



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.008  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.008  
Chinese Journal of General Surgery, 2017, 26(3):317-324.

· 基础研究 ·

## 清胰 II 号对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫损伤的影响

周淼<sup>1</sup>, 代静静<sup>2</sup>, 兑丹华<sup>1</sup>, 敖宇<sup>1</sup>

(1. 遵义医学院附属医院 普通外科, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义市第一人民医院 重症监护室, 贵州 遵义 563000)

### 摘要

**目的:** 探讨清胰 II 号对重症急性胰腺炎 (SAP) 大鼠肠道免疫损伤的影响。

**方法:** 将 80 只 SD 大鼠随机分成假手术组、SAP 模型组 (SAP 组)、SAP 模型 + 清胰 II 号治疗组 (清胰 II 号组)、SAP 模型 + 阳性药物对照组 (谷氨酰胺组), 其中假手术组 8 只, 其余组各 24 只; 采用胰胆管逆行注射 5% 的牛磺胆酸钠建立 SAP 模型; 清胰 II 号组与谷氨酰胺组术后分别用清胰 II 号 (10 mL/kg, 1 次 /6 h) 和谷氨酰胺灌胃 (0.15 g/100 g, 1 次 /6 h) 灌胃, 另两组以相同的方式给予等体积的生理盐水; 除假手术组大鼠在术后 6 h 采集标本外, 其余各组均分别在术后 6、12、24 h 各取 8 只大鼠采集标本, 观察胰腺与回肠组织的病理变化; ELISA 法检测血清 IL-1、IL-10 浓度; RT-PCR 检测回肠组织 HMGB1 mRNA 的表达; 流式细胞仪检测回肠 Peyer 结中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群的凋亡。

**结果:** 除假手术组外, 其余各组胰腺与回肠组织均出现明显的病理学改变, 且逐渐加重, 但两个治疗组术后各时间点胰腺与回肠组织损伤程度均轻于 SAP 组。与对照组比较, 其余各组术后血清 IL-1、IL-10 水平、回肠 HMGB1 mRNA 表达量均明显逐渐升高 (均  $P < 0.05$ ), 但两个治疗组 IL-1、IL-10 的升高幅度均低于 SAP 组 (均  $P < 0.05$ ); 其余各组术后回肠组织 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞凋亡率均明显升高 (均  $P < 0.05$ ), 其中在 SAP 组呈逐渐升高趋势, 而在两个治疗组呈逐渐降低趋势, 且两个治疗组各时间点的各 T 细胞的凋亡率均小于 SAP 组 (均  $P < 0.05$ )。两个治疗组间同时点上述各指标的差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**结论:** 清胰 II 号可减轻 SAP 时肠道免疫功能的损伤, 其机制可能与下调回肠 HMGB1 表达, 减少 T 淋巴细胞的凋亡有关。

### 关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 肠黏膜; 炎症; 细胞凋亡; 方剂

中图分类号: R657.5

## Effect of Qingyi II formula on intestinal immune injury secondary to severe acute pancreatitis in rats

ZHOU Miao<sup>1</sup>, DAI Jingjing<sup>2</sup>, DUI Danhua<sup>1</sup>, AO Yu<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. ICU, the First People's Hospital of Zunyi, Zunyi, Guizhou 563000, China)

**基金项目:** 贵州省科学技术基金资助项目 (黔科合 J 字 2008-2200 号); 贵州省遵义市红花岗区科技局基金资助项目 (fcz120131222)。

**收稿日期:** 2017-01-06; **修订日期:** 2017-02-18。

**作者简介:** 周淼, 遵义医学院附属医院硕士研究生, 主要从事胰腺疾病基础与临床方面的研究。

**通信作者:** 兑丹华, Email: 2361169015@qq.com

**Abstract**

**Objective:** To investigate the effect of Qingyi II formula on intestinal immune injury secondary to severe acute pancreatitis in rats.

**Methods:** Fifty-six SD rats were randomly divided into sham operation group, SAP model group (SAP group), SAP model plus Qingyi II formula treatment group (Qingyi II group), and SAP model plus positive drug control group (glutamine group), with 8 rats in sham operation group and 24 rats each in the other groups. SAP model was induced by retrograde injected 5% sodium taurocholate into the bile-pancreatic duct. After operation, rats in Qingyi II group and glutamine group were subjected to gavage administration of Qingyi II formula (10 mL/kg, once per 6 h) and glutamine (0.15 g/100 g, once per 6 h) respectively, while those in the other two groups were given the same volume of normal saline instead in the same fashion. The specimen samples, except in sham operation group that were harvested at 6 h after operation, were harvested at 6, 12 and 24 h after operation in all of the other groups, with 8 rats in each time point. Then, the pathological changes in pancreatic and ileal tissues were observed, the serum concentrations of IL-1 and IL-10 were determined by ELISA assay, the HMGB1 mRNA expressions in the ileal tissues were detected by RT-PCR, and the apoptosis of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T cell subsets in the Peyer's patches of the ileum were measured by flow cytometry.

