

内毒素亲和吸附剂 SPV 对失血性休克模型大鼠肠壁通透性与细菌移位的影响^Δ

刘 海^{*}(唐山市开滦总医院麻醉科,河北唐山 063000)

中图分类号 R441.9;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0207-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.13

摘要 目的:观察内毒素亲和吸附剂 SPV 对失血性休克模型大鼠肠壁通透性与细菌移位的影响。方法:将 85 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组(5 只)、休克组(每时间点各 5 只,共 20 只)以及 SPV 低、中、高剂量组(将蒙脱石散 0.3 g、硫酸多黏菌素 B 0.5 mg、维生素 B₆ 5 mg 溶于生理盐水中制成总体积为 5 mL 的 SPV 溶液,即为低剂量;中、高剂量药物成分是低剂量的 2、3 倍。各剂量组每时间点各 5 只,共 60 只),各给药组大鼠分别灌胃 SPV 溶液 5、10、15 mL,正常组和休克组大鼠灌胃生理盐水 5 mL,均给药 1 次。末次给药 30 min 后,除正常组外其余各组大鼠均通过股动脉插管放血术复制失血性休克模型。于复苏后 1、4、8、16 h 分别检测各组大鼠血清中二胺氧化酶(DAO)、内毒素、D-乳酸的活性或含量以及计算肠道细菌移位阳性率。结果:与正常组比较,休克组大鼠各时间点血清 DAO 活性均显著增强,血清内毒素、D-乳酸的含量以及肠道细菌移位阳性率均显著升高($P<0.05$)。与休克组比较,SPV 各剂量组大鼠血清 DAO 活性(1~16 h 各时间点)均显著减弱,血清内毒素、D-乳酸的含量(1~16 h 各时间点)以及肠道细菌移位阳性率(SPV 低剂量组 4~16 h 各时间点,SPV 中、高剂量组 1~16 h 各时间点)均显著降低($P<0.05$),且 SPV 中、高剂量组上述指标(1~16 h 各时间点)均显著低于 SPV 低剂量组($P<0.05$);而 SPV 中、高剂量组上述指标组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:内毒素亲和吸附剂 SPV 可剂量依赖性地改善失血性休克模型大鼠的肠壁通透性,并抑制细菌移位。这种作用与其降低血清内毒素、DAO、D-乳酸的活性或含量,下调肠道细菌移位阳性率有关。

关键词 失血性休克;二胺氧化酶;内毒素;D-乳酸;肠壁通透性;细菌移位;大鼠

Effects of Endotoxin Affinity Adsorbent SPV on Intestinal Permeability and Bacterial Translocation in Hemorrhagic Shock Model Rats

LIU Hai(Dept. of Anesthesiology, Tangshan Kailuan General Hospital, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To observe the effects of endotoxin affinity adsorbent SPV on intestinal permeability and bacterial translocation in hemorrhagic shock model rats. METHODS: Totally 85 male SD rats were randomly divided into normal group (5 rats), shock group (each 5 rats at each time point, 20 rats in total), SPV low-dose, medium-dose and high-dose groups (Montmorillonite powder 0.3 g, Polymyxin B sulfate 0.5 mg, Vitamin B₆ 5 mg dissolved in normal saline to obtain SPV solution 5 mL, as low dose; medium and high dose were 2 or 3 times as high as low dose. Each 5 rats of each group at each time point, 60 rats in total). Administration groups were given SPV solution intragastrically 5, 10, 15 mL once, respectively; normal group and shock group were given normal saline 5 mL intragastrically once. Thirty minutes after last medication, other groups received femoral artery catheterization and bleeding to induce hemorrhagic shock model, except for normal group. The activities or contents of diamine oxidase (DAO), endotoxin and D-lactic acid, positive rates of intestinal bacterial translocation were detected in each group at 1, 4, 8, 16 h after recovery. RESULTS: Compared with normal group, the activities of DAO of rats in shock group were enhanced significantly, and the serum contents of endotoxin and D-lactic acid were increased significantly ($P<0.05$). Compared with shock group, the activities of DAO were decreased significantly in SPV groups (at each time point during 1-16 h); the serum contents of endotoxin and D-lactic acid (at each time point during 1-16 h), positive rates of intestinal bacterial translocation (SPV low-dose group at each time point during 4-16 h, SPV medium-dose and high-dose groups at each time point during 1-16 h) were decreased significantly ($P<0.05$). Above indexes in SPV medium-dose and high-dose groups (at each time point during 1-16 h) were significantly lower than those of SPV low-dose group ($P<0.05$). There was no statistical significance in above indexes between SPV medium-dose group and high-dose group ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The endotoxin affinity adsorbent SPV can improve the permeability of the intestinal wall and inhibit bacterial translocation in hemorrhagic shock model rats in dose-dependent manner. The effects of which may be associated with reducing the activities or contents of serum DAO, endotoxin, D-lactic acid, and down-regulating the positive rate of bacterial translocation.

