组随着给药次数的增加,腹泻指数较模型组有显著性下降 ( $P < 0.01$ ),但是腹泻指数高于蒙脱石散组和 GQT 低剂量组 ( $P < 0.01$ )。GQT 高剂量组在第 2 次给药后,腹泻指数与模型组

相比,显著下降 ( $P < 0.01$ ),但是后续随着给药次数的增加,腹泻指数不降反升,在 3 d 给药结束后,腹泻指数同模型组相比无统计学差异。

**3.3 GQT 对粪便 *E. coli* 菌落计数的影响** 对各组粪便的 *E. coli* 菌落进行计数,为方便统计学分析,将所有的结果进行 log 转换,结果见表 5。GQT 各给药组在给药 3 次后,*E. coli* 计数较模型组显著降低 ( $P < 0.01$ )。给药 6 次后,较蒙脱石散组也显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表 4 GQT 对小型猪腹泻指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Impact of GQT on diarrhea index of minipigs after each administration in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	3.16 ± 0.54	3.51 ± 0.43	3.07 ± 0.23	2.72 ± 0.24	3.19 ± 0.32	2.81 ± 0.21
蒙脱石散	9.35 × 10 <sup>-2</sup>	2.86 ± 0.51	2.01 ± 0.67 <sup>1)</sup>	1.83 ± 0.53 <sup>1)</sup>	1.78 ± 0.33 <sup>1)</sup>	1.70 ± 0.17 <sup>1)</sup>	1.51 ± 0.21 <sup>1)</sup>
GQT	1.21	2.97 ± 0.41	2.73 ± 0.71 <sup>1,2)</sup>	2.01 ± 0.29 <sup>1)</sup>	1.98 ± 0.31 <sup>1)</sup>	1.90 ± 0.51 <sup>1)</sup>	1.62 ± 0.13 <sup>1)</sup>
	6.05	3.01 ± 0.21	2.68 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	2.76 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>	2.87 ± 0.14 <sup>2)</sup>	2.34 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	2.21 ± 0.21 <sup>1,2)</sup>
	12.1	3.12 ± 0.21	2.94 ± 0.12 <sup>1,2)</sup>	3.01 ± 0.23 <sup>2)</sup>	2.87 ± 0.11 <sup>2)</sup>	3.01 ± 0.21 <sup>2)</sup>	2.71 ± 0.18 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.01;与蒙脱石散组比较<sup>2)</sup>P < 0.01(表 6~8 同)。

表 5 GQT 对小型猪粪便中 *E. coli* 菌落计数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Impact of GQT on *E. coli* count in minipigs' faeces after each administration in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

CFU·g<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	12.47 ± 0.63	12.26 ± 0.55	12.39 ± 0.44	12.57 ± 0.42	12.17 ± 0.56	12.21 ± 0.67
蒙脱石散	9.35 × 10 <sup>-2</sup>	12.55 ± 0.65	11.49 ± 0.54 <sup>1)</sup>	10.66 ± 0.72 <sup>2)</sup>	10.23 ± 0.50 <sup>2)</sup>	9.67 ± 0.48 <sup>2)</sup>	9.82 ± 0.40 <sup>2)</sup>
GQT	1.21	12.50 ± 0.54	11.23 ± 0.43 <sup>2)</sup>	10.91 ± 0.33 <sup>2)</sup>	10.28 ± 0.30 <sup>2)</sup>	9.62 ± 0.43 <sup>2)</sup>	9.05 ± 0.17 <sup>2,3)</sup>
	6.05	12.54 ± 0.51	12.00 ± 0.53	11.23 ± 0.43 <sup>2)</sup>	10.50 ± 0.23 <sup>2)</sup>	9.72 ± 0.22 <sup>2)</sup>	9.02 ± 0.33 <sup>2,3)</sup>
	12.1	12.27 ± 0.62	11.72 ± 0.63	11.11 ± 0.22 <sup>2)</sup>	10.28 ± 0.20 <sup>2)</sup>	9.19 ± 0.24 <sup>2)</sup>	8.94 ± 0.47 <sup>2,3)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与蒙脱石散组比较<sup>3)</sup>P < 0.01。

