

肠 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002243

RhGM-CSF 对 SAP 大鼠肠黏膜屏障的保护性作用

严 苹¹, 王 清², 刘 宇², 陈 霞¹

(1. 西南医科大学附属医院消化内科, 泸州 646000; 2. 乐山市人民医院肝胆胰外科, 乐山 614000)

【摘要】目的:探讨重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, rhGM-CSF)在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)肠黏膜屏障功能中的保护作用。**方法:**SD 雄性大鼠 36 只,随机均分为 3 组:对照组(假手术组)、胰腺炎组(SAP 组)、治疗组(SAP+rhGM-CSF 组)。采用逆行胰胆管注射 3%牛磺胆酸钠溶液制造重症胰腺炎大鼠模型,治疗组造模成功后,皮下注射 rhGM-CSF 3 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 5 \text{ d}$ 。5 d 后处死大鼠,观察小肠组织形态学、CD4⁺/CD8⁺值及肠道菌群结构改变。**结果:**SAP 大鼠均无死亡,各组黏膜层出现明显病理改变。与胰腺炎组相比,治疗组小肠黏膜损伤明显减轻,上皮细胞基本完整,绒毛排列紧密,小肠腺加深且数量较多,杯状细胞和血管内皮细胞增多,黏膜厚度及肠壁水肿减轻;固有层 CD8⁺淋巴细胞数明显减少,CD4⁺/CD8⁺值明显增高。胰腺炎组与对照组相比肠道菌群明显改变;治疗组双歧杆菌、乳酸杆菌均明显高于胰腺炎组[(6.34 $\pm$ 4.64) ln/g vs. (3.71 $\pm$ 4.96) ln/g, (9.52 $\pm$ 3.86) ln/g vs. (5.17 $\pm$ 2.14) ln/g, $P < 0.05$],而大肠杆菌与肠球菌较胰腺炎组明显降低[(7.98 $\pm$ 2.23) ln/g vs. (11.36 $\pm$ 3.74) ln/g, (4.65 $\pm$ 1.85) ln/g vs. (7.28 $\pm$ 2.63) ln/g, $P < 0.05$]。**结论:**rhGM-CSF 能改善 SAP 肠黏膜免疫屏障功能。

【关键词】重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子;肠黏膜屏障;急性重症胰腺炎

【中图分类号】R576

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-05-19

Protective effect of rhGM-CSF on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis

Yan Ping¹, Wang Qing², Liu Yu², Chen Xia¹

(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University;

2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, People's Hospital of Leshan)

【Abstract】Objective: To explore the protective effects of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis. **Methods:** 36 male SD rats were randomly and evenly divided into 3 groups: control group (sham operation group), severe acute pancreatitis model group (SAP group), and rhGM-CSF group (SAP rats treated with rhGM-CSF). The SAP rat models were established via retrograde injection of 3% sodium taurocholate to the pancreatic duct. Rats in rhGM-CSF group were hypodermically injected with rhGM-CSF with dose of 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day for 5 days. All rats were executed on day 5, and the intestinal mucosal damage, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ and the composition of intestinal flora were analyzed. **Results:** There was no death in rats with SAP, and obvious pathological changes appeared in the mucosa of both groups. Compared with SAP group, damage to intestinal mucosa of rats in rhGM-CSF group were significantly reduced, the epithelial cells were almost intact, the villi were closely arranged, the small intestine gland was deepened and the number was larger, the numbers of goblet cells and vascular endothelial cells were increased, and the mucosal thickness and intestinal wall edema were alleviated; The number of CD8⁺ lymphocytes in lamina propria was significantly reduced, and the CD4⁺/CD8⁺ ratio was obviously higher. The intestinal flora in SAP group changed evidently compared with control group. The content of Bifidobacteria and Lactobacilli of observation group were higher than those of SAP group[(6.34 $\pm$ 4.64) ln/g vs. (3.71 $\pm$ 4.96) ln/g, (9.52 $\pm$ 3.86) ln/g vs. (5.17 $\pm$ 2.14) ln/g, $P < 0.05$], while Escherichia coli and Enterococci were lower[(7.98 $\pm$ 2.23) ln/g vs. (11.36 $\pm$ 3.74) ln/g, (4.65 $\pm$ 1.85) ln/g vs. (7.28 $\pm$ 2.63) ln/g, $P < 0.05$].

