

参附注射液对腹腔感染大鼠血内毒素、小肠黏膜 HSP-70 表达的影响

胡培阳 胡晓飞 屠巍巍 陈中明 何露莎 王 果

摘 要 **目的** 探讨参附注射液对腹腔感染大鼠血内毒素水平、小肠黏膜热休克蛋白-70 (HSP-70) 的表达及肠黏膜屏障功能的影响。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60, 随机分为假手术组、腹腔感染组和参附注射液组, 每组 20 只。假手术组仅行单纯剖腹手术; 感染组采用盲肠结扎加穿孔 (CLP) 手术制作严重腹腔感染模型; 参附注射液组行 CLP 后以参附注射液 [10ml/(kg·d)] 静脉注射。术后第 5 天, 统计各组大鼠的死亡率, 检测血内毒素水平、小肠黏膜 HSP-70 表达, 并作小肠黏膜 Chiu 评分。**结果** 参附注射液组大鼠死亡率明显低于腹腔感染组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与腹腔感染组相比, 参附注射液组大鼠血内毒素水平显著降低 ($P < 0.05$), 小肠黏膜 HSP-70 表达明显升高 ($P < 0.05$), 小肠黏膜 Chiu 氏评分也较低 ($P < 0.05$)。**结论** 参附注射液可降低腹腔感染大鼠血内毒素水平, 促进肠黏膜细胞 HSP-70 的表达, 保护肠黏膜的屏障功能, 从而降低腹腔感染大鼠的死亡率。

关键词 参附注射液 SD 大鼠 内毒素 肠黏膜屏障 热休克蛋白-70

Effects of Shenfu Injection on the Serum Endotoxin Level, HSP-70 Expression of Intestinal Mucosa in Rats with Severe Abdominal Infection. Hu Peiyang, Hu Xiaofei, Tu Weiwei, Chen Zhongming, He Lusha, Wang Guo. VIP Ward, Taizhou Hospital, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To study the effects of Shenfu injection on the serum endotoxin levels, the expression of HSP-70 and intestinal mucosal barrier function in rats with severe abdominal infection. **Methods** A total of 60 male SD rats were randomly divided into three groups ($n = 20$ each): control group (laparotomy only), infection group (cecal ligation plus puncture), and Shenfu group [intravenous injection of Shenfu after cecal ligation plus puncture, 10ml/(kg·d)]. Serum endotoxin levels and the expression of HSP-70 in the intestinal mucosa were measured on the fifth day after the operation. The mortality rate and intestinal pathology Chiu scores were calculated meanwhile. **Results** Of the three groups, infection group got the highest mortality, while Shenfu injection can reduce mortality ($P < 0.05$). Compared with infection group, serum endotoxin level in the Shenfu injection group was significantly lower ($P < 0.05$), the expression of HSP-70 in the intestinal mucosa was significantly increased, and Shenfu injection group got better Chiu's scores ($P < 0.05$). **Conclusion** Shenfu injection can reduce the serum endotoxin level, promote the expression of intestinal HSP-70 and protect the intestinal mucosal barrier function in rats with severe abdominal infection, therefore it may play a role in reducing the mortality of rats with abdominal infection.

Key words Shenfu injection; SD rats; Endotoxin; Intestinal mucosal barrier; Heat shock protein-70

严重腹腔感染可引起肠黏膜屏障损伤, 肠道细菌、内毒素易位, 导致感染性休克甚至多器官功能障碍 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 其病死率约为 20%~40%。目前严重腹腔感染的治疗仍是腹部外科中棘手的问题。参附注射液 (shenfu injection, SF) 为红参、黑附片提取物的制剂, 主要成分

是人参皂甙、乌头类生物碱, 中医认为其具回阳救逆、益气固脱的作用, 主要用于暴脱的厥脱症 (感染性、失血性、失液性休克等)。现代药理学认为参附注射液具有抗炎、抗休克、抗氧自由基、改善微循环、增强机体免疫功能等多种药理作用。研究提示参附注射液对肠黏膜缺血再灌注损伤及重要脏器具有一定的保护作用, 并能够促进肠梗阻患儿术后肠功能及免疫功能的恢复, 但其在严重腹腔感染中的治疗作用及机制尚未见文献报道^[1,2]。本研究通过复制 SD 大鼠严重腹腔感染模型, 检测血清内毒素水平和肠黏膜细胞热休克蛋白-70 (heat shock protein-70, HSP-70)