**3.4 GQT 对血液白细胞计数的影响** 对各组小型猪血液白细胞进行计数,将结果进行 log 转换,结果见表 6。与模型组相比,GQT 各给药组在给药

3 次后可显著降低血液白细胞计数(P < 0.01),GQT 各给药组间及与蒙脱石散组比较均无显著性差异。

表 6 GQT 对小型猪血液白细胞计数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Impact of GQT on WBC count in minipigs blood after each administration in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

× 10<sup>9</sup> 个

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	14.87 ± 0.43	14.82 ± 0.65	14.92 ± 0.54	14.93 ± 0.28	14.42 ± 0.53	14.56 ± 0.25
蒙脱石散	9.35 × 10 <sup>-2</sup>	14.80 ± 0.76	14.46 ± 0.34	13.80 ± 0.56 <sup>1)</sup>	13.87 ± 0.66 <sup>1)</sup>	13.15 ± 0.53 <sup>1)</sup>	12.15 ± 0.32 <sup>1)</sup>
GQT	1.21	14.96 ± 0.27	14.76 ± 0.36	13.57 ± 0.42 <sup>1)</sup>	13.40 ± 0.34 <sup>1)</sup>	12.87 ± 0.65 <sup>1)</sup>	12.05 ± 0.63 <sup>1)</sup>
	6.05	14.98 ± 0.45	14.89 ± 0.65	13.40 ± 0.34 <sup>1)</sup>	13.89 ± 0.42 <sup>1)</sup>	13.27 ± 0.61 <sup>1)</sup>	12.21 ± 0.32 <sup>1)</sup>
	12.1	14.90 ± 0.43	14.67 ± 0.35	13.74 ± 0.62 <sup>1)</sup>	13.23 ± 0.45 <sup>1)</sup>	13.11 ± 0.67 <sup>1)</sup>	12.42 ± 0.76 <sup>1)</sup>

**3.5 GQT 对血清 TNF-α 含量的影响** 对各组小型猪血液 TNF-α 进行含量测定,结果见表 7。在第 3 次给药后,各给药组的血液 TNF-α 较模型组显著降低(P < 0.01),在给药 5 次后,GQT 高、中低剂量组

的 TNF-α 继续下降,和蒙脱石散组和模型组比较有统计学差异(P < 0.01)。蒙脱石散组的 TNF-α 水平在给药 5,6 次后变化相对平稳。

**3.6 GQT 对血清 IL-6 含量的影响** 对各组小型猪

表 7 GQT 对小型猪血清中 TNF-α 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Impact of GQT on TNF-α in minipigs plasma after each administration in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	98.02 ± 9.85	96.79 ± 12.48	97.17 ± 10.83	100.96 ± 11.24	109.38 ± 8.62	115.37 ± 18.55
蒙脱石散	9.35 × 10 <sup>-2</sup>	86.85 ± 9.87	78.44 ± 7.03	65.50 ± 4.49 <sup>1)</sup>	67.63 ± 5.12 <sup>1)</sup>	74.88 ± 6.36 <sup>1)</sup>	78.70 ± 8.00 <sup>1)</sup>
GQT	1.21	91.10 ± 15.92	75.95 ± 10.87	60.99 ± 7.70 <sup>1)</sup>	56.79 ± 8.68 <sup>1)</sup>	59.55 ± 5.25 <sup>1,2)</sup>	57.02 ± 9.55 <sup>1,2)</sup>
	6.05	92.35 ± 12.64	79.11 ± 6.57	59.50 ± 8.72 <sup>1)</sup>	50.96 ± 7.20 <sup>1)</sup>	44.38 ± 6.49 <sup>1,2)</sup>	42.20 ± 5.66 <sup>1,2)</sup>
	12.1	100.02 ± 7.88	86.11 ± 18.53	71.49 ± 10.67 <sup>1)</sup>	53.78 ± 10.66 <sup>1)</sup>	47.56 ± 8.55 <sup>1,2)</sup>	46.92 ± 10.39 <sup>1,2)</sup>

