

# 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能的影响

郑洋<sup>1</sup>, 于晶晶<sup>2</sup>, 杜鹃<sup>3</sup>, 孟令慧<sup>4</sup>

1. 邢台市第三医院消化内科, 河北 邢台 054000; 2. 邢台市第三医院普外科, 河北 邢台 054000;  
3. 河北医科大学病理教研室, 河北 石家庄 050017; 4. 邢台市第三医院检验科, 河北 邢台 054000

**摘要:** **目的** 探讨黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能的作用及相关机制。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组( $n=10$ )、模型组( $n=10$ )、黄芪注射液低剂量组(低剂量组,  $n=10$ )、黄芪注射液中剂量组(中剂量组,  $n=10$ )、黄芪注射液高剂量组(高剂量组,  $n=10$ )。除假手术组外,均采用向胰胆管内输入浓度为 5% 牛磺胆酸钠溶液方法制备急性胰腺炎大鼠模型,假手术组胰胆管内不注入牛磺胆酸钠,仅对胰腺进行物理翻动和划拨。假手术组和模型组于大鼠尾静脉注射等剂量生理盐水,每 6 h 1 次,共 4 次;低剂量组给予黄芪注射液 0.5 ml/kg、中剂量组给予黄芪注射液 1.0 ml/kg、高剂量组给予黄芪注射液 2.0 ml/kg,均为每 6 h 1 次,共 4 次。比较各组大鼠小肠黏膜厚度、胰腺组织病理学评分、血清炎症因子和氧自由基水平、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白(Bax)阳性表达率及组织病理学表现。**结果** 与假手术组比较,模型组小肠黏膜厚度、白介素(IL)-10 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性显著下降,胰腺组织病理学评分、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和丙二醛(MDA)含量及 Bax 蛋白表达阳性率显著增加( $P$  均  $<0.05$ );低剂量组、中剂量组、高剂量组小肠黏膜厚度、IL-10 含量、SOD 活性高于模型组,而胰腺组织病理学评分和 IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 含量及 Bax 蛋白阳性表达率低于模型组( $P$  均  $<0.05$ ),且呈剂量依赖性。**结论** 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能具有保护作用,其机制可能与降低炎症因子、改善氧自由基及下调 Bax 蛋白表达相关。

**关键词:** 黄芪注射液; 急性胰腺炎; 肠道屏障功能; 炎症因子; 氧自由基

**中图分类号:** R 576 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)12-1614-04

## Effects of astragalus injection on intestinal barrier functions in rats with acute pancreatitis

ZHENG Yang\*, YU Jing-Jing, DU Juan, MENG Lin-hui

\* Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Xingtai City, Xingtai, Hebei 054000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of astragalus injection on intestinal barrier functions and the related mechanism in rats with acute pancreatitis. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into five groups ( $n=10$  each): sham operation group, model group, low-, medial-, high-dose astragalus injection groups (low-, medial-, high-dose groups). The rat model of acute pancreatitis was established by input of 5% sodium taurocholate into the pancreaticobiliary duct in all groups except sham operation group performing pancreas mechanical turning only. Astragalus injections of 0.5 ml/kg, 1.0 ml/kg and 2.0 ml/kg were respectively given via tail intravenous injection in low-, medial- and high-dose group, and of normal saline of equal volume were given via tail intravenous injection in sham operation group and model group (once every 6 h, a total of 4 times for all groups). The intestinal mucosal thickness, the pathological score of pancreas tissues, the serum contents of inflammatory factors and activity of oxygen free radical, the positive expression rate of Bax protein and histopathological findings were compared in all groups. **Results** Compared with the sham operation group, the intestinal mucosa thickness, serum content of interleukin(IL)-10 and superoxide dismutase(SOD) activity in model group significantly decreased(all  $P < 0.05$ ), and the pathological score of pancreas tissues, the serum contents of IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  and malondialdehyde(MDA), the positive expression rate of Bax protein in model group significantly increased(all  $P < 0.05$ ). Compared with model group, the intestinal mucosa thickness, serum content of IL-10 and SOD activity in low-, medial-, high-dose groups significantly increased with dose-dependent manner(all  $P < 0.05$ ), and the pathological score of pancreas tissues, the serum contents of IL-6, TNF- $\alpha$  and MDA, the positive expression rate of Bax protein in low-, medial-, high-dose groups significantly decreased(all  $P < 0.05$ ) with dose-dependent manner. **Conclusions** Astragalus

injection has a protective effect for intestinal barrier functions in rats with acute pancreatitis, and its mechanism may be associated with decreasing inflammatory factors, improving oxygen free radical and down-regulating expression of Bax protein.

