

清热解毒方通过下调肠道水通道蛋白 治疗脓毒症大鼠机制研究

高巧营, 刘大全, 吴尚为*, 李东华, 刘洪斌
(天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] **目的:**探讨清热解毒方治疗脓毒症模型大鼠的作用机制。**方法:**采用盲肠结扎穿孔法制作大鼠脓毒症模型。实验分为假手术组、脓毒症模型组、清热解毒方高、中、低 3 个剂量组(24, 12, 6 g·kg⁻¹, ig), 均 1 次/d, 连续 3 d 给药。记录各组大鼠死亡情况, 并以传统细菌培养法对大鼠标本进行细菌定量检测, 通过 Western blot 法检测大鼠结肠水通道蛋白(AQP)2 和 AQP8, 同时应用血清生化分析仪检测大鼠血清生化指标。**结果:**模型组病死率 56%, 且与假手术组大鼠比较, 该组大鼠腹水、淋巴结与血液细菌阳性率和细菌含量及血清生化指标明显升高; 高剂量组大鼠病死率降低, 血清生化指标明显改善, 且 AQP2 和 AQP8 表达与脓毒症模型组有明显差异性($P < 0.05$)。各治疗组 AQP2 和 AQP8 表达下降, 且对中药剂量有依赖性, 同时淋巴结与血标本细菌含量显著降低。**结论:**清热解毒方可通过下调 AQPs 表达而发挥泻下功能, 减少脓毒症大鼠细菌易位治疗脓毒症。

[关键词] 清热解毒方; 脓毒症; 细菌易位; 水通道蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0133-04

[doi] 10.11653/syfyj2014020133

Qingre Jiedu Prescription Treating Septic through Down-Regulating AQPs Expression in Rats

GAO Qiao-ying, LIU Da-quan, WU Shang-wei*, LI Dong-hua, LIU Hong-bin
(Tianjin Acute Abdominal Diseases Institute, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Qingre Jiedu prescription in treatment septic. **Method:** The septic model was induced by cecal ligation and puncture. The experimental rats were divided into five groups; control group, septic model group, Qingre Jiedu prescription treated group (24, 12, 6 g·kg⁻¹). All animals were treated via gastrogavage with distilled water and Qingre Jiedu prescription once a day for 3 days. The survival state was observed. The bacterial populations in experimental sepsis were determined by bacterial culture. And aquaporins (AQP) 2 and AQP8 were detected by western blot. **Result:** The fatality rate in model group was the highest (56%), meanwhile all bacteria in ascites, lymph nodes and bloods were significantly higher than that in control group. For treated group, the mortality and the serum biochemical parameter in the high dose group were significantly decreased. The AQP2 and AQP8 expression levels in all treated groups were decreased compared with that in model group, with a dose-dependent manner. In the high dose group, the number of pathogens in lymph nodes and blood was significantly lower than that in model group. **Conclusion:** Qingre Jiedu prescription can decrease bacterial translocation by reducing expression of AQPs to increase excreta.

[Key words] Qingre Jiedu prescription; sepsis; bacterial translocation; AQPs

[收稿日期] 20130724(018)

[基金项目] 天津市科技攻关计划重大项目(05YFGDSF02600); 天津市中医药管理局科研项目(11020)

[第一作者] 高巧营, 硕士, 研究实习员, 从事中西医结合中药基础研究, Tel: 15122567502, E-mail: tianye608@sohu.com

[通讯作者] * 吴尚为, 博士, 教授, 从事临床检验及病原学研究, Tel: 022-27435367, E-mail: shangweiwu10021@yahoo.com.cn

脓毒症是由感染或高度可疑感染灶引起的全身炎症反应综合征,病死率高^[1]。近年来抗感染和器官功能支持治疗技术取得了长足发展,但仍未能有效降低脓毒症死亡率。本文所研究的清热解毒方经过长期的临床和科研应用,对脓毒症具有一定疗效,它可降低脓毒症大鼠病死率,并推测该方的通里攻下作用可减少致病菌易位^[2]。近年来研究发现水通道蛋白(aquaporins, AQPs)在水转运过程中发挥着重要作用,与肠道水代谢密切相关^[3-4]。本研究旨在探究清热解毒方是否影响结肠 AQPs 的表达进而产生泻下效果抑制细菌易位,且分析该方不同剂量对 AQPs 的表达是否有影响。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 120 只,雌雄各半体重 240 ~ 260 g,由军事医学科学院环境所动物中心提供动物许可证号 SCXK(军)2009-003。

