

枳实通降颗粒对术后肠梗阻大鼠胃肠动力和白细胞介素6、肿瘤坏死因子 α 的影响^Δ

李 倩^{1*}, 莫 黎², 何永恒^{3#} (1. 湖南中医药大学第二中医临床学院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学第二附属医院肛肠五科, 湖南 长沙 410005; 3. 湖南省中医药研究院附属医院肛肠科, 湖南 长沙 410006)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)09-1025-04

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.09.001

摘 要 目的: 观察枳实通降颗粒对术后肠梗阻大鼠胃肠动力和血清白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)表达的影响, 探讨枳实通降颗粒对术后胃肠功能的恢复作用及机制。方法: 选取SD大鼠30只, 雌雄各半, 随机分为空白组、模型组及实验组, 每组10只。模型组、实验组大鼠开腹, 建立术后肠梗阻模型; 术后24 h, 测量胃肠推进率、胃残留物质量, 并取靠近幽门部小肠2 cm行苏木精-伊红染色制图, 观察肠黏膜损伤情况。结果: 与空白组相比, 实验组、模型组大鼠胃肠推进率显著降低, 胃内容物质量和血清IL-6、TNF- α 含量显著升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 实验组大鼠胃肠推进率较模型组有明显升高, 胃内容物质量和血清IL-6、TNF- α 含量显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 病理图片结果显示, 模型组大鼠的小肠黏膜炎症细胞渗出及黏膜坏死较空白组更明显, 实验组大鼠的炎症细胞渗出情况较模型组缓解, 黏膜坏死少见。结论: 枳实通降颗粒能改善术后肠梗阻大鼠胃肠动力, 抑制血清IL-6、TNF- α 表达升高, 促进术后胃肠功能恢复。

关键词 枳实通降颗粒; 术后肠梗阻; 胃肠动力; 白细胞介素6; 肿瘤坏死因子 α

Effect of Zhishi Tongjiang Granule on Gastrointestinal Motility, Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α in Rats with Postoperative Intestinal Obstruction^Δ

LI Qian¹, MO LI², HE Yongheng³ (1. the Second Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Changsha 410007, China; 2. Dept. of Proctology, the Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Hunan Changsha 410005, China; 3. Dept. of Proctology, Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Hunan Changsha 410006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the effect of Zhishi Tongjiang granule on gastrointestinal motility, serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rats with postoperative intestinal obstruction, so as to explore the restorative effect and mechanism of Zhishi Tongjiang granule on postoperative gastrointestinal function. METHODS: Totally 30 SD rats were selected, with half male and half female, which were randomly divided into blank group, model group and experimental group, with 10 rats in each group. The rats in model group and experimental group were given laparoscopy to establish postoperative intestinal obstruction model; at 24 h after surgery, the gastrointestinal propulsion rate and gastric residue mass were measured, and 2 cm close to the small intestine pylorus was taken for Hematoxylin-Eosin staining to observe the intestinal mucosal damage. RESULTS: Compared with the blank group, the gastrointestinal propulsion rates in experimental group and model group decreased significantly, the gastric residue mass, serum IL-6 and TNF- α contents increased significantly, with statistically significant differences ($P < 0.01$); the gastrointestinal propulsion rate of experimental group was significantly higher than that of the model group, the gastric residue mass, serum IL-6 and TNF- α contents of experimental group were significantly lower than those of the model group, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Results of pathological images indicated that the inflammatory exudation and necrosis of small intestinal mucosa in the model group were more obvious than that of the blank group, the inflammatory exudation was alleviated and mucosal necrosis was less in the experimental group than compared with the model group. CONCLUSIONS: Zhishi Tongjiang granule can improve the gastrointestinal

Δ 基金项目: 2021 年度湖南省中医药科研计划项目 (No. 2021100)

* 硕士研究生。研究方向: 结直肠癌的中医药防治。E-mail: 3112126511@qq.com

通信作者: 主任医师, 教授。研究方向: 结直肠癌的中医药防治。E-mail: 1320459923@qq.com

dynamics of rats with postoperative intestinal obstruction, inhibit the elevation of serum IL-6 and TNF- α , and promote the recovery of postoperative gastrointestinal function.

