

实验研究

蜈蚣三七纳米粉预防大鼠术后肠粘连的机制研究

黄欣¹ 李一鸣² 徐福琴¹ 何明钊¹ 邴飞虹²

(1 深圳市龙岗区人民医院普外科,深圳,518172; 2 湖北中医药大学药学院中药资源与中药复方重点实验室,武汉,430065)

摘要 目的:探讨蜈蚣三七纳米粉预防大鼠术后肠粘连的作用机制。方法:Ellis 法建立大鼠术后肠粘连模型,随机分为假手术组、模型组、阳性组(肌肉注射地塞米松 10 mg/kg)、蜈蚣三七高、中、低剂量组(分别灌胃 450、225、112 mg/kg)。术前 3 d 开始给药,术后继续给药 1 周。末次给药后,取血清,ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达,并进行粘连程度肉眼分级。结果:与模型组比较,蜈蚣三七纳米粉各剂量均能明显改善肠粘连程度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),均可明显降低血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:蜈蚣三七纳米粉可抑制炎症反应因子的过度表达,减轻炎症反应,有效预防术后肠粘连的发生。

关键词 蜈蚣三七;肠粘连;TNF- α ;IL-1 β ;IL-6

Study on Mechanism of Nano-powder of Wugongsanqi in Preventing Postoperative Intestinal Adhesion in Rats

Huang Xin¹, Li Yiming², Xu Fuqin¹, He Mingchao¹, Bing Feihong²

(1 Longgang People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518172, China; 2 Key Laboratory of TCM Resource and Compound Prescription, College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

Abstract Objective: To investigate the anti-inflammatory mechanism of nano-powder of Wugongsanqi (NW), the rhizome of *Anemone flaccida*, on postoperative intestinal adhesion in rats. **Methods:** Fifty SD rats were subjected to operation with Ellis' method for establishing intestinal adhesion models, then randomly divided into 5 groups ($n = 10$), namely model, positive (Dexamethasone, i. m. 10 mg/kg), NW high, medium and low dose group (p. o. 450, 225 and 112 mg/kg, respectively). Another ten normal rats were selected as control group. Drugs were given 3 days before the operation until 7 days after the operation. The intestinal adhesion was graded and the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum were evaluated by ELISA. **Results:** NW evidently reduced the severity of postoperative adhesion ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and significantly inhibited the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), compared with those of the model group. **Conclusion:** NW could effectively prevent the formation of postoperative intestinal adhesion by inhibiting the expression of inflammatory cytokines and improving the inflammatory response.

Key Words *Anemone flaccida*; Intestinal adhesion; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.023

肠粘连是腹部及盆腔手术的主要并发症之一,发生率可高达 80%~90%^[1],粘连过度会导致严重的肠梗阻,而临床上迄今未有理想的预防术后肠粘连的方法。蜈蚣三七(又名:地乌)系毛茛科银莲花属植物林荫银莲花(*Anemone flaccida* Fr. Schmidt)的药用根茎,其性温,味辛微苦,具有祛风湿、强筋骨、消肿止痛之功效^[2]。蜈蚣三七主要含皂苷类成分,药理学研究证实蜈蚣三七总皂苷具有良好的抗炎抗过敏、调节免疫等作用^[3]。前期研究表明蜈蚣三七纳米粉能够预防腹腔术后肠粘连的形成^[4],本文从炎症反应细胞因子入手,探讨蜈蚣三七纳米粉预防术后肠粘连的机制,为其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 $\pm$ 20)g,由华中科技大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(鄂)2010-0009。动物分笼饲养,适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药品和试剂 蜈蚣三七纳米粉,由纳米冲击磨粉碎后再加工制得,颗粒小于 100 nm,总皂苷含量约 7%,用蒸馏水配成所需浓度。阳性药地塞米松磷酸钠注射液,由天津金耀氨基酸有限公司提供,批号 0912111。大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒均购自美国 R&D 公司。

