

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

孙治霞*, 索红亮, 王丽辉
(河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] **目的:**探讨桃仁承气汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障的保护作用以及作用机制。**方法:**将大鼠分为假手术组,模型组(盲肠结扎穿孔法复制脓毒症大鼠),桃仁承气汤低、中、高剂量组(2.85, 5.70, 8.55 g·kg⁻¹),地塞米松组(0.01 g·kg⁻¹),每组 12 只。末次给药结束后,处死大鼠,电镜下观察肠黏膜形态变化;检测肠系膜淋巴结、肝、肾、脾组织细菌移位率;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)以及小肠组织中二胺氧化酶(DAO),肠型脂肪酸结合蛋白(i-FABP)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot),免疫组化法(IHC)检测小肠组织中 Toll 样受体 9(TLR9),髓样分化因子 88(MyD88),核转录因子- κ B 亚基 p65(NF- κ B p65)蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠器官细菌移位率, TNF- α , IL-1 β 水平明显升高, DAO, i-FABP 水平, 黏膜厚度, 绒毛高度明显降低, TLR9, MyD88, 细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 细胞质 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组器官细菌移位率, TNF- α , IL-1 β 水平明显降低, DAO, i-FABP 水平, 黏膜厚度, 绒毛高度明显升高, TLR9, MyD88, 细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低($P < 0.05$), 细胞质 NF- κ B p65 蛋白表达明显升高($P < 0.05$)。**结论:**桃仁承气汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障具有一定的保护作用,这可能与抑制 TLR9 信号通路有关。

[关键词] 脓毒症; 肠黏膜; 桃仁承气汤; Toll 样受体 9; 髓样分化因子 88 (MyD88); 核转录因子- κ B 亚基 p65 (NF- κ B p65)

[中图分类号] R289;R574.4;R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0029-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190738

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181217.1731.010.html>

[网络出版时间] 2018-12-18 17:02

Effects of Taoren Chengqitang on Intestinal Mucosal Barrier and TLR9 Signaling Pathway in Septic Rats

SUN Zhi-xia*, SUO Hong-liang, WANG Li-hui

(Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Taoren Chengqitang on intestinal mucosal barrier in septic rats and its possible mechanism. **Method:** Rats were divided into sham operation group, model group (replication of septic rats with cecal ligation and perforation), low, middle and high-dose Taoren Chengqitang groups (2.85, 5.70, 8.55 g·kg⁻¹), and dexamethasone group (0.01 g·kg⁻¹), with 12 rats in each group. After last administration, rats were put to death, the morphological changes of intestinal mucosa were observed under electron microscope, the bacterial translocation rates in lymphoglandulae mesentericae, liver, kidney and spleen tissues were detected; the levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and diamine oxidase (DAO) and intestinal fatty acid binding protein (i-FABP) levels in small intestine tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expressions of Toll like receptor 9 (TLR9), myeloid

[收稿日期] 20181017(005)

[基金项目] 2018 年河南省中医药科学研究专项(2018ZY2050)

[通信作者] * 孙治霞, 硕士, 主治医师, 从事心血管病临床研究, E-mail: jameszll@yeah.net

differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear factor-kappa B subunit p65 in small intestine tissues were detected by Western blot and immunohistochemistry. **Result:** Compared with sham operated group, the bacterial translocation rate, TNF- α and IL-1 β levels in model group increased significantly, DAO, i-FABP, mucosal thickness and villus height decreased significantly, and protein expressions of TLR9, MyD88 and nucleus NF- κ B p65 increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and expression of cytoplasmic NF- κ B p65 protein decreased significantly. Compared with model group, the bacterial translocation rate, TNF- α and IL-1 β levels in organs of low, medium and high-dose Taoren Chengqitang groups and dexamethasone group decreased significantly, DAO, i-FABP, mucosal thickness and villus height increased significantly, while the protein expressions of TLR9, MyD88 and nucleus NF- κ B p65 decreased significantly ($P < 0.05$), and expression of cytoplasmic NF- κ B p65 protein increased significantly. **Conclusion:** Taoren Chengqitang has a certain protective effect on intestinal mucosal barrier in septic rats, which may be related to the inhibition of TLR9 signaling pathway.

