

本文引用:程华初,徐琦,杨茜芸,尹抗抗,谭达全.大承气汤对不完全性肠梗阻模型大鼠回盲部组织病理改变的影响及作用机制研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1669-1675.

大承气汤对不完全性肠梗阻模型大鼠回盲部组织病理改变的影响及作用机制研究

程华初¹,徐琦²,杨茜芸¹,尹抗抗¹,谭达全^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南省中医药研究院,湖南长沙410006)

【摘要】目的 研究大承气汤对不完全性肠梗阻模型动物回盲部组织病理改变及炎性物质释放的影响,探讨其作用机制。**方法** 选用健康SD大鼠120只,雌雄各半,随机分为假手术组、空白组、模型组和大承气汤高、中、低剂量组,每组20只。采用丝线结扎法制备不完全性肠梗阻模型,大承气汤高、中、低剂量组分别给予11.6、5.8、2.9 g/(kg·d)剂量大承气汤灌胃给药,给药体积均为10 mL/(kg·d),空白组、假手术组、模型组灌胃相同体积的0.9%氯化钠注射液,均连续灌胃3 d。采用结肠损伤评分评价回盲部黏膜损伤指数;采用HE染色观察回盲部黏膜形态学改变;采用ELISA法检测血清白细胞介素-1 α (IL-1 α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)、一氧化氮合成酶(eNOS)水平;采用qPCR法检测回盲部组织中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R、eNOS、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱冬肽酶-1(Caspase-1) mRNA含量。**结果** 模型组大鼠肠组织病理呈现黏膜损伤、隐窝破坏、黏膜水肿、间质水肿、炎性细胞浸润等一系列炎性损伤。与空白组和假手术组比较,模型组黏膜损伤指数均增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$),表明造模成功;与模型组比较,大承气汤各剂量组黏膜损伤指数降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与空白组和假手术组比较,模型组血清IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS水平及肠组织中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R、eNOS、NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,大承气汤各剂量组大鼠血清IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS分泌水平均能不同程度下调($P<0.01$),大鼠肠组织NLRP3、eNOS、Caspase-1 mRNA表达水平下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$);大承气汤中、高剂量组大鼠肠组织中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R、ASC、Caspase-1 mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);大承气汤低剂量组大鼠肠组织中IL-1 α 、IL-1R、Caspase-1 mRNA表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 大承气汤可有效改善不完全性肠梗阻模型大鼠肠组织病理损伤,减轻炎症反应,调节NLRP3、ASC、Caspase-1的失衡。

【关键词】 不完全性肠梗阻;大承气汤;回盲部黏膜损伤;炎性因子

【中图分类号】R285.5

【文献标志码】A

【文章编号】doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.005

Effect and Mechanism Research of Ileocecal Histopathological Changes of Incomplete Intestinal Obstruction Model Rats by Dachengqi Decoction

CHENG Huachu¹, XU Qi², YANG Qianyun¹, YIN Kangkang¹, TAN Daquan^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

【Abstract】Objective To study the effect of Dachengqi Decoction on the ileocecal histopathological changes and the release of inflammatory substances in animal models of incomplete intestinal obstruction, and to explore its mechanism of action. **Methods**

