

清热解毒方和凉血活血方防治大鼠术后腹腔粘连的组织形态学研究

白景瑞¹, 吴咸中², 刘洪斌³, 李东华², 崔丽华², 高巧营², 宗春晖², 张一²

摘要 目的: 观察清热解毒方和凉血活血方对大鼠术后腹腔粘连的防治效果并探索其机制。**方法:** 健康雄性 Wistar 大鼠 120 只随机分为 6 组, 采用十二指肠钳夹法制作大鼠腹腔粘连模型, 分别治疗 7 d 并记录生存情况。术后 14 天时处死剖验并对粘连情况评分, 取粘连组织进行 HE 染色和苦味酸-天狼星红染色, 镜下观察并摄片, 对粘连组织纤维化、炎症、血管增殖及 I、III 型胶原含量进行评价。**结果:** 4 个治疗组的生存情况与模型组无明显差异 ($P>0.05$)。清热解毒方术后腹腔粘连范围、强度评分, 纤维化评分, 血管增殖评分, I、III 型胶原含量均低于其他治疗组 ($P<0.05$)。炎症评分无统计学差异 ($P>0.05$)。**结论:** 清热解毒方、凉血活血方均有良好的抗粘连效果, 以清热解毒方为优; 抗粘连机理可能与中药的抗炎作用, 促进术后肠蠕动恢复, 减轻炎症渗出及纤维蛋白基质沉积有关。

关键词: 清热解毒; 凉血活血; 腹腔粘连; 组织形态学

中图分类号: Q95-33; R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-6948(2019)05-0659-05

doi: 10.3969/j.issn.1007-6948.2019.05.001

Morphological Study on Prevention of Qingre Jiedu Herbs and Liangxue Huoxue Herbs for Postoperative Abdominal Adhesion in Rats BAI Jing-rui, WU Xian-zhong, LIU Hong-bin, et al. *Tianjin Nankai Hospital, Tianjin (300100), China*

Abstract : Objective To observe the prevention of Qingre Jiedu Herbs and Liangxue Huoxue Herbs on postoperative abdominal adhesion in rats and explore the mechanism. **Methods** The healthy Wistar rats (120 cases) were randomly divided into 6 groups and then made into postoperative abdominal adhesion model by duodenum clamped. The protective measures or medicines were given respectively for 7 d, and the survival rate was recorded. Adhesions were evaluated on day 14 post-surgical, specimens were collected for histological staining and grading. **Results** There was no difference in survival rate of 4 treatment groups and model group ($P>0.05$). The scores of adhesion range and strength, the fibrosis and neovascularization and the content of type I and III collagen of Qingre Jiedu group were lower than those in other treatment groups ($P<0.05$). The inflammation had no statistical difference ($P>0.05$). **Conclusion** Qingre Jiedu Herbs and Liangxue Huoxue Herbs can both decrease the postoperative abdominal adhesion formation, and the effect of Qingre Jiedu Herbs was better. The reason may be that these herbs can suppress inflammatory, promote the recovery of bowel movement, reduce the inflammatory exudation and fibrin substrate transformation after the operation.

Key words: Qingre Jiedu; Liangxue Huoxue; abdominal adhesion; morphology

腹腔粘连是腹部手术后常见的并发症之一, 轻则引起腹部不适、慢性腹痛, 重则导致粘连性肠梗阻、女性不孕等不良后果^[1]。清热解毒方和凉血活血方是天津南开医院应用多年的临床验方,

对于改善术后腹腔粘连等并发症有良好的治疗效果。为进一步探索清热解毒方和凉血活血方对术后腹腔粘连的防治机理, 我们以腹腔粘连大鼠模型为研究对象, 通过多种组织形态学方法观察其疗效, 并探索其可能机制, 为将来的药物开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 水合氯醛购自天津市化学试剂

1. 天津市南开医院肝胆胰外科一 (天津 300100)