Conclusion: rhGM-CSF may improve effect of intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis.

【Key words】 recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; intestinal mucosal barrier; severe acute pancreatitis

作者介绍: 严 苹, Email: 1254037277@qq.com,

研究方向: 消化内科常见病诊治。

通信作者: 陈 霞, Email: 970217858@qq.com。

基金项目: 四川省卫生和计划生育科研课题资助项目(编号: 6PJ544)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20190711.1112.002.html>

(2019-07-15)

急性胰腺炎是需要住院治疗的急腹症,重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)病情凶险,病死率高达 40%以上^[1]。肠道黏膜屏障功能紊乱(intestine barrier functional disturbance,IBFD)导致的肠道菌群移位是 SAP 继发感染的主要原因^[2-4]。早期保护肠屏障功能,可减少 IBFD 发生,阻止 SAP 病情恶化。重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,rhGM-CSF)目前成为医学界备受关注的黏膜保护因子,已被应用于促进各种原因导致的黏膜修复和愈合。然而 rhGM-CSF 对 SAP 肠道屏障功能的保护作用尚未广泛推崇。本研究旨在观察 rhGM-CSF 对 SAP 大鼠肠道屏障功能的影响。

1 材料及方法

1.1 材料

SD 雄性大鼠 36 只,体质量 250 g,购自上海毕凯公司;牛磺胆酸钠购于美国 Sigma 公司;rhGM-CSF 为长春金赛药业有限责任公司产品;选择性活菌培养平板来自合肥兰旭生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立与分组 36 只 SD 大鼠经适应性喂养 2 周后,用 1%戊巴比妥钠腹腔内麻醉,上腹正中切口进腹,于十二指肠系膜缘逆行插入注射器至胆胰管,按注射成分的不同分为 3 组,每组 12 只:对照组(假手术组)注射生理盐水 2 mL/kg,缝合腹腔;胰腺炎组(SAP 组)注射 3%牛磺胆酸钠溶液 2 mL/kg;治疗组(SAP+rhGM-CSF 组)胰腺炎模型建立

后,连续皮下注射 rhGM-CSF 3 $\mu\text{g}/\text{kg} \times 5 \text{ d}$ ^[5]。所有动物均自由饮水和进食。

1.2.2 观察指标 5 d 后处死动物,在相同部位取各组血、胰腺、小肠等标本,用甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色,观察胰腺及小肠黏膜组织病理改变。用亲和免疫组织化学法检测小肠黏膜 CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞数,并计算 CD4⁺/CD8⁺值。收集各组肠道菌群在选择性细菌培养平板上进行乳酸杆菌、双歧杆菌、大肠杆菌、肠球菌培养,需氧菌培养 48 h、厌氧菌培养 72 h 后,均采用平板活菌计数法进行细菌计数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,采用卡方检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

本研究中无动物死亡。治疗组有一只大鼠在皮下注射 rhGM-CSF 第 1 天,注射部位轻度发红,未予任何处理后自行缓解,其余动物均未出现并发症。

2.2 胰腺组织学改变

与对照组相比,模型组肉眼可见胰腺形态不规则、明显水肿,伴被膜下出血及胰周脂肪坏死;光镜下观察,胰腺小叶结构模糊,炎性细胞浸润明显及纤维化形成。

2.3 小肠黏膜组织学改变

对照组黏膜结构完整,肠壁及黏膜厚度正常。胰腺炎组与对照组相比,小肠壁及黏膜层明显水肿,小肠绒毛缩短、稀疏,上皮细胞间断裂明显,固有层结缔组织松散,小肠腺体数量减少且深度变浅。治疗组与胰腺炎组对比,黏膜损伤明显减轻,黏膜及肠壁轻度水肿,绒毛变长且数量增加,上皮细胞结构基本完整,小肠腺体数量增多并加深(图 1,表 1)。