【收稿日期】2021-08-17

【基金项目】湖南省科技厅项目(2015JC3078)。

【作者简介】程华初,男,在读博士研究生,研究方向:中医基础理论治则治法研究。

【通信作者】* 谭达全,男,教授,博士研究生导师,E-mail:overseastcmdu@hotmail.com。

A total of 120 healthy SD rats were selected, half male and half female, and randomly divided into sham operation group, blank group, model group and Dachengqi Decoction high, medium and low dose groups, with 20 rats in each group. The incomplete intestinal obstruction model was prepared by silk ligation, and the high, medium, and low dose of Dachengqi Decoction group were administered by intragastric administration. The doses were 11.6, 5.8, 2.9 g/(kg·d), respectively, the administration volume was 10 mL/(kg·d), the blank group, sham operation group, and model group were given the same volume of 0.9% sodium chloride injection for 3 consecutive days. The ileocecal mucosal injury index was evaluated by the colon injury score, the morphological changes of the ileocecal mucosa were observed by HE staining, and the serum interleukin-1 α (IL-1 α) and interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-18 (IL-18), nitric oxide synthase (eNOS) levels were detected by ELISA, and qPCR method was used to detect IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, eNOS, nucleotide binding oligomerization domain like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-related spot-like protein (ASC), Caspase-1 mRNA content. **Results** The pathology of the intestinal tissue of rats in the model group showed a series of inflammatory injuries such as mucosal injury, crypt destruction, mucosal edema, interstitial edema, and inflammatory cell infiltration. Compared with the blank group and the sham operation group, the mucosal injury index score of the model group increased ($P<0.01$ or $P<0.05$), indicating that the model was successful. Compared with model group, the mucosal injury index score of Dachengqi Decoction groups was decreased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the blank group and the sham operation group, the serum levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, and eNOS in the model group and intestinal tissues IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, eNOS, NLRP3, ASC and Caspase-1 mRNA were significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with model group, serum levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, and eNOS in Dachengqi Decoction groups were down-regulated to varying degree levels ($P<0.01$), the mRNA expression levels of NLRP3, eNOS and Caspase-1 in rat intestine were down-regulated ($P<0.05$ or $P<0.01$); the mRNA expression levels of IL-1 α , IL-1 β , IL-1R, ASC and Caspase-1 were decreased in Dachengqi Decoction medium dose and high dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$); the mRNA expression levels of IL-1 α , IL-1R and Caspase-1 in intestinal tissue of rats in Dachengqi Decoction low dose group decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Dachengqi Decoction can effectively improve the pathological damage of intestinal tissue in rats with incomplete intestinal obstruction, reduce inflammation, and regulate the imbalance of NLRP3, ASC, and Caspase-1.

[**Keywords**] incomplete intestinal obstruction; Dachengqi Decoction; ileocecal mucosal injury; inflammatory factors

肠梗阻(intestinal obstruction)是指任何原因引起的肠内容物不能正常运行或通过发生障碍,其显著的临床症状为腹痛、腹胀、呕吐、肛门停止排便排气^[1]。临床根据梗阻的程度可分为完全性肠梗阻和不完全性肠梗阻。不完全性肠梗阻是外科常见疾病,也是内科各种疾病伴随的常见并发症,异物、结石、寄生虫等导致的肠腔堵塞及肠扭转、腹腔肿瘤、腹外疝等引起的肠管受压和肠壁病变等均可导致,不仅可以引起肠管本身病变,还可致全身生理功能紊乱及肠道功能障碍、衰竭,最终发展为多器官功能障碍综合征^[2]。

本病属于中医学“肠结”“关格”“腹痛”“积聚”等范畴,以痞(心下闷塞坚硬)、满(胸胁脘腹胀满)、燥(肠有燥粪,干结不下)、实(腹中硬满,痛而拒按,大便不通)四大主证为主要表现,为阳明腑实证,主要病机为气机紊乱、实热与积滞互结、浊气填塞、腑气不通,治疗当急开其闭,佐以散结气、活血脉^[3-4]。大承气汤

由大黄、厚朴、枳实、芒硝组成,主治阳明腑实证、阳热实证、急下证。《伤寒论》第 215 条载:“阳明病,谵语、有潮热、反不能食者,胃中必有燥屎五六枚也;若能食者,但硬耳,宜大承气汤下之。”临床研究^[5-7]表明,使用大承气汤或以其为基础的加减方治疗可收到较好的疗效。本研究采用丝线结扎法制备不完全性肠梗阻大鼠模型,从现代生物学角度探讨大承气汤对模型动物炎性物质释放以及肠道形态的影响,现报道如下。

1 材料

1.1 实验动物

选用健康 SD 大鼠 120 只,雌雄各半[由湖南中医药大学动物实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002],体质量 200~240 g。饲养条件:SPF 级动物饲养室,单笼喂养,室温 26 ℃,相对湿度 50%~60%。定时通风换气,自然明暗周期。实验

前检疫和适应性喂养1周,各项操作均符合动物伦理相关规定。

1.2 药物

大承气汤药物组成:大黄 12 g,厚朴 24 g,枳实 12 g,芒硝 9 g。超微饮片,购买于湖南中医药大学第一附属医院中药房。先煎枳实、厚朴约 25 min,纳入大黄煎煮 15 min,加入溶化芒硝约 2~3 s。分别浓缩至 3 种不同浓度,每毫升含生药 1.16、0.58、0.29 g,4 ℃冷藏备用。

