



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.007
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.007
Chinese Journal of General Surgery, 2022, 31(9):1182-1193.

· 基础研究 ·

活血血清汤对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫屏障功能的影响及机制

梁超¹, 汪扬¹, 刘新博¹, 李善宝^{1,2}

(1.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肝胆胰外科, 上海 200437; 2.上海交通大学医学院附属上海市第一人民医院普通外科, 上海 200080)

摘要

背景与目的: 重症急性胰腺炎(SAP)易并发肠道免疫屏障功能障碍, 笔者前期发现活血血清汤可缓解SAP, 但其作用是否与肠道免疫屏障功能有关尚不清楚。因此, 本研究探讨活血血清汤对SAP大鼠肠道免疫屏障功能的作用及机制。

方法: 将SD大鼠随机分成假手术组、SAP模型组(模型组)、SAP模型+活血血清汤治疗组(治疗组), SAP模型采用5%牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射法诱导, 治疗组造模后给予活血血清汤灌胃, 假手术组与模型组给予等体积生理盐水代替。分别在术后6、12 h处死动物, ELISA检测各组血清中的促炎因子TNF- α 、抗炎因子IL-4、血淀粉酶及脂肪酶的指标变化; HE染色检测胰腺及小肠组织的病理变化; qRT-PCR及Western blot检测小肠组织巨噬细胞M1型标志物iNOS及M2型标志物Arg-1的表达。将大鼠小肠巨噬细胞分别用牛磺胆酸钠、活血血清汤、牛磺胆酸钠+活血血清汤处理, 以无处理的大鼠小肠巨噬细胞为空白对照, 用qRT-PCR及Western blot检测各组细胞NF- κ B、iNOS、TNF- α 、IL-4、Arg-1、TIPE2和PPAR- γ 的表达。

结果: 体内实验中, 与假手术组比较, 模型组与治疗组术后的TNF- α 、IL-4、血淀粉酶、脂肪酶水平均有不同程度升高(部分 $P<0.05$), 但治疗组TNF- α 、血淀粉酶、脂肪酶升高的程度明显低于模型组, 而IL-4升高的水平明显大于模型组(均 $P<0.05$); 模型组与治疗组术后胰腺与小肠组织均出现明显的病理损伤, 但治疗组的损伤程度小于模型组, 且随时间延长, 模型组的损伤程度加重, 治疗组则减轻, 模型组与治疗组胰腺与小肠组织病理评分差异均有统计学意义(均 $P<0.05$); iNOS蛋白与mRNA的表达在模型组小肠组织中表达明显升高, 而在治疗组的小肠组织中明显降低(均 $P<0.05$), Arg-1蛋白与mRNA的表达模型组小肠组织后期(12 h)明显升高, 而在治疗组的早期(6 h)与后期(12 h)均明显升高, 且升高程度大于模型组(均 $P<0.05$)。体外实验中, 单独牛磺胆酸钠处理后的大鼠小肠巨噬细胞的NF- κ B、iNOS、TNF- α 蛋白与mRNA表达水平明显上升(均 $P<0.05$), 而Arg-1、IL-4、TIPE2、PPAR- γ 蛋白及mRNA表达无明显变化(均 $P>0.05$); 单独活血血清汤处理后, 大鼠小肠巨噬细胞的Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR- γ 蛋白及mRNA表达水平明显升高(均 $P<0.05$), 而NF- κ B、iNOS、TNF- α 蛋白及mRNA表达无明显变化(均 $P>0.05$); 与单独牛磺胆酸钠处理比较, 牛磺胆酸钠+活血血清汤处理的大鼠小肠巨噬细胞的NF- κ B、iNOS及TNF- α 蛋白及mRNA表达水平明显下降, 而Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR- γ 蛋白及mRNA表达水平明显增加(均 $P<0.05$)。

结论: 中药活血血清汤对SAP大鼠的肠道免疫屏障功能有保护作用, 其作用机制可能与调控小肠巨噬细胞由M1型向M2型转化, 促进抗炎因子表达, 抑制促炎因子的释放, 进而缓解全身炎症反应有关。

关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 活血血清汤; 巨噬细胞; 肠; 大鼠

中图分类号: R657.5

基金项目: 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院青年孵育计划基金资助项目(2019YYQ03)。

收稿日期: 2022-03-30; **修订日期:** 2022-06-21。

作者简介: 梁超, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院主任医师, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

通信作者: 李善宝, Email: lishanbao1992@163.com

Effect of Huoxueqingjie decoction on intestinal immune barrier function in rats with severe acute pancreatitis and the mechanism

LIANG Chao¹, WANG Yang¹, LIU Xinbo¹, LI Shanbao^{1,2}

(1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 2. Department of General Surgery, Shanghai General Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, 200080 Shanghai, China)

Abstract

Background and Aims: Severe acute pancreatitis (SAP) is always associated with intestinal immune barrier dysfunction. The authors previously found that Huoxueqingjie (HXQJD) decoction can alleviate SAP damage, but whether this action is involved in the intestinal immune barrier function is unclear. Therefore, this study was conducted to investigate the effect of HXQJD decoction on the intestinal immune barrier function in rats with SAP, and the mechanism.

Methods: The SD rats were randomly divided into sham operation group, SAP model group (SAP group), and SAP model plus HXQJD decoction treatment group (treatment group). The SAP model was established by retrograde biliopancreatic duct infusion of 5% sodium taurocholate (NaT). After the operation, HXQJD decoction was administrated by gavage in the treatment group, and the sham operation group and model group were treated with normal saline in the same fashion. Rats were sacrificed at 6 and 12 h after the operation. The serum pro-inflammatory factor TNF- α , anti-inflammatory factor IL-4, as well as blood amylase and lipase levels were detected by ELISA assay. The pathological changes in the pancreas and small intestine were observed by HE staining. The expressions of M1 macrophage phenotype marker iNOS and M2 macrophage phenotype marker Arg-1 in small intestine tissue were determined by qRT-PCR and Western blot. Rat intestinal macrophages were treated with NaT, HXQJD decoction, or NaT plus HXQJD decoction, respectively, using the untreated rat intestinal macrophages as blank control. The expressions of NF- κ B, iNOS, TNF- α , Arg-1, IL-4, TIPE2, and PPAR- γ were examined by qRT-PCR and Western blot, respectively.

Results: In vivo study, the levels of TNF- α , IL-4, and serum amylase and lipase were increased in different degrees after operation in model group and treatment group compared with sham operation group (partial $P < 0.05$), but the increasing amplitudes of TNF- α , and serum amylase and lipase were lower while increasing amplitude of IL-4 was greater in treatment group than those in model group (all $P < 0.05$); evident pathological injuries were seen in the pancreas and small bowel in both model group and treatment group, but the degrees of injuries were milder in treatment group than those in model group, the injuries were worsened in model group while were alleviated in treatment group with the prolongation of time, and the pathological scores for pancreatic and intestinal tissues were significantly different between model group and treatment group (all $P < 0.05$); the protein and mRNA expression levels of iNOS in the small intestinal tissue were significantly increased in model group while were significantly decreased in treatment group (all $P < 0.05$), and the protein and mRNA expression levels of Arg-1 were significantly increased in late stage in model group while were significantly increased in both early and late stages in treatment group with greater increasing amplitudes than those in model group (all $P < 0.05$). In vitro study, the protein and mRNA expression levels of NF- κ B, iNOS, and TNF- α were significantly increased (all $P < 0.05$) while Arg-1, IL-4, TIPE2, and PPAR- γ showed no significant changes (all $P > 0.05$) in the rat intestinal macrophages after NaT treatment alone; the protein and mRNA expression levels of Arg-1, IL-4, TIPE2, and PPAR- γ were significantly increased (all $P < 0.05$) while

NF- κ B, iNOS, and TNF- α showed no significant changes (all $P < 0.05$) in the rat intestinal macrophages after HXQJD decoction treatment alone; the protein and mRNA expression levels of NF- κ B, iNOS, and TNF- α were significantly decreased while Arg-1, IL-4, TIPE2, and PPAR- γ were significantly increased in rat intestinal macrophages after NaT plus HXQJD decoction treatment compared with those after NaT treatment alone (all $P < 0.05$).