2. 天津市南开医院急腹症研究所 (天津 300100)

3. 天津市医药科学研究所 (天津 300020)

通信作者: 吴咸中, E-mail: wuxianzhongdoctor@hotmail.com

批发公司。10% 中性甲醛溶液、水合氯醛购自天津化学试剂公司；天狼星红 (Direct Red 80) 购于 Sigma 公司，饱和苦味酸溶液购于南京建成生物工程研究所。甲硝唑片 (批号 20160819) 由天津太平洋制药有限公司生产，头孢氨苄片 (批号 20161026) 由哈药集团制药总厂制剂厂生产，聚乳酸防粘连凝胶 (批号 20170612) 购自石家庄瑞诺生物医学材料有限公司。全自动脱水机 LEICA-ASP200S，包埋机 LEICA-EG1150H、LEICA-EG1150 C，切片机 LEICA-RM2235，摊片机 LEICA-H1210，烤片机 LEICA-H1220，显微镜 LEICA-DM4000B，偏光显微镜 LEICA-DM2500P，图像系统软件版本 (LAS Version 3.7.0)，均为德国 LEICA 公司产品。电热恒温鼓风干燥箱 DHG101-A 由河南予华仪器有限公司生产。

1.2 实验动物 SPF 级 10 周龄健康 Wistar 大鼠 120 只，雄性，体重 (260 ± 10) g，由天津市山川红实验动物科技有限公司提供，动物批号 SCXK (津) 2016-0001。在实验前，大鼠在 SPF 级动物室中适应 1 周，给予标准动物饲料和水，环境温度维持在 18~26 °C，相对湿度 30%~70%，明暗交替周期为 12/12h。

1.3 方剂构成及配制方法 清热解毒方由大黄、黄芩、白头翁、败酱草组成，比例为 10 : 3 : 6 : 2。凉血活血方由红藤、丹皮、赤芍、元胡组成，构成比例为 4 : 3 : 3 : 2。以上药物均采用三九现代中药有限公司提供的免煎颗粒冲剂。实验前将配方颗粒混合后，按药品说明用沸水将免煎颗粒溶解，配制每 4 mL 药液药物含量相当于 6 g 生药药量。配制后将药液冷却至室温，保存于 4 °C 冰箱备用。灌胃前先将药液恢复至室温，并充分混匀后使用。

1.4 腹腔粘连模型制备 按照课题组前期建立的大鼠腹腔粘连模型^[2]。实验动物术前禁食不禁水 12 h。以 10% 水合氯醛 (3 mL/kg 体重) 腹腔注射麻醉。麻醉满意后将大鼠仰卧固定于手术板上，腹部备皮，经安尔碘消毒皮肤后开始手术：取上腹部正中切口约 2 cm 长，找到十二指肠，自幽门而下，每隔 0.5 cm 用小号止血钳钳夹肠管，钳夹时止血钳与肠管垂直，持续 3 秒，共钳夹 9 处，而后将肠管纳回腹腔，逐层缝合腹壁切口。假手术组只开腹不致伤。术后 12 h 后予自由饮水，24 h 后予标准饲料，继续分笼饲养。

1.5 实验分组及给药方法 120 只健康雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为 6 组，每组 20 只：假手术组、模型组、抗生素组、聚乳酸组、清热解毒方组、凉血活血方组。假手术组及模型组给予 4 mL 生理盐水代替。清热解毒方组、凉血活血方组于术后第 1 天开始灌胃给药，连续 7 天，每天灌胃 1 次，灌胃量 12 mL 药液 / 公斤体重。抗生素组：口服灌胃，剂量为头孢氨苄 6 mg/100 g+ 甲硝唑 7 mg/100 g，1 次 / d。聚乳酸组：造模后，将 1.5 mL 聚乳酸防粘连凝胶均匀涂抹于手术部位，关腹。术后不再给予其他任何治疗。