KEYWORDS Hemorrhagic shock; Diamine oxidase; Endotoxin; D-lactic acid; Intestinal permeability; Bacterial translocation; Rats

Δ 基金项目:河北省卫生计生委医学科学研究重点课题计划(No. ZD20140064)

*副主任医师,硕士。研究方向:临床麻醉学与危重症。E-mail: 172169805@qq.com

肠道是人体内最大的贮菌场所和内毒素库^[1]。在正常生理状态下,肠道黏膜可阻止肠道内的细菌及内毒素转移至肠循环中^[2]。但肠道对机体缺血反应敏感,当发生缺血再灌注损伤时,机体应激反应可使上述肠道屏障

功能受到损伤,使得细菌和内毒素穿越肠黏膜屏障播散至肠系膜淋巴结和全身器官,这一过程被称为细菌移位^[2-3]。细菌移位可诱发全身性炎症反应,而这又是失血性休克后继发多器官功能障碍综合征(MODS)与多器官衰竭(MOF)的重要原因之一^[4]。因此,在失血性休克发生时对肠道进行有效保护,对防止肠道内细菌和内毒素移位、减轻由于缺血造成的机体损伤具有积极意义。

已有研究证实,降低创伤失血性休克高病死率的关键在于抑制全身炎症反应综合征(SIRS)向MODS发展^[5]。相关拮抗炎症介质和内毒素是近年创伤肠道保护的研究方向之一。由于内毒素为大分子聚合物(1 000 kDa),单纯通过透析很难将其有效清除,故目前多采用吸附剂(活性炭、树脂、免疫吸附剂)的方法来清除内毒素^[6],而上述吸附剂存在生产工艺复杂、药源少、价格昂贵等缺点^[7],故开展新型吸附剂的研究很有意义。鉴于此,本研究以蒙脱石散(Smecta)、多黏菌素B(Polymyxin B)、维生素B₆(Vitamin B₆)为原料,制成新型内毒素亲和吸附剂(简称“SPV”),并初步探讨其对失血性休克模型大鼠肠壁通透性和肠源性细菌移位的影响,以期为早期创伤失血性休克相关的细菌移位研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BL-410型生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司);A120S型电子天平(德国Sartorius公司);SABA-18型全自动生化分析仪(意大利GNR公司);3MK型离心机(美国Sigma公司);E-200型生物光学摄影显微镜(日本Nikon公司);恒宇电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);UV1901型双光分光光度计(上海棱光技术有限公司);SP-1920型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

蒙脱石散[商品名:思密达,博福-益普生(天津)制药有限公司,批准文号:国药准字H20000690,规格:3 g];注射用硫酸多黏菌素B(上海上药第一生化药业有限公司,批准文号:国药准字H31022631,规格:50 mg:50万单位);维生素B₆注射液(石药集团欧意药业有限公司,批准文号:国药准字H13021022,规格:2 mL:0.1 g);乳酸钠林格注射液(安徽环球药业股份有限公司,批准文号:国药准字H20043020,规格:500 mL:乳酸钠1.55 g、氯化钠3.0 g、氯化钾0.15 g、氯化钙0.10 g);10%水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司,批准文号:国药准字H37022673,规格:100 mL:100 g);肝素钠注射液(常州千红生化制药股份有限公司,批准文号:国药准字H32022088,规格:2 mL:12 500单位);普通琼脂培养基(上海华康科技开发公司,批号:20140628);D-乳酸检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:H20019002);二胺氧化酶(DAO)和内毒素试剂盒(上海星科生物科技有限公司,批号分别为H20030890、H20053009);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