血液 IL-6 进行含量测定,结果见表 8。在第 2 次给药后,各给药组的血清 IL-6 含量较模型组显著下降 ( $P < 0.01$ ),在给药 5 次后,GQT 低、中、高剂量组的

IL-6 继续下降,和蒙脱石散组和模型组比较有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。GQT 各剂量给药组之间无统计学差异。

表 8 GQT 对小型猪血清中 IL-6 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	给药 1 次	给药 2 次	给药 3 次	给药 4 次	给药 5 次	给药 6 次
模型	-	12.86 ± 1.74	13.59 ± 0.94	13.52 ± 0.89	13.56 ± 0.57	13.45 ± 1.11	12.93 ± 1.12
蒙脱石散	9.35 × 10 <sup>-2</sup>	11.89 ± 1.48	10.41 ± 0.71 <sup>1)</sup>	9.13 ± 0.80 <sup>1)</sup>	8.13 ± 0.86 <sup>1)</sup>	8.37 ± 0.58 <sup>1)</sup>	7.93 ± 0.49 <sup>1)</sup>
GQT	1.21 g·kg <sup>-1</sup>	11.83 ± 1.80	9.63 ± 0.72 <sup>1)</sup>	8.50 ± 0.85 <sup>1)</sup>	7.73 ± 0.41 <sup>1)</sup>	6.74 ± 0.55 <sup>1,2)</sup>	6.13 ± 0.75 <sup>1,2)</sup>
	6.05	11.68 ± 1.53	9.93 ± 0.90 <sup>1)</sup>	8.84 ± 0.74 <sup>1)</sup>	7.23 ± 0.54 <sup>1)</sup>	6.07 ± 0.40 <sup>1,2)</sup>	5.74 ± 0.52 <sup>1,2)</sup>
	12.1	11.37 ± 2.88	9.42 ± 1.67 <sup>1)</sup>	8.91 ± 1.38 <sup>1)</sup>	6.93 ± 2.38 <sup>1)</sup>	6.43 ± 0.93	5.92 ± 0.63 <sup>1,2)</sup>

#### 4 讨论

文中所建立的小型猪 *E. coli* 腹泻模型,根据其临床表现,与《伤寒论》中记载的 GQT 证基本吻合。GQT 在临床广泛用于湿热泄泻,湿热泄泻与感染性腹泻存在密切的关系<sup>[29]</sup>。小型猪在感染 *E. coli* 后出现腹泻,血液白细胞计数增加,粪便中 *E. coli* 计数异常升高等典型的细菌性腹泻症状,本模型较好地模拟了临床感染性腹泻疾病。因此,本文建立的小型猪 *E. coli* 腹泻模型,病-证对应,是进行 GQT 药理学研究的理想模型。实验中对不同造模剂量进行了筛选,判定造模成功的量化标准,符合该判定标准的小型猪和空白组相比腹泻症状典型,且无自愈倾向,重复性较好,考虑到该模型的可靠性及尽量减少动物非必要牺牲的伦理要求,后续药效学实验中不再单设空白组。结合预实验的结果,以临床等效量为基础设置 GQT 高、中、低剂量组的给药剂量。

上述药效学实验指标总体分为 3 类,血清 TNF- $\alpha$  和血清 IL-6 和血液白细胞计数主要反映的是体内有无感染性疾病及体内的炎症转归情况,在 3 个炎症相关指标中,GQT 的各给药组均可以使炎症因子和白细胞计数显著减低,且随着给药剂量和次数的增加,炎症的转归情况越好,从 TNF- $\alpha$  和 IL-6 结果看,各剂量组的抗炎效果均优于蒙脱石散组。粪便中 *E. coli* 计数主要是反映抗微生物的情况,从结果看出,GQT 高剂量组抗 *E. coli* 作用最强,其次是 GQT 中、低剂量组,3 组的抗 *E. coli* 作用均强于蒙脱石散。腹泻指数反映的是止泻作用的强弱,体重变化和存活率是从整体上判断机体的健康程度。腹泻指数和体重变化的实验结果与抗炎和抗菌试验结果不一致,GQT 高剂量组给药 3 d 后,腹泻指数同模型组相比无显著性差异,结合文献分析通过血清

