

大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠肠道髓系细胞触发受体-1表达的影响

沈丽娟, 吴锡平, 王金桂, 王倩, 孙月雯, 关云艳*
(南京中医药大学 无锡附属医院, 江苏 无锡 214071)

[摘要] 目的:研究大黄牡丹汤对脓毒症大鼠急性肠功能障碍的治疗作用是否与调控肠道髓系细胞触发受体-1 (TREM-1)表达有关。方法:雄性SD大鼠100只,腹腔注射 $4.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的脂多糖(LPS)进行造模,造模成功后随机分为5组:模型组,谷氨酰胺组($3.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),大黄牡丹汤低、中、高剂量组($7.5, 15, 30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设正常大鼠10只作为正常组。每日1次。7 d后所有大鼠灌胃混悬液2 mL(乳果糖100 mg,甘露醇50 mg)。留取24 h尿液,运用带电化学检测器的高压液相色谱仪分析尿中乳果糖(lactulose)与甘露醇(mannitol)比值(L/M)。取血和回肠组织,运用高效液相色谱法检测血清瓜氨酸浓度;酶联免疫吸附法检测血清髓系细胞触发受体-1 (TREM-1),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),肠型脂肪酸结合蛋白(iFABP),D-乳酸浓度;实时荧光定量PCR检测回肠组织TREM-1, Toll样受体2 (TLR2), Toll样受体4 (TLR4),髓样细胞分化蛋白(MyD88),核转录因子- κ B (NF- κ B) mRNA的表达水平;电镜观察肠黏膜损伤的病理变化。结果:与正常组比较,模型组血清TREM-1, TNF- α 浓度明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);回肠组织TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA表达水平明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);iFABP, D-乳酸浓度,尿L/M明显升高($P < 0.05$);血清瓜氨酸浓度明显降低($P < 0.05$);回肠黏膜厚度、绒毛长度明显下降($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组血清TREM-1, TNF- α 浓度明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);回肠组织TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA表达水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),4组之间无差异;谷氨酰胺组,大黄牡丹汤中、高剂量组血清iFABP, D-乳酸浓度,尿L/M明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);血清瓜氨酸浓度明显升高($P < 0.05, P < 0.01$);绒毛长度及黏膜层厚度明显升高($P < 0.05$);肠黏膜Chiu氏评分明显下降($P < 0.05$),3组之间无差异。结论:大黄牡丹汤能有效治疗脓毒症大鼠急性肠功能障碍,其作用机制可能与通过调控肠道髓系细胞触发受体-1表达,减轻肠道炎症反应有关。

[关键词] 大黄牡丹汤; 脓毒症; 急性肠功能障碍; 肠道; 髓系细胞触发受体-1

[中图分类号] R289; R289.5; R574; R574.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0020-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190230

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181031.0926.017.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 09:38

Effect of Dahuang Mudan Tang in Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Intestinal Tract in Rats with Septic Acute Intestinal Dysfunction

SHEN Li-juan, WU Xi-ping, WANG Jin-gui, WANG Qian, SUN Yue-wen, GUAN Yun-yan*
(Wuxi Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Wuxi 214071, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the therapeutic effect of Dahuang Mudan Tang on septic acute intestinal dysfunction in sepsis rats is related to the regulation of expression of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1). **Method:** Totally 100 male SD rats were injected intraperitoneally with lipopolysaccharide (LPS) at a dose of $4.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ to build sepsis model. The sepsis model rats were randomly

[收稿日期] 20180807(015)

[基金项目] 无锡市卫计委面上项目(YGZXM1525);无锡市卫计委青年医学重点人才项目(QNRC019)

[第一作者] 沈丽娟, 博士, 副主任医师, 从事脓毒症肠功能障碍的诊断与中西医结合治疗研究, E-mail: Panda55@163.com

[通信作者] *关云艳, 硕士, 主任医师, 从事脓毒症的诊断与中西医结合治疗研究, Tel: 0510-88859999, E-mail: Panda55007@163.com