[**Key words**] sepsis; intestinal mucosa; Taoren Chengqitang; Toll like receptor 9; myeloid differentiation factor 88 (MyD88); nuclear factor- κ B subunit p65 (NF- κ B p65)

脓毒症是机体感染导致的器官功能障碍,具有较高的死亡率和发病率,调查显示脓毒症是重症监护室患者死亡的重要原因,死亡率达 30%^[1-2]。脓毒症发生时会使肠黏膜缺氧、缺血,进而破坏肠黏膜屏障,引发肠道细菌移位,发展为多器官功能障碍综合征导致死亡^[3]。因此,保护肠屏障功能是脓毒症治疗的重要途径。有研究表明,脓毒症幼鼠肠道菌群存在紊乱及移位,伴肠道黏膜损伤,血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)明显升高,同时会造成多器官损伤^[4]。Toll 样受体 9(TLR9)信号通路参与炎症的发生与发展,研究发现 TLR9 在正常的肠道中表达很少,但是当机体发生炎症损伤时,其表达会升高^[5-6]。基于以上研究背景,推测 TLR9 可能参与肠道炎症反应,但在脓毒症损伤肠道屏障中的研究尚无报道。桃仁承气汤出自《伤寒论》,是由大黄、芒硝、桃仁、当归、赤芍、牡丹皮组成,具有肺肠同治,行气通瘀的功效^[7-8],近期研究发现桃仁承气汤在肺损伤后胃肠功能恢复方面效果较好^[9],此外在降低脓毒症患者炎症反应方面也具有一定的疗效^[10],但是否对脓毒症后肠黏膜屏障具有保护作用,目前尚不明确。因此本研究通过制备脓毒症大鼠模型,观察桃仁承气汤对大鼠肠黏膜屏障的保护作用,并探究可能的作用机制是否与 TLR9 信号通路有关。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 240 只,体质量 220 ~ 260 g,动物合格证号 SCXK(豫)2017-0015,由河南省中医院动物实验中心提供,统一在 22 ~ 25 $^{\circ}$ C,湿度 45%,昼夜交替 12 h 的环境中自由饮水摄食,饲养 1 周后进行模型制备。本研究获得河南

省中医院动物伦理委员会批准。

1.2 试剂 桃仁承气汤为本院自制药,由大黄 15 g,芒硝 6 g,桃仁、当归、赤芍、牡丹皮各 9 g 组成,以上饮片由河南省中医院主任中医师周军丽鉴定均为正品。将药物置于 5 倍水中浸泡 2 h,文火煎煮 0.5 h,过滤后收集药液,并在原药渣中加少量水 2 次煎煮,结束后混合 2 次药液,将药液浓缩。地塞米松(天津天药药业股份有限公司,批号 20170216);兔抗 TLR9,髓样分化因子 88(MyD88),核转录因子- κ B 亚基 p65(NF- κ B p65), β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Sigma 公司,批号分别为 20170211,20170216,20170304,20170307);TNF- α ,二胺氧化酶(DAO),白细胞介素-1 β (IL-1 β),肠型脂肪酸结合蛋白(i-FABP)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京诚林生物科技有限公司,批号分别为 20170224,20170311,20170306,20170314);免疫组化检测试剂盒(碧云天生物技术研究,批号 20170416);戊二醛(北京 Solarbio 公司,批号 20170326);钨酸(上海 Spectrum 公司,批号 20170305);醋酸铀,柠檬酸铅(深圳卓越生物技术有限公司,批号分别为 20170224,20170311)。