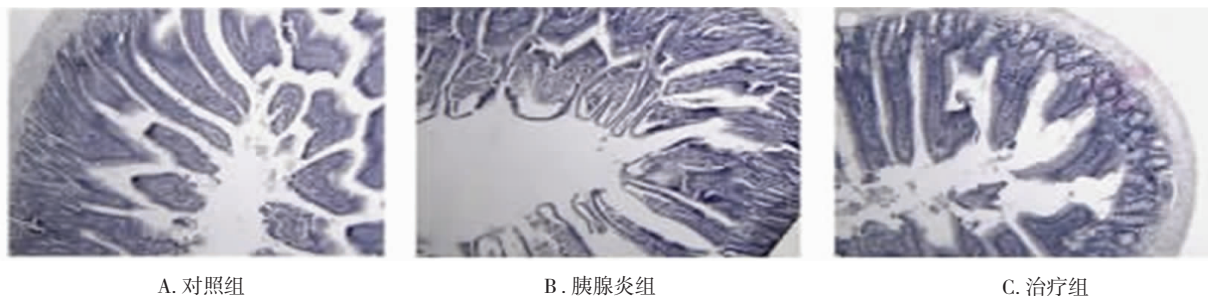


图 1 小肠黏膜组织学改变

表 1 小肠黏膜组织形态学变化($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

组别	肠壁厚度	黏膜厚度	绒毛高度	腺体深度
对照组($n=12$)	573.47 ± 57.54	475.21 ± 34.57	446.32 ± 25.65	298.52 ± 45.76
胰腺组($n=12$)	866.93 ± 59.42^a	691.47 ± 36.37^a	211.25 ± 21.76^a	185.77 ± 52.37^a
治疗组($n=12$)	615.53 ± 61.36^b	536.45 ± 33.52^b	376.63 ± 24.42^b	263.82 ± 49.54^b

注:a,与对照组比较, $P=0.000$;b,与胰腺组比较, $P=0.000$

2.4 小肠黏膜 CD4⁺、CD8⁺淋巴细胞数检测

对照组小肠黏膜中 CD4⁺淋巴细胞数明显增多,胰腺组明显减少且低于治疗组($P<0.05$);治疗组 CD8⁺淋巴细胞数较胰腺组减少($P<0.05$),与对照组相差不大。治疗组与对照组 CD4⁺/CD8⁺相差无明显,均明显高于胰腺组(表 2)。

表 2 小肠黏膜 CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞数检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
对照组 ($n=12$)	5.1 ± 0.9	3.9 ± 1.1	1.3 ± 0.8
胰腺组 ($n=12$)	3.2 ± 1.2^a	4.6 ± 0.8^a	0.7 ± 1.5^a
治疗组 ($n=12$)	4.7 ± 1.1^{bc}	4.0 ± 1.0^b	1.2 ± 1.1^b

注:a、c,与对照组比较, $P=0.000$;b:与胰腺组比较, $P=0.000$

2.5 肠道菌群结构检测

胰腺炎组双歧杆菌和乳酸菌含量比对照组明显减少 [$(3.71 \pm 4.96) \ln/g$, $(5.17 \pm 2.14) \ln/g$; $(8.43 \pm 4.34) \ln/g$, $(10.35 \pm 2.73) \ln/g$, $P<0.001$], 治疗组双歧杆菌和乳酸菌含量与胰腺炎组相比增高明显 [$(6.34 \pm 4.64) \ln/g$, $(9.52 \pm 3.86) \ln/g$; $(3.71 \pm 4.96) \ln/g$, $(5.17 \pm 2.14) \ln/g$, $P<0.001$]。与对照组相比,治疗组大肠杆菌和肠球菌含量增加但低于胰腺组 [$(5.72 \pm 3.35) \ln/g$, $(3.23 \pm 2.17) \ln/g$; $(7.98 \pm 2.23) \ln/g$, $(4.65 \pm 1.85) \ln/g$; $(11.36 \pm 3.74) \ln/g$, $(7.28 \pm 2.63) \ln/g$, $P<0.05$](表 3)。