divided into five groups: model group, glutamine group ($3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low, medium, high-dose Dahuang Mudan Tang group ($7.5, 15, 30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and another 10 normal rats were selected as normal group. Seven days later, 2 mL suspension (100 mg lactulose and 50 mg mannitol) was orally administrated by gavage, and 24 h urines were collected. The ratio of lactulose to mannitol in urine (L/M) was detected by HPLC with pulsed electrochemical detection (HPLC-PED). Serum citrulline concentrations in blood and ileum were determined by HPLC. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the concentrations of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), intestinal fatty acid binding protein (iFABP) and *D*-lactic acid. Real-time PCR was used to detect the mRNA expressions of TREM-1, Toll-like receptors 2 (TLR2), Toll-like receptors 4 (TLR4), myeloid cell differentiation protein (MyD88), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B). Electron microscopy was used to observe the pathological changes of intestinal mucosa injury. **Result:** Compared with normal group, the serum concentrations of TREM-1, TNF- α , iFABP, *D*-lactate; the ratio of lactulose to mannitol in urine (L/M) and the expressions of TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA in model group were increased obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$); citrulline concentration was decreased obviously ($P < 0.05$); the lengths of the villus and thicknesses of the mucosal layer were decreased obviously ($P < 0.05$); the Chiu score was increased obviously ($P < 0.01$). Compared with model group, the expressions of TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA, and the serum concentrations of TREM-1 and TNF- α in all medication administration groups were decreased obviously ($P < 0.05$), with no difference between these groups. Compared with model group, the serum concentrations of iFABP, *D*-lactate, L/M, the Chiu score in glutamine group, medium-dose Dahuang Mudan Tang group and high-dose Dahuang Mudan Tang group were decreased obviously ($P < 0.05$), lengths of villus and thicknesses of mucosal layers were increased obviously ($P < 0.05$); and the citrulline concentrations were increased obviously ($P < 0.05$). There was no difference between the three groups. **Conclusion:** Dahuang Mudan Tang can effectively treat SAID in rats, and its mechanism may be realized by regulating the expression of TREM-1 and relieving intestinal inflammation of intestinal tract.

[Key words] Dahuang Mudan Tang; sepsis; acute intestinal dysfunction; intestinal tract; triggering receptor expressed on myeloid cells-1

脓毒症时,肠上皮细胞数量减少,肠功能障碍,肠黏膜屏障破坏,导致肠腔内毒素入血,引起炎症介质释放增多,使肠黏膜屏障进一步受损,大量细菌和毒素易位,引起体内促炎性和抗炎性炎症介质平衡失调,导致恶性循环,加重全身炎症反应综合征(SIRS),最终造成多器官功能障碍(MODS)^[1-2]。胃肠道是脓毒症发展过程中的“始动器官”^[3]。临床对于胃肠功能障碍多给予常规对症治疗,疗效不佳^[4],而中医药对脓毒症患者肠功能障碍的治疗有一定效果。大黄牡丹汤出自《金匱要略》,由大黄、牡丹皮、桃仁、冬瓜仁和芒硝组成,为历代医家治疗肠痈的代表方剂,具有泻热破瘀、散结消肿之功效^[5]。髓系细胞触发受体-1(TREM-1)是选择性地表达于中性粒细胞、成熟的单核/巨噬细胞上的免疫球蛋白样受体^[6],在感染性疾病中起着炎症激发和级联放大的关键作用^[7]。前期研究证实,脓毒症大鼠回肠组织 TREM-1 表达升高,加重肠黏膜损伤,在脓毒症急性肠功能障碍的发生发展中起重要作用。

研究证实,大黄牡丹汤可减少炎症因子释放,抑制炎症反应,从而治疗炎症性病变^[8],故推测大黄牡丹汤对脓毒症大鼠急性肠功能障碍的治疗作用是否与调控肠道 TREM-1 表达有关。本研究拟构建脓毒症大鼠模型,观察大黄牡丹汤对脓毒症大鼠肠功能的保护作用,及对回肠组织 TREM-1 表达的影响,分析大黄牡丹汤治疗脓毒症急性肠功能障碍的可能机制,以为大黄牡丹汤治疗脓毒症急性肠功能障碍提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物 健康 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 110 只,购自北京维通利华公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,体质量 200 ~ 220 g。动物饲养于江苏省寄生虫病防治研究所,许可证号 SCXK(苏)2012-0033。本研究通过江苏省寄生虫病防治研究所动物伦理委员会审查,批准号 201x008。

1.2 药物 脂多糖(LPS)注射液, *L*-谷氨酰胺(*L*-glutamin)(美国 Sigma 公司,批号分别为 L2880,

G3126), *L*-glutamin 配制成质量浓度为 $0.375 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液; 乳果糖口服液(北京韩美药品有限公司, 国药准字 H20065730); 甘露醇(江苏正大天晴药业股份有限公司, 国药准字 H32026395); 大黄、牡丹皮、冬瓜仁、芒硝(苏州天灵中药饮片有限公司, 批号分别为 180628, 180428, 180507, 180721), 桃仁(江苏亚邦中药饮片有限公司, 批号 180813), 以上中药由南京中医药大学无锡附属医院郝磊药师鉴定为正品, 并按标准流程煎煮制备(大黄牡丹汤原方除芒硝外加水 500 mL, 浸泡 30 min, 煎煮 1 h, 过滤, 再加水 300 mL, 煎煮 30 min, 合并药液后加入芒硝)。