作者单位: 317200 浙江省天台人民医院 (胡培阳); 317000 临海, 浙江省台州医院神经内科 (胡晓飞); 急诊科 (屠巍巍、陈中明); 311800 浙江省诸暨市红十字医院急诊科 (何露莎); 浙江省台州医院特需病房 (王果)

通讯作者: 胡晓飞, 电子信箱: huxiaofei2008@hotmail.com

表达,评估肠黏膜损伤程度来探讨参附注射液在严重腹腔感染的治疗作用。

材料与amp;方法

1. 实验材料:实验动物为清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200 ~ 250g,8 周龄,由浙江中医药大学动物实验中心提供[合格证号:SYXK(浙)2008 - 0115]。参附注射液购自雅安三九药业有限公司,产品批号为国药准字 Z090202)。内毒素检测用显色基质鲎试剂盒(终点显色法,含偶蛋化试剂)购自厦门市鲎试剂厂有限公司(批号:090808)。HSP - 70 免疫组化相关试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。高清晰度病理图像分析系统由同济科技集团千屏影像工程公司提供。

2. 动物分组与造模:取健康雄性 SD 大鼠,适应性喂养 1 周后,随机分成假手术组,腹腔感染组和参附注射液组,每组 20 只。参附注射液组采用盲肠结扎加穿孔手术(cecum ligation and perforation,CLP)制作严重腹腔感染模型行,术后予参附注射液[10ml/(kg · d)]静脉注射 5 天,每天 1 次^[3];感染组同样采用 CLP 制作严重腹腔感染模型,假手术组仅行单纯剖腹手术;后两组术后均予生理盐水[10ml/(kg · d)]静脉注射 5 天,每天 1 次。

3. 标本采集:术后第 5 天,存活的 SD 大鼠予 3% 戊巴比妥腹腔麻醉,抽取下腔静脉血其中 1ml 与配套血液抗凝剂 1ml 混匀后置于冰水中,以 1000r/min 低温离心 10min,取其上清用于内毒素检测。取 Treits 韧带下约 15 ~ 20cm 处一段小肠组织,固定切片后用于观察肠黏膜病理变化和小肠黏膜 HSP - 70 蛋白表达检测。

4. 血清内毒素检测:采用偶氮终点显色法鲎试验(LAL)定量测定血浆内毒素的浓度,WSOFTMAX 软件处理内毒素标准品溶液得到的 OD 值,自动计算待测样品内毒素含量。

5. 小肠黏膜损伤程度评定:小肠标本部分行常规石蜡切片,HE 染色,根据 Chiu 氏 6 级评分对小肠的损伤程度进行评定,双盲法判读肠黏膜病理切片并记分^[4]。0 分:正常黏膜绒毛;1 分:上皮下间隙增大,通常在绒毛的尖端,常伴随有毛细血管淤血;2 分:上皮下间隙扩张伴随上皮层同固有层的中度分离;3 分:绒毛两侧上皮层大量的同固有层分离,部分绒毛顶端破损;4 分:绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露,可能观察到固有层的细胞成分增多;5 分:固有层破坏和不完整、出血和溃疡。

6. 小肠黏膜 HSP - 70 蛋白检测(免疫组化法):另一部分小肠组织切片脱蜡至水,微波修复(5min × 2 次),室温冷却,3% H₂O₂ 封闭 30min,PBS 冲洗后(5min × 2 次),羊血清封闭 30min(37℃ 水浴),滴加 HSP - 70 抗体 37℃ 水浴 30min,PBS 冲洗(5min × 2 次),滴加 II 抗(羊抗鼠)37℃ 水浴 30min,再行 PBS 冲洗(5min × 2 次),DAB 显色 5 ~ 10min,苏木精淡染,0.1% 盐酸、乙醇分化,返蓝,脱水、透明、中性树胶封片。阳性反应为细胞染成棕黄色或有棕黄色颗粒沉积。

