

燥湿止泻颗粒对大肠杆菌引起腹泻小鼠血清和小肠组织中 MPO 的影响

王 哲 潘帮婷 迟长安 田莉莉*

锦州医科大学畜牧兽医学院, 辽宁锦州 121001

摘要 本试验对小鼠保护性给药后,腹腔注射大肠杆菌 O101 菌液构建腹泻模型,检测小鼠血清及小肠组织中髓过氧化物酶的含量,研究燥湿止泻颗粒对致病性大肠杆菌 O101 导致腹泻小鼠髓过氧化物酶(MPO)活性的影响,探讨其对肠道的保护作用机制。试验结果显示,模型组小鼠血清和小肠组织中 MPO 活性分别为 56.67 ± 3.91 、 0.49 ± 0.17 U/g,与空白对照组(19.26 ± 2.02 、 0.26 ± 0.12 U/g)相比差异极显著;燥湿止泻颗粒高、中和低剂量组小鼠血清 MPO 活性分别为 26.82 ± 1.66 、 30.86 ± 4.03 、 51.01 ± 6.76 U/g,均极显著低于模型组,而小肠组织 MPO 活性也显著低于模型组。结果表明:燥湿止泻颗粒能够显著降低血清及小肠组织中髓过氧化物酶的活性,抑制中性白细胞在组织中的浸润,对大肠杆菌引起的小鼠腹泻具有保护作用。

关键词 燥湿止泻颗粒;大肠杆菌;腹泻;髓过氧化物酶

由致病性大肠杆菌导致的仔猪大肠杆菌性腹泻是临床较为常见的传染性疾病,也是危害养猪产业健康发展的主要疾病,发病率及死亡率逐年升高,给养殖业带来了较大的经济损失^[1]。目前,临床上治疗由大肠杆菌引起的腹泻主要应用抗生素,由于长期或不当使用抗生素药物使细菌对药物的敏感性降低,产生了严重的耐药性和药物残留^[2]。因此,采用中药来预防和治疗大肠杆菌导致的腹泻具有很好的应用价值和前景。复合中草药能反映出中药学的特点和优势,要比单味中药的治疗效果好^[3]。本试验通过燥湿止泻颗粒保护性给药后,经腹腔注射致病性大肠杆菌造成小鼠腹泻,检测血清及小肠组织中髓过氧化物酶的活性,以探讨细菌性腹泻时燥湿止泻颗粒对炎性细胞在小肠组织浸润的影响,揭示抗腹泻的作用机制,以期为临床治疗大肠杆菌所引起的腹泻提供理论数据和新的思路方法。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康昆明小白鼠,SPF 级,购于锦州医科大学实验动物中心,雌雄各半,体重达到 22 g 左右进行试验。

1.2 菌种

猪源致病性大肠杆菌 O101,菌株为 CVCC231,购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

1.3 主要试剂

燥湿止泻颗粒由本实验室保存;白头翁散(药店购入);酵母粉提取物(OXOID);胰蛋白胨(OXOID);髓过氧化物酶测试盒(购于南京建成生物工程研究所)。

1.4 试验方法

1)大肠杆菌菌悬液的制备。将 CVCC231 冻干菌株经培养后增菌培养 2~3 代,挑选单个菌落接种于 LB 液体培养基中,置 37 °C 培养箱中培养 3 h。

收稿日期:2020-04-26

基金项目:锦州医科大学大学生创新训练项目

* 通讯作者

王 哲,女,1998 年生,本科在读。

OD 值在 0.7~0.8 之间,采用平皿表面活菌计数法确定菌液浓度为 8.6×10^8 CFU/mL。

2) 药物配制。燥湿止泻颗粒、白头翁散,用灭菌蒸馏水稀释,摇匀备用。

3) 动物分组及给药。将 60 只小白鼠分为 6 组,分别为燥湿止泻颗粒(高、中、低)剂量组、阳性对照组、模型对照组和空白对照组(表 1)。禁食 12 h 后,燥湿止泻颗粒高、中、低剂量组和阳性对照组保护性给药,每只小鼠灌胃容量 0.5 mL,每天灌服 1 次,连续灌胃 5 d。末次给药 30 min 后,空白对照组腹腔注射 0.5 mL 生理盐水,其余 5 组每只小鼠腹腔注射 0.5 mL O101 菌液建立腹泻模型。

