

温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭 IETM 大鼠 TLR4 mRNA, TNF- α 及肝细胞凋亡的影响

杜珊¹, 王杰², 陈斌^{3*}, 周为³, 李武³, 苏煦初³, 彭杰³, 周月¹
(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 金华市中医医院, 浙江 金华 321017;
3. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的: 研究 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 及其下游炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 与肝衰竭肠源性内毒素血症 (IETM) 大鼠肝细胞凋亡的关系, 并探索温阳解毒化瘀颗粒对内毒素介导的肝细胞凋亡的调控机制。方法: SPF 级雄性 SD 大鼠 85 只, 随机分为正常组, 模型组, TLR4 单克隆抗体组和温阳解毒化瘀颗粒组 (8.925 g·kg⁻¹)。采用 D-半乳糖胺 (D-Gal) 腹腔注射建立肝衰竭 IETM 模型, TLR4 单克隆抗体组和温阳解毒化瘀颗粒组在造模前 5 d 给予温阳解毒化瘀颗粒溶液灌胃, 正常组、模型组以等容积蒸馏水代替, 直至处死。各组分别在 24, 48, 72 h 随机处死大鼠并采集标本。检测 24, 48, 72 h 各时间点血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肝组织病理变化, 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测肝组织 TLR4 mRNA 表达, 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测肝组织 TNF- α 表达, 流式细胞仪检测肝细胞凋亡率。结果: 与正常组比较, 模型组 ALT, AST 升高, 肝组织病理损伤程度明显加重, TLR4 mRNA, TNF- α 表达均增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肝细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 温阳解毒化瘀颗粒组 ALT, AST 显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织病理损伤程度明显减轻 ($P < 0.05$), TLR4 mRNA, TNF- α 表达显著下降 ($P < 0.01$), 肝细胞凋亡率亦显著降低 ($P < 0.01$)。结论: TLR4 mRNA, TNF- α 在肝衰竭时与肝细胞凋亡呈正相关, 温阳解毒化瘀颗粒能够改善肝衰竭 IETM 大鼠肝功能, 减轻肝细胞损伤, 减少肝细胞凋亡, 其机制可能与其下调肝脏 TLR4 mRNA 表达, 抑制 TNF- α 释放, 降低肝细胞凋亡率有关。

【关键词】 肝衰竭; 温阳解毒化瘀颗粒; 肠源性内毒素血症; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子- α

【中图分类号】 R22; R242; R2-031; R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2020)02-0026-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20200222

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191009.0937.002.html>

【网络出版时间】 2019-10-09 09:55

Effect of Wenyang Jiedu Huayu Granule on TLR4 mRNA, TNF- α and Hepatocyte Apoptosis in IETM Rats with Hepatic Failure

DU Shan¹, WANG Jie², CHEN Bin^{3*}, ZHOU Wei³, LI Wu³,
SU Xu-chu³, PENG Jie³, ZHOU Yue¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Jinhua Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinhua 321017, China;

3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the relationship between Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA and its downstream inflammatory factor-tumor necrosis factor- α (TNF- α) and hepatocyte apoptosis in mice with intestinal

【收稿日期】 20190509(022)

【基金项目】 国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDZX2012062); 湖南省中医药科研计划项目 (201205); 湖南省科技厅科技计划一般项目 (2013SK3105); 湖南省高层次卫生人才“225”工程培养项目