1.2 试剂与仪器 细菌培养皿(天津金章科技发展有限公司); β -actin、AQP2 和 AQP8 蛋白一抗(美国 Santa cruz 公司);组织蛋白提取试剂盒、蛋白上样缓冲液和蛋白二抗(康为世纪公司);全自动生化分析仪(日本日立公司);垂直电泳、转印槽及凝胶成像系统(美国 BioRad 公司);自动细菌计数仪(英国 Synbiosis 公司)。

1.3 药物 清热解毒方流浸膏按文献^[2]方法制备。取大黄、黄芩、白头翁、败酱草(比例为 2:2:3:3),加 8 倍量水,浸润 30 min,煮沸,保持微沸 2 h。过滤药汁后,第 2 次加水 6 倍量,微沸 1 h 后过滤,合并 2 次药汁,减压浓缩至相当于“2 g·mL⁻¹”浓度。中药材样品由三九公司提供,由四川大学华西药学院鉴定。

2 方法

2.1 分组 将 Wistar 大鼠 120 只随机分为 5 组,假手术组(10 只)、模型组(50 只)、清热解毒方治疗组(分高、中、低剂量组,每组 20 只)。

2.2 模型制作 参照刘洪斌等^[2]盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)法制作脓毒症大鼠模型。术前 12 h 禁食、不限水,以 10% 水合氯醛按 3 mL·kg⁻¹ 体重剂量进行腹腔注射麻醉。无菌条件下开腹,分离盲肠,在距盲肠末端 2 cm 处以 1 号丝线结扎,再用 12 号针头在盲肠末端穿孔 1 处,将盲肠放回腹腔后逐层关腹。假手术组只分离盲肠,不进行结扎、穿孔;治疗组大鼠给清热解毒方流浸膏的蒸馏水稀释药液 ig(高、中、低剂量分别为 24, 12, 6 g·kg⁻¹);假手术组和单纯模型组大鼠给予等体积

蒸馏水 ig。上述 5 个组大鼠均 1 次/d,连续 3 d 给药或蒸馏水。

2.3 标本取材与处理 造模 72 h 各组动物在无菌条件下麻醉、开腹,采集腹水、肠系膜淋巴结、血标本立即进行细菌培养;经腹主动脉取血,EDTA 抗凝,离心分离血清, -20 °C 冻存;同时留取结肠组织, -80 °C 冻存备用。

2.4 细菌定量检测 以 20 μ L 腹水作为原液,用无菌生理盐水进行 10 倍倍比稀释,分别取 20 μ L 各浓度细菌稀释液用 L 棒涂布接种于 BAP 氏培养基,麦康凯琼脂培养基(MAC),CAN 培养基。血液标本 20 μ L 则无需稀释直接 L 棒涂布接种于 BAP,MAC, CAN 培养。无菌条件下称重肠系膜淋巴结 200 mg,加生理盐水 2 mL 匀浆,取匀浆液 200 μ L 涂布于培养皿上。将上述培养皿置于 37 °C 培养箱内培养 24 ~ 48 h。结束后选择适当稀释度培养皿上生长的菌落进行计数。

2.5 生化指标检测 采用全自动生化分析仪,检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),C 反应蛋白(CRP),尿素(Urea),肌酐(Cr)。

2.6 水通道蛋白检测 使用蛋白提取试剂盒从结肠标本中提取总蛋白,蛋白标本与蛋白上样缓冲液按 4:1 比例混合后经热变性处理,样品经 10% SDS-PAGE 电泳后,采用常规 Western blot 方法检测各组动物结肠组织中 AQP2 和 AQP8 的表达水平。一抗浓度为 1:500,二抗浓度为 1:5 000。实验过程中以 β -actin 作为内参照,以对照组结肠组织中的蛋白水平为基准,计算其他组别中水通道蛋白的相对表达量。Western blot 检测时每组至少取 5 例标本进行分析,并且每例标本重复检测 3 次,实验结果使用 Quantity One 软件分析条带灰度,并进行统计学分析。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析;计数资料两组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 病死率 由表 1 可知,造模后 72 h 模型组大鼠病死率为 56%;清热解毒 3 个剂量组 72 h 大鼠病死率不同,高、中剂量组与模型组病死率比较有统计学差异($P < 0.05$)。

3.2 细菌定量检测 假手术组大鼠全部存活,腹腔、淋巴结及血液无细菌生长。模型组和小剂量组大鼠腹腔可见淡黄色或淡粉色混浊半透明状的腹水;中、高剂量组大鼠腹水量较模型组少,腹水性状也较为清亮。