**Results:** Except in sham operation group, obvious and gradually aggravated pathological changes were seen in the pancreatic and ileal tissues in all of the other groups, which were all milder in both treatment groups than those in SAP group at each postoperative time point. Compared with sham operation group, the serum concentrations of IL-1 and IL-10, and HMGB1 mRNA expressions in the ileal tissues were all significantly and increasingly elevated in the remaining groups (all  $P < 0.05$ ), but the increasing amplitudes of IL-1 and IL-10 in both treatment groups were milder than those in SAP group at each postoperative time point (all  $P < 0.05$ ); the apoptosis rates of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in the ileal tissues were all significantly increased in the remaining groups (all  $P < 0.05$ ), which showed an ascending trend in SAP group while a descending trend in either treatment group, and further, the apoptosis rates of these T lymphocytes in either treatment group were significantly lower than those in SAP group at each time point (all  $P < 0.05$ ). The difference in all above parameters showed no statistical significance between the two treatment group at the same time points (all  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Qingyi II formula can lessen the intestinal immune injury secondary to SAP in rats, and the mechanism may be associated with its down-regulating of HMGB1 expression in the ileum and thereby decreasing the apoptosis of T lymphocytes.

**Key words**

Pancreatitis, Acute Necrotizing; Intestinal Mucosa; Inflammation; Apoptosis; CHINESE MEDICAL FORMULA  
**CLC number:** R657.5

急性胰腺炎是临床上常见的急腹症，具有较高的发病率和病死率。20%~30%患者病情较凶险，总体病死率为5%~10%<sup>[1]</sup>。SAP发生后炎症因子大量释放，随后机体会代偿产生大量抑炎因子，使机体处于免疫麻痹状态<sup>[2]</sup>，此时肠道免疫功能受到抑制，肠道内细菌、内毒素向肠外组织迁移，导致继发感染，甚至导致多器官功能衰竭。清胰II号制剂是治疗急性胰腺炎的有效中药复方制剂，前期的实验研究<sup>[3-4]</sup>表明，清胰II号制剂能有效改善重症急性胰腺炎(SAP)大鼠胰腺及胰外脏器损伤，抑制肠道细菌移位。本实验的宗旨建立大鼠SAP模型，观察不同处理组回肠组织的病理改

变，检测血清IL-1、IL-10的浓度及回肠高迁移率族蛋白1(HMGB1)mRNA表达，CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群的凋亡情况，并与谷氨酰胺进行比较，探讨中药清胰II号对SAP大鼠肠道免疫的保护作用及可能的机制。为其开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

清胰II号制剂由课题组提供，牛磺胆酸钠购买于美国Sigma公司，10%水合氯醛由遵义医学院

提供,健康SD大鼠购自重庆第三军医大学[证书编号为SCXK(渝)2012-0005],引物设计与合成购自上海生工生物工程技术有限公司,荧光定量PCR试剂盒(提取RNA,逆转录,扩增)均购买于宝生物工程(大连)有限公司,流式细胞仪(美国BECKMAN COULTER),CD3<sup>+</sup>,CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>抗体均购买于Biolegend。

## 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及模型建立** 选取SD大鼠80只,体质量200~250 g,鼠龄8~10周,雌雄不限,将80只大鼠随机分为假手术组( $n=8$ ),SAP模型组(SAP组, $n=24$ ),SAP模型+清胰II号干预组(清胰II号组, $n=24$ ),SAP模型+阳性药物谷氨酰胺干预组(谷氨酰胺组, $n=24$ )。术前禁食12 h,不禁水,10%水合氯醛(0.33 mL/100 g)麻醉动物,假手术组大鼠开腹后仅翻动肠管,其余组大鼠采用胆胰管逆行注射5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g)制SAP模型;清胰II号组大鼠于SAP制模苏醒后予清胰II号灌胃(1 mL/100 g,1次/6 h),谷氨酰胺组大鼠于SAP制模苏醒后予谷氨酰胺灌胃(0.15 g/100 g,1次/6 h),另两组以同样的方式给予生理盐水。

**1.2.2 标本采集和保存** 假手术组仅在术后6 h采集标本,其余组分别于术后6、12、24 h采集标本。大鼠麻醉后经原切口入腹,用促凝管由下腔静脉取血3~5 mL,室温搁置片刻后,3 000 r/min离心15 min,EP管收集上层血清,-80 °C冰箱保存,备血清IL-1、IL-10的检测,取部分回肠生理盐水冲洗干净,匀浆法提取RNA,逆转录成cDNA后-80 °C冰箱保存,备HMGB1基因的检查;取部分胰腺组织,10%中性福尔马林溶液中固定,4 μm连续切片供HE染色。取末端回肠组织固定于10%中性甲醛缓冲液中,石蜡包埋,4 μm连续切片,HE染色,由专业病理医师观察切片,收集回肠Peyer结制备成单细胞悬液行流式细胞术检测。

