

参附注射液对脓毒症大鼠肠黏膜屏障功能的影响

金水芳, 江荣林*, 雷 澍, 邢 茜, 朱美飞

(浙江中医药大学附属第一医院, 杭州市上城区邮电路 54 号, 310006)

摘要 目的 观察参附注射液对脓毒症大鼠肠黏膜屏障功能的影响及可能作用机制。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、参附注射液组各 16 只。除假手术组外, 其余大鼠采用盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型。造模成功后 2 h 参附注射液组腹腔注射参附注射液 20 ml/kg, 假手术组和模型组腹腔注射等量生理盐水。术后 12、24 h 分别处死 8 只大鼠, 观察各组大鼠小肠黏膜病理改变并评分; ELISA 方法检测小肠黏膜分泌型 IgA 水平, 流式细胞术检测小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率的变化。结果 术后 12、24 h, 模型组与假手术组比较, 大鼠小肠黏膜损伤指数评分均显著增加, 小肠黏膜分泌型 IgA 水平以及 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率均显著降低 ($P < 0.05$); 参附注射液组与模型组比较, 小肠黏膜损伤指数评分显著下降, 小肠黏膜分泌型 IgA 水平以及 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率显著上升 ($P < 0.05$)。结论 参附注射液可能通过促进小肠黏膜分泌型 IgA 分泌和上调 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞表达, 保护脓毒症大鼠肠黏膜屏障功能。

关键词 脓毒症; 参附注射液; 肠黏膜屏障; 分泌型免疫球蛋白 A; 淋巴细胞

脓毒症是目前危重病医学所面临的主要问题之一, 是严重感染导致的全身炎症反应, 常伴随重要器官功能如肠道功能异常, 尤其是肠黏膜屏障在脓毒症的发生和发展过程中起着重要作用^[1-3]。近年来, 随着对脓毒症肠道菌群移位、肠源性感染以及多器官功能障碍综合征的深入研究, 肠黏膜屏障功能日益受到重视, 而肠黏膜屏障的改变与其局部免疫状态有密切关系^[4]。参附注射液提取自红参和黑附子, 其主要有效成分为人参皂苷和乌头生物碱, 具有益气扶正、补气通阳的功效^[5]。本实验通过检测脓毒症大鼠小肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (IgA) 水平和 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率的变化, 探讨参附注射液对脓毒症大鼠肠黏膜屏障功能的影响, 以期临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 48 只, 体质量 250 ~ 300 g, 雌雄各半, 由浙江中医药大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 药物、试剂与仪器

参附注射液购自雅安三九药业有限公司 (国

药准字: Z20043117)。大鼠脏器组织淋巴细胞分离液 LTS1083P 购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司 (批号: 20120106); FITC-CD3 和 PE-TCR γ/δ 大鼠抗体购自美国 BioLegend 公司 (货号: 201403 和 202605); 大鼠分泌型 IgA ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司 (批号: 1202062)。EpicsAltra 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司。BH-2 型光学显微镜, 日本 Olympus 公司。

1.3 模型制备和分组

SD 大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、参附注射液组各 16 只。参照文献 [6], 采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型。腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 麻醉大鼠, 固定、备皮、消毒、铺无菌洞巾, 在腹部正中做一长约 1.5 cm 的切口, 暴露盲肠, 在盲肠中外 1/3 处结扎, 然后在被结扎盲肠的正中位置用 16 号针对穿 2 次, 挤出少量粪便, 还纳盲肠, 逐层缝合腹壁切口、皮肤, 再次消毒切口周围皮肤, 术毕。假手术组大鼠进行相同步骤的手术操作, 但没有盲肠结扎和穿孔。模型成功标准: 发热 (肛温超过自身正常对照值 1℃)、心率加快 (增加 50%, 或约 2 倍于自身正常对照值)、呼吸频率增加 (2 倍于自身正常

基金项目: 浙江省中医药防治重大疾病攻关计划 (2012ZG001)