1.3 试剂 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 髓系细胞触发受体-1 (TREM-1), 肠型脂肪酸结合蛋白 (iFABP), *D*-乳酸酶免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒(上海沪峰化工有限公司, 批号分别为 F11310-A, F3151-A, FA1509-A, F3682-A); trizol RNA Isolation (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-026); 逆转录试剂盒, SYBR[®] Premix ExTaq TM II 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司, 批号分别为 RR047A, RR420A]; 引物序列由上海博彩生物技术有限公司合成。

1.4 仪器 DP2-BSW 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); JEM-1010 型透射电子显微镜(日本 Jeol 电子公司); Elx-800 型酶联免疫分析仪(美国 Bio Tek 公司); Bio LC 型带电化学检测器高压液相色谱仪(美国 Dionex 公司); 1525 型高效液相色谱仪, XBridge C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Empower2 色谱工作站, 2489 型紫外检测器(美国 Waters 公司); Light Cycler 480 型基因扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.5 动物造模及分组 雄性 SD 大鼠 100 只, 腹腔注射 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ LPS 进行造模^[9]。大鼠按 1 mL/100 g 体质量腹腔注射 $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 LPS 溶液, 腹腔注射时 10 min 内分 3 次注射完毕。造模成功的标准: 精神下降、活动减少、竖毛, 大鼠出现心率加快 (\geq 造模前两倍), 血压下降, 口鼻分泌物增多^[10]。造模成功后, 大鼠存活 75 只, 随机分为 5 组, 每组 15 只, 分别为模型组, 谷氨酰胺组, 大黄牡丹汤低、中、高剂量组, 另取 10 只正常 SD 大鼠设为正常组。

1.6 给药方法 谷氨酰胺组灌胃谷氨酰胺每日 1 次, 灌胃剂量 $3.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[11]; 大黄牡丹汤水煎剂以成人(体质量按 60 kg 计算)用药剂量的等效剂量灌胃, 高、中、低剂量分别为 30, 15, $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[12-13], 每日 1 次; 正常组、模型组每日灌胃等容积生理盐

水。实验期间自由进食饮水。7 d 后各组大鼠灌胃 2 mL 含乳果糖 100 mg, 甘露醇 50 mg 的混悬液, 放置代谢笼, 留取 24 h 尿液。

1.7 标本采集及病理检测 大鼠下腔静脉取血, 将收集的血液标本, 经 $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 统一检测。取血后处死, 暴露腹腔, 观察肠管颜色, 记录肠管水肿、出血、扩张及穿孔情况。大鼠处死后取肠黏膜的片段固定在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 2.5% 戊二醛溶液中 1 h 后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 缓冲液洗 3 次, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 1% 锇酸固定 2 h, 冲洗同前。乙醇梯度脱水后包埋于环氧树脂中。切片制成 50 nm 厚超薄切片, 电子染色后透射电镜下观察肠黏膜损伤程度。用图像分析软件测量肠壁绒毛长度, 黏膜层厚度。

1.7.1 肠黏膜通透性检测 带电化学检测器的高压液相色谱仪检测尿液中乳果糖与甘露醇的浓度, 计算比值 (L/M), 淋洗液 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 电压: 检测电极 + 0 V, 氧化电极 + 0.75 V, 还原电极 - 0.01 V; 进样量 25 μL 。

1.7.2 高效液相色谱法检测血清瓜氨酸浓度^[14] 色谱条件: $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵缓冲 (pH 6.0) (A)-甲醇 (B) 0 ~ 10 min, 90% ~ 85% A; 10 ~ 18 min, 85% ~ 55% A; 18 ~ 28 min, 55% ~ 10% A; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长 254 nm; 进样量 20 μL 。

1.7.3 ELISA 检测血清 TNF- α , TREM-1, iFABP, *D*-乳酸浓度 按照试剂盒详细说明书进行操作。加酶标液, 孵育, 洗板, 加入显色剂, 避光反应, 加终止液终止反应, 并在 450 nm 波长下检测吸光度 *A*, 计算其浓度。

1.7.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 的表达 将冷冻回肠组织 50 mg 按 trizol 法提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度, 应用 Takara 反转录及 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。反应条件为 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, 40 个循环。通过溶解曲线, 2% 琼脂糖凝胶电泳和基因测序确定产物的准确性, mRNA 表达程度采用相对定量计算, 后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ^[15] 计算基因相对含量。以 β -actin 作为内参基因, 引物序列见表 1。

