

参附注射液对严重脓毒症大鼠 促胃生长激素干预作用的机制研究

伍万¹ 江荣林² 欧阳侃²

(1. 杭州市中医院, 浙江 杭州 310007; 2. 浙江省中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的 观察参附注射液对脓毒症大鼠肠功能的影响。**方法** 将 40 只大鼠按随机数字表法分为假手术组、脓毒症模型组、参附低浓度和高浓度组, 每组 10 只。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症大鼠模型, 假手术组大鼠仅开腹而不行 CLP。参附低、高浓度组大鼠于制模后 10 min 经尾静脉推注参附注射液 5 mL/kg 和 10 mL/kg; 模型组则推注生理盐水 10 mL/kg。12 h 后取血并处死大鼠, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清促胃生长激素 (Ghrelin)、胃泌素及炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、高迁移率族蛋白-1 (HMGB1) 和髓过氧化物酶 (MPO)、二胺氧化酶 (DAO) 活性; 采用蛋白质免疫印迹法 (Western Blot) 法检测 Ghrelin、胃泌素受体 (GHSR) 蛋白水平; 光镜下观察肠黏膜组织病理学改变并行 Chiu 评分; 采用原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 检测肠黏膜上皮细胞凋亡指数 (AI)。**结果** 与假手术组比较, 模型组血清 Ghrelin、胃泌素含量明显减少 [Ghrelin (ng/L): 121.23 ± 3.53 比 146.28 ± 5.43 , 胃泌素 (ng/L): 81.78 ± 3.27 比 102.78 ± 4.07], TNF- α 、HMGB1 含量明显增加 [TNF- α (mg/L): 93.71 ± 3.66 比 11.69 ± 1.44 , HMGB1 (mg/L): 76.25 ± 4.12 比 22.41 ± 3.08]; 肠组织 DAO 活性降低 [DAO (U/mL): 14.64 ± 0.68 比 25.13 ± 1.98], MPO 活性升高 [MPO (mg/L): 175.98 ± 6.95 比 45.64 ± 4.48], Ghrelin、GHSR 蛋白表达水平明显降低 [Ghrelin (灰度值): 0.12 ± 0.02 比 0.23 ± 0.04 , GHSR (灰度值): 0.18 ± 0.02 比 0.32 ± 0.03]; 肠黏膜 Chiu 评分及回肠黏膜上皮细胞 AI 均明显升高 [Chiu 评分 (分): 3.90 ± 0.52 比 0.30 ± 0.30 , AI: 29.31 ± 1.65 比 5.45 ± 1.35 , 均 $P < 0.01$]。与模型组比较, 参附低、高浓度组血清 Ghrelin 含量和肠组织中 Ghrelin、GHSR 蛋白表达水平均显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肠组织 DAO 活性、Chiu 评分及 AI 显著降低, 且参附高浓度组的变化较参附低浓度组更显著 [Ghrelin (ng/L): 143.54 ± 3.89 比 136.58 ± 4.91 , TNF- α (mg/L): 75.13 ± 4.69 比 83.70 ± 4.40 , HMGB1 (mg/L): 57.47 ± 4.53 比 65.41 ± 4.63 , Ghrelin 蛋白 (灰度值): 0.18 ± 0.03 比 0.15 ± 0.03 , GHSR 蛋白 (灰度值): 0.28 ± 0.03 比 0.23 ± 0.03 , MPO (mg/L): 154.05 ± 5.75 比 162.64 ± 5.73 , DAO (kU/L): 19.70 ± 1.51 比 16.67 ± 0.92 , Chiu 评分 (分): 2.30 ± 0.52 比 3.20 ± 0.48 , AI: 20.38 ± 1.34 比 26.40 ± 1.32 , 均 $P < 0.05$]; 而参附低、高浓度组血清胃泌素含量较模型组有所升高, 但差异均无统计学意义 (83.59 ± 3.24 、 86.54 ± 5.93 比 81.78 ± 3.27 , 均 $P > 0.05$)。光镜下可见模型组肠黏膜绒毛破损、肿胀明显, 有溃疡形成, 血管周围出血明显, 有中性粒细胞浸润, 基底层断裂; 参附组肠绒毛少量缺损, 局限性坏死, 少量出血, 有少量中性粒细胞浸润。**结论** 参附注射液可明显改善脓毒症模型大鼠异常的血清 Ghrelin 表达, 降低血清 TNF- α 、HMGB1 水平, 减少肠组织 MPO 活性、提高 DAO 活性, 减轻回肠黏膜的病理改变, 减少回肠黏膜上皮细胞凋亡, 且此作用强度与参附注射液剂量成正比。