3 讨论

SAP 具有起病急、进展快、病死率高的特点,早期发生胰腺坏死,后期因肠道黏膜损伤导致的菌群移位是影响 SAP 预后的重要因素^[6]。大量研究证实,早期维护肠道黏膜屏障功能可减少肠道细菌和毒素转移,明显改善 SAP 病情^[7-8]。

rhGM-CSF 是近年来医学研究的一个热门因子,在鼠肺条件培养液中首次发现。随后人类 GM-CSF 基因被克隆与推崇,因而 rhGM-CSF 得到关注并逐渐在黏膜修复中得到运用。rhGM-CSF 是一种具有多项潜能的造血因子,不仅可以刺激骨髓造血前体细胞分化、成熟与转移,而且也可促进巨噬细胞、成纤维细胞、角质细胞、皮肤黏膜细胞等不同程度生长。rhGM-CSF 因具有丰富的价值而广泛应用

于临床,最为人熟知的是改善骨髓抑制状态、调节机体免疫力,以及抗病毒、抗真菌感染等作用^[9]。近些年来,其临床热点转移至促进创面愈合,从而激发人们将其应用于黏膜修复损伤。黏膜损伤愈合大体经历炎症反应、增殖、重塑^[10]3 个循序渐进又相互重叠的过程,需要一系列细胞炎性因子参与。研究发现,rhGM-CSF 可有效启动修复的链接反应,通过促进免疫细胞向外周血转移,增强吞噬和分泌功能,提高创面抗感染能力;诱导内皮细胞增生和成熟,促进新生血管形成和再通。同时,促进表皮细胞迁移、增殖,调节成纤维细胞的表型,促进其向肌成纤维细胞转化,降低黏膜的通透性,减少毒素和细菌移位,从而明显提高肠道表皮的屏障功能^[11-12]。本研究结果显示,SAP 大鼠小肠壁和黏膜层明显水肿,肠绒毛缩短、稀疏,上皮细胞间断裂明显,固有层结缔组织松散,小肠腺体数量减少且深度变浅。经 rhGM-CSF 治疗后,大鼠黏膜损伤明显减轻,黏膜及肠壁轻度水肿,绒毛变长且数量增加,上皮细胞结构基本完整,小肠腺体数量增多并加深。因此,rhGM-CSF 能有效缓解小肠黏膜损伤的程度,促进小肠绒毛及小肠上皮结构完整性的恢复。

肠道的免疫屏障是肠黏膜抵御外界反应不可或缺的成分,由先天性和获得性免疫细胞及各种细胞因子共同参与。天然免疫细胞及其效应因子是维持肠道黏膜稳态的第一道防线,能减轻病原体侵袭力、中和毒素,具有广泛的抗炎、清除坏死组织作用。免疫细胞是保护肠道黏膜屏障的重要物质。本研究对照组小肠黏膜中 CD4⁺淋巴细胞数明显增多,胰腺组明显减少且低于治疗组;治疗组 CD8⁺淋巴细胞数较胰腺组减少,与对照组相差不大。CD4⁺减少使细菌清除率下降,CD8⁺明显增加可抑制 B 淋巴细胞的功能,减少抗体分泌并抑制体液免疫功能,导致 sIgA 分泌减少,表明肠黏膜免疫功能障碍。治疗组与对照组相比,CD4⁺/CD8⁺相差无明显,但明显高于

表 3 肠道菌群结构比较 ($\bar{x} \pm s, \ln/g$)

组别	肠杆菌	肠球菌	双歧杆菌	乳酸杆菌
对照组 ($n=12$)	5.72 ± 3.35	3.23 ± 2.17	8.43 ± 4.34	10.35 ± 2.73
胰腺组 ($n=12$)	11.36 ± 3.74^a	7.28 ± 2.63^a	3.71 ± 4.96^a	5.17 ± 2.14^a
治疗组 ($n=12$)	7.98 ± 2.23^{bc}	4.65 ± 1.85^{bc}	6.34 ± 4.64^{bc}	9.52 ± 3.86^{bc}

注:a、c,与对照组相比, $P=0.000$;b:与胰腺炎组相比, $P=0.017$

胰腺组,与 Greven 等^[13]的研究结果一致。急性胰腺炎时 CD4⁺/CD8⁺降低与病情严重程度相关。给予 rhGM-CSF 治疗后,中性粒细胞及巨噬细胞明显增加,分泌多种细胞、生长因子及促进酶活化等作用加强^[14],使 CD4⁺/CD8⁺值升高,有效增强细胞免疫功能,促进 B 淋巴细胞增长和活化,提高胰腺局部及全身免疫力。

