

丁酸钠对肝性脑病大鼠血氨浓度的影响初探

张强¹, 焦晨阳¹, 李根茹¹, 葛长青¹, 张玲¹, 林维佳¹, 王珍¹, 李毓¹, 李丹丹¹, 徐传英², 孙红³ (1.徐州医学院临床医学系, 江苏 徐州 221004; 2.徐州医学院病理生理教研室, 江苏 徐州 221004; 3.徐州医学院生理教研室, 江苏 徐州 221004)

摘要: 目的 观察不同浓度丁酸钠对肝性脑病(HE)大鼠血氨浓度的影响以及对HE的防治效果。方法 采用腹腔注射硫代乙酰胺(TAA)诱导急性肝性脑病模型。饲喂两周后造模两天, 观察大鼠一般情况, 并进行神经反射评级, 血浆TBil、DBil、AST、ALT、血氨和肠道pH值等指标的测定。结果 丁酸钠各组HE大鼠TBil、DBil、ALT、AST均有所下降, 其中丁酸钠A组的肠道pH值较模型组差异有统计学意义($P < 0.05$), 丁酸钠A、B两组的血氨浓度较模型组明显降低(P 均 < 0.001)。丁酸钠处理可改善大鼠的神经反射, 降低大鼠肝性脑病的分期。结论 丁酸钠通过酸化肠道, 降低HE大鼠的血氨浓度, 进而改善HE大鼠所表现出来的精神症状。

关键词: 肝性脑病; 硫代乙酰胺; 丁酸钠; 血氨浓度

Study on effect of sodium butyrate on blood ammonia concentration of hepatic encephalopathy in rats

ZHANG Qiang¹, JIAO Chen-yang¹, LI Gen-ru¹, GE Chang-qing¹, ZHANG Ling¹, LIN Wei-jia¹, WANG Zhen¹, LI Yu¹, LI Dan-dan¹, XU Chuan-ying², SUN Hong³ (1. Department of Clinical Medicine, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China; 2. Department of Pathophysiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China; 3. Department of Physiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China)

Abstract: Objective To observe the effect of ammonia concentrations and the preventing and treating effects on hepatic encephalopathy (HE) in rats by different concentrations of sodium butyrate. **Methods** The hepatic encephalopathy rat models were induced by intraperitoneal injection thioacetamide (TAA) after fed two weeks made mould for two days. General condition and the nerve reflection, the level of TBil, DBil, ALT, AST, NH₃ in serum, the intestinal pH values and liver histopathology were detected. **Results** TBil, DBil, ALT, AST of each sodium butyrate groups were decreased. The intestinal pH value of sodium butyrate group A compared with model group was statistically significant ($P < 0.05$), blood ammonia concentrations of sodium butyrate group A and group B were significantly lower than that in model group ($P < 0.001$). In addition, sodium butyrate treatment can improve neuro-reflex, decrease the staging of HE. **Conclusions** The results indicated that the ammonia concentrations can be reduced because of the souring of the intestinal tract by sodium butyrate, which could also improve the psychiatric symptoms of the hepatic encephalopathy.

Key words: Hepatic encephalopathy; Thioacetamide; Sodium butyrate; Ammonia concentration

肝性脑病(hepatic encephalopathy, HE)是由严重肝病引起的、以代谢紊乱为基础、中枢神经系统功能失调的综合征,其主要临床表现有意识障碍、行为失常和昏迷^[1]。氨中毒学说是重要的HE发病机制。健康人氨的生成和清除维持着动态平衡,当氨的生成增多而清除不足时,过量的氨通过血脑屏障

进入脑内作为神经毒素诱发HE^[2]。临床常用乳果糖作为治疗HE的药物,其服用后可完整到达结肠而被分解成乳酸和醋酸,降低肠道pH值。乳果糖的刺激作用可导致缓泻,最终减少氨的形成和吸收^[1,3]。丁酸为弱酸,在结肠腔内90%以上丁酸以阴离子形式存在^[4]。作为稳定的丁酸盐,丁酸钠可补充人体丁酸根离子^[5]。因此本文从丁酸钠酸化肠道,降低血氨浓度进而改善HE的角度进行实验探究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SD大鼠雄性48只,清洁级,体重(160 ± 20) g,由徐州医学院实验动物中心提供。48只大鼠随机分为模型组、对照组及丁酸钠A、B、C、D 4个剂量组(每组8只),4个剂量组饲料添加丁酸钠晶体的浓度分别为1.25、1.50、2.00、2.50 g/kg。

1.2 药物与试剂 丁酸钠晶体由山东日照东润德农牧发展有限公司提供;硫代乙酰胺(TAA)由上海国药集团化学试剂有限公司提供,水合氯醛购自徐州化学试剂公司,NaCl和KCl分析纯、生理盐水等由徐州医学院基础学院机能实验学省级示范中心提供。

