

清胰Ⅱ号颗粒剂对急性重症胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用

肖青川¹ 兰天罡² 兑丹华²

(1 武警四川总队医院肝胆一外科, 乐山, 614000; 2 遵义医学院附属医院肝胆胰外科, 遵义, 563003)

摘要 目的: 观察清胰Ⅱ号颗粒剂对重症急性胰腺炎(Severe Acute Pancreatitis, SAP)大鼠胰腺损伤的保护作用并探讨其机制。方法: 将 18 只 SD 大鼠随机等分为假手术组(A 组)、SAP 组(B 组)、治疗组(C 组)。以 30 g/L 牛磺胆酸钠逆行注入胰胆管制作大鼠 SAP 模型。C 组以 250 g/L 清胰Ⅱ号颗粒剂灌胃给药(10 mL/kg), 1 次/6 h, A 组、B 组用同等剂量生理盐水以相同方式灌胃。制模后 24 h 取材, 用 real-time PCR 检测胰腺组织中 Hmgb1 mRNA 表达, ELISA 测定胰腺组织中一氧化氮和内皮素-1 浓度, 同时观察胰腺组织病理改变, 测定胰腺组织湿/干重比值。结果: B 组有胰腺组织损伤改变, Hmgb1 mRNA 的表达上调, 一氧化氮和内皮素-1 浓度升高; 清胰Ⅱ号颗粒剂可下调胰腺组织中 Hmgb1 mRNA 的表达, 降低一氧化氮及内皮素-1 浓度, 减轻胰腺病理损害程度。结论: Hmgb1、一氧化氮及内皮素-1 在 SAP 胰腺损伤中可能具有重要作用, 清胰Ⅱ号颗粒剂可能通过下调胰腺组织中 Hmgb1 mRNA 的表达, 降低一氧化氮和内皮素-1 浓度, 减轻胰腺组织的病理改变, 从而保护胰腺损伤。

关键词 高迁徙率蛋白-1; 内皮素-1; 一氧化氮; 重症急性胰腺炎; 大鼠

Protective Effects of Qingyi II Granules against Pancreas Injury in Rats with Severe Acute Pancreatitis

Xiao Qingchuan¹, Lan Tiangang², Dui Danhua²

(1 Department of Hepatobiliary surgery, Sichuan Armed Police Hospital, Leshan 614000, China; 2 Department of Hepatobiliary surgery, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract Objective: To observe the effect and mechanism of Qingyi II Granules (QY) against the pancreas injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** Eighteen SD rats were randomly divided into fake operation group (group A), SAP group (group B) and treatment group (group C). The rat SAP model was made by retrograde injection of 30 g/L sodium taurocholate into pancreatic duct. Group C was treated with 250 g/L Qingyi II Granule (10 mL/kg), once per 6 h, and group A and group B were treated with the same dose of saline in the same way. The expression of Hmgb1 mRNA in pancreatic tissue was detected by real-time PCR after 24 hours of modeling. The concentration of nitric oxide and endothelin-1 in pancreas was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of pancreas were observed and the wet/dry weight ratio of pancreas was measured. **Results:** There were pancreas injury changes in group B, besides, expression of Hmgb1 mRNA was up-regulated and the levels of nitric oxide and endothelin-1 were increased; Qingyi II Granule may cause that the expression of Hmgb1 mRNA in pancreatic tissue, the levels of nitric oxide and endothelin-1 concentration were decreased, thus reduced the degree of pathological damage of the pancreas. **Conclusion:** Hmgb1, nitric oxide and endothelin-1 may play an important role in SAP pancreatic injury. Qingyi II granules may reduce the expression of Hmgb1 mRNA in pancreatic tissue and decrease the concentration of nitric oxide and endothelin-1 to reduce the pathological changes of pancreatic tissue, thus protecting the pancreas injury.

