

清营汤可减轻SAP大鼠肠屏障氧化应激损伤

高照宇¹, 李医铭^{2*}, 姜英健³, 李洪波³, 王江³, 张佃良³

¹青岛大学医学部, 山东 青岛

²青岛大学附属青岛市海慈医院神经内三科, 山东 青岛

³青岛州市立医院普外一科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年2月13日; 录用日期: 2023年3月9日; 发布日期: 2023年3月15日

摘要

重症急性胰腺炎(Severe Acute Pancreatitis, SAP)常伴随肠屏障功能损伤, 从而恶化预后, 但其机制不明确, 治疗方式不统一。本研究的目的是探究通过服用古方清营汤能否减轻这一损伤, 并观察其对肠粘膜机械屏障的作用。采用逆行胆管注射5%牛磺胆酸钠建立SAP模型。将大鼠分为3组: 对照组(SO)、SAP组(SAP)、清营汤干预组(QYT)。检测血清淀粉酶、脂肪酶、TNF- α 等指标评估炎症严重程度。HE染色观察肠道组织学变化; 采用超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)检测肠上皮细胞氧化应激; 检测肠屏障相关蛋白的表达。结果显示, QYT组血清指标、组织损伤严重程度、氧化应激水平均显著低于SAP组同时肠屏障相关蛋白表达回升。这些结果表明清营汤可减轻SAP大鼠肠屏障氧化应激损伤, 为该病的治疗提供新思路。

关键词

清营汤, 氧化应激, 肠屏障, 紧密连接, 重症急性胰腺炎

Qingyingtang Can Reduce Oxidative Stress Injury of Intestinal Barrier in SAP Rats

Zhaoyu Gao¹, Yiming Li^{2*}, Yingjian Jiang³, Hongbo Li³, Jiang Wang³, Dianliang Zhang³

¹Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Third Department of Neurology, Qingdao Haici Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao Shandong

³Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong

Received: Feb. 13th, 2023; accepted: Mar. 9th, 2023; published: Mar. 15th, 2023

*通讯作者。

文章引用: 高照宇, 李医铭, 姜英健, 李洪波, 王江, 张佃良. 清营汤可减轻 SAP 大鼠肠屏障氧化应激损伤[J]. 临床医学进展, 2023, 13(3): 3596-3603. DOI: 10.12677/acm.2023.133515

Abstract

Severe Acute Pancreatitis (SAP) is often accompanied by intestinal barrier dysfunction, which worsens the prognosis, but its mechanism is not clear, and the treatment is not uniform. The aim of this study is to investigate whether Qingyingtang, an ancient prescription, can alleviate this injury and to observe its effect on the intestinal mucosal mechanical barrier. The SAP model was established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the bile duct. The rats were divided into three groups: control group (SO), SAP group (SAP) and Qingying tang intervention group (QYT). Serum amylase, lipase, TNF- α and other indicators were detected to evaluate the severity of inflammation. HE staining was used to observe intestinal histological changes. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were used to detect oxidative stress of intestinal epithelial cells. The expression of intestinal barrier related proteins was detected. The results showed that the serum indexes, tissue injury severity and oxidative stress level in QYT group were significantly lower than those in SAP group, and the expression of intestinal barrier related proteins increased. These results indicate that Qingyingtang can reduce oxidative stress injury of intestinal barrier in SAP rats, and provide a new idea for the treatment of SAP.

Keywords

Qingyingtang, Oxidative Stress, Intestinal Barrier, Tight Junction, Severe Acute Pancreatitis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 简介

急性胰腺炎(Acute Pancreatitis, AP)是一种因胰酶异常激活、胰腺局部炎症反应为主要表现的临床常见的急腹症,其中部分可进展为重症急性胰腺炎,并引起一系列严重的全身炎症反应,甚至威胁生命[1]。肠粘膜屏障是一种选择性渗透屏障,其包括了生物屏障、机械屏障及肠粘膜相关淋巴组织等,肠粘膜屏障既能保证营养物质的吸收,又能防止抗原微生物、毒素等透过肠腔进入血液循环[2]。既往的研究表明,SAP常引起肠屏障的损伤并恶化疾病的预后,因此关注肠粘膜屏障功能的变化对于重症急性胰腺炎的治疗有重要作用[3]。