1.3 主要试剂

10%水合氯醛(长沙夏威生物科技公司,批号 20181213);4%多聚甲醛(长沙夏威生物科技公司,批号 20181114);0.9%氯化钠注射液(山东芥都药业有限公司,批号 2018071510);苏木素-伊红染色液(湖南艾佳生物技术有限公司,货号 P032IH);中性树胶(湖南艾佳生物科技股份有限公司,货号P033IH);二甲苯(上海国药集团药业股份有限公司,批号:10023418);无水乙醇(上海国药集团药业股份有限公司,批号:10009218);HE 染色试剂盒(丽欣生物科技有限公司);TRIZOL 试剂(广东东盛生物科技有限公司,货号:R1022);DS2000 marker(广东东盛生物科技有限公司,货号:M1102);SYBR Green qR-CR Mix(广东东盛生物科技有限公司,货号:P2092);DEPC(美国 Sigma 公司,货号 V900882);Reverse Transcription System[普洛麦格(北京)生物技术有限公司,A5001];RT-PCR 引物(上海生物工程技术服务有限公司)。

1.4 主要仪器

DNM-9602 型酶标仪(北京普朗公司);A0.820H 型切片机(美国永生公司);AE260 型电子天平(梅特勒-托利多公司);FA1004 型电子分析天平(上海天平仪器);FA1004 型低速自动平衡离心机(上海天平仪器厂);TD24-WS 型低速自动平衡离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);FS-CJ-2F 型超净工作台(苏州市冯氏实验动物设备有限公司);DMBS-2231 型摄影生物显微镜(厦门麦克奥迪公司);YT-6C 型生物组织摊烤片机(亚光医用电子技术有限公司);P031IH 型防脱载玻片(湖南艾佳生物技术有限公司);AE41 型光学显微镜(麦克奥迪);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);7300 型荧光定量 PCR 仪赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

2 方法

2.1 动物分组与造模

实验大鼠适应性常规饲养 7 d,期间自由获取食物与水。遵从随机、均衡原则,随机选取 20 只为假手术组、20 只为空白组,均雌雄各半,余 80 只按照丝线结扎法制备不完全性肠梗阻模型^[8]。造模方法:大鼠禁食 24 h,用 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,备皮后碘伏消毒,乙醇脱碘后于腹中线下 1/3 处开腹,暴露回盲部,用直径为 3.2 mm 的中心静脉管与回肠肠管并排放置,在距回盲部 1 cm 处用丝线绕过肠管和中心静脉导管一并结扎,最后抽出中心静脉导管,造成不完全性肠梗阻,将腹壁逐层缝合。造模后大鼠统一右侧卧位置于鼠笼中,待大鼠苏醒。术后注意大鼠的保暖和伤口护理,保持笼内垫料的干爽舒适,避免伤口感染,术后继续禁食 6 h 后予以常规饲养。根据回盲部黏膜损伤指数评价造模是否成功^[9]。假手术组麻醉、开腹等方法同前,只用针线穿透肠系膜而不结扎,空白组不做任何处理。将造模成功的 80 只大鼠随机分为模型组和大承气汤高、中、低剂量组(以下简称高、中、低剂量组),每组 20 只,雌雄各半。

2.2 给药方法

连续 3 d 每天早晨 9 点进行灌胃给药。大承气汤高、中、低剂量组予等体积高、中、低剂量大承气汤灌胃,灌胃剂量根据人与大鼠的体表面积进行换算,3 种剂量呈等比数列 4:2:1,分别为 11.6、5.8、2.9 g/(kg·d),给药体积均为 10 mL/(kg·d)^[10]。空白组、假手术组、模型组灌胃相同体积的 0.9%氯化钠注射液。

2.3 标本采集

各组取 10 只大鼠,麻醉后股动脉采血,离心得血清后处死,血清-80 ℃冻存,即刻剪取回盲部组织,冰 0.9%氯化钠注射液冲洗肠腔内容物后,无菌滤纸吸干水分,肉眼观察回盲部后立即浸泡于 10%甲醛中,固定。各组剩余 10 只大鼠麻醉后处死,即刻剪取回盲部组织,冰 0.9%氯化钠注射液冲洗肠腔内容物后,无菌滤纸吸干水分,置于液氮中,备用。