炎症反应贯穿胰腺炎病理生理的整个过程,而肠源性感染加速胰腺炎损伤和各脏器并发症的发生^[15],由肠道感染继发的全身炎症反应程度与患者预后密切联系。早期提高机体免疫力,增强其对炎症损伤的抵抗力,能明显纠正感染风险。肠道菌群结构的变化在胰腺炎进程中具有重要的意义,维持肠道黏膜屏障功能修复,有助于改善肠道菌群结构紊乱,减少细菌移位及内毒素释放入血,减轻全身炎症反应程度^[16]。本研究显示,与胰腺炎组相比,治疗组双歧杆菌和乳酸菌含量明显升高,而大肠杆菌和肠球菌含量明显减低。

rhGM-CSF 对肠黏膜屏障的保护是多方向的,不仅可作为促免疫细胞增殖的活化因子,同时对肠道黏膜屏障愈合有重要意义,但具体的机制还需进一步探究。

参 考 文 献

- [1] Ji L, Lv JC, Song ZF, et al. Risk factors of infected pancreatic necrosis secondary to severe acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2016, 15(4): 428–433.
- [2] 许守明. 早期肠内营养与延迟肠内营养对重症急性胰腺炎患者腹内高压及免疫功能的影响[J]. 中国全科医学, 2016, 19(14): 1711–1714.
- [3] 沈波, 虞洪, 郭丰, 等. 重症急性胰腺炎合并医源性十二指肠瘘的分析与微创治疗[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(18): 1418–1420.
- [4] 王玮, 张露. 谷氨酰胺联合早期肠内营养治疗急性重症胰腺炎疗效观察及对炎症因子的影响[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(5): 682–685.
- [5] Grabein B, Graninger W, Rodríguez Baño J, et al. Intravenous fosfomycin—back to the future. Systematic review and meta-analysis of the clinical literature[J]. Clin Microbiol Infect, 2017, 23(6): 363–372.
- [6] 李燕, 吴浩, 邓一芸, 等. 重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的变化[J]. 生物医学工程学杂志, 2015, 32(2): 412–417.
- [7] 姚宁. 浅析重症胰腺炎早期并发症多脏器功能障碍综合征的危险因素[J]. 中国实用医药, 2014, 5(31): 30–31.
- [8] Yan B, Tegpal A, Santhi SV. Drug therapy for acute pancreatitis[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2015, 13(3): 354–368.
- [9] 李厚东, 段砚方, 唐江南, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子凝胶联合黄连纱条治疗中厚皮供皮区创面的疗效观察[C]. 中国中西医结合学会会议论文集, 2018: 259–261.
- [10] Jiang N, Tian Z, Tang J, et al. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF) downregulates the expression of protumor factors cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a GM-CSF receptor-independent manner in cervical cancer cells[J]. Mediators Inflamm, 2015, 20(15): 601–604.
- [11] 朱国强, 冯晋斌, 吴学斌, 等. 重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子治疗中厚皮取皮区创面的临床研究[J]. 中国药物与临床, 2014, 14(1): 79–81.
- [12] 顾慧媛, 高欣, 钱丽娟, 等. 益生菌联合早期肠内营养治疗对重症急性胰腺炎患者血清炎症因子、肠黏膜屏障功能的影响[J]. 海南医学, 2017, 36(23): 3793–3795.
- [13] Greven DE, Cohen ES, Gerlag DM, et al. Preclinical characterisation of the GM-CSF receptor as a therapeutic target in rheumatoid arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(10): 1924–1930.
- [14] Véganzones J, Montero A, Maseda E. New evidence on the use of fosfomycin for bacteremia and infectious endocarditis[J]. Rev Esp Quimioter, 2019, 32(S1): 25–29.
- [15] 王茂林, 陈竹, 冯碧敏, 等. 益生菌治疗重症急性胰腺炎的随机对照试验 Meta 分析[J]. 现代预防医学, 2017, 41(19): 2672–2676.
- [16] Fishman JE, Levy G, Alli V, et al. The intestinal mucus layer is a critical component of the gut barrier that is damaged during acute pancreatitis[J]. Shock, 2014, 42(3): 264–270.

(责任编辑:张辉洁)