【第一作者】 杜珊, 在读博士, 从事中医药防治肝病研究, E-mail: ds19910706@163.com

【通信作者】 * 陈斌, 博士, 主任医师, 从事中医药防治肝病研究, E-mail: chenbin0410@126.com

endotoxemia (IETM) of hepatic failure, and explore the regulatory mechanism of Wenyang Jiedu Huayu granule on endotoxin-induced hepatocyte apoptosis. **Method:** The 85 SPF male SD rats were randomly divided into normal group, model group, TLR4 monoclonal antibody group and Wenyang Jiedu Huayu granule group. *D*-galactosamine (*D*-Gal) intraperitoneal injection was performed to establish the IETM model of hepatic failure. The TLR4 monoclonal antibody group and the Wenyang Jiedu Huayu granule group were given Wenyang Jiedu Huayu granule solution by gavage 5 days before the modeling. The normal group and the model group were given isovolumetric distilled water. Each group was given by gavage until sacrifice. Rats in each group were randomly sacrificed at 24, 48, 72 h, respectively, and samples were collected. The levels of serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected at 24, 48, 72 h. The pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of TLR4 in liver tissue was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). The expression of TNF- α in liver tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The apoptotic rate of hepatocytes was detected by flow cytometry. **Result:** Compared with the normal group, ALT and AST were increased in model group, while the pathological injury degree of liver tissue was significantly increased. The expressions of TLR4 mRNA and TNF- α were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), whereas the apoptosis rate of liver cells was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, ALT and AST were decreased in Wenyang Jiedu Huayu granule group ($P < 0.01$), and the degree of pathological injury of liver tissue was significantly reduced ($P < 0.05$). The expressions of TLR4 mRNA and TNF- α were significantly decreased ($P < 0.01$), and the apoptosis rate of liver cells was also reduced ($P < 0.01$). **Conclusion:** TLR4 mRNA and TNF- α are positively correlated with hepatocyte apoptosis in liver failure. Wenyang Jiedu Huayu granule can improve liver function, alleviate liver cell injury and reduce liver cell apoptosis in IETM mice with hepatic failure. The mechanism may be related to its ability to down-regulate the expression of liver TLR4 mRNA, inhibit the release of TNF- α , and reduce the rate of hepatocyte apoptosis.

[**Key words**] hepatic failure; Wenyang Jiedu Huayu granule; intestinal endotoxemia; Toll-like receptor 4; tumor necrosis factor-alpha

肝衰竭是临床危重病症,病情险恶,进展迅速,预后极差,病死率高^[1]。在肝衰竭病程进展中,约 93.3% ~ 100% 的患者会出现肠源性内毒素血症 (IETM)^[2]。内毒素可引起全身炎症反应综合征和脓毒症,甚至多器官功能衰竭^[3]。IETM 介导的“二次打击”在肝衰竭中后期会引起肝细胞大量死亡,严重影响肝衰竭的治疗和预后。相关研究表明内毒素诱导肝细胞凋亡,可能与其主要成分脂多糖 (LPS) 介导 Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路,诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 (IL-1), 白细胞介素-6 (IL-6), 白细胞介素-8 (IL-8) 等炎症因子过度释放有关^[4-5]。故探索 TLR4, TNF- α 在肝衰竭中与肝细胞凋亡的关系,如何减轻肝衰竭 IETM, 不仅关系到肝衰竭的治疗及预后,也将为肝衰竭的治疗提供新思路、新方法。课题组在临床诊疗中发现,肝衰竭中医病机演变规律可归纳为“湿热-热毒致瘀-瘀毒互结”,早期以实证为主,以湿、热、瘀、毒显著,中晚期则虚实夹杂,瘀、毒、虚交织^[6],治疗以清热利湿,解毒化瘀为主,辅以温阳健脾^[7-8]。前期研究

已充分证实温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭有确切疗效^[9-10],可减轻炎症因子释放,减轻肠源性内毒素血症。实验拟观察温阳解毒化瘀颗粒对 *D*-半乳糖胺诱导肝衰竭 IETM 模型大鼠肝组织 TLR4 mRNA 蛋白表达, TNF- α 含量及肝细胞凋亡的影响,进一步阐明其治疗肝衰竭的作用机制。

1 材料

1.1 动物 85 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 (230 \pm 20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 SCXK(湘)2011-0003。实验于湖南中医药大学第一附属医院中心实验室进行,许可证号 SYXK(湘)2013-0005。本研究严格按照湖南中医药大学动物伦理委员会标准进行,伦理号 HN-LL2013-017。

1.2 药物 温阳解毒化瘀颗粒(茵陈 30 g,白术 30 g,附片 10 g,丹参 30 g,赤芍 60 g,薏苡仁 30 g),实验采用单味中药浓缩颗粒剂(华润三九医药股份有限公司,批号分别为 1108001S, 1108002S, 1109002S, 1110001S, 1108001S, 1109002S),浓缩

颗粒剂每 1 g 含生药分别为 10, 6, 3, 4.5, 5, 5 g, 1 付颗粒剂含有生药共计 29.98 g。参考《中药药理实验》^[11], 按照人与大鼠体表面积关系换算大鼠的中药生药日用量, 然后再按照颗粒剂与生药剂量换算关系, 将生药量换算成配方颗粒剂量, 得出大鼠按颗粒剂剂量 $8.925 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 2 次给药, 将所有中药颗粒剂充分混匀, 加入沸腾的蒸馏水中溶解, 配制成 $0.338 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