2.4 指标检测

2.4.1 回盲部黏膜形态学改变 各组大鼠予 10%水合氯醛麻醉,处死大鼠,沿术口开腹,剪取回盲部组织,浸泡于 4%多聚甲醛中固定。采用 HE 染色法,

经脱蜡、水化、染色、分化、透明、封片,进行镜检。

2.4.2 回盲部黏膜损伤指数 参照 Araki Y^[11]及 Yulpinar MA^[12]结肠损伤评分进行,对黏膜损伤、隐窝破坏、黏膜水肿、间质水肿、炎性细胞浸润 5 种组织学表现分别计分,根据各组织的无、轻、中、重的损伤程度分别计 0、1、2、3 分。

2.4.3 血清促炎细胞因子表达 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清白细胞介素-1 α (IL-1 α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-18(IL-18)、一氧化氮合成酶(eNOS)水平。

2.4.4 盲部组织中炎性因子表达 采用 qPCR 法检测各组大鼠回盲部组织中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R、eNOS、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱冬肽酶-1(Caspase-1) mRNA 含量。引物设计见表 1。

表 1 引物设计

基因名称	正向引物基因序列	反向引物基因序列
Caspase-1	CAGGAGGGAATATGTGGG	AACCTTGGGCTTGCTTT
ASC	ACATGGGCATACAGGAGC	CAGAGCATCCAGCAAACC
NLRP3	CCCAGGCTGTAACATTC	GCTTCAGTCCCACGCACA
IL-1 α	ATGGTGCTTATTGACTTTC	GATCAGCCTCTAGTGTGTG
IL-1 β	ATGGCAACTGTCCCTGAAC	TGCTTGGGTCTCATCCTG
IL-1R	TTTCCGTACGTCTCGTGC	TTTGCTTCATCTGGGTTG
eNOS	CAGGCATCACCAGGAAGAA	TCAGAGCCATACAGGATAGTCC

2.5 统计学方法

实验数据使用 SPSS 21.0 统计软件进行处理,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,对样本先进行方差齐性检验,方差齐时,用 *One-Way ANOVA* 检验,并用 *LSD* 法进行组间的多重比较;方差不齐时,用非参数秩和检验,先用 *Kruskal-Wallis H* 比较总的差异,再用 *Mann-Whitney U* 进行两组之间比较。计数资料采用完全随机设计多样本比较的秩和检验。同时采用 *Pearson* 相关系数分析药物剂量与不同指标的相关密切程度。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠回盲部组织病理改变

从切片中可见,造模后,上皮层被破坏黏膜层中出现大量淋巴细胞、炎症细胞浸润,而上皮细胞可见细胞间质水肿,界限不清,细胞肿胀、坏死、脱落。治疗各组的损伤情况各异,对于肠黏膜损伤均有修复

作用,但修复作用并不完全随着剂量的增加而增强。见图 1。

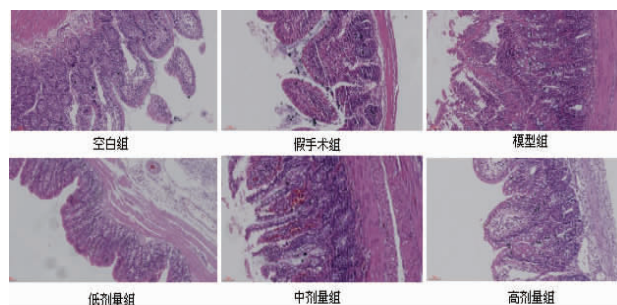


图 1 各组回盲部组织病理变化图(HE, $\times 200$)

3.2 各组大鼠回盲部黏膜损伤指数比较

模型组大鼠肠组织呈现黏膜损伤、隐窝破坏、黏膜水肿、间质水肿、炎性细胞浸润等一系列炎性损伤。肉眼观察,相较于空白组和假手术组,模型组及各治疗组均出现肠管扩张、膨胀,造模组更有肠管黏连、水肿增厚、梗阻以下肠管萎缩等现象。

与空白组和假手术组比较,模型组黏膜损伤指数均增高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明造模成功。与模型组比较,大承气汤各剂量组黏膜损伤指数均降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠回盲部黏膜损伤指数比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$, 分)

