

中药方剂白头翁汤抗细菌内毒素的作用研究

胡屹屹¹ 穆祥² 胡元亮³

(1. 江苏省农业科学院 兽医研究所,南京 210014;

2. 北京农学院 兽医学中医药北京市重点实验室,北京 102206;

3. 南京农业大学 动物医学院,南京 210095)

摘要 探讨中药方剂白头翁汤对细菌内毒素(LPS)的治疗和预防作用,取中药饮片按常规方法煎制成生药质量浓度为1 g/mL的白头翁汤液。分高(1 g/mL)、中(0.5 g/mL)、低(0.1 g/mL)3个剂量给小鼠灌胃,每天1次,连续5 d。第1次给药前3 h和最后1次给药后3 h分别腹腔注射LPS(9 mg/kg)。记录LPS攻毒后48 h内小鼠的死亡率,同时测定各组小鼠的体重、血液指标及器官指数。结果显示,预防高剂量组的小鼠死亡率显著低于LPS对照组,差异极显著,治疗高剂量组和预防中剂量组显著低于LPS对照组,差异显著。治疗高剂量组和预防高剂量组的小鼠体重在24 h时显著高于LPS对照组,差异显著。治疗高剂量组的小鼠白细胞数目、血红蛋白浓度、平均血红蛋白和血小板升高数量较LPS对照组均差异显著。治疗高剂量组小鼠的肝脏、脾脏和肠管指数显著低于LPS对照组,均差异显著。表明中药方剂白头翁汤具有明显的抗大肠杆菌内毒素作用。

关键词 白头翁汤; 小鼠; 内毒素; 死亡率; 血液指标; 脏器指数

中图分类号 S 853.74

文章编号 1007-4333(2011)06-0132-05

文献标志码 A

Study on the antiendotoxin action of Pulsatillae Decoction

HU Yi-yi¹, MU Xiang², HU Yuan-liang³

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agricultural, Beijing 102206, China;

3. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract The purpose of this research was to investigate the antiendotoxin action of Pulsatillae Decoction (PD). PD was extracted and condensed into the decoction at the crude drug concentration of 1 g/mL. Mice in prevention groups were challenged with 9 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) by peritoneal injection after the treated with PD at three different concentrations (0.1, 0.5 and 1 g/mL) for 5 days, and differently, mice in treatment groups were challenged with 9 mg/kg LPS by peritoneal injection before treated with PD at three concentrations (0.1, 0.5 and 1 g/mL) for 5 days. The determined items and results were as follow: compared with LPS control group, the mortality were significantly decreased in the middle- and high-dose prevention groups and high-dose treatment group; the body weight were significantly increased in the high-dose treatment and prevention groups at 24 h; the WBC, HGB, MCH and PLT were significantly increased in the high-dose treatment group; the index of liver, spleen and intestinal were significantly decreased in the high-dose treatment group. It suggested PD had significant antiendotoxin effect.

Key words Pulsatillae Decoction; mice; LPS; mortality; blood index; organ index

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性杆菌生长或死亡时裂解出来的细胞壁脂多糖,经肠道吸收进入血液循环后,导致炎症级联瀑布反应,

可引发多器官功能衰竭甚至机体死亡^[1-3]。寻找安全高效的多靶点药物防治LPS综合症是当今兽医临床面临的棘手课题。清热解毒类中药用于防治感

收稿日期: 2011-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972209)

第一作者: 胡屹屹, 助理研究员, 博士, 主要从事中兽医学和动物药理学研究, E-mail: huyiyi6073@sina.com

染性疾病在人医和兽医临床都有广泛实践,并以确切的疗效和较低的毒副残留及抗药性而广受欢迎。白头翁汤由白头翁、黄连、黄柏和秦皮4味中药组成,具有抗菌消炎、燥湿除热、消肿祛腐、泻火止痢等作用,为清热解毒的代表方剂^[4];白头翁汤可显著降低LPS病理模型家兔血浆中LPS、前列腺素和5-羟色胺的含量,升高皮质醇的水平,与其他清热药合用时效果更佳^[5]。白头翁汤能明显抑制LPS诱导内皮细胞高水平分泌多种炎症因子^[6],抑制凋亡基因转录,增强细胞能量代谢^[7]。小鼠腹腔注射LPS可导致内毒素血症和器官功能衰竭已被公认^[8-9],本研究观察中药方剂白头翁汤对LPS攻毒小鼠的死亡率和多项临床病理指标变化的影响,旨在探讨白头翁汤抗内毒素的药理作用,为兽医临床应用白头翁汤防治细菌性疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及主要仪器