1.3 仪器 BS-51 型普通显微镜, JEM-2100 型透射电子显微镜(日本 Olympus 公司);1703930 型转印槽(英国埃尔格公司);Trans-blot 型转膜仪,165800 型垂直电泳仪, Gel Doc XR + 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);ELX800 型通用酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);YN-02T1 型环保全自动双吊篮生物组织脱水机,YN-02B1 型生物组织冷冻包埋机,YN-02Q1 型轮转式石蜡烤片机(深圳永年科技公司);CM3050S 型切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 模型制备前 12 h 禁食,参照文献中盲肠结扎穿孔法复制脓毒症大鼠^[11],腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉大鼠,固定在鼠板上,常规消毒、铺巾后,于腹正中做 2 cm 竖切口,逐层开腹后,游离盲肠、肠系膜至盲肠血管弓内根部外 1/3 处结扎,于盲肠末端采用 18 号针头观察肠管进行 2 次穿孔,将肠内物挤出少许,逐层关腹。造模前、后 8 h 血清 IL-6 等因子水平升高至造模前 5~10 倍,24 h 内大鼠死亡率达 30%,同时取肝、肾组织进行病理学检测发现严重病理性损伤视为模型制备成功^[12-13]。排除死亡大鼠,共 60 只模型制备成功,模型制备后将大鼠随机分为模型组,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组,另设置假手术组大鼠,仅行盲肠探查术,每组均 12 只。假手术组、模型组大鼠均注射 0.9% 生理盐水,桃仁承气汤低、中、高剂量组分别灌胃 2.85, 5.7, 8.55 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 桃仁承气汤^[9];地塞米松组给予 0.01 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 地塞米松,各组大鼠均给药 28 d。

2.2 标本采集 末次给药结束后,处死大鼠,开胸腹主动脉采血 2 mL, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上层血清,置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。取肠系膜淋巴结、肝、肾、脾组织 0.5 g 各 4 块用于器官细菌移位检测。收集小肠组织(离盲肠根部约 15 cm)用于后续检测。

2.3 透射电镜观察肠黏膜形态变化 将小肠组织置于生理盐水中漂洗 3 遍,加入 2.5% 戊二醛, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 固定 2 h,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,添加 1% 锇酸固定, PBS 清洗后,在梯度乙醇中脱水后,石蜡中包埋后制备超薄切片($0.06 \text{ }\mu\text{m}$),添加醋酸铀染色 0.5 h,添加柠檬酸铅染色 5 min,置于电镜下观察肠黏膜结构情况。采用图像分析软件测量肠壁黏膜厚度和绒毛高度。

2.4 器官细菌移位率检测 取出保存肠系膜淋巴结、肝、肾、脾组织,各称取 1 mg,添加生理盐水 9 mL,置于匀浆器内制备组织均浆液,无菌条件下取均浆液 0.1 mL 用灭菌三角涂布棒将组织均浆液均匀涂布在血琼脂培养基,放在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱内培养 24 h,观察是否出现肉眼可见菌落(直径 $> 0.1 \text{ mm}$),并统计出现细菌移位的器官。

2.5 ELISA 检测大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 及组织中 DAO, i-FABP 含量 取出保存小肠组织,加入预冷生理盐水后研磨为匀浆, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后,保存上清,采用 ELISA 试剂盒检测血清中

TNF- α , IL-1 β 及小肠组织 DAO, i-FABP 水平,在酶标包被板添加标准品 $50 \text{ }\mu\text{L}$,设空白孔(不添加酶标试剂、样品),待测样品孔,于待测样品孔中添加样品 $40 \text{ }\mu\text{L}$,亲和素 $10 \text{ }\mu\text{L}$,封板后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 30 min,洗涤、拍干后,除空白孔外添加酶标试剂 $50 \text{ }\mu\text{L}$,封板后 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 温育 30 min,洗涤、拍干后,加入显色剂 $100 \text{ }\mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应 15 min,加入终止液 $50 \text{ }\mu\text{L}$ 结束反应,于 450 nm 波长处检测各孔的吸光度 A ,并绘制标准品曲线计算样品浓度。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小肠组织中 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白的表达 小肠组织研磨后用裂解液裂解蛋白,参照蛋白提取试剂盒提取小肠组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 $20 \text{ }\mu\text{g}$ 行 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白,结束后将蛋白凝胶转移至 PVDF 膜上,置于冰上行转膜反应,室温下添加 5% 脱脂牛奶封闭,添加一抗 TLR9, MyD88, NF- κ B p65, β -actin,稀释倍数均为 1:500, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, TBST 溶液清洗后加入二抗(1:5 000),室温下放置 1 h, TBST 清洗后 ECL 显色,在凝胶成像仪中观察蛋白表达情况,利用 Image-Pro Plus 软件对各蛋白进行定量分析。