组别	黏膜损伤指数/分
空白组	1.33 \pm 1.53
假手术组	4.00 \pm 2.65
模型组	8.33 \pm 1.53 ^{▲▲}
高剂量组	5.00 \pm 1.00 [■]
中剂量组	3.67 \pm 2.31 [■]
低剂量组	2.67 \pm 1.53 [■]

注:与空白组比较,▲▲ $P < 0.01$,▲ $P < 0.05$;与假手术组比较,[△] $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,■ $P < 0.01$,■ $P < 0.05$

3.3 各组大鼠血清 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS 水平比较

与空白组和假手术组比较,模型组血清 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS 含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,大承气汤各剂量组均能不同程度下调 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS 分泌水平,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 各组大鼠肠组织 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R mRNA 表达水平比较

与空白组和假手术组比较,模型组大鼠肠组织中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R mRNA 表达明显升高($P <$

表3 各组大鼠血清 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-18/(pg·mL ⁻¹)	eNOS/(μ IU·L ⁻¹)
空白组	10	6.59±0.82	8.87±0.53	8.79±0.37	10.36±0.49	11.04±0.97
假手术组	10	11.52±0.62	12.60±1.40	12.96±0.46	13.20±0.37	12.22±0.64
模型组	10	44.40±2.42 ^{▲▲}	36.80±0.84 ^{▲▲}	32.67±0.47 ^{▲▲}	34.51±0.45 ^{▲▲}	39.49±2.27 ^{▲▲}
高剂量组	10	15.36±1.13 [■]	15.13±0.85 [■]	14.83±0.13 [■]	14.82±0.23 [■]	16.11±0.54 [■]
中剂量组	10	25.14±0.88 [■]	25.87±0.94 [■]	23.83±1.06 [■]	24.96±0.22 [■]	26.17±1.34 [■]
低剂量组	10	35.33±0.48 [■]	30.53±0.65 [■]	26.88±0.38 [■]	30.70±0.67 [■]	34.91±1.51 [■]
F 值		842.07	886.52	166.72	3212.23	313.33

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$;与假手术组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,■■ $P<0.01$

0.01 或 $P<0.05$);与模型组比较,大承气汤低剂量组大鼠肠组织中 IL-1 α 、IL-1R mRNA 表达降低($P<0.01$),大承气汤中、高剂量组均不同程度下调 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-1R mRNA 表达($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 4。

表4 各组大鼠肠组织中 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	IL-1 α mRNA/ β -actin	IL-1 β mRNA/ β -actin	IL-1R mRNA/ β -actin
空白组	1.00±0.03	1.14±0.07	1.14±0.17
假手术组	1.11±0.10	1.18±0.09	1.06±0.09
模型组	40.70±1.91 ^{▲▲}	37.23±2.6 ^{▲▲}	20.48±1.70 ^{▲▲}
高剂量组	10.90±1.72 [■]	13.37±1.24 [■]	8.75±1.91 [■]
中剂量组	13.26±1.27 [■]	18.11±2.83 [■]	9.25±1.06 [■]
低剂量组	16.11±1.54 [■]	21.23±1.09	13.47±1.17 [■]

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与假手术组比较,△△ $P<0.01$,△ $P<0.05$;与模型组比较,■■ $P<0.01$,■ $P<0.05$

3.5 各组大鼠肠组织 NLRP3、eNOS mRNA 表达水平比较

与空白组和假手术组比较,模型组大鼠肠组织中 NLRP3、eNOS mRNA 表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);与模型组比较,大承气汤各剂量组均能不同程度下调 NLRP3、eNOS mRNA 表达水平,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。见表 5。

表5 各组大鼠肠组织 NLRP3、eNOS mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	NLRP3/ β actin	eNOS/ β actin
空白组	1.15±0.17	1.15±0.08
假手术组	1.01±0.03	1.09±0.05
模型组	49.70±2.08 ^{▲▲}	38.47±2.64 ^{▲▲}
高剂量组	25.62±1.57 [■]	15.91±0.82 [■]
中剂量组	27.41±1.25 [■]	18.70±0.90 [■]
低剂量组	34.48±1.82 [■]	22.19±1.46 [■]