KEYWORDS Zhishi Tongjiang granule; Postoperative intestinal obstruction; Gastrointestinal motility; Interleukin-6; Tumor necrosis factor- α

术后肠梗阻 (postoperative ileus, POI) 是指胃肠动力的异常模式, 不同于腹部手术后经常发生的机械性梗阻^[1]。目前, 国内外研究结果发现 POI 的发生与多种机制相关, 其中炎症机制在其发生发展过程中起到关键作用。该病的主要特征包括恶心、呕吐, 无法忍受口服饮食, 腹胀及术后首次排气延迟, 是常见的外科并发症^[1-2]。目前有多种针对性的干预措施用于 POI, 如电针^[3]、咀嚼口香糖^[4]和应用外周 μ 受体拮抗剂等, 但其中许多措施的应用证据仍存在争议^[5]。还有研究结果认为, 在早期阶段对腹部迷走神经进行电刺激, 可以促进 POI 小鼠胃肠动力恢复及减少肠道炎症^[6]。临床研究结果已证明, 枳实通降颗粒在促进结直肠癌术后患者胃肠功能恢复方面有良好的疗效, 且安全性好, 对术后早期炎性肠梗阻有一定的防治作用^[7]。故本研究以 SD 大鼠为研究对象, 观察枳实通降颗粒对 POI 大鼠胃肠动力和血清白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 含量的影响, 评估其对 POI 的治疗作用, 探讨其可能的作用机制, 为中药治疗 POI 提供实验依据, 以期为临床治疗 POI 提供安全有效的方法。

1 材料与方法

1.1 仪器

TD5A-WS 型台式低温离心机 (湖南湘仪公司)。

1.2 药品与试剂

枳实通降颗粒 (专利号: ZL 2017 1 0011006. 2) 的组方为枳实 10 g、台乌药 10 g、大腹皮 10 g、广木香 10 g、黄柏 10 g、泽泻 12 g、三七 6 g、川牛膝 12 g、西洋参 6 g 和甘草 6 g, 由湖南中医药大学第二附属医院中药房开出, 浓缩成 1.5 g/ml 的药液^[8]。大鼠 IL-6、TNF- α 酶联免疫检测试剂盒购自上海晶天生物 (生产批号分别为 E20200103010、E20200103012; TNF- α)。

1.3 动物及分组

SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 由湖南斯莱克星达实验动物有限公司提供, 许可证号: [SYXK (湘) 2016-0002]。购入后于湖南中医药大学实验动物中心动物房适应性喂养 5 d, 实验室温度为 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度为 50%~70%, 光照 12 h (8:00~20:00), 适应性喂养后采用随机数字表法进行分为三组, 即空白组、模型组及实验组。所有针对大鼠的实验操作遵守国际和湖南省实验动物使用和保护委员会颁布的条例, 并通过湖南中医药大学伦理审查 (批准编号: LL2019092005)。

表 1 三组大鼠术后 24 h 胃肠推进率、胃残留物质量、血清 IL-6 和 TNF- α 水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of gastrointestinal propulsion rate, gastric residual mass, serum IL-6 and TNF- α among three groups at 24 h after surgery ($\bar{x}\pm s$)

组别	胃残留物质量/g	胃肠推进率/%	血清 IL-6/(ng/L)	血清 TNF- α /(ng/L)
空白组 (n=10)	0.63 $\pm$ 0.151 $\Delta\Delta$	20.97 $\pm$ 3.30 $\Delta\Delta$	37.82 $\pm$ 5.17 $\Delta\Delta$	72.46 $\pm$ 14.59 $\Delta\Delta$
模型组 (n=10)	4.60 $\pm$ 0.61**	1.26 $\pm$ 0.46**	117.79 $\pm$ 9.65** $\Delta\Delta$	293.09 $\pm$ 13.63** $\Delta\Delta$
实验组 (n=10)	2.61 $\pm$ 0.73** $\Delta\Delta$	14.7 $\pm$ 4.30** $\Delta\Delta$	57.79 $\pm$ 4.95** $\Delta\Delta$	110.62 $\pm$ 4.6** $\Delta\Delta$

注: 与空白组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

Note: vs. the blank group, ** $P<0.01$ vs. the model group, $\Delta\Delta P<0.01$

1.4 模型制备

空白组大鼠不予手术处理。模型组、实验组大鼠取下腹部正中切口约 3 cm 开腹, 开腹后提出盲肠, 结扎并切除盲肠, 牵引出小肠后给予 0.9% 氯化钠溶液棉签自小肠近心端向远心端擦拭 1 次, 术后按顺序还纳肠管并分 2 层关腹; 各大鼠手术时间约为 25 min, 术前禁食 24 h, 术后禁食不禁饮。

1.5 给药方法

造模后 6 h, 实验组大鼠给予枳实通降颗粒药液 1 ml 灌胃, 模型组大鼠给予等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃。

