

大承气颗粒对多器官功能障碍综合征大鼠 小肠平滑肌细胞凋亡的干预作用

谢明征 齐清会

摘要 **目的** 探讨大承气颗粒对多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)大鼠小肠平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)凋亡的干预作用及其机制。**方法** 健康成年 Wistar 大鼠 100 只,随机分为对照组(20 只)、模型组(40 只)和大承气颗粒组(中药组,40 只)。模型组和中药组大鼠予腹腔注射大肠希氏菌(*E. coli*)混悬液,建立细菌性腹膜炎致 MODS 模型,中药组造模前 2 天给予大承气颗粒(1 mL/100 g)灌胃,2 次/天,连续 3 天。造模 24 h 后取存活大鼠的上段小肠组织,分别进行末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记技术(terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL)和免疫组织化学染色,观察大承气颗粒干预前后 MODS 大鼠小肠 SMC 的凋亡数量及线粒体凋亡信号途径 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素 C(cytochrome c, Cyt c)蛋白表达的变化。**结果** 与对照组比较,模型组小肠 SMC 凋亡数量、Bax、Cyt c 蛋白表达明显升高($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,中药组小肠 SMC 凋亡数量、Bax、Cyt c 蛋白表达明显降低($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达明显升高($P < 0.01$)。**结论** 大承气颗粒可以通过抑制小肠 SMC 线粒体凋亡途径的激活,抑制 SMC 的凋亡,从而促进 MODS 大鼠胃肠运动功能的恢复。

关键词 多器官功能障碍综合征;平滑肌细胞;凋亡;大承气颗粒

Intervention Effect of Dachengqi Granule on Apoptosis of Small Intestine Smooth Muscle Cells in Rats with Multiple Organ Dysfunction Syndrome XIE Ming-zheng and QI Qing-hui Third Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Liaoning (116011), China

ABSTRACT **Objective** To observe the intervention of Dachengqi Granule (DG) on the apoptosis of small intestine smooth muscle cells (SMCs) in rats with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and its mechanisms. **Methods** Healthy 100 adult Wistar rats were randomly divided into the control group ($n=20$), the MODS model group ($n=40$), and the DG group ($n=40$). *E. coli* suspension was peritoneally injected to rats in the model group and the DG group to establish bacterial peritonitis induced MODS model. DG at 1 mL/100 g was administered by gastrogavage to rats of the DG group, twice daily for 3 successive days. Twenty-four hours after modeling, the proximal segment of intestine was taken and stained by using terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry. Changes of apoptosis quantity of SMCs and the expression of Bcl-2 associated X protein (Bax), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and cytochrome c protein (Cyt c) in mitochondrial apoptotic signaling pathway were observed. **Results** Compared with the control group, the apoptosis quantity of SMCs and the expression of Bax and Cyt c protein significantly increased, and the expression of Bcl-2 protein significantly decreased in the MODS model group ($P < 0.01$). Compared with the MODS model group, the apoptosis quantity of SMCs and the expression of Bax and Cyt c proteins significantly decreased, and the expression of Bcl-2 protein significantly increased in the DG group (all $P < 0.01$). **Conclusion** DG could inhibit apoptosis of SMCs through suppressing activation of mitochondrial apoptotic

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30973852);辽宁省高等学校科研项目计划(No. 2008S074)

作者单位:大连医科大学附属第一医院普外三科(辽宁大连 116011)

通讯作者:齐清会, Tel:13889697786, E-mail: qiqh@medmail.com.cn

DOI: 10. 7661/CJIM. 2014. 05. 0587

signaling pathway in intestinal SMCs, thus promoting the recovery of the gastrointestinal motility function in rats with MODS.

