

# 凉血解毒方干预慢性重型肝炎疗效及内毒素受体通路研究

樊冬梅<sup>1</sup>, 陶双友<sup>2\*</sup>, 陈斌<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学第一附属医院消化内科, 广州 510405;  
2. 广州中医药大学脾胃病研究所, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**观察凉血解毒方干预慢性重型肝炎的临床疗效及对内毒素受体通路的干预作用。**方法:**选取慢性重型肝炎患者 58 例, 随机分为对照组(基础治疗组)30 例和观察组(基础治疗 + 凉血解毒方)28 例, 疗程 2 周, 共 2 个疗程。观察治疗前后症状积分、血清学变化、治疗后总有效率, 同时观察两组患者的血浆内毒素水平、可溶性 CD14 sCD14 水平、测定 Toll 样受体 4 基因(TLR4 mRNA)水平。**结果:**观察组总有效率(78.6%)优于对照组(66.7%), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 两组均可改善临床症状, 改善肝功能, 升高凝血酶原活动度, 观察组与对照组比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 两组慢性重型肝炎治疗前内毒素水平、sCD14 水平、TLR4 mRNA 水平比较无显著性差异, 有可比性, 治疗后观察组血浆内毒素水平、sCD14 水平、TLR4 mRNA 水平较治疗前降低, 与对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**凉血解毒方治疗慢性重型肝炎可提高临床疗效, 其机制可能与干预慢性重型肝炎患者内毒素受体通路有关。

**[关键词]** 慢性重型肝炎; 内毒素受体; 中医药疗法

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0295-04

## Therapeutic Effect of Cooling Blood to Remove Toxin Recipe in Treating Severe Chronic Hepatitis and Intervening Effect of LPS Recognition Receptor

FAN Dong-mei<sup>1</sup>, TAO Shuang-you<sup>2\*</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>

(1. First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. Institute for Spleen and Stomach Research, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the therapeutic effect of Chinese tradition medicine recipe with the function of cooling blood to remove toxin in treating severe chronic hepatitis and intervening effect of lipopolysaccharide (LPS) recognition receptors. **Method:** Fifty-eight cases with chronic severe hepatitis patients were randomly divided into control group with 30 cases (basic treatment) and observation group with 28 cases (basic treatment plus Chinese herb with the function of cooling blood to remove toxin). The clinical symptom score, serological change, the rate of clinical efficiency after treatment were observed after four weeks, and the levels of endotoxin, sCD14, TLR4 mRNA were detected. **Result:** The rate of clinical efficiency of observation group (78.6%) was superior to the control group (66.7%), there was significant difference between two groups ( $P < 0.05$ ). The clinical symptoms of two groups were improved to various degrees, liver function was ameliorated, cholinesterase (CHE) increased in observation group and there was a significant difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ). There were no difference in the levels of endotoxin, sCD14, TLR4 mRNA before treatment between two groups. The levels of endotoxin, sCD14, TLR4 mRNA decreased in observation group after treatment and there was a difference compared with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Chinese tradition

**[收稿日期]** 20120716(006)

**[基金项目]** 广东省中医药管理局项目(K2090061)

**[第一作者]** 樊冬梅, 博士, 副主任医师, 从事中医药治疗消化系统疾病研究, Tel: 15813349326, E-mail: fandongmei1976@163.com

**[通讯作者]** \* 陶双友, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治消化系统疾病研究, Tel: 15360879650, E-mail: taoshuangyou@163.com

medicine recipe with cooling blood to remove toxin is an effective method in treating chronic severe hepatitis, with a high therapeutic effect, and may intervene LPS recognition receptors.

