

清热解毒方治疗大鼠实验性脓毒症的药效学观察

刘大全,高巧营,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药理室,天津 300100)

[摘要] **目的:**观察清热解毒方(GJD)对脓毒症模型大鼠的治疗作用并探讨其细菌学方面的机制。**方法:**采用盲肠结扎穿孔法制作大鼠脓毒症模型,实验分为假手术对照组、脓毒症模型组和 GJD 治疗组(生药 24 g·kg⁻¹),给予清热解毒方治疗后观察大鼠生存情况,同时使用细菌培养和实时定量 PCR 的方法对腹水和血标本进行细菌学分析。**结果:**大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等条件致病菌在脓毒症模型组动物腹水和血液中大量繁殖,在治疗组中上述细菌含量明显减少($P < 0.01$)。**结论:**条件致病菌是脓毒症模型大鼠的主要致病菌,GJD 可以通过抑制致病菌的繁殖而对脓毒症起到治疗作用。

[关键词] 脓毒症; 清热解毒方; 病原体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0246-04

[doi] 10.11653/syfy2013160246

Pharmacodynamic Observation Qingre Jiedu Decoction Improve Survival on Rats Experimental Sepsis

LIU Da-quan, GAO Qiao-ying, WU Shang-wei, LI Dong-hua, LIU Hong-bin*

(Department of Pharmacology, Institute of Acute Abdomen by Integrated Traditional and Western Medicine, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the therapeutic effect of Qingre Jiedu decoction (QJD) and find the bacteriological mechanism on septic model in rats. **Method:** The septic model was induced by cecal ligation and puncture. The experimental rats were divided into three groups: control group, septic model group and QJD (24 g·kg⁻¹) treated group. The survival and the bacterial populations of ascites and blood in experimental sepsis treated with QJD were determined by bacterial culture and real time PCR. **Result:** The populations of conditioned pathogen such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in QJD treated group were decreased significantly compared with that of model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Conditioned pathogen may be primary pathogen of septic rats in our study. QJD are contribute to improve survival in septic model by suppressing proliferation of conditioned pathogen.

[Key words] sepsis; Qingre Jiedu decoction; pathogen

脓毒症(sepsis)是创伤、烧伤、休克、感染及大型手术后等常见严重并发症之一,是感染引起的 1

种严重的全身炎症反应综合征(SIRS)。病情进一步发展可导致严重脓毒症、多器官功能障碍综合征(MODS),多脏器功能衰竭(MOF)以及脓毒症休克(Septic shock),是临床危重病死亡的主要原因之一^[1-5]。以美国为例,1979年脓毒症的发病率为 8 217/10 万,2000 年已升至 24 014/10 万,病死率为 28.6%^[6];在 2003 年,对德国 310 家 ICU 的研究表明,脓毒症和严重脓毒症的发病率分别为 12% 和 13%^[7]。国内在 2002 - 2005 年的 1 项对 11 个省市 37 家医院的 1 087 例重症患者的前瞻性、多中心研

[收稿日期] 20121011(014)

[基金项目] 天津市中医药管理局基金课题(11020)

[第一作者] 刘大全,硕士,助理研究员,从事病原生物学与分子生物学研究,Tel:13821484421,E-mail:superldq@126.com

[通讯作者] *刘洪斌,博士,副研究员,从事药理学研究,Tel:022-27435367,E-mail:jtss@sina.com

究显示,脓毒症发病率为 77.6%,脓毒性休克发生率为 38.9%,两者的病死率分别为 63.3% 和 71.4%^[1]。目前针对脓毒症的治疗药物包括抗生素、糖皮质激素、免疫抑制剂、重组人活化蛋白 C、血液制品等。但这些药物在有效降低脓毒症死亡率和预后方面尚未完全达到令人满意的疗效。本研究对实验动物进行盲肠结扎穿孔术建立脓毒症大鼠模型,同时给予清热解毒方进行治疗,并对其血液和腹水中的菌群结构进行分析和研究,试图从微生物学的角度进一步阐明脓毒症的发病机制以及清热解毒方对脓毒症的治疗作用。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 80 只,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 用药 清热解毒方流浸膏(由大黄、黄芩、白头翁、败酱草组成,比例为 2:2:3:3)。流浸膏的制备方法:取上述处方饮片,加 8 倍量水,浸泡 0.5 h,加热至沸,保持微沸 2 h。过滤后,第 2 次加水 6 倍量,微沸 1 h,过滤,合并 2 次药液,减压浓缩至含生药 2 g·mL⁻¹。中药材样品由三九公司提供,经四川大学华西药学院黄静教授鉴定分别为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi、白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel 和黄花败酱 *Patrinia scabiosaefolia*。