**1.2.3 胰腺组织病理学评分** 在光镜下比较各组胰腺病理学改变,按照镜下病理学评分标准,由病理科医生进行双盲评分。

**1.2.4 RT-PCR检测回肠组织中的6、12、24 h的HMGB1 mRNA的表达** 参照TaKaRa公司RNAiso Reagent试剂盒说明提取组织中总RNA,

并逆转录为cDNA,荧光定量PCR反应条件:95 °C 30 s,95 °C 5 s,57 °C 30 s,40个循环,末循环:55 °C 10 min。HMGB1上游引物:5'-TGA GAA GCT GGC TGT AAT GC-3',下游引物:5'-AAA TGG CTT GGA CAA CTG GTA-3',扩增长度为222 bp;β-actin上游引物:5'-TGT CAC CAA CTG GGA CGA TA-3',下游引物:5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3',扩增长度为165 bp。

**1.2.5 回肠组织的病理学检测** 取一段回肠,暴露黏膜面,用预冷生理盐水彻底冲洗,切取5 mm×3 mm×3 mm大小回肠组织,固定于4%戊二醛固定溶液,标本用逐级增高浓度的酒精(30%→50%→70%→80%→90%→100%)脱水2次,吸出乙醇,加入醋酸异戊酯与乙醇1:1混合液,进行干燥及样品导电处理,最后行电镜扫描。

**1.2.6 T淋巴细胞亚群的凋亡检测** 收集回肠Peyer结制备成单细胞悬液,立即按CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>流式抗体试剂盒说明(CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>分别由PE、PE-Cy7、APC标记)及凋亡检测试剂盒说明(Annexin V-FITC/PI)行流式细胞术检测。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计学软件。本实验数据定量资料结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较用 $q$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胰腺组织病理学检测结果

假手术组大鼠胰腺组织无充血、水肿及坏死(图1A);SAP组胰腺腺泡肿胀、间质水肿,大片出血及坏死灶,大量炎性细胞浸(图1B);清胰II号组(图1C)及谷氨酰胺组(图1D)大鼠胰腺组织周围间质均明显水肿,毛细血管扩张充血,间质及毛细血管周围中等量炎性细胞浸润,腺泡细胞坏死较SAP模型组轻。各组术后胰腺病理学评分均明显且逐渐升高(均 $P<0.05$ ),但两个治疗组评分在相同时间点上均明显低于SAP组(均 $P<0.05$ ),且两组在相同时间点差异均无统计学意义(均 $P>0.05$ )(表1)。

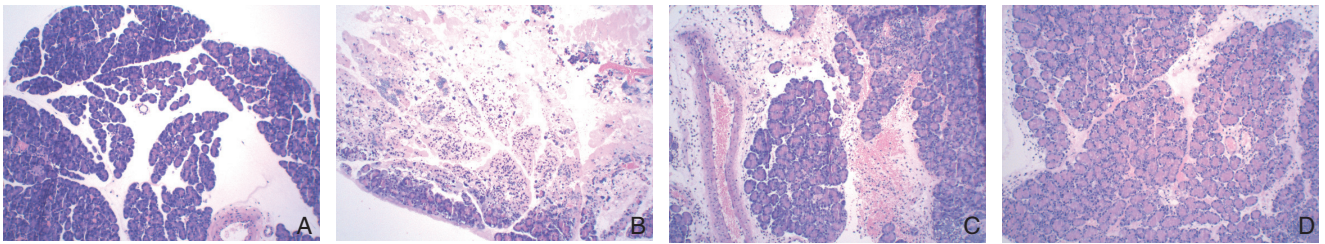


图 1 各组术后 6 h 胰腺组织病理学检测 (HE × 100) A: 假手术组; B: SAP 组; C: 清胰 II 号组; D: 谷氨酰胺组  
 Figure 1 Pathological examination of the pancreatic tissues in each group at postoperative 6 h (HE×100) A: Sham operation group; B: SAP group; C: Qingyi II group; D: Glutamine group

表 1 大鼠胰腺病理学评分比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of pathological scores for pancreatic damage among groups of rats (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	6 h	12 h	24 h
假手术组	0	—	—
SAP 组	7.00 ± 0.82 <sup>1)</sup>	11.00 ± 0.82 <sup>1)</sup>	13.5 ± 0.50 <sup>1)</sup>
清胰 II 号组	4.75 ± 0.96 <sup>1),2)</sup>	8.00 ± 0.82 <sup>1),2)</sup>	10.00 ± 0.82 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	4.00 ± 0.82 <sup>1),2)</sup>	8.00 ± 0.82 <sup>1),2)</sup>	10.00 ± 0.82 <sup>1),2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较, P<0.05; 2) 与 SAP 组同时间点比较, P<0.05