KEYWORDS multiple organ dysfunction syndrome; smooth muscle cell; apoptosis; Dachengqi Granule

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是一种在严重感染、创伤、休克及大手术等原发病发生后,机体同时或序贯发生两个或两个以上器官或系统功能障碍的临床综合征。是腹部外科患者死亡的重要原因。近年来研究证明胃肠道是 MODS 的始动器官和靶部位,胃肠功能障碍救治的成败直接影响患者的治疗质量和预后。胃肠动力的恢复是缓解胃肠功能衰竭最初和最关键的步骤^[1]。寻找有效的治疗 MODS 胃肠运动障碍,促进胃肠动力恢复的方法十分必要。

本实验以细菌性腹膜炎致 MODS 大鼠模型为研究对象,观察 MODS 大鼠和大承气颗粒干预后的小肠平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)凋亡数量以及线粒体凋亡信号途径 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素 C(cytochrome c, Cyt c)蛋白表达的变化,并探讨 MODS 致胃肠运动功能障碍及大承气颗粒干预的机制。

材料与方法

1 动物 健康 3~4 月龄清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,体重 200~250 g,由大连医科大学动物实验中心提供。动物合格证编号:SCXK(辽)2008-0002。于 2010 年 9—12 月在大连医科大学实验动物中心饲养,饲养条件:温度 20~25℃,相对湿度 40%~50%,自然光照,每箱 5 只,正常鼠粮饮食,正常饮水,3 天更换垫料。

2 药物 大承气颗粒组成:大黄 12 g,芒硝 6 g,厚朴 9 g,枳实 9 g,天津南开医院药厂生产(批号:20100614)。颗粒剂用无菌蒸馏水溶解成含生药 100%的药剂,相当于生药 1 g/mL。

3 试剂及仪器 TUNEL 凋亡检测试剂盒(11684817910),瑞士 Roche 公司;小鼠抗大鼠 Bax(sc-7480)、Bcl-2(sc-7382)抗体和山羊抗大鼠 Cyt c(sc-8385)抗体,美国 Santa Cruz 公司。即用型二步法(非生物素)检测试剂盒(PV-9002, PV-9003),美国 GBI 公司;DAB 酶底物显色试剂盒及中性树胶,北京中杉金桥。肠埃希氏菌(*E.coli*)由大连医科大学附属第一医院检验科提供。

4 动物分组、模型制备及干预方法 健康成年 Wistar 大鼠 100 只,随机分为对照组 20 只、模型组 40 只和大承气颗粒组(中药组)40 只。按照陈哲宇等^[2]方法建立细菌性腹膜炎致 MODS 大鼠模型:无菌条件下,对照组每只大鼠予腹腔注射 1 mL 生理盐水;模型组和中药组每只大鼠予腹腔注射 1 mL *E.coli* 混悬液,建立细菌性腹膜炎致 MODS 模型。模型组大鼠 40 只,死亡 23 只,造模成功率为 42.5%。中药组于造模前 2 天给予大承气颗粒(1 mL/100 g)灌胃(大鼠给药剂量相当于人 6.3 倍,按体表面积换算),2 次/天,连续 3 天。

5 检测指标及方法 造模 24 h 后颈椎脱臼法处死存活大鼠,取上端小肠置于 4℃ 4%多聚甲醛中固定过夜。梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡切片机连续切片,每片厚度为 5 μm,附于多聚赖氨酸包被的载玻片上,60℃ 过夜。

5.1 腹腔解剖学观察 颈椎脱臼法处死大鼠后立即观察各组大鼠腹腔解剖情况。

5.2 Bax、Bcl-2、Cyt c 蛋白表达检测 采用免疫组织化学法。按超敏即用型二步法(非生物素)检测试剂盒说明书进行,概述如下:组织切片常规脱蜡、水化,3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,抗原修复液沸水浴 15 min,一抗(小鼠抗大鼠 Bax、Bcl-2 抗体,山羊抗大鼠 Cyt c 抗体)4℃ 孵育过夜,滴加试剂 1(聚合物辅助剂),37℃ 孵育 20 min,滴加试剂 2(辣根酶标记抗小鼠 IgG 多聚体,辣根酶标记抗山羊 IgG 多聚体),37℃ 孵育 20 min,DAB 显色,苏木素复染,常规脱水、透明、封片。以 PBS 代替一抗做阴性对照,已知阳性切片做阳性对照。

采用美国 Media Cybernetics 公司的 Image-Pro Plus 6.0(IPP 6.0)软件分析图像,计算小肠肌层 Bax、Bcl-2、Cyt c 蛋白阳性表达区域的积分光密度(Integral optical density, IOD)。

