

# 全程应用大承气汤加味方对重症急性胰腺炎模型大鼠肠黏膜屏障的影响

钦丹萍<sup>1</sup> 魏 霞<sup>2</sup> 方国栋<sup>3</sup> 杨 锋<sup>3</sup> 赖登攀<sup>2</sup>

**摘要 目的** 研究全程运用大承气汤加味方对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)模型大鼠炎症介质的影响,以明确全程运用大承气汤加味方通腑导滞较单纯早期运用对 SAP 肠黏膜屏障损伤的干预优势。**方法** 采用随机数字表法将 190 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、奥曲肽组(octreotide, OT 组)、早期大承气汤加味方组(早期组)及全程大承气汤加味方组(全程组),每组 38 只。采用肠壁穿刺逆行胰胆管注射 5% 牛黄胆酸钠建立 SAP 模型。造模 3 h 后假手术组及模型组灌胃生理盐水,每 12 h 1 次,OT 组皮下注射 OT 1.35  $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ,每 8 h 1 次;早期组灌胃大承气汤加味方 0.4 mL/100 g,6 h 后改为生理盐水,每 12 h 1 次;全程组灌胃大承气汤加味方 0.4 mL/100 g,每 12 h 1 次。造模后 48 h 观察各组累积生存率及胰腺、小肠光学显微镜下表现;分别于造模 4、6、24、48 h 进行胰腺及小肠组织病理评分并检测血清淀粉酶(amyase,AMY)、ALT 及 TNF- $\alpha$  水平;采用 Western blot 法测定小肠组织高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box protein 1, HMGB1)表达水平;造模 48 h 观察各组肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLNs)细菌移位阳性率,对血清 TNF- $\alpha$ 、小肠组织 HMGB1 与胰腺、小肠组织病理评分的相关性进行分析。**结果** 各组累积生存率分别为假手术组 100.0%、全程组 79.2%、OT 组 70.8%、早期组 45.8%及模型组 37.5%。造模 6 h 后,与模型组比较,全程组、早期组及 OT 组胰腺及小肠组织病理评分降低( $P < 0.05$ ),造模 24、48 h,全程组、OT 组胰腺及小肠组织病理评分明显低于早期组( $P < 0.05$ )。造模 6、24、48 h,与模型组比较,全程组、早期组及 OT 组血清 AMY、ALT 均降低( $P < 0.05$ );造模 48 h,全程组及 OT 组血清 AMY、ALT 均低于早期组( $P < 0.05$ )。造模 6 h,全程组、早期组及 OT 组血清 TNF- $\alpha$  低于模型组( $P < 0.05$ )。造模 6、24、48 h,此 3 组小肠组织 HMGB1 水平亦低于模型组( $P < 0.05$ ),其中 24、48 h 全程组及 OT 组均低于早期组( $P < 0.05$ )。造模 48 h,全程组、OT 组 MLNs 细菌移位阳性数低于模型组及早期组( $P < 0.05$ )。SAP 早期 6 h 内血清 TNF- $\alpha$  与胰腺病理评分呈正相关( $r = 0.579, P < 0.01$ )。ROC 曲线分析提示血清 TNF- $\alpha$  水平可预测 SAP 严重程度(ROC 曲线下面积为 0.990, 95% CI: 0.971 ~ 1.000)。小肠组织 HMGB1 水平与小肠组织病理评分呈正相关( $r = 0.620, P < 0.01$ )。**结论** 早期运用大承气汤加味方通腑导滞能有效降低炎症因子 TNF- $\alpha$  的释放,而全程运用大承气汤加味方通腑导滞能有效抑制 HMGB1 表达,较单纯早期治疗能更好地减轻胰腺及小肠损伤,降低 MLNs 移位阳性率,提高生存率。

**关键词** 大承气汤加味方;重症急性胰腺炎;全程治疗;炎症介质;肠黏膜屏障

Intervention Effect of Modified Dachengqi Decoction on Intestinal Mucosal Barrier of Severe Acute Pancreatitis Model Rats QIN Dan-ping<sup>1</sup>, WEI Xia<sup>2</sup>, FANG Guo-dong<sup>3</sup>, YANG Feng<sup>3</sup>, and LAI Deng-pan<sup>2</sup> 1 Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006); 2 Department of Emergency, Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou (310015); 3 First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)

**ABSTRACT Objective** To study the effect of Modified Dachengqi Decoction (MDD) as whole course therapy on mediators of inflammation in severe acute pancreatitis (SAP) model rats, and to com-

基金项目:2010 年浙江省中医药科学研究基金计划项目(No. 2010ZB117)

作者单位:1. 浙江中医药大学附属第一医院消化科(杭州 310006); 2. 杭州师范大学附属医院急诊科(杭州 310015); 3. 浙江中医药大学第一临床医学院(杭州 310053)