Note: 1) P<0.05 vs. sham operation group; 2) P<0.05 vs. SAP group

2.2 回肠组织病理学检测结果

2.2.1 光镜观察 光镜下假手术组回肠组织无水肿、出血及坏死, 腺体结构完整; SAP 组镜下见回肠组织结构紊乱、间质水肿、出血, 大量中性粒细胞浸润, 局部灶性坏死; 两个治疗组镜下见肠黏膜组织水肿、充血, 少量中性粒细胞浸润, 程度较 SAP 组轻 (图 2)。

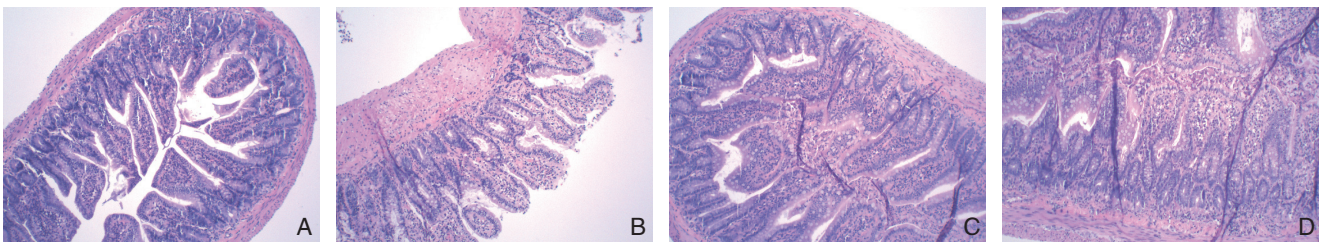


图 2 各组术后 6 h 回肠组织病理学检测 (HE × 100) A: 假手术组; B: SAP 组; C: 清胰 II 号组; D: 谷氨酰胺组  
 Figure 2 Pathological examination of the ileal tissues in each group at postoperative 6 h (HE×100) A: Sham operation group; B: SAP group; C: Qingyi II group; D: Glutamine group

2.2.2 电镜观察结果 电镜下见假手术组肠黏膜表面微绒毛清晰, 数目多, 直立、凸起, 排列整齐; SAP 组镜微绒毛坏死、脱落、融合; 两个治疗组

回肠黏膜表面微绒毛萎缩变短, 绒面间隙增宽, 排列欠整齐 (图 3)。

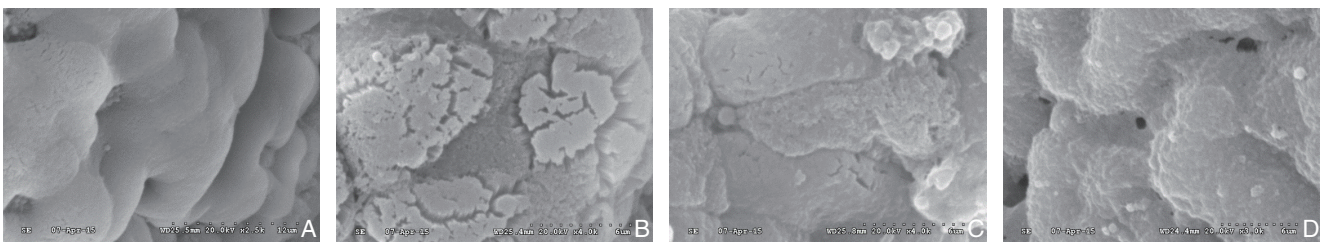


图 3 各组术后 6 h 回肠组织电镜观察 (× 10 000) A: 假手术组; B: SAP 组; C: 清胰 II 号组; D: 谷氨酰胺组  
 Figure 3 Electron microscopic observation of the ileal tissues in each group at postoperative 6 h (×10 000) A: Sham operation group; B: SAP group; C: Qingyi II group; D: Glutamine group

2.3 血清 IL-1、IL-10 的浓度检测结果

与对照组比较, 其余各组术后血清 IL-1、IL-10 水平均明显并逐渐升高 (均 P<0.05), 但两

个治疗组各时间点的 IL-1、IL-10 的升高程度均小于 SAP 组 (均 P<0.05), 且两组间同时间点各指标差异均无统计学意义 (均 P>0.05) (表 2)。