紧密连接蛋白(TJ)是肠机械屏障的重要组成部分,其由多种跨膜蛋白构成,如ZO-1、occludin、claudin-1等,其结构常位于相邻的上皮细胞之间,从而封闭细胞间隙,限制肠内有害物质的移动并允许营养物质的吸收[4][5]。一旦TJ结构出现损伤,肠屏障功能也随之下降,从而可能导致细菌移位、出血甚至是脓毒症血症等一系列严重并发症[6][7][8]。肠粘膜屏障功能损伤涉及多种机制,其中氧化应激损伤是其中重要的一部分[9]。近年来的研究表明,活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是其中重要的作用因子,ROS可导致肠粘膜结构和功能障碍,加重炎症反应并进一步损伤肠粘膜屏障[10]。

清营汤有清热解毒、活血化瘀之功效,其以犀角为君药(现用水牛角),水牛角咸寒,其气清灵透发,寒而不遏,清营凉血解毒,且能散瘀。三甘寒,清营凉血滋阴;玄参咸寒,滋阴清热解毒;麦冬甘寒,养阴生津清热。三味相合助君药清营凉血解毒,为豆药。银花、连翘清热解森,轻宣透邪,使营分之热转出气解,此即叶天士所谓“入营犹可透热转气”之理诸药相合,共奏清营污热解毒、透热养阴活血之

功,以清泻营分热毒为中心,佐以养阴生津、透热转气、活血散瘀[11][12]。祖国医学认为,SAP的发生和发展主要因饮食不调、外感湿热毒瘀等六淫,内伤七情,邪气侵袭,腑气不通、瘀毒内蕴,根据其病因不同,治疗方式迥异。

本研究试图探究清营汤这一重要方剂在重症急性胰腺炎中的作用,与传统生长抑素制剂相比,中医药有性温和,多靶点等优势,对于SAP继发的肠屏障损伤可起到多方面的调节作用,为临床工作以及中医药的发展提供新的思路和可能性。

2. 材料和方法

2.1. 动物和模型

本研究经青岛大学(中国青岛)动物伦理与实验委员会批准,按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的实验动物指南进行。SPF级Wistar成年雄性大鼠24只,8周龄,体重200~250g,由青岛大学动物中心提供。将大鼠随机分为假手术组(SO)、SAP组(SAP)和清营汤治疗组(QYT)。用3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,沿腹白线开放大鼠腹腔。直视下将套管针逆行插入胰胆管,然后将套管针穿入肝脏方向,用SK-5001微输液泵逆行注射5%牛磺胆酸钠溶液(Signa)(1ml/kg,0.02ml/min),建立SAP模型。根据前期研究发现,SAP大鼠损伤在24h时最为严重,故本实验中所有大鼠均在建模后24h取样[13]。SO组胰胆管逆行注射等量生理盐水,清营汤组成及制备:水牛角30g,生地黄15g,元参9g,竹叶必3g,麦冬9g,丹参6g,黄连6g,银花9g,连翘6g,中药材均购自青岛市中医医院中药房。药材加水比例1:9,药材浸泡时间1h,煮沸时间30min;药渣加水比例1:3,煮沸时间20min,过滤后将两次煎液合并,用双层纱布过滤后,加热蒸发浓缩滤液至1g/mL。QYT组自建模前3天开始,按1ml/100g体重给予浓缩滤液灌胃,共治疗4次。

2.2. 样本收集

SAP模型建立后24h取样。按原切口打开大鼠腹腔,穿刺下腔静脉取血液标本,血样于4℃下离心5min(3000RPM),收集上清液进行分析。取末端回肠组织,部分标本用4%多聚甲醛固定。其余保存在-80℃冰箱中。

2.3. 血清检测

采用Olympus全自动生化分析仪检测血清脂肪酶(LIPA)和淀粉酶(AMY)活性;采用标准ELISA试剂盒(南京建成生物技术公司)检测血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)水平。采用EKT-5M革兰阴性菌动态检测试剂盒(北京金山春生物技术公司)检测血清内毒素浓度。采用二胺氧化酶(DAO)ELISA试剂盒测定DAO水平(南京建成生物技术公司)。

2.4. 氧化应激指标测定

采用试剂盒检测回肠中谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活性。采用活性氧测定试剂盒(Solarbio)测定肠黏膜ROS含量。

