

大承气汤对脓毒症大鼠肝脏 Toll 样受体 4 表达的影响

吴嘉骏, 赵冰, 苏文利, 王毅鑫, 朱文献

(上海中医药大学附属普陀医院急救中心急诊外科, 上海 200062)

【摘要】 目的 探讨不同剂量大承气汤对脓毒症大鼠肝脏 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达的影响。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、假手术组、模型组及大承气汤低、高剂量组, 每组 10 只。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备大鼠脓毒症模型。大承气汤低、高剂量组分别于术前 2 h、术后每日 2 次灌胃 5 ml/kg、10 ml/kg 大承气汤; 其他 3 组同时点灌胃 10 ml/kg 生理盐水。各组于术后 24 h 处死 5 只动物取肝组织, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 TLR4 mRNA 表达。另取 5 只大鼠于术后 2、6、12、48 h 取血, 测定血浆白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠肝组织中 TLR4 mRNA 表达及血浆 IL-6、TNF- α 含量均较假手术组升高 (均 $P < 0.01$)。以大承气汤干预后, 肝组织中 TLR4 mRNA 表达及血浆 IL-6、TNF- α 含量均较模型组下降, 且高剂量组降低程度更为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 大承气汤对脓毒症大鼠肝脏 TLR4 表达有抑制作用, 并存在一定的量效关系。

【关键词】 大承气汤; 脓毒症; Toll 样受体

中图分类号: R285.5; R256.4 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.05.011

Effect of Dachengqi decoction (大承气汤) on expression of Toll like receptor 4 in liver of septic rats WU Jia-jun, ZHAO Bing, SU Wen-li, WANG Yi-xin, ZHU Wen-xian. Emergency Department, Putuo District Center Hospital Affiliated to Shanghai Traditional Chinese Medicine University, Shanghai 200062, China
Corresponding author: SU Wen-li, Email: swlrchsy@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the influence of Dachengqi decoction (大承气汤) of different doses on liver expression of Toll like receptor 4 (TLR4) mRNA and inflammatory mediators in rats with abdominal sepsis. **Methods** Fifty healthy male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups: normal control, sham operation, model, Dachengqi decoction low and high dose groups (each, $n=10$). The model of caecum ligation perforation (CLP) was established by using Chaudry's method. The low and high dose Dachengqi decoction groups were treated by different doses of the decoction, 5 ml/kg and 10 ml/kg respectively at appropriate time by intra-gastric administration at 2 hours before CLP and twice a day after CLP, and in other three groups, intra-gastric administration with the same amount of normal saline at the same time was given. After CLP for 24 hours, 5 animals in each group were sacrificed and hepatic samples were taken and analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR) to show the expression of TLR4 mRNA. Blood samples were taken from another 5 rats in each group at 2, 6, 12, 48 hours after CLP, in which interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were determined. **Results** Hepatic expression of TLR4 mRNA and the blood levels of IL-6 and TNF- α in model group were higher than those in sham operation group (all $P < 0.01$). After intervention by different doses of Dachengqi decoction, the hepatic expression of TLR4 mRNA and blood levels of IL-6 and TNF- α were lower than those in model group, and in the high-dose Dachengqi decoction group, they were obviously lower than those in low-dose Dachengqi decoction group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Dachengqi decoction inhibits the hepatic expression of TLR4 in rats with abdominal sepsis, and the inhibition acts in a way of dose-dependence.

【Key words】 Dachengqi decoction; Sepsis; Toll like receptor-4

近年来研究发现, 一族被称为 Toll 样受体 (TLR) 的跨膜蛋白作为受体分子参与了细菌的致病过程^[1], 其家族成员 TLR4 可与革兰阴性 (G^-) 菌的脂多糖 (LPS) 及部分厌氧菌结合, 激活下游信号转导途径, 使机体产生免疫应答, 参与了脓毒症的发生^[2]。肝脏是清除内毒素的重要器官, 也是首当其冲的受损器官。本研究中探讨大承气汤治疗脓毒症与 TLR4 信号转导的关系及对炎症通路下游白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响, 为

揭示大承气汤治疗脓毒症的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂: 健康雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 200~250 g, 购自上海西普尔毕凯实验动物中心 [许可证号: SXK (沪) 2008-0008]。总 RNA 抽提试剂、RNA 逆转录试剂盒和荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司; 大鼠三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)、TLR4 基因引物及探针由上海闪晶生物公司合成; 大鼠 IL-6 和 TNF- α 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒购自上海博谷生物技术有限公司。