表2 各组大鼠各时间点血清IL-1和IL-10的浓度水平 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Figure 2 Serum levels of IL-1 and IL-10 in each group of rats at different postoperative time points (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1			IL-10		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	14.4970 ± 0.5019	—	—	7.3430 ± 0.4404	—	—
SAP组	21.3680 ± 0.6349 <sup>1)</sup>	32.3780 ± 2.2842 <sup>1)</sup>	44.9585 ± 1.2963 <sup>1)</sup>	13.3606 ± 0.5226 <sup>1)</sup>	14.9835 ± 0.8790 <sup>1)</sup>	19.0393 ± 1.1992 <sup>1)</sup>
清胰II号组	18.0830 ± 0.7314 <sup>1),2)</sup>	24.7675 ± 2.2048 <sup>1),2)</sup>	32.7723 ± 2.1981 <sup>1),2)</sup>	30.9153 ± 1.3300 <sup>1),2)</sup>	18.8363 ± 1.2544 <sup>1),2)</sup>	24.8222 ± 2.2165 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	17.2856 ± 1.7138 <sup>1),2)</sup>	23.3280 ± 3.4042 <sup>1),2)</sup>	30.9153 ± 1.3300 <sup>1),2)</sup>	15.6348 ± 0.6573 <sup>1),2)</sup>	18.6348 ± 1.8060 <sup>1),2)</sup>	24.8278 ± 0.9512 <sup>1),2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较, P<0.05; 2) 与SAP组同时间点比较, P<0.05  
 Note: 1) P<0.05 vs. sham operation group; 2) P<0.05 vs. SAP group

2.4 回肠HMGB1表达检测结果

与对照组比较, 其余各组术后回肠组织HMGB1 mRNA相对表达量均明显并逐渐升高 (均P<0.05), 但两个治疗组各时间点的回肠组织

HMGB1 mRNA相对表达量的升高程度均小于SAP组 (均P<0.05), 且两组间同时间点HMGB1 mRNA表达差异均无统计学意义 (均P>0.05) (表3)。

表3 各组各时间点大鼠回肠HMGB1 mRNA相对表达量 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Relative expression levels of HMGB1 mRNA on the ileal tissues of each group of rats at different postoperative time points (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	6 h	12 h	24 h
假手术组	1.0396 ± 0.5626	—	—
SAP组	4.1703 ± 1.3166 <sup>1)</sup>	35.8489 ± 3.0048 <sup>1)</sup>	63.7041 ± 2.4597 <sup>1)</sup>
清胰II号组	1.3816 ± 0.5707 <sup>1),2)</sup>	4.5859 ± 1.5387 <sup>1),2)</sup>	21.3879 ± 6.0820 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	1.6025 ± 0.1504 <sup>1),2)</sup>	2.2252 ± 0.1405 <sup>1),2)</sup>	2.5953 ± 0.1493 <sup>1),2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较, P<0.05; 2) 与SAP组同时间点比较, P<0.05  
 Note: 1) P<0.05 vs. sham operation group; 2) P<0.05 vs. SAP group

2.5 各组大鼠淋巴细胞凋亡率

与对照组比较, 其余各组术后回肠组织CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞凋亡率均明显升高 (均P<0.05), 其中SAP组CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞凋亡率随时间呈逐渐升高趋势, 但两个治

疗组以上淋巴细胞的凋亡率随时间呈逐渐降低趋势, 且各时间点均小于SAP组 (均P<0.05), 此外, 两治疗组间同时间点各T细胞亚群的凋亡率差异均无统计学意义 (均P>0.05) (表4)。

表4 各组大鼠各时间点淋巴细胞凋亡率 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Apoptosis rates of T lymphocytes in each group of rats at different time points (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

项目	6 h	12 h	24 h
CD3 <sup>+</sup>			
假手术组	1.1400 ± 0.2966	—	—
SAP组	10.1000 ± 0.5431 <sup>1)</sup>	16.9400 ± 2.4600 <sup>1)</sup>	26.6000 ± 0.9407 <sup>1)</sup>
清胰II号组	9.2200 ± 0.2772 <sup>1),2)</sup>	6.7000 ± 0.7036 <sup>1),2)</sup>	3.2000 ± 0.1000 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	9.1000 ± 0.2449 <sup>1),2)</sup>	5.3400 ± 0.7403 <sup>1),2)</sup>	3.5200 ± 0.8701 <sup>1),2)</sup>
CD4 <sup>+</sup>			
假手术组	1.1200 ± 0.2280	—	—
SAP组	9.8200 ± 0.2280 <sup>1)</sup>	14.2000 ± 2.8443 <sup>1)</sup>	25.0200 ± 1.4255 <sup>1)</sup>
清胰II号组	8.9400 ± 0.3647 <sup>1),2)</sup>	6.9400 ± 1.0407 <sup>1),2)</sup>	2.7600 ± 0.3362 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	9.0400 ± 0.4393 <sup>1),2)</sup>	7.4200 ± 0.1924 <sup>1),2)</sup>	2.9200 ± 0.1643 <sup>1),2)</sup>
CD8 <sup>+</sup>			
假手术组	1.1600 ± 0.1342	—	—
SAP组	10.3400 ± 0.6580 <sup>1)</sup>	14.9800 ± 3.1499 <sup>1)</sup>	27.1000 ± 1.5758 <sup>1)</sup>
清胰II号组	7.5600 ± 0.4561 <sup>1),2)</sup>	7.6000 ± 0.2449 <sup>1),2)</sup>	3.9800 ± 0.1483 <sup>1),2)</sup>
谷氨酰胺组	7.6800 ± 0.3701 <sup>1),2)</sup>	7.4400 ± 0.2074 <sup>1),2)</sup>	3.9600 ± 0.3647 <sup>1),2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较, P<0.05; 2) 与SAP组同时间点比较, P<0.05  
 Note: 1) P<0.05 vs. sham operation group; 2) P<0.05 vs. SAP group