SPF级健康雄性SD大鼠85只,(6.2±2.7)周龄,体重(300±18)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[动物使用合格证号:SCXK-(京)2013-0009]。所有大鼠均分笼适应性饲养7 d,室温控制为20~25℃,湿度为55%,昼夜更替周期为12 h。

2 方法

2.1 SPV溶液的制备

精密称取蒙脱石散0.3 g、硫酸多黏菌素B 0.5 mg(相当于0.5万单位)和维生素B₆ 5 mg,溶于适量生理盐水中,得蒙脱石散、硫酸多黏菌素B、维生素B₆质量浓度分别为60、0.1、1 mg/mL的SPV溶液(总体积为5 mL),即为SPV低剂量;其中、高剂量药物成分是低剂量的2、3倍。上述剂量设置均参照2015年版《中国药典》(二部)^[8]规定,并按照人用临床等效剂量换算而得。

2.2 分组与给药

所有大鼠禁食、不禁水12 h后,随机分为正常组(5只)、休克组[每时间点(1、4、8、16 h)各5只,共20只]以及SPV低、中、高剂量组[各剂量组每时间点(1、4、8、16 h)各5只,共60只]。给药组大鼠均灌胃相应药物1次(分别灌胃“2.1”项下SPV溶液5、10、15 mL),正常组和休克组大鼠均灌胃生理盐水5 mL 1次。

2.3 造模

末次给药30 min后,除正常组外,其余各组大鼠均以10%水合氯醛麻醉,以仰卧位固定于手术台上,暴露一侧颈内动、静脉,连接生物机能实验系统,动态监测大鼠的平均动脉压(MAP);同时,于显微镜下放置导管,注入肝素钠注射液125单位/kg,暴露股动脉进行动脉插管放血,在10 min内使其MAP降至(35±5) mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)并维持,建立大鼠失血性休克模型。若休克状态能稳定[即大鼠存活且MAP维持在(35±5) mmHg]30 min则表明模型复制成功。随后经股静脉缓慢回输抽出的血液,并输注放血量2倍的乳酸钠林格注射液进行复苏(上述操作于20 min内完成),监测MAP恢复至休克前的90%。正常组大鼠进行相同的手术操作,但是不放血、不回输血液。

2.4 血清标本的采集与相关指标的检测

分别于复苏后的1、4、8、16 h时常规消毒休克组和各给药组大鼠腹部皮肤,沿正中切口切开腹腔,轻轻拨开肠管暴露下腔静脉,采集静脉血2 mL;正常组大鼠于相同时间点同法采集静脉血2 mL。将所采静脉血放至离心管中,3 000 r/min离心60 s,分离血清,采用比色法以双光分光光度计检测血清中DAO活性,采用分光光度法以紫外-可见分光光度计测定血清中的内毒素、D-乳酸含量。严格按照相关试剂盒说明书操作。

2.5 肠道细菌移位率的计算

取血后,采用颈椎脱臼法处死各组大鼠,剪取其全部肠系膜淋巴结,称定质量后匀浆。取上述组织匀浆0.1 mL,以涂菌法接种至普通琼脂培养基中,于37℃恒

温培养箱中培养 24 h 后,根据菌落稀释倍数记录菌落个数,并换算成每克淋巴结组织的含菌量,用菌落形成单位(CFU)表示^[9]。当培养基上的菌落>100 CFU/每克淋巴结组织时,判定为细菌培养阳性,以此计算各组大鼠肠道的细菌移位阳性率(细菌移位阳性率=细菌培养阳性大鼠只数/该组大鼠总数×100%)^[10]。

2.6 统计学方法

采用 SAS 9.4 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);计数资料以只数或率表示,组间比较采用 Fisher 确切概率法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中 DAO 活性比较

与同时时间点正常组比较,休克组大鼠各时间点血清 DAO 活性均显著增强,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与同时时间点休克组比较,SPV 各剂量组大鼠各时间点血清 DAO 活性水平均显著减弱,且 SPV 中、高剂量组显著低于 SPV 低剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 SPV 中、高剂量大鼠同时时间点血清 DAO 活性比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 1。