* 通讯作者: jiangronglin@126.com, (0571) 86620356

对照值)、白细胞总数变化(正常对照值的 2 倍或减少 50%)等。排除观察期间出现造模不成功或死亡的动物并重新造模补充。

造模成功后 2 h, 参附注射液组一次性给予腹腔注射 20 ml/kg 参附注射液, 假手术组和模型组腹腔注射等量生理盐水。

1.4 观察指标及方法

各组分别于术后 12、24 h 采用随机数字表法选取 8 只大鼠处死, 从回盲部以上 5 cm 处取小肠组织 5 cm 置于 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察病理改变, 根据 Chiu 小肠黏膜损伤评分方法^[7]观察大鼠小肠黏膜损伤指数, 对小肠黏膜损伤程度进行分级。具体分级标准如下: 0 分: 肠黏膜绒毛正常; 1 分: 绒毛顶端上皮出现囊状间隙, 并伴有毛细血管充血; 2 分: 上皮间隙扩大, 中度固有层水肿, 中央乳糜管扩张; 3 分: 固有层明显水肿, 肠黏膜上皮层细胞变性、坏死、少数绒毛顶端脱落; 4 分: 上皮细胞层变性、坏死、脱落、部分绒毛脱落, 固有层裸露, 毛细血管扩张、充血; 5 分: 绒毛脱落、固有层崩解, 出血或溃疡形成。

另取两段 15 cm 小肠组织采用 ELISA 方法检测小肠黏膜分泌型 IgA 水平和流式细胞术检测小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率的变化, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Scheffe 法。

2 结果

2.1 各组大鼠小肠黏膜病理改变

光学显微镜下假手术组大鼠各时间点小肠黏膜组织结构完整, 肠绒毛排列整齐, 清晰可见浆膜层、肌层、固有层以及黏膜层, 甚至可见黏液层。模型组大鼠小肠黏膜厚度明显变薄, 肠绒毛排列不整齐, 部分区域有绒毛上皮成块剥离, 甚至完全脱落, 部分绒毛顶端破损, 仅有固有层, 局部可见固有层崩解。参附注射液组大鼠小肠黏膜也可见间质

水肿, 绒毛增粗缩短, 排列较为整齐, 部分绒毛尖端抬高, 个别与固有层剥离或绒毛上皮轻度脱落。

2.2 各组大鼠不同时间点小肠黏膜损伤指数评分比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组 12、24 h 小肠黏膜损伤指数评分均显著增加 ($P < 0.05$); 参附注射液组 12、24 h 小肠黏膜损伤指数评分较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点小肠黏膜损伤指数评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	12 h	24 h
假手术组	8	0.38 $\pm$ 0.52	0.25 $\pm$ 0.46
模型组	8	3.88 $\pm$ 0.64*	4.00 $\pm$ 0.76*
参附注射液组	8	2.38 $\pm$ 0.74 Δ	1.88 $\pm$ 0.64 Δ

注: 与假手术组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠不同时间点小肠黏膜分泌型 IgA 水平比较

表 2 示, 模型组大鼠 12、24 h 小肠黏膜分泌型 IgA 水平较假手术组均显著降低 ($P < 0.05$)。参附注射液组 12、24 h 小肠黏膜分泌型 IgA 水平较模型组均显著上升 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠不同时间点小肠黏膜分泌型 IgA 水平比较 ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	12 h	24 h
假手术组	8	179.27 $\pm$ 15.67	170.89 $\pm$ 18.40
模型组	8	79.44 $\pm$ 4.49*	71.42 $\pm$ 4.97*
参附注射液组	8	123.08 $\pm$ 10.46 Δ	115.43 $\pm$ 14.36 Δ

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠不同时间点小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率比较

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组 12、24 h 小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率均显著降低 ($P < 0.05$)。参附注射液组 12、24 h 小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率较模型组均显著上升 ($P < 0.05$)。

3 讨论

脓毒症发病机制非常复杂, 涉及感染、炎症、

表 3 各组大鼠不同时间点小肠黏膜 CD3⁺、 $\gamma\delta$ T 细胞百分率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD3 ⁺		$\gamma\delta$ T	
		12 h	24 h	12 h	24 h
假手术组	8	53.38 $\pm$ 5.25	51.03 $\pm$ 7.42	12.89 $\pm$ 2.78	12.16 $\pm$ 2.76
模型组	8	30.56 $\pm$ 7.01*	32.59 $\pm$ 4.43*	4.14 $\pm$ 1.24*	3.59 $\pm$ 0.86*
参附注射液组	8	49.09 $\pm$ 8.54 Δ	48.91 $\pm$ 9.28 Δ	7.36 $\pm$ 1.40 Δ	7.13 $\pm$ 2.35 Δ

注: 与假手术组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$;