2.7 免疫组化法检测小肠组织 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达 常规制备小肠组织石蜡切片,脱蜡脱水后 PBS 清洗,添加柠檬酸钠行抗原修复,3% 过氧化氢消除内源过氧化酶活性,清洗后滴加 10% 山羊血清封闭,添加 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 一抗,稀释倍数均为 1:500, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,滴加 HRP 标记过氧化物酶二抗(1:5 000)后复染,氨水返蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片处理,显微镜下观察蛋白阳性表达情况,采用 Image-Pro Plus 软件对各蛋白阳性表达进行定量分析,蛋白阳性表达率 = 染色阳性细胞/细胞总数 $\times 100\%$ 。

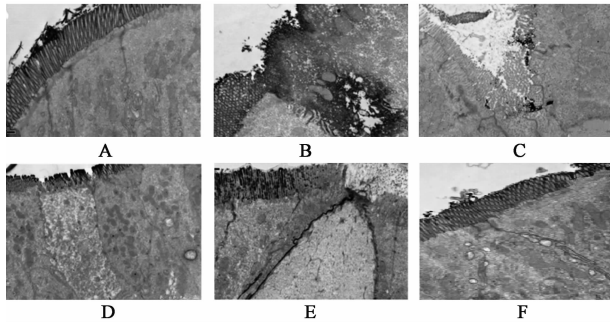
2.8 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析,计数资料均采用“率”进行描述,行卡方检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 模型大鼠活动度明显降低,并出现厌食、竖毛等情况,桃仁承气汤低、中、高剂量组与地塞米松组大鼠经治疗后大鼠活动度逐渐增加,厌食、竖毛等情况逐渐得到改善。假手术组大鼠并无明显变化。各组大鼠均未出现死亡。

3.2 对小肠组织病理形态学的影响 假手术组

绒毛的数量和结构正常;模型组肠黏膜上皮细胞坏死,绒毛破坏塌陷;桃仁承气汤低剂量组部分小肠绒毛萎缩和萎缩,线粒体、内质网肿胀,部分区域组织完全溶解;桃仁承气汤中剂量组,上皮微绒毛数量减少,部分微绒毛损伤,细胞器超微结构基本正常;桃仁承气汤高剂量组,地塞米松组绒毛结构逐渐恢复正常。与假手术组比较,模型组黏膜厚度、绒毛高度显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组黏膜厚度、绒毛高度明显升高($P < 0.05$)。见图 1,表 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 桃仁承气汤低剂量组;D. 桃仁承气汤中剂量组;E. 桃仁承气汤高剂量组;F. 地塞米松组(图 2~5 同)

图 1 电镜观察小肠组织超微结构(透射电镜, $\times 15\ 000$)

Fig. 1 Ultrastructure of small intestine tissue observed under electron microscopy(TEM, $\times 15\ 000$)

3.3 对大鼠器官细菌移位率的影响 与假手术组比较,模型组器官细菌移位率明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组器官细菌移位率均明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 及小肠组织中 DAO, i-FABP 水平的影响 与假手术组比较,模型组血清

表 1 桃仁承气汤对小肠组织病理形态学的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Taoren Chengqitang on pathological morphology of small intestine($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	黏膜厚度	绒毛高度 μm
假手术	-	278.53 \pm 14.06	173.59 \pm 12.38
模型	-	220.58 \pm 12.65 ¹⁾	123.57 \pm 8.35 ¹⁾
桃仁承气汤	2.85	231.65 \pm 12.07 ²⁾	146.58 \pm 10.68 ²⁾
	5.70	244.58 \pm 13.45 ²⁾	152.69 \pm 12.87 ²⁾
	8.55	251.38 \pm 14.19 ²⁾	163.57 \pm 11.49 ²⁾
地塞米松	0.01	258.67 \pm 12.32 ²⁾	168.43 \pm 17.55 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3~5 同)。

表 2 桃仁承气汤对大鼠器官细菌移位率的影响($n = 12$)

Table 2 Effect of Taoren Chengqitang on bacterial translocation rate in rat organs($n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肝/只	肾/只	脾/只	淋巴结/只	总移位率/%
假手术	-	0	0	0	3	7.5
模型	-	5	1	4	7	42.5 ¹⁾
桃仁承气汤	2.85	3	1	2	2	20.0 ²⁾
	5.70	2	1	1	2	15.0 ²⁾
	8.55	2	0	1	2	12.5 ²⁾
地塞米松	0.01	2	0	1	1	10.0 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

