

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00913

## 参附注射液减轻重症急性胰腺炎大鼠肠屏障功能障碍及二次打击损伤

邹忠东,张再重,唐力军,涂小煌,王 烈,王 瑜\*

南京军区福州总医院普通外科研究所,福州 350025

**[摘要]** **目的:**探讨参附注射液(Shenfu injection, SFI)对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肠屏障功能障碍与二次打击的防护作用。

**方法:**雄性 Wistar 大鼠 54 只,随机分为 3 组:SAP 组(SAP,  $n=24$ ),采用逆行十二指肠胰胆管注射 5% 牛黄胆酸钠溶液制备 SAP 大鼠模型;SAP+SFI 组( $n=24$ ),建模前 2 h 先给予 SFI 10 ml/kg 体质量腹腔注射;假手术组(SO,  $n=6$ )。建模成功后 3、6、12、24 h,分别取血液和小肠、胰腺、肺脏、肝脏标本。光镜下观察小肠组织病理改变,检测各时段血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)活性,以及相应时段胰腺、肺脏、肝脏中髓过氧化物酶(MPO)含量。**结果:**SAP 组各时间点血液 TNF- $\alpha$ 、IL-6、DAO 均较 SO 组显著升高( $P<0.01$ ),6~24 h 胰腺、肺脏、肝脏 MPO 较 SO 组显著升高( $P<0.01$ );SAP+SFI 组各时间点血液 DAO、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平显著低于 SAP 组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),6~24 h 胰腺、肺脏、肝脏 MPO 显著低于 SAP 组( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );SAP+SFI 组建模后 24 h 小肠病理组织改变较 SAP 组明显减轻。**结论:**SFI 可防护 SAP 大鼠肠屏障功能障碍,并可减轻胰腺、肺脏、肝脏遭受二次打击的严重程度,其作用机制可能与减少中性粒细胞聚集、抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 相关。

**[关键词]** 参附注射液;重症急性胰腺炎;肠屏障功能障碍;二次打击;细胞因子

**[中图分类号]** R 576.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0913-04

### Protective effect of *Shenfu* injection against intestinal barrier dysfunction and second hit in rats with severe acute pancreatitis

ZOU Zhong-dong, ZHANG Zai-zhong, TANG Li-jun, TU Xiao-huang, WANG Lie, WANG Yu\*

Research Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To evaluate the protective effect of *Shenfu* injection (SFI) against intestinal barrier dysfunction and second hit in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** Fifty-four male Wistar rats were randomly divided into sham operation group ( $n=6$ ), SAP group ( $n=24$ ), and SAP+SFI group (10 ml/kg body wt,  $n=24$ ). Sham operation group underwent laparotomy only. SAP model was established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct of Wistar rats. SAP+SFI group was given SFI (10 ml/kg) intaperitoneally 2 h before SAP establishment. Rats were sacrificed at 3, 6, 12 and 24 hours after operation. The samples of pancreas, lung and liver were collected for measuring the levels of myeloperoxidase (MPO) at 3, 6, 12, and 24 h after injection of sodium taurocholate. The pathological changes of the terminal ilea were observed under light microscopy, and the blood levels of diamine oxidase (DAO), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were also measured at different time points. **Results:** The blood levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and DAO in SAP group were significantly higher than those in the sham operation group at all time points ( $P<0.01$ ). The levels of intrapulmonary, intrapancreatic and intrahepatic MPO in SAP group were significantly than those in the sham operation group at 6, 12, and 24 hours ( $P<0.01$ ). The contents of DAO, TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly decreased in SAP+SFI group compared with in SAP group at all time points ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The contents of intrapulmonary, intrapancreatic and intrahepatic MPO were significantly decreased in SAP+SFI group compared with SAP group at 6, 12, and 24 h after operation ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Intestinal pathological damages were obviously milder in SAP+SFI group than that in SAP group at 24 h after operation. **Conclusion:** SFI can protect the small intestine mucosal barrier and other organs from second hit by reducing the polymorphonuclear leucocyte detaining and inhibiting TNF- $\alpha$  and IL-6.