Key Words High migration rate family protein-1; Endothelin-1; Nitric oxide; Severe acute pancreatitis; Rats

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.042

重症急性胰腺炎(Severe Acute Pancreatitis, SAP)发生时, 首要出现的是胰腺自身的病理生理变化, 包括胰腺的充血、水肿、出血及坏死, 内外分泌功能的紊乱等, 胰腺损伤是发生这些变化的基础。普

遍认为 SAP 胰腺损伤发生机制是胰腺微循环障碍^[1]。而多种炎性反应递质、细胞因子在胰腺微循环障碍中起重要作用。本实验通过观测清胰Ⅱ号颗粒剂干预措施下, SAP 大鼠胰腺组织病理学变化、内

皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 浓度变化及胰腺组织中高迁徙率族蛋白-1 (high mobility group box 1, Hmgb1) mRNA 表达改变, 探讨清胰Ⅱ号颗粒剂对 SAP 大鼠胰腺损伤是否有保护作用, 及其可能的作用机制, 以便为该药的开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 18 只, 购自第三军医大学野战外科研究所动物室 (动物质量合格证号 SCXK-(军) 2012008), 体质量 150 ~ 200 g, 雌雄不拘。

1.1.2 药物 牛磺胆酸钠 (美国 Sigma 公司)。清胰Ⅱ号颗粒剂 (遵义医学院附属医院研制)。

1.1.3 试剂与仪器 大鼠 ET-1、NO 定量 ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司)。反转录反应试剂、RNAiso Reagent、PCR 反应试剂 (大连宝生物工程公司), 荧光定量 PCR 仪器 (iCycler iQ, Bio-rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用随机数字表法, 将 18 只大鼠等分为假手术组 (A 组)、SAP 组 (B 组)、治疗组 (C 组)。参照文献^[2]的方法复制 SAP 模型: 100 g/L 水合氯醛注射腹腔麻醉大鼠, 上腹正中切口进腹。

1.2.2 给药方法 A 组进腹后仅翻动肠管即关腹; 其余 2 组大鼠开腹后提起十二指肠, 用血管夹分别夹住肝门部胰胆管和十二指肠端, 向胰胆管内逆行缓慢注入 30 g/L 牛磺胆酸钠溶液 2 mL/kg, 时间 1 min, 后保持 2 min 再关腹。制模后 1 h 每组大鼠灌胃: A、B 组喂饲生理盐水 10 mL/kg, C 组喂饲等量 250 g/L 清胰Ⅱ号颗粒剂。其后, 重复灌胃 1 次/6 h。24 h 后处死大鼠, 取材检测各相关指标。

1.2.3 检测指标与方法 胰腺组织形态学观察和湿/干重比值测定: 处死大鼠后, 取胰腺组织做常规 HE 染色。采用盲法, 由专人在光学显微镜镜下观察胰腺组织病理改变, 并进行病理评分^[3]。用吸水纸吸干新鲜胰腺组织水分, 电子天平称量湿重。再置于干燥箱中, 60 ℃ 干燥 72 h, 称量干重, 计算湿/干重比值。胰腺组织中 Hmgb1 基因 mRNA 表达水平测定和相对定量分析: 以 real-time PCR 法检测胰腺组织内 Hmgb1 及 β -actin 的 mRNA 表达水平^[1]。以 β -actin 作为内参, 引物上游序列: 5'-TGACAGGATG-