【关键词】 参附注射液; 脓毒症; 促胃生长激素; 胃泌素

An observation on interference mechanism of Shenfu injection on ghrelin in rats with severe sepsis Wu Wan*, Jiang Ronglin, Ouyang Kan. *Hangzhou Traditional Chinese Medicine (TCM) Hospital, Hangzhou 310007, Zhejiang, China

Corresponding author: Jiang Ronglin, the First Clinical Medical College of Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310006, Zhejiang, China, Email: jiangronglin@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Shenfu injection on intestinal function in rats with sepsis. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: sham operation, sepsis model, low and high concentration Shenfu injection groups, each group $n = 10$. The sepsis model was replicated by cecal ligation and puncture (CLP), while the rate in sham operation group just underwent abdominal incision without CLP. Ten minutes after CLP, the low and high dose Shenfu injection groups were given 5 mL/kg and 10 mL/kg Shenfu intravenous injection via a tail vein respectively. The rats in the model group were treated by intravenous injection of 10 mL/kg normal saline through a tail vein in 10 minutes after CLP. Twelve hours later, the rats were sacrificed. The levels of Ghrelin, Gastrin, tumor necrosis factor- α (TNF- α), high mobility group B1 protein (HMGB1), myeloperoxidase (MPO) and diamine oxidase (DAO) activity in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of protein of Ghrelin and gastrin receptor (GHSR) were detected by Western Blot. Under light microscope, the histopathological

changes in intestinal mucosa were investigated, and Chiu score was determined, and the apoptosis index (AI) of intestinal mucosal epithelial cells was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). **Results** Compared with sham operation group, in model group, the levels of Ghrelin and Gastrin in serum were significantly decreased [Ghrelin (ng/L): 121.23 ± 3.53 vs. 146.28 ± 5.43 , Gastrin (ng/L): 81.78 ± 3.27 vs. 102.78 ± 4.07], the serum levels of TNF- α and HMGB1 were markedly increased [TNF- α (mg/L): 93.71 ± 3.66 vs. 11.69 ± 1.44 , HMGB1 (mg/L): 76.25 ± 4.12 vs. 22.41 ± 3.08], the DAO activity and protein expressions of Ghrelin and GHSR of intestinal tissue were obviously decreased [DAO (U/mL): 14.64 ± 0.68 vs. 25.13 ± 1.98 , Ghrelin (grey value): 0.12 ± 0.02 vs. 0.23 ± 0.04 , GHSR (grey value): 0.18 ± 0.02 vs. 0.32 ± 0.03], the MPO activity in intestinal tissue, Chiu score of intestinal mucosa and AI of ileum mucosal epithelial cells were remarkably increased [MPO (mg/L): 175.98 ± 6.95 vs. 45.64 ± 4.48 , Chiu score: 3.90 ± 0.52 vs. 0.30 ± 0.30 , AI: 29.31 ± 1.65 vs. 5.45 ± 1.35 , all $P < 0.01$]. Compared with model group, in low and high Shenfu injection groups, the levels of Ghrelin in serum and protein expressions of Ghrelin and GHSR in intestinal tissues were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), the activity of DAO of intestinal tissues, the Chiu score and AI were significantly decreased, the degrees of changes being more significant in high Shenfu injection group than those in low Shenfu injection group [Ghrelin (ng/L): 143.54 ± 3.89 vs. 136.58 ± 4.91 , TNF- α (mg/L): 75.13 ± 4.69 vs. 83.70 ± 4.40 , HMGB1 (mg/L): 57.47 ± 4.53 vs. 65.41 ± 4.63 , protein expression of Ghrelin (grey value): 0.18 ± 0.03 vs. 0.15 ± 0.03 , protein expression of GHSR (grey value): 0.28 ± 0.03 vs. 0.23 ± 0.03 , MPO (mg/L): 154.05 ± 5.75 vs. 162.64 ± 5.73 , DAO (kU/L): 19.70 ± 1.51 vs. 16.67 ± 0.92 , Chiu score: 2.30 ± 0.52 vs. 3.20 ± 0.48 , AI: 20.38 ± 1.34 vs. 26.40 ± 1.32 , all $P < 0.05$]. The levels of serum Gastrin in low and high Shenfu injection group were higher than those in model group, but no statistically significant differences were found (83.59 ± 3.24 , 86.54 ± 5.93 vs. 81.78 ± 3.27 , both $P > 0.05$). Under light microscope, the pathological changes were seen as follows: destruction and obvious edema of intestinal mucosal villi, ulcer formation, significant perivascular hemorrhage, presence of neutrophil infiltration and fracture of basement membrane in model group, while in low and high Shenfu groups, the intestinal villi had little defect, focal necrosis, small amounts of hemorrhage and neutrophil infiltration. **Conclusions** Shenfu injection can significantly improve the abnormal expressions of serum Ghrelin, reduce the levels of serum TNF- α and HMGB1, lowered MPO activity and enhance DAO activity in intestinal tissue, alleviate pathological changes in ileum mucosa, and decrease AI of ileum mucosal epithelial cells in rats with sepsis. And the degree of therapeutic effect is proportional to the Shenfu injection dose.