TNF- $\alpha$  和 IL-6 及血液白细胞计数和粪便 *E. coli* 菌落计数结果可知,GQT 有确切的疗效,改善了机体炎症状况<sup>[30-33]</sup>,抑制了 *E. coli* 的增殖。实验中为了模拟婴幼儿腹泻,选用了尚在哺乳期的西藏小型猪,其肠道免疫功能较成年动物偏弱,加之黄连和黄芩属于苦寒药物,对胃肠道有刺激作用。邱赛红等<sup>[34-35]</sup>对常用苦寒药物进行急性毒性研究,发现高剂量的黄连水煎液对胃肠道有直接刺激腹泻作用。由此推测高、中剂量的 GQT 由于对小型猪胃肠道刺激过大,造成其止泻作用不佳。由于腹泻状态持续时间较长,导致高剂量组的小型猪严重脱水,体内电解质紊乱,最终死亡<sup>[36]</sup>。GQT 高、中剂量组的实验结果提示婴幼儿给药要剂量得当。

综上所述,GQT 可通过抗炎和抑制 *E. coli* 增殖减轻 *E. coli* 感染哺乳期小型猪腹泻。其抗炎作用与减少炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 有关。文中首次建立了哺乳期小型猪 *E. coli* 致泻模型,该病理模型与 GQT 证相对应,GQT 对其作用良好,因此该模型在婴幼儿细菌感染性腹泻药理研究中具有推广价值。

#### [参考文献]

[1] 王君梅. 中药汤剂清金化痰汤加减治疗小儿支原体肺炎临床疗效观察[J]. 海峡药学,2017,29(4): 196-197.

[2] 孙谦,路娜娜,孙雯,等. 探究儿童抗生素相关性腹泻中药学干预的作用与价值[J]. 中外医疗,2017,36(8):1-3.

[3] 崔新洁,夏瑾,邵铁娟,等. 中药抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌生物膜研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(2):132-136.

[4] 王新华. 抗生素联合中药保留灌肠治疗慢性盆腔炎疗效观察[J]. 临床合理用药杂志,2017,10(1): 48-49.