4) 样本采集。小鼠禁食不禁水 12 h 后,从小鼠尾静脉采血 0.5 mL,分离血清,备用;用二氧化碳使小鼠死亡,无菌解剖取小肠组织 200 mg,用预冷的 PBS 冲洗干净后放入液氮中保存备用。

5) 血清和组织上清的制备及髓过氧化物酶(MPO)活性的测定。小鼠尾静脉采血,室温静置 30 min,4 °C 冰箱过夜,3 000 r/min 离心 10 min 取上清,用 0.5 mL 的离心管分装,-20 °C 保存备用。按 MPO 试剂盒说明书方法进行,先配制匀浆介质,称取一定质量的小肠组织,按体积比 1:19 加匀浆介质,制备成 5% 的组织匀浆。然后按 MPO 试剂盒说明检测血清和小肠组织 MPO 的活性。

6) 数据统计与分析。应用 SPSS 19.0 软件进行统

计,试验数据表示为平均值±标准误,使用 ANOVA 多重比较分析中的 LSD 检验(*t* 检验)检验数据显著性。

2 结果与分析

2.1 腹泻模型建立及临床症状

攻毒后,模型组小鼠精神极度沉郁,被毛逆立,卷缩于笼子一角,饮食欲减少至废绝,腹式呼吸。排便次数增多,小鼠肛门周围及尾部粘有黄色稀便,腹泻率为 100%。剖检变化发现胃胀气严重;十二指肠有散在出血点,肠系膜淋巴结肿胀,肠壁变薄易断,呈半透明状;肠管膨胀扩张明显,内容物稀薄,呈水样黄色,与文献[4]相符。燥湿止泻颗粒组和阳性对照组小鼠腹泻症状轻微,精神状态良好。空白对照组小鼠未出现腹泻症状和其他临床症状,剖检未见异常。

2.2 小鼠血清及小肠组织中 MPO 的活性变化

如表 2 所示,模型对照组与空白对照组相比小鼠小肠组织中 MPO 的活性显著升高 ($P < 0.01$);燥湿止泻颗粒高、中剂量组与模型对照组相比小肠组织中 MPO 的活性显著降低 ($P < 0.05$)。模型对照组和空白对照组比较血清中 MPO 的活性显著升高 ($P < 0.01$);燥湿止泻颗粒高、中剂量组与模型对照组相比 MPO 的活性显著降低 ($P < 0.01$)。从数据结果得出,燥湿止泻颗粒能够降低大肠杆菌引起腹泻时小鼠血清及小肠组织中 MPO 的活性。

表 1 小鼠腹泻试验分组及给药

组别	动物数/只	剂量/(g/kg)
燥湿止泻颗粒高剂量组	10	3.20
燥湿止泻颗粒中剂量组	10	1.60
燥湿止泻颗粒低剂量组	10	0.80
阳性对照组	10	0.64
模型对照组	10	等容积生理盐水
空白对照组	10	等容积生理盐水

表 2 小鼠肠道和血清中 MPO 的活性

组别	样本量/ <i>n</i>	肠道中 MPO/(U/g)	血清中 MPO/(U/g)
燥湿止泻颗粒高剂量组	10	0.19±0.13**	26.82±1.66**
燥湿止泻颗粒中剂量组	10	0.31±0.21*	30.86±4.03**
燥湿止泻颗粒低剂量组	10	0.43±0.15	51.01±6.76**
阳性对照组	10	0.35±0.14	31.33±1.86**
模型对照组	10	0.49±0.17	56.67±3.91
空白对照组	10	0.26±0.12*	19.26±2.02**

注:“*”表示 $P < 0.05$,“**”表示 $P < 0.01$ 。

3 讨 论

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)为含铁溶酶体酶,是过氧化物酶家族的重要成员之一,主要存在于中性白细胞和单核-巨噬细胞中^[5]。MPO 占中性白细胞蛋白质干重的 4%,中性白细胞产生的 MPO 占循环中 MPO 含量的 95%,MPO 活性的高低直接反映出中性白细胞的浸润程度^[6]。当中性白细胞在组织中大量浸润时,MPO 活性明显升高,因此通过检测 MPO 活性可以用来表述中性白细胞的浸润程度,间接反应组织发生炎症的程度^[7-8]。