CAGAAGGAGA-3', 下游序列: 5'-TAGAGCCAC-CAATCCACACA-3', 产物长度 104 bp (大连宝生物合成)。Hmgb1 基因引物, 上游序列: 5'-TGGGAACT-GGAGCAAAACC-3', 下游序列: 5'-ACCACAAGACACCCCTCACC-3', 产物长度 123 bp。反应条件: 预变性: 95 ℃, 10 sec, 1 个循环。PCR 反应: 95 ℃, 5 sec, 60.2 ℃ (内参基因为 61.6 ℃), 20 sec, 40 个循环。熔解曲线分析: 55 ℃ 开始采集信号, 60 次。用 Bio-rad 公司提供的基因表达分析软件 Genex. xls 进行相对定量分析、处理数据。胰腺组织中 ET-1 和 NO 浓度的测定: 取每组相同质量的胰腺组织进行匀浆, 离心分离后取上清, -20 ℃ 保存。各样品中 ET-1 和 NO 的含量, 依照大鼠 ET-1、NO 定量 ELISA 试剂盒中提供的方法分别进行检测。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。对数据进行正态性、方差齐性检验。符合正态分布且方差齐同, 进行方差分析。差异有统计学意义, 进而行两两比较的 q 检验。资料呈偏态分布或方差不齐, 进行秩和检验, 将数据经秩转换后, 作两两比较的 q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺组织形态学观察和病理学评分比较 光学电子显微镜下胰腺组织形态学观察: A 组胰腺组织偶见炎性细胞浸润, 无明显水肿、出血、坏死, 腺泡结构完整。制模后的 B 组胰腺组织可见大量炎性细胞浸润, 间质水肿、结构破坏, 组织大片出血、坏死, 腺泡肿胀。而清胰Ⅱ号颗粒剂干预后的 C 组胰腺组织炎性细胞浸润, 间质水肿、出血、坏死及腺泡的破坏程度均较 B 组减轻。量化后的 B 组胰腺组织病理学评分高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组胰腺病理学评分小于 B 组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 胰腺组织湿/干重比值比较 3 组中, B 组胰腺组织湿/干重比值明显高于 A 组 (4.84 ± 0.23 VS 3.37 ± 0.22 , $P < 0.01$)。而 C 组胰腺组织湿/干重比值明显低于 B 组 (4.39 ± 0.29 VS 4.84 ± 0.23 , $P < 0.01$)。

2.3 其他各项指标检测 与 A 组比较, B 组胰腺组织中 Hmgb1 mRNA 相对表达量显著上调 ($P < 0.01$), ET-1、NO 浓度均显著升高 (均 $P < 0.01$)。与 B 组比较, C 组胰腺组织中 Hmgb1 mRNA 相对表达量明显下调 ($P < 0.01$), 且 ET-1、NO 浓度均明显降低 (均 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组胰腺组织病理学评分、NO 及 ET-1 浓度、Hmgb1 mRNA 相对表达量比较 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	组织病理学评分	NO (nmol/L)	ET-1 (ng/L)	Hmgb1 mRNA
A	0.68 ± 0.81	332.33 ± 45.19	16.00 ± 1.38	2.89 ± 0.74
B	12.00 ± 1.26 **	570.00 ± 68.52 **	25.93 ± 1.43 **	832.75 ± 47.12 **
C	9.67 ± 1.21 ** ▲	444.67 ± 28.02 ** ▲△	20.88 ± 0.93 ** ▲△	201.13 ± 29.11 ** ▲△

注: ** P < 0.01 vs A 组; ▲△ P < 0.01 vs B 组; ▲ P < 0.05 vs B 组。

3 讨论

既往实验研究表明,在 SAP 的发生、发展过程中,由于胰腺组织微循环障碍进而导致的胰腺组织缺血损伤是一个重要因素^[4]。SAP 时,引发胰腺损伤的涉及因素众多,而胰腺组织局部体液因素的调节作用尤其重要。ET-1 和 NO 是内皮细胞分泌的 2 种重要的血管活性物质。NO 由 L-精氨酸和分子氧在 NO 合酶的催化下生成。作为一种内源性血管舒张剂、炎性反应递质、血小板聚集抑制因子和神经递质,NO 最主要的生物学功能是传递信息、舒张血管和细胞毒作用。有研究显示,NO 可能主要通过扩张血管、提高胰腺血流量、改善胰腺微循环,以减轻 SAP 时胰腺的亚细胞器损害,特别是减轻对线粒体和溶酶体的氧化损伤^[5]。同时,NO 可以对抗异位胰蛋白酶原的激活,抑制胰腺内胰蛋白酶和血清脂肪酶活性,进而实现对胰腺的保护作用^[6]。关于 NO 在 SAP 发病中的作用也有不同的认识。Hossam 等^[7]以蛙皮素诱发大鼠水肿型急性胰腺炎,观察到用 L-NNA 阻断内源性 NO 后,胰腺组织水肿减轻,同时代表血管通透性的 Evans blue 漏出减少,而 NO 底物 L-精氨酸能逆转 L-NNA 的作用,因此,NO 导致胰腺损伤的机制是增加了蛋白的渗出和血管通透性。在本实验中,我们发现,复制大鼠 SAP 模型后,胰腺组织中 NO 含量明显增高,反映胰腺组织损伤的病理学指标如湿干重比值、病理学评分明显改变,胰腺损伤明显,表明高浓度的 NO 可能介导了 SAP 时的胰腺损伤。ET-1 是迄今发现的最强的长效缩血管物质。研究发现对 ET-1 反应最明显的血管是微动脉分枝部,ET-1 可使其收缩甚至使血管腔完全闭塞,ET-1 的血管选择性作用对调节微循环血流量具有重要意义^[8]。还有动物研究显示,静脉注射 ET-1 可使胰腺血流量明显下降,而胰腺血流量明显增加则出现在给予选择性 ET-1 受体拮抗剂后,表明在胰腺组织缺血缺氧的损伤过程中 ET-1 发挥了重要作用^[9]。目前认为,急性胰腺炎时,ET-1 引发胰腺损伤的主要机制是:血管内皮细胞产生的 ET-1 使胰腺小动脉痉挛,胰腺供血不足,胰腺组织缺血,而缺血又可导致产生更多 ET-1,从而形成急性胰腺炎

