

栀子金花汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障及相关炎症因子的影响

孙素灵¹, 姜逸², 陆雄², 吴雪卿³, 杨孙虎¹, 王鸣^{1*}

(1. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院普外科, 上海 200082; 2. 上海中医药大学科技实验中心细胞生物与组织病理学实验室, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: 目的 探究栀子金花汤对 CLP 致脓毒症大鼠模型肠黏膜屏障损伤和炎症因子的影响。方法 大鼠随机分为假手术组、模型组和栀子金花汤低、中、高剂量组 (6、18、36 g/kg), 采用 CLP 盲肠结扎穿孔技术建立脓毒症大鼠模型, 造模后给予相应剂量药物干预 3 d。给药结束后, HE 染色观察回肠组织病理结构变化, 透射电子显微镜下观察回肠上皮细胞和相关连接结构, ELISA 法检测血清和局部回肠段相关炎症因子水平。结果 与正常组比较, 模型组大鼠脓毒症评分升高 ($P<0.01$), 肠绒毛排列紊乱, 黏膜层出现炎症细胞浸润灶, 肠上皮细胞结构破坏, 微绒毛大量脱落, 连接结构疏松不明; 血清和回肠组织 DAO 水平和促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$), 血清抗炎因子 IL-10 水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 栀子金花汤中、高剂量组大鼠脓毒症评分降低 ($P<0.01$), 肠绒毛相对整齐, 炎症浸润灶面积减少, 肠上皮细胞结构相对完整, 连接结构相对正常, 血清 IL-1 β 水平降低 ($P<0.01$), 血清和回肠组织 DAO、TNF- α 水平降低 ($P<0.05, P<0.01$), IL-10 水平升高 ($P<0.05, P<0.01$)。结论 栀子金花汤可以通过维持肠黏膜屏障结构的完整性, 调节血清和局部回肠组织的炎症反应, 发挥对 CLP 致脓毒症大鼠的改善作用。

关键词: 栀子金花汤; 脓毒症; 肠屏障损伤; 炎症因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-0987-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.043

脓毒症是一种由感染引起宿主强烈炎症反应并伴发器官功能障碍的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[1]。尽管近年来脓毒症治疗有所进展, 但它仍然是重症监护病房患者最常见的死亡原因之一^[2-3]。一项全球性的脓毒症发生率和死亡率回顾性研究结果显示, 仅在 2017 年全球脓毒症患者人数累计 4 890 万例, 其中 1 100 万例患者报告死亡, 占全球死亡人数的 19.7%^[4]。肠道是参与和加重脓毒症的中心器官, 被认为是全身炎症反应综合征的“引擎”^[5]。尤其在盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 模型中, 肠屏障损伤导致肠道通透性增加, 促使管腔微生物和内毒素进入循环, 诱导多种炎症介质释放进一步加剧多器官功能衰竭^[6]。

栀子金花汤出自《医宗金鉴·杂病心法要诀》^[7], 在黄连解毒汤的基础上添加一味大黄, 对热毒内蕴患者有奇效。已有研究证实栀子金花汤可以通过调节炎症介质改善脓毒症腹腔感染^[8], 栀子金花汤保留灌肠在肛窦炎治疗过程中亦可发挥良好的抑菌作用^[9]。关于栀子金花汤对脓毒

症肠黏膜屏障的影响及机制探索不多, 本研究旨在为相关临床研究提供实验室依据。

1 材料

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠 30 只, 8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 购自杭州医学院 [实验动物生产许可证号 SCXK (浙) 2019-0002], 饲养于上海中医药大学附属市中西医结合医院实验动物中心, 温度 (25 ± 2) °C, 相对湿度 (60 ± 10)%, 光照日夜循环各 12 h, 自由饮食饮水, 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 药物 生栀子、黄芩 (批号 20230421、2023030707, 上海养和堂中药饮片有限公司); 黄连 (批号 220809, 上海青浦中药饮片有限公司); 黄柏 (批号 230508, 上海虹桥中药饮片有限公司); 大黄 (批号 20221117, 上海万仕诚药业有限公司), 药材均购自上海市中西医结合医院中药房, 经专家鉴定为正品。栀子金花汤由栀子 15 g、黄连 15 g、黄芩 10 g、黄柏 10 g、大黄 3 g 组成, 药材加蒸馏水 1 L 浸泡 30 min, 武火烧开转文火煎煮 30 min, 过滤, 滤渣

