

穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义

覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新

覃慧敏, 三峡大学第一临床医学院宜昌市中心人民医院感染科 湖北省宜昌市 443003

吴春明, 温州市中医院肝病科 浙江省温州市 325000

李洪涛, 宋建新, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科 湖北省武汉市 430030

覃慧敏, 2006年同济医学院硕士, 副主任医师, 主要从事肝病的临床和教学研究。

湖北省卫生厅科研基金资助项目, No. NX200506

作者贡献分布: 此课题由宋建新设计; 研究过程由覃慧敏、吴春明操作完成; 数据分析由覃慧敏、李洪涛完成; 本论文写作由覃慧敏、吴春明、李洪涛完成。

通讯作者: 宋建新, 430030, 武汉市硚口区解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科。

songsingsjx@sina.com

电话: 027-83663602

收稿日期: 2007-10-11 修回日期: 2008-01-26

Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance

Hui-Min Qin, Chun-Ming Wu, Hong-Tao Li, Jian-Xin Song

Hui-Min Qin, Department of Infectious Diseases, Yichang Central People's Hospital, the First College of Clinical Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443003, Hubei Province, China

Chun-Ming Wu, Department of Liver Diseases, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China

Hong-Tao Li, Jian-Xin Song, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the Research Project from Department of Public Health of Hubei Province, No. NX200506

Correspondence to: Dr. Jian-Xin Song, Department of Infectious Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. songsingsjx@sina.com

Received: 2007-10-11 Revised: 2008-01-26

Abstract

AIM: To detect the impact of andrographolide on the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats by high performance liquid chromatography and to probe its clinical significance.

METHODS: The discharge rate of mannitol (M) and lactulose (L) in cirrhosis rats was detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and compared with the standard curve.

RESULTS: The lactulose/mannitol (L/M) discharge rate in cirrhosis rats was significantly higher than that in normal rats (0.036 ± 0.012 vs 0.026 ± 0.009 , $P < 0.05$) and significantly lower in the andrographolide and norfloxacin intervention group than that in the control group (0.022 ± 0.010 , 0.022 ± 0.007 vs 0.036 ± 0.012 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The permeability of intestinal tract of cirrhosis rats is significantly higher than that of normal rats and significantly lower in the andrographolide and norfloxacin intervention group than that in the control group.

Key Words: Andrographolide; Cirrhosis; Intestinal permeability; High performance liquid chromatography

Qin HM, Wu CM, Li HT, Song JX. Role of andrographolide in the permeability of intestinal tract of cirrhosis rats and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 839-843

摘要

目的: 检测穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的影响, 并探讨其可能的临床意义。

方法: 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测研究对象尿液标本中甘露醇(mannitol, M)和乳果糖(lactulose, L)排出率比值, 通过计算甘露醇和乳果糖的排出率来评估肠道通透性。

结果: 在上述色谱条件下, 肝硬化大鼠尿液标本中乳果糖/甘露醇排出率较正常大鼠(0.036 ± 0.012 vs 0.026 ± 0.009 , $P < 0.05$)显著增高。穿心莲及诺氟沙星干预组较对照组L/M显著降低(0.022 ± 0.010 , 0.022 ± 0.007 vs 0.036 ± 0.012 , $P < 0.05$)。

结论: 肝硬化大鼠较正常大鼠肠道通透性显著性增高。肝硬化大鼠中, 穿心莲及诺氟沙星干预组大鼠的肠道通透性较对照组显著降低。

关键词: 穿心莲内酯; 肝硬化; 肠道通透性; 高效液相色谱法

■背景资料

自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化患者晚期常见的严重并发症之一, 现已明确SBP的发生及发展与肝硬化患者肠黏膜屏障功能受损、肠道通透性升高造成肠道细菌/内毒素易位等因素相关, 而肠源性内毒素血症更会造成对肝脏的“二次打击”。因此, 了解肝硬化时肠道通透性的变化情况以及临床常用抗感染药物在肠道通透性变化中的影响, 对于SBP的防治具有重要意义。

■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科; 潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■相关报道