通讯作者:钦丹萍, Tel: 13606805004, E-mail: qindp19841@sina.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 12. 1482

pare interventional advantages over intestinal mucosal barrier (IMB) of SAP rats between whole course therapy of MDD and early stage therapy of MDD. **Methods** Totally 190 SD rats were divided into five groups according to random digit table, i.e., the sham-operation group, the model group, the octreotide (OT) group, the early stage MDD treatment group, the whole course MDD treatment group, 38 in each group. SAP models were established with retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the pancreaticobiliary duct. Three hours after modeling normal saline (NS) was administered to rats in the sham-operation group and the model group by gastrogavage, once per 12 h. 1.35  $\mu$ g/100 g OT was subcutaneously injected to rats in the OT group, once every 8 h. 0.4 mL/100 g MDD was administered to rats in the early stage MDD treatment group, and 6 h later changed to NS (once per 12 h). 0.4 mL/100 g MDD was administered to rats in the whole course MDD treatment group, once every 12 h. The accumulative survival rate and morphological manifestations of pancreas and small intestine were observed under microscope 48 h after modeling. Pathologic scores of the pancreas and small intestine were conducted at 4, 6, 24, and 48 h after modeling. Contents of serum amylase (AMY), alanine transaminase (ALT), and TNF- $\alpha$  were also detected. The expression of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in the small intestine tissue was also detected by Western blot. The positive rate of bacterial translocation in mesenteric lymph nodes (MLNs) was observed within 48 h. Correlations between serum TNF- $\alpha$  or HMGB1 in small intestinal tissue and pathological scores of the pancreas or the small intestine were analyzed. **Results** The accumulative survival rate was 100.0% in the sham-operation group, 79.2% in the whole course MDD treatment group, 70.8% in the OT group, 45.8% in the early stage MDD treatment group, and 37.5% in the model group. At 6 h after modeling, pathological scores decreased more in the whole course MDD treatment group, the early stage MDD treatment group, the OT group than in the model group ( $P < 0.05$ ). At 24 and 48 h after modeling, pathological scores of the pancreas and the small intestine decreased more in the whole course MDD treatment group and the OT group than in the early stage MDD treatment group ( $P < 0.05$ ). At 6, 24, and 48 h after modeling, serum contents of AMY and ALT both decreased more in the whole course MDD treatment group, the early stage MDD treatment group, the OT group than in the model group ( $P < 0.05$ ). At 48 h after modeling serum contents of AMY and ALT both decreased more in the whole course MDD treatment group and the OT group than in the early stage MDD treatment group ( $P < 0.05$ ). At 6 h after modeling serum TNF- $\alpha$  levels decreased more in the whole course MDD treatment group, the early stage MDD treatment group, the OT group than in the model group ( $P < 0.05$ ). At 6, 24, and 48 h after modeling the level of HMGB1 in the small intestinal tissue decreased more in the whole course MDD treatment group, the early stage MDD treatment group, the OT group than in the model group ( $P < 0.05$ ). Of them, HMGB1 levels at 24 and 48 h were lower in the whole course MDD treatment group and the OT group than in the early stage MDD treatment group ( $P < 0.05$ ). The number of MLNs bacterial translocation at 48 h after modeling was lower in the whole course MDD treatment group and the OT group than in the early stage MDD treatment group and the model group ( $P < 0.05$ ). Serum TNF- $\alpha$  contents within 6 h were positively correlated with pathological scores of pancreas ( $r = 0.579$ ,  $P < 0.01$ ). ROC curve showed that serum TNF- $\alpha$  contents could predict the severity of SAP (ROC = 0.990, 95% CI: 0.971 to 1.000). HMGB1 in the small intestine was positively correlated with pathological scores of the small intestine ( $r = 0.620$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Early stage use of MDD could effectively reduce the release of TNF- $\alpha$ , while whole course use of MDD could effectively inhibit the expression of HMGB1. The latter could preferably attenuate injuries of the pancreas and the small intestine, lower MLNs bacterial translocation, and elevate the survival rate.

**KEYWORDS** Modified Dachengqi Decoction; severe acute pancreatitis; whole course therapy; mediators of inflammation; intestinal mucosal barrier

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是临床常见急腹症, 病情重, 并发症多, 病死率高<sup>[1]</sup>, 目前病死率仍有 10%~20%<sup>[2]</sup>。SAP 临床分急性炎症反应期、全身感染期和残余感染期, 其疾病进程取决于坏死程度和胰腺感染, 脓毒血症是晚期死亡的主要原因, 主要发生于全身感染期<sup>[3,4]</sup>, 而肠黏膜屏障功能

障碍是导致肠道细菌移位,继发胰腺感染,造成“二次打击”的前提条件<sup>[5]</sup>。目前临床上应用通腑导滞中药或复方进行早期干预已成共识,但仍存在一定病死率,这与 SAP 继发全身感染导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发生相关<sup>[6]</sup>。因此针对 SAP,除早期应用中药通腑导滞干预外,临床上更强调将通腑导滞贯穿 SAP 全过程<sup>[7]</sup>,即全程应用中药通腑导滞。本课题组前期研究已显示全程运用大承气汤加味方对 SAP 模型大鼠肠功能衰竭的干预更具有优势<sup>[8]</sup>,本研究进一步探讨全程运用大承气汤加味方对 SAP 大鼠炎症介质的影响及肠黏膜屏障的保护作用。

## 材料与方法

1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠 190 只,体重(250±20)g,浙江中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(沪)2008-0016。实验前于浙江中医药大学动物房饲养 1 周,设定动物房温度(20±2)℃、湿度(55%±5%)、每日光照 12 h,喂饲标准鼠食,自由饮水,饲养环境为清洁级。

2 药物与试剂 大承气汤加味方组成:生大黄(后下)10 g 玄明粉(冲)8 g 厚朴 10 g 枳壳 10 g 桃仁 10 g 莱菔子 15 g,由浙江省中医院制剂中心制备,浓度为每毫升含 1 g 生药;牛黄胆酸钠:美国 Sigma 公司生产,批号:1001175600;奥曲肽(octreotide, OT):0.1 mg/mL,北京诺华制药有限公司,批号:S0216;TNF-α 试剂盒由深圳达科为生物技术有限公司生产,批号:RT480954;高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box protein 1, HMGB1)试剂盒,美国 Rnd 公司,批号:RT678944B;BCA 蛋白定量试剂盒,普利莱基因技术有限公司,批号:001113;ECL 化学发光试剂盒,普利莱基因技术有限公司,批号:1252728。