Conclusion: HXQJD decoction offers a protective effect on the intestinal immune barrier function in SAP rats, and its action mechanism may be associated with it regulating the transformation of intestinal macrophages from M1 type to M2 type, promoting the expression of anti-inflammatory factors and inhibiting the release of pro-inflammatory factors, thereby alleviating the systemic inflammatory response.

Key words

Pancreatitis, Acute Necrotizing; Huoxueqingjie Decoction; Macrophages; Intestines; Rats

CLC number: R657.5

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 为临床上常见的急腹症, 是急性胰腺炎的一个亚型, 与多器官功能衰竭及全身炎症反应综合征相关, 严重者危及生命^[1-2]。SAP 患者易并发肠道屏障功能障碍, 而小肠巨噬细胞的 M1/M2 型极化参与肠黏膜的免疫调节过程, 但机体机制仍有待深入研究^[3-4]。

M1 型巨噬细胞活化后可分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α), 并表达特征及标识分子诱生型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS), 而 iNOS 基因存在着核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 调控位点, NF- κ B 可调节 iNOS 的表达^[5]。抗炎症因子 IL-4 参与调节 SAP 炎症反应过程, 而 M2 型巨噬细胞活化后分泌 IL-4, 可减轻 M1 型巨噬细胞引起的炎症反应^[5-6]; 其亦可产生精氨酸酶 1 (arginase-1, Arg-1), 使清道夫受体表达上调, 导致产生一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及 IL-12 的能力下降, 因此将表达的 Arg-1 及 IL-4 作为 M2 分化的证据^[7], 同时过氧化物酶增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR- γ) 是 M2 巨噬细胞活化过程中的重要转录因子^[8]。肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8 样分子 2 (tumor necrosis factor- α -induced protein 8 like 2, TIPE2) 属于 TNFAIP8 家族成员, 是天然免疫和获得性免疫反应的负向调控因子; 在巨噬细胞中, TIPE2 高表达可调控 NF- κ B 信号途径, 可抑制 M1 巨噬细胞的分化。在 T 淋巴细胞中可负向调节 T 细胞受体及 Toll 样受体的活化, 阻止严重炎症性疾病的发生与发展, 进而对维持免疫的稳态

起到重要作用^[9-11]。笔者前期研究发现活血血清汤可缓解 SAP 的炎症反应, 但是对肠道屏障免疫功能的影响不清, 其对巨噬细胞的极化更需深入研究。

本研究利用牛磺胆酸钠构建大鼠 SAP 模型, 使用中药活血血清汤研究其对大鼠胰腺及肠道炎症的反应情况, 并通过体外实验, 进一步探讨活血血清汤对肠巨噬细胞分化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞、动物及器械 大鼠小肠巨噬细胞株购于中科院上海细胞库。SPF 级别雄性 SD 大鼠 200~230 g, 由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院动物实验中心提供, 动物房为 SPF 级, 环境: 恒温 26 $^{\circ}$ C、恒湿 45%~55%、12 h 光照和 12 h 黑夜交替, 自由进食标准颗粒饲料和饮水, 整个实验过程中对大鼠的处理符合动物伦理学标准, 实验伦理注册号: YYLAC-2021-118。实验器械, 剪刀、镊子等 (购自上海金钟器械厂), 手术缝线、注射器等 (购自上海浦东金环医疗用品有限公司), 微泵注射装置由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院肝胆胰外科提供。

1.1.2 实验药物、试剂及仪器 活血血清汤: 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院制剂室提供, 主要成分有丹参 12 g、赤芍 9 g、大黄 15 g、枳实 12 g、芒硝 6 g、柴胡 12 g、桃仁 12 g、黄连 9 g、黄芩等 9 g, 浓煎后相当于生药 1 g/mL, 每毫升相

当于含生药 1 g。牛磺胆酸钠 (Sigma, 美国), 用生理盐水配成 5% 溶液。2% 戊巴比妥由动物实验中心提供。DMEM 培养基 (SH30022.01B, Hyclone, 美国), PBS (GNM20012, 吉诺生物, 中国), 胰酶 (碧云天, 中国), 青链霉素双抗 (C0222, 碧云天, 中国), 胎牛血清 (FBS) (26010074, Gibco, 美国), TRIzol (15596018, Invitrogen, 美国), 引物 (上海生工生物科技有限公司, 中国), Prime Script™ RT Reagent Kit (RR047A, TakaRa, 日本), SYBR® Premix Ex Taq™ (RR820A, TakaRa, 日本), CCK-8 试剂盒 (C0037, 碧云天, 中国), RIPA 裂解液 (P0013C, 碧云天, 中国), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (P0012S, 碧云天, 中国), 2× SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (P0015B, 碧云天, 中国), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (P0012A, 碧云天, 中国), ECL 发光试剂盒 (P0018FS, 碧云天, 中国), 预染蛋白 Marker (LC5615, Thermo Fisher, 美国), GAPDH (ab9485, Abcam, 英国), PPAR γ 抗体 (ab178860, Abcam, 英国), IL-4 (12227S, CST, 美国), TIPE2 (53842S, CST, 美国), Arg1 (93668T, CST, 美国)、NF- κ B (8242T, CST, 美国), iNOS (80517-1-RR, Proteintech, 美国)、TNF α 抗体 (17590-1-AP, Proteintech, 美国)。大鼠血清淀粉酶 (CSB-EL001689RA, 华美生物, 中国), 大鼠血脂肪酶 (CSB-E13784r, 华美生物, 中国), IL-4 (CSB-E04635r, 华美生物, 中国) 及 TNF α (CSB-E11987r, 华美生物, 中国) 的 ELISA 试剂盒。普通 PCR 仪 (BIO-RAD, 美国), 实时荧光定量 (BIO-RAD, 美国), 多功能酶标仪 (BIO-RAD, 美国), 转膜仪 (BIO-RAD, 美国), 电泳仪 (BIO-RAD, 美国), 化学发光凝胶成像分析系统 (BIO-RAD, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 SAP 模型建立及实验分组 (1) 模型制备: 所有大鼠术前禁食 12 h, 禁水 4 h。2% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉。用微量泵通过胰管逆行以 1 mL/kg 的剂量持续匀速输入 5% 的牛磺胆酸钠, 速度为 0.06 mL/min, 输注时间 5 min 建立 SAP 模型^[3, 12]。(2) 动物分组: 假手术组是麻醉后开腹扰动胰组织后关腹, 腹腔注射生理盐水 0.2 mL 每只。治疗组用活血清解汤灌胃, 每 20 mL/kg, 每 6 h 灌胃 1 次。非治疗组及治疗组分别在 6 h 及 12 h, 用 2% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 开腹经腹主