1.3 主要仪器 离心机、pH计、分析天平、小型漩涡混匀器等均由徐州医学院提供,全自动生化检测仪、肝素管由徐州市传染病医院检验科提供。

1.4 造模 连续饲喂大鼠两周后,采用连续两天每天腹腔注射TAA 300 mg/kg造模,造模期间大鼠自由饮食、饮水,采样前禁食16小时^[6]。从首次腹腔注射开始,为了防止大鼠电解质紊乱等并发症,每隔8小时皮下注射3 ml 10%葡萄糖、2 ml生理盐水和20 μmol KCl的等量混合液^[7]。第二次注射TAA后24小时麻醉采样后处死。

1.5 方法

1.5.1 大鼠肝性脑病分期方法 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,即可诊断为HE^[8]。按照文献^[9,10]方法,根据大鼠出现的主要神经行为异常症状和测定大鼠包括翻正反射、置位反射、角膜反射、平衡反射、惊跳反射、疼痛反射等11个神经反射把HE分为4期。I期:嗜睡、自主活动减少,反应迟缓,神经反射正

常,得分11分;II期:共济失调,反射基本正常,得分9~10分;III期:翻正反射、平衡反射、痛觉反射等神经反射逐渐消失,得分2~8分;IV期:动物昏迷角膜反射消失,得分0~1分。

1.5.2 血浆生物化学检测 肝功能检测和血氨浓度均采用全自动生化检测仪。采自下腔静脉的血样5 ml,于肝素抗凝管中抗凝保存,3000 r/min离心10分钟,取上层的血浆,送至徐州市传染病医院检验科检验,主要检测TBil、DBil、AST、ALT以及大鼠血氨浓度。

1.5.3 肠道pH值 截取大鼠回盲部后端结肠大约10 cm,准确称取结肠内容物重量,并以1:8的稀释比例加入去离子水,用小型漩涡混匀器(250次/分)混匀5分钟混合,采取pH计法检测大鼠肠道pH。

1.6 统计学处理 应用GraphPad Prism 5进行统计学分析,主要通过单因素方差分析(one-way ANOVA),数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 存活状况 对照组大鼠活动自如,体重持续增加;模型组大鼠腹腔注射TAA后出现进食饮水减少,自主活动减少,体重下降;丁酸钠4组除D组外体重在造模前均保持增加,造模后各组体重均下降;丁酸钠D组(2.5 g/kg)前期生活状态正常,饲喂1周开始出现精神不振,自主活动减少,食欲下降等症状并陆续出现死亡。至造模当天(第15天)仅剩4只,不符合数据统计学要求,故在指标观测中将丁酸钠D组排除。经过前14天的实验记录,不同浓度的丁酸钠对大鼠体重影响有较明显的统计学差异。见表1。

2.2 大鼠肝性脑病分期 于第二次腹腔注射TAA造模后24小时,观察大鼠主要神经行为异常症状、测定大鼠包括翻正反射、置位反射、角膜反射、平衡反射、惊跳反射、疼痛反射等11个神经反射,记录得分,分析可得丁酸钠处理可改善大鼠的神经反射,降低大鼠肝性脑病的分期,减轻患鼠HE程度,见表2。

2.3 丁酸钠对HE大鼠肝功能的影响 与对照组比

较，TAA模型组大鼠TBil、DBil、ALT、AST均显著升高，差异均有统计学意义（ P 均 < 0.05 ）。丁酸钠各组大鼠肝功能各项指标与模型组比较均下降；但除丁酸钠A组的AST浓度与模型组比较，差异有统计学意义以外，其余仅有下降趋势，差异均无统计学意义。丁酸钠各组间肝功能比较，差异无统计学意义，见表3。

2.4 各组HE大鼠血氨值比较 与对照组比较，模型组大鼠血氨值明显升高（ $P < 0.001$ ）；丁酸钠各组大鼠的血氨值虽较对照组升高，但是较模型组大鼠血氨值明显降低，且丁酸钠A、B组与模型组比较明显降低（ $P < 0.001$ ）；不同浓度丁酸钠处理组的血氨降低程度均有所不同，见图1。

2.5 大鼠肠道pH值的比较 与正常组比较，模型组大鼠造模后肠道pH值升高较明显（ $P < 0.01$ ），丁酸钠各组肠道pH值均低于模型组大鼠，但高于正常组；其中仅丁酸钠A组的肠道pH值与模型组比较，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ），丁酸钠B、C组与模型组比较，差异无统计学意义，见图2。