3 动物分组、造模及给药 采用肠壁穿刺逆行胰胆管注射 5% 牛黄胆酸钠造模方法建立 SAP 模型<sup>[9]</sup>。将成模大鼠采用随机数字表法分为模型组、奥曲肽组(OT 组)、早期大承气汤加味方组(早期组)及全程大承气汤加味方组(全程组),另设假手术组,每组各 38 只。每组再随机分为 4 个亚组(其中 4、6 h 各 7 只,24、48 h 各 12 只)。因预实验造模后 24、48 h 死亡较多,故 24、48 h 亚组增加动物数,但同一时间段各组基数相等。

给药剂量与方法:等效剂量以成人常规剂量按人与动物体表面积系数折算<sup>[10]</sup>。造模 3 h 后假手术组、

模型组生理盐水灌胃 0.4 mL/100 g,每 12 h 1 次;OT 组皮下注射 OT 1.35 μg/100 g,每 8 h 1 次;早期组以大承气汤加味方 0.4 mL/100 g 灌胃,6 h 后改为生理盐水 0.4 mL/100 g 灌胃,每 12 h 1 次;全程组以大承气汤加味方 0.4 mL/100 g 灌胃,每 12 h 1 次,假手术组仅翻动胰腺后关腹。造模 48 h 后终止实验。

## 4 观察指标及检测方法

4.1 大鼠生存情况观察 观察造模后 24、48 h 各组大鼠累积生存率。

4.2 胰腺及小肠病理学改变 造模 48 h 观察各组胰腺及小肠光学显微镜下表现。

4.3 胰腺及小肠组织病理学评分 分别于造模 4、6、24、48 h 后取各组大鼠胰头和距回盲部 10 cm 处长约 1 cm 的小肠组织,HE 染色,采用改良 Schmidt 法<sup>[11]</sup>进行胰腺组织病理学评分,参考文献[12]小肠组织损伤评价标准行小肠组织病理学评分。胰腺病理评分方法如下:因意外死亡计 0 分,余因 SAP 死亡均计 13 分。小肠病理评分:因意外死亡计 0 分,余因 SAP 死亡均计 5 分。所有病理切片由浙江中医药大学附属第一医院与杭州师范大学附属医院两位高年资病理医师采用双盲法进行观察。

4.4 血清淀粉酶(amylase, AMY)、ALT 及 TNF-α 水平检测 分别于造模后 4、6、24、48 h 后 10% 水合氯醛溶液腹腔内注射麻醉,取腹主动脉血 4~5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,全自动生化检测仪检测血 AMY 及 ALT,酶联免疫吸附法检测血清 TNF-α 水平。

4.5 小肠组织 HMGB1 蛋白表达检测 分别于造模 4、6、24、48 h 后处死大鼠,取距回盲部 10 cm 处约 1 cm 的小肠组织,切取约 200 mg,加入 1 000 μL 新鲜配置的冷蛋白裂解液,经 4℃,12 000 r/min 离心 20 min,取上清液,劳里改良法(BCA 法)进行蛋白定量。取 40 μg 蛋白与上样缓冲液混合,SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜。先后加入 1:1 000—抗羊抗 HMGB1 抗体,1:10 000 标记二抗辣根过氧化物酶兔抗羊 IgG, ECL 显影,应用凝胶成像系统进行分析,测定 HMGB1 条带与 β-actin 内参的光密度值,并取两者的比值行半定量分析。

4.6 造模 48 h 肠系膜淋巴结细菌移位阳性率检测 参照文献[13],造模 48 h 按严格无菌条件下打开腹腔,取出肠系膜淋巴结(mesenteric lymph nodes, MLNs)称重,加入 10 倍量的无菌生理盐水,匀浆,分别取 50 μL 接种于血琼脂培养基(blood agar plate, BAP)、麦康凯琼脂培养基(MacConkey agar medi-

um,MAC),36℃培养。培养48h无细菌生长,报告48h无细菌生长。凡有一个菌落形成者为阳性。

5 统计学方法 采用SPSS 17.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用One-way ANOVA分析,两两比较采用SNK法;不同时间点数据比较采用重复测量资料的方差分析;计数资料比较采用 $\chi^2$ 检验;24、48h亚组累积生存函数采用Kaplan-meier生存分析;采用Pearson相关分析评估血清TNF- $\alpha$ 与胰腺病理评分,小肠组织HMGB1水平与小肠组织病理评分的相关性;血清TNF- $\alpha$ 对SAP病情严重程度的预测采用ROC曲线分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

1 造模24、48h大鼠生存情况及死因分析(图1) 除24h与48h假手术组各2只因操作不当触及动脉失血性休克死亡外,其余大鼠均死于SAP。Kaplan-meier生存分析,各组累计生存率分别为:假手术组100%、全程组79.2%、OT组70.8%、早期组45.8%、模型组37.5%。全程组、OT组低于假手术组,