动脉注射器采血并处死动物, 动脉血静置 30 min 后离心 (3 500 r/min, 5 min), 收集上清液置于 -80 °C 冰箱中冻存用于后续生化检测。(3) 细胞实验分组: 将大鼠小肠巨噬细胞分别用活血清解汤 (活血清解汤组)、牛磺胆酸钠 (牛磺胆酸钠组), 牛磺胆酸钠+活血清解汤 (牛磺胆酸钠+活血清解汤组) 处理, 以无处理的大鼠小肠巨噬细胞为空白对照组, 共培养 24 h。活血清解汤颗粒溶解于 DMSO, 并用细胞滤网过滤清除杂质及微生物, 收集各组培养基上清液、细胞进行备用 (已有相关实验采用牛磺胆酸盐刺激巨噬细胞的实验模型^[13-14])。

1.2.2 CCK-8 实验 大鼠小肠巨噬细胞细胞培养后, 制备细胞悬液, 细胞计数, 稀释后在 96 孔板中接种待测细胞悬液, 每孔约 5×10^3 个细胞 100 μ L 细胞悬液, 种 3 个复孔。置于 37 °C 培养箱中培养, 细胞接种后贴壁大约需要培养 6 h。加入不同浓度梯度的牛磺胆酸钠或者活血清解汤 (药物采用 40 μ m 无菌过滤器过滤), 其中牛磺胆酸钠浓度设定根据相关文献及说明书设置成 (1~128 μ mol/L 相关浓度梯度)^[13-14], 活血清解汤根据前期实验设置成 (1~64 g/mL 相关浓度梯度), 37 °C 培养箱中培养 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8, 培养 1.5 h, 后测定 450 nm 吸光度。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol 试剂从培养的大鼠巨噬细胞中提取总 RNA, 根据 TaKaRa 逆转录试剂盒操作说明, 建立逆转录反应体系, 合成 cDNA。反转录后进行荧光定量 PCR 扩增, 反应条件为 50 °C 2 min, 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 7 min, 最后降至 4 °C 结束反应。以检测 NF- κ B、iNOS、TNF- α 、Arg-1、IL-4、TIPE2、PPAR- γ 和 GAPDH 表达的表达水平, 其中 GAPDH 被用作内参。引物序列见表 1。

1.2.4 Western blot 细胞置于蛋白裂解液中, 制备组织匀浆, 提取大鼠巨噬细胞中总蛋白质。根据 BCA 蛋白测定试剂盒的制造商说明书, 测定所提取样品的蛋白质浓度。取 20 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 1 h 后, 加入一抗 iNOS (1:1 000)、TNF- α (1:1 000)、NF- κ B (1:2 000)、Arg-1 (1:1 000)、IL-4 (1:1 000)、TIPE2 (1:1 000)、PPAR- γ (1:1 000) 和 GAPDH (1:2 000), 4 °C 孵育过夜。洗膜 3 次后, 加二抗 (抗兔/鼠 1:5 000), 37 °C 孵育 2 h。洗膜 3 次后, 加

入ECL试剂，机器显影。

1.2.5 ELISA实验 按照检测试剂盒说明书，对大鼠的血淀粉酶、血脂肪酶、IL-4和TNF- α 水平进行测定。

1.2.6 组织病理学观察 取胰腺及小肠组织，切取0.5 cm \times 0.4 cm \times 0.3 cm大小组织块，10%中性福尔马林固定，自动脱水机逐级酒精脱水，二甲苯透明，包埋、4 μ m切片，HE染色，显微镜观察组织的病理变化。依照Schmidt病理评分标准^[15]对各组胰腺进行改良评分，从胰腺水肿、坏死、炎症细胞浸润等方面对染色结果进行评定，分为5个等级，以1、2、3、4、5分进行标记。以Chiu病理评分^[16]为基础对肠黏膜、固有层及腺体等组织炎症病理进行改良评分，包括肠绒毛、水肿、出血、炎症、坏死、溃疡等方面进行评分，小肠黏膜损伤程度评分：0~5分，每段小肠观察10个视野，评分总和为小肠黏膜病理评分^[17-18]。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	序列
GAPDH	正向:CAG CAA GGA TAC TGA GAG CAA GAG 反向:GTT ATG GGG TCT GGG ATG GA
NF- κ B	正向:GCC GAC GTA CTG CTT TGC A 反向:GCC AGC CAC CAC GAT GTT
iNOS	正向:CAG CAT CCA CGC CAA GAA 反向:CAG GTG TTC CCC AGG TAG GTA G
TIPE2	正向:AGA CAC ATC CAA AGC AAG 反向:AGC TCG TCT AGC ACC TCG CT
TNF- α	正向:CAG ACC CTC ACA CTC AGA TCA TC 反向:AGC CTT GTC CCT TGA AGA GAA C
Arg1	正向:AAG AAA AGG CCC ATT CAC CT 反向:CAC CTC CTC TGG TGT CTT CC
IL4	正向:GGT CTC AGC CCC CAC CTT GC 反向:CCG TGG TGT TCC TTG TTG CCG T
PPAR- γ	正向:GCC AGG GCG ATC TTG ACA 反向:ATG CCG ATG GCC ACC TCT TT

1.3 统计学处理

所有数据统计分析均使用SPSS软件(版本22.0)进行,所有条形图中的误差条表示指定的SD或SEM,数据符合正态分布的计量资料,两组间采用*t*检验,组间多重比较采用*F*检验, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物实验各组TNF- α 和IL-4、血清淀粉酶及血脂肪酶水平比较

与假手术组比较,模型组术后6、12 h的TNF- α 表达量增加(均 $P < 0.05$),而治疗组后6、12 h的TNF- α 表达量明显低于相同时间段的非治疗组(均 $P < 0.05$),且治疗组的TNF- α 表达量明显随时间延长明显降低($P < 0.05$)(图1A)。与假手术组比较,模型组术后6 h的IL-4表达量增加不明显($P > 0.05$),而治疗组术后6 h的IL-4表达量明显高于假手术组与模型组(均 $P < 0.05$),且随着治疗时间延长治疗组IL-4表达水平明显升高($P < 0.05$)(图1B)。在相同时间段的血清淀粉酶及脂肪酶水平,治疗组明显低于相同时间段的模型组(均 $P < 0.05$)(图1C-D)。

2.2 各组胰腺及肠道组织HE染色以及病理结果

HE染色结果显示:假手术组胰腺组织无水肿、充血和胰腺坏死,镜下胰腺腺泡排列规则,腺管形态正常,无明显充血、坏死和炎性浸润,且胰岛结构完整;肠道上皮及绒毛未见明显损伤,无充血及水肿,未见炎症细胞浸润。与手术组比较,模型组与治疗组术后6、12 h的胰腺组织均有出血,腺泡细胞肿胀、坏死,小叶结构紊乱,叶间隙增宽,间质内有炎性细胞浸润等病理改变;小肠组织可见更多的炎性细胞浸润弥散、小肠绒毛断裂及脱落、腺体肿胀、出血灶形成,甚至固有层崩解。模型组胰腺与小肠的病理改变随时间延长而逐渐加重,治疗组胰腺与小肠的病理改变随时间延长而逐渐减轻(图2)。各组胰腺与小肠组织的病理学评分差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)(表2)。

2.3 各组大鼠小肠组织与M1/M2巨噬细胞相关标志基因iNOS、Arg-1的表达

Western blot及qRT-PCR结果显示,与假手术组比较,模型组12 h组的iNOS表达量明显增加($P < 0.05$),而治疗组的iNOS表达量明显低于相同时间段的非治疗组(均 $P < 0.05$)。与假手术组比较,模型组6 h的Arg-1表达量明显下降($P < 0.05$),而12 h的Arg-1表达量明显增加($P < 0.05$),治疗组Arg-1表达量明显高于假手术组与模型组6 h的表达了(均 $P < 0.05$),且随着治疗时间延长Arg-1表达水平明显升高($P < 0.05$)(图3)。