收稿日期: 2023-10-11

基金项目: 上海市虹口区卫生健康委员会医学科研课题 (虹卫 2302-04); 上海市虹口区卫生健康委员会中医药科研课题 (HKQ-ZYY-2020-08); 上海市虹口区卫生健康委员会临床重点扶持专科建设项目 (HKZK2020A03); 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院青年人才培养计划项目 (RCPY0052)

作者简介: 孙素灵 (1992—), 女, 硕士, 主治医师, 从事中医药在外科相关疾病及围手术期的研究。Tel: 15216676202, E-mail: hbssl2016@126.com

*通信作者: 王鸣 (1971—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事中医药在外科相关疾病及围手术期的研究。Tel: 13501844713, E-mail: doc_wa@126.com

加蒸馏水 1 L 复煎 30 min, 过滤, 合并 2 次滤液, 加热浓缩至生药量 3.6 g/mL。根据人与大鼠体表面积计算法换算, 桃子金花汤低、中、高剂量组为 6、18、36 g/kg, 每天相当于临床剂量的 (1、3、6 倍)。

1.3 试剂 TNF- α 、IL-10、IL-1 β 、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (批号 230714204R、230714229R、230714225R、230714245R, 江苏酶免实业有限公司); 伊红和苏木素染液 (批号 220602, 上海虹桥乐翔医用试剂技术有限公司); 25% 戊二醛水溶液、乙醇 (批号 20200109、20210728, 国药集团化学试剂有限公司); 铁酸 [批号 10194309, 阿法埃莎 (中国) 化学有限公司]; 环氧树脂 E-51 (昆山绿循电子材料有限公司); 异弗烷 (批号 20230403, 青岛欧博方医药科技有限公司)。

1.4 仪器 Axio imager 2 正置荧光显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); Tecnai G2 spirit 透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); Tianshi 988 洗板机 (北京天石天力医疗器械技术开发中心); Rayto RT-6100 酶标仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司); 电热恒温培养箱 (武汉一恒苏净科学仪器有限公司); TG16W 微量高速离心机 (长沙湘智离心机仪器有限公司); TGL16M 台式高速冷冻离心机 (上海卢湘仪离心机仪器有限公司); HT-111B 恒温摇床 (上海赫田科学仪器有限公司); EasyWeLL 系列 JY98-IIIN 细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将大鼠随机分为假手术组、模型组和桃子金花汤高、中、低剂量组, 每组 6 只。参考文献 [10] 报道, 采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 技术建立脓毒症大鼠模型。大鼠吸入异氟烷麻醉, 麻醉后固定于鼠板, 继续予以异氟烷维持。大鼠腹部剃毛备皮, 用 75% 乙醇消毒, 用手术剪刀从大鼠腹部正中开口 (倒 T 型) 暴露腹腔, 将盲肠轻轻拉出并分离肠系膜, 在距盲肠末端 1 cm 处用 3-0 号无菌手术缝线结扎, 然后用 22G 针头在盲肠结扎远端中央区域贯通穿刺 2 次 (注意避开血管), 轻微挤压盲肠, 确保穿刺点通畅, 随后将肠段送回腹腔, 用 6-0 号无菌手术缝线关闭腹膜及腹肌, 最后缝合皮肤; 假手术组除不进行盲肠结扎与穿孔外, 其余手术操作同模型组。手术结束后, 大鼠于鼠笼内观察 1 h 后放回动物饲养中心继续饲养。其中模型组死亡 2 只。造模后次日, 桃子金花汤高、中、低剂量组灌胃给予 6、18、36 g/kg 药液, 假手术组和模型组灌胃给予生理盐水, 每天 2 次, 每次间隔 12 h, 连续给药 3 d^[11]。

2.2 脓毒症模型评判 给药结束后, 参考文献 [12] 报道, 从外观、自主意识、自主活动、对刺激的反应、眼睛是否有分泌物、呼吸频率、呼吸质量 7 个指标进行评价, 每个指标分成 5 个等级 (0~4 分), 总分为 7 个指标的分数相加, 最高分为 28 分, 若大鼠出现死亡则记为最高分。评分标准见表 1。