性反应细胞因子 ET-1 正反馈的病理生理过程,这一恶性循环的直接后果就是加重胰腺组织的损伤^[10]。在我们的研究中,也观察到,诱导大鼠产生 SAP 后,胰腺组织中 ET-1 的含量显著增加,胰腺损伤明显。而给予清胰 II 号颗粒剂干预后,出现相反的变化。急性胰腺炎时,一定浓度的 ET-1 可刺激 NO 产生增加。合适水平的 NO 通过对抗 ET-1 缩血管作用,改善胰腺微循环,减轻白细胞-内皮的相互作用等,对胰腺损伤有保护作用。而过多释放的 NO 不但对胰腺损伤无保护作用,反而会介导胰腺组织损伤的发生和发展:一是高水平的 NO 可引起血管过度扩张,血液瘀滞,组织氧利用减少,直接导致胰腺损伤发生;二是 NO 还有自由基性质的细胞毒性作用,促使胰腺组织损伤加重。Hmgb1 是一类广泛存在于真核细胞内的非组蛋白,在人体分布十分广泛。可在单核巨噬细胞、中性粒细胞、血小板、肝细胞等细胞核和细胞质中表达。在炎性反应发生时,由于其相对于 IL、TNF-α 等早期炎性反应递质出现的晚,而以晚期炎性反应递质著称。有研究显示,用纯化的 Hmgb1 加入巨噬细胞培养物中,可明显刺激 NO、IL-1、IL-6、IL-8 及 TNF-α 的产生,且呈剂量依赖性^[11]。这表明作为晚期炎性反应递质的 Hmgb1,反过来又可以增加早期炎性反应递质的大量释放。近年的动物实验和临床研究都发现在急性胰腺炎发生时,体内的 Hmgb1 水平升高,且升高程度与疾病严重程度呈正相关,而用 Hmgb1 阻滞剂丙酮酸乙酯干预后,肝、肺、肾功能及胰腺、肺等病理组织学改变得明显改善,病死率降低,表明 Hmgb1 是急性胰腺炎急性炎性反应和器官损伤的重要递质^[12-14]。在我们的研究中亦发现,SAP 发生后,胰腺组织中 Hmgb1mRNA 的表达明显上调。清胰 II 号颗粒剂是一种中药复方制剂,内含大黄、栀子、丹皮等主要成分。我们前期对 SAP 发病机制中相关细胞因子 TNF-α、CD44、IL-1、IL-6、MCP-1 等的作用进行了研究^[15-17],也观察到清胰 II 号颗粒剂有抑制促炎性反应细胞因子 TNF-α、CD44、IL-1、IL-6 等释放的作用^[18]。在本实验中,我们还发