5.3 TUNEL 法凋亡检测 实验步骤按说明书进行:切片常规脱蜡脱水;蛋白酶 K 孵育后,PBS 冲洗;滴加 TUNEL 反应混合溶液,37℃ 孵育 60 min;加入转化剂-POD,37℃ 孵育 30 min;PBS 冲洗;加入 DAB 底物溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗;苏木素复染细胞核,封片,光镜下采集图像。

每组随机选取 10 张图片进行分析。每张图片进

行 SMC 总数和凋亡数量计数,并计算凋亡指数,凋亡指数(%) = 平滑肌凋亡数量/平滑肌总数 × 100%。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计学处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组一般状态比较 造模 24 h 后,对照组大鼠共 20 只,均存活。对照组大鼠毛色光泽,活动自如,躲避扑捉灵敏,饮食、饮水量正常,尿色淡黄,大便通畅,为黑褐色成形便。模型组大鼠死亡 23 只,死亡率为 57.5%,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);存活大鼠倦怠无力,活动减少,扑捉时无主动躲避,饮食、水量明显减少,尿色深,粪便燥结,呈串珠样。中药组死亡 11 只,死亡率 27.5%,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);存活大鼠活动增加,扑捉时躲避灵敏,挣扎有力,饮食、饮水量增多,尿色淡黄,大便为黄褐色略成形软便。

2 各组大鼠腹腔解剖结果比较(图 1) 对照组大鼠胃肠形态、蠕动正常,肠管呈粉红色,无粘连。模型组大鼠胃肠扩张明显,腹腔内大量渗出液,部分出现血性腹水,大部分肠管呈暗紫色,肠腔内暗紫色血水样液体潴留,梗阻征象明显。中药组胃肠轻度充盈,蠕动基本正常,腹腔少量渗出液,无血性渗出,肠腔内少量淡黄色液体潴留。

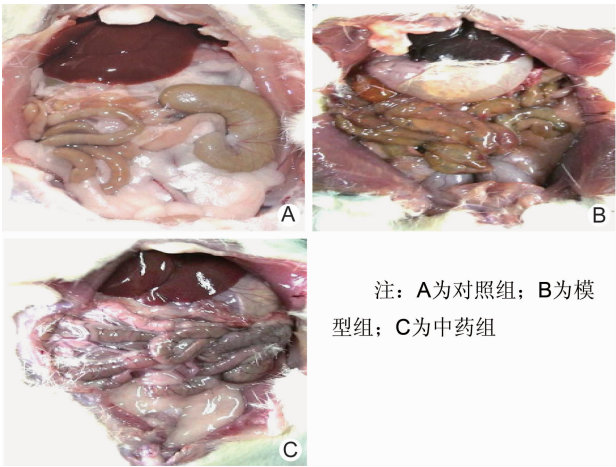


图 1 各组大鼠腹腔解剖观察

3 各组大鼠 SMC 凋亡情况比较(图 2,表 1) 对照组小肠肌层中未见或极少见 SMC 凋亡现象。模型组小肠肌层中可见大量的凋亡细胞,较对照组明显增多($P < 0.01$),凋亡细胞核染色较深,密度均一。中药组小肠肌层中凋亡细胞数量较 MODS 组明显减少

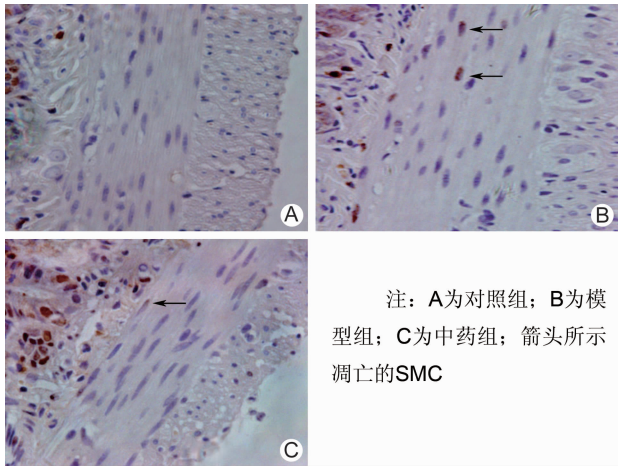


图 2 各组大鼠 SMC 凋亡观察 (TUNEL, ×400)