TNF- α , IL-1 β 水平显著升高,小肠组织中 DAO, i-FABP 水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组血清 TNF- α , IL-1 β 水平明显降低,小肠组织 DAO, i-FABP 水平明显升高($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 桃仁承气汤对大鼠血清 TNF- α , IL-1 β 及小肠组织中 DAO, i-FABP 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Taoren Chengqitang on serum TNF- α , IL-1 β and DAO, i-FABP levels in small intestine tissue of rats($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	DAO/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	i-FABP/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	171.78 \pm 15.46	31.75 \pm 5.88	36.84 \pm 3.58	1.25 \pm 0.23
模型	-	235.66 \pm 18.71 ¹⁾	64.29 \pm 7.35 ¹⁾	20.38 \pm 4.39 ¹⁾	0.64 \pm 0.06 ¹⁾
桃仁承气汤	2.85	207.28 \pm 13.62 ²⁾	51.42 \pm 5.33 ²⁾	24.58 \pm 3.57 ²⁾	0.87 \pm 0.05 ²⁾
	5.70	198.48 \pm 12.46 ²⁾	39.78 \pm 5.20 ²⁾	28.54 \pm 4.06 ²⁾	0.93 \pm 0.12 ²⁾
	8.55	179.39 \pm 14.65 ²⁾	35.24 \pm 7.29 ²⁾	30.54 \pm 3.19 ²⁾	1.04 \pm 0.19 ²⁾
地塞米松	0.01	171.57 \pm 11.73 ²⁾	34.58 \pm 6.27 ²⁾	31.68 \pm 4.33 ²⁾	1.08 \pm 0.21 ²⁾

3.5 对大鼠小肠组织 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组 TLR9,

MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),细胞质 NF- κ B p65 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);

与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组、地塞米松组 TLR9, MyD88, 细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 细胞质 NF- κ B p65 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 4。

3.6 对大鼠小肠组织 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达率明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3 ~ 5, 表 5。

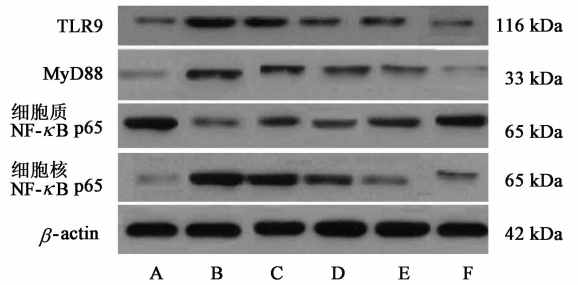


图 2 小肠组织中 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TLR9, MyD88 and NF- κ B p65 protein expressions in small intestine tissue

表 4 桃仁承气汤对小肠组织中 TLR9, MyD88, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of Taoren Chengqitang on TLR9, MyD88 and NF- κ B p65 protein expressions in small intestine tissue ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR9 / β -actin	MyD88 / β -actin	细胞核 NF- κ B p65 / β -actin	细胞质 NF- κ B p65 / β -actin
假手术	-	0.31 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03	0.23 \pm 0.08	1.07 \pm 0.08
模型	-	0.94 \pm 0.12 ¹⁾	0.84 \pm 0.16 ¹⁾	1.08 \pm 0.13 ¹⁾	0.21 \pm 0.08 ¹⁾
桃仁承气汤	2.85	0.82 \pm 0.11 ²⁾	0.68 \pm 0.09 ²⁾	0.91 \pm 0.09 ²⁾	0.30 \pm 0.05 ²⁾
	5.70	0.68 \pm 0.09 ²⁾	0.56 \pm 0.06 ²⁾	0.75 \pm 0.07 ²⁾	0.44 \pm 0.06 ²⁾
	8.55	0.61 \pm 0.08 ²⁾	0.37 \pm 0.07 ²⁾	0.35 \pm 0.04 ²⁾	0.62 \pm 0.04 ²⁾
地塞米松	0.01	0.40 \pm 0.05 ²⁾	0.21 \pm 0.05 ²⁾	0.27 \pm 0.06 ²⁾	0.73 \pm 0.06 ²⁾