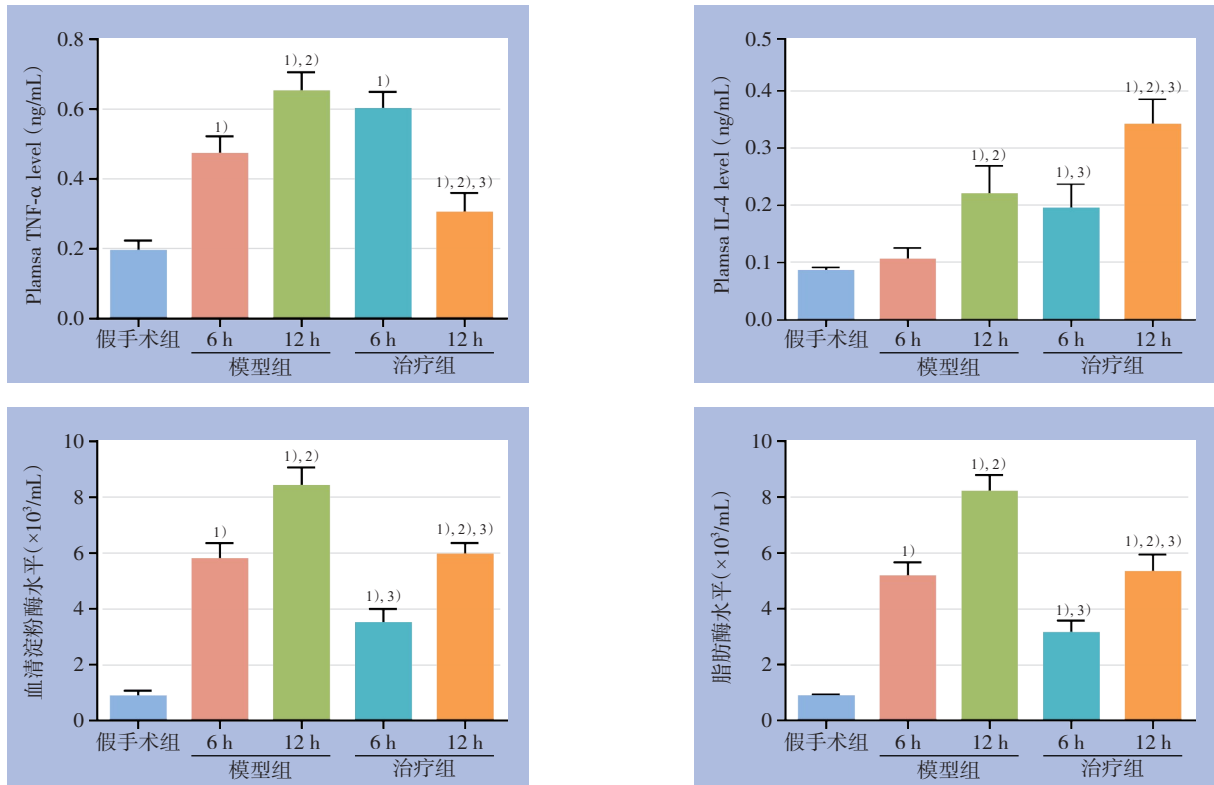


图1 各组血清中TNF- α 、IL-4、血清淀粉酶及脂肪酶水平比较 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与同组6 h比较, $P < 0.05$; 3) 与模型组同时间点比较, $P < 0.05$

Figure 1 Comparison of the serum levels TNF- α , IL-4, amylase and lipase among groups 1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. the 6-h value in the same group; 3) $P < 0.05$ vs. the value of the same time point in model group

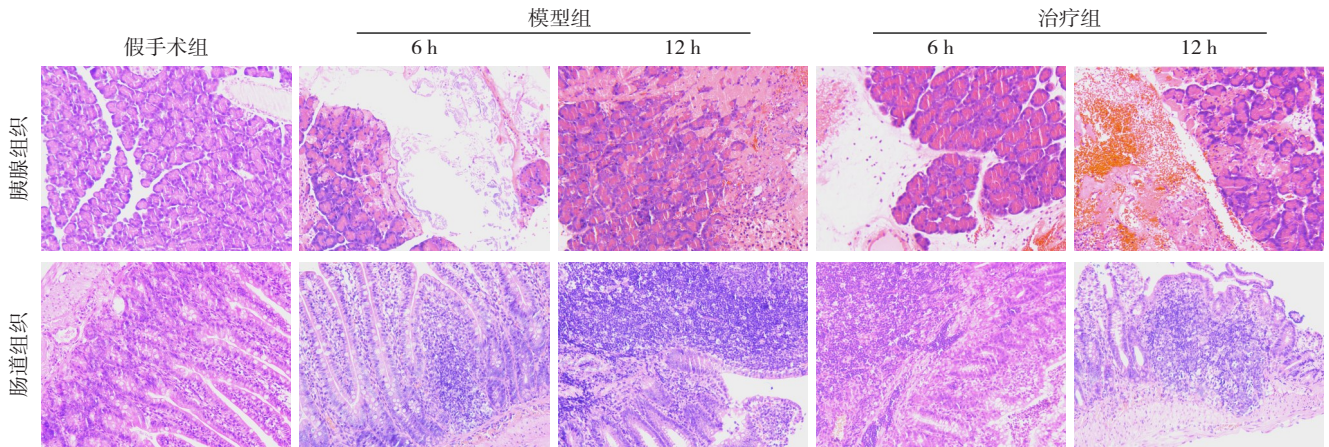


图2 各组大鼠胰腺和肠道组织病理学改变 (HE $\times 200$)

Figure 2 The histopathological changes of the pancreatic and intestinal tissues (HE $\times 200$)

表2 各组胰腺和肠道组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of pathological score of pancreas and intestine issue among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组织	假手术组	模型组		治疗组	
		6 h	12 h	6 h	12 h
胰腺	1.56 \pm 0.32	10.24 \pm 1.57 ¹⁾	14.72 \pm 1.39 ^{1),2)}	12.85 \pm 1.69 ^{1),3)}	9.26 \pm 1.31 ^{1),2),3)}
小肠	2.63 \pm 0.49	15.41 \pm 1.52 ¹⁾	27.53 \pm 2.77 ^{1),2)}	18.49 \pm 2.14 ^{1),3)}	10.17 \pm 1.24 ^{1),2),3)}

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与同组6 h比较, $P < 0.05$; 3)与模型组同时间点比较, $P < 0.05$

Notes: 1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. the 6-h value in the same group; 3) $P < 0.05$ vs. the value of the same time point in model group