阳性细胞计数方法:采用双盲法在每张切片中选取有代表性的区域,在高倍镜(10 × 40)下计数 1000 个细胞中的阳

性细胞数(辅以计算机图像分析软件 IPP6.0 自动进行统计计数),每组数值以均数 ± 标准差表示。个别坏死细胞及周边着色细胞不计入阳性细胞内。

7. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。本实验计量资料以采用完全随机设计的方差分析,组间比较采用 SNK - q 检验,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用行 × 列表卡方检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠实验后死亡情况(表 1):假手术组术后 5 天均未出现死亡,死亡率为 0%;腹腔感染前 3 天共死亡 10 只,总死亡率为 50%;参附注射液组前 3 天共死亡 4 只,总体死亡率为 20%。与假手术组相比,腹腔感染组大鼠死亡率显著升高($P < 0.01$)。而采用参附注射液治疗后,参附注射液组大鼠死亡率与生理盐水治疗的腹腔感染组大鼠死亡率比较略有降低($P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠在 24、48、72h 内死亡数及死亡率

组别	n	24h	48h	72h	总死亡数	总死亡率(%)
假手术组	20	0	0	0	0	0
腹腔感染组	20	4	6	0	10	50*
参附注射液组	20	0	4	0	4	20#

与假手术组相比,* $P < 0.05$,# $P > 0.05$

2. 3 组间内毒素水平比较(表 2):术后第 5 天,腹腔感染组内毒素含量明显高于假手术组和参附注射液治疗组,差异有统计学意义($P < 0.05$);参附注射液组内毒素水平虽较假手术组高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 3 组术后第 5 天血内毒素水平比较

组别	n	内毒素水平
假手术组	20	2.29 ± 0.57
腹腔感染组	10	8.38 ± 1.65*
参附注射液组	16	3.06 ± 0.74#△

与假手术组相比,* $P < 0.05$,# $P > 0.05$;与腹腔感染组相比,△ $P < 0.05$ 。

3. 小肠黏膜 Chiu 氏评分(图 1、表 3):假手术组小肠黏膜病理大多表现为正常绒毛(Chiu 氏评分:0 分),腹腔感染组小肠病理以绒毛上下皮间隙增大为主(Chiu 氏评分:1 分),参附注射液治疗组小肠多表现为正常绒毛和绒毛上下皮间隙增大。3 组均未见绒毛两侧上皮层大量的同固有层分离,部分绒毛顶端破损;绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露,固有层的

细胞成分增多;固有层破坏和不完整、出血和溃疡等病理表现。

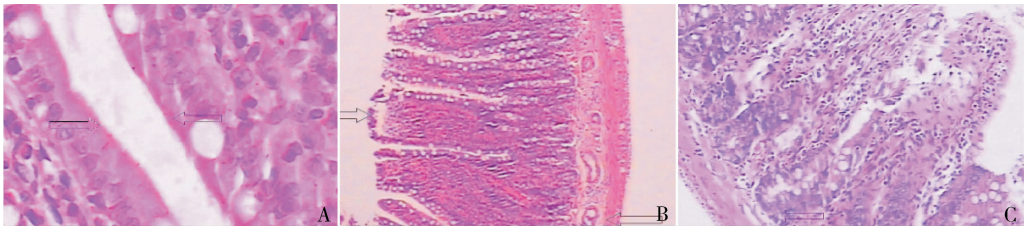


图1 小肠黏膜 Chiu 氏评分(HE 染色)

- A. 正常黏膜绒毛(Chiu 氏评分:0 分×100);B. 小肠黏膜上皮下间隙增大,伴有毛细血管淤血(Chiu 氏评分:1 分,×40);
C. 小肠黏膜上皮层固有层的中度分离(Chiu 氏评分:2 分,×40)

表3 大鼠小肠黏膜病理 Chiu 氏评分及 10×40 倍下各组大鼠 1000 个肠黏膜细胞中 HSP-70 阳性细胞数

组别	n	Chiu 氏评分(分) ^a	HSP-70 阳性细胞数(个) ^b
假手术组	20	0.75±0.46	23.60±9.07
腹腔感染组	10	1.40±0.55 ^{a1}	39.20±13.55 ^{b1}
参附注射液组	16	0.48±0.30 ^{a2,a3}	89.20±16.61 ^{b2,a3}

^aChiu 氏评分,与假手术组相比,^{a1} $P<0.05$,^{a2} $P>0.05$;与腹腔感染组相比,^{a3} $P<0.05$;^bHSP-70 阳性细胞数,与假手术组相比较,^{b1} $P>0.05$,^{b2} $P<0.05$;与腹腔感染组相比较,^{b3} $P<0.05$