1.3 主要仪器 CJM-SY-B 型高能纳米冲击磨(秦皇岛市太极环纳米制品有限公司), AC100-110 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司)。

1.4 方法

1.4.1 Ellis 法制备大鼠术后肠粘连模型^[5] 取 SD 大鼠,禁食不禁水 12 h 后,麻醉、固定,腹部消毒,取下腹部正中切口,提出盲肠,置于纱布上约 5 min,使浆膜干燥,以解剖刀片轻刮整个盲肠浆膜 10 遍,造成轻度渗血,然后以无齿镊夹住盲肠系膜动脉约 2 min,造成暂时局部缺血。盲肠回纳入腹腔原位后以止血钳夹伤相应腹壁,常规关腹。

1.4.2 分组与给药 取造模成功的动物 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只:模型组(灌胃等体积蒸馏水)、阳性组(肌肉注射地塞米松 10 mg/kg)、蜈蚣三七高、中、低剂量组(分别灌胃 450、225、112 mg/kg),每组 10 只。另取 10 只大鼠开腹后立即缝合,作为假手术组(灌胃等体积蒸馏水)。造模前给药 3 d,造模后继续给药,1 次/d,持续 1 周。

1.4.3 检测指标 末次给药后 12 h,各组动物进行心脏采血,3 500 r/min 离心 5 min 分离血清,采用双抗体夹心 ELISA 法上酶标仪检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达水平,操作按试剂盒说明书进行。采血后处死动物,开腹观察肠粘连发生情况,并按 Phillips 五级标准^[6]进行分级:0 级,无粘连;I 级,粘连面积小于 20%,易分离;II 级,粘连面积小于 40%,分离后局部浆膜稍有损伤;III 级,粘连面积为 40%~60%,分离后局部有损伤和渗血;IV 级,粘连面积大于 60%,组织粘连成团,分离困难。

1.4.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,粘连程度分级采用完全随机设计的秩和检验,炎症反应因子组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 蜈蚣三七纳米粉对肠粘连程度分级的影响 假手术组有 1 只发生粘连,模型组动物均发生粘连,各给药组的部分动物未见粘连或粘连程度较轻。与模型组比较,蜈蚣三七各剂量组的肠粘连程度明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但未呈现明显的量效关系。结果见表 1。

2.2 蜈蚣三七纳米粉对血清细胞因子表达的影响 模型组血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平显著升高,与假手术组比较均有统计学意义($P < 0.01$)。蜈蚣三七各剂量组均可明显降低血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,与模型组比较差异均有统计学意义($P <$

0.05 或 $P < 0.01$)。结果见表 2。

表 1 各组术后肠粘连分级(例数 = 10)

组别	剂量 (mg/kg)	分级					平均秩
		0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级	
假手术组	-	9	1	0	0	0	5.50**
模型组	-	0	1	1	3	5	56.75
蜈蚣三七低剂量组	112	3	4	2	1	0	34.00**
蜈蚣三七中剂量组	225	3	2	1	2	1	38.44*
蜈蚣三七高剂量组	450	5	2	0	1	2	35.10*
阳性组	10	6	2	1	1	0	28.50**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 2 蜈蚣三七纳米粉对术后肠粘连大鼠血清炎症反应因子表达的影响($\bar{x} \pm s$,例数 = 10,ng/L)

组别	剂量 (mg/kg)	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	-	92.3 $\pm$ 27.6	144.2 $\pm$ 40.9	211.3 $\pm$ 50.7
模型组	-	174.0 $\pm$ 59.8**	265.5 $\pm$ 78.6**	334.2 $\pm$ 90.5**
蜈蚣三七低剂量组	112	118.3 $\pm$ 19.3 $\Delta\Delta$	202.8 $\pm$ 51.7 Δ	250.5 $\pm$ 49.9 $\Delta\Delta$
蜈蚣三七中剂量组	225	116.4 $\pm$ 21.5 $\Delta\Delta$	176.5 $\pm$ 34.0 $\Delta\Delta$	238.4 $\pm$ 50.2 $\Delta\Delta$
蜈蚣三七高剂量组	450	130.6 $\pm$ 50.0 Δ	180.3 $\pm$ 45.6 $\Delta\Delta$	263.0 $\pm$ 60.4 Δ
阳性组	10	110.5 $\pm$ 31.2 $\Delta\Delta$	147.1 $\pm$ 28.3 $\Delta\Delta$	209.1 $\pm$ 61.0 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