模型组和各剂量组大鼠不同部位细菌检出阳性率和菌量不同,将细菌总数计数为 N ,结果见表 2。各组腹水细菌阳性率较高,但高剂量治疗组细菌计数低于模型组。高剂量组淋巴结和血液细菌检出阳性率和细菌定量检测均最低,与模型组及中、低剂量组有差异性 ($P < 0.05$)。淋巴结和血液细菌检测在一定程度上代表表示细菌易位情况,从表 2 的数据可以看出细菌易位情况与中药剂量有依赖性。

3.3 血清生化指标 如表 3 所示,脓毒症模型组 CRP, ALT, AST, Urea, Cr 水平较假手术组有明显增高 ($P < 0.05$);高、中、低剂量组以上血清各指标水

平较模型组有所降低 ($P < 0.05$)。

表 1 不同剂量清热解方对脓毒症大鼠 72 h 病死率的影响

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	例数 /只	死亡数 /只	病死率 /%
假手术	-	10	0	0
模型	-	50	28	56
清热解方	24	20	2	10 ¹⁾
	12	20	5	25 ¹⁾
	6	20	8	40

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 不同剂量清热解方对脓毒症大鼠不同部位感染菌含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

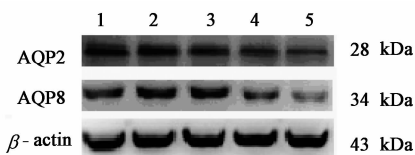
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	腹水		淋巴结		血液	
		菌检阳性率/%	菌数/Log N·mL ⁻¹	菌检阳性率/%	菌数/Log N·g ⁻¹	菌检阳性率/%	菌数/Log N·mL ⁻¹
假手术	-	0	0	0	0	0	0
模型	-	100	8.73 ± 0.46 ¹⁾	86	3.72 ± 0.02 ¹⁾	90	2.84 ± 0.06 ¹⁾
清热解方	24	80	3.08 ± 0.60 ²⁾	15	2.56 ± 0.12 ²⁾	5	1.89 ± 0.11 ²⁾
	12	100	5.63 ± 0.49 ²⁾	40	3.28 ± 0.03 ²⁾	40	2.56 ± 0.08 ²⁾
	6	100	7.82 ± 0.41 ²⁾	80	3.68 ± 0.08	80	2.65 ± 0.05 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~4 同)。

表 3 不同剂量清热解方对脓毒症大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	CRP/mg·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	Urea/mmol·L ⁻¹	Cr/ μ mol·L ⁻¹
假手术	-	10	3.8 ± 0.8	29.8 ± 3.8	73.8 ± 13.4	6.8 ± 0.8	30.8 ± 3.2
模型	-	22	120.2 ± 5.8 ¹⁾	178.4 ± 13.6 ¹⁾	391.4 ± 23.6 ¹⁾	23.2 ± 5.6 ¹⁾	50.2 ± 10.8 ¹⁾
清热解方	24	18	20.5 ± 3.2 ²⁾	50.4 ± 3.2 ²⁾	150.3 ± 13.2 ²⁾	5.5 ± 1.2 ²⁾	28.4 ± 2.8 ²⁾
	12	15	34.8 ± 7.9 ²⁾	67.8 ± 8.7 ²⁾	157.6 ± 28.7 ²⁾	6.8 ± 1.0	33.6 ± 2.5 ²⁾
	6	13	36.9 ± 3.6 ²⁾	76.5 ± 10.2 ²⁾	173.3 ± 20.2 ²⁾	6.9 ± 2.5	36.7 ± 3.6 ²⁾

3.4 水通道蛋白 AQP2 和 AQP8 检测 Western blot 实验结果显示:假手术组、模型组、低剂量组大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白的表达水平相近。高、中剂量治疗组大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白的表达水平较模型组均不同程度降低 ($P < 0.05$),见图 1 和表 4。



1. 对照组;2. 模型组;3. 清热解方 6 g·kg⁻¹;
4. 清热解方 12 g·kg⁻¹;5. 清热解方 24 g·kg⁻¹

图 1 各实验组大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白电泳图

4 讨论

脓毒症是创伤、烧伤、感染等临床危重病患者的

表 4 各实验组大鼠结肠组织中 AQP2 和 AQP8 蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AQP2 / β -actin	AQP8 / β -actin
假手术	-	1	1
模型	-	0.92 ± 0.17	0.82 ± 0.20
清热解方	24	0.37 ± 0.12 ²⁾	0.29 ± 0.09 ²⁾
	12	0.75 ± 0.14	0.58 ± 0.05 ²⁾
	6	0.87 ± 0.23	0.80 ± 0.12