1.3 试剂与仪器 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(美国 Qiagen 公司,142315812),实时定量 PCR 试剂盒(北京天根生化科技有限公司,L0730),细菌培养耗材(天津金章科技发展有限公司,75742210),厌氧菌培养袋(法国 bioMérieux 公司,1001017300),Microstation 快速微生物鉴定系统(美国 Biolog 公司),IQ5 型实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组 前期研究表明^[8]盲肠结扎穿孔术 72 h 后脓毒症模型大鼠的病死率在 50% ~ 70%;另外,当清热解毒方的给药剂量为生药 24 g·kg⁻¹ 体重时能明显减轻脓毒症大鼠的主要脏器损害,降低死亡率。故本研究将 Wistar 大鼠 76 只随机分为假手术组(8 只)、模型组(50 只)和清热解毒方治疗组(18 只)。

2.2 模型制作 本研究参照 Wichterman 等^[9]的文献采用盲肠结扎穿孔(CLP)法制作脓毒症大鼠模型,手术前 12 h 禁食、不限水,以 10% 水合氯醛按 3 mL·kg⁻¹ ip 麻醉。无菌条件下开腹,分离盲肠,在

距其末端 2 cm 处以 2-0 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 ig 给予清热解毒方流浸膏的蒸馏水稀释药液(生药 24 g·kg⁻¹/次,分别于造模后 6,24,48 h 各给药 1 次);假手术组和单纯模型组大鼠 ig 给予等体积蒸馏水。

2.3 标本取材与处理 造模 72 h 后各组动物在无菌条件下麻醉、开腹,取腹水和血液进行细菌培养(如动物腹腔内无腹水,则注入 2 mL 无菌生理盐水进行腹腔灌洗,然后取灌洗液进行细菌培养),同时另取 1 份腹水标本使用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。

2.4 细菌培养 以腹水(或灌洗液)作为原液,用无菌生理盐水进行 10 倍的倍比稀释,取 20 μL 不同浓度的细菌稀释液分别接种于需氧培养皿和厌氧培养皿上(厌氧培养皿放置于厌氧培养袋中);血液标本则无需稀释直接涂于培养皿上。需氧和厌氧培养皿分别在 37 °C 培养箱内培养 24,48 h。培养结束后选择适当的稀释度培养皿上生长的菌落进行革兰染色、镜检、耐氧试验和上机检测,以对细菌的菌种做出鉴定。另外,腹水中的细菌总数可由培养皿上生长的菌落数计算而得。

2.5 实时定量 PCR 使用引物设计软件 Primer 5,针对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的 16S rRNA 序列设计特异性引物(表 1)。反应体系为 20 μL 其中 DNA 模板 0.5 μL,上、下游引物(5 pmol·μL⁻¹)各 1 μL,2.5 × Real Master Mix 和 20 × SYBR Solution 的混合液 9 μL,水 8.5 μL。反应程序为:94 °C 变性 4 min 后,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s 共 45 个循环,最后以 68 °C 10 min 延伸后结束。

表 1 3 种细菌 16S rRNA 的引物序列信息

菌种	引物序列	片段长度 /bp
大肠埃希菌	5'-CATGCCCGCTGTATGAAGAA-3'	95
	5'-CGGGTAACGTCAATGAGCAAA-3'	
金黄色葡萄球菌	5'-CCTCAGCTCGTCTCGTGTGAGATGTTG-3'	204
	5'-CGCGTTTCGCTACCCCTTTGTATTGT-3'	
粪肠球菌	5'-CAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG-3'	412
	5'-AGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG-3'	