2.3 HE 染色观察回肠组织病理变化 末次给药后禁食不禁水 12 h, 次日采用异氟烷麻醉大鼠后, 取血 5 mL, 并取回肠部位。取部分回肠于 10% 中性甲醛中固定, 乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋, 切片, 依次使用二甲苯、乙醇脱蜡, 苏木素染核, 盐酸乙醇分化, 伊红染胞浆, 自然晾干后树脂封片, 于光学显微镜下观察回肠组织病理结构变化。

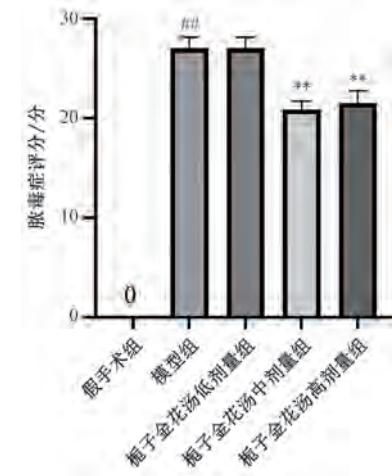
2.4 透射电镜观察回肠组织超微结构 取部分回肠段固定于 2.5% 戊二醛中, 0.1 mol/L PBS 充分浸洗 3 次后, 依次使用 1% 铁酸后固定, 梯度乙醇、丙酮脱水, 采用环氧树脂 618 浸透固化, 超薄切片 70 nm, 使用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色, 蒸馏水洗 3 次, 自然晾干后于透射电镜下观察超微结构。

2.5 ELISA 法检测血清及回肠组织 DAO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平 血液样本室温放置 2 h, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 备用; 取适量回肠组织, 加入 0.1 mol/L PBS 破碎匀浆, 离心取上清, 蛋白定量后备用。按照相应试剂盒说明书检测血清及回肠组织 DAO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平。

2.6 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行处理, 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, 2 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桃子金花汤对脓毒症大鼠脓毒症评分的影响 如图 1 所示, 与假手术组比较, 模型组脓毒症评分升高 ($P < 0.01$), 平均 26 分, 提示造模成功; 与模型组比较, 桃子金花汤中、高剂量组脓毒症评分降低 ($P < 0.01$)。



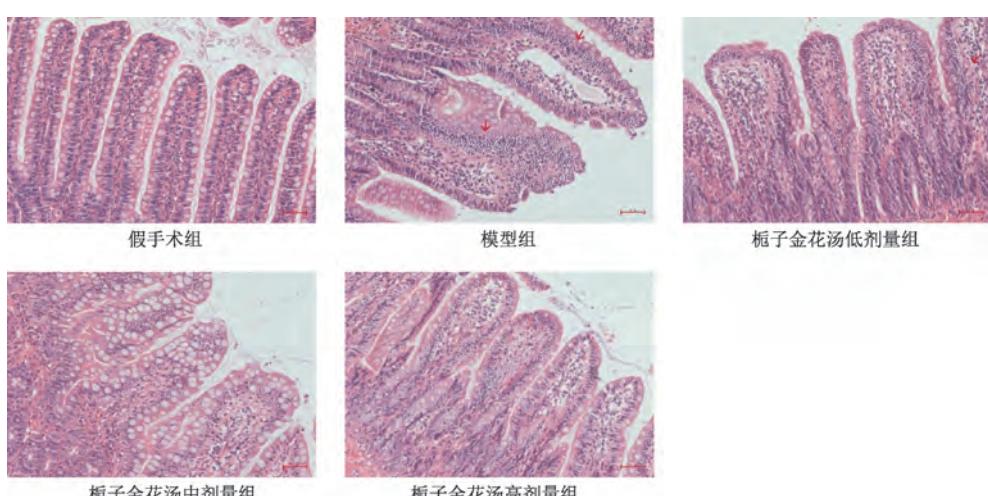
注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠脓毒症评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=4\sim6$)