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$,▲ $P<0.05$;与假手术组比较,△△ $P<0.01$,△ $P<0.05$;与模型组比较,■■ $P<0.01$,■ $P<0.05$

3.6 各组大鼠肠组织 ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平比较

与空白组和假手术组比较,模型组大鼠肠组织中 ASC 和 Caspase-1 mRNA 表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,大承气汤中、高剂量组大鼠肠组织中 ASC、Caspase-1 mRNA 表达下调($P<0.05$),大承气汤各剂量组均能不同程度下调 Caspase-1 mRNA 表达水平($P<0.05$)。见表 6。

表6 各组大鼠肠组织中 ASC、Caspase-1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ASC/ β actin	Caspase-1/ β actin
空白组	1.03±0.09	1.11±0.09
假手术组	1.07±0.10	1.08±0.05
模型组	30.99±1.85 ^{▲▲}	35.17±2.20 ^{▲▲}
高剂量组	17.20±1.31 [■]	19.12±3.11 [■]
中剂量组	20.19±0.97 [■]	22.21±2.24 [■]
低剂量组	20.38±2.28	22.07±1.90 [■]

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$;与假手术组比较,△ $P<0.05$;与模型组比较,■■ $P<0.05$

4 讨论

肠梗阻属于中医学“肠结”“关格”“腹痛”“积聚”的范畴,饮食不节,劳累过度,寒邪凝滞,热邪郁闭,湿邪中阻,或手术后瘀血留滞,燥屎内结或虫团集聚等原因,导致肠道气机痞塞,上下不通,不通则痛;气滞于中,清气不得上升,浊气不得下降,则发生腹胀;肠道痞阻,胃气上逆而作呕吐,甚至吐出粪便;气机闭塞,大肠传导失司而致便秘。从本病的痛、胀、呕、闭四大临床特征分析,以“闭”为主要矛盾,故当以“攻下通便”为基本治则,通过泻下、荡涤、攻逐等作用,使停留在胃肠的宿食、燥屎、冷积、瘀血、结痰、停水、虫积等有形积滞从大便而出,便通气畅,则痛、胀、呕三症自然缓解^[13]。

中医学中的“下法”是通过泻下、荡涤、攻逐等作

用,使停留在胃肠的宿食、燥屎、冷积、瘀血、结痰、停水、虫积等有形积滞从大便而出的治法。由于积滞有寒热,正气有盛衰,邪气有兼夹,故下法有寒下、温下、润下、逐水、攻补兼施之别。大承气汤是寒下法的代表方剂,软坚润燥、苦寒泄下与开痞散结、行气除满并重,通里与攻下并行。其由两个君臣结构组成,即:大黄苦寒泄热、攻积通便、荡涤肠胃邪热积滞,为君药;芒硝咸苦而寒,泻热通便、润燥软坚,协大黄峻下热结,为臣药。积滞内阻,致腑气不通,内结之实热积滞,难以速下,重用厚朴亦为君药,行气消胀除满,臣以枳实下气开痞散结,助厚朴行气而除痞满。柯韵伯在《伤寒来苏集·伤寒附翼·阳明方总论》中论述:“厚朴倍大黄,是气药为君,名大承气……大承气用水一斗,先煮枳朴,煮取五升,内大黄煮取三升。内硝者,以药之为性,生者锐而先行,熟者气钝而和缓。仲景欲使芒硝先化燥屎,大黄继通地道,而后枳朴除其痞满,缓于制剂者,正以急于攻下也”^[14],阐释了大承气汤的作用机制,是以“生而锐”的芒硝为“先锋官”,先化开燥屎,再由行气药和泻热通腑药共同作用,达到通里攻下的目的。临床研究^[15-17]显示,大承气汤及其加减方治疗肠梗阻可有效改善肠梗阻患者胃肠功能障碍,降低患者炎症指标水平,修复肠道屏障功能。孙文杰等^[18]采用可视化知识图谱整体分析近10年大承气汤的研究概况及趋势,结果显示肠梗阻是该方最为相关的疾病。