【Key words】 Shenfu injection; Sepsis; Ghrelin; Gastrin

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征 (SIRS), 因机体免疫功能失衡、紊乱^[1]等而引起血管内皮细胞损伤及微循环功能障碍^[2], 导致肠道运动功能受到抑制, 肠腔内细菌黏附于肠壁, 同时肠上皮细胞大量凋亡, 屏障功能受损, 细菌及毒素有机会进入机体的血液循环, 进一步加重脓毒症的发展进程最终导致多器官功能衰竭 (MOF)。因此, 维护肠道正常运动功能和肠黏膜结构的完整性是阻止肠道内细菌和毒素移位的首要条件。研究证实, 参附注射液有降低脓毒性休克患者炎症反应^[3]、保护心脑血管^[4]、降低病死率^[5]等作用, 但对肠道功能是否有保护功能目前还未见相关研究报道。本研究采用有温阳救逆作用的参附注射液干预严重脓毒症大鼠, 观察血清促胃生长激素 (Ghrelin)、胃泌素、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、髓过氧化物酶 (MPO) 水平和二胺氧化酶 (DAO) 的活性, 以及肠黏膜损伤和肠黏膜上皮细胞的凋亡情况, 为治疗严重脓毒症、保护肠功能提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验主要试剂: 大鼠 Ghrelin、胃泌素、TNF- α 、HMGB1、MPO、DAO 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试

剂盒均购自上海西唐生物科技有限公司; 参附注射液由四川雅安三九药业有限公司生产, 批号为国药准字: Z2004-3117。原位末端缺刻标记试验 (TUNER) 检测试剂盒购自南京凯基生物科技有限公司。

1.2 动物分组及处理: 选择 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 雄雌不限, 体质量 220 ~ 300 g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 20120418。按随机数字表法分为假手术组、模型组和参附低、高浓度组, 每组 10 只。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症模型^[6]; 假手术组仅开腹但不行 CLP。参附低、高浓度组于制模后 10 min 经尾静脉推注参附注射液 5 mL/kg 和 10 mL/kg, 模型组则推注生理盐水 10 mL/kg。12 h 处死动物取材备用。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 大鼠血清 Ghrelin、胃泌素、TNF- α 、HMGB1 和肠组织 MPO、DAO 水平测定: 采用 ELISA, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 肠黏膜损伤程度评分: 在距回盲部 2 cm 处剪取回肠组织约 3 cm, 用 10% 甲醛水溶液固定, 常