**Key words:** Astragalus injection; Acute pancreatitis; Intestinal barrier function; Inflammatory factor; Oxygen free radical

流行病学调查显示急性胰腺炎发病率呈不断上升趋势<sup>[1]</sup>,患者常伴麻痹性肠梗阻、腹胀、腹痛,严重者出现全身炎症反应综合征,进而致多器官功能障碍综合征病情发展快速且严重,病死率极高<sup>[2-3]</sup>。中药黄芪应用于急性胰腺炎具有良好的治疗作用,但其具体作用机制尚不十分明确<sup>[4]</sup>。本研究探讨黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠肠道屏障功能的作用及相关机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物:SPF 级 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,体重(180 ± 20)g,由北京维通利华公司提供,合格证号:SCXK(京)2007-0001。室温 23 ~ 25 °C,相对湿度 40% ~ 70%,适应性饲养 1 周。实验药物:黄芪注射液(哈尔滨圣泰生物制药有限公司;规格:中药,每支装 2 ml),乌拉坦(湖北兴银河化工有限公司,纯度 99%),牛磺胆酸钠溶液(购于 Sigma 公司,粉针剂,每支 1 g,纯度 99%)。

1.2 主要仪器和试剂 仪器:MP31001 型电子天平(上海舜宇恒平科技仪器有限公司);HAD-D202 转轮式切片机(德国徕卡公司);BMJ-III 生物组织包埋机(常州市中威电子仪器有限公司);7180 型全自动生化分析仪(日本日立公司);CX41 生物显微镜(日本 OLYMPUS 公司);TGL-160 台式高速离心机(上海医用分析仪器厂)。试剂:白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒(均购于武汉博士德生物工程有限公司);丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(均购于武汉博士德生物工程有限公司);B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体(上海宾智生物科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 实验分组和模型制备 实验分组:50 只 SD 大鼠随机分为假手术组( $n=10$ )、模型组( $n=10$ )、黄芪注射液低剂量组( $n=10$ )、黄芪注射液中剂量组( $n=10$ )、黄芪注射液高剂量组( $n=10$ )。模型制备:术前 24 h 禁食不禁水,给予乌拉坦腹腔注射麻醉,麻醉成功后,将大鼠仰卧在手术板上,四肢用胶带固定;常规消毒,用手术刀自腹部中间位置切开,提取出十二指肠,在十二指肠两侧能够观察到胰腺,找到胰胆管且用手术刀割开;然后逆向刺穿十二指肠且达胰胆

管处;用无损伤血管夹夹闭肝门部胆管近端和远端;再以 5 ml 注射器以 0.1 ml/min 速度缓慢持续向胰胆管内输入浓度为 5% 的牛磺胆酸钠溶液,观察胰腺组织局部出现水肿,且有散在表面出血点后,关闭腹腔。除假手术组大鼠外,其余 40 只 SD 大鼠均造模成功。假手术组大鼠胰胆管内不注入牛磺胆酸钠,仅对胰腺进行物理翻动和划拨。假手术组和模型组于大鼠尾静脉注射等剂量生理盐水,每 6 h 1 次,共 4 次;低剂量组给予黄芪注射液 0.5 ml/kg,中剂量组给予黄芪注射液 1.0 ml/kg,高剂量组给予黄芪注射液 2.0 ml/kg,均为每 6 h 1 次,共 4 次。

1.3.2 各组大鼠小肠黏膜厚度和胰腺组织病理学评分变化 取距幽门 10 cm 处小肠,给予甲醛固定后,光镜检查,测定小肠黏膜厚度;采用 Schmidt 法半定量评分标准评价组织病理学评分。

1.3.3 各组大鼠血清炎症因子含量变化 于大鼠进行腹腔注射 24 h 后眼眶取血 2 ml,于 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,于 -70 °C 下保存待测。采用酶联免疫吸附法(ELISA 法)测定 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  含量。

1.3.4 各组大鼠胰腺组织病理学 切取 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 胰腺组织块,采用 10% 中性甲醛固定,进行 HE 染色。染色步骤包括玻片处理、组织脱水与透明、石蜡切片机脱蜡、苏木精染色、伊红复染、封片。