中药饮片购自北京同仁堂药店。取白头翁150 g、黄连60 g、黄柏120 g和秦皮120 g加10倍蒸馏水于圆底烧瓶中,浸泡1 h后加热回流1 h,趁热用纱布过滤。药渣再分别加8倍水和6倍水加热回流1 h;合并3次滤液,减压浓缩成生药浓度为1 g/mL的药液,4℃冰箱保存。LPS(O₅₅:B₅),购自Sigma公司(美国),批号:L-2880,使用前用无菌生理盐水溶解。

电子分析天平(型号FA1004),上海天平仪器厂;全自动血球计数仪(型号MEK-6318),日本光电公司。

1.2 动物分组

健康普通级昆明种小鼠180只,体重16~18 g,雌雄各半,购自中国科学院遗传与发育研究所实验动物中心。适应环境1周后,随机均分为9组,每组20只。预防和治疗的高、中、低剂量组分别灌服1.0、0.5和0.1 g/mL的白头翁汤,药物对照组灌服1 g/mL的白头翁汤,LPS对照组和空白对照组灌服等体积生理盐水,1 mL/次,每天1次,连续5 d;3个预防组于最后一次给药后3 h、3个治疗组于第1次给药前3 h和LPS对照组,按9 mg/kg腹腔注射LPS溶液攻毒。

1.3 测定指标

观察记录攻毒后48 h内,各组小鼠的临床表现和死亡率。于攻毒前(0 h)和攻毒后24和48 h用

电子天平称量各组小鼠的体重。于攻毒48 h后,取各组存活的小鼠5只,眼眶采血0.5 mL。用全自动血球计数仪进行血常规检查,项目包括白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血小板计数(PLT)、血红蛋白浓度(HGB)、平均血红蛋白量(MCH)和红细胞压积(HCT)。做完血像测定的小鼠进行病理解剖,分离心、肝、脾、肺、肾和肠,观察病变,并用电子天平称重,计算器官指数。

1.4 数据分析

各项检测指标结果采用平均数±标准差(Mean±SD)的形式表示,应用统计软件SPSS 17.0中的ANOVA(one way analysis of variance)法进行方差分析,比较LPS对照组与空白对照组、药物治疗组之间的差异显著性,比较空白对照组与药物对照组之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 死亡率的变化

LPS对照组小鼠于攻毒6 h后开始死亡,36 h后停止死亡,死亡高峰集中在12~24 h。临床症状表现为呼吸急促、浑身震颤、腹泻脱水、羞明流泪、精神沉郁、采食减少。空白对照组小鼠的死亡率为0,LPS对照组小鼠的死亡率高达55%,两者差异极显著($P<0.01$)。各组小鼠的死亡率见表1。其中预防高剂量的小鼠死亡率极显著($P<0.01$)低于LPS对照组,治疗高剂量组和预防中剂量组的小鼠死亡率显著($P<0.05$)低于LPS对照组。

2.2 体重的变化

LPS对照组小鼠攻毒后腹泻脱水,形体消瘦,24和48 h时的体重极显著低于空白对照组($P<0.01$)。治疗高剂量和预防高剂量组的小鼠体重在24 h时显著高于LPS对照组($P<0.05$),预防高剂量组在48 h时极显著高于LPS对照组($P<0.01$)(表2)。

2.3 血液指标的变化

LPS对照组小鼠攻毒48 h后白细胞数目、血红蛋白浓度和平均血红蛋白量均极显著低于空白对照组($P<0.01$),血小板数量显著低于空白对照组($P<0.05$)。与LPS对照组相比,治疗高剂量组的上述4项指标均显著升高($P<0.05$),预防中剂量组和高剂量组的白细胞数目和血红蛋白浓度显著升高($P<0.05$)(表3)。

表1 攻毒后各组小鼠死亡数及死亡率的动态变化

Table 1 Dynamic changes of mortality for the mice after LPS injection($n=20$)

组别	攻毒后时间/h				死亡总数	总死亡率/%
	0~12	12~24	24~36	36~48		
LPS对照	3	6	2	0	11	55
治疗低剂量	2	4	1	0	7	35
治疗中剂量	0	3	2	0	5	25
治疗高剂量	1	1	1	0	3	15 a
预防低剂量	1	3	1	0	5	25
预防中剂量	1	3	0	0	4	20 a
预防高剂量	1	1	0	0	2	10 b
药物对照	0	0	0	0	0	0 b
空白对照	0	0	0	0	0	0 b

