

中医通里攻下法对多器官功能不全综合征时 肠道屏障功能保护作用的实验研究*

陈海龙¹ 吴咸中² 关凤林¹ 裴德凯¹

内容提要 目的:探讨中医通里攻下法对多器官功能不全综合征(MODS)时肠道屏障功能的保护作用。方法:采用酵母多糖腹腔注射制备大鼠 MODS 模型。应用通里攻下中药大承气汤对模型动物进行治疗,并观察内毒素、二胺氧化酶(DAO)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、过氧化脂质(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、肿瘤坏死因子(TNF)含量的变化,肠粘膜、肠细胞膜通透性及小肠粘膜病理形态学改变。结果:MODS 时肠道屏障功能明显受到损伤和破坏。大承气汤能明显降低 MODS 大鼠血中内毒素水平,减少了血液和肠组织中 TNF 的含量,降低了血和肠组织中 XOD 和 MDA 水平,提高了 GSH 的含量,显著提高了肠组织中 DAO 的含量,并能降低模型动物肠粘膜和肠细胞膜通透性,减轻肠粘膜组织的病理损害。结论:通里攻下中药对 MODS 时肠道屏障功能具有明显的保护作用。

关键词 肠道屏障 多器官功能不全综合征 中医通里攻下法

Protective Effects of Tongli Gongxia Herbs on Gut Barrier in Rat with Multiple Organ Dysfunction Syndrome
CHEN Hailong, WU Xianzhong, GUAN Fenglin, et al *The First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Liaoning (116011)*

Objective: To explore the protective effects of Tongli Gongxia (TLGX) herbs on gut barrier with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods:** The MODS models were induced by intraperitoneal injection of Zymosan A, and Dachengqi decoction (DCQD) was used in treating MODS models. The levels of endotoxin in the peripheral and portal blood, and the contents of diamine oxidase (DAO), xanthine oxidase (XOD), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and tumor necrosis factor (TNF), the permeability of intestinal mucosa and enterocytes, and the histopathologic changes were observed. **Results:** The gut barrier function in MODS rats were severely damaged. DCQD could significantly reduce the levels of endotoxin in the blood ($P < 0.01$), the contents of XOD, MDA and TNF in the blood and intestinal tissue were lowered ($P < 0.01$), but the levels of GSH in blood and intestinal tissue were raised ($P < 0.05$). Levels of DAO in the intestinal tissue was markedly increased ($P < 0.01$). DCQD could reduce the permeability of intestinal mucosa and enterocytes, and attenuate the histopathologic changes of intestinal mucosa in MODS rats. **Conclusion:** TLGX herbs have apparently protective effects on the gut barrier in MODS rats.

Key words gut barrier, multiple organ dysfunction syndrome, Tongli Gongxia herbs

在创伤和感染等应激状态下,肠道的屏障功能受到削弱或损害,就可使肠道内大量的细菌和内毒素经门静脉和淋巴系统侵入血液循环,造成肠源性感染和内毒素血症,并在一定条件下激发细胞因子的连锁反应和毒性网络,引起全身各器官的损害^[1]。笔者应用酵母多糖(Zymosan A)腹腔注射制备大鼠多器官功能不全综合征(MODS)动物模型,发现肠道屏障功能的

损伤和破坏在 MODS 中具有重要的发病学意义^[2]。本研究探讨了中医通里攻下法对 MODS 时肠道屏障功能的保护作用。

材料与方法

1 材料

1.1 动物及分组 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220g,由大连医科大学实验动物中心提供。将实验大鼠随机分成 4 组,每组 20 只。

1.2 药品 大承气汤由大黄、芒硝、枳实、厚朴等

* 国家自然科学基金资助项目(No.39700194)

1. 大连医科大学第一临床学院(辽宁 116011);2. 天津医科大学

中药组成,由大连医科大学中西医急腹症研究所提供,浓缩成 100%(每毫升含生药 1g)的药液。

1.3 试剂 Zymosan A,黄嘌呤,邻苯二甲醛(OPA),四乙氧基丙烷,二胺氧化酶(DAO)标准品,辣根过氧化酶均购自美国 Sigma 公司;内毒素测定试剂盒购自上海市临床检验中心;肿瘤坏死因子(TNF)试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所。

2 方法

2.1 模型制备及给药方法 对照组腹腔注射无菌液体石蜡并生理盐水灌胃(1 ml/100g 体重);模型组造模(无菌 Zymosan A 粉剂与无菌液体石蜡制成混悬液,按 1.0 mg/g 体重腹腔注射,诱发无菌性腹膜炎,制备 MODS 模型^[3])并生理盐水灌胃(1 ml/100g 体重);中药组造模并大承气汤灌胃(1 ml/100g 体重);抗生素组造模并氨卞青霉素灌胃(2 次/天,连续 2 天,给药剂量 8.925 mg/100g 体重)。2 天后全部动物均在乙醚麻醉下,以 1/1000 升汞消毒眼球再用生理盐水冲洗后以细玻璃管经球后静脉采血 3 ml;然后剖腹,经门静脉采血 1 ml,留测各项指标;并取部分末段回肠组织进行病理学检查和通透性测定。