1.3.5 各组大鼠氧自由基指标含量变化 于大鼠注射 24 h 后腹主动脉取血 2 ml,于 4 °C 下以 3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,于 -70 °C 下保存待测。采用黄嘌呤氧化酶法测定 MDA 和 SOD。

1.3.6 免疫组化法测定各组大鼠肠黏膜细胞 Bax 蛋白表达 回肠组织切片,厚度为 5  $\mu$ m,置于备用的玻片上,于 58 °C 烤箱中烘干熔蜡 60 min;脱蜡、水化组织切片,采用 3% 双氧水去离子水孵育 6 min,阻断内源性过氧化物酶,再将切片放入盛有枸橼酸盐缓冲液(CBS)容器中,于 95 °C 持续 15 min,取出容器,切片于 4 °C 条件下冷却 20 min,再以磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,每次 5 min;滴加按 1:100 稀释的兔抗 Bax 多克隆抗体,4 °C 过夜,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加按 1:500 稀释的山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,室温条件下孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;二氨

基联苯胺 (DAB) 显色, 于 CX41 生物显微镜下观察染色程度, 染色好的切片采用自来水冲洗 10 min 终止显色; 再将切片放入苏木精迅速浸泡, 用自来水冲洗 10 min, 将切片放入乙酸迅速浸泡, 用自来水冲洗 10 min; 切片以 75%、85%、95% 乙醇分别浸泡、脱水 1 min, 将切片用二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III 浸泡 5 min 透明, 将切片自然晾干, 滴上中性树脂封片, 将封好的切片放入烤箱中过夜, 在 CX41 生物显微镜下观察 Bax 蛋白阳性表达率。阳性标准为胞浆染色呈棕黄色, 高倍镜下观察 10 个高倍视野, 计算总细胞数和阳性细胞数。阳性表达率 = 阳性细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ 。

1.4 统计学处理 运用统计学软件 SPSS 19.0 分析处理数据。多个样本均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多组间计量资料采用  $F$  检验, 多重比较采用 SNK- $q$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠小肠黏膜厚度和胰腺组织病理学评分比较 与假手术组比较, 模型组小肠黏膜厚度显著下降 ( $P < 0.05$ ), 胰腺组织病理学评分显著增加 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组、中剂量组、高剂量组小肠黏膜厚度高于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而胰腺组织病理学评分低于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。见表 1。

2.2 各组大鼠血清炎症因子水平比较 与假手术组比较, 模型组血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而 IL-10 水平显著下降 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 低剂量组、中剂量组、高剂量组血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平低于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而 IL-10 水平高于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。见表 2。

2.3 各组大鼠氧自由基水平比较 与假手术组比较, 模型组血清 MDA 水平显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 SOD 水平显著下降 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组、中剂量组、高剂量组血清 MDA 水平低于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 而 SOD 水平高于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。见表 3。

2.4 各组大鼠 Bax 蛋白表达阳性率比较 与假手术组比较, 模型组 Bax 蛋白表达阳性率显著增加 ( $P < 0.05$ ); 低剂量组、中剂量组、高剂量组 Bax 蛋白表达阳性表达率低于模型组 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。见表 4。

2.5 各组大鼠胰腺组织病理表现 假手术组大鼠胰

腺结构清晰, 无炎症细胞浸润, 且无出血灶和坏死; 模型组大鼠胰腺腺泡细胞坏死, 间质有水肿、充血; 低剂量组、中剂量组、高剂量组腺泡破坏减轻, 炎症细胞浸润减少。见图 1。

## 3 讨论

中医学认为急性胰腺炎属“脾心痛”、“脾热病”、“胃脘痛”等范畴, 主要由湿热蕴结肝胆、腑气不通所致, 病机耗气伤阴。黄芪具有补气固表、敛疮生肌、利尿排毒功效, 现代药理研究表明黄芪具有提高机体免

表 1 各组大鼠小肠黏膜厚度和胰腺组织病理学评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	小肠黏膜厚度 ( $\mu\text{m}$ )	胰腺组织病理学评分 (分)
假手术组	10	659.46 $\pm$ 34.51	0.31 $\pm$ 0.06
模型组	10	385.38 $\pm$ 19.89*	5.97 $\pm$ 1.12*
低剂量组	10	442.48 $\pm$ 23.48*#	4.68 $\pm$ 0.93*#
中剂量组	10	518.73 $\pm$ 26.79*#&	3.97 $\pm$ 0.89*#&
高剂量组	10	598.32 $\pm$ 31.27*#&△	2.65 $\pm$ 0.54*#&△