注:与LPS对照组相比,a为 $P<0.05$,b为 $P<0.01$ 。

表2 攻毒后对各组小鼠体重的影响

Table 2 Effect of LPS injection on body weight of the mice($n=5$)

组别	攻毒后时间/h			g
	0	24	48	
LPS对照	23.92±0.61	22.23±0.65 d	22.94±0.91 d	
治疗低剂量	23.44±0.95	22.61±0.83	23.17±0.97	
治疗中剂量	23.26±0.91	23.26±1.04	23.61±1.05	
治疗高剂量	23.61±0.60	23.40±0.94 a	24.09±0.91	
预防低剂量	23.58±1.07	23.14±1.07	23.25±1.08	
预防中剂量	23.83±1.03	22.82±0.98	23.90±0.98	
预防高剂量	23.18±0.91	23.51±1.03 a	24.83±1.12 b	
药物对照	23.37±0.59	24.35±0.69	25.73±0.93	
空白对照	23.72±0.84	24.51±0.74	25.67±0.87	

注:与LPS对照组相比,a为 $P<0.05$,b为 $P<0.01$;与空白对照组相比,c为 $P<0.05$,d为 $P<0.01$ 。下表同。

表3 攻毒后各组小鼠血液指标的动态变化

Table 3 Dynamic changes of hemogram for the mice after LPS injection ($n=5$)

组别	白细胞计数/ ($10^3/\mu\text{L}$)	红细胞计数/ ($10^6/\mu\text{L}$)	血小板计数/ ($10^3/\mu\text{L}$)	血红蛋白质量 浓度/(g/dL)	平均血红蛋白量/ pg	红细胞压积/ %
LPS对照	5.04±1.90 d	8.24±0.57	218.0±37.54 c	9.32±1.68 d	14.16±0.76 d	43.12±3.83
治疗低剂量	5.44±1.88	8.26±0.80	282.0±68.98	10.16±1.98	14.46±0.55	42.48±3.99
治疗中剂量	6.22±1.53	7.86±1.04	298.2±56.29	10.44±2.18	14.72±0.76	40.04±3.40
治疗高剂量	7.70±1.76 a	8.24±0.89	313.8±68.63 a	12.54±2.13 a	15.10±0.79 a	44.76±4.05
预防低剂量	5.66±1.29	8.25±0.97	293.0±96.80	10.78±2.38	14.66±0.63	41.28±3.95
预防中剂量	7.38±1.38 a	7.90±0.86	303.2±69.96	12.10±2.46 a	15.04±0.78	38.56±3.26
预防高剂量	8.26±2.25 b	8.02±1.06	314.0±47.92 a	12.86±0.78 a	14.98±0.63	45.64±4.13
药物对照	8.50±2.05	8.17±0.70	335.4±74.59	13.52±1.44	15.58±0.59	46.70±5.09
空白对照	8.32±1.78	8.47±0.58	332.0±93.78	13.36±2.98	15.62±0.94	46.78±3.34

2.4 器官指数的变化

LPS 对照组的小鼠攻毒 48 h 后进行病理剖解, 肉眼可见肠壁扩张变薄, 肠管充血水肿, 呈半透明状, 肠内充满大量水样渗出液, 肝脏肿胀, 脾脏有出血点。肝脏、脾脏和肾脏指数均显著高于空白对照

组($P < 0.05$), 肠管指数极显著高于空白对照组($P < 0.01$)。治疗高剂量组小鼠的肝脏、脾脏和肠管指数显著低于 LPS 对照组($P < 0.05$), 预防中剂量组和高剂量组小鼠的肠管指数分别显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)低于 LPS 对照组(表 4)。

表 4 攻毒后小鼠器官指数的变化

Table 4 Changes of organ index for the mice after LPS injection ($n=5$)

组别	心	肝	脾	肺	肾	肠
LPS 对照	0.68±0.11	6.40±0.56 c	0.55±0.06 c	0.71±0.09	1.58±0.10 c	10.27±0.62 d
治疗低剂量	0.63±0.12	6.13±0.54	0.53±0.05	0.69±0.09	1.53±0.10	9.48±0.84
治疗中剂量	0.61±0.11	5.88±0.57	0.50±0.06	0.63±0.09	1.47±0.13	9.30±0.68
治疗高剂量	0.58±0.08	5.62±0.69 a	0.43±0.09 a	0.65±0.08	1.50±0.09	9.13±0.83 a
预防低剂量	0.64±0.11	6.30±0.64	0.50±0.09	0.70±0.09	1.57±0.08	9.38±0.62
预防中剂量	0.60±0.11	5.83±0.49	0.45±0.12	0.68±0.08	1.48±0.12	9.17±0.99 a
预防高剂量	0.59±0.10	5.50±0.47 a	0.46±0.10	0.63±0.07	1.44±0.10	8.86±0.99 b
药物对照	0.56±0.09	5.69±0.75	0.41±0.08	0.65±0.11	1.39±0.12	8.58±0.70
空白对照	0.58±0.07	5.58±0.48	0.43±0.05	0.64±0.11	1.43±0.13	8.46±0.57