表 1 各组大鼠血清 Ghrelin、胃泌素、TNF- α 、HMGB1 及肠组织 MPO、DAO 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Ghrelin (ng/L)	胃泌素 (ng/L)	TNF- α (mg/L)	HMGB1 (mg/L)	肠 MPO (mg/L)	肠 DAO (kU/L)
假手术组	10	146.28 $\pm$ 5.43	102.78 $\pm$ 4.07	11.69 $\pm$ 1.44	22.41 $\pm$ 3.08	45.64 $\pm$ 4.48	25.13 $\pm$ 1.98
模型组	10	121.23 $\pm$ 3.53 ^a	81.78 $\pm$ 3.27 ^a	93.71 $\pm$ 3.66 ^a	76.25 $\pm$ 4.12 ^a	175.98 $\pm$ 6.95 ^a	14.64 $\pm$ 0.68 ^a
参附低浓度组	10	136.58 $\pm$ 4.91 ^b	83.59 $\pm$ 3.24	83.70 $\pm$ 4.40 ^b	65.41 $\pm$ 4.63 ^b	162.64 $\pm$ 5.73 ^b	16.67 $\pm$ 0.92 ^b
参附高浓度组	10	143.54 $\pm$ 3.89 ^{cd}	86.54 $\pm$ 5.93	75.13 $\pm$ 4.69 ^{cd}	57.47 $\pm$ 4.53 ^{cd}	154.05 $\pm$ 5.75 ^{bd}	19.70 $\pm$ 1.51 ^{bd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与参附低浓度组比较,^d $P<0.05$

规脱水,石蜡包埋,切片,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察小肠组织病理学改变。肠黏膜损伤程度按 Chiu 六级评分法分为 0~5 分^[7]。

1.3.3 细胞凋亡检测:用 TUNEL 测定细胞凋亡率,操作步骤按试剂盒说明书进行。高倍镜下(10 目镜 $\times$ 40 物镜)见到凋亡阳性细胞核呈棕黄色,凋亡阴性细胞核呈蓝色。以凋亡阳性细胞数目占总细胞数的百分比作为细胞凋亡指数(AI)。

1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肠组织 Ghrelin、胃泌素受体(GHSR)的蛋白表达:取空肠组织 20 mg 加入 200 μ L RIPA 裂解液制备组织匀浆,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,取上清液,以二喹啉甲酸(BCA)法测定各指标的蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,电泳后将分离出的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h;用含吐温 20 的 Tris 缓冲液(TBS-T)缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20)洗膜 3 次,每次 30 min;加入多克隆兔抗 Ghrelin、GHSR 抗体(1:500,一抗)4 $^{\circ}$ C 过夜, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,每次 30 min;加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗体兔抗(二抗)孵育 2 h, TBS-T 缓冲液洗膜 3 次,每次 30 min;加入 ECL 化学发光剂并曝光,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。胶片用 BIO-RAD 凝胶系统成像,用 Quantity one 软件对条带进行半定量分析。Ghrelin、GHSR 蛋白表达水平=样本 Ghrelin、GHSR 蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.4 统计学处理:使用 SPSS 17.0 软件进行多样本比较的方差分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐时用 SNK- q 和 Dunnett- t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清 Ghrelin 和胃泌素含量比较(表 1):与假手术组比较,模型组血清 Ghrelin 和胃泌素含量显著减少(均 $P<0.01$)。参附低、高浓度组血清

Ghrelin 含量较模型组显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而两组血清胃泌素含量均有所增加,以高浓度组升高更显著,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 各组血清 TNF- α 与 HMGB1 含量的比较(表 1):与假手术组比较,模型组血清 TNF- α 、HMGB1 水平均升高;与模型组比较,参附低、高浓度组 TNF- α 、HMGB1 水平均降低,且以高浓度组降低更显著(均 $P<0.05$)。

2.3 各组大鼠肠组织 MPO 和 DAO 水平的比较(表 1):与假手术组比较,模型组肠组织 MPO 水平显著增加,而 DAO 活性显著下降(均 $P<0.01$);与模型组比较,参附高、低浓度组肠组织 MPO 水平显著下降,DAO 活性显著增加,以参附高浓度组变化更显著(均 $P<0.05$)。

2.4 各组大鼠肠组织病理学观察和肠上皮细胞 AI 比较(表 2):假手术组肠黏膜绒毛排列整齐,血管周围结构正常,无明显出血,肌层纤维排列整齐,浆膜层正常;回肠黏膜上皮仅见少量凋亡细胞。模型组肠黏膜绒毛破损,肿胀明显,有溃疡形成,血管周围出血明显,有中性粒细胞浸润,基底层断裂;模型组 Chiu 评分也较假手术组明显升高($P<0.01$);回肠黏膜上皮凋亡细胞明显增加,主要部位在黏膜上皮柱状细胞和黏膜下层,其 AI 显著高于假手术组($P<0.01$)。与模型组比较,参附组肠黏膜形态改善,Chiu 评分明显降低;肠黏膜上皮细胞 AI 明显低于模型组,且参附高浓度组改善更显著(均 $P<0.05$)。