1.8 统计学方法 统计分析过程采用 SPSS 21.0 软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 多组间均数比较采用单因素方差分析, 两组间及组内均数比较采用 *t* 检验, 其中 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
TREM-1	上游 5'-AAGTATGCCAGAAGCAGGAAGG-3'	138
	下游 5'-GGTAGGGTCATCTTTCAGGGTGT-3'	
TLR2	上游 5'-AGCGAAAATCTGTATG-GTTGAA-3'	166
	下游 5'-TGACTCAAAACCAAGCTTTG-TAGA-3'	
TLR4	上游 5'-AGAATGAGGACTGGGTGA-3'	100
	下游 5'-AGCGGCTACTCAGAACT-3'	
MyD88	上游 5'-GCTCATTGAGAAAAGGT-GTCG-3'	130
	下游 5'-TCAGTCGCTTCTGTGGACA-3'	
NF- κ B	上游 5'-GCAAACCTGGGAATACTTCATGTGACTAAG-3'	123
	下游 5'-ATAGGCAAGGTCAGAATGCACCAGAAGTCC-3'	
β -actin	上游 5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3'	211
	下游 5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'	

2 结果

2.1 大黄牡丹汤对大鼠死亡率的影响 由于脓毒症模型自然病程死亡率高^[16],造模结束时大鼠存活 75 只,随机分为 5 组,每组 15 只。实验结束时,正常组无死亡,模型组大鼠死亡 5 只(死亡率 33.3%),谷氨酰胺组死亡 3 只(死亡率 20%),大黄牡丹汤低剂量组死亡 4 只(死亡率 26.7%),大黄牡丹汤中、高剂量组各死亡 3 只(死亡率 20%)。

2.2 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠炎症指标的影响 与正常组比较,模型组血清

TREM-1, TNF- α 含量明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,谷氨酰胺组,大黄牡丹汤低、中、高剂量组血清 TREM-1, TNF- α 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠炎症指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Dahuang Mudan Tang on inflammatory indexes of rats with septicacut intestinal dysfunction ($\bar{x} \pm s$) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

分组	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	TREM-1	TNF- α
正常	-	10	4.25 \pm 0.54	440.08 \pm 62.08
模型	-	10	6.24 \pm 1.45 ²⁾	586.48 \pm 96.95 ¹⁾
谷氨酰胺	3.75	12	5.24 \pm 0.45 ³⁾	479.42 \pm 80.35 ⁴⁾
大黄牡丹汤	7.5	11	5.36 \pm 0.38 ³⁾	487.59 \pm 81.45 ⁴⁾
	15	12	5.31 \pm 0.42 ³⁾	487.01 \pm 76.32 ⁴⁾
	30	12	5.28 \pm 0.33 ³⁾	485.14 \pm 80.27 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

2.3 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组回肠组织 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,谷氨酰胺组,大黄牡丹汤低、中、高剂量组回肠组织 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 表达水平明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),4 组间无差异。见表 3。

表 3 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Dahuang Mudan Tang on mRNA expression of TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B in inflammatory indexes of rats with septicacut intestinal dysfunction ($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	TREM-1	TLR2	TLR4	MyD88	NF- κ B
正常	-	10	0	1.39 \pm 0.25	2.46 \pm 0.98	6.86 \pm 2.38	0.67 \pm 0.12
模型	-	10	0.58 \pm 0.19 ²⁾	3.45 \pm 1.27 ¹⁾	4.53 \pm 1.98 ¹⁾	9.84 \pm 3.17 ¹⁾	1.83 \pm 0.58 ²⁾
谷氨酰胺	3.75	12	0.31 \pm 0.07 ³⁾	2.65 \pm 1.02 ³⁾	3.03 \pm 1.26 ⁴⁾	8.06 \pm 2.64 ³⁾	0.98 \pm 0.34 ³⁾
大黄牡丹汤	7.5	11	0.29 \pm 0.08 ⁴⁾	2.74 \pm 0.87 ³⁾	3.15 \pm 1.03 ³⁾	8.12 \pm 2.08 ³⁾	1.01 \pm 0.56 ³⁾
	15	12	0.28 \pm 0.10 ⁴⁾	2.70 \pm 1.14 ³⁾	3.08 \pm 1.24 ³⁾	8.07 \pm 1.39 ³⁾	0.98 \pm 0.26 ³⁾
	30	12	0.28 \pm 0.09 ⁴⁾	2.66 \pm 0.76 ³⁾	3.05 \pm 0.89 ³⁾	8.04 \pm 2.03 ³⁾	1.02 \pm 0.43 ³⁾

2.4 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠回肠黏膜形态及病理学改变的影响 正常组回肠各层次结构清晰,无明显异常。模型组肠黏膜上皮抬高,绒毛较正常组短、宽,向两侧倒伏,部分绒毛顶端脱落,绒毛顶端上皮下出现囊状间隙。谷氨酰胺组,大