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, &  $P < 0.05$ ; 与中剂量组比较, △  $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清炎症因子水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	IL-6	IL-10	TNF- $\alpha$
假手术组	10	68.32 $\pm$ 10.98	20.74 $\pm$ 3.41	24.38 $\pm$ 4.52
模型组	10	195.28 $\pm$ 34.21*	8.42 $\pm$ 1.87*	120.93 $\pm$ 27.43*
低剂量组	10	163.21 $\pm$ 29.89*#	12.31 $\pm$ 2.01*#	91.32 $\pm$ 23.14*#
中剂量组	10	128.39 $\pm$ 24.51*#&	15.12 $\pm$ 2.10*#&	64.21 $\pm$ 18.49*#&
高剂量组	10	89.32 $\pm$ 17.52*#&△	17.45 $\pm$ 2.39*#&△	40.82 $\pm$ 8.74*#&△

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, &  $P < 0.05$ ; 与中剂量组比较, △  $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠氧自由基水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

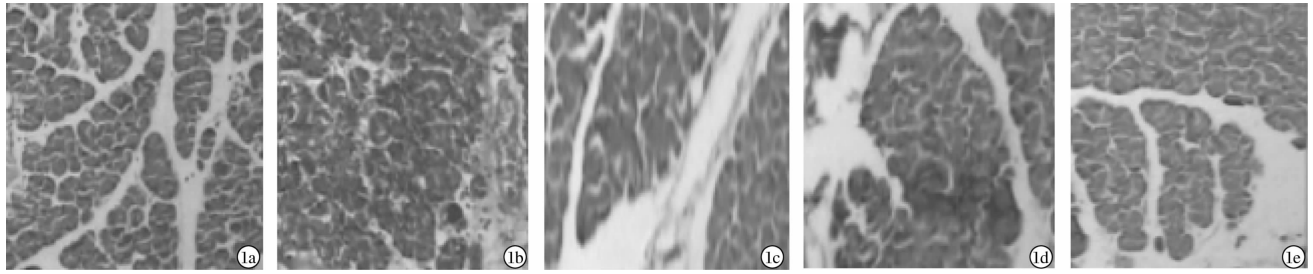
组别	例数	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	SOD (U/L)
假手术组	10	4.76 $\pm$ 0.61	348.29 $\pm$ 25.41
模型组	10	10.13 $\pm$ 1.45*	205.62 $\pm$ 18.42*
低剂量组	10	8.57 $\pm$ 1.18*#	238.29 $\pm$ 21.37*#
中剂量组	10	7.09 $\pm$ 0.94*#&	265.54 $\pm$ 22.10*#&
高剂量组	10	6.10 $\pm$ 0.78*#&△	305.47 $\pm$ 19.89*#&△

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, &  $P < 0.05$ ; 与中剂量组比较, △  $P < 0.05$ 。

表 4 各组大鼠 Bax 蛋白阳性表达率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	Bax (%)
假手术组	10	5.29 $\pm$ 0.57
模型组	10	47.83 $\pm$ 3.42*
低剂量组	10	41.29 $\pm$ 3.17*#
中剂量组	10	37.46 $\pm$ 2.09*#&
高剂量组	10	35.15 $\pm$ 2.16*#&△

注: 与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ ; 与低剂量组比较, &  $P < 0.05$ ; 与中剂量组比较, △  $P < 0.05$ 。



1a:假手术组;1b:模型组;1c:低剂量组;1d:中剂量组;1e:高剂量组

图 1 各组大鼠胰腺组织病理表现(HE 染色,  $\times 100$ )

疫功能、促进机体代谢,以及增强机体应激能力和耐缺氧作用<sup>[5-6]</sup>。近年来研究报道黄芪注射液用于急性胰腺炎效果明显。朱渊红等<sup>[7]</sup>学者报道,黄芪注射液对急性胰腺炎肺损伤具有防治作用,且能通过调节肺组织内炎症因子 IL-10 和 TNF- $\alpha$  水平而发挥作用。