目前,在肝硬化并发SBP的预防和治疗中,抗生素仍然占据着主要地位,但是在临床应用中,抗生素又可能引起细菌溶解而导致内毒素的释放,引起病情恶化,而且对于晚期肝硬化患者预防性使用广谱抗生素可能导致肠道菌群失调和细菌耐药,在临床应用上一直存在争议。穿心莲作为一种有抗感染作用的中草药现已广泛应用于临床,穿心莲的主要有效部分为内酯成分。有研究显示,其抗感染作用可能是通过调节部分细菌的密度阈值感应系统(Quorum Sensing System)QS系统而达到抗感染作用的。

覃慧敏, 吴春明, 李洪涛, 宋建新. 穿心莲内酯对肝硬化大鼠肠道通透性的作用及临床意义. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 839-843

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/839.asp>

0 引言

肝硬化患者晚期容易出现多种并发症,其中,自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是一种常见的严重并发症。目前研究表明肠道细菌移位(bacterial translocation, BT)是SBP发生的重要原因之一,而BT的发生与肝硬化时肠道通透性(intestinal permeability, IP)升高密切相关^[1-2]。

观察肠道通透性较为困难,现多采用间接方法即通过观察肠道大分子物质通透性的改变间接证实肠道屏障功能的变化来实现^[3]。本研究以甘露醇(mannitol, M)和乳果糖(lactulose, L)作为探针,采用高效液相色谱分析法(HPLC)测定肝硬化大鼠尿中甘露醇和乳果糖排出率比值来评估肠道通透性。

穿心莲为爵床科植物Andrographis paniculata(Burm. f. Nees),其主要有效成分是穿心内酯,目前研究证实穿心莲具有一定的抗菌、抗病毒、增强免疫等作用,临床上广泛用于治疗上呼吸道感染、细菌性菌痢等感染性疾病,但其在SBP治疗中的作用未见有报道^[4-6]。我们采用穿心莲成药作用于实验性肝硬化大鼠,观察穿心莲对肝硬化大鼠肠道通透性的影响,从而为进一步了解穿心莲在肝硬化SBP及细菌移位中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar δ 大鼠60只,体质量200-250 g(由同济医学院实验动物中心提供)。所有大鼠自由进食水,2次/wk sc 40%-50%四氯化碳油溶液(剂量:0.3 mL/100 g体质量),连续12 wk。仪器:德国Schambeck SFD GmbH高压液相色谱系统, System Gold V810(美国Beckman公司), RI2000示差折光检测器, NH2色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 mm, Waters), 超声振荡仪, 分析天平。主要试剂:乳果糖标准品和甘露醇标准品(色谱纯, Sigma公司);乳果糖分子探针(Solvay Pharmaceuticals B.V, 荷兰),甘露醇分子探针(上海源聚生物科技有限公司),硫柳汞(北京欣经科生物技术有限公司),阴阳离子交换树脂(天津标准科技有限公司),醋酸,乙腈,超纯水。

1.2 方法

1.2.1 研究对象标本的收集:造模成功后随机选取肝硬化大鼠40只,另取40只正常大鼠作为对照。将所有大鼠禁食8-10 h后,取2 mL乳果糖/甘露醇混合液(含乳果糖100 mg,甘露醇50 mg)灌胃。收集其后8 h尿液,记总量,将尿样本加防腐剂硫柳汞(0.2 mg/mL)后混匀,置于-20℃冰箱保存待检。

1.2.2 标本检测前的处理:将冻存的样品解冻,摇匀后取4 mL离心(10 000 r/min)10 min。取上清加入50 mL/L醋酸2-3滴,加热煮沸3-5 min,冷却后再次离心(10 000 r/min)10 min。取上清经阴阳离子交换树脂去离子,再以0.22 μm滤器过滤后,用超声振荡仪振荡20 min后上机待检。