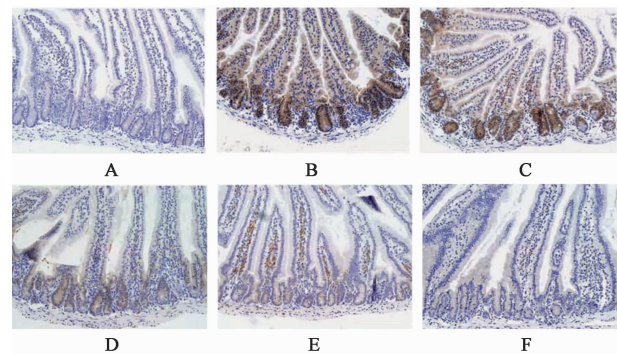


图 3 桃仁承气汤对小肠组织中 TLR9 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of Taoren Chengqitang on TLR9 protein positive expression in small intestine tissue (IHC, $\times 100$)

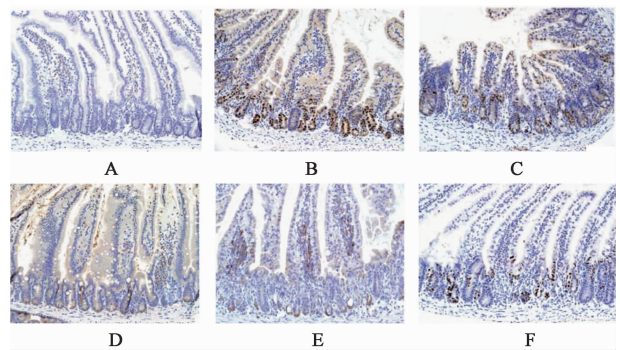


图 4 桃仁承气汤对小肠组织中 MyD88 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, $\times 100$)

Fig. 4 Effect of Taoren Chengqitang on MyD88 protein positive expression in small intestine tissue (IHC, $\times 100$)

4 讨论

肠道为机体最大的细菌库,肠道损伤后使交感神经产生兴奋,释放大量毒性物质,损伤肠黏膜机械屏障,导致肠黏膜通透性增加,肠道内吸收大量内毒素、细菌,并移位至组织和淋巴系统,产生大量 TNF- α 等炎症因子,形成级联放大作用,最终引发脓毒症^[15]。国内学者研究显示肠动力降低后使小肠中细菌大量繁殖,毒素增加,是晚期脓毒症患者发生脓毒症的主要原因^[16]。本研究通过制备脓毒症大鼠,结果显示模型大鼠活动度明显降低,出现厌食、

竖毛等情况,器官细菌移位率显著升高,血清 TNF- α , IL-1 β 水平显著升高,电镜结果显示肠黏膜上皮细胞坏死,绒毛破坏塌陷,细胞器溶解,说明脓毒症大鼠肠黏膜受损。DAO 属于小肠黏膜上层绒毛中高活性酶, i-FABP 属于低分子量胞液蛋白,当黏膜屏障受损时, DAO, i-FABP 进入淋巴管和血流,使肠组织中 DAO, i-FABP 水平降低,因此 DAO, i-FABP 水平可反映肠道机械屏障的完整性和受损伤程度^[17-18]。本研究显示模型组大鼠肠组织中 DAO, i-FABP 水平降低,将进一步提示黏膜屏障受损,

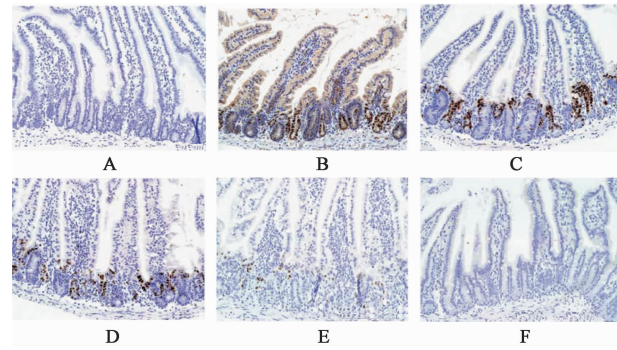


图 5 桃仁承气汤对小肠组织中 NF-κB p65 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, ×100)

Fig. 5 Effect of Taoren Chengqitang on NF-κB p65 protein positive expression in small intestine tissue(IHC, ×100)