[Key words] chronic severe hepatitis; LPS recognition receptors; traditional Chinese medicine

慢性重型肝炎 (chronic severe hepatitis, CSH) 被世界卫生组织认定为内科常见危重病, 死亡率极高, 其发病机制错综复杂, 中医治疗慢性重型肝炎根据发病机制多采用凉血解毒方治疗。我们临床中发现, 慢性重型肝炎应注重凉血解毒治疗, 但具体干预机制研究不多, 本研究对凉血解毒方治疗慢性重型肝炎的临床疗效及干预内毒素受体通路进行了初步研究。

## 1 资料与方法

**1.1 病例选择** 2009 年 1 月~2011 年 1 月广州中医药大学第一附属医院消化内科慢性重型肝炎中、早期住院患者 58 例诊断与分期符合 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》制定的标准<sup>[1]</sup>, 排除标准: 同时感染艾滋病毒 (HIV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、丁型肝炎病毒 (HDV) 或其他类型肝脏疾病 (如酒精性、自身免疫性或胆汁淤积性肝病); 妊娠和哺乳期妇女。所有病例乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 阳性均大于 6 个月。随机分为两组, 观察组 28 例, 其中男 18 例, 女 10 例, 年龄 (46.4 ± 10.2) 岁, CSH 早期 10 例, 中期 18 例。对照组 30 例, 男 19 例, 女 11 例, 年龄 (44.9 ± 10.6) 岁, CSH 早期 9 例, 中期 21 例。60 例患者肝炎病原学检测均为乙型。两组患者在性别、年龄、病情分期等方面经统计学处理, 差异均无显著性意义, 具有可比性。两组均经过正规抗病毒治疗, 同时留血清。所有标本采取前均与患者签署知情同意书, 并得到医院伦理委员会批准。

**1.2 治疗** 对照组: 采用内科基础治疗。内科基础治疗: 按病情给予相似的常规内科处理: 卧床休息, 补充足够能量和维生素, 保肝降酶退黄、利尿、通便、醒脑等对症治疗, 静滴前列地尔等药物, 定期补充白蛋白、凝血酶原复合物、血浆等血制品, 积极防治并发症 (主要是感染) 等。观察组在内科基础治疗基础上加凉血解毒方为基础的中药口服: 水牛角 (先煎) 30 g, 茵陈 30 g, 叶下珠、茜草、白背叶根各 15 g, 田基黄、丹参各 20 g, 石菖蒲、郁金各 10 g, 甘草 5 g。在院制剂室煎煮, 100~150 mL/次, 2 次/d。2 周为 1 个疗程。共 2 个疗程。临床主要症状包括乏力、恶心呕吐、纳差、腹胀、黄疸、口干 (苦)、出血倾向。

症状分级量化参考《中药新药治疗病毒性肝炎的临床研究指导原则》<sup>[2]</sup> 而制定, 症状轻重评分方法: 无症状为 0 分, 轻度为 2 分, 中度为 4 分, 重度为 6 分。**1.3 观察指标** 参考《病毒性肝炎防治方案》制定的标准<sup>[1]</sup>, 疗效比较; 症状积分比较; 血清学比较。

### 1.4 检测指标

**1.4.1 内毒素测定** 内毒素的检测方法采用显色基质鲎实验法, 试剂盒购自上海伊华医学科技有限公司, 批号 20081115。试验患者于试验前晚禁食 8 h, 于次日清晨空腹抽取静脉血 2 mL 试管采用无热源试管, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 离心后 -20 ℃ 保存待测。实验步骤依试剂盒说明逐步进行。以 EU·mL<sup>-1</sup> 表示结果。

**1.4.2 Toll 样受体 4 基因 (TLR4 mRNA) 水平测定** 无菌条件下一次采集研究对象静脉血 12 mL, 分别置于 3 支试管中: 1 支无热原处理的肝素抗凝管 (2 mL)、1 支非抗凝管 (2 mL), 上述两管离心取上清液放入 -30 ℃ 冰箱内保存, 1 支 2% EDTA 抗凝管 (8 mL), 常规采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度法分离外周血单个核细胞 (PBMCs)。取 8 mL 淋巴细胞分离液加入无菌试管中, 再加入 8 mL 静脉血, 2 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取白膜层置另一无菌试管, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 调整细胞密度 1 × 10<sup>6</sup> mL。将细胞分为 2 份: 第 1 份用于流式细胞术检测, 第 2 份立即抽提总 RNA。