2.5. 组织病理学评估

取回肠末端组织,石蜡包埋,5 μ m切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下进行组织学分析。

2.6. Western-Blot

采用BCA蛋白检测试剂盒(Transgen)检测回肠总蛋白。用ZO-1(Affinity)、Occludin(Affinity)、

Claudin-1 (Affinity)、二抗(Bioeasy BE0101)进行 Western-Blot 检测。以 β -actin 蛋白(ABways)作为对照。采用 Image J 软件(Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)分析灰度值。

2.7. 统计学分析

采用 GraphPad Prism8.0 软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)进行统计学分析。定量资料以均数±标准差(SD)表示。组间变量比较采用 t 检验、单因素方差分析、Tukery 检验。计数资料采用 χ^2 检验。以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

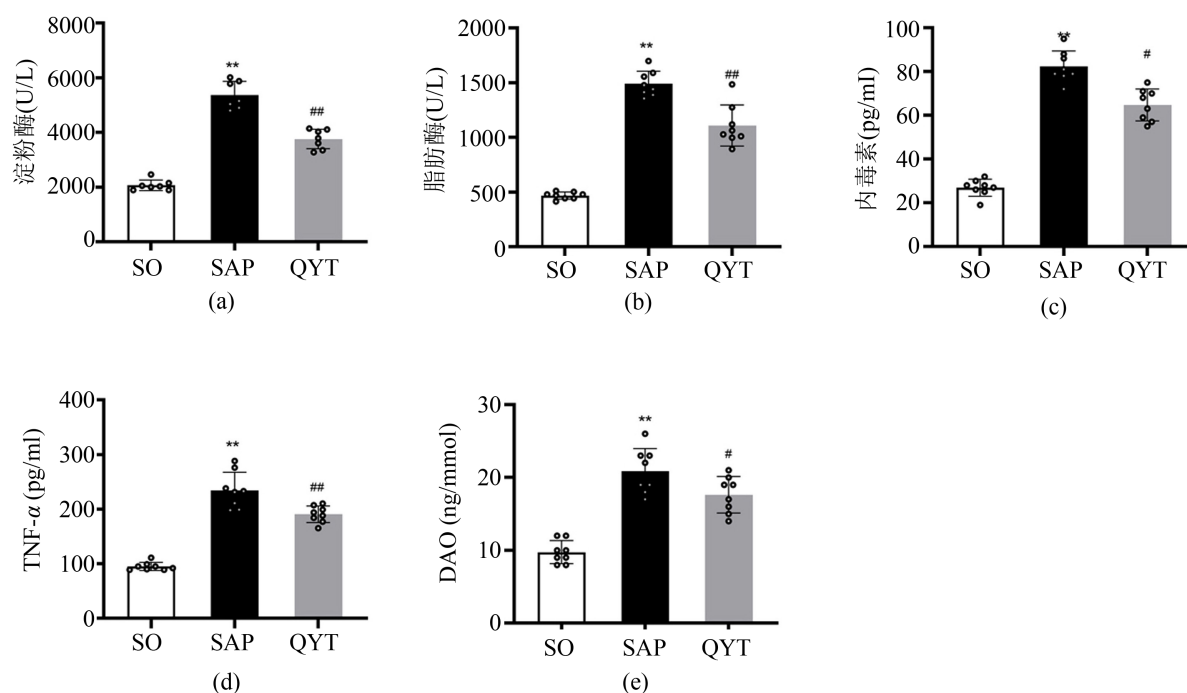
3. 结果

3.1. SAP 大鼠肠屏障损伤模型的建立

如前所述 SAP 模型在建立后 24 h 达到峰值, 故于此时采样以达到最理想的效果。如图 1 所示, 血清的损伤指标显示 SAP 组指标明显高于 SO 组(图 1; $p < 0.01$)。与 SO 组相比, SAP 组出现了如水肿、出血、绒毛、黏膜细胞坏死等典型的肠道损伤(图 2), 这些现象表明我们成功建立了 SAP 诱导的肠屏障损伤模型。