表 2 各组大鼠血清中内毒素、D-乳酸含量比较($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab 2 Comparison of serum contents of endotoxin and D-lactic acid in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	内毒素,pg/mL				D-乳酸,mg/L			
	1 h	4 h	8 h	16 h	1 h	4 h	8 h	16 h
正常组	9.42±2.07	9.60±1.93	9.33±2.00	9.59±2.13	21.20±3.14	21.90±2.90	21.39±2.98	21.77±3.09
休克组	312.99±19.14*	450.63±23.30*	462.40±25.50*	482.40±26.50*	120.73±11.24*	160.02±17.30*	170.67±21.50*	190.53±24.04*
SPV 低剂量组	270.89±18.20**	240.87±15.90**	180.57±13.32**	106.48±9.65**	80.23±8.20**	119.87±15.00**	122.57±16.32**	75.48±4.65**
SPV 中剂量组	241.32±16.73**Δ	215.45±17.19**Δ	135.04±13.34**Δ	32.85±4.17**Δ	44.37±5.01**Δ	89.45±9.19**Δ	80.04±11.34**Δ	44.85±4.17**Δ
SPV 高剂量组	238.70±15.43**Δ	209.90±16.90**Δ	137.90±9.49**Δ	31.90±4.79**Δ	40.70±4.43**Δ	87.90±8.90**Δ	81.12±9.49**Δ	43.90±4.79**Δ

注:与同时时间点正常组比较,* $P<0.05$;与同时时间点休克组比较,** $P<0.05$;与同时时间点 SPV 低剂量组比较,Δ $P<0.05$
Note: vs. normal group at the same time point, * $P<0.05$; vs. shock group at the same time point, ** $P<0.05$; vs. SPV low-dose group at the same time point, Δ $P<0.05$

3.3 各组大鼠肠道细菌移位阳性率比较

与同时时间点正常组比较,休克组大鼠各时间点肠道细菌移位阳性率均显著上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与同时时间点休克组比较,SPV 低剂量组大鼠 4~16 h 各时间点以及 SPV 中、高剂量组大鼠 1~16 h 各时间点的细菌移位阳性率均显著降低,且 SPV 中、高剂量组大鼠 1~16 h 各时间点的细菌移位阳性率均显著低于 SPV 低剂量组,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 SPV 中、高剂量组大鼠同时时间点肠道细菌移位阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 3。

4 讨论

健全的肠道黏膜屏障功能可阻隔细菌和内毒素的致病作用,而失血性休克可造成肠道黏膜的通透性增加,导致肠腔内的细菌和内毒素直接侵入肠壁内,从而继续向肠道所属的肠系膜淋巴结以及血液循环系统、远端器官转移,从而进一步刺激炎症介质的释放,使机体代偿功能减弱^[11]。Nunez TC 等^[12]研究发现,肠道屏障受

表 1 各组大鼠血清中 DAO 活性比较($\bar{x} \pm s, n=5, \text{mg/mL}$)
Tab 1 Comparison of serum activities of DAO in rats of each groups($\bar{x} \pm s, n=5, \text{mg/mL}$)

组别	1 h	4 h	8 h	16 h
正常组	11.95±3.01	11.99±2.77	12.02±2.90	12.13±2.99
休克组	91.90±9.24*	111.32±14.30*	115.07±17.50*	124.53±15.04
SPV 低剂量组	60.23±5.20**	78.87±5.90**	72.57±6.60**	56.48±4.65**
SPV 中剂量组	42.37±4.01**Δ	51.45±4.19**Δ	35.94±3.34**Δ	32.85±3.17**Δ
SPV 高剂量组	41.99±4.77**Δ	52.33±5.10**Δ	37.12±3.09**Δ	32.00±2.79**Δ

注:与同时时间点正常组比较,* $P<0.05$;与同时时间点休克组比较,** $P<0.05$;与同时时间点 SPV 低剂量组比较,Δ $P<0.05$
Note: vs. normal group at the same time point, * $P<0.05$; vs. shock group at the same time point, ** $P<0.05$; vs. SPV low-dose group at the same time point, Δ $P<0.05$

3.2 各组大鼠血清中内毒素、D-乳酸含量比较

与同时时间点正常组比较,休克组大鼠各时间点血清内毒素、D-乳酸含量均显著上升,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与同时时间点休克组比较,SPV 各剂量组大鼠各时间点血清内毒素、D-乳酸含量均显著降低,且 SPV 中、高剂量组显著低于 SPV 低剂量组、差异均有统计学意义($P<0.05$);而 SPV 中、高剂量大鼠同时时间点血清内毒素、D-乳酸含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表 2。