免疫、凝血及组织损害等一系列问题,并与机体多系统多器官病理生理变化密切相关。目前认为肠黏膜屏障功能障碍和机体免疫功能降低是导致肠黏膜损害的主要因素^[8]。脓毒症时肠黏膜屏障功能障碍,从而肠黏膜通透性增高,炎症介质和细胞因子大量释放,机体免疫功能降低,启动全身炎症反应综合征,并引起多器官功能障碍综合征^[9]。在本实验中,脓毒症大鼠肠黏膜损伤指数评分升高,光镜下显示肠黏膜厚度明显变薄,肠绒毛排列不整齐,部分区域有绒毛上皮成块剥离,甚至完全脱落,部分绒毛顶端破损,仅有固有层,局部可见固有层崩解,均说明脓毒症大鼠肠道机械屏障已明显受损。肠黏膜结构的损害将影响肠黏膜局部支持系统屏障功能,如免疫屏障以及相应的营养供给和代谢,从而降低肠黏膜的更新和修复能力。参附注射液具有益气扶正、补气通阳的作用,使阳气畅达,推动气血在经络中流畅运行,及时恢复脏器的正常机能,抑制脓毒症对肠黏膜的损伤,防止脓毒症进一步恶化^[10]。肠道作为机体最大的免疫器官,分泌型 IgA 起着核心作用^[11],增加其分泌也是改善脓毒症肠道和全身炎症状态的重要环节。本实验中各时间点模型组分泌型 IgA 水平均较假手术组显著降低,说明肠黏膜局部免疫功能在一定程度上受到抑制。而与模型组比较,参附注射液组各时间点分泌型 IgA 水平均显著增加,提示肠黏膜局部免疫屏障功能得到明显改善。

$\gamma\delta$ T 细胞是 T 淋巴细胞的一个特殊亚群,主要分布在皮肤和黏膜组织中,是机体的一种重要的免疫细胞,在正常人外周血 T 淋巴细胞中一般不超过 5%,但在表皮及肠黏膜组织中大量存在(约占 40%),在病原菌感染状态时活化和增殖^[12],因此其可谓是机体抵抗外界病原菌的第一道防线。研究发现, $\gamma\delta$ T 细胞通过调节免疫反应,在机体抗感染免疫、自身免疫疾病以及器官移植免疫耐受的产生和维持中发挥重要作用^[13-14]。本实验中,脓毒症模型组大鼠各时间点肠黏膜 CD3⁺ 细胞百分率与假手术组比较显著降低, $\gamma\delta$ T 细胞百分率也有一定程度的降低,提示脓毒症时肠黏膜免疫功能受到抑制,从而为脓毒症的发展、恶化提供了内在条件。参附注射液可提高机体的细胞免疫功能,在 T 淋巴细胞成熟过程中至关重要,其可诱导肠黏膜 T 淋巴细胞的增殖,显著提高 CD3⁺ 和 $\gamma\delta$ T 细胞百分率,从而对肠黏膜免疫屏障起到了一定的保护作用。

总之,参附注射液不仅可以抑制脓毒症对大鼠肠黏膜功能及结构的损害,甚至可以明显提高肠黏膜的免疫屏障功能,从而达到保护肠黏膜功能的作用。当然,本研究仍需要进行大样本临床试验研究以进一步确定其临床应用价值。

参考文献

- [1] Blanco J, Muriel-Bombín A, Sagredo V, et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study [J]. Crit Care, 2008, 12(6): R158.
- [2] 盛志勇, 姚咏明. 脓毒症与多器官功能障碍综合征 [J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(10): 653-654.
- [3] Rowlands BJ, Soong CV, Gardiner KR. The gastrointestinal tract as a barrier in sepsis [J]. Br Med Bull, 1999, 55(1): 196-211.
- [4] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes [J]. World J Surg, 1996, 20(4): 411-417.
- [5] 杨靖, 谢雁鸣, 李霖, 等. 基于医院信息系统的参附注射液治疗危重症临床用药特点分析 [J]. 中医杂志, 2014, 55(12): 1059-1062.
- [6] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85(2): 205-211.
- [7] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.
- [8] Puleo F, Arvantitakis M, Van Gossum A, et al. Gut failure in the ICU [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2011, 32(5): 626-638.
- [9] Cawcutt KA, Peters SG. Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management [J]. Mayo Clin Proc, 2014, 89(11): 1572-1578.
- [10] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识 [J]. 北京中医, 2007, 26(4): 198-200.
- [11] Liu C, Li A, Weng YB, et al. Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(46): 5843-5850.
- [12] 金水芳, 江荣林, 邢茜, 等. 参附注射液对脓毒症大鼠外周血 CD3⁺ 和 $\gamma\delta$ T 细胞的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(12): 1355-1357.
- [13] Lee WY, Hu YM, Ko TL, et al. Glutamine modulates sepsis-induced changes to intestinal intraepithelial $\gamma\delta$ T lymphocyte expression in mice [J]. Shock, 2012, 38(3): 288-293.
- [14] Han G, Geng S, Li Y, et al. $\gamma\delta$ T-cell function in sepsis is modulated by C5a receptor signalling [J]. Immunology, 2011, 133(3): 340-349.