### 3 讨论

肠黏膜屏障一般由机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障构成。多种细胞因子和炎症介质的释放是造成肠黏膜屏障损伤、肠道通透性增加和肠源性感染的原因<sup>[5-8]</sup>。其中,肠道免疫屏障可以很好的避免肠道内菌群发挥不当的免疫反应,让促炎和抗炎处于平衡之中<sup>[9]</sup>。SAP时,大量炎症介质和细胞因子释放,使肠道出现微循环障碍,大量免疫细胞凋亡,导致肠道局部或全身免疫力下降,从而导致肠道发生免疫功能损伤,最终可导致肠道功能衰竭<sup>[10]</sup>。可见,发生SAP时,加强对肠道黏膜免疫屏障的保护,对肠黏膜屏障乃至对全身免疫功能都有积极作用。

HMGB1作为一种晚期炎症因子<sup>[11-12]</sup>,几乎存在于所有的细胞中。Wolfson等<sup>[13-14]</sup>研究发现:用HMGB1处理肠上皮细胞和内皮细胞后,可引起单层细胞屏障功能丧失。Luan等<sup>[15]</sup>的研究表明,AP大鼠肠黏膜中HMGB1含量明显升高。Yang等<sup>[16]</sup>的研究显示含HMGB1的胆汁可破坏肠黏膜屏障。上述研究均证实HMGB1介导了SAP时IBFD的发病过程,但其发病机制尚不十分明确。SAP时存在T淋巴细胞亚群变化<sup>[17]</sup>。乔世峰等<sup>[18]</sup>研究了SAP大鼠肠道免疫功能的变化,发现SAP发生后各期CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>明显下降,说明大鼠早期即发现肠黏膜免疫功能明显下降。王兴鹏等<sup>[19-20]</sup>的研究发现ANP大鼠回肠Peyer集合淋巴结中存在大量凋亡淋巴细胞,亦证明了SAP大鼠存在肠道免疫屏障受损。

HMGB1是众所周知的危险相关分子模式或警报素,能够激活先天性免疫反应。HMGB1可激活树突状细胞并诱导树突状细胞成熟,成熟树突状细胞通过淋巴管迁移到淋巴结,将其在外周组织获得的外源性抗原提呈给未致敏T细胞,从而启动免疫反应。董宁等<sup>[21]</sup>研究显示,大面积烧伤患者伤后HMGB1含量与T淋巴细胞免疫功能障碍相关。另有研究<sup>[22]</sup>发现HMGB1能显著诱导调节性T细胞表达TLR4下调,进而参与调节调节性T细胞的免疫活性。以上研究表明HMGB1不仅对T淋巴细胞免疫功能具有直接调节作用,还可通过影响细胞免疫中其它重要细胞的功能继而间接地调节T细胞免疫功能。近年来,从细胞免疫角度探讨

HMGB1与IBFD的关系引起了广泛关注。

HMGB1不仅是种晚期炎症因子,同时也是一种免疫调节因子。前期实验<sup>[23]</sup>已经证实在SAP时,大鼠血HMGB1随时间推移,不断升高。本实验显示, HMGB1介导并参与了SAP及IBFD病程的发展,随病程的进展,回肠HMGB1 mRNA表达量越来越高,同时,血清IL-1、IL-10浓度及CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的凋亡越来越高。HMGB1可能通过对CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞亚群的调节,从细胞免疫途径介导并参与SAP时肠免疫功能障碍的发生。

清胰II号制剂是治疗急性胰腺炎的有效中药复方制剂,前期的实验研究<sup>[24]</sup>表明,清胰II号制剂能有效改善SAP大鼠胰外脏器官损伤,对肠屏障功能具有良好的保护作用。在肖青川等<sup>[25]</sup>的研究中发现, SAP大鼠予清胰II号治疗后,其回肠HMGB1 mRNA表达量下调,移位细菌数量减少,回肠病理改变减轻,说明清胰II号可能通过下调回肠HMGB1 mRNA表达,从而改善肠道功能。