1.3 试剂 D-半乳糖胺(南通通吕生物制品有限公司, 批号 20111106); TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(深圳市科润达生物工程有限公司, 批号 27194); 苏木素-伊红(HE)试剂(Solarbio 公司, 批号 G1120); 丙氨酸氨基转移酶(ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 C099-2-1, C010-1-1); TLR4 抗体, Annexin V-FITC/碘化丙锭(PI)细胞凋亡试剂盒(Abcam 公司, 批号分别为 ab22048, ab14085); trizol 试剂(Invitrogen 公司, 批号 10296028); 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(Promega 公司, 批号 0000185778)。

1.4 仪器 7170 型全自动生化分析仪(日本日立公司); Epics Altra 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司); 7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司); Thermo Scientific MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 参照前期实验^[9-10], 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为正常组, 模型组, TLR4 单克隆抗体组, 温阳解毒化瘀颗粒组, 正常组 10 只, 其余各组 25 只。造模前禁食 12 h, 将 D-半乳糖胺粉末用无菌生理盐水溶解, 并用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 调 pH 至 7.0, 配成质量分数为 20% 的溶液。模型组, TLR4 单克隆抗体组, 温阳解毒化瘀颗粒组大鼠给予 D-半乳糖胺 $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 一次性腹腔注射, 24 h 后成模; 正常组大鼠给予相同容积蒸馏水。

2.2 给药 在造模前 5 d 开始, TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组大鼠用上述中药溶液按 $8.925 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 2 次灌胃, 正常饮食, 直至处死。TLR4 单克隆抗体组造模前 1 h 预先腹腔注射 TLR4 Ab, $10 \text{ } \mu\text{g}/\text{只}$, 每 48 h 注射 1 次。正常组、模型组以等容积生理盐水代替。

2.3 动物处置 大鼠称体质量后以 2% 戊巴比妥钠溶液按 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉, 因死亡率不同, 各组在 24, 48, 72 h 随机处死大鼠并采集标本。模

型组每个时间点处死 6 只, TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组 7 只。

2.4 肝功能检测 无菌条件下, 分别于上述时间点抽取大鼠心脏血液 3 mL, 全自动生化分析仪测定 ALT, AST。

2.5 肝组织病理检测 严格无菌条件下, 取新鲜右叶肝组织 2 g, 用生理盐水中清洗干净, 于 10% 甲醛中固定, 常规乙醇脱水, 透明, 包埋, 切片, HE 染色, 在显微镜下观察标本。参考相关文献评分^[12], 按肝组织损伤范围的不同评分, 肝组织结构正常计 0 分; 肝细胞点状坏死计 1 分; 肝细胞呈灶状或片状坏死, 占小叶 1/3 以内计 2 分; 肝细胞呈广泛坏死伴出血, 占小叶 1/3 ~ 2/3 计 3 分; 肝细胞坏死占小叶 2/3 以上计 4 分。

2.6 Real-time PCR 测定 TLR4 mRNA 表达 肝组织匀浆机匀浆, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去除杂质, 提取组织中总 RNA, 按试剂盒反转录合成 cDNA; SYBR Green II 染料法进行 PCR 反应, $20 \text{ } \mu\text{L}$ 反应体系扩增。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min(共 40 次循环); $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s 溶解。运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法比较各组目标 mRNA 表达差异。PCR 引物序列由武汉华联生物技术有限公司设计合成, 见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
TLR4	上游 5'-GAGGCAGCTCTTGGTGGAACTT-3'	115
	下游 5'-CAAGCACACTGAGGACCGACA-3'	
β -actin	上游 5'-ACCCCGGGTCCCAGCTTAG-3'	145
	下游 5'-CGAAGGTGGAAGACTGGGAG-3'	

2.7 ELISA 检测 TNF- α 表达 剪取左内叶肝组织 1 g, 匀浆机匀浆, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 严格参照 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

2.8 流式细胞仪检测肝细胞凋亡率 剪取尾叶肝组织 1 g, 于预冷的 PBS 中立即剪碎至 1 mm^3 大小, PBS 多次洗涤, 加入 9 倍标本体积的预冷磷酸盐缓冲液(PBS), 匀浆器匀浆, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取其上清液, 加入离心管中, 滤膜过滤至另一离心管, 混匀, 取 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 加入流式细胞仪检测试管。每管加入 Annexin-V FITC $4.5 \text{ } \mu\text{L}$, 再加入 PI $2.5 \text{ } \mu\text{L}$, 避光反应 10 min 后于流式细胞仪中检测。以正常组为对照, 设定 FIT, CPI 的波长, 由 Beckman