胰腺损伤后激活局部的各种炎症介质和炎症细胞,局部的炎症是机体自我保护反应,但急性胰腺炎时局部炎症反应失控,过度激活细胞因子与炎症因子,从而形成细胞因子瀑布式反应,大量细胞因子如 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  等从局部组织进入循环系统<sup>[8-9]</sup>。在急性胰腺炎发病中,存在抗炎反应和促炎反应的失衡:胰腺局部 IL-6、TNF- $\alpha$  的产生是对腺泡细胞损伤的保护性反应,通常这种促炎反应被随着产生的 IL-10 等引发的抗炎反应平衡,炎症局限在损伤部位,预后较好<sup>[10]</sup>;但重症急性胰腺炎抗炎反应和促炎反应则失衡,出现全身炎症反应综合征,预后差。本研究表明,低剂量组、中剂量组、高剂量组血清 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平低于模型组,而 IL-10 水平高于模型组,说明黄芪注射液可减轻炎症反应。近年来研究表明,氧化应激反应是参与胰腺微循环障碍的主要因素。MDA 为脂质过氧化物,主要因机体产生氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,从而引发脂质过氧化作用而形成;SOD 活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力<sup>[11]</sup>。本研究表明,低剂量组、中剂量组、高剂量组血清 MDA 水平低于模型组,而 SOD 水平高于模型组,说明黄芪注射液可改善氧自由基平衡。近年来研究发现,腺泡细胞凋亡或者坏死对急性胰腺炎病情轻重有重要作用,且急性胰腺炎时胰腺腺泡细胞 Bax 表达增强。Bax 是线粒体的一种重要的调控基因,能够提高线粒体膜通透性,促进细胞色素 C 的释放,从而形成凋亡诱导复合物,作用于凋亡效应因子致使细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,低剂量组、中剂量组、高剂量组 Bax 蛋白表达阳性率低于模型组,说明黄芪注射液可明显下调 Bax 蛋白的表达。

综上所述,黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠肠道屏

障功能具有保护作用,其机制可能与改善炎症因子、改善氧自由基及下调 Bax 蛋白表达相关。

#### 参考文献

- [1] Yadav D, Lee E, Papachristou GI, et al. A population-based evaluation of readmissions after first hospitalization for acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2014, 43(4): 630-637.
- [2] Jin T, Huang W, Yang XN, et al. Validation of the moderate severity category of acute pancreatitis defined by determinant-based classification [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014, 13(3): 323-327.
- [3] Hamada T, Yasunaga H, Nakai Y, et al. Impact of hospital volume on outcomes in acute pancreatitis: a study using a nationwide administrative database [J]. *J Gastroenterol*, 2014, 49(1): 148-155.
- [4] 张超贤,郭晓凤,秦咏梅. 黄芪注射液对急性胰腺炎大鼠 NF- $\kappa$ B 活性、NF- $\kappa$ B 及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(10): 1051-1055.
- [5] 朱渊红,吕昕,王新华. 黄芪注射液对 SAP 肺损伤大鼠肺组织炎症细胞凋亡的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2011, 29(9): 2040-2042.
- [6] 王少言,初巍巍,霍阳,等. 黄芪注射液对重症急性胰腺炎大鼠外周血清氧化相关物质的影响 [J]. *解放军医药杂志*, 2014, 26(12): 5-7.
- [7] 朱渊红,王新华,王真,等. 黄芪注射液对急性胰腺炎重症肺损伤大鼠肺组织炎症因子的影响 [J]. *中国中医药科技*, 2010, 17(5): 414-415.
- [8] 王建祥,张华,刘彦. 血必净治疗急性胰腺炎的临床疗效及对血清炎症因子和氧自由基的影响 [J]. *中国卫生产业*, 2014, 9(16): 33-34.
- [9] 曾杰,陈宁波,胡卫健,等. 奥曲肽联合加贝酯治疗重症急性胰腺炎的疗效及对患者胃肠功能和血清细胞因子的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(17): 4743-4745.
- [10] 杨培,冷波,李波,等. 富氢水对重症急性胰腺炎大鼠血清炎症细胞因子及肺组织氧化应激反应的影响 [J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2015, 9(18): 3394-3398.
- [11] 张延英,舒畅,蔡兴,等. 大黄芪牡丹汤组方对急性胰腺炎模型大鼠炎症反应及氧化应激水平的影响 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(5): 24-26.
- [12] 陈海龙,张桂信,宫爱霞,等. 大鼠急性胰腺炎时胰腺腺泡细胞凋亡及 Bax、Caspase-8 的表达 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(10): 1067-1072.