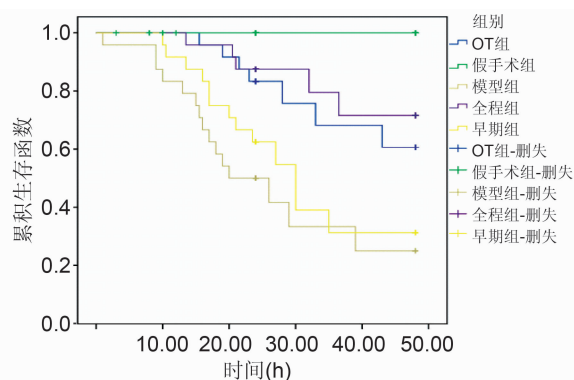


图1 各组大鼠累积生存函数

而高于早期组及模型组( $P < 0.05$ )。

2 造模后48h各组胰腺及小肠病理学改变(图2,3) 胰腺:造模48h假手术组胰腺腺泡结构正常,排列紧密;模型组胰腺组织坏死明显伴出血,细胞间隔扩张,大量的炎性细胞浸润,并形成皂化斑;早期组胰腺组织出血、坏死,大量炎症细胞浸润;OT组胰腺腺泡细胞轻度肿胀,点状出血,少量炎症细胞浸润;全程组胰腺腺泡细胞轻度肿胀,少量炎症细胞浸润。

小肠:造模48h假手术组肠绒毛排列规则,肠上皮间隙正常;模型组肠绒毛排列不规则,并两两融合,上皮细胞大量坏死脱落,肠上皮间隙明显扩大,大量炎性细胞浸润;早期组肠绒毛排列不整齐,水肿明显,上皮细胞大量坏死脱落,肠上皮间隙明显扩大,大量炎性细胞浸润;OT组及全程组肠绒毛排列整齐,轻度水肿,无上皮细胞脱落,肠上皮间隙正常,少量炎性细胞浸润。

3 各组胰腺及小肠组织病理评分比较(表1) 造模6、24、48h,与假手术组比较,模型组胰腺、小肠病理评分明显升高( $P < 0.05$ );造模6h,与模型组比较,全程组、早期组及OT组胰腺、小肠病理评分降低( $P < 0.05$ );造模24、48h,全程组、OT组胰腺、小肠组织病理评分低于早期组( $P < 0.05$ ),但全程组与OT组胰腺、小肠病理评分比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

4 各组不同时间点血清AMY、ALT水平比较(表2) 与假手术组比较,模型组各时点AMY均明显升高( $P < 0.05$ );造模6、24、48h,与模型组比较,全程组、早期组及OT组AMY均降低( $P < 0.05$ );48h全程组、OT组AMY均低于早期组( $P < 0.05$ ),

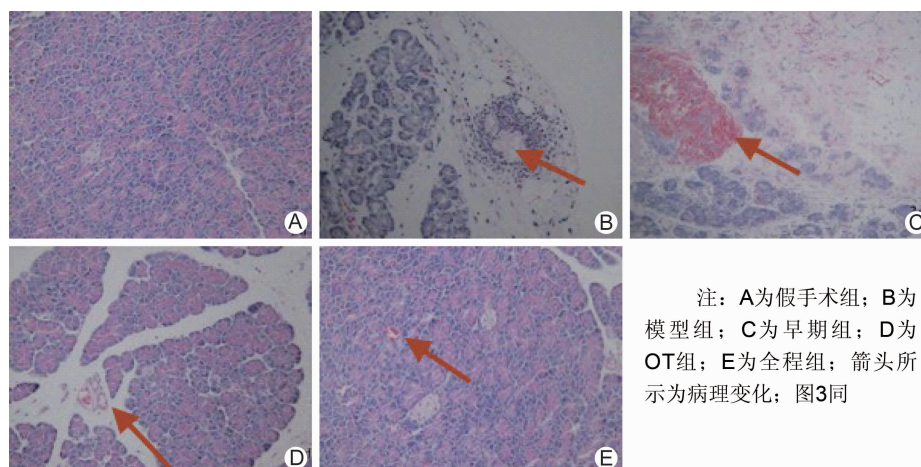


图2 造模48h后各组小肠病理组织表现(HE,  $\times 200$ )

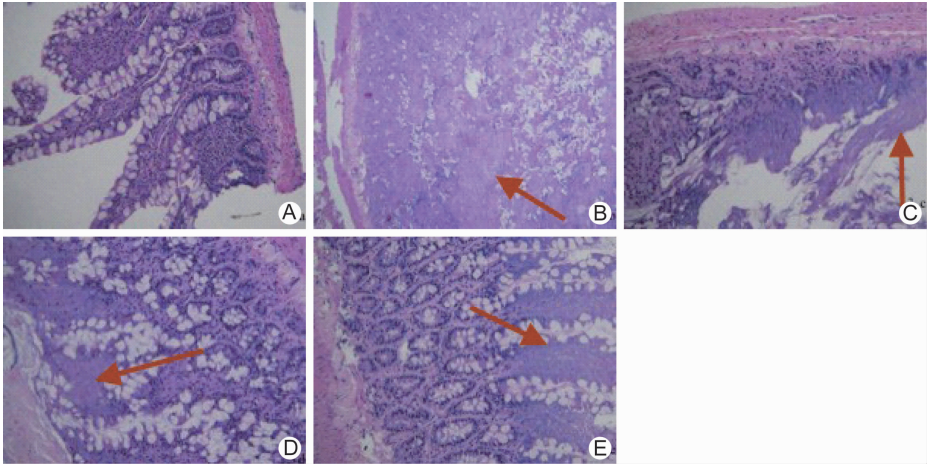


图3 造模 48 h 后各组胰腺病理组织表现 (HE, ×200)

