

桃核承气汤对大鼠肝性脑病模型干预治疗的分析

李晓娟¹, 朱 云², 王立福², 杜 宁², 孙永强², 宋雪艾²,
景 婧², 王丽苹², 张 帆², 余思邈², 王睿林², 李瑞生¹

(1. 解放军第 302 医院临床研究管理中心, 北京 100039, 2. 解放军第 302 医院中西医结合诊疗与研究中心, 北京 100039)

【摘要】 目的 探讨桃核承气汤(去甘草)对硫代乙酰胺(TAA)诱导的大鼠肝性脑病的干预治疗作用。**方法** 通过 TAA 腹腔注射诱导建立大鼠肝性脑病模型, 观察桃核承气汤(去甘草)颗粒对肝性脑病的神经行为改变、神经病学测试、血清生化指标及肝脏和脑病理损伤的影响。**结果** 本实验成功构建了大鼠肝性脑病模型。桃核承气汤(去甘草)颗粒低、中、高剂量均能不同程度地改善 TAA 引起的 HE 大鼠的神经反射情况, 降低 HE 级别, 降低血氨和生化指标指数以及使病理结果均呈现减轻的现象, 其中以高剂量组为最佳($P < 0.05$), 效果与阳性药相近。**结论** 桃核承气汤(去甘草)对 TAA 引起的大鼠肝性脑病有较好的预防治疗作用, 本实验为该方剂的临床肝性脑病的使用提供了坚实的实验依据。

【关键词】 桃核承气汤; 肝性脑病; 硫代乙酰胺; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)10-0014-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.10.004

Analysis of the preventive and therapeutic effects of Taohe Chengqi decoction on a rat model of hepatic encephalopathy

LI Xiao-juan¹, ZHU Yun², WANG Li-fu², DU Ning², SUN Yong-qiang², SONG Xue-ai²,
JING Jing², WANG Li-ping², ZHANG Fan², YU Si-miao², WANG Rui-lin², LI Rui-sheng¹

(1. Research Center for Clinical and Translational Medicine; 2. Liver Disease Center for Combined TCM and Western Medicine, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

【Abstract】 Objective To analyze the preventive and therapeutic effects of a traditional Chinese medicine Taohe Chengqi decoction on a rat models of hepatic encephalopathy (HE) induced by thioacetamide (TAA). **Methods** The rat model of HE was established by intraperitoneal injection of TAA, and the effects of Taohe Chengqi decoction were observed by neurobehavioral changes, neurological test, blood ammonia, serum biochemical indexes, and liver and brain pathological examination. **Results** The rat model of hepatic encephalopathy was successfully established. Low, medium and high dose Taohe Chengqi decoction markedly improved neuro-reflexes and liver and brain pathological damages, and significantly decreased the HE staging and serum biochemical indexes, and the results of high dose group was the best, similar to that of positive drug-treatment group. **Conclusions** Taohe Chengqi decoction exhibits promising preventive and therapeutic effects on the rat model of TAA-induced hepatic encephalopathy, and these results provide substantial experimental evidence for its clinical application.

【基金项目】 国家“十二五”科技重大专项资助项目(2012ZX10005010-002-002)。

【作者简介】 李晓娟(1980-), 女, 硕士, E-mail: sxlily55@163.com; 朱云(1983-), 女, 博士, zynorway@126.com; 二者为并列第一作者。

【通讯作者】 王睿林(1979-), 男, 博士, 主治医师, 从事中西医结合治疗研究, E-mail: wr7905@163.com; 李瑞生(1969-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事人类疾病动物模型研究, E-mail: lrsheng@sohu.com。