**1.4.2.1 流式细胞术分析** 取流式细胞专用试管 2 支, 分别加入 IgG (阴性对照), CD14 单克隆抗体各 5 μL 和外周血单个核细胞 100 μL, 混匀置室温 20 ℃ 避光孵育 30 min, 然后用 PBS 2 mL 洗涤, 1 200 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 洗去未结合单抗, 加入 PBS 0.5 mL 上机检测。采用 BD 公司的 CellQuest 软件进行测定分析, 每次获取 10 000 个细胞以“门技术”确定单核细胞群并统计结果。

**1.4.2.2 单个核细胞 TLR4 mRNA 半定量分析** 单个核细胞总 RNA 提取后取 10 μL 总 RNA, 加入引物, 逆转录缓冲液、RNA 酶抑制剂、dNTP、M-MuLV 逆转录酶等孵育, 合成的第一链 cDNA 于 -20 ℃ 保存, 进行 PCR 扩增, 进行 PCR 产物分析 (即 TLR4 mRNA 相对水平)。

**1.4.3 sCD14 测定** 采用德国 IBL 公司生产的

sCD14 检测试剂盒,检测原理为 ELISA 双抗体夹心法。除空白对照孔外,加入已稀释好的待测标本或不同浓度的对照品各 50  $\mu\text{L}$  至相应孔中,同时再加入 50  $\mu\text{L}$  Anti-sCD14 溶液。封板胶纸封住反应孔,并在微量震荡器上震荡数分钟,室温下孵育 2 h。洗板 3 次。每孔加入酶结合物 150  $\mu\text{L}$ (空白对照孔除外),充分混匀,室温下孵育 1 h。洗板 3 次。加入 TMB 底物 200  $\mu\text{L}$ ,充分混匀后,室温下孵育 15 min。加入终止液 100  $\mu\text{L}$ 、混匀。酶标仪在 450 nm 处读取吸光度(A)。结果判断:所有标本的读数减去空白对照读数即为计算值,以标准血清的计算值,绘制标准曲线。根据标准曲线,计算每个标本 sCD14 的浓度。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用  $t$  检验,方差不齐时采用  $t'$  检验;计数资料以频数表示,采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有显著性。

**1.6 疗效判断** 有效①临床治愈:症状消失,黄疸消退,并发症治愈,肝功能正常;②好转:症状消失或缓解,并发症控制, TBil 下降超过治疗前 50%。无效肝功能衰竭,出现并发症而死亡,或病情加重放弃治疗而自动出院。

## 2 结果

**2.1 两组治疗前后的疗效比较** 见表 1。结果显示:两组有效率比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),观察组疗效优于对照组。

表 1 两组治疗重型肝炎疗效比较

| 组别 | 例数 | 治愈/例 | 好转/例 | 无效/例 | 总有效率/%             |
|----|----|------|------|------|--------------------|
| 观察 | 28 | 6    | 16   | 6    | 78.6 <sup>1)</sup> |
| 对照 | 30 | 5    | 15   | 10   | 66.7               |

注:与对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 两组治疗前后症状积分比较** 观察组治疗前主要症状分值为(21.5  $\pm$  7.2)分,治疗后(10.6  $\pm$  5.5)分;对照组治疗前主要症状分值为(22.5  $\pm$  7.1)分,治疗后(13.2  $\pm$  7.8)分,两组症状改善与治疗前比较( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。观察组对 CSH 患者症状改善较对照组的效果更好( $P < 0.05$ )。

**2.3 两组治疗前后血清学比较** 见表 2。两组治疗后主要肝功指标总胆红素(TBil)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)明显下降,血清白蛋白(Alb)上升,主要凝血指标凝血时间(PT)下降,治疗前后比较差异均有显著性或非常显著性意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );两组治疗后比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),观察组对主要肝功、凝血指标的改善优于对照组。