4. 各组大鼠肠黏膜 HSP-70 的表达(图 2、表 3):显微镜下所见:腹腔感染组和参附注射液组的大

鼠小肠黏膜 HSP-70 表达主要集中在固有层的淋巴细胞,黏膜下层结缔组织及成纤维细胞中也有阳性表达。参附注射液组 HSP-70 表达阳性者多为整个细胞染成棕黄色,而对照组及假手术组则多见阳性细胞中黄色颗粒,见图 2。与假手术组相比,参附注射液组肠黏膜 HSP-70 表达显著升高($P<0.05$),而腹腔感染组 HSP-70 表达表达略有升高,但差异无统计学意义。并且,与腹腔感染组大鼠相比,参附注射液组肠黏膜 HSP-70 的表达差异仍有统计学意义。

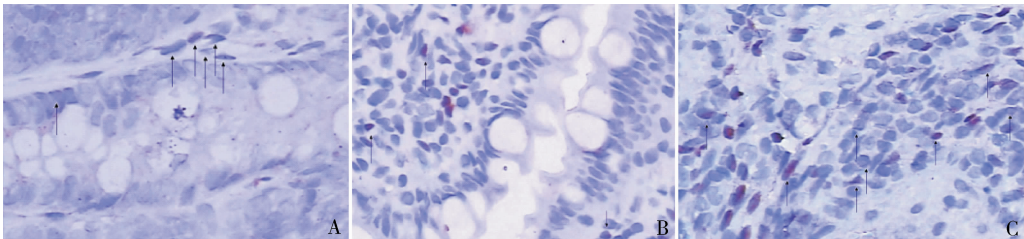


图2 3 组大鼠小肠黏膜 HSP-70 表达情况(苏木素染色,×100)

- A. 假手术组小肠黏膜细胞 HSP-70(箭头)少量表达,阳性者多见细胞内中黄色颗粒;B. 腹腔感染组大鼠小肠黏膜细胞 HSP-70 表达略多;C. 参附注射液组小肠黏膜细胞 HSP-70 表达较多,阳性者多为整个细胞染成棕黄色(苏木素染色,×100)

讨 论

腹腔感染是普通外科常见疾病之一,多继发于腹腔内脏器炎症穿孔、损伤破裂或手术后并发症等。严重腹腔感染可引起肠黏膜屏障损伤,肠道细菌易位,继发细胞因子和炎性介质的连锁反应,导致感染性休克甚至多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。

内毒素是革兰阴性杆菌产生的一种重要产物,腹腔感染脓毒症时,其水平可明显升高。内毒素可以抑制肠道的蠕动、分泌、消化和免疫防御作用,引起黏膜水肿,使肠绒毛顶部细胞坏死,肠通透性增加,从而破坏肠黏膜屏障功能。内毒素还可以激活补体、激活血

液凝固,通过产生刺激血管的激素和激活巨噬细胞的 IL-1 损害肠屏障^[5]。在本研究中,笔者观察到假手术组小肠黏膜各层结构完整,肠绒毛排列整齐,而腹腔感染组肠黏膜下层间质水肿、血管充血,肠绒毛毛细血管充血,部分区域有黏膜上皮脱落,浆膜层明显炎性渗出,肠黏膜的 Chiu 氏评分假手术组高,并且腹腔感染组大鼠组血清内毒素水平较假手术组高。本研究的结果支持内毒素对肠黏膜屏障具有破坏作用。另一方面,我们发现应用参附注射液组大鼠肠黏膜病理改变较腹腔感染组有明显好转,黏膜水肿、上皮坏死等情况减轻,并且内毒素水平也较腹腔感染组降低,提示参附注射液可能具有肠黏膜屏障的保护作

用。王进等^[6]曾运用参附注射液治疗内毒素所致全身炎症反应综合征的大鼠,结果发现参附注射液可以显著降低 NF- κ B 活性、TNF- α 及 IL-6 水平,减轻肺脏和肝脏病理损伤,而杨仁轩等^[7]对老年髋部围手术期患者应用参附注射液进行治疗时也证实预防性使用参附注射液能使血浆内毒素显著减低,增强肝脏的解毒功能,直接促进肝脏对内毒素的灭活。在缺血再灌注损伤动物模型中,吴洋等^[8]研究表明参附注射液能够激发血红素加氧酶(HO-1)的大量生成,抑制诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,清除氧自由基,抑制脂质过氧化物产生,维护肠黏膜屏障的作用。结合以往的研究结果,笔者提出参附注射液可能通过降低腹腔感染大鼠血内毒素水平,抑制炎症反应及抗氧化应激,进而起到肠黏膜的保护作用。