1.6 检测指标

1.6.1 大鼠生存情况及腹腔粘连大体评价 术后观察并记录大鼠生存情况，于术后第 14 d 处死解剖：腹部取“U”形切口开腹，首先检查腹腔粘连的发病率。粘连的范围和强度由两个非实验参与人员在双盲的情况下进行评分，两种不同的评分系统分别参考 Nair 和 Zühlke 的评分标准^[3] (详见表 1)，最后评分取两次评分的均数；同时记录粘连受累器官。

表 1 大鼠腹腔粘连大体评价标准

评分	范围	强度
0	无粘连	无粘连
1	内脏之间或者内脏与腹壁之间有 1 条粘连带	膜性粘连，易于钝性分离
2	内脏之间或者内脏与腹壁之间有 2 条粘连带	粘连有一定强度，可以钝性分离，部分需要锐性分离
3	内脏之间或者内脏与腹壁之间有 2 条以上粘连带，且内脏未直接与腹壁粘连	粘连更强韧，必须锐性分离
4	多发的密集的腹腔粘连，或者内脏直接与腹壁粘连	脏器之间很强的粘连，锐性分离会损伤脏器的浆膜

1.6.2 组织病理学评价 大体评价后，取手术部位及粘连组织标本，用 0.9% 生理盐水漂洗干净后，

经固定、蜡块包埋、常规切片等处理，采用苏木素-伊红 (HE) 染色，在显微镜下观察其组织病理变

化并摄片。

组织病理评分采用盲评法，由两位病理科医师对病理切片进行观察并评分，评价指标包括纤

维化、炎症反应和血管增殖情况^[4]，见表 2。最后结果取两次评分的均数。

表 2 腹腔粘连组织学 (HE 染色) 评价标准

评分	纤维化	炎症	新生血管密度
0	无	无	无
1	轻度	巨大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞	1~3个微血管
2	中度	巨大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞、多形核白细胞和嗜酸性粒细胞	4~10个微血管
3	重度	大量的炎症细胞及微脓肿	10个微血管以上

1.6.3 粘连部位胶原含量测定 粘连部位 I、III 型胶原含量测定采用苦味酸-天狼星红染色法^[5]，经偏光显微镜分析图像，每张切片在 200 倍视野下随机选取 5 个视野摄片，图片采用 Image-Pro® Plus v 6.0 For Windows 图像分析软件计算粘连组织中 I 型胶原和 III 型胶原染色表达的面积百分比。

1.7 统计学处理 所有数据应用 SPSS 19.0 统计学软件统计运算，各组术后生存情况绘制生存曲线，生存率比较采用寿命表 (Life Table) 法，粘连评价、胶原分析结果的比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 生存情况分析 造模后 14 天生存情况比较，清热解毒方组生存率明显高于聚乳酸治疗对照组 ($P < 0.05$)，其余各治疗组生存率与聚乳酸治疗对照组之间无显著差异 ($P > 0.05$)，见图 1。

2.2 术后腹腔粘连大体评价结果 无论是粘连的范围还是强度，各治疗组粘连评分均低于模型组，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。清热解毒方组粘连范围评分高于假手术组，显著低于抗生素组、聚

乳酸组及凉血活血方组 ($P < 0.05$)；凉血活血方组与抗生素组、聚乳酸组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。清热解毒方组粘连强度高于假手术组，低于模型组、抗生素组、聚乳酸组、凉血活血方组 ($P < 0.05$)；模型组、抗生素组、聚乳酸组、凉血活血方组之间两两比较粘连强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 2。

2.3 粘连部位组织学评价结果 纤维化评分：术后 14 天时，清热解毒方组、凉血活血方组、抗生素组均低于模型组 ($P < 0.05$)。清热解毒方组明显低于聚乳酸组 ($P < 0.05$)，但凉血活血方组与抗生素组、聚乳酸组比较无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。炎症评分：除聚乳酸组外，各组均低于模型组 ($P < 0.05$)。清热解毒方组、凉血活血方组、抗生素组之间两两比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血管增殖评分：清热解毒方组、抗生素组血管增殖评分低于模型组、聚乳酸组 ($P < 0.05$)，与假手术组比较无明显统计学差异 ($P > 0.05$)。凉血活血方组与模型组、聚乳酸组两两比较无明显差异 ($P > 0.05$)，见图 3。