【Key words】 Taohe Chengqi decoction; Hepatic encephalopathy; Thioacetamide; Rat

肝性脑病 (hepatic encephalopathy, HE) 是一种以可逆性意识障碍为主要特征的神经紊乱和运动异常综合征, 多为急慢性肝病较严重的并发症。临床先出现精神症状, 而后出现意识障碍, 甚至并发的脑水肿常导致颅内压增高和脑卒的发生, 因此具有较高死亡率^[1,2]。HE 发病机制尚未完全阐明, 也无有效的防治药物与方法, 因此对 HE 的基础和临床研究十分迫切。肝性脑病动物模型的建立对于发病机制、诊断和治疗的研究发挥着非常重要的作用, 其中以大鼠模型应用最为广泛^[3]。桃核承气汤是《伤寒论》治太阳蓄血证的主方, 具有活血软坚、疏肝解郁、健脾化湿之功效, 研究表明此方剂对肝脏具有一定的保护作用^[4,5]。因此本实验拟通过硫代乙酰胺 (TAA) 诱导大鼠肝性脑病模型, 观察桃核承气汤对其 HE 评分、生化指标以及肝脏和脑病理结果的影响, 探讨其对肝性脑病的防护作用和作用机理, 以期临床寻求治疗 HE 的药物提供坚实的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 单鼠体质量 180 ~ 220 g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 生产许可证【SCXK(军)2012-0004】。本实验室具有 SPF 级实验动物使用许可证【SYXK(军)2012-0010】。

1.2 药品与试剂

硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) (Sigma 公司), 产品号: G2501, 批号: 9029-12-3。氯化钠注射液 (0.9%) 来自石家庄四药有限公司, 批号: 1412273201; 氯化钾来自中国医药公司北京采购供应站, 产品号: 090407; 葡萄糖来自北京化工厂, 产品号: 20090228; 乳果糖 (Abbott 公司), 产品号: 1083418。甲醛溶液来自天津市大茂化学试剂厂, 批号: 20100523。桃核承气汤 (去甘草) 颗粒 (桃仁、桂枝、芒硝和生大黄) 由本院制剂室制备 (6.5 g/袋)。

1.3 动物分组及模型制备

SD 大鼠在本中心 SPF 级屏障环境饲养, 动物自由饮水、采食正常饲料, 1 周后随机分为六组 (8 只/组): 空白对照组, 模型对照组, 桃核承气汤 (去甘草) 颗粒低、中、高剂量 (1.17、3.51、10.53 g/kg) 组, 乳果糖组 (0.2 mL/d/只)。桃核承气汤 (去甘草) 的剂量根据人临床剂量换算, 换算公式: 大鼠剂量 (g/

kg) = 6.3 × 人临床剂量 (0.5 g/kg)。此剂量作为低剂量, 而中剂量与高剂量分别为低剂量的 3 倍和 9 倍。给药: 中药高、中、低剂量组以及阳性药组从造模前 1 周开始至造模后 2 d 连续给药, 中药各剂量组的灌胃容量为 2 mL/200 g 大鼠体重, 乳果糖组灌胃体积为 (0.2 mL/200 g), 1 次/d。正常对照组和模型组给予相同体积的生理盐水。造模: TAA 250 mg/(kg/d) 隔日腹腔注射 2 次。正常对照组则给予生理盐水 ip, 共 2 次。首次注射 TAA 后每隔 12 h, 各组大鼠 (包括正常对照组) 均皮下注射 0.5 mL 混合溶液 (含 0.45% NaCl、5% 葡萄糖、0.2% KCl) 行补液治疗。

1.4 检测指标

1.4.1 造模后, 观察大鼠精神状态、体质量变化、自主活动等情况: 根据大鼠肝性脑病诊断标准, 若大鼠出现嗜睡、反应迟缓, 自主性活动减少、共济失调、昏迷等症状之一, 即可诊断 HE^[6]。并根据 Zimmermann 法^[6]对大鼠 HE 进行分级: 0 级: 正常 (11 分); I 级: 嗜睡, 反应迟缓, 自主活动减少, 反射正常 (11 分); II 级: 共济失调, 但反射仍基本正常 (10 ~ 11 分); III 级: 反射逐渐消失 (< 10 分); IV 级: 角膜反射消失, 动物昏迷 (0 分)。