1.2.3 肠道通透性的检测:(1)标准溶液的配制:精密称取乳果糖标准品5 g、甘露醇标准品2.5 g,加流动相1 L制成标准品溶液。梯度溶液的配制:精密量取上述溶液1、2、10、20、50、100、200 mL分别置1 L量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀作为标准溶液。(2)色谱条件:色谱柱: NH2柱(4.6 mm×250 mm×5 mm, Waters);高压泵: S9404SM不锈钢微量泵SS 0.01-3.0;柱温:室温;流动相:乙腈:水(70:30 V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL; RI2000示差折光检测器。(3)HPLC分析:取预处理后的尿样品0.2 mL从进样口注入至HPLC仪,由切换阀自动进样20 μL。进样后开始记录,至待测峰全部出现,基线平稳后停止记录。(4)标准曲线的绘制:用System Gold V810配套软件对色谱图进行积分处理,得峰面积积分值。以峰面积积分值为纵座标,进样浓度(mg/L)为横座标,建立甘露醇和乳果糖的标准曲线和回归方程。(5)回收率和乳果糖/甘露醇排出率L(%) / M(%)的计算:用尿样品加标准品进行测定,计算甘露醇和乳果糖的回收率。根据标准曲线和回归方程计算样品中的甘露醇排出率和乳果糖排出率,得出乳果糖/甘露醇排出率L(%) / M(%)。

统计学处理 用统计分析软件SPSS12.0进行数据分析,数据用mean±SD表示。采用t检验, P<0.05有显著性统计学意义。

2 结果

在上述色谱条件下,甘露醇和乳果糖标准品溶液、尿液样品中各组分均能实现基线分离,峰形良好。不同浓度甘露醇的加样回收率在92.7%-98%之间,乳果糖的加样回收率在91.3%-

表 1 8 h内甘露醇和乳果糖尿中排出率的比值(mean \pm SD)

分组	LAC(%)	MAN(%)	L(%) / M(%)
肝硬化大鼠	0.020 \pm 0.010 ^a	0.614 \pm 0.190	0.036 \pm 0.012 ^a
正常大鼠	0.0129 \pm 0.007	0.502 \pm 0.143	0.026 \pm 0.009

^a $P < 0.05$.

97.4%之间。

2.1 甘露醇和乳果糖的标准曲线 结果表明甘露醇和乳果糖分别在25-1000 mg/L和50-2000 mg/L, 范围内与积分峰面积呈线性关系. 回归方程分别为: $y(m) = 4032.8x + 6599.2$, $r(m) = 0.9992$; $y(l) = 1905.5x + 3499.1$, $r(l) = 0.9992$. 其中 $y(m)$ 为甘露醇浓度, $y(l)$ 为乳果糖浓度, x 为峰面积; $r(m)$ 和 $r(l)$ 分别为二者的相关系数。

2.2 峰形曲线 甘露醇和乳果糖的出峰时间分别为6.721 min和9.242 min. 见图1-2.

2.3 肝硬化大鼠和正常大鼠肠道通透性比较 结果以甘露醇(M)和乳果糖(L)在尿中的排出率及其比值表示. 数据显示肝硬化大鼠尿中乳果糖排出率及L/M比值均比正常大鼠显著增高($P < 0.05$, 表1). 肝硬化大鼠肝组织及肠道组织HE染色见图3A-B.

2.4 肝硬化大鼠各干预组肠道通透性的比较 结果以甘露醇(M)和乳果糖(L)在尿中的排出率及其比值表示. 数据显示穿心莲组和诺氟沙星组大鼠尿中乳果糖排出率及L/M比值均比对照组大鼠显著增高($P < 0.05$, 表2). 诺氟沙星组、穿心莲组及混合组肠道组织切片见图3C-E.

3 讨论

自发性细菌性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是肝硬化患者晚期常见的严重并发症之一, 现已明确SBP的发生及发展与肝硬化患者肠黏膜屏障功能受损、肠道通透性升高造成肠道细菌/内毒素易位等因素相关, 而肠源性内毒血症更会造成对肝脏的“二次打击”^[7-9]. 因此, 了解肝硬化时肠道通透性的变化情况以及临床常用抗感染药物在肠道通透性变化中的影响, 对于SBP的防治具有重要意义。

30年前Caridis *et al*^[10]首次通过引入肠黏膜通透性的概念指出, 肠黏膜上皮具有被某些物质分子以非载体或通道介导的方式进行被动扩散的特性^[11]. 正常情况下, 肠道黏膜上皮组织紧密连接完好, 可通过肠上皮细胞吸收小分子物质(如甘露醇), 但当肠道黏膜机械屏障功能受损