3.2 桃子金花汤对脓毒症大鼠回肠组织病理形态的影响 如图 2 所示, 假手术组大鼠回肠各层结构完整, 肠绒毛排列整齐, 未见炎症细胞浸润; 模型组大鼠回肠结构破坏严重, 肠绒毛排列紊乱, 部分肠上皮层脱落, 黏膜层可见大量炎性细胞聚集, 以中性粒细胞为主; 与模型组比较, 桃

表1 脓毒症模型评分标准

指标	描述	评分/分
外观	毛发光滑	0
	部分毛发竖毛	1
	背部全部毛发竖毛	2
	毛发可能竖立也可能不竖立,蓬松,凌乱	3
	毛发可能竖立也可能不竖立,憔悴	4
自主意识	活跃状态	0
	活动状态。不可直立	1
	活动明显迟缓。仍然可以行走	2
	活动受损。挑动后才活动,行动震颤	3
	活动严重受损。挑衅后仍静止不动,可能会颤抖	4
自主活动	活动正常。摄食,饮水,攀爬,行走,打斗等	0
	活动减少。只在笼底活动	1
	活动显著减少。静止,偶尔探索活动	2
	无活动。静止不动	3
	无活动。静止不动,颤抖(特别是后肢)	4
对过激的反应	对听觉刺激或触摸立即做出反应	0
	对听觉刺激反应缓慢或无反应,对触摸有强烈反应(移动以逃避)	1
	对听觉刺激无反应,对触摸有中等反应(移动几步)	2
	对听觉刺激无反应,对触摸有轻微反应(不移动)	3
	对听觉刺激无反应,对触摸几乎无反应,推倒后不能翻身	4
眼睛	睁开	0
	不到半闭合,可能有分泌	1
	半闭合,可能有分泌	2
	半闭合或更甚,可能有分泌	3
呼吸频率	全闭合或者有分泌物(浑浊)	4
	正常,快速呼吸	0
	轻微减少(肉眼无法计数)	1
	中度减少(肉眼勉强能计数)	2
	严重减少(肉眼能轻松计数,呼吸间隔0.5 s)	3
呼吸质量	极度减少(呼吸间限>1 s)	4
	正常	0
	间断性呼吸困难	1
	呼吸困难,不喘气	2
	呼吸困难,间断性喘气	3
	喘气	4



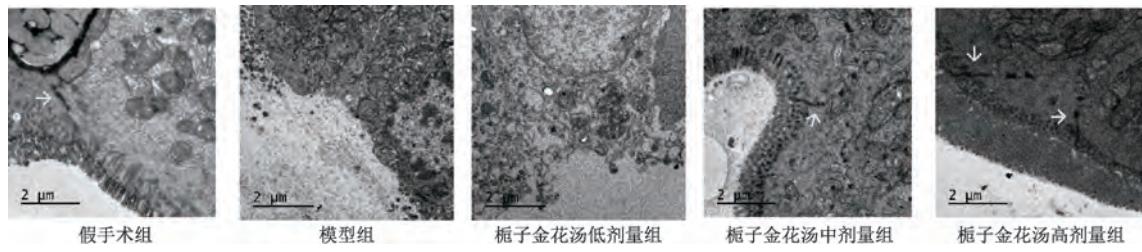
注:红色箭头指示炎性细胞浸润。

图2 各组大鼠回肠组织HE染色($\times 200$)

子金花汤各剂量组回肠结构基本完整，少量肠上皮细胞脱落，低剂量组黏膜层炎性细胞浸润面积减少，中、高剂量组炎性细胞数量偶见且优于低剂量组。

3.3 桃子金花汤对脓毒症大鼠回肠组织黏膜屏障超微结构的影响 如图3所示，假手术组大鼠肠黏膜上皮细胞结构

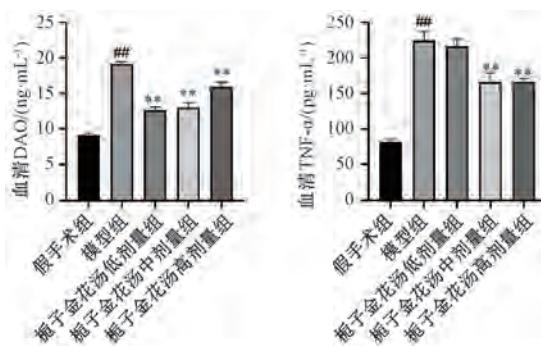
完整、边界清晰，细胞器、连接结构正常；与正常组比较，模型组大鼠肠上皮细胞结构破坏严重，表现为微绒毛大量脱落，连接结构疏松不明，细胞膜破碎；与模型组比较，桃子金花汤低剂量组无明显变化，中、高剂量组大鼠肠上皮细胞结构相对完整。