3 讨论

目前，临床上对HE的治疗手段主要是降低毒

素和改善肝脏的解毒功能。丁酸钠作为外源性补充丁酸根离子的物质，可以酸化肠道，通过对HE大鼠回盲部肠道内容物的检测，发现肝性脑病大鼠肠道pH值有显著的升高（ $P < 0.01$ ），而丁酸钠各组大鼠造模后肠道pH值较模型组均有所下降，且丁酸钠A组（浓度1.25 g/kg）大鼠肠道pH值与模型组比较，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。此外，血氨浓度显著降低（ $P < 0.001$ ）和神经反射的改善说明饲喂丁酸钠可以降低大鼠肠道pH值，通过阻断或弱化氨的肠肝循环以减少氨的吸收，改善脑细胞功能，且不同浓度的丁酸钠酸化程度略有差异，以丁酸钠A组（浓度1.25 g/kg）效果最佳。

丁酸钠在动物饲料添加剂领域被广泛应用^[11]。本研究通过对各组大鼠日增重、日采食量、料重比的监测，发现丁酸钠能明显提高大鼠日采食量（ $P < 0.01$ ），降低料重比，其中以丁酸钠B组（浓度1.5 g/kg）的效果最好（ $P < 0.001$ ）。丁酸钠C组（浓度2.0 g/kg）处理后虽然日采食量升高，但料重比的值也明显升高，说明此时的丁酸钠浓度已经对大鼠产生消极的作用，但尚未达到丁酸钠D组（浓度2.5 g/kg）产生较大死亡的程度，所以2.0 g/kg可以

表 1 不同浓度丁酸钠对大鼠生长的影响（ $n = 8$ ）

	日增重（g， $\bar{x} \pm s$ ）	日采食量（g， $\bar{x} \pm s$ ）	料重比
对照组	3.02 \pm 1.08	11.07 \pm 0.75	3.67
模型组	2.84 \pm 0.38	11.33 \pm 0.91	3.99
丁酸钠A组（浓度1.25 g/kg）	3.41 \pm 0.50	12.13 \pm 0.49 ^a	3.56
丁酸钠B组（浓度1.50 g/kg）	3.83 \pm 0.96	12.78 \pm 0.83 ^b	3.37
丁酸钠C组（浓度2.00 g/kg）	3.32 \pm 1.25	13.81 \pm 0.81	4.16

注：与对照组比较，^a $P < 0.01$ ；^b $P < 0.001$

表 2 不同浓度丁酸钠对大鼠肝性脑病神经反射和分期的影响（ $n = 8$ ）

	对照组	模型组	丁酸钠A组（浓度1.25 g/kg）	丁酸钠B组（浓度1.50 g/kg）	丁酸钠C组（浓度2.00 g/kg）
反射得分	11	0~11	8~11	9~11	7~11
HE分期（ $\bar{x} \pm s$ ）	0	3.1 \pm 1.2	2.1 \pm 0.9	2.0 \pm 0.8	2.5 \pm 0.9

表 3 各组大鼠肝功能各项指标的比较（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 8$ ）

组别	TBil（ $\mu\text{mol/L}$ ）	DBil（ $\mu\text{mol/L}$ ）	ALT（U/L）	AST（U/L）
对照组	1.01 \pm 0.57	0.62 \pm 0.31	36.67 \pm 21.04	82.63 \pm 41.48
模型组	3.67 \pm 5.56	2.28 \pm 3.48 ^a	294.70 \pm 218.9 ^b	454.90 \pm 221.90 ^b
丁酸钠A组（浓度1.25 g/kg）	2.40 \pm 1.44	1.88 \pm 0.77	100.70 \pm 92.07	186.10 \pm 147.70 ^c
丁酸钠B组（浓度1.50 g/kg）	3.20 \pm 2.50	1.81 \pm 1.11	219.80 \pm 208.20 ^b	278.70 \pm 217.30 ^a
丁酸钠C组（浓度2.00 g/kg）	7.14 \pm 3.44	4.93 \pm 2.15 ^b	355.8 \pm 187.80 ^b	375.60 \pm 159.30 ^b

注：与对照组比较，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.001$ ；^c与模型组比较， $P < 0.05$

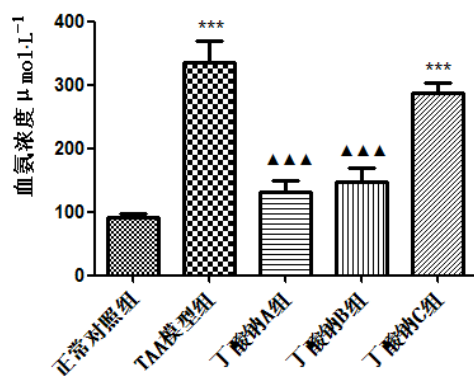


图1 各组大鼠血氨浓度比较

注: 丁酸钠A组浓度为1.25 g/kg, 丁酸钠B组浓度为1.5 g/kg, 丁酸钠C组浓度为2.0 g/kg。***与对照组比较, $P < 0.001$; ▲▲▲与模型组比较, $P < 0.001$