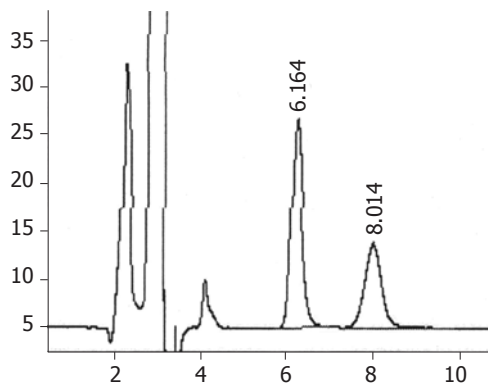


图 1 标准品的峰形曲线。

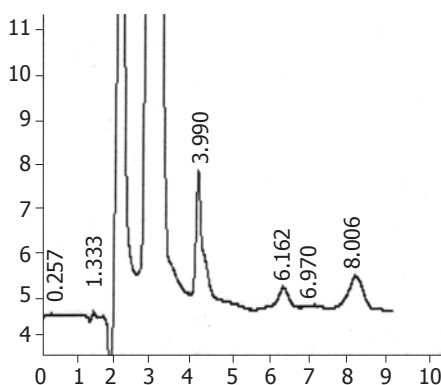


图 2 正常大鼠尿样峰形曲线。

时上皮细胞间紧密被破坏, 大分子物质(如乳果糖)在旁路的吸收会增加, 从而显示肠道通透性增高, 肠道通透性增高是肠道黏膜机械屏障功能受损的间接反映指标^[12]. 根据这一原理, 本研究应用Liu *et al*^[3]报道的方法, 即采用高压液相色谱法+示差折光检测器(HPLC-RID)检测大鼠尿中甘露醇/乳果糖排泄率的比值来反应肠道通透性。

通过应用该方法, 我们发现前者显著高于后者($P < 0.05$), 与国外报道一致^[13-15]. 其机制可能是由于硬化时门静脉压力升高, 肠道血流缓慢, 黏膜下毛细血管和静脉扩张淤血, 使氧和营养物质输送到黏膜的时间延长, 代谢产物不能及时转运. 肠微循环障碍, 黏膜出现缺血性改变. 肠黏膜血流量的改变致黏膜水肿、血管扩张、肌肉纤维增生、肠绒毛/陷窝比下降以及肌性黏膜增粗, 破坏了肠黏膜屏障的完整性, 导致肠道通透性升高^[16].

同时我们发现, 在肝硬化大鼠中, 穿心莲组、诺氟沙星组均较生理盐水对照组L/M显著降低($P < 0.05$). 数据显示: 穿心莲组的甘露醇排出率变化不大, 而乳果糖尿中排出率下降, L/M明显低于对照组中. 这表明穿心莲能增强肠上

■创新盘点

目前研究证实穿心莲具有一定的抗菌、抗病毒、增强免疫等作用, 临床上广泛用于治疗上呼吸道感染、细菌性菌痢等感染性疾病, 但其在SBP治疗中的作用未见有报道. 本文采用穿心莲成药作用于实验性肝硬化大鼠, 观察穿心莲对肝硬化大鼠肠道通透性的影响。

■应用要点

本文为进一步了解穿心莲在肝硬化SBP及细菌移位中的作用提供理论依据。

表 2 各组的肠黏膜通透性改变(mean ± SD)

分组	n	LAC(%)	MAN(%)	L/M
穿心莲组	11	0.012 ± 0.017 ^a	0.529 ± 0.145	0.022 ± 0.010 ^a
诺氟沙星组	10	0.012 ± 0.022 ^a	0.530 ± 0.128	0.022 ± 0.007 ^a
诺氟沙星+穿心莲组	9	0.014 ± 0.003	0.502 ± 0.143	0.029 ± 0.008
对照组	10	0.020 ± 0.010	0.614 ± 0.190	0.036 ± 0.012

^aP<0.05 vs 对照组.