- [5] 张振巍,张娜娜,石磊,等. 中药“抗生素”临床应用思考[J]. 中医学报,2014,29(7):1019-1020.
- [6] 刘惠瑾,黄春霞,牛艳慧. 中西药结合治疗婴幼儿支气管肺炎抗生素相关性腹泻的临床疗效观察[J]. 中成药,2017,39(5):1103-1105.
- [7] 张凌波,郝瑞芳. 葛根芩连汤合平胃散加减治疗小儿秋季腹泻(湿热型)40例临床研究[J]. 亚太传统医药,2016,12(20):126-127.
- [8] 叶晶晶,钟夏君. 葛根芩连汤加减治疗小儿秋季腹泻的疗效观察[J]. 海峡药学,2015,27(8):176-177.
- [9] 阿米娜·克然木. 中西医结合治疗婴儿腹泻疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(18):142.
- [10] 彭佩佩. 加味葛根芩连汤治疗小儿湿热型泄泻的临床观察[D]. 石家庄:河北医科大学,2012.
- [11] 张海英. 葛根芩连汤保留灌肠治疗小儿秋季腹泻的临床观察[C] // 中华中医药学会. 第四次全国民间传统诊疗技术与验方整理研究学术会论文集. 北京, 2011:2.
- [12] 曾菊香. 葛根芩连汤加味治疗婴幼儿腹泻60例[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(17):2156-2157.
- [13] 赵益,赖小东,叶争荣,等. 葛根芩连汤对溃疡性结肠炎模型大鼠抗氧化及抗炎的作用机制[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5):1741-1745.
- [14] 毛莹,张贵君,彭慧,等. 葛根芩连汤药效组分解热抗炎药效学研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2014,16(1):30-32.
- [15] 杨婧,杨丽珍,王亚贤,等. 不同制备工艺葛根芩连汤抗炎抑菌作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(1):224-226.
- [16] 郭震浪,苏振宇,戴韵峰,等. 葛根芩连汤治疗小儿轮状病毒性肠炎疗效的 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(24):199-203.
- [17] 陈丽红,唐于平,王强. 不同提取方法制备的葛根芩连配方颗粒抑菌药效研究[J]. 中成药,2012,34(10):2016-2017.
- [18] 王新,杨婧,马凯,等. 葛根芩连汤防治小鼠感染大肠埃希菌的作用观察[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017,(14):147-149,155.
- [19] 刘茜明,杨光勇,何光志,等. 葛根芩连汤对抗生素相关腹泻肠道乳酸杆菌属的影响研究[J]. 家畜生态学报,2016,37(11):74-78.
- [20] 刘茜明,杨光勇,何光志,等. FQ-PCR 技术分析葛根芩连汤对抗生素相关性腹泻模型肠道双歧杆菌属的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(8):1820-1823.
- [21] Yandza T, Tauc M, Saint-Paul M, et al. The pig as a preclinical model for intestinal ischemia-reperfusion and transplantation studies[J]. J Surg Res, 2012, 178(2): 807-819.
- [22] 王俊丽,张要齐,孙雪峰,等. 中药复方对猪大肠埃希菌的体外抑菌活性研究[J]. 中兽医学杂志,2013(1):6-8.
- [23] 陈甜甜,杨忠福,刘建柱. 猪大肠杆菌病研究进展[J]. 猪业科学,2008(8):20-25.
- [24] 李晋涛,魏静,牟芝蓉,等. 人源轮状病毒的小型猪腹泻模型建立[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(9):577.
- [25] 崔立. 实验用小型猪种群净化技术及其不同模型的建立和应用[D]. 南京:南京农业大学,2005.
- [26] 刘宇政,章军,王跃生,等. 葛根芩连汤剂量相关问题探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(16):216-218.
- [27] 罗佳波,谭晓梅,余林中,等. 葛根芩连汤配伍规律的研究[J]. 中草药,2005,36(4):512-518.
- [28] 张赛奇. 葛芪复方对仔猪大肠杆菌性腹泻作用效果研究[D]. 北京:中国农业科学院,2015.
- [29] 邱爱珠,陈宝田. 葛根芩连汤证为感染性腹泻病治的论证研究[J]. 热带医学杂志,2010,10(6):640-642.
- [30] 姜丽霞. 细菌和病毒感染性腹泻患儿 IL-1、IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  水平观察[J]. 检验医学,2006,21(1):88.
- [31] 兰洁. 降钙素原、白介素-6、C 反应蛋白鉴别感染性腹泻的灵敏度、特异性分析[J]. 现代仪器与医疗,2017,23(3):87-89.
- [32] 杨立华,傅晓凤,聂微萱,等. 感染性腹泻患儿炎前细胞因子检测及临床意义[J]. 中国实用儿科杂志,2008,23(9):697-698.
- [33] 高萍芝,王殿敏,王国利,等. 感染性腹泻患儿检测血清白细胞介素-6 的临床意义[J]. 临床儿科杂志,1998,16(4):237-238.
- [34] 邱赛红,孙必强,李磊,等. 常用苦寒药过量使用对胃黏膜屏障功能影响的实验研究[J]. 中国医药导刊,2007,9(2):140-142.
- [35] 邱赛红,李飞艳,尹健康,等. 9 味苦寒药对小鼠胃肠运动与肝肾功能影响的实验研究[J]. 湖南中医学院学报,2004,24(5):1-3,6.
- [36] 朱朝敏,幸琳琳. 感染性腹泻的发病机制[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(19):1456-1457.

[责任编辑 邹晓翠]