2.6 PCR 标准曲线的制作 取准确定量的细菌菌株作为对照品(为天津市南开医院细菌室保存的质控菌株)做系列稀释后,使其细菌密度为 10⁴ ~

10^8 CFU·mL⁻¹, 并使用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。以该 DNA 为模板进行荧光定量 PCR。标准曲线以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标,以 PCR 反应过程中出现荧光信号的初始循环数 (Ct) 为纵坐标绘制而成。待测样品的 PCR 结果和标准曲线进行比较,即可获得各待测样品中该种细菌的数量。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两组独立样本的 *t* 检验;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 一般状况 假手术组大鼠活动及进食等表现均未见异常,假手术 72 h 后大鼠全部存活;模型组大鼠造模后均有不同程度的嗜睡、竖毛、行动迟缓等不适表现,造模后 72 h 模型组大鼠的病死率为 56% (28/50);治疗组大鼠竖毛等不适表现明显比模型组轻微,造模后 72 h 治疗组大鼠的病死率为 11.1% (2/18),两组病死率比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。

3.2 腹水细菌培养 假手术组大鼠 8 只全部存活,大鼠腹腔内未见腹腔渗出液,使用无菌生理盐水灌洗腹腔后收集腹腔灌洗液进行检测,细菌培养结果显示灌洗液中无细菌生长。模型组大鼠 50 只,造模后 72 h 仍存活的有 22 只,大鼠腹腔内均有较多的腹水存在,其性状为淡黄色或淡粉色混浊半透明液体。治疗组大鼠 18 只,造模后 72 h 仍存活的有 16 只,大鼠腹水量较模型组少,腹水性状也较为清亮,

治疗组大鼠腹水标本中大肠埃希菌和粪肠球菌的检出率明显低于模型组 ($P < 0.05$),2 组之间其他菌种的检出率无统计学差异。见表 2。

表 2 脓毒症大鼠腹水中细菌检出率比较 %

分组	n	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	粪肠球菌	肠球菌属	链球菌属	其他	厌氧菌
模型	22	100	77.8	95.5	72.7	50.0	27.3	31.8
QJD	16	50.0 ²⁾	75.0	62.5 ¹⁾	75.0	50.0	25.0	25.0

注:“肠球菌属”包括:鹌鸡肠球菌、耐久肠球菌和病臭肠球菌;“链球菌属”包括:无乳链球菌、草绿色链球菌和野生链球菌;“其他”包括:微球菌、抗辐射不动杆菌、摩根氏菌、水獭漫游球菌、肺炎克雷伯菌、热杀索丝菌和沙氏漫游球菌;“厌氧菌”包括:罗伊氏乳杆菌、食果糖脱硫弧菌、韦荣氏球菌、乳硝酸盐菌、双发酵乳杆菌、假长双歧杆菌、需血清霍氏菌和脆弱拟杆菌属。与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

3.3 腹水中优势细菌的定量检测 根据腹水细菌培养的结果:腹水中需氧菌占据绝对优势,而在需氧菌中占前 3 位的优势菌为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌。所以本研究中以菌落计数法检测了腹水中的需氧菌总数,同时使用实时定量 PCR 法检测了各样品中上述 3 种优势细菌的具体数量。与模型组相比,治疗组大鼠腹水中细菌总数以及大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的数量均明显减少 ($P < 0.01$),见表 3。

3.4 血液细菌培养 所有标本均未培养出厌氧菌,血培养中需氧优势菌为大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌。与模型组相比,治疗组大鼠血培养的阳性率明显降低 ($P < 0.01$),见表 4。

表 3 脓毒症大鼠腹水中细菌定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

log₁₀ N·mL⁻¹

分组	需氧菌总数	大肠埃希菌	金黄色葡萄球菌	粪肠球菌
模型	9.81 ± 0.67 (22)	8.80 ± 0.83 (22)	5.39 ± 1.21 (17)	7.24 ± 1.32 (21)
QJD	3.25 ± 0.70 (16) ²⁾	2.76 ± 1.27 (8) ²⁾	3.87 ± 0.69 (12) ²⁾	4.91 ± 1.05 (10) ²⁾

注:() 内为标本例数

表 4 脓毒症大鼠血液中细菌检出情况比较

分组	n	血培养阳性率/%	血液中培养出的细菌种类
模型	22	100	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、极小短小杆菌、CDC 菌群 II-EA
QJD	16	12.5 ²⁾	大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌