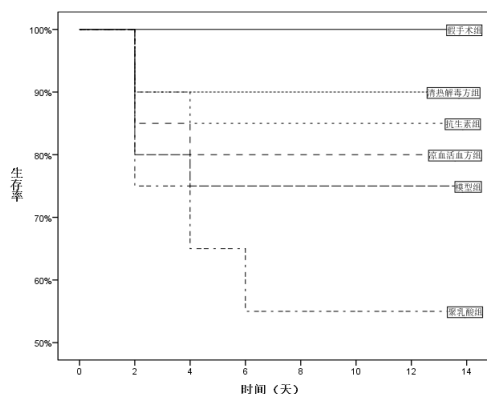


图 1 术后 14 天各实验组动物生存情况

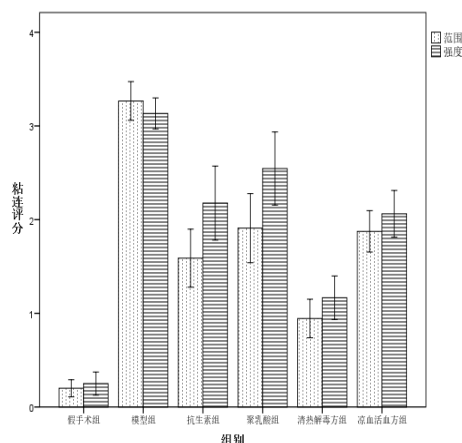


图 2 术后 14 天各实验组腹腔粘连大体评分

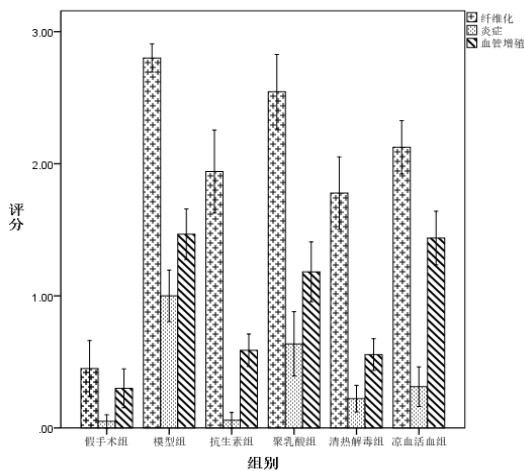


图3 术后14天各实验组粘连部位组织学评价结果(HE染色)

2.4 粘连部位胶原含量分析结果 各治疗组粘连区域 I、III 型胶原的含量均高于假手术组而低于模型组 ($P < 0.05$)。清热解毒方组 I 型胶原的含量与抗生素组、凉血活血方组无明显统计学差异 ($P > 0.05$)，明显低于聚乳酸组 ($P < 0.05$)。凉血活血方组 I 型胶原的含量与抗生素组无明显统计学差异 ($P > 0.05$)，均低于聚乳酸组 ($P < 0.05$)。清热解毒方组 III 型胶原的含量与抗生素组无明显差异 ($P > 0.05$)，低于聚乳酸组、凉血活血方组 ($P < 0.05$)。凉血活血方组 III 型胶原的含量低于聚乳酸组，而高于其他 3 个治疗组 ($P < 0.05$)，见图 4。