细胞因子在术后肠粘连形成中的作用正逐渐被认识并受到重视。研究表明,由受损伤部位和腹腔液中的细胞所表达的多肽生长因子、细胞因子及其受体在调控组织愈合或粘连形成的过程中可能起关键的作用^[7-8]。

TNF- α 在损伤后的炎症反应过程中起着较重要的作用,如刺激其他许多递质包括 IL-1、IL-6 和血小板激活因子的释放;通过刺激黏附分子的产生,促进中性粒细胞-上皮细胞间的粘连,同时增强中性粒细胞的吞噬作用。Kaidi 等研究发现局部和全升高水平的 TNF- α 在术后短时间内与肠粘连形成的程度有显著性联系,可作为粘连形成的一种标志物^[9]。另据报道,早期阻断 TNF- α 活性有利于降低术后肠粘连的发生率^[10]。IL-1 是机体组织受到损伤和发生炎症反应时做出急性反应的关键递质。Saba 等^[11]研究表明,术后早期血清中较高水平的 IL-1 与术后腹膜粘连形成显著相关,IL-1 升高可作为术后发生腹膜粘连的可靠指标。杨雁灵等^[12]研究发现,应用 IL-1 β 抗体的小鼠术后腹腔粘连程度明显低于对照组,说明抑制 IL-1 β 的表达可预防腹膜粘连的发生。IL-6 是机体对损伤做出反应时分泌的多功能细胞因子,被认为与许多免疫性的增殖和新生物的形成过程有关。Saba 等^[13]发现术前静脉注射抗 IL-6 抗体能减少肠损伤模型大鼠粘连形成且不影响伤口愈合,认为 IL-6 在

(下接第 474 页)

与妇科千金片的抗炎、镇痛作用差异无统计学意义,但其确切的作用机制还需深入研究。

参考文献

- [1] 曹泽毅. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:249-252.
- [2] 金何奎,朱海波,蔡英姬,等. 复方樟丹制剂抗炎作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2002,9(1):9-10.
- [3] 马瑞丽,于小凤,徐秀泉,等. 大血藤的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国野生植物资源,2012,31(6):1-5.
- [4] 徐文峥,江伟华. 红藤汤中药配方颗粒治疗慢性盆腔炎的临床观察[J]. 中国中药杂志,2011,36(10):1386-1387.
- [5] 史杨,曹阳,赵莉,等. 红藤在妇科疾病中的应用[J]. 中医学学报,

2012,40(2):109-111.

- [6] 许蓬娟,花春艳,艾洪滨,等. 石榴皮水提物的镇痛实验研究[J]. 生物医学工程研究,2009,28(4):263-266.
- [7] 张文娟,李茂星,张泉龙,等. 栀子苷的快速提取分离及其镇痛抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):170-174.
- [8] Hu JY, Jin GZ. SuPrasPinal D2 recePtor involved in an - tinocicePtion induced by 1 - tetrahydroPalmatine[J]. Acta Pharmacol Sin, 1999, 20(8):715.
- [9] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:241-247,764-770.