表 3 各组大鼠肠道细菌移位阳性率比较[$n=5$,只(%)]
Tab 3 Comparison of positive rates of bacterial translocation in rats of each group[$n=5$,case(%)]

组别	1 h	4 h	8 h	16 h
正常组	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
休克组	1(20)*	4(80)*	5(100)*	5(100)*
SPV 低剂量组	1(20)*	3(60)**	3(60)**	4(80)**
SPV 中剂量组	0(0)**Δ	2(40)**Δ	2(40)**Δ	2(40)**Δ
SPV 高剂量组	0(0)**Δ	2(40)**Δ	2(40)**Δ	2(40)**Δ

注:与同时时间点正常组比较,* $P<0.05$;与同时时间点休克组比较,** $P<0.05$;与同时时间点 SPV 低剂量组比较,Δ $P<0.05$
Note: vs. normal group at the same time point, * $P<0.05$; vs. shock group at the same time point, ** $P<0.05$; vs. SPV low-dose group at the same time point, Δ $P<0.05$

损、机体免疫功能损伤、肠道菌群失调是导致细菌移位的三大机制,且肠道屏障受损是尤为重要的因素。因此,预防细菌移位、降低内毒素水平对于防止 MODS、MOF 具有重要意义。
蒙脱石散是由双四面体氧化硅及八面体氧化铝组

成的具多层纹状结构的不溶性铝酸盐矿物质,粒径为1~3 μm ,具有比表面积大且电荷分布不均的特点。基于这种特殊结构,蒙脱石散可作为一种肠黏膜保护剂,在消化道黏膜形成保护层,抑制细菌与病毒的侵袭,减少肠道黏膜损伤的发生^[13]。多黏菌素B是一种多肽类抗生素,对多数革兰氏阴性杆菌具有灭活作用,并且对静止期和生长繁殖期细菌均有效^[14]。经相关卫生行政部门批注,日本医疗机构已开始使用含多黏菌素B的纤维素吸附剂治疗革兰氏阴性杆菌引起的败血症休克,取得了显著的效果^[15-16]。维生素B₆作为一种水溶性维生素,参与多种代谢反应,并可促进机体微循环,具有一定的解毒作用^[17]。根据上述药物的作用特点,参照2015年版《中国药典》(二部)^[8]和本课题组前期研究^[18],本研究制备了内毒素亲和吸附剂SPV,并以失血性休克模型大鼠为对象,初步考察了SPV对其肠道通透性和细菌移位的影响。鉴于前期已有成果,本研究暂未设置阳性对照组。

当肠道黏膜受到损伤时,DAO会被释放入血,因此其活性强弱可间接反映肠道黏膜的受损程度^[16]。内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁结构中的脂多糖成分,在细菌死亡后,可从其细胞中释放到血液中^[19-22];D-乳酸是胃肠道固有细菌的代谢产物,是具有高度活性的细胞内酶^[23-24];两者可间接反映肠道黏膜的通透性。本研究结果显示,休克组大鼠的血清DAO活性以及内毒素、D-乳酸含量均较正常组显著增强或上升,差异均有统计学意义,提示模型大鼠在发生缺血性休克时,其肠道黏膜明显受损,且通透性增加。经不同剂量SPV预处理后,各给药组大鼠上述指标均较休克组显著减弱或下降,且SPV中、高剂量组显著低于SPV低剂量组,差异均有统计学意义,提示SPV对肠道黏膜损伤及通透性具有一定的改善作用,且呈一定的量效关系。在本研究过程中,笔者发现各给药组大鼠血清DAO活性以及D-乳酸含量均先上升后下降,而血清内毒素含量的变化则未见类似趋势,提示上述血清学指标对SPV的敏感性有所不同。