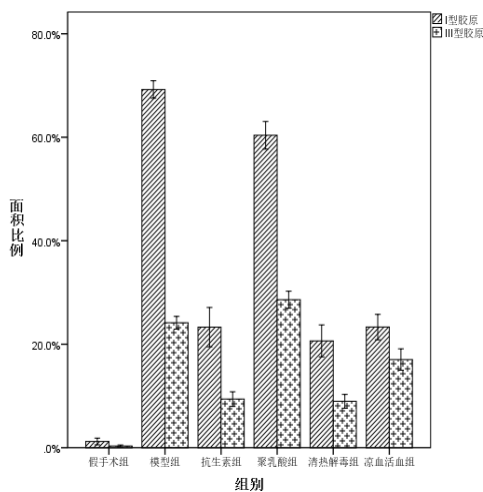


图4 术后各组粘连部位胶原含量比较(苦味酸-天狼星红染色)

3 讨论

现代医学认为腹腔粘连形成是机体应对手术打击过度应激的结果^[6]。手术及术后炎症现象引起腹膜损伤，导致手术部位血流严重减少，血管病理性增生，血管渗透性增加，炎症细胞激增。炎症渗出中激活的纤维蛋白原在两个相互连接的腹膜浆膜破损面之间，转化成胶状的纤维蛋白性基质^[7]。组织型纤溶酶原激活剂 (tissue Plasminogen Activators, tPA) 介导的纤溶酶原激活能力大大减弱，而腹膜损伤和炎症引起纤溶酶原激活剂抑制剂 (Plasminogen Activators Inhibitor, PAI) 大量产生和释放，导致机体纤溶能力的下降。沉积的纤维蛋白在术后早期未被及时降解吸收并持续存在，形成纤维素性粘连。在巨噬细胞、成纤维细胞等细胞成分以及组织碎片等参与下，纤维素性粘连转化为由成纤维细胞和不同类型的胶原构成的纤维束，在两个腹膜破损面之间形成永久的粘连。

传统中医将腹腔粘连归类于“症瘕积聚”的范畴，术后早期的中医辨证为气滞血瘀，脉络闭阻，实热内蕴，以致正气亏虚，邪实为害^[8]。

清热解毒方、凉血活血方 2 个中药治疗组术后 14 天时动物生存率与抗生素组、模型组均没有明显差异。推测其原因可能是十二指肠钳夹致术后腹腔粘连动物模型的手术创伤局限于十二指肠，虽能诱发腹腔粘连形成，却不会造成使实验大鼠致死的脓毒症，可以有效减少实验动物的需求数量^[2]。这也是该动物模型的优点之一。而聚乳酸组大鼠尸检时发现手术部位肠管缺血严重，肠腔内发现大量血凝块。这可能是在抹抗粘连凝胶时，碰触挤压等操作对手术部位造成了二次损伤，加重了肠壁出血坏死，导致本组死亡率明显高于其余各组。

清热解毒方有效成分包括多种大黄素、白头翁皂苷等。细菌学研究表明：清热解毒方能抑制多种耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌，尤其对耐药鲍曼不动杆菌和耐药铜绿假单胞菌抑菌效果佳^[9]。术后早期应用不仅能有效地减轻手术部位及周围的炎症反应^[10]，还可通过下调肠道水通道蛋白表达，兴奋肠道平滑肌，促进肠蠕动恢复，减少了手术部位贴合的时间，促进手术部位炎性渗出液的吸收^[11]，抑制纤维蛋白性基质的生成和 I、III 型胶原沉积，减少术后腹腔粘连形成的物质基础，从而有效减轻术后腹腔粘连的形成。

凉血活血方有效成分包括：丹皮酚、丹皮多糖、

延胡索乙素、绿原酸、红藤总皂苷等。前期研究表明^[12]：凉血活血方可改善脓毒症大鼠模型肠屏障功能，降低血浆内毒素水平，减少手术后腹膜炎影响，本研究也证实：凉血活血方术后抗炎效果与抗生素相当。凉血活血方能稳定肠微血管内皮细胞，减少血管的渗出与内皮细胞的分泌，降低血管内皮细胞生长因子的表达，抑制粘连组织内毛细血管的新生^[13]；提高粘连组织中 tPA 水平，抑制 PAI-1、结缔组织生长因子、成纤维细胞生长因子-10 合成，降低 I、III 型胶原含量^[12]，从而减少术后腹腔粘连。