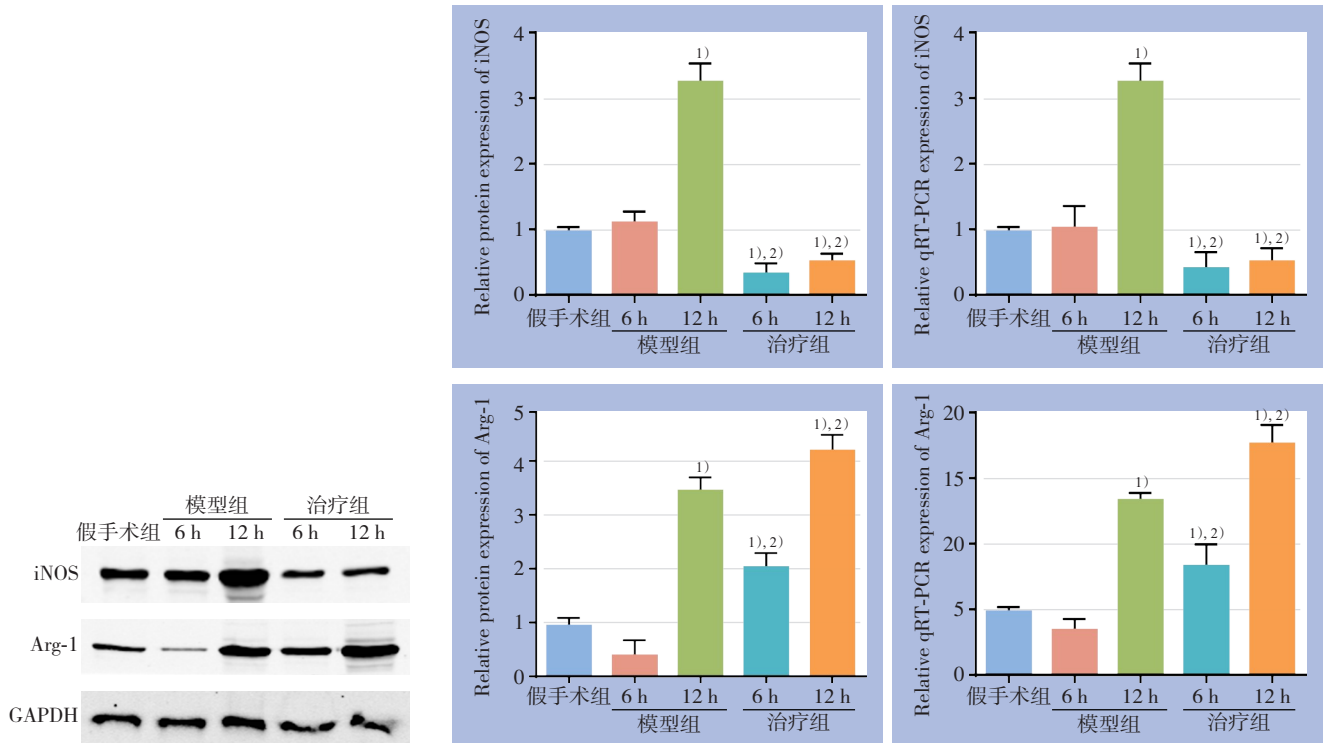


图3 Western blot及qRT-PCR检测各组大鼠小肠组织iNOS、Arg-1基因的表达 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组同时间点比较, $P<0.05$

Figure 3 The expressions of iNOS and Arg-1 in small intestine among groups of rats detected by Western blot and qRT-PCR 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. the value of the same time point in model group

2.4 大鼠肠巨噬细胞相关基因表达

利用CCK-8实验,按照相应的浓度梯度,加入大鼠巨噬细胞培养液中进行检测,发现牛磺胆

酸钠对大鼠小肠巨噬细胞的 IC_{50} 浓度为 $6\ \mu\text{mol/L}$ (图4);活血清解汤对大鼠小肠巨噬细胞的 IC_{50} 浓度为 $6.8\ \text{g/mL}$ (图4)。

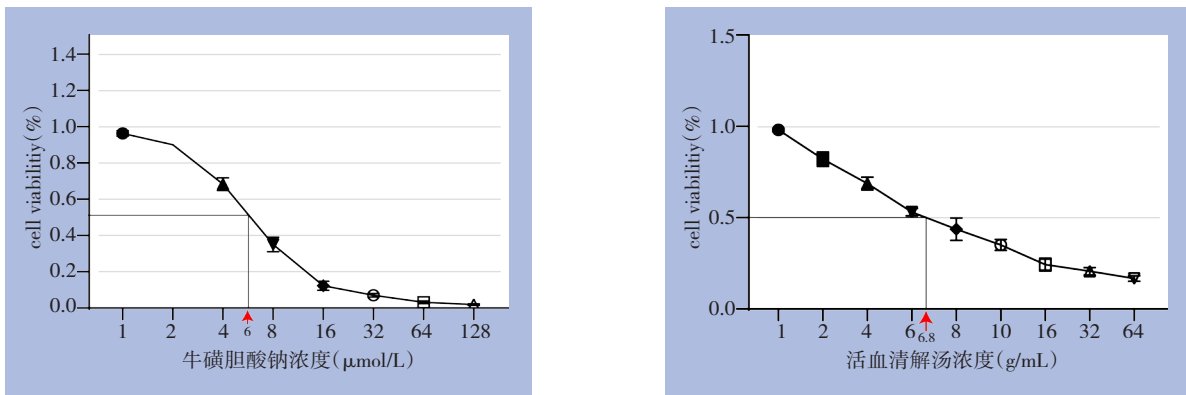


图4 CCK-8检测牛磺胆酸钠与活血清解汤对大鼠小肠巨噬细胞的 IC_{50} 浓度

Figure 4 IC_{50} values of sodium taurocholate and HXQJ decoction on rat intestinal macrophages determined by CCK-8 assay

体外实验中,牛磺胆酸钠与活血清解汤均采用各自 IC_{50} 浓度。Western blot及qRT-PCR结果显示,与空白对照组及活血清解汤组比较,牛磺胆酸钠组NF- κ B、iNOS及TNF- α 蛋白及mRNA表达水平明显上升(均 $P<0.05$),而Arg-1、IL-4、TIPE2及

PPAR- γ 蛋白及mRNA表达水平无明显统计学差异(均 $P>0.05$);与空白对照组比较,活血清解汤组Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR- γ 蛋白及mRNA表达水平明显升高(均 $P<0.05$),而NF- κ B、iNOS及TNF- α 蛋白及mRNA表达无明显变化(均 $P>0.05$);与牛

磺胆酸钠组比较,牛磺胆酸钠+活血清解汤组的NF-κB、iNOS及TNF-α蛋白及mRNA表达水平明显下降(均 $P<0.05$),而Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR-γ