表 5 桃仁承气汤对小肠组织中 TLR9, MyD88, NF-κB p65 蛋白阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of Taoren Chengqitang on positive rate of TLR9, MyD88 and NF-κB p65 protein in small intestine tissue($\bar{x} \pm s, n = 12$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TLR9	MyD88	NF-κB p65
假手术	-	34.75 ± 4.58	31.54 ± 3.25	27.49 ± 3.88
模型	-	73.42 ± 5.67 ¹⁾	62.44 ± 4.59 ¹⁾	68.44 ± 4.76 ¹⁾
桃仁承气汤	2.85	57.54 ± 5.06 ²⁾	60.34 ± 4.36 ²⁾	46.25 ± 3.35 ²⁾
	5.70	49.46 ± 4.82 ²⁾	56.24 ± 5.37 ²⁾	42.65 ± 4.02 ²⁾
	8.55	41.33 ± 5.54 ²⁾	39.57 ± 4.27 ²⁾	34.47 ± 5.38 ²⁾
地塞米松	0.01	40.28 ± 6.06 ²⁾	38.18 ± 4.09 ²⁾	33.16 ± 4.69 ²⁾

模型制备成功。

桃仁承气汤是由大黄、芒硝、桃仁、当归、赤芍、牡丹皮组成,赤芍、牡丹皮具有清热凉血,活血散瘀之功效;桃仁、当归具有活血化瘀,润燥滑肠之功效,芒硝减轻肠道炎症反应,消除肠道内氧自由基,增加肠黏膜血流量^[19]。过往研究显示桃仁承气汤联合犀角地黄汤能够较好缓解脓毒症患者炎症反应,缓解免疫功能障碍^[20]。由赤芍、桃仁等组成的加味承气汤对子宫切除术后胃肠功能恢复具有较好的疗效^[21]。但桃仁承气汤对脓毒症肠黏膜屏障损伤是否也具有保护作用,目前研究不多。本研究显示经桃仁承气汤处理后,器官细菌移位率显著降低,血清 TNF-α, IL-1β 水平显著降低,肠组织 DAO, i-FABP 水平升高,电镜显示肠黏膜绒毛结构恢复正常,提示桃仁承气汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障受损具有一定的保护作用,但具体作用机制尚不清楚。

TLR9 信号通路与肠道疾病的发生密切相关,TLR9 识别双核苷酸(CpG)后在其 TIR 功能域与信号转接蛋白 MyD88 结合后,将信号传导至 MyD88 下游蛋白 NF-κB,进而调控如 TNF-α 等多种炎症因

子的表达,进而再次激活 NF-κB,形成瀑布效应,导致器官损伤^[12-23]。肠道损伤大鼠中研究显示,TLR9 水平明显升高,且下游炎症因子水平也明显升高,推测 TLR9 可能通过调控下游炎症因子,进而调控肠黏膜屏障的通透性^[24]。在结肠炎大鼠中研究发现,大鼠肠黏膜中 TLR9, MyD88, 细胞核 NF-κB p65 蛋白阳性表达明显升高,给予乌梅丸治疗后 TLR9, MyD88, 细胞核 NF-κB p65 蛋白表达显著降低,且大鼠炎症明显减轻^[25]。在重症胰腺炎肠黏膜屏障受损大鼠中 TLR9, MyD88, NF-κB p65 水平明显升高,随着病情加重水平进一步升高,提示 TLR9 信号通路可能参与脓毒症肠黏膜屏障受损过程^[26]。本研究结果显示模型组大鼠肠组织中 TLR9, MyD88, NF-κB p65 蛋白表达明显升高,表明 TLR9 信号通路可能参与脓毒症肠黏膜屏障受损过程;而桃仁承气汤低、中、高剂量组,地塞米松组 TLR9, MyD88, NF-κB p65 蛋白表达明显降低,推测桃仁承气汤通过抑制 TLR9 信号通路蛋白的表达进而保护脓毒症大鼠肠黏膜屏障损伤。

综上所述,桃仁承气汤能够脓毒症大鼠肠黏膜屏障损伤,降低机体炎症反应,其可能是通过抑制 TLR9 信号通路蛋白的表达,缓解肠黏膜屏障损伤,进而发挥药理作用。然而脓毒症大鼠肠黏膜屏障损伤发生机制较复杂,桃仁承气汤是否通过其他途径发挥作用,还有待进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 商娜. 脓毒症流行病学研究[J]. 中国急救医学, 2013, 33(1): 8-12.