3 讨论

1) LPS 是机体发热、腹泻、炎症、水肿、凝血和休克等综合症发生的病理基础^[10]。至今, 人们对 LPS 综合症的治疗仍无特效措施, 抗生素的应用虽然能够有效控制细菌感染, 但有增加 LPS 综合症的危险。LPS 抗体曾被寄予厚望, 但临床效果欠佳。其他措施包括抑制类脂 A 合成、阻断 LPS 信号转导等, 都还需要经过较长时间的实践证实^[11]。中药及其成分对 LPS 损伤的保护作用主要表现在: 直接清除 LPS 的中和作用, 对抗炎症因子分泌失调的拮抗作用和改善微循环血流性质的调节作用^[12]。

2) 白头翁汤出自张仲景的《伤寒论》, 组方严谨, 仅白头翁、黄连、黄柏和秦皮 4 味药, 功擅清阳明之湿热, 泄厥阴之郁火, 解血分之热毒, 治湿热之痢疾。现代药理学试验证明, 白头翁汤具有抗菌消炎、止泻镇静、免疫调节、修复溃疡等作用^[13]。当前用于防治动物肠道细菌性疾病的中药方剂, 大多数以白头翁汤为基础。本试验证明, 白头翁汤具有显著的抗 LPS 药理作用, 同时药物对照组与空白对照组相比, 各项检测指标无一出现显著性差异, 证明白头翁汤安全可靠。

3) 腹腔注射 LPS 6.0 mg/kg, 即可致小鼠全身

炎症反应综合症和多器官功能障碍综合征, 9.0 mg/kg 为小鼠半数致死量, 24.0 mg/kg 的 LPS 可导致小鼠全部死亡, 因此本试验将 LPS 攻毒剂量定为 9.0 mg/kg, 动物的死亡率和临床表现与文献报道基本一致^[14]。大肠杆菌内毒素对牛、猪、犬、猫和鸡的致死量分别为 0.025、5.000、4.000、15.000 和 50.000 mg/kg^[15]。

4) 本试验中小鼠在攻毒后出现呼吸急促、浑身震颤、采食减少和腹泻脱水等临床症状, 是因为 LPS 能够刺激儿茶酚胺的释放, 引起机体高糖和高脂血症^[16]; 小鼠代谢亢进, 能量大量消耗, 形体消瘦孱弱, 与空白对照组相比体重差异显著。攻毒小鼠体重减轻的另一方面原因来自于机体的腹泻与脱水, 白头翁汤可通过激活 TGF- β 1/Smad3 信号通路来发挥对炎症性肠病的损伤修复^[17]。可见白头翁汤在治疗细菌病的同时还能提高动物的生产性能和经济价值。

5) LPS 可以激活 Hageman 因子(凝血因子 XII), 启动内源性凝血途径^[18]。本试验中攻毒小鼠表现出血小板减少症, 可能是由于血小板消耗过多所致。LPS 还能抑制红细胞的生成, 它可以与红细胞膜结合形成复合抗原, 在补体参与下发生溶血反应^[19], 推测这是血红蛋白含量升高的原因。试验结

果表明,白头翁汤对 LPS 诱导的循环血白细胞、血小板和血红蛋白等数目含量的减少均有不同程度的恢复作用。此外,还可以通过下调细胞因子 ET-1 和 TXB₂ 来改善血管壁的通透性,预防血栓形成^[6,20]。

6)病理剖解显示,小鼠注射 LPS 后,肝脏、脾脏、肾脏体积和重量均有增加,尤以肠管最为明显。病理变化主要表现为充血、出血、水肿、渗出和炎性细胞浸润,甚至细胞坏死,这就可以解释内脏器官肿大的原因^[15]。作为治疗痢疾和肠炎的传统名方,白头翁汤对肠道的保护作用也最为显著,后期的分子生物学试验证明,白头翁汤可通过减少炎症因子的翻译,抑制凋亡基因的转录,加速机体蛋白的合成,增强细胞能量的代谢等方面来对抗 LPS 所产生的各项毒理效应^[7]。