表 1 大鼠 SMC 凋亡情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡细胞计数 (个/视野)	细胞计数 (个/视野)	凋亡指数 (%)
对照	10	1.0 ± 1.2 *	129.1 ± 23.8 *	0.7 ± 0.5 *
模型	10	7.3 ± 2.5	82.4 ± 13.8	8.8 ± 2.4
中药	10	4.3 ± 1.8 *	101.6 ± 14.6 *	4.4 ± 2.1 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$

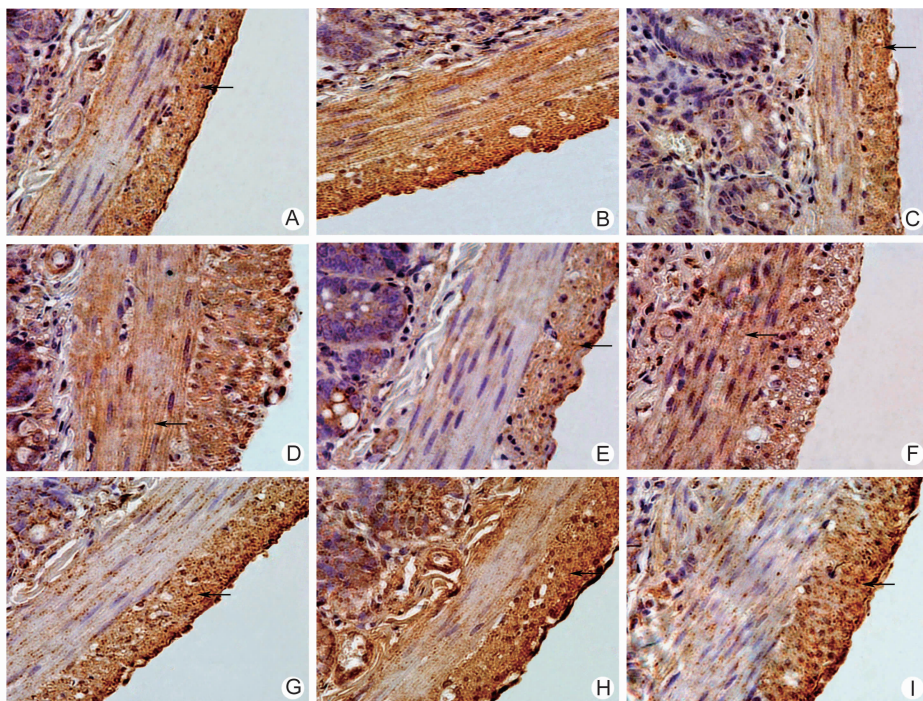
($P < 0.01$),凋亡细胞核较模型组淡染或仅部分染色。

4 各组大鼠小肠肌层 Bax、Bcl-2、Cyt c 蛋白表达比较(表 2,图 3) 对照组小肠肌层中见少量 Bax 蛋白表达;可见大量 Bcl-2 蛋白表达,分布均匀,环行肌和纵行肌中的表达无明显差异;环行肌中 Cyt c 蛋白表达量极少,纵行肌可见少量表达。与对照组比较,模型组小肠肌层中 Bax 蛋白表达明显升高($P < 0.01$),分布均匀,环行肌中表达的升高程度尤为明显;Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.01$),分布不均,环行肌下降尤为明显,部分区域表达极低;Cyt c 蛋白表达升高($P < 0.01$),以环形肌升高明显,近黏膜肌层表达较高。与模型组比较,中药组小肠肌层 Bax 蛋白表达明显降低($P < 0.01$),环行肌尤为显著;Bcl-2 的表达明显升高($P < 0.01$),分布无明显差异性;Cyt c 蛋白表达较 MODS 组明显减少($P < 0.01$),尤以环形肌明显。

表 2 各组大鼠小肠肌层 Bax、Bcl-2、Cyt c 蛋白表达比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Cyt c
对照	10	9 74 ± 2 230	25 309 ± 6 856 *	4 858 ± 1 341 *
模型	10	39 851 ± 6 519	5 801 ± 1 391	24 631 ± 5 591
中药	10	10 960 ± 1 781 *	14 277 ± 2 035 *	8 874 ± 2 608 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$