Effect of *ShenFu Injection* (参附注射液) on the Intestinal Mucosal Barrier Function of Sepsis Rats

JIN Shuifang, JIANG Ronglin, LEI Shu, XING Qian, ZHU Meifei

(The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Province 310006, China)

ABSTRACT Objective To observe effect and possible mechanism of action of *ShenFu Injection* on the intestinal mucosal barrier function of sepsis rats. **Methods** 48 Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, model group, and *ShenFu Injection* group, with 16 rats in each group. The sepsis models were produced with cecum ligation perforation in all rats except those in the control group. Two hours after successful molding, *ShenFu Injection* group was given 20 ml/kg of *ShenFu Injection* intraperitoneally, the control group and the model group were given equivalent amount of normal saline intraperitoneally. 12 h and 24 h after the surgery 8 rats were executed respectively in each group to observe and grade the pathological changes of small intestinal mucosa. ELISA method was used to detect the level of secretory IgA in small intestinal mucosa. Flow cytometry was applied to detect percentage changes of small intestinal mucosa CD3⁺ and $\gamma\delta$ T cell. **Results** 12 h and 24 h after the surgery, compared with the control group, the score of the small intestine mucosa damage index increased significantly, but the level of secretory IgA in small intestinal mucosa and percentages of CD3⁺ and $\gamma\delta$ T cells decreased significantly in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the score of the small intestine mucosa damage index decreased significantly, but the level of secretory IgA in small intestinal mucosa and percentages of CD3 and $\gamma\delta$ T cells increased significantly in the *ShenFu Injection* group ($P < 0.05$). **Conclusion** *ShenFu Injection* may protect the intestinal mucosal barrier function of Sepsis rats by promoting small intestinal mucosa to secrete secretory IgA and increasing the expression of CD3⁺ and $\gamma\delta$ T cell.

Keywords sepsis; *ShenFu injection* (参附注射液); intestinal mucosal barrier; secretory Immunoglobulin A (IgA); lymphocyte

(收稿日期: 2015-01-01; 修回日期: 2015-03-02)

编辑: 洪 涛

首届国医大师、院士学术思想及临床经验研讨会征文通知

国医大师及院士是我国德高望重、医术精湛的名医大家,中医药理论造诣深厚,学术成就卓越,临床经验丰富。为了促进国医大师及院士学术思想和临床经验的传承,更好地促进中医药事业发展,不断提高广大中医临床医师的诊治水平,《中医杂志》将设专栏报道国医大师及院士经验。同时,配合专栏拟定于2015年第4季度举办国医大师、院士学术思想及临床经验研讨会,现公开进行征文。优秀来稿将陆续在《中医杂志》“国医大师与院士”专栏公开发表。征文要求如下。

1. 征文内容: 1) 国医大师及院士学术思想、临床经验、诊疗特长的总结与整理; 2) 国医大师及院士中医、中西医结合诊治典型病例的探讨; 3) 国医大师及院士治疗临床常见病、疑难病、危重病的用药经验; 4) 国医大师及院士对中医药事业发展、中医理论、中医药科研及临床研究的思考等。

2. 征文要求: 1) 内容必须来自于两院院士和国家中医药管理局正式公布的两届国医大师; 2) 未正式公开发表过的论文; 3) 论文务求主题鲜明、资料详实; 4) 文章作者应是国医大师亲传弟子、院士弟子、工作室(站)或工作团队; 5) 稿件篇幅在5000字以内,摘要150~300字,关键词3~8个,请注明作者姓名、职称、具体通讯地址、邮政编码、电子信箱、手机号码等; 6) 来稿同时,请附上国医大师或院士两寸照片和400字以内小传; 7) 论文邮件主题以“作者姓名+国医大师(或院士)姓名”命名。请用Word文档以附件的形式发送至邮箱64035632@163.com。收到必复,1周内若无回复,请与编辑部联系; 8) 详情可登录www.jtcm.net.cn查询,截稿日期: 2015年10月15日。

3. 联系方式: 地址: 北京市东城区东直门内南小街16号中医杂志社,邮编: 100700,联系电话: (010) 64014411 转 3045, 64035632, 联系人: 侯建春, 手机 13691096692。