1.2 动物模型制作及分组: 按随机数字表法将大鼠

通信作者: 苏文利, Email: swlrchsy@sohu.com

作者简介: 吴嘉骏 (1979-), 男 (汉族), 浙江省人, 医学硕士, 医师, 现在上海市第十人民医院急危重病科工作。

分成正常对照组、假手术组、模型组及大承气汤低、高剂量组,每组 10 只。正常对照组不做手术处理;假手术组麻醉后仅开腹轻扰肠管后关腹;模型组参照 Chaudry 等^[3]的方法,采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型。大承气汤低、高剂量组于术前 2 h 分别灌胃 5 ml/kg、10 ml/kg 大承气汤〔大黄 45 g(后下)、厚朴 45 g、枳实 45 g、芒硝 27 g,煎煮浓缩到 162 ml〕1 次,术后每日 2 次;其他 3 组同时间点灌胃 10 ml/kg 生理盐水。每组随机抽取 5 只大鼠术后 2、6、12、48 h 经右股动脉取血备用;余 5 只大鼠术后 24 h 处死,取肝脏标本,液氮中保存备用。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血浆 IL-6、TNF-α 检测:分别于各时间点采血 1 ml,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,离心取上清液,-70 ℃ 保存备用。IL-6、TNF-α 测定按试剂盒说明书操作,检测标本的吸光度(A)值。

1.3.2 肝脏 TLR4 mRNA 测定:以 TRIzol 法提取总 RNA,将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,由检测仪自带软件完成数据分析。每个样品的靶基因相对 mRNA 表达水平用公式计算。

$$\text{mRNA} = 2^{-\Delta\text{Ct}}$$

ΔCt=靶基因 Ct 值-GAPDH Ct 值

1.4 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验、SNK-*q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 IL-6 水平(表 1):各实验组血浆 IL-6 浓度峰值出现在术后 12 h。术后 2 h 各实验组 IL-6 浓度比较差异无统计学意义(均 *P*>0.05);术后 6、12、24 h 模型组 IL-6 浓度较假手术组显著升高(均 *P*<0.01);大承气汤低、高剂量组 IL-6 浓度均较模型组显著降低且高剂量组术后 6 h、12 h 较低剂量组降低更明显(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

2.2 血浆 TNF-α 水平(表 1):各实验组的 TNF-α 浓度变化趋势基本相同,峰值均出现在术后 2 h。

术后 2、6、12、24 h 模型组 TNF-α 较假手术组明显升高(均 *P*<0.01);大承气汤低、高剂量组较模型组显著降低且高剂量组降低更为显著(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

2.3 肝组织 TLR4 mRNA 的表达(表 2):TLR4 mRNA 在正常对照组几乎无表达;术后 24 h 假手术组大鼠肝脏有少量 TLR4 mRNA 表达;模型组 TLR4 mRNA 表达量较假手术组明显增多(*P*<0.01);大承气汤低、高剂量组肝组织 TLR4 mRNA 表达均较模型组显著下调,且以高剂量组更为显著(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

表 2 各组大鼠肝组织 TLR4 mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TLR4 mRNA($\times 10^{-3}$)
正常对照组	5	0
假手术组	5	3.84±0.68
模型组	5	18.54±1.72 ^c
大承气汤低剂量组	5	10.95±2.38 ^{ac}
大承气汤高剂量组	5	7.44±2.24 ^{adf}

注:与假手术组比较,^a*P*<0.01;与模型组比较,^c*P*<0.01,

^e*P*<0.01;与大承气汤低剂量组比较,^f*P*<0.05

3 讨论

近年来,国内学者在采用中西医结合方法防治脓毒症方面取得了一定的成绩,以大承气汤为代表的通里攻下法是防治脓毒症的重要方法之一。大承气汤下瘀血、荡涤肠胃、推陈致新等功效不仅能改善胃肠道缺血,减轻肝细胞损伤,而且能减少内毒素池和菌毒移位,达到减少炎症介质释放的目的,具有调节促炎/抗炎平衡及免疫功能的作用,已广泛用于脓毒症患者的治疗并取得了显著疗效,但其治疗脓毒症的分子机制尚未完全清楚。