蛋白及mRNA表达水平明显增加(均 $P<0.05$)(图5-6)。

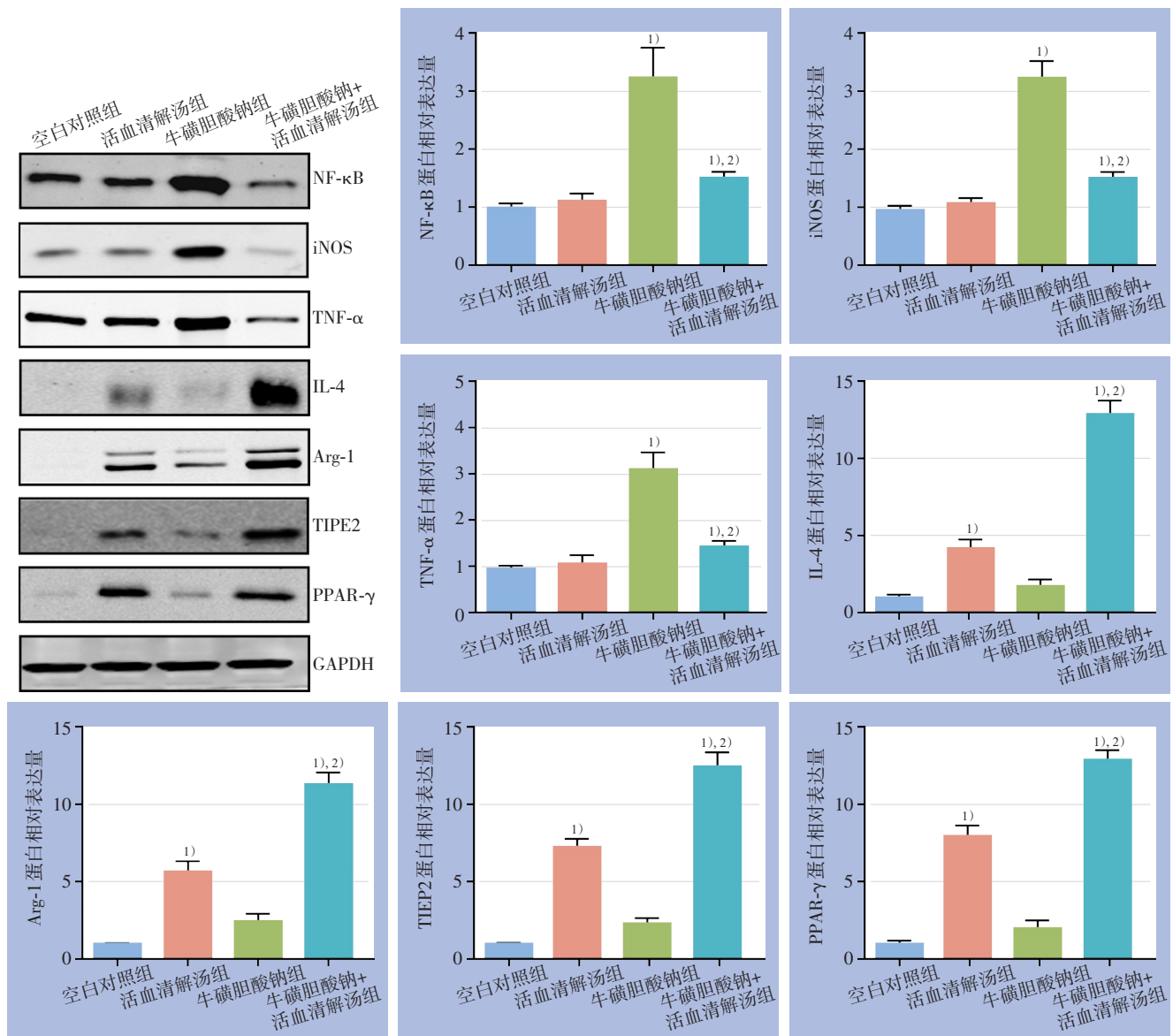


图5 Western blot检测各组细胞NF-κB、iNOS、TNF-α、Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR-γ蛋白表达 1)与空白对照组比较, $P<0.05$; 2)与牛磺胆酸钠组比较, $P<0.05$

Figure 5 The protein expressions NF-κB, iNOS, TNF-α, Arg-1, IL-4, TIPE2 and PPAR-γ in each group of cells determined by Western blot 1) $P<0.05$ vs. blank control group; 2) $P<0.05$ vs. sodium taurocholate group

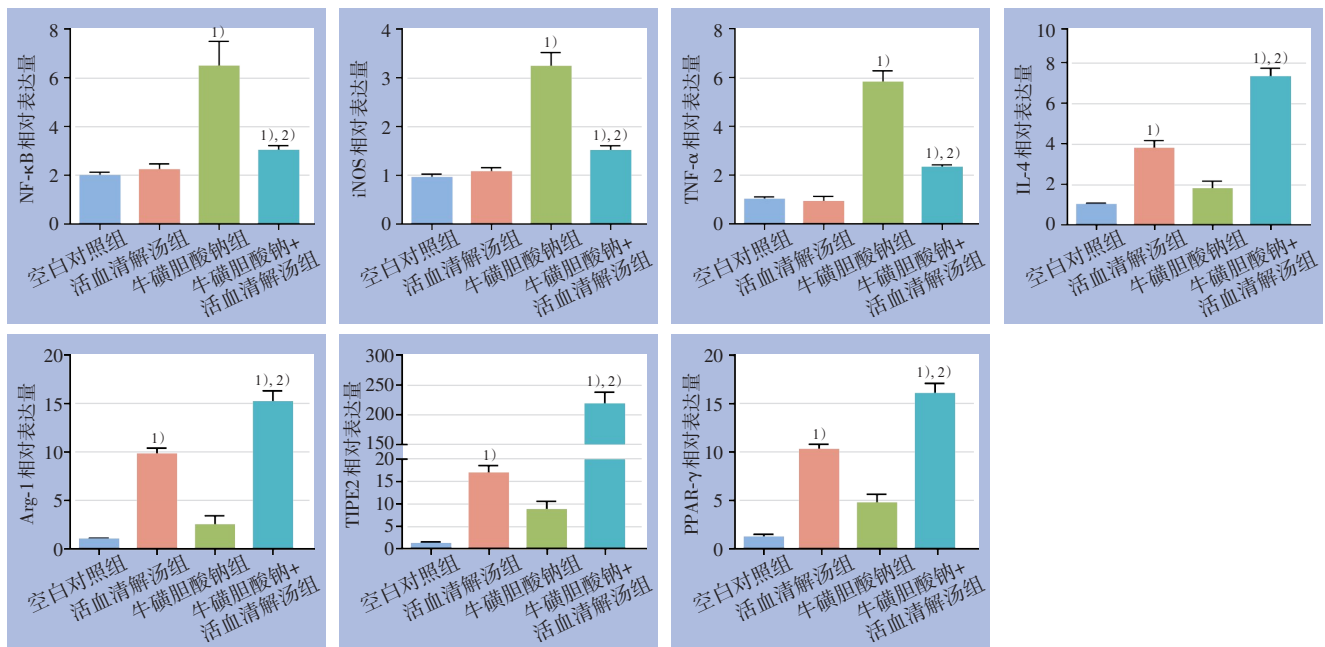


图6 qRT-PCR检测各组细胞的NF-κB、iNOS、TNF-α、Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR-γ mRNA表达 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与牛磺胆酸钠组比较, $P < 0.05$

Figure 6 The mRNA expressions NF-κB, iNOS, TNF-α, Arg-1, IL-4, TIPE2 and PPAR-γ in each group of cells determined by qRT-PCR 1) $P < 0.05$ vs. blank control group; 2) $P < 0.05$ vs. sodium taurocholate group

3 讨论

急性胰腺炎是临床上一种常见的急腹症,特征是胰腺水肿、出血、坏死等。其中约1/5的患者并发SAP,不仅会导致严重的急性胰腺损伤,还易引起全身炎症反应综合征,甚至是多器官功能障碍综合征^[3]。在SAP早期,机体促炎与抗炎调节机制失衡,引起炎症过度反应,导致胰腺局部及外组织损伤^[19]。肠道是全身炎症反应的一个重要靶器官,可防止肠道内的细菌及毒素等有害物质穿透肠壁,在维护机体内部环境的稳定方面发挥重要作用^[20]。SAP早期时易并发肠道屏障功能障碍,引起的肠道菌群异位、肠源性感染以及内毒素血症可进一步加重SAP^[21]。其中单核巨噬细胞系统被激活,TNF-α等促炎细胞因子链启动后,引起炎症介质级联样反应,加重肠黏膜损伤,导致肠道屏障功能障碍^[22-23]。