黄牡丹汤中、高剂量组较模型组明显改善,黏膜层绒毛细长,排列整齐,顶端上皮细胞无明显变性坏死。与正常组比较,模型组回肠黏膜厚度、绒毛长度明显下降 ($P < 0.05$),Chiu 氏评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,谷氨酰胺组,大黄牡丹汤中、高剂量

组回肠黏膜厚度、绒毛长度明显升高 ($P < 0.05$), 3 组间无差异。见表 4, 图 1。

表 4 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠回肠黏膜病理学改变的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	绒毛长度	黏膜厚度
正常	-	10	283.67 ± 16.43	544.54 ± 40.94
模型	-	10	210.63 ± 12.18 ¹⁾	412.25 ± 37.16 ¹⁾
谷氨酰胺	3.75	12	259.42 ± 18.05 ³⁾	486.13 ± 32.75 ³⁾
大黄牡丹汤	7.5	11	219.84 ± 13.21	416.32 ± 26.53
	15	12	259.03 ± 11.34 ³⁾	486.67 ± 23.76 ³⁾
	30	12	257.98 ± 12.67 ³⁾	487.58 ± 24.58 ³⁾

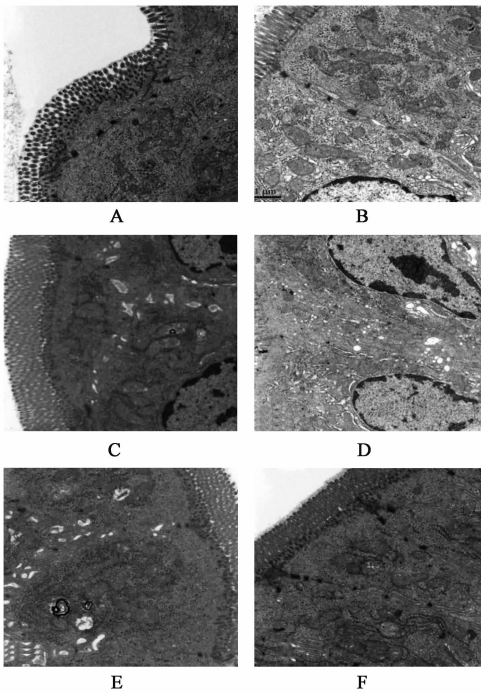


图 1 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠回肠黏膜超微结构改变的影响(透射电镜, × 20 000)

Fig.1 Effect of Dahuang Mudan Tang on pathological of intestinal mucosa in rats(TEM, × 20 000)

2.5 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠肠黏膜通透性的影响 与正常组比较,模型组尿L/M,血清D-乳酸明显升高($P < 0.05$),提示肠黏膜通透性明显增高;与模型组比较,谷氨酰胺组,大黄牡丹汤中、高剂量组尿L/M,血清D-乳酸明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),3组间无差异。见表5。

2.6 大黄牡丹汤对肠功能的影响 与正常组比较,模型组血清瓜氨酸水平明显下降($P < 0.05$),血清iFABP水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,谷氨酰胺组,大黄牡丹汤中、高剂量组血清瓜氨酸水平

表 5 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠肠黏膜通透性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Dahuang Mudan Tang on intestinal permeability of rats with septi cacute intestinal dysfunction ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	L/M	D-乳酸/mg·L ⁻¹
正常	-	10	0.19 ± 0.02	2.86 ± 0.23
模型	-	10	3.65 ± 0.29 ¹⁾	8.07 ± 2.24 ¹⁾
谷氨酰胺	3.75	12	2.29 ± 0.21 ²⁾	4.98 ± 1.21 ²⁾
大黄牡丹汤	7.5	11	3.04 ± 0.65	7.94 ± 2.53
	15	12	2.31 ± 0.17 ²⁾	5.02 ± 1.95 ²⁾
	30	12	2.43 ± 0.42 ²⁾	4.94 ± 1.03 ³⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表6同)。

均明显升高($P < 0.05$),血清iFABP含量明显下降($P < 0.01$),3组间无差异。见表6。

表 6 大黄牡丹汤对脓毒症急性肠功能障碍大鼠肠功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Dahuang Mudan Tang on intestine function of rats with septi cacute intestinal dysfunction ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	瓜氨酸/μmol·L ⁻¹	iFABP/ng·L ⁻¹
正常	-	10	71.72 ± 5.12	1.23 ± 0.13
模型	-	10	41.03 ± 2.18 ¹⁾	7.26 ± 1.42 ¹⁾
谷氨酰胺	3.75	12	57.62 ± 2.18 ²⁾	3.04 ± 0.25 ³⁾
大黄牡丹汤	7.5	11	42.65 ± 5.25	6.97 ± 1.23
	15	12	56.03 ± 2.04 ²⁾	3.21 ± 0.18 ³⁾
	30	12	56.25 ± 4.74 ²⁾	3.19 ± 0.23 ³⁾