本研究显示, SAP模型组胰腺病理评分与假手术组相比均明显升高,模型复制成功;随着病程时间的延长,胰腺病理损伤越来越重,予以清胰II号及谷氨酰胺干预治疗后,各组各对应时间点胰腺病理评分均较SAP组降低,说明治疗有效,且两组治疗效果无明显差异。IL-1、IL-10浓度显示, SAP组各时间点较假手术组升高,两个治疗组较SAP组各时间点下降,但两个治疗组各对应时间点无统计学差异,说明清胰II号和谷氨酰胺均可以有效降低炎症介质。清胰II号及谷氨酰胺灌胃后,各时间点回肠HMGB1 mRNA表达量均较模型组下降,各时间点CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>的凋亡率较模型组下降,回肠病理损伤较模型组减轻。随着用药时间的延长,各时间点各T细胞的凋亡率呈下降趋势,表明两种药物均能时间抑制肠道淋巴细胞的凋亡。

综上所述,重症急性胰腺炎时,大量炎症因子释放,肠道屏障功能受损,在SAP并IBFD的过程中, HMGB1作为晚期炎症因子及免疫刺激因子参与其中, HMGB1可能通过对肠道T淋巴细胞的调节,从细胞免疫途径介导肠黏膜免疫屏障功能障碍,促进SAP的病情进展。清胰II号制剂对SAP大鼠肠黏膜免疫屏障功能具有保护作用,其机制

可能是通过降低机体HMGB1的表达,使CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的凋亡减少,从而改善SAP时肠道免疫功能。

#### 参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组,《中华胰腺病杂志》编辑委员会,《中华消化杂志》编辑委员会,等.中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海)[J].中华胰腺病杂志,2013,13(2):73-78. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2013.02.001.  
Pancreatic Disease Group of Digestive Disease Branch of Chinese Medical Association, Editorial Committee of Chinese Journal of Pancreatology, Editorial Committee of Chinese Journal of Digestion, et al. Chinese guidelines for the management of acute pancreatitis (Shanghai, 2013)[J]. Chinese Journal of Pancreatology, 2013, 13(2):73-78. doi:10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2013.02.001.
- [2] Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, et al. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis[J]. J Gastrointest Surg, 2003, 7(1):26-35.
- [3] 蔡治方,兑丹华,陈正修,等.清胰II号颗粒剂对大鼠重症急性胰腺炎合并肾损伤时的保护作用[J].山东医药,2012,52(28):10-12. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2012.28.004.  
Cai ZF, Dui DH, Chen ZX, et al. Changes of acute renal injury in SAP rats and the protective function of QingYi II[J]. Shandong Medical Journal, 2012, 52(28):10-12. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2012.28.004.
- [4] 兑丹华,彭慈军,赵鹏,等.清胰II号对香猪重症急性胰腺炎肺损伤的保护作用[J].消化外科,2004,3(6):419-422. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2004.06.011.  
Dui DH, Peng CJ, Zhao P, et al. Protective effects of the Qingyi II on pancreas and pulmonary following SAP in pigs[J]. Journal of Digestive Surgery, 2004, 3(6):419-422. doi:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2004.06.011.
- [5] Capurso G, Zerboni G, Signoretti M, et al. Role of the gut barrier in acute pancreatitis [J]. J Clin Gastroenterol, 2012, 46(Suppl):S46-51. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182652096.
- [6] 葛鹏磊,贾乾斌,李宁,等. GLP-2对胆总管结扎大鼠肠道细菌移位及内毒素血症的影响[J].中国普通外科杂志,2012,21(2):173-177.  
Ge PL, Jia QB, Li N, et al. Effect of glucagon-like peptide 2 (GLP-2) on bacterial translocation and endotoxemia in rats with common bile duct ligation[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2012, 21(2):173-177.
- [7] Jamdar S, Siriwardena AK. Contemporary management of infected necrosis complicating severe acute pancreatitis[J]. Crit Care, 2006, 10(1):101.
- [8] Pitchumoni CS, Patel NM, Shah P. Factors influencing mortality in acute pancreatitis: can we alter them?[J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(9):798-814.
- [9] Chen VL, Kasper DL. Interactions between the intestinal microbiota and innate lymphoid cells[J]. Gut Microbes, 2014, 5(1):129-140. doi: 10.4161/gmic.27289.
- [10] Barreau F, Hugot JP. Intestinal barrier dysfunction triggered by invasive bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 17:91-98. doi: 10.1016/j.mib.2013.12.003.
- [11] Shen X, Li WQ. High-mobility group box 1 protein and its role in severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(5):1424-1235. doi: 10.3748/wjg.v21.i5.1424.
- [12] 尹朝奇,贺全勇,罗成群,等. HSF-1在HMGB1诱导的炎症反应中的作用[J].中国普通外科杂志,2016,25(9):1291-1295. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011.  
Yin CQ, He QY, Luo CQ, et al. Role of HSF-1 in inflammatory response induced by HMGB1[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(9):1291-1295. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.09.011.
- [13] Wolfson RK, Chiang ET, Garcia JG. HMGB1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption[J]. Microvasc Res, 2011, 81(2):189-197. doi: 10.1016/j.mvr.2010.11.010.
- [14] Dai S, Sodhi C, Cetin S, et al. Extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) inhibits enterocyte migration via activation of Toll-like receptor-4 and increased cell-matrix adhesiveness[J]. J Biol Chem, 2010, 285(7):4995-5002. doi: 10.1074/jbc.M109.067454.
- [15] Luan ZG, Zhang H, Ma XC, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in the pathogenesis of intestinal barrier injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2009, 39(2):216-223. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181bab5c5.
- [16] Yang R, Miki K, Oksala N, et al. Bile high-mobility group box 1 contributes to gut barrier dysfunction in experimental endotoxemia[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(2):R362-369. doi: 10.1152/ajpregu.00184.2009.
- [17] Luan ZG, Ma XC, Zhang H, et al. Protective effect of ethyl pyruvate on pancreas injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. J Surg Res, 2013, 181(1):76-84. doi: 10.1016/j.jss.2012.05.066.
- [18] 乔世峰,孙家邦,李非,等.重症胰腺炎大鼠肠道免疫功能改变及精氨酸的调节作用[J].中国免疫学杂志,2006,22(8):761-763.  
Qiao SF, Sun JB, Li F, et al. Alterations of intestinal immune function and regulatory effects of L-arginine in rats with experimental severe acute pancreatitis[J]. Chinese Journal of Immunology, 2006, 22(8):761-763.