**[KEY WORDS]** Shenfu injection; severe acute pancreatitis; intestine barrier functional disturbance; second attack; cytokines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8):913-916]

**[收稿日期]** 2008-12-20 **[接受日期]** 2009-02-20

**[基金项目]** 福建省自然科学基金(2006J0372), Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province(2006J0372).

**[作者简介]** 邹忠东,博士,副教授、副主任医师,硕士生导师. E-mail: fzptwk@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0591-24937077, E-mail: fzptwk@163.com

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)起病急骤,病情危重,病死率常高达20%~30%,导致患者死亡的主要原因是胰腺坏死组织继发感染以及由此产生的全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)。研究发现,肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance, IBFD)是导致SAP相关SIRS和MODS的关键因素,并对SAP发生、发展和转归有着重要影响;有效防护IBFD是SAP治疗中的重要环节,对减少SAP并发症、降低死亡率有重要意义<sup>[1-3]</sup>。参附注射液(Shenfu injection, SFI)的主要成分为红参、附片,主要用于阳气暴脱的厥脱症(感染性、失血性、失液性休克等);近来,研究表明SFI能够减轻SIRS大鼠肝、肺组织病理损伤程度<sup>[4]</sup>。本研究旨在观察SFI对SAP大鼠肠屏障功能及二次打击的防护作用,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 SFI(国药准字Z20043116,批号071102)购自雅安三九药业有限公司, TNF- $\alpha$ 、IL-6检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司(批号20071206), MPO试剂盒、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号20080112),牛磺胆酸钠为Sigma公司产品。

1.2 实验动物和分组 54只成年健康雄性清洁级Wistar大鼠,体质量220~250g,由中国科学院上海实验动物中心提供。按随机数字表法分为3组, SAP组( $n=24$ )采用胆胰管逆行注入5%牛磺胆酸钠溶液建立SAP模型;SAP+SFI组( $n=24$ )建模前2h先给予腹腔注射SFI 10 ml/kg;假手术组(SO,  $n=6$ )开腹后仅翻动胰腺。前两组根据不同时间点再分为建模后3 h、6 h、12 h和24 h共4个亚组。

1.3 SAP模型制备 参照文献<sup>[5]</sup>方法并改良建立SAP模型。实验前,大鼠禁食12 h,自由饮水。以戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,严格无菌条件下,上腹正中切口进腹,找到胆胰管汇入十二指肠乳头处,4号头皮静脉针于十二指肠乳头附近穿刺十二指肠壁,进入胆胰管,并逆行刺入胆胰管约0.5 cm深度,同时动脉夹夹闭肝门处胆总管,匀速注入5%牛磺胆酸钠溶液1 ml/kg,滞留2 min后去除动脉夹和针头,保持管内压力10 min,关腹。术后10 min尾静脉注射生理盐水5 ml/kg,以补充术中丢失的液体。

1.4 各项指标检测 各组大鼠在规定时间内注射致死剂量的戊巴比妥钠(200 mg/kg)处死,严格无菌条件下取血液和小肠、胰腺、肝脏、肺脏标本。

1.4.1 小肠组织形态学观察 取末端回肠标本2 cm左右,10%甲醛固定,修剪、脱脂、石蜡包埋和切片, H-E染色,光镜下观察组织形态学改变。

1.4.2 DAO活性测定 取腹主动脉血液,室温静置30 min, 2 000  $\times$  g离心10 min,分离血浆-70℃低温保存。通过测定血浆DAO活性来反应肠通透性改变。测试方法及步骤参照黎君友等<sup>[6]</sup>建立的分光光度法进行,436 nm处测光密度(D)值。

1.4.3 促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6测定 取腹主动脉血液,室温静置30 min, 2 000  $\times$  g离心10 min,分离血浆-70℃低温保存。采用ELISA法检测TNF- $\alpha$ 、IL-6含量。操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.4 胰腺、肝脏和肺脏组织髓过氧化物酶(MPO)含量检测 各组在规定时间内分别取相同部位胰腺、肝脏和肺脏组织1 g左右,液氮保存,制备组织匀浆。高速冷冻离心机4℃ 600  $\times$  g离心10 min后,取上清液于10 000  $\times$  g下离心20 min,最后再取上清液-70℃低温保存。采用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)法测定各组织中MPO活性,以每克组织蛋白在37℃反应体系中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>被分解1  $\mu$ mol为1个酶活性单位。操作严格按照MPO检测试剂盒进行。