3.2. 肠粘膜氧化应激

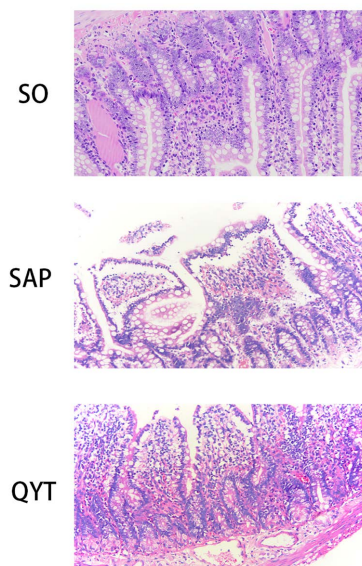
取回肠末端组织, 检测丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和活性氧(ROS), 以确定肠粘膜中发生氧化应激损伤的程度。与 SO 组相比, SAP 组大鼠 GSH、SOD 指标明显降低, ROS、MDA 指标明显升高(图 3, $p < 0.05$), 提示 SAP 大鼠模型中, 回肠组织存在严重的氧化应激损伤。



血清淀粉酶(a)、脂肪酶(b)活性, 内毒素(c)、TNF- α (d)、DAO (e)在 SAP 组中水平显著高于 SO 组。与 SAP 组相比, QYT 组血清淀粉酶(a)、脂肪酶(b)活性, 内毒素(c)、TNF- α (d)、DAO (e)水平降低。以平均值 \pm 标准差(n = 8)表示。与 SO 组比较, * $p < 0.05$ 和** $p < 0.01$; 与 SAP 组比较# $p < 0.05$ 和## $p < 0.01$ 。

Figure 1. Changes in serum inflammatory markers

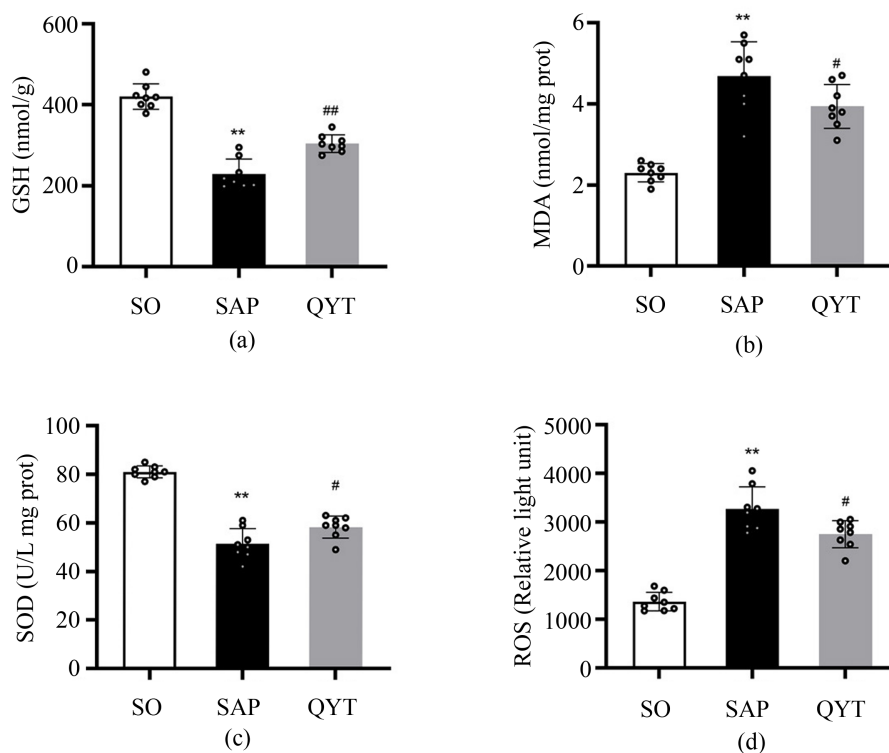
图 1. 血清炎症指标的变化



与 SO 组相比, SAP 组出现了如水肿、出血、绒毛、黏膜细胞坏死等典型的肠道损伤,同时 QYT 组的图像显示这一现象被逆转。

Figure 2. Intestinal mucosal injury

图 2. 肠粘膜损伤



与 SO 组相比, SAP 组 SOD 活性和 GSH 含量降低, MDA 和 ROS 指标升高。与 SAP 组比较, QYT 组 SOD、GSH 明显升高, MDA、ROS 明显降低。以平均值 ± 标准差(n = 8)表示。与 SO 组比较, *p < 0.05 和 *p < 0.01; 与 SAP 组比较 #p < 0.05 和 ##p < 0.01。