本研究结果还显示,休克组大鼠的肠道细菌移位阳性率较正常组显著升高,差异均有统计学意义。这表明发生失血性休克后,休克组大鼠肠道内细菌的迁移明显增多。经不同剂量SPV预处理后,各给药组大鼠的肠道细菌迁移阳性率均显著下降,且SPV中、高剂量组显著低于SPV低剂量组,差异均有统计学意义。这表明SPV可明显抑制模型大鼠肠道内的细菌迁移,并呈一定的量效关系。同时笔者还发现,休克组大鼠的细菌移位阳性率在8 h时达到100%,而SPV中、高剂量组大鼠细菌移位阳性率高峰则出现较早(4 h时),且出现峰值后趋于稳定;SPV低剂量组大鼠细菌移位阳性率虽较休克组有所降低,但后期仍有所升高,提示低剂量SPV虽在一定程度上延缓了细菌的移位,但要稳定地阻止肠道细菌移位仍显不足。

综上所述,不同剂量的SPV均可显著降低失血性休克模型大鼠血清DAO活性及内毒素、D-乳酸含量,并降

低肠道细菌移位阳性率,且中、高剂量的效果更好。这提示SPV可剂量依赖性地减轻其肠道黏膜的损伤,并改善其肠壁通透性,减少其细菌移位。但本研究仍存在以下不足:(1)失血性休克致肠道黏膜损伤的机制十分复杂,应进一步探讨其相关抗损伤因素,寻找更有效的防治措施;(2)本研究仅初步探讨了失血性休克后吸附剂SPV对大鼠肠道黏膜的保护作用,但其具体的作用机制尚有待后续研究进一步完善;(3)本研究的SPV给药为造模前预防性给药,其给药时间点的选择与临床实际情况不符,但本研究首要目的在于探究新型吸附剂SPV是否有效,同时为避免休克后经口灌服所致的误吸,本研究采用了预防性给药方式;(4)由于研究条件的限制,本研究未将SPV与其他吸附剂的作用进行比较,故仍有待于后续研究进一步证实。

参考文献

- [1] WILMORE DW, SMITH RJ, O'DWYER ST, et al. The gut: a central organ after surgical stress[J]. *Surgery*, 1988, 104(5):917-923.
- [2] MANN V, MANN S, SZALAY G, et al. Treatment of polytrauma in the intensive care unit[J]. *Anaesthetist*, 2010, 59(8):739-761.
- [3] PETRONI RC, BISELLI PJ, LIMA TM, et al. Impact of time on fluid resuscitation with hypertonic saline (NaCl 7.5%) in rats with LPS-induced acute lung injury[J]. *Shock*, 2015, 44(6):609-615.
- [4] JEONG KY, SUH GJ, KWON WY, et al. The therapeutic effect and mechanism of niacin on acute lung injury in a rat model of hemorrhagic shock: down-regulation of the reactive oxygen species-dependent nuclear factor κB pathway[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2015, 79(2):247-255.
- [5] BERG RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract[J]. *Trends Microbiol*, 1995, 3(4):149-150.
- [6] 张波,何建川.血液灌流用内毒素吸附剂的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2011, 40(5):153-154.
- [7] CHANDY T, RAO GH. Evaluation of heparin immobilized chitosan-PEG microbeads for charcoal encapsulation and endotoxin removal[J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, 2000, 28(1):65-77.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:729.
- [9] 梁红山.国家标准中菌落数检测的有关疑点探讨[J]. *现代预防医学*, 2001, 28(4):505.
- [10] 陈华,刘亚千,黄丽洁,等.灵光注射液对失血性休克大鼠胃肠黏膜的保护作用[J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(2):107-110.
- [11] SPAHN DR, BOUILLON B, CERNY V, et al. Management of bleeding and coagulopathy following major trauma: an updated European guideline[J]. *Crit Care*, 2013. DOI:10.1186/cc12685.
- [12] NUNEZ TC, VOSKRESENSKY IV, DOSSETT LA, et al. Early prediction of massive transfusion in trauma: simple

粉防己碱对神经母细胞瘤细胞增殖和迁移、侵袭能力的影响及其机制研究

邓 香*(成都市第五人民医院儿科,成都 611130)

中图分类号 R730.264;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0211-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.14