2.2 观察指标和测定方法 内毒素含量采用鲎实验偶氮基质显色法;还原型谷胱甘肽(GSH)含量采用荧光测定改良法;黄嘌呤氧化酶(XOD)活性的测定按吴晓生等^[4]介绍的 NBT 比色法;丙二醛(MDA)含量的测定采用改良的八木国夫法;TNF 含量采用放免法;DAO 含量测定采用分光光度法。

2.3 肠粘膜和肠细胞膜通透性 采用夏愿耀的方法^[5]以镧作示踪剂进行观察。

2.4 组织病理观察方法 动物活杀后取小块回肠段标本,分别置入磷酸福尔马林缓冲液和 2.5%戊二醛溶液中固定。组织经过常规处理,分别以 Olympus 显微镜和 JEM-2000EX 电子显微镜观察并照相。

2.5 统计学处理 所得结果经 Pentium II 微机,采用美国 Minitab 统计包进行数据处理。

结 果

1 各组大鼠血内毒素水平的变化 见表 1。模型组外周血和门静脉血内毒素含量明显高于对照组

($P < 0.01$);与模型组比较,中药组两者含量明显下降($P < 0.01$),而抗生素组变化不明显($P > 0.05$)。

表 1 各组内毒素水平的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内毒素 (ng/L)	
		外周血	门静脉血
对照	12	41.41 ± 6.27	59.48 ± 6.53
模型	10	199.71 ± 20.36 [*]	234.00 ± 24.39 [*]
中药	11	84.90 ± 9.72 ^A	126.95 ± 10.08 ^A
抗生素	10	165.85 ± 17.23	217.24 ± 13.17

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,^A $P < 0.01$

2 各组血和肠组织中 XOD、MDA 和 GSH 含量的变化 见表 2。模型组血清和肠匀浆中 XOD 活性和 MDA 含量明显升高,GSH 含量明显下降($P < 0.01$);中药组血清和肠匀浆中 XOD 活性和 MDA 含量出现明显下降($P < 0.01$),GSH 含量出现明显升高($P < 0.05$)。而抗生素组未出现明显变化($P > 0.05$)。

3 各组血和肠组织中 DAO 及 TNF 含量的变化 见表 3。与对照组比较,模型组血清中 DAO 含量明显升高($P < 0.01$),肠匀浆 DAO 含量明显下降($P < 0.01$);与模型组比较,中药组血清中含量明显下降($P < 0.01$),而肠匀浆 DAO 含量明显升高($P < 0.05$);而抗生素组变化不明显($P > 0.05$)。与对照组比较,模型组血清和肠匀浆中 TNF 含量明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组血和肠组织中 TNF 含量出现明显下降($P < 0.01$),而抗生素组变化不明显($P > 0.05$)。

4 各组大鼠小肠病理形态学改变及肠粘膜通透性的变化 光镜观察发现模型组小肠粘膜出现明显病理改变,经不同治疗后病理改变减轻,以中药组为优,抗生素组较差,见表 4。肠粘膜通透性研究发现,模型组大鼠肠标本中,可看到电子密度高的镧颗粒沉积在肠细胞间隙中,沿着细胞周缘呈线条状分布,线条的粗细不尽相等,有时随着细胞间隙的走向呈弯曲或缠绕成不规则圈网状,有的镧颗粒可呈串珠状分布,在部分标本中镧颗粒透过细胞膜进入细胞内。而在对照组肠标本中未见沉积的镧颗粒。经不同治疗后肠细胞间质

表 2 各组血和肠组织中 XOD、MDA 和 GSH 含量的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清			肠匀浆		
		XOD (U/L)	MDA (μmol/L)	GSH (mg/L)	XOD (U/g pro)	MDA (μmol/g pro)	GSH (mg/g pro)
对照	12	77.99 ± 10.75	3.16 ± 0.27	3.45 ± 0.34	83.90 ± 3.06	10.83 ± 2.46	3.68 ± 0.58
模型	10	130.64 ± 14.43 [*]	14.46 ± 2.41 [*]	1.03 ± 0.45 [*]	160.83 ± 10.06 [*]	17.06 ± 1.08 [*]	1.53 ± 0.19 [*]
中药	12	45.31 ± 8.08 ^A	5.85 ± 1.52 ^A	2.40 ± 0.16 ^A	101.06 ± 12.84 ^A	11.36 ± 1.40 ^A	2.81 ± 0.40 ^A
抗生素	10	119.35 ± 15.82	6.16 ± 2.16	1.05 ± 0.27	162.71 ± 8.03	16.50 ± 1.80	1.91 ± 0.28