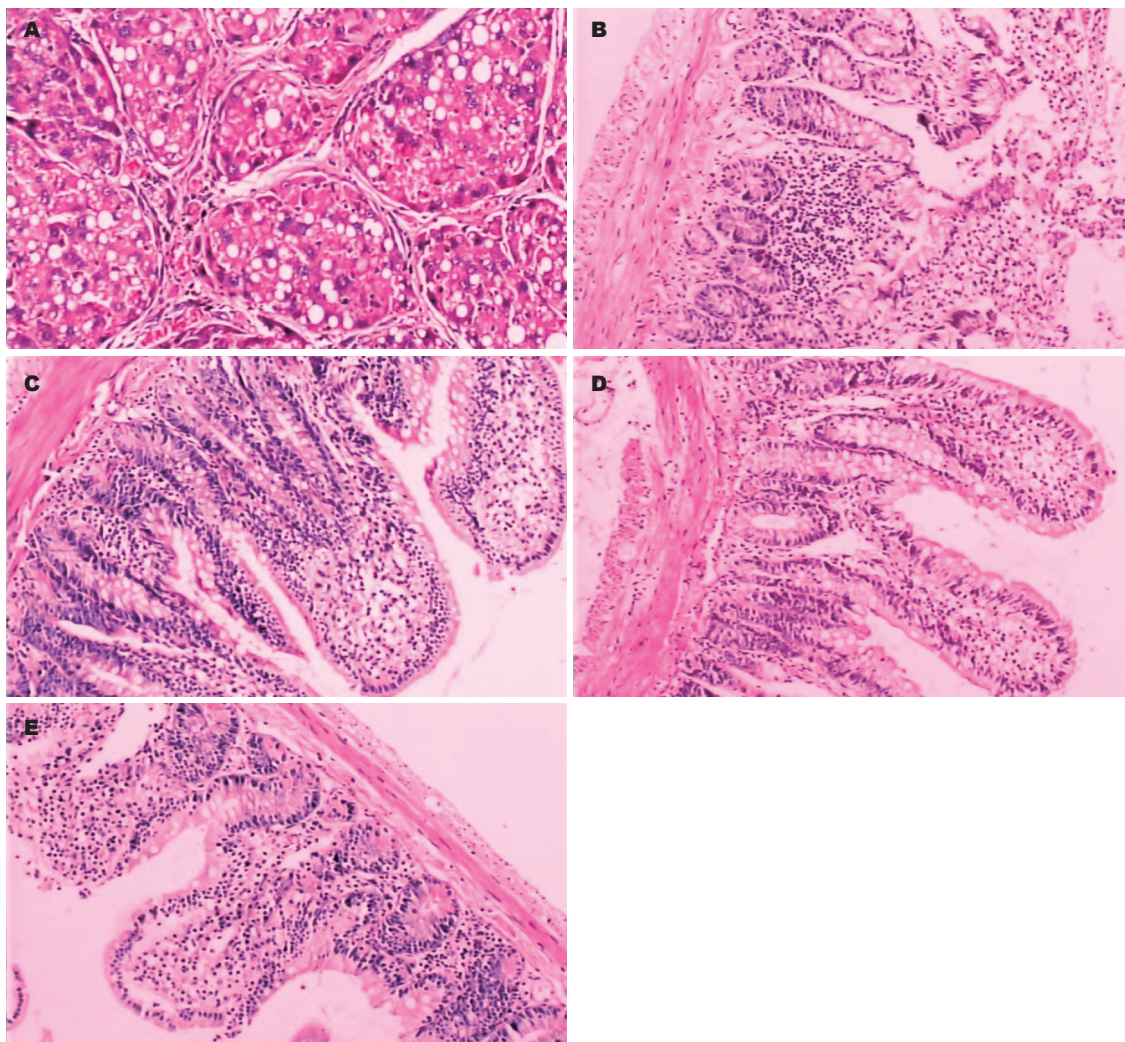


图 3 各组肠道组织及肝脏组织HE染色. A: 肝硬化模型组肝脏切片(×400); B: 肝硬化模型组肠道切片; C: 诺氟沙星组肠道切片; D: 穿心莲组肠道切片; E: 混合组肠道切片(B-E均为×800倍).

皮细胞及细胞间紧密连接,阻止肠道内大分子物质(乳果糖)的通过,吸收减少,排出率下降.提示肝硬化大鼠中,穿心莲及诺氟沙星干预组大鼠的肠道通透性较生理盐水对照组显著降低,即穿心莲和诺氟沙星可以显著降低肝硬化大鼠的肠道通透性.

目前,在肝硬化并发SBP的预防和治疗中,抗生素仍然占据着主要地位,但是在临床应用

中,抗生素又可能引起细菌溶解而导致内毒素的释放,引起病情恶化^[17],而且对于晚期肝硬化患者预防性使用广谱抗生素可能导致肠道菌群失调和细菌耐药,在临床应用上一直存在争议^[18].