1.5 统计学处理 应用SPSS 13.0统计软件分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间有显著性差异时,采用最小显著差法(LSD)进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠小肠组织形态学观察结果 光学显微镜下,SAP组大鼠各时间点均出现不同程度的小肠绒毛稀疏、肿胀,炎性细胞浸润,上皮细胞脱落,以建模后24 h改变最为严重;SAP+SFI组大鼠建模后24 h小肠绒毛数量和高度接近SO组,有少量的炎性细胞浸润和上皮细胞脱落(图1)。

2.2 各组大鼠血浆DAO活性检测结果 SAP组3~24 h各时间点血浆DAO均显著高于SO组( $P < 0.01$ );SAP+SFI组3~24 h各时间点血浆DAO均显著低于同时间点SAP组( $P < 0.01$ ),但仍显著高于SO组( $P < 0.01$ ,图2)。

2.3 各组大鼠血浆促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6检测结果 SAP组各时间点血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6均较SO组显著升高( $P < 0.01$ ),12 h达最高水平;SAP+SFI组各时间点血浆TNF- $\alpha$ 、IL-6均显著低于SAP组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),但6~24 h TNF- $\alpha$ 、3~24 h IL-6仍显著高于SO组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ,图3)。

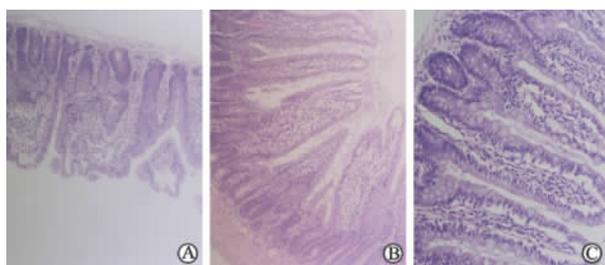


图 1 各组大鼠末端回肠光镜图片

Fig 1 Light microscopic images of terminal ilea in different groups(H-E)

A; 24 h after operation in SAP group; B; 24 h after operation in SAP+SFI group; C; SO group. Original magnification;  $\times 40$

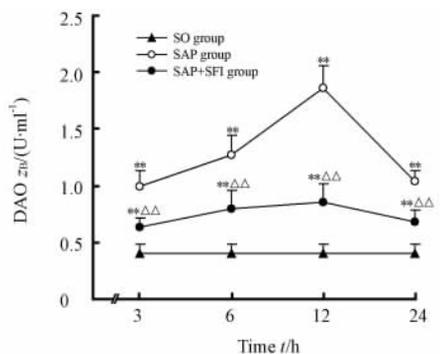


图 2 各组血浆 DAO 活性变化

Fig 2 Changes of plasma DAO levels in 3 groups

\*\*  $P < 0.01$  vs SO group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs SAP group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

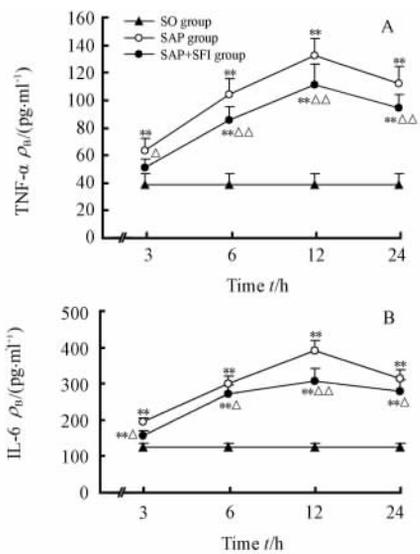


图 3 各组大鼠血浆 TNF- $\alpha$ (A) 和 IL-6(B) 水平变化

Fig 3 Changes of plasma TNF- $\alpha$ (A) and IL-6(B) levels in 3 groups

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs SO group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs SAP group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.4 各组大鼠胰腺、肝脏和肺脏组织 MPO 检测结果 SAP 组 6~24 h 3 个时间点各组织 MPO 均较 SO 组显著升高 ( $P < 0.01$ ); SAP+SFI 组 6~24 h 3 个时间点各组织 MPO 显著低于 SAP 组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 4)。