表 2 各组大鼠肠黏膜上皮细胞凋亡情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Chiu 评分 (分)	AI
假手术组	10	0.30 $\pm$ 0.30	5.45 $\pm$ 1.35
模型组	10	3.90 $\pm$ 0.52 ^a	29.31 $\pm$ 1.65 ^a
参附低浓度组	10	3.20 $\pm$ 0.48 ^b	26.40 $\pm$ 1.32 ^b
参附高浓度组	10	2.30 $\pm$ 0.52 ^{cd}	20.38 $\pm$ 1.34 ^{cd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与参附低浓度组比较,^d $P<0.05$

2.5 各组大鼠肠组织 Ghrelin、GHSR 蛋白表达比较(表 3; 图 1): 与假手术组比较, 模型组肠组织 Ghrelin、GHSR 蛋白表达显著减少(均 $P < 0.01$)。与模型组比较, 参附注射液组低、高浓度组肠组织中 Ghrelin、GHSR 明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且参附组高浓度组血清 Ghrelin、GHSR 蛋白表达增加明显, 差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肠组织 Ghrelin、GHSR 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Ghrelin 蛋白 (灰度值)	GHSR 蛋白 (灰度值)
假手术组	10	0.23 ± 0.04	0.32 ± 0.03
模型组	10	0.12 ± 0.02^a	0.18 ± 0.02^a
参附低浓度组	10	0.15 ± 0.03^b	0.23 ± 0.03^b
参附高浓度组	10	0.18 ± 0.03^{cd}	0.28 ± 0.03^{cd}

注: 与假手术组比较, $^aP < 0.01$; 与模型组比较, $^bP < 0.05$, $^cP < 0.01$; 与参附低浓度组比较, $^dP < 0.05$

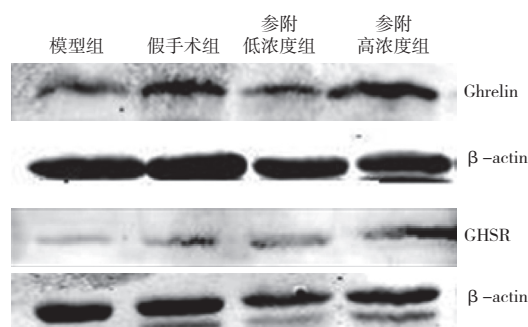


图 1 Western Blot 检测各组大鼠肠组织 Ghrelin、GHSR 蛋白表达水平

3 讨论

Ghrelin 由胃分泌后直接进入血液循环, 在下丘脑弓状核与 Ghrelin 功能性受体 GHS-R1a 结合后刺激神经肽 Y/ 南美豚鼠 agouti 相关蛋白(NPY/AgRP)神经元合成 NPY 和 AgRP, 从而起到增加食欲、加强胃肠动力的生物学效应。Ariga 等^[8]研究发现, 腹腔注射 Ghrelin 能明显加快胃排空, 提高胃窦幽门协调运动, 说明 Ghrelin 能降低血清 HMGB1 水平和改善肠黏膜屏障功能^[9]。Park 等^[10]研究发现, Ghrelin 可降低禁食 48 h 后大鼠小肠黏膜细胞的 DNA 裂解率, 减轻绒毛的缩短, 并降低介导细胞凋亡的执行分子天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的活性。本实验结果表明, 与模型组比较, 不同浓度的参附注射液都能明显降低血清 Ghrelin 表达水平, 且存在量效关系, 以高剂量的作用明显。胃泌素是由胃窦部和上段小肠黏膜 G 细胞分泌的一种肽类

激素, 有加强胃肠运动和胆囊收缩、刺激胃酸分泌和促进胃肠黏膜增生等的生物功能。但本实验结果表明, 不同浓度参附注射液组的胃泌素表达增加并不显著, 说明参附注射液不是通过增加胃泌素的表达来促进肠道运动。

TNF- α 是炎症初期主要的促炎介质之一, 是触发炎症“瀑布效应”的主要促炎细胞因子, 可促进白细胞介素(IL-1、IL-6、IL-8)、血小板活化因子(PAF)等促炎细胞因子的释放, 这些炎症因子互为因果、相互激活、相互放大, 从而导致 SIRS。