公司系统软件分析结果。

2.9 统计学处理 实验数据均采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料多组间比较采用方差分析,各组间两两比较采用 LSD 检验,相关分析采用 Pearson 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具体统计学意义。

3 结果

3.1 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝功能的影响 与

正常组比较,模型组大鼠各时间点 ALT,AST 均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,温阳解毒化瘀颗粒,TLR4 单克隆抗体组各时间点 ALT,AST 均显著降低 ($P < 0.01$);与 TLR4 单克隆抗体组比较,温阳解毒化瘀颗粒组 AST 在 24,72 h 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.2 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织病理学的影响 正常组大鼠肝小叶结构正常,肝细胞无明显

表 2 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on liver function in rats ($\bar{x} \pm s$)

U·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	ALT			AST		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
正常	-	9	54.8 ± 8.5	54.8 ± 8.5	54.8 ± 8.5	129.6 ± 23.1	129.6 ± 23.1	129.6 ± 23.1
模型	1.8	6	565.6 ± 209.1 ²⁾	5 037.0 ± 971.9 ²⁾	3 229.6 ± 1 114.9 ²⁾	1 181.6 ± 155.2 ²⁾	7 686.0 ± 1 751.4 ²⁾	5 148.8 ± 1 345.4 ²⁾
TLR4 单克隆抗体	8.925	7	260.2 ± 79.3 ⁴⁾	3 107.0 ± 1 026.5 ⁴⁾	810.6 ± 496.4 ⁴⁾	935.0 ± 163.6 ⁴⁾	4 684.0 ± 2 264.6 ⁴⁾	2 928.8 ± 865.3 ⁴⁾
温阳解毒化瘀颗粒	8.925	7	295.0 ± 50.0 ⁴⁾	2 522.2 ± 1 198.2 ⁴⁾	978.4 ± 1 070.3 ⁴⁾	682.8 ± 167.0 ^{4,5)}	4 329.6 ± 1 525.8 ⁴⁾	1 942.2 ± 1 823.3 ^{4,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与 TLR4 单克隆抗体组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 6 同)。

变性、坏死,汇管区未见炎性细胞浸润。模型组大鼠肝小叶结构破坏,肝细胞呈弥漫性坏死,可见大量炎性细胞浸润。TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组大鼠肝小叶结构未见明显破坏,部分肝细胞呈点灶状坏死,汇管区可见少量炎性细胞浸润。见图 1。

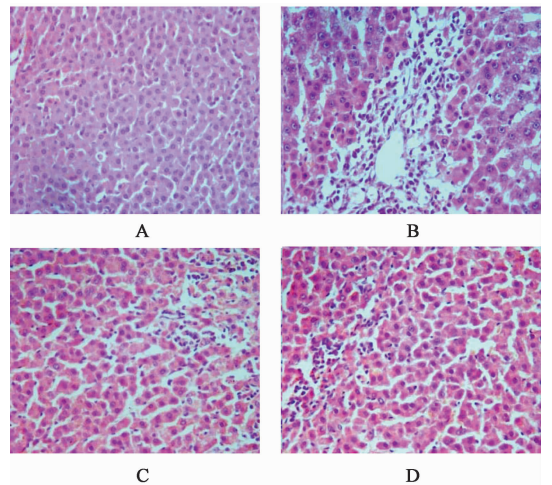
3.3 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织病理评分的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织损伤程度在 24,48,72 h 各时间点均显著加重 ($P < 0.01$);与模型组比较,TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组大鼠肝组织损伤程度在各时间点明显减轻 ($P < 0.05$);与 TLR4 单克隆抗体组比较,温阳解毒化瘀颗粒组大鼠肝组织病理损伤程度较轻,但各时间点均无统计学差异。见表 3。

3.4 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织 TLR4 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TLR4 mRNA 表达在 24,48,72 h 均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组大鼠 TLR4 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$);与 TLR4 单克隆抗体组比较,温阳解毒化瘀颗粒组 TLR4 mRNA 表达在各时间点有所降低,但均无统计学差异。见表 4。