1.6 观察指标

(1) 胃肠推进率及胃残留物: 造模后 23.5 h, 各组大鼠给予活性炭溶液 0.15 ml 灌胃, 30 min 后以 10% 水合氯醛 (0.25 ml/100 g) 麻醉大鼠, 夹闭胃贲门、幽门及回肠下端, 计算胃肠推进率 (小肠黑染长度/全长 $\times$ 100%), 并分离胃体测量胃残留物质量 (全胃重量-洗净后胃体重量)。(2) 血清 IL-6、TNF- α 检测: 造模后 24 h, 麻醉大鼠, 心尖采血, 静置 1 h 后, 离心 (4 000 r/min, 离心力为 3 040 $\times g$, 4 $^{\circ}$ C) 15 min, 取上清液, 行酶联免疫吸附试验, 检测血清 IL-6、TNF- α 含量。(3) 小肠病理切片: 测量小肠后, 于靠近幽门端取 2 cm 小肠肠管, 用 0.9% 氯化钠溶液洗净后以 4% 甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片后行苏木精-伊红染色。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多样本符合正态分布且满足方差齐性采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 检验, 若不满足则应用 Kruskal-Wallis H 检验; 均以 $\alpha=0.05$ 的标准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有极显著统计学意义。

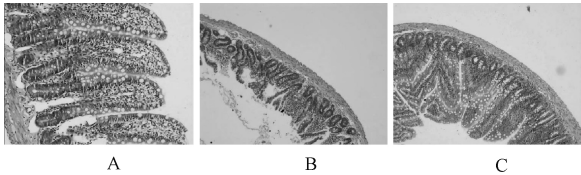
2 结果

2.1 三组大鼠术后 24 h 胃肠推进率、胃残留物质量、血清 IL-6 和 TNF- α 水平比较

术后 24 h, 与空白组相比, 模型组、实验组大鼠胃内残留物质量明显升高, 且模型组大鼠明显高于实验组; 模型组、实验组大鼠胃肠推进率较空白组明显降低, 且实验组大鼠明显高于模型组; 模型组、实验组大鼠血清 IL-6、TNF- α 表达较空白组均明显升高, 且实验组大鼠明显低于模型组, 上述差异均有极显著统计学意义 ($P<0.01$), 见表 1。结果表明造模成功, 且枳实通降颗粒可以抑制 POI 大鼠血清 IL-6、TNF- α 表达升高。

2.2 小肠黏膜病理切片

空白组大鼠小肠黏膜未见异常;术后 24 h,模型组大鼠见黏膜坏死及炎症细胞浸润,而实验组大鼠黏膜坏死程度较轻,见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 实验组

A. blank group; B. model group; C. experimental group

图 1 三组大鼠小肠苏木精-伊红染色图片(×200 倍)

Fig 1 HE staining images of small intestine of rats (×200 times)

3 讨论

POI 的发病机制是多因素的,是由于免疫、炎症、神经、电解质和受体介导的功能紊乱引起的运动障碍,多种因素交互影响^[1]。POI 大致有 2 个阶段:一个是以过度抑制反应为特征的短暂神经介导阶段;另一个是较长的炎症反应阶段^[5]。而炎症反应在 POI 的后续维持阶段起关键作用^[9],首先是手术操作激活常驻巨噬细胞^[10]及肥大细胞^[11],引起肌层的白细胞募集及各种细胞因子(如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)的释放,在肠道肌层形成炎症细胞浸润,损害肠道运动,并通过炎症级联反应及神经机制将损害扩展到整个胃肠道^[12];另外,肠道操作会使小肠抗菌能力受到干扰,并伴有细菌过度生长和易位^[13]。

IL-6 是一种具有广谱免疫调节活性的细胞因子,血中 IL-6 浓度过高可引起炎症反应或加重器官的炎症反应,造成器官损害。在腹部手术中,对小肠的手术操作会引发肌层内 IL-6 的下游诱导、翻译、释放和功能活动^[14]。TNF- α 具有广泛的生物学活性,是巨噬细胞被脂多糖和其他细菌产物活化后分泌的一种重要的炎症细胞因子,通过对多种类型靶细胞直接或间接的作用引发广泛的促进炎症反应的活性。在临床中发现,POI 患者的血清 IL-6、TNF- α 水平均有明显的升高^[15]。