- [19] 王兴鹏, 王冰娟, 吴恺, 等. 细胞凋亡在急性坏死型胰腺炎早期肠黏膜上皮细胞死亡中的作用[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(5):267-270. doi:10.3760/j.issn.0254-1432.2001.05.003.
- Wang XP, Wang BX, Wu K, et al. Role of apoptosis in the cell death of rat intestinal epithelium during the early stage of acute necrotizing pancreatitis[J]. Chinese Journal of Digestion, 2001, 21(5):267-270. doi:10.3760/j.issn.0254-1432.2001.05.003.
- [20] Ammori BJ, Cairns A, Dixon MF, et al. Altered intestinal morphology and immunity in patients with acute necrotizing pancreatitis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002, 9(4):490-496.
- [21] 董宁, 金伯泉, 姚咏明, 等. 严重烧伤后细胞免疫改变及其与高迁移率族蛋白B1的相关性[J]. 中华外科杂志, 2008, 46(10):759-762. doi:10.3321/j.issn:0529-5815.2008.10.011.
- Dong N, Jin BQ, Yao YM, et al. Change in T cell-mediated immunity and its relationship with high mobility group box-1 protein levels in extensively burned patients[J]. Chinese Journal of Surgery, 2008, 46(10):759-762. doi:10.3321/j.issn:0529-5815.2008.10.011.
- [22] Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells[J]. EMBO Rep, 2004, 5(8):825-830.
- [23] 赵建锋, 兑丹华, 代静静, 等. 清胰II号对重症急性胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用及机制探讨[J]. 山东医药, 2016, 56(10):25-26. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2016.10.009.
- Zhao JF, Dui DH, Dai JJ, et al. Protective effect and mechanism of Qingyi II against pancreatic damage caused by acute pancreatitis in rats[J]. Shandong Medical Journal, 2016, 56(10):25-26. doi:10.3969/j.issn.1002-266X.2016.10.009.
- [24] 蔡治方, 兑丹华, 王俊, 等. 清胰II号方对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4):490-493.
- Cai ZF, Dui DH, Wang J, et al. Effects of Qingyi II Recipe on the Intestinal Barrier Function of Severe Acute Pancreatitis Rats[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2012, 32(4):490-493.
- [25] 肖青川, 兑丹华, 兰天罡, 等. 清胰II号颗粒剂对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌移位的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(10):905-909. doi:10.3321/j.issn:1003-5370.2009.10.011.
- Xiao QC, Dui DH, Lan TG, et al. Effects of Qingyi II Granules on Intestinal Bacterial Translocation In Rats with Acute Necrotizing Pancre-atitis[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western medicine, 2009, 29(10):905-909. doi:10.3321/j.issn:1003-5370.2009.10.011.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 周森, 代静静, 兑丹华, 等. 清胰II号对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫损伤的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(3):317-324. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.008

Cite this article as: Zhou M, Dai JJ, Dui DH, et al. Effect of Qingyi II formula on intestinal immune injury secondary to severe acute pancreatitis in rats[J]. Chin J Gen Surg, 2017, 26(3):317-324. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2017.03.008