在本研究中,利用牛磺胆酸钠构建大鼠SAP模型,血淀粉酶、脂肪酶及病理学结果提示成功构建,与相关报道相似^[3, 24]。同时发现活血清解汤能减轻SAP大鼠的炎症反应程度,促炎症因子TNF-α释放减少,抗炎因子IL-4释放增多,降低血清淀粉酶及脂肪酶水平。活血清解汤可降低临床

急性胰腺炎患者血清炎症细胞因子水平,提高超氧化物歧化酶活性,清除氧自由基,改善症状,提高疗效^[25]。临床研究^[26]发现活血清解汤配合西医常规疗法治疗急性胰腺炎,患者的排气及通便时间、腹胀及腹痛缓解时间、体温恢复正常及住院时间明显优于西医常规疗法。本中心前期研究^[27]发现活血清解汤改善SAP患者血液流变学,控制D-二聚体的升高,维持血栓素A2及前列环素I2之间的平衡,起到治疗SAP作用。因此,活血清解汤在急性胰腺炎及SAP中均发挥积极作用,可有效缓解炎症反应程度。而SAP易引发肠道屏障功能障碍,活血清解汤是否对肠道黏膜免疫屏障的具有保护作用及其中机制尚不清楚,有待深入研究。

巨噬细胞分M1型和M2型,肠巨噬细胞由血液中的单核细胞骨髓造血干细胞及胸腺内早期T淋巴细胞分化而来,主要分布于肠黏膜下的固有层中,占人体巨噬细胞的绝大多数,参与炎症反应^[28]。在健康肠道环境中,肠道巨噬细胞以M2型为主;而在炎症期间,单核细胞被招募到肠道固有层并成为炎性巨噬细胞,分泌促炎症细胞因子,推动炎症反应,表现出M1型^[29]。M1型巨噬细胞的特征是分泌细胞因子的能力增强,可被TNF-α活

化,活化后不仅能正反馈分泌促炎症细胞因子,如TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 及IL-6等杀伤感染性病原体,还能表达M1型巨噬细胞一个重要的特征及标识分子iNOS,产生NO,产生NO的巨噬细胞在炎症发病机制中发挥作用,而NF- κ B是其活化的重要转录因子^[30-32]。M2型巨噬细胞有抗炎和免疫调节作用,可表达抗炎细胞因子如IL-4和转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)等,降低炎症细胞因子水平,从而下调M1型巨噬细胞引起的炎症反应。同时M2型巨噬细胞能诱导产生Arg-1,使清道夫受体表达上调,产生NO和IL-12的能力下降,可将表达Arg-1及IL-4作为M2型巨噬细胞分化的证据,其中PPAR- γ 是其活化的重要转录因子^[29, 31]。本研究建立的大鼠SAP模型提示,术后6h的TNF- α 表达水平明显增高,而IL-4表达水平偏低;随着SAP进程延长,术后12h IL-4表达水平明显增加。以上提示早期SAP可能由M1巨噬细胞表型占优势,后期M2型巨噬细胞抗炎发挥积极作用。但对SAP大鼠使用活血血清汤后,术后6h的TNF- α 表达水平较未使用组明显降低,且IL-4表达水平升高,在术后12h趋势更加明显,这提示活血血清汤可能促进SAP大鼠肠黏膜巨噬细胞由M1型巨噬细胞表型转化为M2型。

巨噬细胞在免疫反应中的表型具有可塑性,随着微环境刺激的改变,进而改变其生理特性,遵循不同的激活途径;M1型巨噬细胞首先出现在炎症发生早期,针对刺激释放多种炎症介质,以推动炎症反应;而过度过量的炎症反应会导致机体损伤加重,M2型巨噬细胞在炎症后期释放抗炎介质,抑制炎症反应,维持内环境稳定。因此根据他们所接受的微环境刺激不同,巨噬细胞可遵循不同的激活途径,在不同组织甚至同一组织中呈现的表型以及功能也具有差异性^[28]。

为了进一步探讨肠巨噬细胞在炎症中表型变化,本研究在体外实验中发现牛磺胆酸钠刺激肠巨噬细胞后,TNF- α 、iNOS及NF- κ B表达水平明显升高,说明牛磺胆酸钠可介导肠巨噬细胞的炎症反应。活血血清汤加入肠巨噬细胞后TNF- α 、iNOS及NF- κ B表达水平较单独牛磺胆酸钠刺激组明显降低,而Arg-1、IL-4、TIPE2及PPAR- γ 表达水平升高,这提示活血血清汤一定程度上能促进大鼠肠黏膜巨噬细胞由M1型巨噬细胞表型转化为M2型。

但笔者观察到在单独活血血清汤刺激这种趋势相对于体内实验不是很明显,猜测原因如下:由于炎症反应是一个复杂的级联过程,除了巨噬细胞外还有其他多种免疫细胞参与,因此笔者体外的模拟实验相对来说比较简单。由于条件所限,需要将来对活血血清汤在急性胰腺炎中的作用机制进行更加深入的研究。但结果也能一定程度上说明活血血清汤可介导大鼠肠黏膜表型的转化,调节肠黏膜的免疫屏障功能,减轻大鼠SAP的炎症反应程度。这也为治疗及预防SAP提供新的思路。

综上所述,本研究结果表明活血血清汤可能通过调节SAP大鼠中的小肠巨噬细胞,由M1型转化成M2型,缓解炎症反应,这也为研究活血血清汤的作用机制提供新的思路。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献

- [1] Boxhoorn L, Voermans RP, Bouwense SA, et al. Acute pancreatitis[J]. *Lancet*, 2020, 396(10252): 726-734. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31310-6.
- [2] Gliem N, Ammer-Hermenau C, Ellenrieder V, et al. Management of severe acute pancreatitis: an update[J]. *Digestion*, 2021, 102(4): 503-507. doi: 10.1159/000506830.
- [3] Yuan XH, Luo C, Wu J, et al. Abdominal paracentesis drainage attenuates intestinal mucosal barrier damage through macrophage polarization in severe acute pancreatitis[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2021, 246(18): 2029-2038. doi: 10.1177/15353702211015144.
- [4] Huang QL, Cheng XM, Luo C, et al. Placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells ameliorate severe acute pancreatitis by regulating macrophage polarization via secreting TSG-6[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 337. doi: 10.1186/s13287-021-02411-9.
- [5] Wang SX, Cao M, Xu SH, et al. Luteolin alters macrophage polarization to inhibit inflammation[J]. *Inflammation*, 2020, 43(1): 95-108. doi: 10.1007/s10753-019-01099-7.
- [6] 李臻, 张晓英, 杨国栋. p38MAPK抑制剂对高脂血症急性胰腺炎大鼠肠道微生物区系的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2021, 30(3): 286-293. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.03.006.
Li Z, Zhang XY, Yang GD. Effects of p38MAPK inhibitor on intestinal microbiota in rats with hyperlipidemic acute pancreatitis[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2021, 30(3):