1.4.2 血液生化指标及肝脏与脑病理学检测: 于末次注射 TAA 的第 2 天, 各组大鼠禁食 8 h 后经眶后静脉丛采集 3 mL 血液分离血清用于检测丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和白蛋白/(总蛋白 - 白蛋白) A/G 比值等生化指标。采集完血液后, 取各组大鼠相同部位肝脏组织和两侧脑组织置 4% 甲醛溶液固定, 切片, HE 染色, 进行病理组织学检查^[7]。肝组织病理观察参照文献[8]方法对肝组织病变程度进行分级: 正常 (-)、肝细胞水肿 (+)、气球样变 (++)、点状坏死伴门管区炎症细胞浸润 (+++)、小灶样坏死 (++++)。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 17.0 分析软件进行统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析并进行组间两两比较分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物对各组大鼠行为、神经反射、HE 等级影响及血氨对比分析

各组大鼠神经反射评分、HE 分级结果显示:空白对照组大鼠活动灵活,神经反射灵敏。模型组大鼠均不同程度的出现行动迟缓,步态不稳,共济失调等反射极迟钝或消失等现象。与模型组比较,其他各组 HE 级别均降低,但只有阳性对照组与桃核承气汤高剂量组具有统计学意义($P < 0.05$)。模型对照组的血氨显著高于空白对照组($P < 0.05$),用药组均出现不同程度的降低,而与模型组比较,阳性对照组、中剂量组和高剂量组的血氨显著降低($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 药物对各组大鼠生化指标的影响

通过对各组大鼠生化指标的对比分析显示:与空白对照组比较,模型组大鼠的 ALT、AST、ALP 均显著增高($P < 0.05$),A/G 比值显著降低($P < 0.05$)。与模型对照组比较,其他各组大鼠的 ALT、AST、ALP 均显著降低($P < 0.05$),A/G 比值显著增高($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,桃核承气汤低剂量组的 ALT、AST 显著增高($P < 0.05$),A/G 比值

显著降低($P < 0.05$),而桃核承气汤中剂量组和高剂量组与阳性对照组结果差异无显著性(表 2)。

2.3 药物对各组大鼠肝脏和脑的病理结果影响

肝脏病理学研究结果显示:正常对照组肝细胞结构基本正常,未见脂肪变性、肿胀、炎症、细胞变性坏死等明显的病理组织学的改变。模型对照组:肝细胞排列紊乱,肝小叶结构不清,呈现不同程度的肿胀、变性、点片状、小灶或大灶性碎屑状坏死。与模型对照组比较,桃核承气汤低、中和高剂量组以及乳果糖组的肝组织变性、肿胀、坏死均有不同程度的减轻和改善(表 3)。脑病理结果显示:正常对照组未见异常。模型组大脑有轻度脑水肿致血管周围轻度袖套样改变,神经元光镜下有少量噬神经现象,原浆型胶质细胞散在或灶性退变,部分区域有轻度增生,轻度脑水肿。与模型组比较,桃核承气汤低、中和高剂量组以及乳果糖组的脑组织的病变程度均有所减轻和改善(图 1)。

表 1 各组大鼠神经反射得分、HE 等级及血氨比较结果

Tab. 1 Comparison of scores of neuro-reflexes, the staging of hepatic encephalopathy and blood ammonia in each group

组别/指标 Group/Indexes	神经反射得分 Scores of neuro-reflexes	HE 级别 Staging of HE	血氨 (mmol/L) Blood ammonia (mmol/L)
空白对照组 Control group	11	0	42.71 ± 9.87
模型对照组 Model group	2 - 8	3.0 ± 0.00	190.45 ± 35.76 ^Φ
阳性对照组 Positive control group	8 - 11	2.13 ± 0.64 [*]	58.38 ± 16.75 [*]
低剂量 Low dose group	4 - 10	2.75 ± 0.46 ^Δ	157.80 ± 27.14 ^{ΦΔ}
中剂量 Medium dose group	6 - 11	2.63 ± 0.74	120.44 ± 29.65 ^{Φ*}
高剂量 High dose group	9 - 11	2.00 ± 0.53 [*]	62.97 ± 13.21 [*]

注:与空白对照组比较: ^Φ $P < 0.05$ 。与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。与阳性对照组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group: ^Φ $P < 0.05$. Compared with the model group: ^{*} $P < 0.05$. Compared with the positive control group: ^Δ $P < 0.05$.