表 1 各组不同时间点胰腺及小肠组织病理评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 4 h            |              | 6 h            |                | 24 h                         |                              | 48 h                         |                              |
|-----|----------------|--------------|----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|     | 胰腺             | 小肠           | 胰腺             | 小肠             | 胰腺                           | 小肠                           | 胰腺                           | 小肠                           |
| 假手术 | 0.20±0.45(7) * | 0.29±0.49(7) | 0.40±0.55(7) * | 0.43±0.53(7) * | 0.25±0.45(12) *              | 0.25±0.45(12) *              | 0.17±0.39(12) *              | 0.17±0.39(12) *              |
| 模型  | 3.40±0.55(7)   | 0.57±0.53(7) | 4.86±0.71(7)   | 2.71±1.11(7)   | 11.17±2.04(12)               | 4.42±0.79(12)                | 12.75±0.62(12)               | 4.92±0.29(12)                |
| 早期  | 3.20±0.84(7)   | 0.71±0.49(7) | 3.80±0.45(7) * | 1.29±0.49(7) * | 10.67±2.15(12)               | 4.17±0.83(12)                | 12.42±1.00(12)               | 4.75±0.45(12)                |
| OT  | 3.60±0.55(7)   | 0.57±0.53(7) | 3.80±0.84(7) * | 1.14±0.38(7) * | 8.42±2.81(12) * <sup>△</sup> | 3.25±1.14(12) * <sup>△</sup> | 6.67±4.70(12) * <sup>△</sup> | 2.75±1.71(12) * <sup>△</sup> |
| 全程  | 3.40±0.55(7)   | 0.43±0.53(7) | 3.80±1.10(7) * | 1.29±0.49(7) * | 8.33±2.31(12) * <sup>△</sup> | 2.92±1.16(12) * <sup>△</sup> | 5.92±4.30(12) * <sup>△</sup> | 2.25±1.71(12) * <sup>△</sup> |

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ ;与早期组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ;()内数据为动物数

但全程组与 OT 组 AMY 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

与假手术组比较,模型组各时间点 ALT 均明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,全程组、早期组及 OT 组各时间点 ALT 水平降低( $P < 0.05$ );造模 24、48 h,全程组、OT 组均低于早期组( $P < 0.05$ ),但全程组与 OT 组 ALT 比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

5 各组不同时间点血清 TNF-α 水平比较(表 3)

与假手术组比较,造模 4、6 h 模型组血清 TNF-α 升高( $P < 0.05$ );造模 6 h,与模型组比较,全程组、早期组及 OT 组 TNF-α 均降低( $P < 0.05$ ),但全程组与早期组 TNF-α 水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );造模 24、48 h 各组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

6 各组小肠组织 HMGB1 表达水平比较(表 4,图 4)与假手术组比较,模型组各时点小肠组织 HMGB1

表 2 各组不同时间点血清 AMY、ALT 水平比较 (U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 4 h                 |                   | 6 h                  |                   | 24 h                 |                                 | 48 h                            |                               |
|-----|---------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
|     | AMY                 | ALT               | AMY                  | ALT               | AMY                  | ALT                             | AMY                             | ALT                           |
| 假手术 | 2 164.2±393.5(7) *  | 74.00±11.96(7) *  | 2 176.5±388.1(7) *   | 84.14±6.39(7) *   | 1 599.0±441.1(10) *  | 125.80±17.36(10) *              | 1 294.6±86.6(10) *              | 66.70±10.36(10) *             |
| 模型  | 10 647.4±1 755.7(7) | 210.43±25.95(7)   | 17 062.2±2 509.0(6)  | 362.67±24.13(6)   | 19 535.0±2 758.8(6)  | 571.33±21.66(6)                 | 18 985.0±1 627.1(3)             | 751.33±9.02(3)                |
| 早期  | 8 888.0±602.6(7)    | 161.00±13.43(7) * | 8 322.7±800.8(7) *   | 213.71±24.23(7) * | 4 911.0±1 154.6(7) * | 297.57±9.47(7) *                | 3 716.0±209.9(4) *              | 179.00±8.83(4) *              |
| OT  | 9 437.8±1 982.9(7)  | 160.71±19.70(7) * | 7 883.0±1 704.5(7) * | 204.14±21.69(7) * | 3 784.0±626.3(9) *   | 257.22±23.42(9) * <sup>△</sup>  | 1 582.6±205.4(8) * <sup>△</sup> | 87.25±11.97(8) * <sup>△</sup> |
| 全程  | 9 488.6±1 203.6(7)  | 170.43±15.30(7) * | 8 265.7±1 431.3(7) * | 207.71±29.22(7) * | 2 898.6±706.5(10) *  | 251.20±17.52(10) * <sup>△</sup> | 2 333.0±496.9(9) * <sup>△</sup> | 92.89±19.78(9) * <sup>△</sup> |

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ ;与早期组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ;()内数据为动物数;因大鼠死亡时间较长,无法检测死亡血 AMY、ALT,剔除死亡大鼠,仅统计存活大鼠血清 AMY、ALT