Figure 3. GSH (a), GSH (b), SOD (c), ROS (d) contents in terminal ileal tissue

图 3. 末端回肠组织中 GSH (a)、GSH (b)、SOD (c)、ROS (d)含量

3.3. 清营汤可改善 SAP 大鼠症状

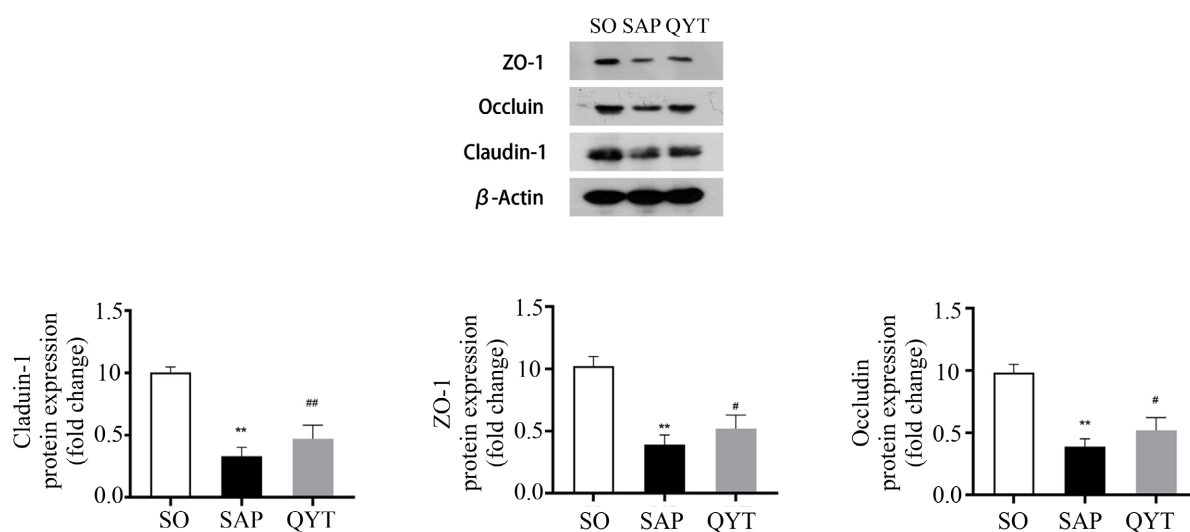
清营汤在《温病条辨》中被记载,有着养阴透热、清营养阴,使营分之邪热转出气分而解,为治疗营分证之主方。对营分证疾病研究的深入,热盛阴虚病机进一步被阐明,并在临床新药研究及治疗方面取得很大发展。按照前期实验设计,给予大鼠清营汤浓缩液灌胃治疗,结果表明与 SAP 组相比,应用清营汤可大鼠血清炎症指标更低(图 1, $p < 0.05$)。同时观察大鼠病理检测的结果,与 SAP 组相比, QYT 组大鼠肠粘膜及胰腺损伤减轻。

3.4. 清营汤可减轻肠道氧化应激水平

与 SAP 组相比, QYT 组末端回肠肠粘膜组织中 GSH、SOD 水平明显上升,同时 ROS、MDA 等损伤指标降低(图 3, $p < 0.05$),提示应用清营汤治疗可减轻 SAP 大鼠肠粘膜氧化应激水平,保护肠屏障。

3.5. 清营汤可保护肠道 TJ 蛋白,减轻 SAP 大鼠肠屏障损伤

TJ 蛋白在维持肠黏膜屏障的正常生理功能中发挥着重要作用,为了进一步确定清营汤对肠黏膜屏障的保护作用,我们采用 Western-Blot 技术检测末端回肠 TJ 蛋白的表达,结果表明, SAP 组 Occludin、Claudin-1、ZO-1 的表达低于 QYT 组(图 4, $p < 0.05$)。同时,与 SAP 组相比, QYT 组大鼠血清内毒素指标降低,也从侧面证实了肠屏障功能的恢复(图 1, $p < 0.05$)。



Western-blot 检测回肠 TJ 蛋白印迹、ZO-1、occludin、claudin-1 的表达水平。数据以均数 \pm 标准差($n = 8$)表示。与 SO 组相比* $p < 0.05$ 和* $p < 0.01$; 与 SAP 组比较# $p < 0.05$, ## < 0.01 。