3.5 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠 TNF- α 的影响 与正常组比较,模型组大鼠 TNF- α 含量在各时间点均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,TLR4 单克隆

抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组 TNF- α 含量在各时间点均显著减低 ($P < 0.01$);与 TLR4 单克隆抗体组比较,温阳解毒化瘀颗粒组 TNF- α 表达在 24 h 稍升高,在 48,72 h 有所降低,48 h 时有统计学差异 ($P < 0.05$)。见表 5。

3.6 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝细胞凋亡率的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝细胞凋亡率在各时间点均显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组各时间点



A. 正常组;B. 模型组;C. TLR4 单克隆抗体组;D. 温阳解毒化瘀颗粒组
图 1 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织病理学的影响 (HE, $\times 400$)
Fig.1 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on histopathology of liver in mice (HE, $\times 400$)

与正常组比较,模型组大鼠肝细胞凋亡率在各时间点均显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,TLR4 单克隆抗体组、温阳解毒化瘀颗粒组各时间点

表 3 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织病理评分的影响

Table 3 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on pathological score of liver tissue in rats

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	24 h					病损评分 ($\bar{x} \pm s$)	48 h					病损评分 ($\bar{x} \pm s$)	72 h					病损评分 ($\bar{x} \pm s$)
			-	+	++	+++			-	+	++	+++			-	+	++	+++		
正常	-	9	9	0	0	0	0	-	9	0	0	0	0	-	9	0	0	0	0	-
模型	1.8	6	0	1	1	2	2	2.83 ± 1.16 ²⁾	0	0	1	2	3	3.33 ± 0.82 ²⁾	0	0	1	1	4	3.50 ± 0.83 ²⁾
TLR4 单克隆抗体	8.925	7	0	3	3	2	0	2.83 ± 1.16 ³⁾	0	1	3	2	1	2.42 ± 0.97 ³⁾	0	1	3	1	2	2.57 ± 1.13 ³⁾
温阳解毒化瘀颗粒	8.925	7	0	4	2	2	0	1.71 ± 0.95 ³⁾	0	2	2	2	1	2.29 ± 1.11 ³⁾	0	2	2	1	2	2.43 ± 1.27 ³⁾

表 4 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝组织 TLR4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on TLR4 mRNA expression in rats liver tissue($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TLR4		
			24 h	48 h	72 h
正常	-	9	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.21 ± 0.05
模型	1.8	6	1.32 ± 0.06 ²⁾	1.38 ± 0.04 ²⁾	1.43 ± 0.03 ²⁾
TLR4 单克隆抗体	8.925	7	0.74 ± 0.02 ⁴⁾	0.73 ± 0.04 ⁴⁾	0.75 ± 0.06 ⁴⁾
温阳解毒化瘀颗粒	8.925	7	0.56 ± 0.03 ⁴⁾	0.59 ± 0.01 ⁴⁾	0.58 ± 0.05 ⁴⁾

表 5 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠 TNF-α 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on TNF-alpha level in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TNF-α/mg·L ⁻¹		
			24 h	48 h	72 h
正常	-	9	21.96 ± 2.09	-	-
模型	1.8	6	82.28 ± 9.29 ²⁾	149.97 ± 10.70 ²⁾	207.37 ± 14.19 ²⁾
TLR4 单克隆抗体	8.925	7	54.89 ± 9.95 ⁴⁾	108.41 ± 10.12 ⁴⁾	136.98 ± 7.82 ⁴⁾
温阳解毒化瘀颗粒	8.925	7	56.69 ± 6.72 ⁴⁾	93.87 ± 7.90 ^{4,5)}	124.18 ± 7.64 ⁴⁾

肝细胞凋亡率显著降低($P < 0.01$);与 TLR4 单克隆抗体组比较,温阳解毒化瘀颗粒组大鼠肝细胞凋亡

率在 24 h 时稍增高,在 48,72 h 降低($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠肝细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Wenyang Jiedu Huayu granule on apoptosis rate in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	凋亡率/%		
			24 h	48 h	72 h
正常	-	9	2.38 ± 0.08	-	-
模型	1.8	6	6.30 ± 0.25 ²⁾	10.60 ± 0.31 ²⁾	12.85 ± 0.40 ²⁾
TLR4 单克隆抗体	8.925	7	5.40 ± 0.22 ⁴⁾	8.90 ± 0.32 ⁴⁾	10.30 ± 0.29 ⁴⁾
温阳解毒化瘀颗粒	8.925	7	5.60 ± 0.16 ^{4,5)}	7.20 ± 0.29 ^{4,5)}	9.20 ± 0.43 ^{4,5)}