表 2 各组大鼠血清生化指标分析

Tab. 2 Analysis of serum biochemical indexes in each group

组别/指标 Group/Indexes	丙氨酸转氨酶 ALT (U/L)	天冬氨酸氨基转移酶 AST (U/L)	碱性磷酸酶 ALP	白蛋白/(总蛋白 - 白蛋白) A/G
空白对照组 Control group	55.88 ± 8.63 ^{*Δ}	165.25 ± 25.64 ^{*Δ}	457.50 ± 70.95 [*]	2.12 ± 0.19 [*]
模型对照组 Model group	467.5 ± 171.28 ^{☆Δ}	1158.25 ± 256.86 ^{☆Δ}	781.25 ± 88.20 ^{☆Δ}	1.30 ± 0.33 ^{☆Δ}
阳性对照组 Positive control group	175.5 ± 54.45 ^{☆☆}	406.38 ± 178.72 ^{☆☆}	533.88 ± 160.48 [*]	1.94 ± 0.26 [*]
低剂量 Low dose group	277.13 ± 65.20 ^{☆☆Δ}	638.88 ± 87.91 ^{☆☆Δ}	648.13 ± 82.63 ^{☆☆}	1.54 ± 0.33 ^{☆☆Δ}
中剂量 Medium dose group	237.25 ± 53.82 ^{☆☆}	524.63 ± 280.18 ^{☆☆}	564.38 ± 128.25 [*]	1.79 ± 0.64 [*]
高剂量 High dose group	135.13 ± 29.75 [*]	249.63 ± 147.26 [*]	523.75 ± 99.68 [*]	2.20 ± 0.59 [*]

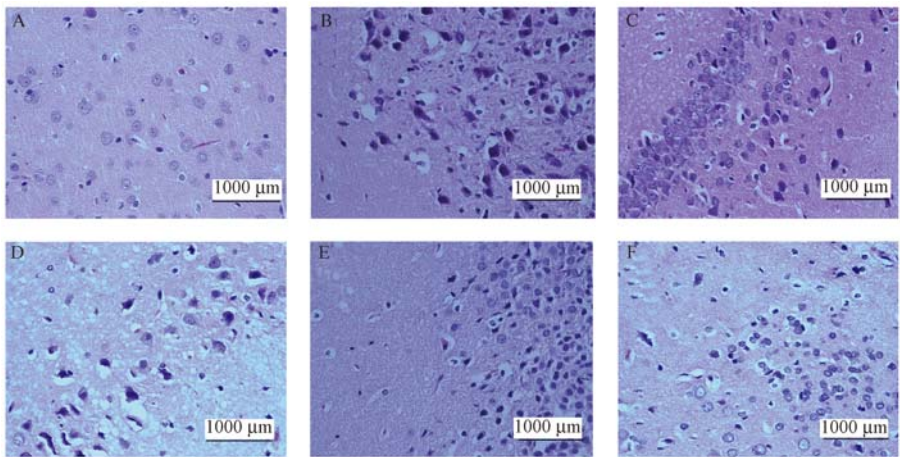
注:注:与空白对照组比较: [☆] $P < 0.05$ 。与模型对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。与阳性对照组比较: ^Δ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group: [☆] $P < 0.05$. Compared with the model group: ^{*} $P < 0.05$. Compared with the positive control group: ^Δ $P < 0.05$.

表 3 各组大鼠肝脏组织的病变程度
Tab. 3 The degrees of liver damage in the rats in each group

组 别 Groups	N	(-)	(+)	(+ +)	(+ + +)	(+ + + +)
空白对照组 Control group	8	8	0	0	0	0
模型对照组 Model group	8	0	3	2	1	2
阳性对照组 Positive group	8	2	4	1	1	0
低剂量 Low dose group	8	1	2	2	2	1
中剂量 Medium dose group	8	1	3	3	1	0
高剂量 High dose group	8	1	4	2	1	0

注：正常 (-)、肝细胞水肿 (+)、气球样变 (+ +)、点状坏死伴门管区炎症细胞浸润 (+ + +)、小灶样坏死 (+ + + +)
Note. Normal (-), Hepatocyte edema (+), balloon degeneration (+ +), punctate necrosis accompanied with inflammatory cell infiltration in portal area (+ + + +), focal necrosis (+ + + +).