摘 要 目的:探讨粉防己碱(TET)对神经母细胞瘤细胞增殖和迁移、侵袭能力的影响及其作用机制。方法:以人神经母细胞瘤细胞系IMR-32细胞、SH-SY5Y细胞为研究对象,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)方法检测浓度分别为0(空白对照)、2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的TET对细胞增殖的影响;采用Transwell小室迁移实验和侵袭实验,考察正常对照组(TET浓度为0 $\mu\text{mol/L}$)和TET组(10 $\mu\text{mol/L}$,IMR-32细胞;15 $\mu\text{mol/L}$,SH-SY5Y细胞)的细胞跨膜情况;采用Western blotting法检测按上述浓度TET处理后的IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞中金属基质蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、 β -catenin、糖原合成激酶3 β (GSK3 β)、磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)的蛋白表达水平。结果:5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的TET可显著降低IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的存活率($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其半数抑制浓度分别为10.148、14.461 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞迁移实验和侵袭实验结果显示,与正常对照组比较,TET组跨膜细胞数均显著减少($P<0.01$);Western blotting法检测结果显示,与正常对照组比较,TET组细胞中MMP-2、MMP-9、 β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。结论:TET对神经母细胞瘤细胞的增殖和迁移、侵袭能力具有明显的抑制作用,其机制与下调细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达及抑制Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 粉防己碱;神经母细胞瘤;IMR-32细胞;SH-SY5Y细胞;增殖;迁移;侵袭

Study on the Effects of Tetrandrine on Proliferation and Migration, Invasion Ability of Neuroblastoma Cells and Its Mechanism

DENG Xiang(Dept. of Pediatrics, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of tetrandrine (TET) on the proliferation and migration, invasion ability of neuroblastoma cells and its mechanism. METHODS: Human neuroblastoma cell lines IMR-32 and SH-SY5Y were chosen as objects. MTT assay was used to detect the effects of 0 (blank control), 2.5, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$ TET on cell proliferation. The transmembrane number of normal control group (TET concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$) and TET group (10 $\mu\text{mol/L}$ for IMR-32 cells, 15

as ABC: assessment of blood consumption? [J]. *J Trauma*, 2009, 66(2):346-352.

[13] 刘劲.蒙脱石散在临床上的应用[J].医药与保健:下旬刊, 2009;72-73.

[14] 黎源,吴疆.肠道细菌移位的研究进展[J].世界华人消化杂志, 2015, 23(6):938-943.

[15] RONCO C, KLEIN DJ. Polymyxin B hemoperfusion: a mechanistic perspective[J]. *Crit Care*, 2014. DOI: 10.1186/cc13912.

[16] AOKI H, KODAMA M, TANI T, et al. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber[J]. *Am J Surg*, 1994, 167(4): 412-417.

[17] 岳茂兴.偏二甲胍中毒损伤特点及其临床救治对策研究[J].总装备部医学学报, 2001, 3(3):155-157.

[18] 刘海,赵剑秋,彭晓静,等.内毒素亲和吸附剂对失血性休克大鼠NO、SOD及MDA水平的影响[J].中国老年学杂志, 2016, 36(7):1563-1565.

[19] WONG J, VILAR E, FARRINGTON K. Endotoxemia in

end-stage kidney disease[J]. *Semin Dial*, 2015, 28(1): 59-67.

[20] ALAMILI M, BENDTZEN K, LYKKESFELDT J, et al. Effect of melatonin on human nighttime endotoxaemia: randomized, double-blinded, cross-over study[J]. *In Vivo*, 2014, 28(6):1057-1063.

[21] SCOTT LJ, FIGGITT DP. Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis[J]. *CNS Drugs*, 2004, 18(6): 379-396.

[22] ZHAO L, LUO L, JIA W, et al. Serum diamine oxidase as a hemorrhagic shock biomarker in a rabbit model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8):e102285.

[23] ZHANG L, FAN X, ZHONG Z, et al. Association of plasma diamine oxidase and intestinal fatty acid-binding protein with severity of disease in patient with heat stroke[J]. *Am J Emerg Med*, 2015, 33(7):867-871.

[24] LIU W, SHAN LP, DONG XS, et al. Combined early fluid resuscitation and hydrogen inhalation attenuates lung and intestine injury[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(4):492-502.

* 主治医师,硕士研究生。研究方向:新生儿疾病。电话:028-82723432。E-mail:deng521xiang@163.com

(收稿日期:2018-06-11 修回日期:2018-11-12)
(编辑:张元媛)

中国药房 2019年第30卷第2期

China Pharmacy 2019 Vol. 30 No. 2 • 211 •