注:A、D、G 为对照组;B、E、H 为模型组;C、F、I 为中药组;A、B、C 为 Bax;D、E、F 为 Bcl-2;G、H、I 为 Cyt c

图 3 各组大鼠小肠平滑肌 Bax、Bcl-2、Cyt c 蛋白表达 (免疫组化染色, ×400)

讨 论

MODS 是创伤和感染后最严重的并发症,病死率高,是危重病中的顽症^[3]。MODS 的发病机制目前尚不完全清楚,但研究已证实在缺血缺氧、创伤、感染、休克等病理状态下,由于神经内分泌系统的激活,全身血流重新分布,胃肠道处于严重的缺血、缺氧状态,导致黏膜屏障受损,肠腔内细菌和内毒素进入循环系统,诱发单核-巨噬细胞系统持续释放肿瘤坏死因子(TNF)、IL-1 等炎症介质,使得全身炎症反应失控,从而导致多器官功能受损^[4]。因此,目前研究观点认为胃肠道是 MODS 等危重病病理生理过程的积极参与者,胃肠运动功能障碍救治的成败直接影响患者的治疗质量和预后^[5]。

大承气颗粒由大黄、芒硝、枳实和厚朴四味中药组成,具有荡涤肠腑,泻热除满的作用,在 MODS 的临床防治中已取得了确切的疗效。有研究表明,大承气汤促进胃肠动力的恢复与其发挥抑制肠道炎症的过度反应有着密切联系^[6],但其具体的机制尚不完全清楚,尤其是 MODS 发生时消化道处于缺血缺氧和炎症过度反应的状态下,是否会诱发 SMC 凋亡现象的发生,而大承气颗粒的影响作用又如何,目前尚未见确切报导。

胃肠运动功能由胃肠运动神经、Cajal 间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)和 SMC 共同协调完

成。ICC 是胃肠道慢波的产生者和神经信号传递的中介,胃肠运动神经是消化道蠕动的调控者,而 SMC 是胃肠运动的最终执行者。SMC 功能和形态变化直接影响胃肠运动功能状态^[7]。本实验采用 TUNEL 和免疫组化方法,通过观察和检测 MODS 和大承气颗粒干预后的大鼠小肠 SMC 的凋亡现象和线粒体凋亡途径相关蛋白表达量的变化,初步探讨 MODS 致胃肠动力障碍的发生机制和大承气颗粒的干预机制。研究结果显示,MODS 可以造成大鼠小肠平滑肌的严重损伤,数量明显减少,细胞凋亡现象显著,从而破坏了小肠肌层的完整性,使得消化道动作电位的扩步受阻,小肠平滑肌收缩节律紊乱,肠管蠕动失协调性和统一性,最终导致胃肠动力障碍的发生。而大承气颗粒干预后 SMC 数量显著增加,同时凋亡数量和凋亡指数则明显减少,有效地保护了小肠肌层的完整性,促进了胃肠动力的恢复。结果提示 MODS 状态下胃肠动力障碍的发生可能和小肠 SMC 的凋亡密切相关,而大承气颗粒可以通过抑制小肠 SMC 的凋亡,保护其生理功能。

细胞凋亡的信号传导通路主要有死亡受体途径、内质网途径和线粒体途径等^[8]。其中线粒体途径被认为是调控细胞凋亡最主要的途径,而线粒体膜通透性的改变和 Cyt c 的释放则是线粒体途径的中心环节^[9]。Bax 和 Bcl-2 蛋白在线粒体凋亡途径中具有重要作用,二者相互拮抗。分布于线粒体外膜上的

Bcl-2 蛋白具有稳定线粒体膜的作用,阻止线粒体释放 Cyt c 等促凋亡蛋白^[10];而 Bax 蛋白则可以减低线粒体膜电位导致促凋亡蛋白的释放。因此,Bax/Bcl-2 决定了细胞凋亡的发生与否,当 Bax/Bcl-2 比值增加时促进细胞凋亡,而该比值下降时则抑制细胞凋亡^[11]。本研究显示,MODS 大鼠小肠 SMC 胞浆中的 Bax、Cyt c 表达显著上调,Bcl-2 表达则明显下调,中药组则表现出相反的趋势。提示在病理状态下多种凋亡诱导因素的激活,使小肠 SMC 胞质中的 Bax 移位至线粒体膜上,并与 Bcl-2 形成二聚体从而抑制 Bcl-2 的活性,不可逆性地开放线粒体膜通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP),使得线粒体膜的通透性持续性升高和线粒体膜电位降低,原本存在于线粒体内外膜间的 Cyt c 被释放到胞浆,从而激活半胱天冬蛋白酶 3 (Caspase-3),促发 Caspases 的活化联级反应,最终导致染色质浓缩和核碎裂,引发小肠 SMC 的凋亡^[12]。因此,MODS 状态下线粒体凋亡途径的激活,可能是诱发小肠 SMC 凋亡的重要机制之一;而大承气颗粒具有显著地阻碍线粒体途径激活的作用,从而抑制 SMC 的凋亡,促进胃肠动力的恢复。