HMGB1 作为炎症晚期炎症介质, 是维持炎症“瀑布式”反应的中心分子, 与脓毒症、自身免疫疾病的病机关系密切。邵义明等^[11]发现 HMGB1 大鼠与脓毒症严重程度及预后有密切关系, 且 HMGB1 表达水平越高, 其死亡的可能性越大。本实验表明, 参附注射液能明显降低模型大鼠血清 TNF- α 、HMGB1 表达水平, 且存在量效关系, 说明参附注射液能降低血清 TNF- α 、HMGB1 炎症介质的表达水平, 降低炎症反应程度, 同时可能改善脓毒症预后。

Ghrelin 主要分布在胃肠道和中枢神经系统; GHSR 广泛分布于中枢神经系统及外周组织, 其胃肠道 GHSR 活性最高。研究表明, Ghrelin 与 GHSR 有促进食欲、加强胃肠动力等生物效应^[12]。本研究显示, 脓毒症模型大鼠肠组织中 Ghrelin 和 GHSR 蛋白含量较假手术组明显减少, 表明脓毒症机体内炎症介质可直接抑制 Ghrelin 和 GHSR 蛋白表达, 从而使 Ghrelin 与 GHSR 结合减少, 最终导致肠道运动功能减弱。而使用参附注射液后大鼠肠组织中 Ghrelin 和 GHSR 蛋白含量明显升高, 说明参附注射液能促进胃肠 Ghrelin 分泌, 其中一部分 Ghrelin 进入下丘脑弓状核与 GHS-R1a 结合后刺激 NPY/AgRP 神经元合成 NPY 和 AgRP; 另一部分 Ghrelin 直接与胃肠组织中 GHSR 结合, 释放促生长激素(GH)和促肾上腺皮质激素, 共同促进胃酸分泌, 促进胃肠蠕动、保护胃黏膜。关于 GHSR 蛋白表达量增加, 可能与 Ghrelin 有抑制炎症反应和刺激迷走神经兴奋, 导致 GHSR 上调有关, 具体机制有待进一步研究证实。本研究还发现肠组织 Ghrelin、GHSR 蛋白升高与参附注射液剂量成正比。

MPO 是反映中性粒细胞活化的指标。肠组织 DAO 活性能反映肠黏膜上皮细胞损伤及肠屏障结构的破坏, 这已在动物实验和临床研究中得以证实^[13-14]。本实验结果显示, 参附注射液能明显降低模型大鼠 MPO 表达水平, 显著提高 DAO 活性, 并且

存在有量效关系。说明参附注射液能通过减少氧自由基 MPO 的生成和中性粒细胞浸润、增加 DAO 活性,提高机体抗氧化能力,最终减少肠黏膜上皮细胞死亡而保护肠屏障结构和功能的完整性。

肠黏膜和上皮细胞正常生长周期为 3~8 d。而本研究发现,CLP 术 12 h 后肠黏膜形态学发生改变及肠上皮细胞凋亡明显增多,其机制有:① 脓毒症时体内血流重新分配,肠微循环血流相对减少,肠黏膜、肠上皮细胞发生缺血、缺氧,引起黏膜血管通透性增高、白细胞浸润、黏膜屏障功能遭受破坏;② 炎症介质作用:TNF- α 还通过激活死亡受体(肿瘤坏死因子受体家族)并与 I 型 TNF 受体(TNFR-1)结合,通过激活 caspases 级联反应而导致肠黏膜上皮细胞凋亡;③ 脓毒症时损伤的肠道中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)过度表达,而产生过多的 NO,高浓度的 NO 使过氧化亚硝酸盐和过氧化氮沉积在线粒体膜上,损伤线粒体功能,从而降低组织氧耗量^[15],使组织细胞进入乏氧低代谢过程,继而导致肠上皮细胞氧代谢障碍,加速细胞凋亡。本研究中 CLP 术 12 h 后肠上皮细胞 AI 均明显高于假手术组,不同浓度参附注射液可降低肠上皮细胞 AI,且作用与浓度成正比。说明脓毒症时确实存在着肠上皮细胞凋亡增多的现象,而应用参附注射液对细胞凋亡有明显的抑制作用,且其作用强度与参附注射液的浓度成正相关。顾伟等^[16]研究发现,参附注射液有通过强心提高心排血量(CO)、氧输送(DO₂)、氧消耗(VO₂)来改善严重脓毒症时全身氧代谢,从而推测参附注射通过改善组织氧代谢,增加 ATP 生成,从而改善肠道功能,抑制肠上皮细胞凋亡。