注：白色箭头指示连接结构。

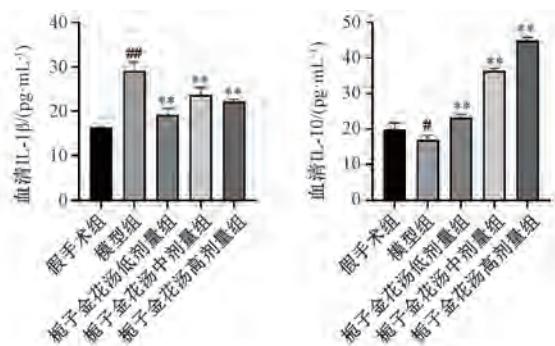
图3 各组大鼠回肠组织超微结构 ($\times 8200$)

3.4 桃子金花汤对脓毒症大鼠血清和回肠组织 DAO 及炎症因子水平的影响 如图4~5所示，与正常组比较，模型组大鼠血清和回肠组织 DAO 水平升高 ($P<0.01$)，提示肠黏膜细胞受损，回肠机械性屏障完整性破坏；促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P<0.01$)，而血清抗炎因子 IL-10 水平降低 ($P<0.05$)，回肠组织 IL-10 水平无明显变化



注：与假手术组比较，# $P<0.05$, ## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图4 各组大鼠血清 DAO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 6$)



注：与假手术组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠回肠组织 DAO、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=4\sim 6$)

4 讨论

脓毒症病情凶险，是重症监护病房患者常见死亡原因^[3]。随着现代医学发展脓毒症主流的抗感染治疗和器官功能支持技术获得了长足进步，但脓毒症的ICU监测和治

疗花费颇多，严重消耗公共医疗资源。疾病预后差，又拖累患者的后期生活质量。从个人家庭和社会层面，脓毒症都造成了巨大威胁。如何拓展脓毒症的治疗手段，降低脓毒症的重症死亡率，是各类临床或实验室研究所面临的严

苛挑战。脓毒症机制复杂尚未阐明，在 CLP 模型中盲肠创伤诱导免疫系统过度激活，炎症介质的触发、增强和放大效应是病理核心^[13]。

中医经典中并无“脓毒症”对应病名，诸医家普遍将其归入“伤寒”“温病”“疫病”范畴，可参见“异病同治”或“同病异治”理论予以治疗。《医宗金鉴》记载栀子金花汤主治痘中厥逆，因阳毒内攻，热极反寒，致热厥者，与脓毒症早期“毒热证机理相合”。栀子金花汤方组黄芩、黄连、黄柏、栀子、大黄，在黄连解毒汤基础上添加一味大黄形成。黄连解毒汤主治三焦火毒，且多项研究证实黄连解毒汤对脓毒症早期之毒热证有较好抗炎疗效，在中医临床应用于各类感染性疾病和胃肠道疾病等^[14-15]。此外大黄性味苦、寒，具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒的功效。现代药理研究证实大黄主要有效成分大黄素可以通过 TLR4 信号通路减轻 LPS 诱导的肠上皮细胞损伤，并上调缝隙连接蛋白 CX43 表达^[16]。本实验结果表明，栀子金花汤中、高剂量组可明显改善 CLP 模型大鼠回肠黏膜层炎症细胞浸润，减少中性粒细胞积聚，降低血清和局部回肠组织相关促炎因子 TNF-α、IL-1β 水平，升高抗炎因子 IL-10 水平，提示栀子金花汤对脓毒症大鼠具有较好的抗炎作用。