另有研究表明,Bcl-2 还能通过抑制胞内 Ca^{2+} 重新分布、减少内质网 Ca^{2+} 的释放等方式干扰 Ca^{2+} 信号传导从而抑制细胞凋亡的发生^[13]。这提示 Ca^{2+} 亦可能是造成 MODS 肠道 SMC 凋亡的关键因素之一,而大承气颗粒对此途径是否也具有干预作用尚待进一步的研究。

综上所述,MODS 胃肠动力障碍的发生和线粒体途径激活所致的平滑肌凋亡密切相关;抑制线粒体凋亡途径的激活从而减轻平滑肌的凋亡现象,保护平滑肌的完整性可能是大承气颗粒促进胃肠动力的恢复的重要机制之一。研究结果为大承气颗粒防治 MODS 胃肠动力障碍提供了新的理论依据。但细胞凋亡是多诱因、多途径的,MODS 状态下小肠 SMC 凋亡是否有其他途径参与,而大承气颗粒的影响作用又如何,尚待进一步的研究。

(致谢:本研究得到大连医科大学中西医结合学院战丽彬院长、隋华和孙杰等友情帮助,在此深表谢意。)

参 考 文 献

- [1] Puleo F, Arvanitakis M, Van Gossum A, et al. Gut failure in the ICU [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32(5): 626-638.
- [2] 陈哲宇,齐清会. 多器官功能不全综合征大鼠结肠运动功能变化和机制的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(3): 341-342.
- [3] Hackett TB. Introduction to multiple organ dysfunction and failure [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2011, 41(4): 703-707.
- [4] Hsieh YH, McCartney K, Moore TA, et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury leads to inflammatory changes in the brain [J]. *Shock*, 2011, 36(4): 424-430.
- [5] Kannan KB, Colorado I, Reino D, et al. Hypoxia-inducible factor plays a gut-injurious role in intestinal ischemia reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(5): 853-861.
- [6] 王绍山,齐清会. 术前服用大承气冲剂对肿瘤患者炎症介质的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(6): 337-339.
- [7] Daniel EE. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle [J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2004, 16 (Suppl 1): 118-122.
- [8] Krueger A, Baumann S, Krammer PH, et al. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor mediated apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(24): 8247-8254.
- [9] Hüttemann M, Lee I, Grossman LI, et al. Phosphorylation of mammalian cytochrome C and cytochrome C oxidase in the regulation of cell destiny: respiration, apoptosis, and human disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 748: 237-264.
- [10] Eno CO, Zhao G, Olberding KE, et al. The Bcl-2 proteins Noxa and Bcl-xL coordinately regulate oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Biochem J*, 2012, 444(1): 69-78.
- [11] Sepac A, Sedlic F, Si-Tayeb K, et al. Isoflurane preconditioning elicits competent endogenous mechanisms of protection from oxidative stress in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells [J]. *Anesthesiology*, 2010, 113(4): 906-916.
- [12] Rajah TT, Peine KJ, Du N, et al. Physiological concentrations of genistein and 17 β -estradiol inhibit MDA-MB-231 breast cancer cell growth by increasing BAX/BCL-2 and reducing pERK1/2 [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(4): 1181-1191.
- [13] Dremna ES, Sharov VS, Schöneich C. Heat-shock proteins attenuate SERCA inactivation by the anti-apoptotic protein Bcl-2: possible implications for the ER Ca^{2+} -mediated apoptosis [J]. *Biochem J*, 2012, 444(1): 127-139.

(收稿:2012-10-30 修回:2013-07-08)