MPO 活性是评价中性白细胞在组织中浸润程度的主要指标,MPO 表达与炎症发生的严重程度呈正相关,检测 MPO 活性可作为肠道损伤程度的重要评价指标^[9-10]。本试验用燥湿止泻颗粒预防性给药后,腹腔注射致病性大肠杆菌诱导小鼠腹泻,检测血清和小肠组织中 MPO 活性的变化,观察能否抑制腹泻早期炎性细胞在小肠组织的浸润。燥湿止泻颗粒主要是由黄连、黄芩、金银花、蜘蛛香组成的中药复方,主要用于抗炎、抗腹泻等病症,具有清热燥湿、泻火解毒、消食止泻等功效。为了评价燥湿止泻颗粒的药效,本试验检测了燥湿止泻颗粒对致病性大肠杆菌诱导的腹泻小鼠血清和小肠组织中 MPO 的活性。试验结果表明,燥湿止泻颗粒高、中和低剂量组能够降低 MPO 活性,与模型对照组相比效果明显。燥湿止泻颗粒高剂量组与阳性对照组相比 MPO 值偏低,说明高剂量燥湿止泻颗粒可以明显抑制腹泻小鼠肠道炎性细胞的浸润,对于小鼠肠道的保护作用优于阳性对照药白头翁散。当机体出现炎症反应时,中性白细胞中的 MPO 释放到循环系统中,参与机体的炎症反应^[11]。同时,白细胞会跨内皮细胞迁移由血管壁穿过到达血管外形成炎细胞,在细胞因子的趋化下进入组织间隙造成组织浸润,是机体感染和炎症的基本反应^[12]。

本试验通过腹腔注射大肠杆菌建小鼠腹泻模型,观察到小鼠血清及小肠组织中 MPO 活性明显升高,而燥湿止泻颗粒高、中剂量组可明显降低腹泻小鼠血清及肠道中 MPO 的活性,与阳性对照组

(白头翁散)结果相近,说明燥湿止泻颗粒能够抑制炎性细胞在小肠组织的大量浸润。揭示燥湿止泻颗粒对腹泻小鼠肠道具有一定的保护作用,这可能与抑制中性白细胞浸润有关。

参 考 文 献

- [1] 张恒.中药“复方黄连散”防治仔猪大肠杆菌性腹泻机理的研究[D].北京:中国农业科学院,2010.
- [2] 何敏,易本驰,陈敏.猪大肠杆菌对抗生素耐药性的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2011(3):27-30.
- [3] JIAO Z L.Exploitation and research of traditional Chinese medicine compound prescriptions[J].Shaaxi J Tradit Chin Med, 2004(2):357-359.
- [4] 张晓利.白头翁复方对腹泻小鼠肠道粘膜双糖酶的影响[D].保定:河北农业大学,2010.
- [5] PODREZ E A, POLIAKOV E, SHEN Z, et al. A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (41): 38517-38523.
- [6] KLEBANOFF S J. Myeloperoxidase: friend and foe [J]. Leukoc Biol, 2005, 77(5):598-625.
- [7] OGAWA Y, KANSTSU K, LINO T, et al. Protection against dextran sulfate sodium-induced colitis microspheres of ellagic acid in rats [J]. Life Sci, 2002(71):827-839.
- [8] BAUGHA J A, BUCALA R. Macrophage migration inhibitory factor [J]. Crit Care Med, 2002(30):S27-S35.
- [9] LI X L, CAI Y Q, QIN H, et al. Therapeutic effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds in rats with TNBS-induced ulcerative colitis [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008(86):841-849.
- [10] KIYOSUE M, FUJISAWA M, KINOSHITA K, et al. Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis [J]. Neurogastroenterol, 2006, 18(11):1019-1030.
- [11] TANG W H, WU Y, NICHOLLS S J, et al. Plasma myeloperoxidase predicts incident cardiovascular risks in stable patients undergoing medical management for coronary artery disease [J]. Clin Chem, 2011, 57(1):33-39.
- [12] 王统京,张涛,穆祥,等.小檗碱对LPS诱导白细胞跨内皮迁移的影响[J].北京农学院学报,2011,26(3):2-4.

【责任编辑:胡敏】