本研究采用丝线结扎法制备不完全性肠梗阻大鼠模型,予不同剂量大承气汤进行干预,探讨该方对模型大鼠回盲部肠道形态以及炎性物质释放的影响。对回盲部肠道形态的研究结果显示:正常的肠黏膜组织由从内而外依次由黏膜层、黏膜肌层、黏膜下层、肌层和外膜四部分构成。造模后,上皮细胞可见细胞间质水肿,界限不清,细胞肿胀、坏死、脱落。治疗各组的损伤情况各异,对于肠黏膜损伤均有修复作用,但修复作用并不完全随着药物剂量的增加而增强。一方面要考虑其修复作用可能与大黄能提高黏膜的血流灌注起到保护大鼠肠黏膜有关;另一方面可能与芒硝对肠黏膜的刺激有关,其剂量越大对肠黏膜的刺激性越强^[19]。

肠黏膜损伤指数是由 Chiu CJ 等^[9]在1970年的实验研究中提出,此后的动物试验研究中关于肠黏膜损害的严重程度判定多基于此,是判定黏膜损伤

指数程度最简便、最快速的指标。本实验中,模型组的黏膜损伤、隐窝破坏、黏膜水肿、间质水肿、炎细胞浸润各项指标评分均高出正常组和假手术组,说明造模方法对于模型大鼠的回盲部结肠组织造成了炎性损伤,提示造模成功。大承气汤各剂量组均能不同程度改善炎性病理损伤,高剂量组的黏膜损伤积分较之中剂量和低剂量略高,差异无统计学意义,可能与芒硝对于肠黏膜的刺激性有关。

炎症小体是一类具有控制炎症反应、宿主防御作用的多聚蛋白复合物,细胞传感器、适配器——凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、前体半胱天冬酶1(pro-Caspase-1)是其基本构成^[20]。NLRP1、NLRP3、NLRC4、NLRP6、NLRP9b、NLRP12、黑色素瘤缺失2(AIM2)及 pyrin 等均可装配成炎症小体复合体^[21]。其中NLRP3是NOD样受体(NLRs)家族中优先级最高的成员,研究^[22]表明,NLRP3炎症小体与肠道炎症免疫环境密切相关。在LPS、其他毒素或环境压力等外源性刺激下,NLRP3炎症小体的传感器NLRP3蛋白接受到启动信号,通过连接蛋白ASC将pro-Caspase-1招募到炎症小体复合体,Caspase-1前体通过自身催化裂解,产生活性亚基p10和p20,被激活的Caspase-1对pro-IL-1 β 、pro-IL-18进行剪切裂解,使其成为具有生物活性的IL-1 β 、IL-18^[23]。IL-1 β 具有调控发热、疼痛阈值、血管舒张基因表达的作用,并促进免疫细胞向感染组织不断渗透;IL-18则是介导适应性免疫的促炎细胞因子^[24]。同时,作为半胱氨酸蛋白酶之一的Caspase-1尚可裂解Gasdermin D蛋白(GSDMD),介导特殊的程序性死亡,即细胞焦亡,GSDMD介导的细胞焦亡可促进细胞因子的释放和DAMPs的产生,为免疫系统应对感染做准备^[25]。因此,由NLRP3炎症小体激活的Caspase-1通过释放成熟的细胞因子和清除感染或损伤的细胞,为宿主细胞提供了双重防御机制。研究^[26]表明,结肠黏膜组织中NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA和蛋白表达及IL-1 β 、IL-18等致炎因子含量明显增高,提示NLRP3炎症小体异常过度激活是结肠炎性反应发展的主要原因。

本实验对各组大鼠血清IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS水平及回盲部组织中IL-1ra、IL-1 β 、IL-1R、eNOS、NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA水平进行了观察比较,研究结果显示:模型组大鼠血清

IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-18、eNOS 较空白组和假手术组明显升高,大承气汤高、中、低剂量均能不同程度地下调其分泌水平,且与剂量呈负相关。模型大鼠结肠组织 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1R、eNOS、NLRP3、ASC、Caspase-1 mRNA 表达与空白组和假手术组相比,差异均具有统计学意义,大承气汤高、中、低剂量均能不同程度下调各项指标表达水平,且与剂量呈负相关,剂量越大越能控制下降其表达水平,但大承气汤剂量与 Caspase-1 mRNA 表达水平相关性不明显。本研究从病理形态和炎性因子上阐明了大承气汤对不完全性肠梗阻的部分作用机制,表明大承气汤可有效改善不完全性肠梗阻模型大鼠肠组织病理损伤,减轻炎症反应,调节 NLRP3、ASC、Caspase-1 的失衡。