3.7 温阳解毒化瘀颗粒对大鼠相关分析的影响

为评价 TLR4 表达与炎症应答的关系,对大鼠各时间点肝组织 TLR4/GAPDH 与 TNF-α 进行相关分析。结果表明,不同时间点肝组织 TNF-α 含量与 TLR4 mRNA 表达呈正相关($F = 0.615, P < 0.01$)。TLR4 mRNA, TNF-α 与肝细胞凋亡率均呈正相关,

说明内毒素通过 TLR4 介导 TNF-α 过度释放,激活炎症级联反应,对肝衰竭的肝细胞凋亡起重要作用。

4 讨论

内毒素存在于革兰阴性细菌的细胞壁内,当细菌死亡细胞壁崩解时释出,其主要化学成分为 LPS^[13]。肝衰竭时,内毒素血症是引起肝脏损伤的

重要启动因素之一。TLR4 作为 LPS 受体,在介导 LPS 信号转导、激活单核/巨噬细胞诱导炎症反应中具有重要作用^[14]。TLR4 在正常肝脏中呈低表达,而在肝衰竭时则呈异常高表达,提示 TLR4 参与了肝衰竭时 LPS 对肝损伤的病理过程。LPS 不仅直接损伤肝细胞,还能通过 TLR4 的介导激活肝内的库弗细胞(KC)释放各种炎症介质,如 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 等,引起肝细胞的凋亡或坏死。这些炎性细胞因子构成一个独特的细胞因子和化学介质网络,共同参与肝细胞凋亡的发生,其中 TNF- α 发挥着关键核心作用。在肝脏中, TNF- α 是巨噬细胞激活后产生的细胞因子,研究发现高浓度的可致肝细胞变性、坏死,对肝脏有明显的毒性^[15]。TNF- α 通过受体进入肝细胞后,可诱导肝细胞自由基产生,引起肝细胞膜性结构损伤和 DNA 链断裂,从而导致肝细胞变性和坏死,诱导肝细胞凋亡并引发肝功能衰竭。TNF- α 还可通过诱导 T 细胞表达多种细胞因子,增强细胞毒性 T 细胞介导的免疫损伤,促进肝细胞凋亡、坏死。

中医认为肝衰竭肠源性内毒素血症发病责之于脾,脾虚为发病之本,脾气不健,运化失常,水湿无以布散,加之感受毒邪,湿、毒内外合邪,则发为此病。本病病理因素为虚、(热)毒、湿、瘀等,这也与肝衰竭的中医病机相合^[16-17]。温阳解毒化瘀颗粒为湖南中医药大学第一附属医院肝病研究所治疗肝衰竭的经验方,具有祛湿退黄、温阳健脾、解毒化瘀之效,符合中医辨证论治理论。该方由茵陈、白术、附片、丹参、赤芍、薏苡仁组成。方中重用赤芍以加强化瘀止痛之功,配合茵陈以利湿退黄,两药合用共为君药;丹参功能活血凉血、祛瘀止痛,附片温补脾肾,可防茵陈、赤芍、丹参寒凉太过,二者共为臣药,加强君药利湿退黄的功效,兼以温补脾肾、祛瘀止痛。再佐以白术、薏苡仁以燥湿健脾益气,防诸药损伤脾胃。诸药合用,共同达到祛湿退黄、温阳健脾、解毒化瘀的功效。

实验以 D-半乳糖胺诱导肝衰竭 IETM 大鼠为模型,造模后与空白组比较,模型组大鼠肝功能 AST, ALT 明显升高,HE 染色显示肝小叶结构破坏,肝细胞呈弥漫性坏死,可见大量炎性细胞浸润,肝细胞凋亡增多,肝组织病理评分,TLR4 mRNA, TNF- α 含量明显升高,表明模型制备成功。经温阳解毒化瘀颗粒治疗后,与模型组比较,温阳解毒化瘀颗粒组,TLR4 单克隆抗体组大鼠 AST, ALT 明显降低,大鼠肝小叶结构未见明显破坏,部分肝细胞呈点灶状坏