注：A：对照组；B：模型组；C：阳性对照组；D：桃核承气汤低剂量组；E：桃核承气汤中剂量组；
F：桃核承气汤高剂量组 (标尺 = 1 000 μm)

图 1 各组大鼠脑组织病理学检查结果 (HE 染色)

Note: A: A control mouse; B: A mouse of model group; C: A mouse of positive control group; D: A mouse of low Taohechengqi Decoction group; E: A mouse of medium Taohe Chengqi Decoction group; F: A mouse of high Taohe Chengqi Decoction group (Bar = 1 000 μm)

Fig. 1 The results of pathological examination of the brain in different groups (HE staining)

3 讨论

肝性脑病的临床表现非常复杂,虽然氨中毒学说在肝性脑病的发病机制中占着核心地位,但对肝性脑病的定义以及治疗仍存在争论^[9],目前临床上仍以西医结合中医的综合治疗为主,中医法常见有化痰通腑法、通腑开窍法、退黄降氨汤等,能够降低血氨来改善 HE 病情。在西医无特效疗法之时,中药治疗有着广阔的发展空间^[10]。张照兰等^[11]运用肠毒清颗粒灌肠法治疗肝性脑病,达到泻下排毒、化浊开窍的目的。胡瑜等^[12]证实丹参注射液对肝性脑病有较好的防治作用。而桃核承气汤是仲景之名方,主治瘀血与邪热互结于下焦之蓄血证^[13],杨荣源等^[4]证实桃核承气汤 (桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草) 对脓毒症大鼠肝脏组织具有保护作用。而本实验中对传统的桃核承气汤进行了方剂改良,由于中医理论认为“甘”能令人中满,肝病常见腹胀

症状,为防出现中满之候加重,故去之。本方在临床使用中对肝性脑病具有一定的疗效,但国内外尚无对该改良方剂的报道。

因此本实验使用 TAA 构建 SD 大鼠肝性脑病模型,观察桃核承气汤 (去甘草) 改良方剂对肝性脑病的作用效果。各组大鼠神经反射和 HE 等级、血清生化指标以及肝脏和脑病理结果显示:模型组大鼠均不同程度的出现行动迟缓,步态不稳,共济失调等反射极迟钝或消失等现象,评分较低,级别较高,血氨浓度显著升高,生化指标 ALT、AST、ALP 均显著增高 ($P < 0.05$),A/G 比值显著降低 ($P < 0.05$),同时模型组肝脏病理显示出现了不同程度的灶样坏死,脑病理结果也显示轻度的脑水肿,由此说明本实验成功构建了大鼠肝性脑病模型。而其他用药各组的 HE 级别、血氨浓度、血清生化指标以及病理学改变结果均显示按照桃核承气汤 (去甘草) 颗粒从低、中到高剂量出现了依次的降低和减轻现

象,由此表明桃核承气汤(去甘草)颗粒低、中、高剂量均能不同程度地改善 TAA 引起的 HE 大鼠的神经反射情况,降低 HE 级别,降低生化指标的指数以及使病理结果均呈现减轻的现象,其中血氨浓度的显著降低可能对 HE 症状的改善起到决定性作用,而其中尤以高剂量组为最佳($P < 0.05$),效果与阳性药相近。此结果与胡瑜等^[12]使用丹参对肝性脑病的干预结果较一致,同时对肝脏组织保护作用方面,与杨荣源等^[4]使用桃核承气汤(桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草)对肝脏保护作用的结果相一致,但本实验中的桃核承气汤(去甘草)为改良方剂,具体的改良剂量对药物的作用影响及其作用机制有待进一步研究。