3 讨论

脓毒症是宿主对感染的反应失控引起的危及生命的器官功能障碍^[17],是ICU的首位死亡原因。

有调查发现,美国每年有 90 万到 300 万的人发生脓毒症^[18],而且脓毒症休克的死亡率超过 40%^[19]。长久以来,胃肠道被认为在脓毒症的病理生理机制中发挥了重要的作用,由严重感染导致的炎症环境改变引起了肠黏膜通透性增高,肠道菌群失调、移位,最终引起脓毒症和持续的炎症反应,胃肠道是诱发和进展为多脏器功能衰竭的“始动”器官^[20-22]。Shimizu 等^[23]发现脓症患者肠道功能在诊断脓毒症时即出现异常。如何通过改善脓毒症患者的胃肠功能,提高脓毒症的生存率越来越受到 ICU 医生的重视。

对于脓毒症相关的胃肠功能障碍,目前最主要的干预措施包括早期肠内营养、补充谷氨酰胺、调整肠道微生态等,但由于胃肠道结构和功能的复杂性,目前仍缺乏特效的治疗方法^[24]。

中医认为肠功能衰竭多为热毒内蕴、气滞血瘀、积滞内停,病理中心为毒瘀互结所致,其治疗大法治宜清热解毒、行气活血通瘀、消积导滞^[25]。据此理论宜选用大黄牡丹汤治疗^[26]。大黄牡丹汤由大黄、牡丹皮、桃仁、冬瓜仁和芒硝组成,方中大黄泻火泄热、逐瘀排毒,牡丹皮凉血散瘀为君;芒硝助大黄清热解毒、泻下通便为臣;桃仁、牡丹皮活血化瘀为佐;冬瓜仁排痈散结为使。诸药合用,攻积破瘀、排脓消肿,使肠道之热毒瘀血从大便而下,则可化脓消痈^[26]。研究发现,大黄牡丹汤利于急性阑尾炎术后炎症的消散和吸收,利于术后胃肠蠕动的增加和胃肠功能的恢复^[27]。同时,大黄牡丹汤加减联合西药治疗急性胰腺炎,能抑制机体的炎症和应激反应,具有抗氧化损伤,清除机体自由基的作用^[28]。但因大黄牡丹汤为一多成分复杂体系,有多作用途径和多靶标的作用特点,故有必要进行深入研究,探讨其可能的作用机制。

本研究构建脓毒症大鼠模型,检测血清瓜氨酸, iFABP, L/M 水平,分析其与正常大鼠的差异。瓜氨酸是一种非蛋白质的氨基酸,主要由小肠黏膜上皮细胞吸收代谢谷氨酰胺产生^[14]。前期研究证实,瓜氨酸可以作为诊断脓毒症大鼠急性肠功能障碍的有效指标^[14]。iFABP 主要在肠上皮细胞表达,其表达水平与肠黏膜通透性及菌群移位相关,血清 iFABP 可作为脓毒症肠功能障碍评估的无创性指标^[29]。D-乳酸是胃肠道固有细菌的代谢产物,肠道多种细菌均可产生。哺乳动物体内不具备将其快速代谢分解的酶系统,当肠黏膜屏障受损,肠道中细菌产生的 D-乳酸通过受损肠黏膜入血,哺乳动物没有 D-乳酸

脱氢酶,在肠黏膜受损和肠黏膜通透性增加时,可见血中 D-乳酸水平升高^[30]。因此检测其外周血水平即可反映肠黏膜损害程度和通透性变化^[31]。利用不被人体代谢的大分子糖类测定肠黏膜通透性评估肠黏膜的完整性是一种无创的诊断肠黏膜屏障功能的方法^[32]。L/M 能直接反映肠黏膜通透性,比值越高提示肠黏膜通透性越高,可无创的评估动物及人体肠黏膜的屏障功能^[33]。本研究中,脓毒症大鼠血清 iFABP, D-乳酸及尿 L/M 较正常组明显升高,血清瓜氨酸下降,考虑存在肠功能障碍,证实脓毒症肠功能障碍模型构建成功。上述检测指标经大黄牡丹汤治疗后发生了显著变化,提示大黄牡丹汤与谷氨酰胺均能改善脓毒症急性肠功能障碍大鼠的肠黏膜通透性,改善肠道病理损伤,治疗脓毒症肠功能障碍。