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.01$;与模型组比较,^A $P < 0.01$

表 3 各组 DAO 及 TNF 含量的变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清		肠匀浆	
		DAO(g/L)	TNF(μ g/L)	DAO(g/g pro)	TNF(μ g/g pro)
对照	12	6.21 $\pm$ 1.90	1.62 $\pm$ 0.29	11.75 $\pm$ 2.11	1.17 $\pm$ 0.85
模型	10	23.83 $\pm$ 3.39 *	2.70 $\pm$ 0.33 *	4.84 $\pm$ 1.88 *	3.44 $\pm$ 0.40 *
中药	11	10.60 $\pm$ 2.38 ^A	1.71 $\pm$ 0.24 ^A	8.50 $\pm$ 2.92 ^A	0.68 $\pm$ 0.13 ^A
抗生素	10	19.28 $\pm$ 2.94	2.27 $\pm$ 0.33	6.38 $\pm$ 1.77	2.59 $\pm$ 0.21

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^A $P < 0.01$

表 4 各组大鼠小肠组织病理形态学改变 (例)

组别	n	中性粒细胞浸润	粘膜充血	粘膜水肿	粘膜坏死
对照	12	0	1	1	0
模型	10	5	10	10	10
中药	12	2	4	3	1
抗生素	10	3	6	5	2

和肠细胞内的铜颗粒明显减少,以中药组为优,抗生素组较差。

讨 论

目前,在外科领域里,肠道的屏障功能已引起了人们极大的关注。正常肠道中所含的细菌和内毒素的量足以将宿主致死数遍有余。在机体的内外表面,肠粘膜不但面积最大,而且肠道中所含细菌的量也最高,大于 10^{14} ,各种细菌多达 400 种以上。目前的观点是这些细菌多为致病菌。因此肠粘膜必须是机体的一道十分重要的防御屏障,才能有效地阻止肠道内的细菌和内毒素侵入体内。肠道屏障功能的健全是诸多肠道功能得以维持正常的根本所在^[6]。

我们应用 Zymosan A 诱发的 MODS 动物模型发现,肠道屏障损伤是 MODS 发生和发展的重要环节。DAO 在肠粘膜细胞中含量非常丰富,是肠粘膜细胞代谢不可缺少的酶,当肠粘膜受到损伤时其活性降低,是一个观察肠道屏障功能的可靠指标。本实验结果发现,MODS 时肠组织中 DAO 含量出现明显下降,表明肠道屏障功能受到损伤和破坏。而通里攻下中药大承气汤能明显提高模型状态下已经显著降低了的肠组织中 DAO 的含量,因而提示通里攻下中药对肠道屏障

具有明显的保护作用。其机制如下:(1)中药能防止或减轻肠粘膜的过氧化损伤。肠粘膜组织中含有丰富的 XOD,它所产生的氧自由基是造成肠道机械屏障损伤的重要因素。本实验发现,下法中药能明显提高肠粘膜组织中抗氧化剂 GSH 的含量,降低 XOD 活性,减少过氧化脂质 MDA 的生成。因而具有抗过氧化损伤的功效;(2)中药能减轻血循环中内毒素的含量,因而能减轻内毒素对肠粘膜上皮细胞的直接损伤和破坏作用;(3)中药能降低肠壁毛细血管通透性,改善微循环,疏通肠道,降低肠腔内压力,因而能改善血运,增加氧到肠的运输,减轻过氧化损伤;(4)中药能降低肠粘膜通透性和肠细胞渗透性,因而起到直接的保护作用;(5)中药能通过调整肠内细菌微生态平衡而加强肠道的生物学屏障功能;(6)中药能抑制肠道相关淋巴组织中的免疫活性细胞产生和释放 TNF 等细胞因子,减轻这些炎性细胞因子通过旁分泌对肠上皮细胞的损害。因此,通里攻下法通过保护肠道屏障功能可以减少肠源性内毒素血症和肠源性细菌移位,进而防治多器官功能不全综合征。

参 考 文 献

1. Deitch EA. Multiple system organ failure. Ann Surg 1992;216 (20): 111—134.
2. 陈海龙,吴咸中,裴德凯,等.肠道屏障在多器官功能不全综合征中的发病学意义研究.中华普通外科杂志 1998;13(1): 50—53.
3. 陈海龙,吴咸中,臧玉华,等.非细菌性多器官功能不全综合征的动物模型.中国急救医学杂志 1997;17(2): 1—4.
4. 吴晓生,李龙官.比色法测定黄嘌呤氧化酶.生物化学与生物物理进展 1986;(5): 65—70.
5. 夏愿耀.用镧作细胞外示踪剂的方法探讨.第二军医大学学报 1987;3(4): 282—283.
6. 陈海龙.肠道屏障.见李永渝主编.临床消化病理生理学.贵阳:贵州科技出版社,1995: 48—58.

(收稿:1999-06-14 修回:1999-10-29)