肠道作为脓毒症多器官功能障碍综合征关键一环，也是非肠源性脓毒症的靶目标，近乎半数的脓毒症患者伴严重肠道功能障碍^[17]。而肠上皮细胞作为肠道重要的生理屏障，一旦肠上皮完整性丧失，细菌和内毒素移位入血，由此诱导一系列级联反应造成多器官衰竭。DAO 是一种分布在人类和哺乳动物小肠黏膜上层绒毛中的高度活性的细胞内酶，在组胺和多种多胺代谢中起作用，其活性与黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关，能够反映肠道机械屏障的完整性和受损伤程度^[18]。本实验结果表明，栀子金花汤中、高剂量组肠绒毛排列相对整齐，结构相对完整；肠上皮超微结构损伤有所改善，肠上皮细胞结构相对完整，微绒毛脱落减少，连接结构相对紧密；血清和回肠组织 DAO 水平减少。

综上所述，栀子金花汤可以改善 CLP 致脓毒症大鼠模型血清和回肠组织炎症反应，通过保护肠上皮细胞及其连接结构维护肠屏障的完整性。本研究为后续栀子金花汤减轻炎症、保护肠屏障来改善脓毒症的深入机制研究提供前期基础。

参考文献：

- [1] 孙必强, 李美珍, 李果丽, 等. 大承气汤对肠源性脓毒症大鼠细胞因子 IL-6、IL-10、TNF-α 表达的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2019, 38(11): 146-148.
- [2] 王宇辉, 叶八宁, 吴婧, 等. 乌司他丁对脓毒血症大鼠肠黏膜屏障损伤的保护及其对 Wnt 信号通路的影响 [J]. 解剖学报, 2021, 52(2): 295-299.
- [3] Weng L, Xu Y, Yin P, et al. National incidence and mortality of hospitalized sepsis in China [J]. Crit Care, 2023, 27(1): 84.
- [4] Rudd K E, Johnson S C, Agesa K M, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. Lancet, 2020, 395(10219): 200-211.
- [5] Zhang X, Ning W, Gao G, et al. Bazedoxifene attenuates intestinal injury in sepsis by suppressing the NF-κB/NLRP3 signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2023, 947: 175681.
- [6] Ning W, Gao G, Zhou Y, et al. Calcitonin gene-related peptide ameliorates sepsis-induced intestinal injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 116: 109747.
- [7] 浙江中医学院. 医宗金鉴·杂病心法要诀白话解(第3版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [8] 闫雨蒙, 徐霄龙, 李博, 等. 2000—2022 年中医药治疗脓毒症研究文献的知识图谱可视化分析 [J]. 中医杂志, 2023, 64(16): 1700-1706.
- [9] Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis [J]. Intensive Care Med, 2020, 46(8): 1552-1562.
- [10] Seymour C W, Yende S, Scott M J, et al. Metabolomics in pneumonia and sepsis: an analysis of the GenIMS cohort study [J]. Intensive Care Med, 2013, 39(8): 1423-1434.
- [11] 刘阳, 刘委宏, 郝浩, 等. 半夏泻心汤对脓毒症大鼠肠道机械屏障的保护作用研究 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(1): 5-8.
- [12] Shrum B, Anantha R V, Xu S X, et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model [J]. BMC Res Notes, 2014, 7: 233.
- [13] 魏玉芬. 黄连解毒汤对 CLP 诱导的脓毒症大鼠的保护作用及其代谢组学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [14] 董颖, 刘保光, 许二平. 黄连解毒汤抗炎作用与临床应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 245-250.
- [15] 江桂通, 王腊, 田维毅. 基于“毒热论”谈黄连解毒汤对脓毒症的治疗机理 [J]. 基层中医药, 2022, 1(12): 38-43.
- [16] 余应嘉, 叶淑芳, 邓燕芳, 等. 大黄素甲醚对脂多糖诱导肠上皮细胞损伤自噬与缝隙连接蛋白的作用影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(18): 2032-2036.
- [17] 胡英山, 王晶晶, 高红梅. 脓毒症相关肠道功能障碍发病机制的研究进展 [J]. 天津医药, 2023, 51(3): 333-336.
- [18] 许雄. 瓜氨酸对脓毒症大鼠回肠黏膜组织学及血清二胺氧化酶、D-乳酸表达水平的影响 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.