参考文献

- [1] 周永坤,许振国,朱 勇.肠梗阻诊断治疗[M].北京:人民军医出版社,2014:8.
- [2] 吕云福.肠梗阻的常见病因分类与治疗策略[J].中华普外科手术学杂志(电子版),2011,5(3):251-255.
- [3] 李 冀.方剂学速记[M].北京:中国中医药出版社,2017.
- [4] 冯世纶,张长恩.经方传真;胡希恕经方理论与实践[M].3版.北京:中国中医药出版社,2018.
- [5] 杨 勇,赵 薇.大承气汤治疗不完全性肠梗阻 28 例疗效观察[J].云南中医中药杂志,2015,36(2):40-41.
- [6] 张福兴,江一平.大承气汤加味治疗肠梗阻 48 例[J].江西中医药,2013,44(5):30-31.
- [7] 赵汉鹏,马腾飞,沈益君,等.中药封包联合复方大承气汤治疗不完全性肠梗阻的临床研究[J].中医药导报,2016,22(4):83-85.
- [8] 李禹呈,杨 拯,袁梦郎,等.新方法建立大鼠不完全性肠梗阻模型的实验研究[J].四川动物,2013,32(2):276-279,156.
- [9] CHIU C J. Intestinal mucosal lesion in low-flow states [J]. Archives of Surgery, 1970, 101(4): 478.
- [10] 陈 奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006.
- [11] ARAKI Y, ANDOH A, TAKIZAWA J, et al. Clostridium butyricum, a probiotic derivative, suppresses dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in rats [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2004, 13(4): 577-580.
- [12] GÜLPINAR M A, ZBEYLI D, ARBAK S, et al. Acute stress ameliorates colitis via central corticotropin-releasing factor and serotonin (5-HT)-3 receptors [J]. Turkish Journal of Medical Sciences, 2005, 35(1): 13-19.
- [13] 李 军.老年肠梗阻临床诊治分析[J].中外医疗,2018,37(4):41-42,46.
- [14] 柯 琴.《伤寒来苏集·伤寒附翼·阳明方总论》[M].上海:上海科学技术出版社,1959.
- [15] 李道卫.大承气汤灌肠法治疗粘连性肠梗阻 48 例临床观察[J].光明中医,2020,35(1):43-45.
- [16] 戴景涛,颜小明,卓 玛.大承气汤灌肠治疗肠结核所致肠梗阻临床疗效分析[J].青海医药杂志,2020,50(4):70-71.
- [17] 郑香琴,冯惠春,郑晓真,等.浓煎大承气汤在老年癌性不全肠梗阻中的应用[J].新中医,2021,53(9):102-106.
- [18] 孙文杰,陈亚峰,高 磊,等.近 10 年“大承气汤”相关研究知识图谱分析[J].上海中医药杂志,2019,53(9):22-26.
- [19] 沈凌鸿,郑贵军,王君梅,等.大黄加芒硝对危重病患者胃肠功能障碍的疗效观察[J].天津中医药,2013,30(3):145-147.
- [20] HAFNER-BRATKOVIČ I, SUŠJAN P, LAINŠČEK D, et al. NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway [J]. Nature Communications, 2018, 9: 5182.
- [21] SHARMA D, KANNEGANTI T D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation [J]. The Journal of Cell Biology, 2016, 213(6): 617-629.
- [22] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): 3328.
- [23] SAGOO P, GARCIA Z, BREART B, et al. In vivo imaging of inflammasome activation reveals a subcapsular macrophage burst response that mobilizes innate and adaptive immunity [J]. Nature Medicine, 2016, 22(1): 64-71.
- [24] DINARELLO C A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [J]. Annual Review of Immunology, 2009, 27: 519-550.
- [25] BULEK K, ZHAO J J, LIAO Y, et al. Epithelial-derived gasdermin D mediates nonlytic IL-1 β release during experimental colitis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2020, 130(8): 4218-4234.
- [26] 任改艳,黄剑林.NLRP3 炎症小体与炎症性肠病的研究进展[J].中国免疫学杂志,2019,35(13):1662-1665.

(本文编辑 苏 维)