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

严重并发症。肠源性脓毒症时肠黏膜屏障功能受损肠道中细菌扩散进入腹腔大量繁殖,或直接侵入易位到无菌的淋巴结、血液及远端器官,引起严重的腹膜炎、SIRS 或 MODS^[5]。

目前治疗脓毒症无特效药,中医药已成为治疗

脓毒症的重要手段。前期研究发现清热解毒方剂对脓毒症有一定疗效。本研究脓毒症大鼠在给予清热解毒方不同剂量治疗后出现了不同程度的腹泻症状,高剂量组大鼠病死率降低和细菌易位现象明显减少,血清生化指标得到了明显改善。我们推测该方剂的通里攻下作用促进肠内细菌及内毒素的排出,使细菌易位入血减少。近年来关于消化道水代谢的相关蛋白 AQP 的研究日益增多^[6],清热解毒方可减少肠道细菌易位,是否与该方调控肠道 AQP 表达有关呢?

清热解毒方治疗脓毒症时,该组方中作为传统泻下药物大黄的通里攻下作用尤为突出。既往研究认为大黄是通过肠细胞膜上 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶,阻碍 Na^+ 转运吸收,使肠内渗透压增高,保留大量水分,促进肠蠕动而致泻^[7]。近来证实肠道 AQP 与肠道水分吸收密切相关,并且结肠水分吸收是体内肠道水液吸收的终末环节,尤其结肠对水分吸收与粪便含水量及便质关系密切,由此推断,清热解毒方可能是通过对结肠水通道蛋白的抑制作用而产生泻下效应而治疗脓毒症。

AQP 又名水孔蛋白,是位于细胞膜上可控制水进出细胞的蛋白质,它主要分布于与液体分泌和吸收有关的上皮细胞和内皮细胞。它通过对体内水分的吸收、排泄、分泌来调节水跨膜转运和细胞内外环境平衡。跨膜水转运是最基本的生理功能,因此水转运的专性蛋白 AQP 的表达必然与机体的生理病理状态密切相关。现今已知哺乳类动物体内有 13 种 AQP (AQP0-12),其中与结肠水分吸收关系最密切的 AQP,包括 AQP1, AQP2^[8], AQP3^[9], AQP4^[10] 和 AQP8 等。

本研究选取了只对水有渗透性可在结肠组织中表达的 AQP2 和 AQP8 作为观察指标。我们发现中、低剂量组大鼠没有出现明显泻下现象,结肠 AQP2, AQP8 蛋白表达与模型组无显著差异,此时大鼠淋巴结和血液细菌易位情况及血清生化指标较模型组亦无明显改善;高剂量组大鼠出现稀便和水样便,其结肠 AQP2, AQP8 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$),血清生化指标也有所改善,细菌易位较模型组明显减少。由此可见:清热解毒方能下调大鼠结肠 AQP2 和 AQP8 蛋白表达,且表达与中药剂量负相关。

综上,细菌可通过损伤的肠屏障易位到机体无菌环境引起脓毒症症状,清热解毒方治疗脓毒症的细菌移位机制为:下调 AQP 表达使下消化道水分吸收减少产生通里攻下效能抑制细菌易位,从感染源头治疗脓毒症。

[参考文献]

- [1] Peters R P, Savelkoul P H, Vandenbroucke-Grauls C M. Future diagnosis of sepsis [J]. *Lancet*, 2010, 375 (9728):1779.
- [2] 刘洪斌, 吴咸中, 李东华, 等. 清热解毒方对脓毒症大鼠的治疗作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2008, 14(6):580.
- [3] Wang W, Li Q, Yang T, et al. Expression of AQP5 and AQP8 in human colorectal carcinoma and their clinical significance[J]. *World J Surg Oncol*, 2012, 10:242.
- [4] Ikarashi N, Ushiki T, Mochizuki T, et al. Effects of magnesium sulphate administration on aquaporin 3 in rat gastrointestinal tract [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34 (2):238.
- [5] Ohland C L, Macnaughton W K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298(6):807.
- [6] Liu S, Zhang S, Jiang H, et al. Co-expression of AQP3 and AQP5 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(3):636.
- [7] 刘亮亮, 隋峰, 闫美娟, 等. 大黄炮制品各组泻下作用的比较研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (17):161.
- [8] Guttman J A, Samji F N, Li Y, et al. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens [J]. *Cell Microbiol*, 2007, 9 (1):131.
- [9] Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, et al. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(2):203.
- [10] Yamamoto T, Kuramoto H, Kadowaki M. Down regulation in aquaporin 4 and aquaporin 8 expression of the colon associated with the induction of allergic diarrhea in a mouse model of food allergy [J]. *Life Sci*, 2007, 81(2):115.

[责任编辑 聂淑琴]