清热解毒方和凉血活血方均有抗炎作用，以清热解毒方为优；而清热解毒方对肠道功能的改善，能确切地减少纤维蛋白性基质的形成，有效地降低粘连的强度和范围。凉血活血方对纤溶能力的改善虽能增强纤维蛋白的溶解吸收，但其抗粘连效果逊于清热解毒方。

清热解毒方、凉血活血方组对于十二指肠钳夹引起的术后腹腔粘连均有良好的防治作用，且清热解毒方优于凉血活血方。抗粘连机理与中药的抗炎作用，促进肠蠕动恢复，减轻术后炎性渗出，促进纤维蛋白基质的溶解吸收，抑制胶原的沉积和机化有关。

参考文献：

- [1] Askari VR, Rahimi VB, Zamani P, et al. Evaluation of the effects of Iranian propolis on the severity of post operational-induced peritoneal adhesion in rats[J]. Biomed Pharmacother,2018,99:346-353.
- [2] Bai J, Liu H, Li D, et al. Duodenum clamping trauma induces

significant postoperative intraperitoneal adhesions on a rat model[J]. PLoS One,2012,7(11):e49673.

- [3] Sisodia V, Sahu S K, Kumar S. Clinical Profile of Patients with Postoperative Adhesive Intestinal Obstruction and its Association with Intraoperative Peritoneal Adhesion Index[J]. Chirurgia (Bucur),2016,111(3):251-258.
- [4] Neagoe OC, Ionica M, Mazilu O. Use of methylene blue in the prevention of recurrent intra-abdominal postoperative adhesions[J]. J Int Med Res,2018,46(1):504-510.
- [5] 李春宝, 薛超, 齐玮, 等. 金葡素促进兔前交叉韧带重建后腱骨愈合的实验研究 [J]. 中国骨伤,2017,30(6):538-544.
- [6] Cheong YC, Laird SM, Li TC, et al. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation[J]. Human Reproduction Update,2001,7(6):556-566.
- [7] Chiorescu S, Andercou OA, Grad NO, et al. Intraperitoneal administration of rosuvastatin prevents postoperative peritoneal adhesions by decreasing the release of tumor necrosis factor[J]. Clujul Med,2018,91(1):79-84.
- [8] 曾煦欣, 陈应军, 毛建文, 等. 丹参素对腹膜粘连组织成纤维细胞胶原合成与降解的调控 [J]. 实用医学杂志,2018,34(13):2128-2131.
- [9] 房杰, 孙兰菊, 陈明慧, 等. 清热解毒方对耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌的抑菌作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志,2018,24(1):74-78.
- [10] 刘大全, 高巧营, 吴尚为, 等. 清热解毒方治疗大鼠实验性脓毒症的药理学观察 [J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):246-249.
- [11] 高巧营, 刘大全, 吴尚为, 等. 清热解毒方通过下调肠道水通道蛋白治疗脓毒症大鼠机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2014(2):133-136.
- [12] 鹿燕敏, 李东华, 王蓓, 等. 凉血活血方对腹腔感染脓毒症大鼠肠组织纤溶及胶原代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(21):200-203.
- [13] 王宇歆, 周静, 杜凡, 等. 凉血活血方有效组分对脓毒症大鼠肠道血液循环及氧供的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志,2012,18(4):372-375.

(收稿: 2019-02-20 发表: 2019-09-30)

· 特殊声明 ·

凡论文作者向《中国中西医结合外科杂志》投稿之时即认为作者将著作使用权转让给本刊使用并需与本刊签订论文著作使用转让合约。本刊对该作者的论文著作有审理、修改、删减、增加、编辑、出版、发行、传播等权利。特此声明。