表 2 两组治疗前后血清学比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 例数 | 时间  | TBil/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ | AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ | Alb/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | PT/s                           |
|----|----|-----|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 观察 | 28 | 治疗前 | 336.8 $\pm$ 189.8                         | 631.6 $\pm$ 516.6                   | 466.9 $\pm$ 539.8                   | 28.96 $\pm$ 5.72                    | 26.2 $\pm$ 9.1                 |
|    |    | 治疗后 | 268.4 $\pm$ 179.4 <sup>1,3)</sup>         | 38.6 $\pm$ 17.6 <sup>1,3)</sup>     | 55.2 $\pm$ 38.6 <sup>1,3)</sup>     | 31.6 $\pm$ 5.2 <sup>1,3)</sup>      | 17.6 $\pm$ 7.3 <sup>1,3)</sup> |
| 对照 | 30 | 治疗前 | 328.3 $\pm$ 179.6                         | 626.0 $\pm$ 498.7                   | 448.6 $\pm$ 403.2                   | 29.15 $\pm$ 5.24                    | 26.8 $\pm$ 8.8                 |
|    |    | 治疗后 | 294.6 $\pm$ 205.8 <sup>2)</sup>           | 48.3 $\pm$ 20.6 <sup>2)</sup>       | 61.3 $\pm$ 36.5 <sup>2)</sup>       | 31.98 $\pm$ 4.67 <sup>2)</sup>      | 20.3 $\pm$ 6.9 <sup>2)</sup>   |

注:与治疗前比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与对照组治疗后比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 两组治疗前后血清内毒素水平比较** 观察组治疗前血清内毒素水平为(0.29  $\pm$  0.13) EU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,治疗后(0.16  $\pm$  0.05) EU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>;对照组治疗前主要症状分值为(0.31  $\pm$  0.14) EU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,治疗后(0.23  $\pm$  0.11) EU  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,两组治疗前比较差异无统计学意义,两组治疗前后比较差异均有显著性或非常显著性意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );两组治疗后比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),观察组对血清内毒素水平改善优于对照组。

**2.5 两组治疗前后血浆 sCD14 水平,外周血 TLR4 mRNA 表达比较** 治疗组治疗后血浆 sCD14 (6.92  $\pm$  2.46) mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>水平,外周血 TLR4 mRNA [(13 673.78  $\pm$  4 583.72) copy/ $\mu\text{g}$  RNA]较治疗前 [(10.21  $\pm$  5.63) mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, (17 116.37  $\pm$  5 203.3)

copy/ $\mu\text{g}$  RNA]下降,差异有显著性意义( $P < 0.05$ ),但对对照组治疗前 [(12.09  $\pm$  7.66) mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, (17 004.7  $\pm$  5 208.3) copy/ $\mu\text{g}$  RNA]后 [(11.34  $\pm$  6.72) mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, (15 776.1  $\pm$  4 886.7) copy/ $\mu\text{g}$  RNA]差异不明显,治疗前后比较无显著性差异。

## 3 讨论

重型肝炎的发病机制错综复杂,但肠源性内毒素(LPS)血症在肝炎重型化过程中起到关键作用得到一致公认<sup>[3]</sup>。LPS 对肝细胞的毒性作用有直接和间接两种,但 LPS 对肝脏的影响,更重要的是间接作用,即 LPS 与效应细胞上 LPS 受体相互作用进而激活单核巨噬细胞系统产生肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等炎性介质进而诱导失控性炎症反应并最终导致肝功能衰竭<sup>[4]</sup>。单核细胞等细胞表面上 LPS 相关受

体分子是机体识别并启动炎症反应的始动因素,因此,对 LPS 受体的研究显得极为重要。1990 年, Wright 等<sup>[5]</sup>首次发现 CD14 作为 LPS 受体之一, CD14 是一种 55KD 糖蛋白,有膜型 CD14(mCD14)和可溶性 CD14(sCD14)两种。mCD14 是通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定在细胞膜上,主要表达在单核/巨噬细胞表面。sCD14 分布于血浆中,由 mCD14 脱落或细胞分泌产生。sCD14/LPS 复合物不仅能结合 CD14 阴性细胞,使这些细胞分泌细胞因子,而且可以增强单核细胞的 LPS 的反应<sup>[6]</sup>。然而就 LPS 信号转导而言,CD14 仅仅是 LPS 的一个中继站,无法将 LPS 信号递到胞内。近年来,信号受体 Toll 的发现,为 LPS 受体的研究找到突破点。人 TLRs 家族成员已发展 10 个<sup>[7]</sup>,与 LPS 相关的 TLRs 主要是 TLR2 和 TLR4。一般认为,TLR2 可识别种微生物细胞壁的成分,但并不是 LPS 的主要受体,TLR4 是介导 LPS 诱导细胞激活的主要受体<sup>[6]</sup>,亦最受关注。目前研究显示 TLR4 的表达和功能上调在内毒素引起的肝功能衰竭中起着重要作用,且与 TNF- $\alpha$  等炎症介质表达呈正相关<sup>[8-9]</sup>,因此,预防 TLR4 过度反应的研究已成为目前控制暴发性肝衰竭研究的热点。但目前有关化学药物仍局限于体外研究阶段。