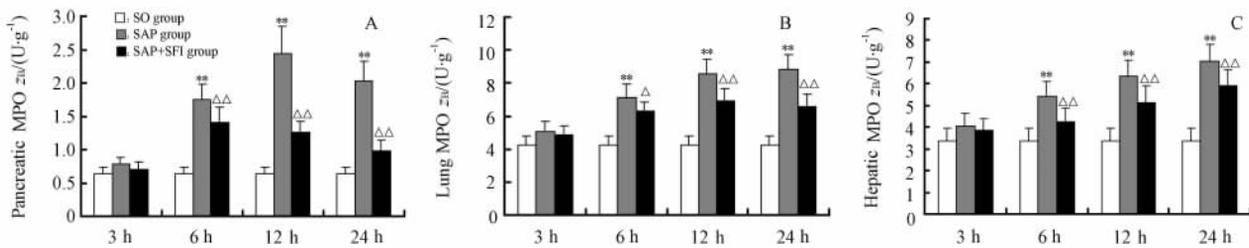


图 4 各组大鼠胰腺(A)、肺(B)、肝(C)组织 MPO 活性变化

Fig 4 MPO activity changes in pancreatic(A), lung(B) and liver(C) tissues in 3 groups

\*\*  $P < 0.01$  vs SO group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs SAP group.  $n = 6, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

肠道是全身应激反应的中心器官之一, 正常的肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成, 对维护机体的生理状态起着重要作用。SAP 时可继发 IBFD, 一方面直接导致细菌和(或)内毒素移位至坏死胰腺组织继发胰腺感染, 另一方面肠道细菌和(或)内毒素进入体循环, 刺激已活化的单核细胞和巨噬细胞, 促进其释放细胞因子和炎

症介质, 进而启动 SIRS 并引起 MODS<sup>[7]</sup>。因此, SAP 相关 IBFD 是导致 SAP 较高死亡率的主要原因之一, 有效防护 IBFD 对于控制 SAP 病情发展、改善预后、降低死亡率具有重要意义<sup>[8]</sup>。

有研究<sup>[9]</sup>表明, 参附注射液除了可以改善心功能不全和抗休克之外, 还能够抑制炎症、改善微循环, 减轻 SIRS 严重程度, 但其作用机制仍未阐明。DAO 是小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶, 其他组织或细胞中几乎不存在, 生理状态下血

浆中 DAO 活性很低,当肠黏膜受损时,细胞释放大 量 DAO 入血,使血中 DAO 含量升高。因此,血液 DAO 含量可客观反映肠黏膜结构完整性,而肠黏膜结构的破坏是发生 IBFD 的基础,故检测血液 DAO 也可间接反映肠黏膜屏障功能<sup>[10]</sup>。逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠法建立 SAP 动物模型,具有简便、可靠、价格低廉等特点,更适合 SAP 发病机制和治疗学的研究<sup>[5]</sup>。本研究采用该法制备 SAP 大鼠模型,发现 SAP 大鼠小肠发生明显的组织病理学改变,肠黏膜结构完整性受到严重破坏,血液 DAO 含量显著升高,提示 SAP 大鼠继发 IBFD,给予 SFI 预处理后能够减轻小肠组织病理改变,有效降低血浆 DAO 含量,维护肠道黏膜结构和功能完整性,减轻 IBFD 严重程度。

胰腺腺泡细胞早期产生和释放的促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 在 SAP 相关 IBFD、SIRS 和 MODS 发生发展中起着重要作用<sup>[11-12]</sup>,是 SAP 中最早升高并起关键作用的炎症启动因子,不但能直接损伤机体细胞,还可诱发其他促炎细胞因子的释放,引起连锁反应,进而导致 SIRS。同时,TNF- $\alpha$ 、IL-6 还可损伤肠道上皮细胞间的紧密连接,破坏肠道黏膜屏障完整性,并诱导肠黏膜细胞凋亡。其对肠道黏膜的损伤作用,是导致 IBFD 并引起细菌和(或)内毒素移位的机制之一,并在 IBFD 发生过程中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。本研究表明,SFI 可显著降低 SAP 大鼠血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平,能够降低 SAP 的严重程度,防护 SAP 相关 IBFD,进而抑制 SIRS 的发展。另外,较高浓度的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等细胞因子,还可进一步刺激已活化的单核巨噬细胞,释放更多的细胞因子和炎性介质,引起循环中第二次细胞因子高峰,对机体造成“二次打击”<sup>[15]</sup>。MPO 为中性粒细胞中存在的特殊过氧化酶,具有细胞特异性,组织中 MPO 含量可客观地反映该组织中中性粒细胞聚集与活化程度。本研究中,SAP 大鼠建模 6 h 后胰腺、肺脏、肝脏 MPO 显著升高,表明出现组织损伤,SFI 预处理后可以显著降低 SAP 大鼠建模 6~24 h 胰腺、肺脏、肝脏组织 MPO,抑制中性粒细胞的聚集,提示其能够保护 SAP 大鼠重要脏器,有效防护二次打击损伤。