TREM-1 为一种跨膜糖蛋白,选择性地在中性粒细胞和一部分单核细胞上表达, TREM-1 与其配体结合后激活下游信号通路,导致 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 等促炎细胞因子合成增多,同时抑制抗炎细胞因子 IL-10 的合成;而 TNF- α , IL-8 等可上调 TREM-1 的表达,从而产生激发和放大炎症反应的恶性循环^[7]。研究显示,脓毒症时细胞表面的 TREM-1 呈现特异性^[34]。但正常肠道几乎不表达 TREM-1,是肠道防止炎症反应与过度组织损伤的重要机制^[35]。研究发现, TREM-1 不仅参与了感染等急性炎症反应,同时促进肠道急慢性炎症时的炎症反应,加重肠组织损伤^[36]。有研究报道,重症胰腺炎大鼠肠组织内 TREM-1 高表达,促进炎症介质释放和肠黏膜屏障功能障碍,促进炎症因子释放,促使 SIRS,诱发和加重 MODS^[34]。抑制肠巨噬细胞 TREM-1 的表达可减轻氧化应激对肠黏膜屏障的损伤^[37]。研究显示,大黄牡丹汤可通过抑制溃疡性结肠炎小鼠的炎症状态,防止结肠组织增厚,维持肠道结构的完整性,改善溃疡性结肠炎小鼠的症状^[38]。前期研究证实,大黄牡丹汤能通过调控 TLR/MyD88/NF- κ B 信通路,抑制危重症患者体内炎症的发生发展,从而达到治疗急性肠功能障碍的目的。而 TREM-1 可以应答内源和外源性危险信号,协同和放大 TLR 介导的信号通路,加强炎症反应,最终导致失控性炎症反应的发生^[39]。本研究发现,脓毒症大鼠回肠组织 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 表达显著升高,大黄牡丹汤能下调升高的 TREM-1, TLR2, TLR4, MyD88, NF- κ B mRNA 表达水平,减轻肠道炎症状态,改善脓毒症大鼠的肠黏

膜通透性,改善肠道病理损伤,治疗肠功能障碍。

综上,大黄牡丹汤能有效治疗脓毒症大鼠急性肠功能障碍,其作用机制之一可能是通过调控肠道髓系细胞触发受体-1 表达,减轻肠道炎症反应实现的。另外,中药组方成分复杂,大黄牡丹汤可能通过多途径、多靶点发挥抑制炎症反应的作用,其具体机制还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Peters J H, Beishuizen A, Keur M B, et al. Assessment of small bowel function in critical illness: potential role of citrulline metabolism[J]. J Intensive Care Med, 2011, 26(2):105-110.

[2] Rowlands B J, Soong C V, Gardiner K R, et al. Thegastrointestinal tract as a barrier in sepsis[J]. Br Med Bull, 1999, 55(1):196-211.

[3] 马晓春,尹晓晗,栾正刚. 血红素加氧酶-1 对脓毒症患者胃肠道保护作用研究进展[J]. 创伤与急危重病医学,2013,1(1):17-20.

[4] 官永海,陈福刚. 中药灌肠结合针刺疗法治疗 ICU 重症感染合并胃肠功能障碍疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(9):967-969.

[5] 孙燕妮,承解静,杨晓燕,等. 大黄牡丹汤含药血清对 LPS 刺激的小鼠肺巨噬细胞 TLR4 和 MyD88 表达的影响[J]. 山东医药,2014,54(10):10-13.

[6] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel re-ceptor expressed on neutrophils and monocytes [J]. J Immunol, 2000, 164(10):4991-4995.

[7] 关云艳,王倩,吴海荣. 髓样细胞表达的触发受体-1 研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2010,33(1):49-52.

[8] 苗大兴,肖天保,梁宛伶. 大黄牡丹汤含药血清对巨噬细胞释放炎症因子的影响[J]. 时珍国医国药, 2014,25(4):843-845.

[9] Stahl O, Loffler B, Haier J, et al. Mimicry of human sepsis in a rat model-prospects and limitations [J]. J Surg Res,2013, 179(1):e167-175.

[10] 何艳,秦雪梅,鲁卫华,等. 脓毒症大鼠肠道瞬时感受器电位香草酸受体 1 及降钙素基因相关肽的表达及作用[J]. 中国临床药理学与治疗学,2016,21(1):38-41.

[11] 沈丽娟,王倩,吴锡平,等. 谷氨酰胺对脓毒症大鼠急性肠黏膜损伤的保护作用[J]. 内科急危重症杂志, 2018,24(3):253-255.

[12] 苗大兴,肖天保,梁宛伶,等. 大黄牡丹汤含药血清对小鼠骨髓源巨噬细胞吞噬功能及 Toll 样受体 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(8):

1891-1893.