表 3 各组不同时间点血清 TNF-α 水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

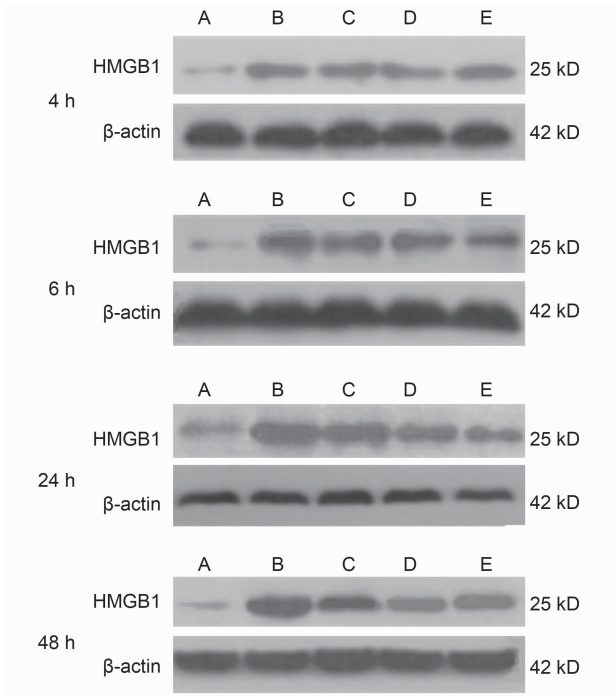
| 组别  | 4 h            | 6 h             | 24 h          | 48 h          |
|-----|----------------|-----------------|---------------|---------------|
|     |                |                 |               |               |
| 假手术 | 4.52±3.29(7) * | 4.69±0.58(7) *  | 3.90±0.33(10) | 3.76±0.37(10) |
| 模型  | 16.13±2.28(7)  | 13.61±0.93(6)   | 4.29±0.02(6)  | 3.89±0.13(3)  |
| 早期  | 17.63±3.78(7)  | 10.80±0.69(7) * | 3.98±0.17(7)  | 3.85±0.14(4)  |
| OT  | 18.07±7.94(7)  | 8.09±0.60(7) *  | 3.78±0.32(9)  | 3.73±0.18(8)  |
| 全程  | 13.63±3.65(7)  | 11.06±1.11(7) * | 4.02±0.03(10) | 3.60±0.21(9)  |

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ ;与早期组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ;()内数据为动物数

表 4 各组不同时间点小肠组织 HMGB1 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 4 h               | 6 h               | 24 h                            | 48 h                           |
|-----|-------------------|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 假手术 | 0.15 ± 0.02 (7) * | 0.16 ± 0.02 (7) * | 0.19 ± 0.03 (10) *              | 0.17 ± 0.02 (10) *             |
| 模型  | 0.90 ± 0.02 (7)   | 1.45 ± 0.03 (6)   | 1.72 ± 0.02 (6)                 | 1.58 ± 0.02 (3)                |
| 早期  | 0.90 ± 0.02 (7)   | 1.16 ± 0.04 (7) * | 1.24 ± 0.03 (7) *               | 1.19 ± 0.01 (4) *              |
| OT  | 0.88 ± 0.03 (7)   | 1.19 ± 0.02 (7) * | 0.77 ± 0.02 (9) * <sup>△</sup>  | 0.47 ± 0.04 (8) * <sup>△</sup> |
| 全程  | 0.89 ± 0.03 (7)   | 1.19 ± 0.03 (7) * | 0.74 ± 0.04 (10) * <sup>△</sup> | 0.44 ± 0.04 (9) * <sup>△</sup> |

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与早期组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;( )内数据为动物数;因大鼠死亡时间较长,考虑蛋白组织分解,故未检测死亡大鼠小肠组织 HMGB1,剔除死亡大鼠,仅统计存活大鼠小肠组织 HMGB1



注:A 为假手术组,B 为模型组,C 为早期组,D 为 OT 组,E 为全程组

图 4 各组造模不同时间点小肠组织 HMGB1 蛋白表达电泳图

水平均升高( $P < 0.05$ );造模 6、24、48 h,与模型组比较,全程组、早期组及 OT 组 HMGB1 水平均降低( $P < 0.05$ );造模 24、48 h,全程组及 OT 组 HMGB1 水平均低于早期组( $P < 0.05$ ),但全程组与 OT 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

7 造模 48 h 各组 MLNs 细菌移位阳性数比较 (表 5) 与假手术组比较,模型组 MLNs 细菌移位阳

表 5 造模 48 h 各组 MLNs 细菌移位阳性数比较

| 组别  | <i>n</i> | 阳性数              |
|-----|----------|------------------|
| 假手术 | 10       | 1 *              |
| 模型  | 3        | 3                |
| 早期  | 4        | 4                |
| OT  | 8        | 2 * <sup>△</sup> |
| 全程  | 9        | 2 * <sup>△</sup> |

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ;与早期组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

性数升高( $P < 0.05$ );全程组、OT 组 MLNs 细菌移位阳性数低于模型组及早期组( $P < 0.05$ ),但全程组与 OT 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

8 血清 TNF- $\alpha$  及胰腺病理评分的相关性及血清 TNF- $\alpha$  预测 SAP 的 ROC 曲线分析 (图 5、6) SAP 早期 6 h 内血清 TNF- $\alpha$  水平与胰腺病理评分呈正相关( $r = 0.579, P < 0.01$ )。血清 TNF- $\alpha$  预测 SAP 的 ROC 曲线下面积为 0.990,95%CI 为 0.971 ~ 1.000,提示在早期 6 h 内,血清 TNF- $\alpha$  水平可预测 SAP 严重程度。