腹腔感染后应用参附注射液治疗还可能影响热休克蛋白(heat shock protein-70, HSP-70)的表达。业已证明 HSP-70 是一种分子伴侣,在细胞的信息传递、生长、分化中具有重要的调控作用,同时 HSP-70 又具有抗原呈递而起作用,参与细胞的抗损伤、修复过程。HSP-70 通过抑制 NF- κ B 活化,从而抑制免疫应答细胞内炎症细胞因子 IL-1、IL-2、TNF- α 等的转录,阻断促炎因子表达,从而抑制炎症反应^[9]。在本研究中,我们发现腹腔感染组大鼠肠黏膜 HSP-70 表达与假手术组相比差异无统计学意义,而参附注射液治疗组大鼠 HSP-70 的表达较假手术组和腹腔感染组均高,提示参附注射液可能促进腹腔感染大鼠肠黏膜 HSP-70 的表达,从而发挥肠黏膜保护作用。

在本研究中,我们还观察到腹腔感染组大鼠的死亡率明显高于假手术组,而应用参附注射液治疗腹腔感染大鼠后,其死亡率较单纯应用生理盐水治疗的腹腔感染大鼠死亡率低,这一方面可能与应用参附注射液治疗能降低内毒素水平、对抗内毒素性休克,并能改善重症脓毒症血症时组织氧代谢有关,另一方面可能与参附注射液能改善肠系膜微循环,促进肠道黏膜 HSP-70 的表达,保护肠黏膜屏障有关^[10-12]。

综上所述,本研究的结果表明应用参附注射液治疗腹腔感染大鼠,可以降低血清内毒素水平,促进肠黏膜 HSP-70 的表达,保护肠黏膜屏障,从而降低腹腔所致的死亡率。

参考文献

- 1 Xia ZY, Liu XY, Zhan LY, *et al.* Ginsenosides compound (shen-fu) attenuates gastrointestinal injury and inhibits inflammatory response after cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 130(2): 258-264
- 2 王丽亚, 魏影非, 杜惠兰, 等. 参附注射液对肠梗阻术后患儿肠功能恢复及细胞免疫、血 IL-2、TNF- α 水平的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(10): 744-746
- 3 鲍扬, 李幼生, 黎介寿. 一种新型腹腔感染动物模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(1): 99-100
- 4 Matsuda H, Hirato J, Kuroiwa M, *et al.* Histopathological and immunohistochemical study of the enteric innervations among various types of aganglionoses including isolated and syndromic Hirschsprung disease [J]. *Neuropathology*, 2006, 26(1): 8-23
- 5 Suzuki Y, Lu Q, Xu DZ, *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase activity is inhibited in cultured intestinal epithelial cells by endotoxin or nitric oxide [J]. *Int J Mol Med*. 2005, 15(5): 871-877
- 6 Wang J, Qiao LF, Yang GT. Role of Shenfu injection in rats with systemic, inflammatory response syndrome[J]. *Chin J Integr Med*, 2008, 14(1): 51-55
- 7 杨仁轩, 郭玉海, 李念虎, 等. 参附注射液对老年髋部手术后肠屏障的保护机制[J]. *中医正骨*, 2005, 17(12): 8-9
- 8 吴洋, 夏中元. 参附注射液对肠缺血再灌注大鼠肾组织 HO-1 与 iNOS 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(7): 1024-1027
- 9 Chan JY, Ou CC, Wang LL, *et al.* Heat shock protein 70 confers cardiovascular protection during endotoxemia via inhibition of nuclear factor- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in the rostral ventrolateral medulla[J]. *Circulation*, 2004, 110(23): 3560-3566
- 10 王龙, 刘先义, 陈雪君, 等. 参附注射液对休克复苏时肠黏膜保护作用机制的实验研究[J]. *中国急救医学*, 2001, 21(8): 447-448
- 11 江荣林, 雷谢, 王灵聪, 等. 参附注射液对重度脓毒症患者组织氧代谢的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(7): 965-967
- 12 宋欣伟, 骆永忠. 不同剂量参附注射液对兔心肌缺血再灌注损伤时胃肠微循环的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(11): 128-129

(收稿: 2011-12-29)

(修回: 2012-02-16)

欢迎订阅

欢迎赐稿