TLR4 在识别细菌 LPS 及其介导的炎症反应信号转导中起重要作用。肝脏是清除内毒素的重要器官,也是在感染致多器官功能障碍综合征(MODS)中首当其冲受损伤的器官^[4]。目前的研究表明,G⁻菌释放入血的 LPS 与单核/巨噬细胞表面的 CD14 结合,经 CD14 对 LPS 的集聚作用而活化

表 1 各组大鼠不同时间点血浆 IL-6 和 TNF-α 浓度变化($\bar{x}\pm s$,*n*=5)

组别	IL-6(μg/L)				TNF-α(μg/L)			
	2 h	6 h	12 h	24 h	2 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	2.21±0.45	2.34±0.37	2.55±0.87	3.11±0.62	0.04±0.25	0.03±0.09	0.02±0.12	0.04±0.11
假手术组	52.13±7.21 ^a	53.91±6.99 ^a	53.75±5.76 ^a	53.31±6.01 ^a	4.40±1.21 ^a	3.91±1.99 ^a	3.75±1.76 ^a	3.31±2.01 ^a
模型组	58.35±6.54 ^a	700.44±34.43 ^{ac}	625.96±27.56 ^{ac}	319.51±9.17 ^{ac}	34.13±2.54 ^{ac}	28.44±4.43 ^{ac}	25.96±3.56 ^{ac}	19.51±3.17 ^{ac}
大承气汤低剂量组	54.76±5.98 ^a	455.64±21.21 ^{acd}	377.18±16.93 ^{acd}	194.71±9.81 ^{acd}	14.76±3.98 ^{acd}	11.64±4.21 ^{acd}	7.18±2.93 ^{acd}	4.71±1.81 ^{abd}
大承气汤高剂量组	57.11±5.55 ^a	316.71±16.96 ^{acef}	255.54±7.72 ^{acef}	171.16±9.66 ^{acd}	7.11±2.55 ^{abdg}	6.71±1.96 ^{abdg}	5.54±1.22 ^{abdf}	4.16±2.66 ^{abdf}

注:与正常对照组比较,^a*P*<0.01;与假手术组比较,^b*P*<0.05,^c*P*<0.01;与模型组比较,^d*P*<0.05,^e*P*<0.01;与大承气汤低剂量组比较,^f*P*<0.01,^f*P*<0.05

TLR4。活化的 TLR4 通过介导蛋白酪氨酸激酶和 p38MAPK 的激活而活化转录因子〔核转录因子- κ B (NF- κ B)、活化蛋白-1 (AP-1)、活化转录因子 2 (ATF2)等〕,促进效应细胞表达合成 TNF- α 、IL-1、IL-6 及 IL-8 等炎症因子^[5],引起一系列病理生理变化,其中 TNF- α 在全身炎症反应综合征(SIRS)的发生中起着重要作用。本研究显示:正常对照组大鼠血浆 TNF- α 含量很低,假手术组和模型组大鼠血浆 TNF- α 水平在术后 2 h 达到峰值,其后有逐步下降趋势,符合 TNF- α 作为早期高表达的炎症介质,也可与脓毒症大鼠制模后短时间内出现体温升高、寒战等情况相联系;在 2、6、12 h 模型组大鼠血浆 TNF- α 含量较假手术组显著升高,提示 TNF- α 在脓毒症发生后的 12 h 内均处于高表达状态。TNF- α 在脓毒症发生过程中扮演着重要角色。这与国内外研究报道的结果^[6]一致。同时,TNF- α 可诱发 IL-1、IL-6、IL-8 的生成,还可激活巨噬细胞、白细胞,促进血小板激活因子、一氧化氮(NO)、前列腺素和白细胞三烯等的产生,它们相互作用引起炎症介质的过度释放,产生炎症因子的“瀑布”反应^[7],对机体造成严重影响。