4 结 论

在生存率、体重、包括血像和内脏病变等各项指标上,预防组的效果略胜于同剂量的治疗组,进一步证实了中药在未病先防方面的独特功效。综上,白头翁汤能够显著降低 LPS 小鼠的死亡率、改善体重减轻、白细胞和血小板数量减少、内脏肿大等病变,全方位多角度地拮抗 LPS 所致的病理损伤,保护机体恢复正常的生理状态,可为兽医临床细菌性疾病的防治,尤其是大肠杆菌病和肠炎,提供高效安全的药物。同时对白头翁汤方剂中有效成分的深入研究、系列制剂的开发,以及成分方剂的构建也具有重要的借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] Motawi T K, Darwish H A, Abd E I, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on endotoxin-induced cardiac stress in rats: A possible mechanism of protection[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2011, 25(2): 84-94
- [2] Han J H, McKenzie H C, McCutcheon L J, et al. Glucose and insulin dynamics associated with continuous rate infusion of dextrose solution or dextrose solution and insulin in healthy and endotoxin-exposed horses[J]. *Am J Vet Res*, 2011, 72(4): 522-529
- [3] Roh E, Lee H S, Kwak J A, et al. MD-2 as the target of nonlipid chalcone in the inhibition of endotoxin LPS-induced TLR4 activity[J]. *J Infect Dis*, 2011, 203(7): 1012-1020
- [4] 王瑞锋, 王雪. 白头翁汤的药理作用与临床应用[J]. *中医学报*, 2010, 25(147): 270-271
- [5] 宋崇顺, 王积福, 任映, 等. 白头翁汤与清热解毒药相配伍的实验研究[J]. *中国中医基础学杂志*, 1998, 4(3): 23-25
- [6] Hu Yiyi, Hu Yuanliang, Mu Xiang, et al. Pulsatilla decoction and its active ingredients inhibit secretion of NO, ET-1, TNF- α and IL-1 α in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2009, 27(5): 284-288
- [7] Hu Yiyi, Hu Yuanliang, Mu Xiang, et al. Study on the antiendotoxin action of pulsatillae decoction using an affymetrix rat genome array[J]. *Cellular Immunology*, 2009, 257(1/2): 32-37
- [8] 罗冲, 杨锡强, 李欣, 等. LPS 诱导的内毒素血症小鼠及重症联合免疫缺陷小鼠模型炎症反应的比较[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(1): 44-46
- [9] 何征宇, 朱也森, 姜虹. 间断腹腔注射脂多糖制作内毒素诱导的小鼠急性肺损伤肺纤维化动物模型[J]. *中国呼吸与危重病杂志*, 2010, 9(1): 76-80
- [10] Tsujikawa A, Kiryu J, Yamashiro K, et al. Interactions between blood cells and retinal endothelium in endotoxic spsis[J]. *Hypertension*, 2000, 36: 250-258
- [11] 王东宁, 张惟杰, 吴祥甫. 抗内毒素治疗的新策略[J]. *生物工程学报*, 2001, 17(3): 241
- [12] 张艺平, 韩鹏. 中药抗内毒素研究新进展[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2001, 8(2): 122
- [13] 孙俊颖, 彭新宇, 魏光伟, 等. 白头翁汤的药理作用研究进展[J]. *广东农业科学*, 2010, 12: 112-113
- [14] 魏育林, 李亚俊, 罗乃丹, 等. 脂多糖致小鼠 SIRS 和 MODS 的研究[J]. *急诊医学*, 2000, 9(6): 370-373
- [15] 赵玲, 李英伦. 内毒素对鸡的病理生理影响[J]. *中国家禽*, 2004, 8(1): 226-228
- [16] 崔颖, 王金兰, 刘庆增. 内毒素的致热特性[J]. *天津药学*, 2002, 14(5): 29
- [17] 陆树文, 刘红菊, 赵伟, 等. 白头翁汤治疗炎症性肠病的分子机制研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2011, 27(1): 106-109
- [18] 赵虎, 张珍玲. 细菌内毒素对血管内皮细胞的激活损伤作用[J]. *国外医学微生物学分册*, 1999, 22(6): 14
- [19] Veszy C J, Kitchens R L, Wolfbauer G, et al. Lipopolysaccharide binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes[J]. *Infect Immun*, 2000, 68: 2410-2417
- [20] Hu Yiyi, Hu Yuanliang, Mu Xiang, et al. Chinese herbal medicinal ingredients inhibit secretion of IL-6, IL-8, E-selectin and TXB₂ in LPS-induced rat intestinal microvascular endothelial cells [J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2009, 31(4): 550-555

(责任编辑: 苏燕)