综上所述,SFI 具有防护 SAP 大鼠肠屏障功能障碍的作用,并可减轻胰腺、肺脏、肝脏遭受二次打击的严重程度,发挥保护机体重要脏器的作用。本实验提示,其作用机制可能与减少机体器官内中性

粒细胞聚集、抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 相关。

## [参考文献]

- [1] Nagpal K, Minocha V R, Agrawal V, Kapur S. Evaluation of intestinal mucosal permeability function in patients with acute pancreatitis [J]. *Am J Surg*, 2006, 192: 24-28.
- [2] Jha R K, Yong M Q, Chen S H. The protective effect of resveratrol on the intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14: BR14-BR19.
- [3] 程礼, 王兴鹏, 汪佩文, 靖大道, 徐敏, 陈洁. 保护肠屏障功能对重症急性胰腺炎患者预后的影响 [J]. *胃肠病学*, 2005, 10: 24-26.
- [4] Wang J, Qiao L F, Yang G T. Role of Shenfu Injection in rats with systemic inflammatory response syndrome [J]. *Chin J Integr Med*, 2008, 14: 51-55.
- [5] 许永春, 李兆申, 屠振兴, 满晓华. 改良逆行胆胰管注射法制备轻重不同两种大鼠急性胰腺炎模型 [J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25: 1251-1252.  
Xu Y C, Li Z S, Tu Z X, Man X H. Development of severe and mild acute pancreatitis rats models by modified retrograde cholangiopancreatic duct infusion of bile salt [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2004, 25: 1251-1252.
- [6] 黎君友, 孙丹, 吕艺, 晋桦, 胡森, 盛志勇. 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12: 464-466.
- [7] Rychter J W, van Minnen L P, Verheem A, Timmerman H M, Rijkers G T, Schipper M E, et al. Pretreatment but not treatment with probiotics abolishes mouse intestinal barrier dysfunction in acute pancreatitis [J]. *Surgery*, 2009, 145: 157-167.
- [8] Liu H, Li W, Wang X, Li J, Yu W. Early gut mucosal dysfunction in patients with acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2008, 36: 192-196.
- [9] 王进, 刘德宏, 杨光田. 参附注射液对内毒素所致大鼠全身炎症反应综合征的作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2006, 13: 23-26.
- [10] Ruan P, Gong Z J, Zhang Q R. Changes of plasma D(-)-lactate, diamine oxidase and endotoxin in patients with liver cirrhosis [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3: 58-61.
- [11] Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators [J]. *Shock*, 2005, 24 (Suppl 1): 45-51.
- [12] de-Madaria E, Martínez J, Sempere L, Lozano B, Sánchez-Payá J, Uceda F, et al. Cytokine genotypes in acute pancreatitis: association with etiology, severity, and cytokine levels in blood [J]. *Pancreas*, 2008, 37: 295-301.
- [13] Leindler L, Morschl E, László F, Mándi Y, Takács T, Jármai K, et al. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats [J]. *Pancreas*, 2004, 29: 157-161.
- [14] Hang C H, Shi J X, Li J S, Li W Q, Wu W. Expressions of intestinal NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , and IL-6 following traumatic brain injury in rats [J]. *J Surg Res*, 2005, 123: 188-193.
- [15] Lankisch P G, Bruns A, Doobe C, Weber-Dany B, Maisonneuve P, Lowenfels A B. The second attack of acute pancreatitis is not harmless [J]. *Pancreas*, 2008, 36: 207-208.

[本文编辑] 孙岩