[2] Delano M J, Ward P A. Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? [J]. J Clin Invest, 2016, 126(1): 23-31.

[3] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.

[4] 刘承远, 陈海鸣. IL-10、TNF-α 在脓毒症小鼠小肠黏膜中的表达及其意义[J]. 江西医药, 2015, 50(11): 1173-1175.

[5] Hsiao H B, Chou A H, Lin S I, et al. Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to the release of gangster-associated molecular patterns[J]. J Virol, 2014, 88(20): 11658-11670.

[6] Sardi C, Luchini P, Emanuelli A, et al. Three months of Western diet induces small intestinal mucosa alteration in TLR KO mice[J]. Microsc Res Tech, 2017, 80(6): 563-569.

- [7] 宋慧荣,罗亚敏,李冉,等. 桃核承气汤与桃仁承气汤差异探析[J]. 河南中医,2018,38(6):824-827.
- [8] 张磊. 加味桃仁承气汤治疗胸腰椎压缩性骨折后腹胀便秘的疗效观察[J]. 成都中医药大学学报,2014,37(3):82-83,115.
- [9] 胡玉杰. 桃仁承气汤治疗急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2014.
- [10] 任钰鑫,刘小军,连永红,等. 清瘟败毒饮合凉膈散加减辅助血必净注射液治疗脓毒症热毒炽盛证的多靶点效应[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):189-194.
- [11] 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.
- [12] Hubbard W J, Choudhry M, Schwacha M G, et al. Cecal ligation and puncture[J]. Shock, 2005, 24(1):52-57.
- [13] Buras J A, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis; setting the stage[J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(10):854-865.
- [14] KUO C K, LI W J, Mauck R L, et al. Cartilage tissue engineering: its potential and uses[J]. Curr Opin Rheumatol, 2006, 18(1):64-73.
- [15] 沈海平,周云,何苏丽,等. 新加黄龙汤对脓毒症休克患者胃肠道功能的临床研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6):187-189.
- [16] 张俊亮,曾其毅. 脓毒症与胃肠道功能损伤的关系及研究进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(17):2925-2927.
- [17] LI Z, ZHANG X, ZHOU H, et al. Exogenous s-nitrosoglutathione attenuates inflammatory response and intestinal epithelial barrier injury in endotoxemic rats[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2016, 80(6):977-986.
- [18] 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.
- [19] 王桂华,兰涛,吴向军,等. 桃仁提取物对急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能及炎性反应的影响[J]. 中药材, 2014, 37(12):2267-2270.
- [20] 兰涛,李志娟,付立平,等. 不同剂量桃仁提取物对急性胰腺炎大鼠肠道黏膜屏障功能及免疫功能的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 11(3):339-343,353.
- [21] 郜智慧,王倩青. 加味承气汤对保留盆腔自主神经的广泛性子宫切除术后胃肠功能恢复的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4):220-222.
- [22] HUANG C, PAN L, LIN F, et al. Monoclonal antibody against Toll-like receptor 4 attenuates ventilator-induced lung injury in rats by inhibiting MyD88 and NF- κ B dependent signaling[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(3):693-700.
- [23] YAN Y, LU B, LI P, et al. NOD receptor and TLR9 modulation in severe acute pancreatitis-induced intestinal injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6):8471-8480.
- [24] Latorre E, Layunta E, Grasa L, et al. Intestinal serotonin transporter inhibition by Toll-like receptor 2 activation a feedback modulation[J]. PLoS One, 2016, 11(12):169303-169312.
- [25] HOU Y, LU X, ZHANG Y. IRAK inhibitor protects the intestinal tract of necrotizing enterocolitis by inhibiting the Toll-Like receptor (TLR) inflammatory signaling pathway in rats[J]. Med Sci Monit, 2018, 24(5):3366-3373.
- [26] 苏伟,欧娅,杨自力,等. Toll样受体9信号通路在重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障功能障碍中的作用[J]. 广东医学, 2014, 35(23):3609-3612.

[责任编辑 孙丛丛]