Figure 4. Expression level of TJ protein

图 4. TJ 蛋白表达水平

综上所述,我们的这项实验证实了服用清营汤治疗可减轻 SAP 大鼠肠粘膜氧化应激水平,提高 TJ 蛋白的表达从而保护肠粘膜机械屏障。

4. 讨论

清营汤治疗重症急性胰腺炎在临床中早有报道及应用[14][15]。在我们的实验中首次关注到其对肠粘膜屏障的保护作用以及对氧化应激的抑制作用。与 SAP 组相比, QYT 组大鼠各项血清炎症指标下降,通过观察大鼠末端回肠 GSH、MDA、ROS 及 SOD 水平,证实清营汤可减轻 SAP 大鼠末端回肠的氧化应激

反应, 这些证据为清营汤的发展和应⽤提供了新的思路。

SAP 是一种严重的、迅速进展的急腹症, 同时 SAP 可造成肠屏障功能的损伤, 从而继发 SIRS、ALI 等一系列严重并发症, 病死率高达 10%~30% [16]。研究表明, 氧化应激对于 SAP 大鼠的肠屏障功能损伤尤为重⽤[17]。本实验采⽤成熟的 SAP 大鼠模型, 探讨清营汤这一传统中药方剂对于肠屏障功能的保护作用。

在正常生理条件下, 肠道屏障在维持肠道渗透压和限制细菌移位⽅⾯发挥着重⽤作用[18]。肠道屏障功能主要由上皮细胞及其胞间 TJ 蛋白维持, 共同维持肠道生态稳定, 大量的临床和实验数据表明, SAP 的全身反应可能与肠屏障损伤有关[19]。

⾎淀粉酶、脂肪酶是 SAP 常⽤的判断指标, TNF- α 、IL-6 则与 SAP 预后相关[20]。服⽤清营汤后, SAP 大鼠相关指标降低。ROS 是正常的细胞代谢副产物, 生理剂量下 ROS 是有益的, 但是过量的 ROS 会导致氧化应激损伤[21]。在本实验中, ROS 的表达程度与 TJ 蛋白损伤严重程度程正相关。

古籍中有“胰”的记载很少, 后代医家根据临床腹痛、腹胀、恶⼼、呕⼲、发热等症⽤, 将其归属于中医“腹痛”“胰瘕”“胃心痛”“脾心痛”等范畴。中医认为“不通则痛”“不容则痛”是其根本原因[22]。胰腺病位主要在脾、胃、肝、胆, 其病因主要为饮食不节、情志不畅、劳逸失常等, 加之⼤感六淫化热入里、湿热蕴结, 热结伤阴, 导致营阴亏损⽽发病[23]。

清营汤为著名医家吴瑭先生《温病条辨》中的传世方剂, 其有清热解毒、活血化瘀、养阴补虚之功, 与胰腺炎中药治疗⽅案切合, 其中⽔牛角清灵解疫, 黄连清热燥湿, 同时⽣地黄、元参清热兼滋肾补水, 自清代以来, 该方常⽤于感染类疾病[24]。

综上所述, 本实验证实了清营汤对 SAP 大鼠肠粘膜屏障功能的保护作用, 肠屏障功能损伤机制复杂, 涉及大量的通路, 相关⽅⾯的研究⼤在⼤断进⾏, 氧化应激只是其中⼤小部分。清营汤作为祖国医学的重⽤传世方剂, 其应⽤及相关研究有望进⼤发展。