参附注射液的主要成分是人参皂苷、乌头类生物碱,可解除微血痉挛,改善微循环,增加组织氧供应。本研究显示,脓毒症大鼠血清 Ghrelin 和胃泌素表达水平明显下降,血清 TNF- α 、HMGB1 及肠组织 MDA 表达水平明显升高,而肠组织 DAO 活性明显降低,参附注射液干预后能显著增加严重脓毒症大鼠 Ghrelin 表达水平,从而增加肠道蠕动功能,减少细菌毒素黏附肠壁而发生的移位;同时通过 Ghrelin 的抗炎途径来减少促炎细胞因子 TNF- α 、HMGB1 的表达水平,降低炎症反应程度和肠组织氧化自由基 MPO 生成,减少中性粒性浸润,降低其活性,从而增加 DAO 的活性,减轻氧自由基、炎症介质对肠组织及功能的损伤,最终保护肠道屏障功能^[17]。这些都是通过 Ghrelin 的促进肠蠕动和抗炎保护肠屏障

而可以得出的结论,肠道的运动功能和屏障功能相互依存、相互作用,紧密联系,肠道的运动功能有赖于肠屏障结构的完整性。反之,肠屏障功能的完整性有赖于正常肠道运动功能,减少肠腔内细菌毒素吸附肠壁机会,从而对肠壁造成损害。

综上所述,参附注射液能明显减轻严重脓毒症炎症反应程度,保护脓毒症对肠道缺血、缺氧/再灌注损害,是治疗脓毒症的有效药物。

参考文献

- [1] 徐杰,张斌,于娜,等. 大黄联合山莨菪碱对严重脓毒症患者免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(2): 65-67.
- [2] 章志丹,马晓春. 脓毒症血管内皮细胞损伤与微循环功能障碍[J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23(2): 125-128.
- [3] 曾振国,龚洪翰,李勇,等. 参附注射液对脂多糖诱导的肺泡巨噬细胞微小 RNA-146a 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2012, 24(3): 166-169.
- [4] 袁军,张力,李进,等. 参附注射液对神经外科围手术期患者心脏的保护作用[J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23(12): 763-764.
- [5] 梁宇,孙立东,赵子瑜,等. 大剂量参附注射液治疗脓毒性休克的临床疗效分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(2): 109-110.
- [6] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.
- [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] Ariga H, Nakade Y, Tsukamoto K, et al. Ghrelin accelerates gastric emptying via early manifestation of antro-pyloric coordination in conscious rats [J]. Regul Pept, 2008, 146(1-3): 112-116.
- [9] Wu R, Dong W, Qiang X, et al. Oregenic hormone ghrelin ameliorates gut barrier dysfunction in sepsis in rats [J]. Crit Care Med, 2009, 37(8): 2421-2426.
- [10] Park JM, Kakimoto T, Kuroki T, et al. Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(1): 48-56.
- [11] 邵义明,姚华国,梁小仲,等. 高迁移率族蛋白 B1 表达水平与大鼠脓毒症严重程度及预后关系的实验研究[J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18(11): 668-672.
- [12] Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans [J]. Diabetes, 2001, 50(8): 1714-1719.
- [13] 张连阳,王正国,朱佩芳,等. 大鼠失血性休克复苏后肠屏障功能障碍[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(7): 767-770.
- [14] 吴承堂,黎洁良. 二胺氧化酶在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(1): 64.
- [15] Singer M, De Santis V, Vitale D, et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation [J]. Lancet, 2004, 364(9433): 545-548.
- [16] 顾伟,李春盛,殷文朋,等. 参附注射液对心肺复苏后心肌功能障碍猪转录因子 T-bet 和 GATA-3 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(3): 190-196.
- [17] Cheyuo C, Jacob A, Wang P. Ghrelin-mediated sympathoinhibition and suppression of inflammation in sepsis [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012, 302(3): E265-272.

(收稿日期: 2015-03-08)

(本文编辑: 李银平)