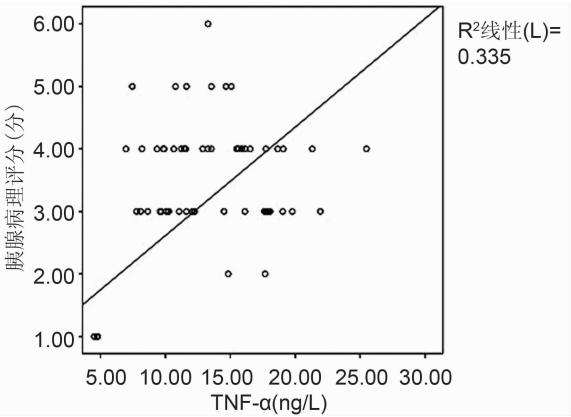


图 5 血清 TNF- $\alpha$  与胰腺病理评分的相关分析

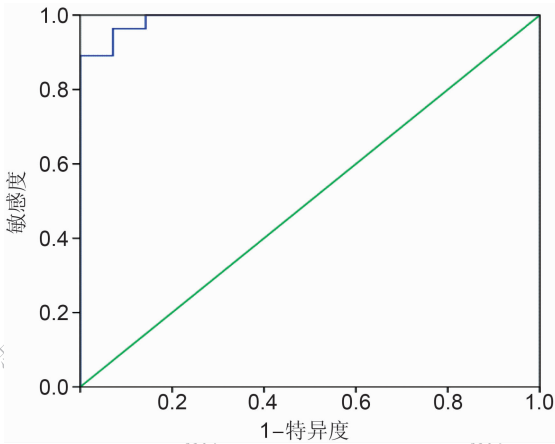


图 6 血清 TNF- $\alpha$  预测 SAP 的 ROC 曲线

9 小肠组织 HMGB1 水平与小肠组织病理评分的相关性分析(图 7) 小肠组织 HMGB1 与小肠组织病理评分呈正相关( $r=0.620$ ,  $P<0.01$ )。

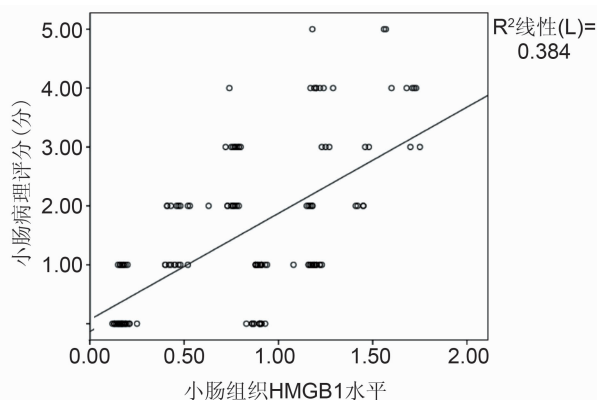


图 7 小肠组织 HMGB1 水平与小肠组织病理评分的相关性分析

## 讨 论

目前临床上对 SAP 早期干预已成共识,但仍有一定病死率。龚锦文等<sup>[14]</sup>研究发现早期干预虽能改善 SAP 病情,降低病死率,但不能完全达到阻止胰腺炎重症化的目的。苗彬等<sup>[6]</sup>对早期通腑导滞法治疗 SAP 的疗效进行 Meta 分析后发现早期中药干预 SAP 后病死率为 7.4%。

SAP 临床分为 3 期,第一期主要是炎症介质造成对靶器官的第一次打击,由于肠黏膜屏障损伤,导致细菌移位、促使炎症介质大量释放,给靶器官造成第二次打击,出现继发感染期,而此期是患者重症化、死亡的主要因素<sup>[15]</sup>。目前通腑导滞早期干预 SAP 终止治疗的目标临床尚不清晰,多以给药后腹痛缓解为主要考核指标,而忽视了 SAP 特殊的病理生理过程。

SAP 具有腹痛、腹胀及便秘等表现<sup>[16]</sup>,属中医学“阳明腑实证”范畴。研究表明,通腑导滞法对于防止 SAP 肠功能衰竭,拮抗肠道细菌移位有显著作用<sup>[17]</sup>。在阳明腑实证治疗上,张仲景强调“得快利即止”,“中病即止”,就 SAP 而言,因其特殊的病理生理过程,发病初期的腹痛改善、大便通畅,仅相当于第一期急性炎症反应期的缓解,而此刻肠黏膜屏障损伤尚未恢复,仍存在细菌移位导致继发全身感染的风险,因此,在此阶段“得快利即止”,就意味着治疗仅限于早期阶段,而缺乏对后续肠黏膜屏障保护的重视。因此,针对 SAP,治疗上要重视肠黏膜屏障功能,关注急性炎症反应期后可发生继发感染的状况,将通腑导滞治疗贯穿于疾病全过程<sup>[7]</sup>。

SAP 作为一种严重的炎症过程,产生大量的炎症

介质参与疾病的发生发展, TNF- $\alpha$  是 SAP 最早升高的<sup>[18]</sup>,作为始动因子,其释放后再与细胞因子网络中的其他因子相互诱生,导致细胞因子瀑布式释放,从而造成多脏器组织损伤<sup>[19]</sup>。HMGB1 作为晚期炎症介质参与疾病的病理生理过程。在 SAP 发病过程中, HMGB1 表达升高较晚,出现于“第一次打击”后,但维持时间较长。研究表明,肠黏膜损伤与 HMGB1 的高表达密切相关, HMGB1 可介导肠黏膜屏障损伤,导致通透性增加<sup>[20]</sup>。HMGB1 表达的的高低可以反映肠黏膜屏障功能损伤的程度。

本研究根据早晚期炎症因子的表达趋势、肠黏膜上皮细胞凋亡细菌移位及内毒素水平情况<sup>[21,22]</sup>,以 6 h 为早期与全程的时间分隔点,研究结果与 Yasuda T 等<sup>[23]</sup>报道一致。因末端回肠细菌较多,因此选择此部位能更好地反映 SAP 小肠黏膜损伤程度<sup>[24]</sup>。本研究表明所有 SAP 造模大鼠 4 h 均出现胰腺充血水肿,胰腺病理评分、血清 AMY、ALT 较假手术组显著升高且均未死亡,造模成功率达 100%。

造模 48 h 模型组出现胰腺组织明显坏死伴出血、皂化斑形成,小肠黏膜损害,全程组胰腺组织出血坏死情况、小肠黏膜损害、血清 AMY、ALT、胰腺及小肠组织病理评分、MLNs 细菌移位阳性数较早期组降低,同时全程组累积生存率高于早期组,表明全程通腑导滞治疗较单纯早期应用能更好地减轻胰腺及小肠损伤,降低 MLNs 细菌移位阳性率,保护肠黏膜屏障,以及降低肝细胞损伤,改善肝功能,从而提高生存率。