[13] Chiu C J, Mearldle A H, Brown R, et al. Intestinal mucosa lesion in low flow states [J]. Arch Surg,1970, 101(4):478-483.

[14] SHEN L J, GUAN Y Y, WU X P, et al. Serumcitrulline as a diagnostic marker of sepsis-induced intestinal dysfunction[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(2):230-236.

[15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the (2-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods,2001, 25(4):402-408.

[16] 刘洪斌,吴咸中,李东华,等. 清热解毒方对脓毒症大鼠的治疗作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2008, 14(6):580-584.

[17] Singer M, Deutschman C S, Seymour C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8):801-810.

[18] Gaieski D F, Edwards J M, Kallan M J, et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States[J]. Crit Care Med, 2013,41(5):1167-74.

[19] Shankar-Hari M, Phillips G S, Levy M L, et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315(8):775-787.

[20] Sertaridou E, Papaioannou V, Kolios G, et al. Gut failure in critical care: old school versus new school [J]. Ann Gastroenterol, 2015,28(3):309-322.

[21] Clark J A, Coopersmith C M. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness[J]. Shock, 2007,28(4):384-393.

[22] Klingensmith N J, Coopersmith C M. The gut as the motor of multiple organ dysfunction in critical illness [J]. Crit Care Clin, 2016,32(2):203-212.

[23] Shimizu K, Ogura H, Hamasaki T, et al. Altered gut flora are associated with septic complications and death in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome [J]. Dig Dis Sci,2011,56(4):1171-1177.

[24] 周秀红,张灵恩,陆铸今,等. 危重患儿急性胃肠功能衰竭的病因、死亡危险因素分析和干预措施[J]. 中国小儿急救医学,2006,8(4):339-342.

[25] 刘洋,江宇泳,王宪波,等. 肠功能障碍的中医药治疗进展[J]. 中医药学报,2013,41(6):87-89.

[26] 张保国,刘庆芳. 大黄牡丹汤现代药效学研究与应用[J]. 中国药学杂志,2009,44(21):1601-1604.

- [27] 邓芳芳,曹森,张文兴. 大黄牡丹汤恢复急性阑尾炎术后肠功能的 Meta 分析[J]. 中国中西医结合外科杂志,2015,21(2): 124-127.
- [28] 周健,高淳,唐学典. 大黄牡丹汤加减治疗急性胰腺炎对机体炎症和应激反应的影响[J]. 中医药信息,2017,34(1): 62-66.
- [29] 关云艳,沈丽娟,吴锡平,等. 血清 I-FABP 在诊断脓毒症大鼠急性肠功能障碍中的作用及谷氨酰胺对其表达的影响[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(4): 44-46.
- [30] 舒道,董京文,杨海峰,等. 通腑清胰方辅助治疗重症胰腺炎的疗效及对肠黏膜屏障功能的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(21):280-284.
- [31] Glatz J F, Van D V G J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance [J]. Prog Lipid Res, 1996,35(3): 243-282.
- [32] 于博昊,杜一平,谢小波,等. 离子色谱法检测兔尿样中的乳果糖与甘露醇[J]. 分析试验室,2010,29(3):119-121.
- [33] 刘桂伟,任维聘,姜国胜. 谷氨酰胺强化肠内营养对结肠癌患者左半结肠切除术后肠通透性及感染并发症的作用[J]. 中国全科医学, 2018,21(5):526-530.
- [34] Gibot S, Le R P, Bollaert P E, et al. Surface triggering receptor expressed on myeloid cells 1 expression patterns in septic shock[J]. Intensive Care Med,2005,31(4): 594-597.
- [35] Mirjam S, Axel B, Frank S, et al. TREM-1 expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases [J]. J Clin Invest, 2007, 117(10): 3097-3106.
- [36] 殷凯,党胜春,张建新. 髓系细胞触发受体-1 对重症急性胰腺炎大鼠肠屏障功能的影响[J]. 中华急诊医学杂志,2011,20(8):811-815.
- [37] 胡蓉,吴朝阳,党胜春,等. 髓系细胞触发受体-1 对大鼠肠巨噬细胞氧化应激的影响[J]. 江苏大学学报: 医学版,2015,25(5):378-381.
- [38] 温如燕,罗霞,郑彦懿,等. 大黄牡丹汤改善 DSS 诱导的溃疡性结肠炎小鼠炎症状态及其贫血症[J]. 中华中医药学刊,2016,34(12):2998-3001.
- [39] 魏晓丽,李运璧. TREM-1 及其与脓毒症的关系研究进展[J]. 实用医院临床杂志,2015,12(3):173-176.

[责任编辑 孙丛丛]