中医学认为,术后胃肠功能障碍及术后炎性肠梗阻属虚实夹杂之证^[16]。手术耗血伤气,加之术后禁食,气血生化无源,致气血虚弱,故术后多有头晕乏力、多汗等气血虚证表现;术中经脉受损,瘀血内停,化湿生热,阻滞气血,腑气不通,故术后常有腹胀甚至胀痛、久不排气排便等实证表现,属本虚标实、虚实夹杂之证。枳实通降颗粒方中,枳实破气消积、化痰散痞,主治积滞内停、痞满胀痛、大便不通,为君药;木香、乌药和大腹皮为臣药,可行气止痛,宽中健脾增君药之力;西洋参补气养阴、清热生津,既补身之所需,亦防行气药之耗气伤阴,三七擅活血止血、散瘀止痛,川牛膝逐瘀通经、引血下行,黄柏清热燥湿,泽泻利水渗湿兼以泻热,上述 5 药共为佐药,以助君药通畅气机、清热祛湿,兼以活血化瘀、益气生津;甘草调和诸药,为使药。全方共奏行气运下、清热利湿、活血祛瘀、益气健脾之功效,达到通畅气机、去实邪、补本虚的目的,适用于 POI 的治疗及预防。从现代药理学的角度分析,枳实通降颗粒中含有多种有效成分,对于胃肠运动有促进作用,对术后患者的恢复有积极作用。

枳实中的黄酮提取物可通过抑制促炎细胞因子 IL-6、TNF- α 的表达而发挥抗炎作用^[17],橙皮苷有促进胃肠动力的作用;大腹皮对健康毕格犬的胃肠道运动有明显的促进作用^[18];木香茎叶^[19]、乌药^[20]的提取液均对正常小鼠的小肠推进功能有明显的促进作用。

本研究中,术后 24 h,与空白组相比,模型组、实验组大鼠的胃残留物质量明显增多,胃肠推进率显著降低,术后胃肠功能明显受损,与模型组相比,实验组大鼠的胃肠推进率较高,胃残留物较少,枳实通降颗粒能较好地改善 POI 大鼠的胃肠功能受损情况。术后 24 h,模型组、实验组大鼠血清 IL-6、TNF- α 表达较空白组明显升高,而实验组大鼠明显低于模型组,差异有极显著统计学意义($P<0.01$)。证明枳实通降颗粒能够显著抑制 POI 大鼠的血清促炎因子 IL-6、TNF- α 升高。枳实通降颗粒对 POI 胃肠功能的改善可能与降低血清 IL-6、TNF- α 的表达及改善肠壁炎症细胞渗出有关。

综上所述,枳实通降颗粒可于术后早期应用,以促进术后胃肠功能恢复,预防 POI 的发生。在今后的研究中,可细化给药方案以获得更好的临床疗效,并进一步探讨其作用机制。

参考文献

[1] Vather R, O'Grady G, Bissett IP, et al. Postoperative ileus: mechanisms and future directions for research [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014, 41(5): 358-370.

[2] Bragg D, El-Sharkawy AM, Psaltis E, et al. Postoperative ileus: Recent developments in pathophysiology and management [J]. Clin Nutr, 2015, 34(3): 367-376.

[3] Murakami H, Li S, Foreman R, et al. Ameliorating Effects of Electroacupuncture on Dysmotility, Inflammation, and Pain Mediated via the Autonomic Mechanism in a Rat Model of Postoperative Ileus [J]. J Neurogastroenterol Motil, 2019, 25(2): 286-299.

[4] Liu Q, Jiang H, Xu D, et al. Effect of gum chewing on ameliorating ileus following colorectal surgery: A meta-analysis of 18 randomized controlled trials [J]. Int J Surg, 2017, 47: 107-115.

[5] Chapman SJ, Pericleous A, Downey C, et al. Postoperative ileus following major colorectal surgery [J]. Br J Surg, 2018, 105(7): 797-810.

[6] Stakenborg N, Wolthuis AM, Gomez-Pinilla PJ, et al. Abdominal vagus nerve stimulation as a new therapeutic approach to prevent postoperative ileus [J]. Neurogastroenterol Motil, 2017, 29(9). doi: 10.1111/nmo.13075.

[7] 莫黎, 何永恒, 康安定, 等. 枳实通降颗粒对结直肠癌患者术后胃肠功能恢复及术后早期炎性肠梗阻防治作用的双中心前瞻性研究 [J]. 中医杂志, 2017, 58(20): 1760-1763.

[8] 徐叔云. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861.

[9] Peters EG, De Jonge WJ, Smeets BJ, et al. The contribution of mast cells to postoperative ileus in experimental and clinical studies [J]. Neurogastroenterol Motil, 2015, 27(6): 743-749.

[10] Kalff JC, Buchholz BM, Eskandari MK, et al. Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat [J]. Surgery, 1999, 126(3): 498-509.

(下转第 1031 页)