穿心莲作为一种有抗感染作用的中草药现已广泛应用于临床,穿心莲的主要有效部分为内酯成分^[19],即穿心莲甲、乙、丙、丁素等,其

体外实验证实穿心莲在体外并无直接杀菌作用. 近年来研究显示, 穿心莲的抗感染作用可能是通过调节部分细菌的密度阈值感应系统(Quorum Sensing System)QS系统而达到抗感染作用的^[20]. 此外, 有实验证实穿心莲还能抑制急性炎症早期的毛细血管通透性增高而起到抗组织渗出的作用, 因而有明显抗炎作用, 其中大剂量组抗炎作用甚至强于阿司匹林, 其作用机制尚不明确^[13].

总之, 通过实验, 我们发现肝硬化大鼠较正常大鼠的肠道通透性明显升高; 穿心莲可以显著降低肝硬化大鼠的肠道通透性. 本实验中, 穿心莲+诺氟沙星组肝硬化大鼠肠道通透性与对照组相比, 无显著差异, 考虑可能与实验标本数较少有关, 另外, 穿心莲在SBP治疗及降低肠道通透性中对于剂量的依赖, 安全性等仍有待于进一步研究.

4 参考文献

- 1 Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 353-372
- 2 Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM. Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1493-1502
- 3 Liu H, Zhang S, Yu A, Qu L, Zhao Y, Huang H, Li J. Studies on intestinal permeability of cirrhotic patients by analysis lactulose and mannitol in urine with HPLC/RID/MS. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 2339-2344
- 4 顾利红, 朱品业. 薄层扫描法测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量. *中草药* 2000; 31: 260
- 5 高学敏. 中药学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 552-557
- 6 沈映君. 中药药理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 239-245
- 7 Hillebrand DJ. Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002; 5: 479-489
- 8 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 422-433
- 9 Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 961-965
- 10 Caridis DT, Reinhold RB, Woodruff PW, Fine J. Endotoxaemia in man. *Lancet* 1972; 1: 1381-1385
- 11 Lunn PG, Northrop-Clewes CA, Downes RM. Intestinal permeability, mucosal injury, and growth faltering in Gambian infants. *Lancet* 1991; 338: 907-910
- 12 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- 13 Fujii T, Seki T, Maruoka M, Tanaka J, Kawashima Y, Watanabe T, Sawamura T, Inoue K. Lactulose-L-rhamnose intestinal permeability test in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2001; 19: 158-169
- 14 Parlesak A, Schafer C, Schutz T, Bode JC, Bode C. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol* 2000; 32: 742-747
- 15 Pascual S, Such J, Esteban A, Zapater P, Casellas JA, Aparicio JR, Girona E, Gutiérrez A, Carnices F, Palazón JM, Sola-Vera J, Pérez-Mateo M. Intestinal permeability is increased in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 2003; 37: 1482-1486
- 16 Ersoz G, Aydin A, Erdem S, Yuksel D, Akarca U, Kumanlioglu K. Intestinal permeability in liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 409-412
- 17 Strauss E, Caly WR. Spontaneous bacterial peritonitis: a therapeutic update. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 249-260
- 18 Wong F, Bernardi M, Balk R, Christman B, Moreau R, Garcia-Tsao G, Patch D, Soriano G, Hoefs J, Navasa M. Sepsis in cirrhosis: report on the 7th meeting of the International Ascites Club. *Gut* 2005; 54: 718-725
- 19 邓文龙. 四种穿心莲内酯的药理作用比较. *药学学报* 1982; 17: 195
- 20 Li HT, Qin HM, Wang WH, Li GJ, Wu CM, Song JX. Effect of andrographolide on QS regulating virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006; 31: 1015-1017

■同行评价

本文立题有依据, 设计合理, 操作规范, 技术难度大, 结果可靠, 讨论观点明确, 条理性强, 研究结果先进.

编辑 潘伯荣 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版. 在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/submission@wjgnet.com>, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893寻求帮助. 投稿须知下载网址<<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxx.pdf>>审稿过程平均时间需要14 d. 来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审. 接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬). (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)