参考文献

- [1] 宋洋, 乐佳蕴, 王小翠, 李春润, 金伟. ⼤黄调节肠道菌群干预急性胰腺炎的研究进⼤[J]. 中国中医急症, 2022, 31(8): 1307-1309.
- [2] Schoultz, I. and Keita, Å.V. (2019) Cellular and Molecular Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease-Focusing on Intestinal Barrier Function. *Cells*, **8**, 193. <https://doi.org/10.3390/cells8020193>
- [3] Petrov, M.S., Shanbhag, S., Chakraborty, M., Phillips, A.R. and Windsor, J.A. (2010) Organ Failure and Infection of Pancreatic Necrosis as Determinants of Mortality in Patients with Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, **139**, 813-820. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.010>
- [4] Odenwald, M.A. and Turner, J.R. (2017) The Intestinal Epithelial Barrier: A Therapeutic Target? *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology*, **14**, 9-21. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.169>
- [5] 郑晨曦, 等. 葛根苓连汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道屏障的保护作用机制研究[J]. 中国兽医学报, 2022: 1-7.
- [6] Nagpal, R. and Yadav, H. (2017) Bacterial Translocation from the Gut to the Distant Organs: An Overview. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **71**, 11-16. <https://doi.org/10.1159/000479918>
- [7] Zhou, H.C., et al. (2021) *Zizyphus jujuba* cv. Muzao Polysaccharides Enhance Intestinal Barrier Function and Improve the Survival of Septic Mice. *Journal of Food Biochemistry*, **45**, e13722. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13722>
- [8] Yang, S., et al. (2018) Time Course Study of Intestinal Epithelial Barrier Disruption in Acute Mesenteric Venous Thrombosis. *The Journal of Surgical Research*, **224**, 222-232. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.022>
- [9] Zhuang, Y., et al. (2019) Resveratrol Attenuates Oxidative Stress-Induced Intestinal Barrier Injury through PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**, Article ID: 7591840. <https://doi.org/10.1155/2019/7591840>
- [10] Catanzaro, D., et al. (2015) *Boswellia serrata* Preserves Intestinal Epithelial Barrier from Oxidative and Inflammatory Damage. *PLOS ONE*, **10**, e0125375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125375>
- [11] 尹莹, 顾炜, 芦源. 清营汤加减对急性湿疹大鼠的干预及对大鼠皮肤 TNF- α 、IL-4 表达的影响[J]. 上海中医药杂志

- 志, 2019, 53(7): 70-74.
- [12] 王天麟, 等. 浅析“透热转气”及清营汤在重症急性胰腺炎继发脓毒症中的应用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2022, 30(12): 859-862+866.
- [13] Ma, D., et al. (2021) Inhibition of Ferroptosis Attenuates Acute Kidney Injury in Rats with Severe Acute Pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, **66**, 483-492. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06225-2>
- [14] 孙群, 朱金水. 生长抑素单用及其与清营汤联用对重症急性胰腺炎患者白介素水平的影响[J]. 世界临床药物, 2010, 31(4): 229-232.
- [15] 李汉永, 李旭成, 魏丛师. 清营汤在急诊科运用验案举隅[J]. 光明中医, 2018, 33(4): 571-572.
- [16] Ge, P., et al. (2020) Intestinal Barrier Damage, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Acute Lung Injury: A Troublesome Trio for Acute Pancreatitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **132**, Article ID: 110770. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110770>
- [17] Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S. and Crowe, S.E. (2014) Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological Reviews*, **94**, 329-354. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2012>
- [18] Schoultz, I. and Keita, Å.V. (2020) The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, **9**, 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- [19] Pearce, S.C., et al. (2018) Marked Differences in Tight Junction Composition and Macromolecular Permeability among Different Intestinal Cell Types. *BMC Biology*, **16**, 19. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0481-z>
- [20] Szatmary, P., et al. (2022) Acute Pancreatitis: Diagnosis and Treatment. *Drugs*, **82**, 1251-1276. <https://doi.org/10.1007/s40265-022-01766-4>
- [21] Gao, Q. (2019) Oxidative Stress and Autophagy. In: Qin, Z.-H., Ed., *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*, Springer, Berlin, 179-198. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_9
- [22] 郭晨博, 汪永锋, 张延英. 急性胰腺炎的中医认识与实验研究进展[J]. 甘肃科技, 2022, 38(22): 112-116+119.
- [23] 余莹, 程健. 重症急性胰腺炎“腑气不通”的中医病机本质探讨[J]. 中国疗养医学, 2023, 32(1): 32-36.
- [24] 刘一谷, 郭应军. 清营汤联合西医治疗对脓毒症患者炎症反应及凝血功能的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(2): 265-270.

缩 写

SAP: 重症急性胰腺炎

ROS: 活性氧

TJ: 紧密连接蛋白

TNF- α : 肿瘤坏死因子- α

IL-6: 白介素-6

GSH: 谷胱甘肽

DAO: 二胺氧化酶

MDA: 丙二醛

SOD: 超氧化物歧化酶

AMY: 淀粉酶

LIPA: 脂肪酶