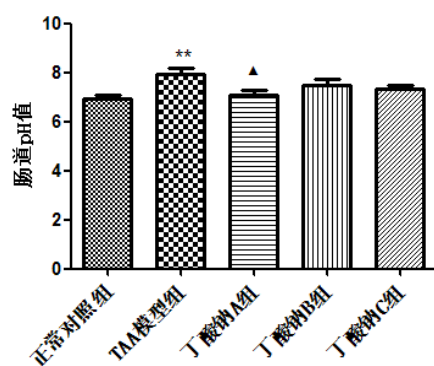


图2 各组大鼠肠道pH值比较

注: 丁酸钠A组浓度为1.25 g/kg, 丁酸钠B组浓度为1.5 g/kg, 丁酸钠C组浓度为2.0 g/kg。**与对照组比较, $P < 0.01$; ▲与模型组比较, $P < 0.05$

作为此后有关研究丁酸钠饲料添加浓度的最大值。另外, 丁酸钠通过抑制脱乙酰基作用, 抑制NF- κ B信号转导过程, 从而阻止HMGB-1合成, 因此丁酸钠可能通过吸收入血后作用于肝脏, 通过上述途径调节炎症, 减弱TAA对肝细胞的损伤, 这种观点有待于后期实验的研究和验证。

肝功能是衡量肝脏功能的重要指标, 本研究中丁酸钠各组的肝功能指标与模型组无明显的统计学差异, 仅存在下降趋势, 这可能与实验造模后大鼠处理时间较短有关。肝性脑病患者的脑病方面表现非常明显, 通过观察大鼠神经行为异常症状和测定大鼠神经反射来评估脑功能的异常略显单薄, 因此可以引入迷宫或者脑电图等指标来更加精确的反映大鼠的脑功能。

本研究结果提示丁酸钠可以通过酸化肠道降低血氨浓度, 从而达到防治肝性脑病的效果。希望通过针对价格低廉的丁酸钠对肝性脑病的防治研究, 为肝性脑病治疗提供新的途径, 为患者带来福音。国内外关于丁酸钠在畜牧业和细胞分子水平等方面的研究逐步成为热点课题, 随着研究的深入丁酸钠以及短链脂肪酸定会给人类发展带来惊喜。

参考文献

- [1] 葛均波, 徐永健. 内科学[M]. 第8版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 434-438.
- [2] 金惠铭, 王建枝. 病理生理学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 237-245.
- [3] 杨莉丽, 邹兵, 王俊萍, 等. 乳果糖和益生菌制剂预防肝性脑病的临床疗效观察[J]. 中国医药导报, 2011, 8: 75-76.
- [4] Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications[J]. Adv Exp Med Biol, 1997, 427: 123-134.
- [5] 韩晓风, 王鹏远, 马元元, 等. 丁酸钠对腹膜炎小鼠肠道屏障功能的保护[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 2: 1765-1767.
- [6] 刘赫, 梁妍, 刘雁勇, 等. 地黄苏合香合剂对轻微肝性脑病模型大鼠治疗的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 16: 904-906.
- [7] 邱华毛, 德文, 韦艾凌. 大黄煎剂对急性肝衰竭大鼠肝性脑病防治机制的实验研究[J]. 中国中医急症, 2007, 16: 195-197.
- [8] 张美华, 贾林, 杜洪, 等. 硫代乙酰胺致大鼠肝性脑病模型的量-效关系[J]. 广州医学院学报, 2004, 32: 72-74.
- [9] 陆伦根. 肝性脑病的发病机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12: 304-304.
- [10] 许瑞玲, 尹镭, 陈贤明, 等. 暴发性肝衰血脑屏障通透性改变对肝性脑病发生发展的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10: 160-163.
- [11] 周勤飞, 王永才. 丁酸钠对动物肠道影响及其应用进展[J]. 家畜生态学报, 2009, 30: 104-105.
- [12] 李军, 周祯祥. 生大黄对肝性脑病大鼠肿瘤坏死因子- α 和血氨水平的影响[J]. 中国中医急症, 2011, 20: 1265-1266.
- [13] Faijam M, Dehdab P, Abbassnia F, et al. Thioacetamide-induced acute hepatic encephalopathy in rat: behavioral, biochemical and histological changes[J]. Iran Red Crescent Med J, 2012, 14: 164-170.
- [14] 狄茜, 李扬. 丁酸钠对前列腺癌PC-3M细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2004, 9: 710-712.
- [15] 姚咏明, 徐珊, 盛志勇. 高迁移率族蛋白B1的组织损伤效应及其干预途径[J]. 中国医学科学医学报, 2007, 29: 459-465.

收稿日期: 2014-03-25