本实验研究显示, SAP 早期血清 TNF- $\alpha$  水平能反映其病情严重程度,晚期肠组织 HMGB1 与肠黏膜损伤有关,全程运用大承气汤加味方通腑导滞不仅能有效降低早期炎症介质 TNF- $\alpha$  的释放,而且能抑制 SAP 晚期炎症介质 HMGB1,较单纯早期治疗能更好地减轻胰腺及小肠损伤,降低 MLNs 移位阳性率,保护肠黏膜屏障,提高生存率。

另外,与 OT 组比较,造模 6 h 全程组血清 TNF- $\alpha$  浓度高于 OT 组,可能与奥曲肽可直接抑制血小板活化因子释放,导致 TNF- $\alpha$  产生减少有关<sup>[25]</sup>; 24、48 h 全程组肠组织 HMGB1 水平低于 OT 组,反映全程运用大承气汤加味方通腑导滞较奥曲肽在抑制晚期炎症介质 HMGB1 方面具有一定优势。

(致谢:感谢浙江中医药大学附属第一医院中心实验室王海滨给予的蛋白分析技术指导以及浙江中医药大学附属第一医院病理科任永葆、韩建新与杭州师范大学附属医院病理科杨文君给予的组织病理技术指导)

## 参 考 文 献

- [1] Bumbasirevic V, Radenkovic D, Jankovic Z, et al. Severe acute pancreatitis: overall and early *versus* late mortality in intensive care units [J]. *Pancreas*, 2009, 38(2): 122–125.
- [2] Hartwig W, Maksan SM, Foitzik T, et al. Reduction in mortality with delayed surgical therapy of severe pancreatitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2002, 6(3): 481–487.
- [3] Fritz S, Hackert T, Hartwig W, et al. Bacterial translocation and infected pancreatic necrosis in acute necrotizing pancreatitis derives from small bowel rather than from colon [J]. *Am J Surg*, 2010, 200(1): 111–117.
- [4] Nathen AB, Curtis JR, Beale RJ, et al. Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(12): 2524–2536.
- [5] van Minnen LP, Blom M, Timmerman HM, et al. The use of animal models to study bacterial translocation during acute pancreatitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2007, 11(5): 682–689.
- [6] 苗彬, 崔乃强, 李忠廉, 等. 早期通里攻下法对重症急性胰腺炎结局影响的系统评价 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(10): 1042–1047.
- [7] 钦丹萍. 西医疾病开展中医药治疗的若干思考 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2010, 34(5): 639–640.
- [8] 魏霞, 钦丹萍, 赖登攀, 等. 大承气汤加味方对重症急性胰腺炎大鼠肠功能衰竭的干预作用 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(16): 1407–1411.
- [9] 张明钧, 姚玮艳, 乔敏敏, 等. 肠壁穿刺逆行胰胆管注射牛黄胆酸钠重症急性胰腺炎造模 [J]. *上海交通大学学报*, 2006, 26(5): 488–490.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [11] Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. *Int J pancreatol*, 1992, 12(1): 41–51.
- [12] Chiu CJ, Mardle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow state [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478–483.
- [13] Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, et al. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2001, 5(4): 364–370.
- [14] 龚锦文, 周桂霞, 王惠玲. 早期临床干预策略在阻断胰腺炎重症化进程中的作用 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2009, 16(10): 838–840.
- [15] 朱斌, 孙家邦, 周继盛, 等. 重症急性胰腺炎胰腺感染的综合性预防及治疗 [J]. *中华普通外科杂志*, 2001, 16(11): 645–646.
- [16] 俞敏慧, 钦丹萍. “通里攻下”法治疗重症急性胰腺炎的研究进展 [J]. *浙江临床医学*, 2011, 13(5): 569–571.
- [17] 贾利辉, 郝景坤, 陈琳, 等. 大承气汤加味灌肠治疗重症急性胰腺炎 38 例 [J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(12): 1600.
- [18] 郭莲怡, 金旭鹏, 闻颖, 等. 丹参对重症急性胰腺炎时血清 TNF- $\alpha$ 、IL-10 的影响 [J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(5): 954–955.
- [19] Yang YL, Li JP, Li KZ, et al. Tumor necrosis factor alpha antibody prevents brain damage of rats with acute necrotizing pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(19): 2898–2900.
- [20] Luan ZG, Zhang H, Ma XC, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in the pathogenesis of intestinal barrier injury in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2010, 39(2): 216–223.
- [21] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis [J]. *J Intern Med*, 2004, 255(3): 320–331.
- [22] 戚大川, 汤耀抑, 武钧, 等. 实验性重症急性胰腺炎细胞因子的变化规律 [J]. *胰腺病学*, 2002, 2(2): 95–97.
- [23] Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Breakdown of intestinal mucosa via accelerated apoptosis increases intestinal permeability in experimental severe acute pancreatitis [J]. *J Surg Res*, 2006, 50(2): 18–26.
- [24] 卿伯华, 曾之耀, 王湘英, 等. NF- $\kappa$ B、HMGB1 在重症急性胰腺炎肠黏膜损伤中的时点表达及其意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(33): 3390–3396.
- [25] 刘建新. 奥曲肽对重症急性胰腺炎患者血清炎性细胞因子的影响 [J]. *中国实用医药*, 2008, 3(36): 25–26.

(收稿: 2015-01-08 修回: 2015-08-11)