死,汇管区可见少量炎性细胞浸润,肝组织病理评分,TLR4 mRNA, TNF- α 含量均有所降低,肝细胞凋亡率下降。说明温阳解毒化瘀颗粒可改善肝衰竭 IETM 大鼠肝功能,减轻肝组织损伤,可能与下调 TLR4 mRNA 表达,减少 TNF- α 含量有关。

综上所述,温阳解毒化瘀颗粒能够改善肝衰竭 IETM 大鼠肝功能、减轻肝损伤、减少肝细胞凋亡,可能与其能下调肝脏 TLR4 mRNA 表达,抑制 TNF- α 释放,降低肝细胞凋亡率有关。此外,TLR4 mRNA, TNF- α 与肝细胞凋亡率均呈正相关,说明内毒素通过 TLR4 介导 TNF- α 过度释放,激活炎症级联反应,对肝细胞凋亡起重要作用。相关研究均证实温阳解毒化瘀颗粒治疗肝衰竭 IETM 疗效确切,为中医药防治肝衰竭 IETM 提供新的治疗思路及方法,但是否还存在其他调控通路有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] YANG Y, GONG X B, HUANG L G, et al. Diosmetin exerts anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects to protect against endotoxin-induced acute hepatic failure in mice[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(19):30723-30733.
- [2] NIU Y H, YIN D L, LIU H L, et al. Restoring the Treg cell to Th17 cell ratio may alleviate HBV-related acute-on-chronic liver failure [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(26):4146-4154.
- [3] DONG L, YIN L, QUAN H F, et al. Hepatoprotective effects of kaempferol-3-O- α -l-arabinopyranosyl-7-O- α -l-rhamnopyranoside on D-galactosamine and lipopolysaccharide caused hepatic failure in mice[J]. *Molecules*, 2017, 22(10):1755-1768.
- [4] Kim S J, Lee S M. Necrostatin-1 protects against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury by preventing TLR4 and RAGE signaling[J]. *Inflammation*, 2017, 40(6):1912-1923.
- [5] YAN L P, HU X N, WU Q H, et al. CQMUI-011, a novel adamantane sulfonamide compound, inhibits lipopolysaccharide-and D-galactosamine-induced fulminant hepatic failure in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47(4):231-243.
- [6] 王雅,陈斌,龙远雄,等.基于数据挖掘的慢加急性(亚急性)肝衰竭证素分布特点及用药规律研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(11):1234-1237.
- [7] 莫小艾,蒋开平,黄清华,等.甘露消毒丹治疗乙肝病毒相关慢加急性肝衰竭湿热证疗效及 FibroScan 变化的临床观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16):170-175.

- [8] 龙富立,陈小明,谢丽,等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠细胞因子及肝组织的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(20):101-105.
- [9] 王轩,陈斌,彭杰,等. 温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭内毒素血症大鼠肠道 sIgA 的影响[J]. 中西医结合肝病杂志,2013,23(3):157-159.
- [10] 陈斌,王杰,彭杰,等. 温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭肠源性内毒素血症大鼠 TLR4、NF- κ B 表达的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2013,15(5):818-824.
- [11] 陈奇,沈映君,孙学蕙,等. 中药药理实验[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1988;21-23.
- [12] 艾陈芳. 抗肝衰复方治疗重型肝炎的临床观察及对急性肝衰竭大鼠防护作用的实验研究[D]. 武汉:湖北中医学院,2007.
- [13] Dullah E C, Ongkudon C M. Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions[J]. Crit Rev Biotechnol, 2017,37(2):251-261.
- [14] Murphy M, XIONG Y, Pattabiraman G, et al. Pellino-1 positively regulates Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 signaling and is suppressed upon induction of endotoxin tolerance[J]. J Biol Chem, 2015, 290(31):19218-19232.
- [15] 李小苹,李三强,王冬梅,等. 肿瘤坏死因子- α 在小鼠酒精性肝损伤过程中的表达及意义[J]. 中国临床药理学杂志,2017,33(19):1912-1914.
- [16] 李树志,熊壮,刘铁军. 基于下法毒消肝清丸对于肝硬化内毒素血症的临床研究[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(9):1870-1872.
- [17] 张向磊,卢立伟,胡冬青,等. 护肠消毒微丸结肠靶向给药阻断瘀毒内蕴证乙型肝炎相关慢加急性肝衰竭肠源性内毒素血症临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):191-197.

[责任编辑 张丰丰]