在目前使用大剂量抗生素以及糖皮质激素能带来很大副作用的情况下,中医药或是中西医结合治疗严重的感染性疾病,是一个较好的补充和方法,也是目前的研究热点。脓毒症时微循环障碍,血液瘀滞、血流不畅等是其重要的病理生理变化,为应用活血化瘀法提供了依据,其中以血必净为代表,对改善微循环障碍,减轻缺血/再灌注损伤和内毒素损伤,保护组织器官具有显著作用^[8];采用栀子金花汤、血必净注射液等治疗腹腔感染脓毒症大鼠,可以有效降低 TLR4 下游炎症介质的表达^[9-10];黄连解毒汤能阻断 TLR4 高表达,阻断 TLR4 胞内信号转导的 MyD88 依赖和非依赖两条途径^[11]。大承气汤对控制炎症“瀑布”的形成也有一定作用,有研究显示大承气汤中的中药颗粒可以和 G⁻菌感染时产生的 LPS 结合,从而减少 LPS 对靶细胞的刺激,减少 TLR4 的表达,抑制炎症“瀑布”形成^[12]。但也有学者认为,一些细胞因子如 TNF- α 可刺激 TLR4 的表达量增加,TLR4 与其下游的 TNF- α 表达存在一个“正反馈环”^[13]。有研究发现 TNF- α mRNA 表达增高和 TLR4 mRNA 表达增高在脓毒症发病机制中起重要作用^[14-15],TLR4 在体内广泛分布,有学者通过检测内毒素血症模型动物骨骼相关基因表达变化,证实内毒素血症中骨骼 TLR mRNA 表达量显著增加^[16];有学者观察脓毒症大鼠

心肌细胞凋亡的变化及 TLR4、TNF- α 及 IL-6 基因表达的关系同样提示这种“正反馈环”^[17]。某些药物可能是作用于这一循环才导致 TLR4 的下调。本实验中应用不同剂量大承气汤预处理脓毒症模型大鼠,观察其对 TLR4 mRNA 以及炎症通路下游 IL-6、TNF- α 的影响。结果显示:大承气汤对脓毒症大鼠肝组织 TLR4 mRNA 表达有显著抑制作用;同时可以降低其下游炎症介质 IL-6、TNF- α 在外周血中的含量,且抑制作用呈剂量依赖性,其是否能直接干预 TLR4 将是今后的研究方向。

参考文献

- [1] Mansell A, Brint E, Gould JA, et al. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF- κ B activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem*, 2004, 279(36):37227-37230.
- [2] Byrd-Leifer CA, Block EF, Takeda K, et al. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of taxol. *Eur J Immunol*, 2001, 31(8):2448-2457.
- [3] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*, 1979, 85(2):205-211.
- [4] Peng Y, Gong JP, Liu CA, et al. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(19):2890-2893.
- [5] Uesugi T, Froh M, Arteel GE, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*, 2001, 34(1):101-108.
- [6] 鄢小建, 姚咏明. 细菌内毒素受体研究新进展. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(16):375-378.
- [7] 姚咏明, 盛志勇, 于燕, 等. 创伤后肠源性内毒素血症对肿瘤坏死因子产生的影响. *中华外科杂志*, 1997, 35(7):446-447.
- [8] 雪琳. SIRS 和 MODS 防治新对策的实验研究——血必净的药效学观察. *中国危重病急救医学*, 1997, 9(12):720-722.
- [9] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子- α 及凝血功能的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2):104-107.
- [10] 王鸣, 舒志军, 张胜华, 等. 栀子金花汤对腹腔感染脓毒症大鼠炎症介质的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(3):169-172.
- [11] 蒋建新, 朱佩芳, 王正国. 内毒素基因与 Toll 样受体 4 基因致病机制的研究进展. *中华创伤杂志*, 2002, 18(12):765-767.
- [12] 武若君, 李泰, 刘京涛, 等. 大承气汤灌肠在多器官功能障碍综合征中的临床应用. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(2):76-77.
- [13] 鄢小建, 姚咏明, 董宁, 等. 脓毒症大鼠多器官 Toll 样受体 4 基因表达的改变及意义. *中华肝胆外科杂志*, 2005, 11(1):31-34.
- [14] 刘英, 徐陶, 雷贤英. 乌司他丁对严重脓毒症患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 表达的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(9):560-561.
- [15] 杨卫国, 李成荣, 何颜霞, 等. 小儿脓毒症 Toll 样受体信号途径转导分子及调节因子的变化研究. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(9):561-564.
- [16] 赵子瑜, 杨京, 苏楠, 等. 内毒素血症小鼠骨髓 Toll 样受体 4 基因的变化. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(1):13-16.
- [17] 尹海燕, 韦建瑞, 张锐, 等. 脓毒症大鼠心肌细胞 Toll 样受体 4 和炎症因子基因表达的变化及作用机制. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(8):488-491.

(收稿日期:2010-07-11)

(本文编辑:李银平)