慢性重型肝炎是一类病情严重、临床症状复杂、病死率高、严重危害人们健康的肝脏疾病。临床治疗的关键是能否迅速有效的清除体内各种有毒物质,阻断恶性循环,保护肝脏及其他脏器功能,而现有的药物治疗难以缓解由于肝细胞坏死所致的大量毒性代谢产物堆积,并进一步加重残存肝细胞的损伤。原位肝移植疗效确切,但由于供体肝脏来源受限,加之肝衰竭本身病情进展迅速,使我国大部分重型肝炎患者不能受益于肝移植。目前采用人工肝支持系统(ALSS)清除体内蓄积的代谢产物,为肝细胞再生提供较好的内环境,成为重型肝炎特别是中早期患者治疗的重要手段,血浆置换(PE)是 ALSS 中较为成熟的肝脏替代疗法,虽然临床疗效确切,但只能暂时阻断有害物质对肝脏的损害,无法从根本上干预 LPS 受体分子介导的炎症介质的产生。新近的研究表明 LPS 受体介导的这些炎症介质在重型肝炎的发生发展中起关键作用,随着对 LPS 受体的研究使重型肝炎的发病及治疗研究有了一定的进展,尤其近年对 Toll 样受体(TLRs)的研究,正逐步揭示着重型肝炎的发病机制,TLRs 中 TLR4 通路的

部分阐明也为寻找重型肝炎的治疗提供了新的契机,尤其新近体外实验研究发现凉血解毒类方药对 Toll 样受体及下游信号转导通路均有一定的干预作用<sup>[10-11]</sup>。但迄今为止临床上以 LPS 受体分子为靶点的治疗方案尚属空白。本研究显示凉血解毒方干预方案在重型肝炎的治疗上有不可轻视的疗效,而且初步发现其对内毒素受体通路有一定的干预作用,有着广阔的应用和开发前景。

### [参考文献]

- [1] 第 5 次全国传染病、寄生虫学术会议. 病毒性肝炎防治方案(试订)[J]. 中华传染病杂志, 1995, 13(4): 241.
- [2] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2002: 148.
- [3] Han D W. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 961.
- [4] Kuhla A, Eipel C, Siebert N, et al. Hepatocellular apoptosis is mediated by TNF alpha-dependent Fas/Fasligand cytotoxicity in a murine model of acute liver failure[J]. Apoptosis, 2008, 13(12): 1427.
- [5] Wright S D, Ramos R A, Tobias P S, et al. CD14, a receptor for complex of lipopolysaccharide and LPS binding protein[J]. Science, 1990, 249: 1431.
- [6] Soares J B, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, et al. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases [J]. Hepatol Int, 2010, 4(4): 659.
- [7] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 13: 1.
- [8] 黄瑜, 陈永平, 许烂漫, 等. 动态监测 Toll 样受体 4 CD14 在大鼠急性肝衰竭中的变化[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2): 142.
- [9] 赵军, 刘旭华, 陈煜, 等. 内毒素性肝衰竭大鼠 TLR4 mRNA 表达、血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  及肝细胞凋亡的动态变化[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2008, 17(1): 42.
- [10] 赵宝胜, 刘洪斌, 马悦颖, 等. 黄连解毒汤含药血清对 Toll 样受体 34、型及其下游信号转导通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(5): 15.
- [11] 杜新亮, 隋峰, 张畅斌, 等. 桑菊饮含药血清对小鼠巨噬细胞 Toll 样受体表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 57.

[责任编辑 邹晓翠]