综上所述,本实验应用桃核汤承气(去甘草)对 TAA 大鼠肝性脑病模型进行干预实验,结果表明本方剂对 TAA 引起的肝性脑病症状具有减缓作用,显著降低血氨浓度,同时对 TAA 造成的肝损伤具有一定保护作用,为该方剂用于临床肝性脑病的治疗提供坚实的动物实验支持以及为进一步作用机制的研究奠定研究基础。

参考文献:

- [1] 刘冀,朱建忠,隋月林,等.四氯化碳诱导大鼠肝性脑病模型的制备[J].中国比较医学杂志,2012,22(2):33-37.
- [2] 江文明.肝性脑病的发病机制及治疗进展[J].求医问药,2012,10(7):580-581.
- [3] 谭琳玲,潘锦瑶,郑德俊,等.硫代乙酰胺诱导大鼠急性肝性脑病模型建立的用药时间研究[J].现代消化及介入诊疗,2013,18(6):344-348.
- [4] 杨荣源,黄宏强,刘云涛,等.桃核承气汤对脓毒症大鼠肝脏组织的保护作用及机制[J].新中医,2014,46(6):210-212.
- [5] 张英军,王军,徐阳,等.桃核承气汤的实验研究[J].长春中医药大学学报,2014,30(2):234-237.
- [6] Zimmermann C, Ferenci P, Pflü C, et al. Hepatic encephalopathy in thioacetamide-induced acute liver failure in rats: characterization of an improved model and study of amino acid-ergic neurotransmission [J]. Hepatology, 1989, 9: 594-601.
- [7] 王睿林,李晓娟,白云峰,等.黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用[J].中国比较医学杂志,2015,25(2):34-37,87.
- [8] 王丽卿,祝胜美,周衡俊,等.急性肝性脑病大鼠脑水肿与脑水通道蛋白 4 的相关性[J].中华医学杂志,2011,91(36):2573-2577.
- [9] 逢菲,胡瑾华.肝性脑病的动物模型及分子生物学机制研究进展[J].国际消化病杂志,2014,34(2):84-86.
- [10] 徐大海,张楠,高金莹,等.肝性脑病治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2011,27(2):218-221.
- [11] 张照兰,时峰.肠毒清颗粒灌肠治疗肝性脑病 II-III 级的临床观察[J].时珍国医国药,2012,23(9):2365-2366.
- [12] 胡瑜,蔡梦婷,陈健文,等.丹参注射液对肝性脑病的防治作用及机制研究[J].中国药师,2014,17(11):1811-1814.
- [13] 张英军,王军,徐阳,等.桃核承气汤的实验研究[J].长春中医药大学学报,2014,30(4):234-237.

[修回日期]2016-04-28

(上接第 8 页)

- [9] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic accuracy of interferon-gamma release assays for tuberculous meningitis: a meta-analysis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2016, 20(4): 494-499.
- [10] Lahuerta-Marin A, Gallagher M, McBride S, et al. Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms [J]. Vet Res, 2015, 46: 90.
- [11] Vervenne RA, Jones SL, van Soelingen D, et al. TB diagnosis in non-human primates: comparison of two interferon-gamma assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2004, 100(1-2): 61-71.
- [12] Garcia MA, Yee J, Bouley DM, et al. Diagnosis of tuberculosis in macaques, using whole-blood in vitro interferon-gamma (PRIMAGAM) testing [J]. Comp Med, 2004, 54(1): 86-92.
- [13] Parsons SD, de Villiers C, Gey van Pittius NC, et al. Detection of *Mycobacterium kansasii* infection in a rhesus macaque (*Macaca mulatta*) using a modified QuantiFERON-TB Gold assay [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 136(3-4): 330-334.
- [14] 汪乾坤,姜勇,童胜涛,等.猕猴结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立与初步应用[J].中国兽医学报,2015,35(9):1488-1494.
- [15] 廖娟红.新型牛结核 IFN- γ 体外释放检测法的建立和应用[D].武汉:华中农业大学,2010:38-44.
- [16] 杨新婷,杨扬,杜凤娇,等.肺结核患者全血 γ 干扰素释放试验影响因素的探讨[J].中国防痨杂志,2013,35,(12):1007-1012.

[修回日期]2016-03-19