- 286–293. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.03.006.
- [7] Gong M, Zhuo XZ, Ma AQ. STAT6 upregulation promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis[J]. *Med Sci Monit Basic Res*, 2017, 23:240–249. doi: 10.12659/msmbr.904014.
- [8] Wang X, Ji YG, Feng PP, et al. The m6A reader IGF2BP2 regulates macrophage phenotypic activation and inflammatory diseases by stabilizing TSC1 and PPAR γ [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(13): 2100209. doi: 10.1002/advs.202100209.
- [9] Bi JC, Cheng C, Zheng CY, et al. TIPE2 is a checkpoint of natural killer cell maturation and antitumor immunity[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(38):eabi6515. doi: 10.1126/sciadv.abi6515.
- [10] Sun XH, Li XY, Zhou YF, et al. Up-regulating TIPE2 alleviates inflammatory pain by suppressing microglial activation-mediated inflammatory response via inhibiting Rac1/NF- κ B pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2021, 404(1):112631. doi: 10.1016/j.yexcr.2021.112631.
- [11] Wang ZJ, Fayngerts S, Wang P, et al. TIPE2 protein serves as a negative regulator of phagocytosis and oxidative burst during infection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(38): 15413–15418. doi: 10.1073/pnas.1204525109.
- [12] Liu RH, Wen Y, Sun HY, et al. Abdominal paracentesis drainage ameliorates severe acute pancreatitis in rats by regulating the polarization of peritoneal macrophages[J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(45):5131–5143. doi: 10.3748/wjg.v24.i45.5131.
- [13] Pavlović N, Kopsida M, Gerwins P, et al. Inhibiting P2Y12 in macrophages induces endoplasmic Reticulum stress and promotes an anti-tumoral phenotype[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):E8177. doi: 10.3390/ijms21218177.
- [14] Bártai-Konczos A, Veres Z, Szabó M, et al. Comparative study of CYP2B1/2 induction and the transport of bilirubin and taurocholate in rat hepatocyte-mono-and hepatocyte-Kupffer cell co-cultures[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2016, 82: 1–8. doi: 10.1016/j.vascn.2016.05.015.
- [15] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. *Ann Surg*, 1992, 215(1): 44–56. doi: 10.1097/0000658-199201000-00007.
- [16] Chiu CJ, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. II. The protective effect of intraluminal glucose as energy substrate[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 484–488. doi: 10.1001/archsurg.1970.01340280036010.
- [17] Zhang XY, Liu ZM, Wen SH, et al. Dexmedetomidine administration before, but not after, ischemia attenuates intestinal injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5): 1035–1046. doi: 10.1097/ALN.0b013e3182503964.
- [18] 张春, 林建源, 吕桂芳, 等. 地塞米松对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的保护作用机制研究[J]. *中外医学研究*, 2020, 18(34):6–8. doi: 10.14033/j.cnki.cfmr.2020.34.003.
- Zhang C, Lin JY, Lu GF, et al. Protective mechanism of dexamethasone on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Chinese and Foreign Medical Research*, 2020, 18(34):6–8. doi: 10.14033/j.cnki.cfmr.2020.34.003.
- [19] Gukovskaya AS, Gukovsky I, Algül H, et al. Autophagy, inflammation, and immune dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(5): 1212–1226. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.071.
- [20] Galipeau HJ, Verdu EF. The complex task of measuring intestinal permeability in basic and clinical science[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2016, 28(7):957–965. doi: 10.1111/nmo.12871.
- [21] Ye SJ, Si CL, Deng J, et al. Understanding the effects of metabolites on the gut microbiome and severe acute pancreatitis[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:1516855. doi: 10.1155/2021/1516855.
- [22] Li XY, He C, Zhu Y, et al. Role of gut microbiota on intestinal barrier function in acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(18):2187–2193. doi: 10.3748/wjg.v26.i18.2187.
- [23] Zhu Y, He C, Li XY, et al. Gut microbiota dysbiosis worsens the severity of acute pancreatitis in patients and mice[J]. *J Gastroenterol*, 2019, 54(4): 347–358. doi: 10.1007/s00535-018-1529-0.
- [24] Bálint ER, Fűr G, Kui B, et al. Fentanyl but not morphine or buprenorphine improves the severity of necrotizing acute pancreatitis in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1192. doi: 10.3390/ijms23031192.
- [25] 陆迅, 王晓文, 郭瑶瑶. 活血清解汤结合西医常规疗法治疗急性胰腺炎临床研究[J]. *国际中医中药杂志*, 2018, 40(6):499–502. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2018.06.005.
- Lu X, Wang XW, Guo YY. Clinical efficacy and mechanism of traditional Chinese medicine Huoxue-Qingjie Decoction for acute pancreatitis[J]. *International Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 40(6): 499–502. doi: 10.3760/cma.j.issn.1673-4246.2018.06.005.
- [26] 姜宇. 活血清解汤佐治急性胰腺炎的疗效分析[J]. *临床研究*, 2019, 27(3):116–117. doi: 10.3969/j.issn.1004-8650.2019.03.065.
- Jiang Y. Clinical analysis of Huoxueqietang in the treatment of acute pancreatitis[J]. *Clinical Research*, 2019, 27(3): 116–117. doi: 10.3969/j.issn.1004-8650.2019.03.065.
- [27] 沙盈盈, 梁超, 朱晓明, 等. 活血清解汤早期干预对重症急性胰腺炎患者血液流变学及D二聚体、血栓素A2、前列环素I2的影响[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(4):678–681. doi: 10.3969/j.issn.1001-5256.2016.04.013.
- Sha YY, Liang C, Zhu XM, et al. Effects of early intervention with Huoxueqingjie Decoction on hemorheological parameters and D-dimer, thromboxane A2, and prostaglandin I2 levels in patients

- with severe acute pancreatitis[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2016, 32(4):678-681. doi: 10.3969/j.issn.1001-5256.2016.04.013.
- [28] Moreira Lopes TC, Mosser DM, Gonçalves R. Macrophage polarization in intestinal inflammation and gut homeostasis[J]. Inflamm Res, 2020, 69(12): 1163-1172. doi: 10.1007/s00011-020-01398-y.
- [29] Yunna C, Mengru H, Lei W, et al. Macrophage M1/M2 polarization[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 877:173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- [30] Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, et al. The Metabolic Signature of Macrophage Responses[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.
- [31] Lin YH, Wang YH, Peng YJ, et al. Interleukin 26 Skews Macrophage Polarization Towards M1 Phenotype by Activating cJUN and the NF- κ B Pathway[J]. Cells, 2020, 9(4): 938. doi: 10.3390/cells9040938.
- [32] 秦超, 关磊, 徐田磊, 等. CYLD在急性胰腺炎肺损伤中的表达及其与NF- κ B通路关系的体外研究[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(3):357-362. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.009.
- Qin C, Guan L, Xu TL, et al. CYLD expression during acute lung injury caused by acute pancreatitis and its relation with NF- κ B pathway: an in vitro study[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(3):357-362. doi: 10.3978/j.issn.1005-6947.2016.03.009.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:梁超,汪扬,刘新博,等.活血清热解毒对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫屏障功能的影响及机制[J].中国普通外科杂志,2022,31(9):1182-1193. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.007

Cite this article as: Liang C, Wang Y, Liu XB, et al. Effect of Huoxueqingjie decoction on intestinal immune barrier function in rats with severe acute pancreatitis and the mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2022, 31(9):1182-1193. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2022.09.007

本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型, 如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验, 采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕4个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明, 尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料, 用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时, 要合理安排纵横标目, 并将数据的含义表达清楚; 用统计图时, 所用统计图的类型应与资料性质相匹配, 并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时, 分母不宜小于20, 要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料, 应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析; 对于定性资料, 应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的, 选用合适的统计分析方法, 不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析, 应结合专业知识和散布图, 选用合适的回归类型, 不应盲目套用简单直线回归分析, 对具有重复实验数据的回归分析资料, 不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料, 要在一元分析的基础上, 尽可能运用多元统计分析方法, 以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理地解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时, 应说明对比组之间的差异有统计学意义, 而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如: 成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等), 统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)应尽可能给出具体的 P 值(如 $P=0.0238$); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时, 在给出显著性检验结果的同时, 再给出95%置信区间。

中国普通外科杂志编辑部