4 讨论

大鼠的盲肠结扎、穿孔模型是被广泛接受的脓毒症动物模型之一,手术过程中肠道中的大量细菌随肠内容物一起扩散进入腹腔,并可以在腹腔中大量繁殖进而引起严重的腹膜炎和脓毒症表现^[10-11]。本研究中在脓毒症模型组大鼠的腹水标本中占据统

治地位的 3 种细菌分别是大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌。其中大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌还存在于脓毒症大鼠血液中。所以说,在本研究中可以认为:大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌很有可能就是脓毒症模型大鼠的致病菌和至死菌。其他如肠球菌属、链球菌属和厌氧菌等菌群是否是脓毒症

的致病菌还有待进一步的研究来确定。大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均属于条件致病菌,在正常的肠道中也是存在的,但数量有限并且与其他菌群之间保持动态平衡,当机体发生肠梗阻、肠穿孔、腹膜炎和脓毒症时这种平衡被打破,条件致病菌则会在肠道、腹腔甚至在血液中大量繁殖,进而引起 MODS 甚至死亡等严重后果。

在临床上常用于治疗脓毒症的中药复方有:清热解方类,活血化瘀类和扶正固本类。这是与中医学将脓毒症归于热毒症,瘀血症和急性虚症的认识相对应^[12-13]。本研究使用的清热解方由大黄、黄芩、白头翁、败酱草组成,源自金匱泻心汤,主要用来治疗化脓性阑尾炎、阑尾脓肿以及其他腹腔感染甚或出现 MODS 者,临床见证为热毒炽盛、高热不退、脘腹胀满、舌红、便秘等。在本研究的治疗过程中观察发现:脓毒症大鼠在给予清热解方治疗后出现腹泻症状,但竖毛、嗜睡、行动迟缓等症状明显缓解,因此推测清热解方中大黄发挥了一定的泻下作用,促进了肠内细菌等有害物质的排出,使肠道内致病菌的数量明显减少,泄露到腹腔中的致病菌也随之减少,内毒素等有害物质的吸收入血也明显减少,从而减轻了一系列后续级联炎性反应。细菌检测结果显示清热解方明显降低了腹水中致病菌的数量,并导致了脓毒症大鼠的血培养阳性率以及病死率明显降低,进而对脓毒症起到了治疗作用。

综上所述,本研究在建立脓毒症大鼠模型的基础上,进一步对其腹水和血液中的细菌结构进行系统地分析。结果表明以大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌为首的条件致病菌是导致脓毒症大鼠患病甚至引起死亡的主要致病菌群。本研究从微生物的角度进一步诠释了脓毒症的病理过程,同时发现清热解方可以抑制上述致病菌在腹水和血液中的繁殖,从而对脓毒症起到治疗作用。

[参考文献]

- [1] 郭艳青,郑爱民,段美丽. 脓毒症的流行病学研究进展[J]. 中国现代医药杂志,2008,10(8):133.
- [2] 赵鹤龄,申丽旻,程彤,等.《拯救脓毒症运动:2008

严重脓毒症和脓毒症休克管理指南》解读(一)2008严重脓毒症和脓毒症休克管理指南概况[J]. 临床荟萃,2008,23(7):523.

- [3] Dellinger R P, Levy M M, Carlet J M, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock:2008 [J]. Crit Care Med, 2008, 36(1):296.
- [4] Wenzel R P, Edmond M B. Septic shock-evaluating another failed treatment [J]. N Engl J Med, 2012,366(22):2122.
- [5] Zambon M, Ceola M, Almeida-de-Castro R, et al. Implementation of the Surviving Sepsis Campaign guidelines for severe sepsis and septic shock: We could go faster [J]. J Crit Care, 2008, 23(4):455.
- [6] Martin G S, Mannino D M, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000 [J]. N Engl J Med, 2003, 348(16):1546.
- [7] Brunkhorst F M, Engel C, Reinhart K, et al. Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany: results from the German Prevalence study [J]. Crit Care, 2005, 9(1):196.
- [8] 刘洪斌,吴咸中,李东华,等. 清热解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.
- [9] Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and proposal [J]. J Surg Res, 1980,29(2):189.
- [10] Buras J A, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005,4(2):854.
- [11] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009,4(1):31.
- [12] 隋峰,闫美娟,琳娜,等. 大黄不同炮制品解热作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(15):167.
- [13] 廖跃华,吴丽珍,程赣,等. 佛甲草抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):142.

[责任编辑 李玉洁]