(2014-09-22 收稿 责任编辑:曹柏)

(上接第469页)

刺激术后肠粘连的形成中起作用。近来的临床研究证实,IL-6是腹腔液中的正常成分,但在许多发生术后腹腔粘连的患者中IL-6水平明显升高^[14]。

本研究观察了蜈蚣三七纳米粉对术后肠粘连大鼠血清中细胞因子表达的影响,结果表明蜈蚣三七纳米粉各剂量对术后肠粘连有预防作用,能明显改善肠粘连程度,能显著降低血清细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平,这与Dwivedi等^[15]关于乳胶粉的研究结果一致。本室前期研究证实蜈蚣三七能够调节细胞因子失衡,具备良好的抗炎作用^[16],结合本文结果,提示蜈蚣三七纳米粉预防术后肠粘连的机制可能与抑制炎症反应因子的过度表达,进而减轻早期腹腔的急性炎症反应有关。

参考文献

- [1] Hellebrekers BW, Kooistra T. Pathogenesis of postoperative adhesion formation[J]. Br J Surg, 2011, 98(11):1503-1516.
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:802.
- [3] 江俊. 地乌总苷对佐剂性关节炎大鼠特异性免疫功能影响的实验研究[J]. 中药材,2002,25(3):194-195.
- [4] 黄欣,李一鸣,徐福琴,等. 蜈蚣三七纳米粉对大鼠术后肠粘连的预防作用[J]. 国际中医中药杂志,2013,35(6):513-515.
- [5] Tokita Y, Yuzurihara M, Satoh K, et al. The cholinergic nervous system plays an important role in rat postoperative intestinal adhesion[J]. Surgery, 2008, 143(2):226-232.
- [6] Phillips RK, Dudley HA. The effect of tetracycline lavage and trauma on visceral and parietal peritoneal ultrastructure and adhesion formation[J]. Br J Surg, 1984, 71(7):537-539.
- [7] Imudia AN, Kumar S, Saed GM, et al. Pathogenesis of Intra - abdominal

and pelvic adhesion development[J]. Semin Reprod Med, 2008, 26(4):289-297.

- [8] Kawashima R, Kawamura YI, Oshio T, et al. Comprehensive analysis of chemokines and cytokines secreted in the peritoneal cavity during laparotomy[J]. J Immunoassay Immunochem, 2012, 33(3):291-301.
- [9] Kaidi AA, Gurchumelidze T, Nazzal M, et al. Tumor necrosis factor - α : a marker for peritoneal adhesion formation[J]. J Surg Res, 1995, 58(5):516-518.
- [10] Kurukahvecioglu O, Koksall H, Gulbahar O, et al. Infliximab "TNF - α antagonist" decreases intraabdominal adhesions[J]. Saudi Med J, 2007, 28(12):1830-1835.
- [11] Saba AA, Godziachvili V, Mavani AK, et al. Serum levels of interleukin 1 and tumor necrosis factor α correlate with peritoneal adhesion grades in humans after major abdominal surgery[J]. Am Surg, 1998, 64(8):734-737.
- [12] 杨雁灵, 窦科峰, 李开宗. 应用IL-1 β 抗体预防术后腹腔粘连实验研究[J]. 西北国防医学杂志, 2002, 23(6):429-430.
- [13] Saba AA, Kaidi AA, Godziachvili V, et al. Effects of interleukin - 6 and its neutralizing antibodies on peritoneal adhesion formation and wound healing[J]. Am Surg, 1996, 62(7):569-572.
- [14] Ambler dR, Fletcher NM, Diamond MP, et al. Effects of hypoxia on the expression of inflammatory markers IL - 6 and TNF - α in human normal peritoneal and adhesion fibroblasts[J]. Syst Biol Reprod Med, 2012, 58(6):324-329.
- [15] Dwivedi AJ, Kuwajerwala NK, Silva YJ, et al. Effects of surgical gloves on postoperative peritoneal adhesions and cytokine expression in a rat model[J]. Am J Surg, 2004, 188(5):491-494.
- [16] 张国斌, 邓成志, 廖一帆, 等. 蜈蚣三七总皂苷对胶原性关节炎小鼠炎症细胞因子的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(11):1320-1323.

(2013-10-21 收稿 责任编辑:王明)