现,诱发大鼠 SAP 发生 24 h 后,胰腺组织湿/干重比值增加,胰腺炎性反应水肿、出血坏死明显,出现胰腺损伤,胰腺组织中 NO、ET-1 水平均升高,Hmgb1 mRNA 表达上调。而经过清胰Ⅱ号颗粒剂干预后,胰腺湿/干重比值降低,胰腺病理组织学改变减轻,同时,SAP 大鼠胰腺组织中的 NO、ET-1 水平降低,Hmgb1 mRNA 表达下调。由此,我们推测清胰Ⅱ号颗粒剂对 SAP 胰腺损伤有保护作用,除了与降低 NO、ET-1 等炎性反应递质浓度有关外,还可能与下调胰腺组织 Hmgb1 mRNA 表达有关。但是,在这一过程中是否存在 Hmgb1 与 NO 及 ET-1 的协同作用,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 臧泽林,祝瑞,黄文炼. 复方丹参注射液辅助治疗重症急性胰腺炎的临床疗效研究[J]. 世界中医药,2015,10(4):520-522.
- [2] 肖青川,兑丹华,兰天罡,等. 清胰Ⅱ号颗粒剂对急性坏死性胰腺炎大鼠肠道细菌移位的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(10):905-909.
- [3] Anthony J, Rongione, Amy M, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. Gastroenterology, 1997, 112(3): 960-967.
- [4] Ahmet Gulcub, Damla Haktanir, Aris Cakiris, et al. Effects of curcumin on proinflammatory cytokines and tissue injury in the early and late phases of experimental acute pancreatitis[J]. Pancreatolgy, 2013, 13(4):347-354.
- [5] Gang Wang, Jia-Chen Iv, Lin-Feng Wu, et al. From nitric oxide to hyperbaric oxygen: invisible and subtle but nonnegligible gaseous signaling molecules in acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2014, 43(4): 511-517.
- [6] E A Camargo, D G Santana, C I Silva, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide as a therapeutic target for acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2[J]. Eur J Pain, 2014, 18(5):691-700.
- [7] Hossam M M Arafa, Ramadan A M Hemeida, Mohamed I A Hassan, et al. Acetyl-L-carnitine ameliorates caerulein-induced acute pancreatitis in rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105(1):30-36.
- [8] Stanisław Milnerowicz, Halina Milnerowicz, Stanisław Nabzdyk, et al. Plasma Endothelin-1 Levels in Pancreatic Inflammations[J]. Adv Clin Exp Med, 2013, 22(3):361-368.
- [9] Sandstrom P, Brooke S, Mark E, et al. Highly Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Ameliorates Experimental Acute Pancreatitis[J]. Pancreas, 2005, 30(1):e10-e15.
- [10] Xi-Ping Zhang, Jie Zhang, Mei-Li Ma, et al. Pathological changes at early stage of multiple organ injury in a rat model of severe acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(1):83-87.
- [11] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes[J]. J Exp Med, 2000, 192(4):565-570.
- [12] Rui Kang, QiuHong Zhang, Wen Hou, et al. Intracellular hmgb1 inhibits inflammatory nucleosome release and limits acute pancreatitis in mice[J]. Gastroenterology, 2014, 146(4):1097-1107.
- [13] Il-Joo Jo, Kyoung-Chel Park, Sun Bok Choi, et al. Scolopendra subpinipes mutilans protected the cerulein-induced acute pancreatitis by inhibiting high-mobility group box protein-1[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(10):1551-1562.
- [14] Zhang T, Xia M, Zhan Q, et al. Sodium Butyrate Reduces Organ Injuries in Mice with Severe Acute Pancreatitis Through Inhibiting HMGB1 Expression[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2015, 60(7):1991-1999.
- [15] 兑丹华, 高占峰, 赵鹏, 等. 清胰Ⅱ号和粉防己碱对实验性重症急性胰腺炎的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(24):2418-2421.
- [16] 李鹏, 王玲君, 兑丹华. CD44 在重症急性胰腺炎大鼠肝脏表达及清胰Ⅱ号颗粒剂保护作用的实验研究[J]. 贵阳医学院学报, 2011, 36(6):561-564.
- [17] 尚献会, 李建国, 范振海, 等. MCP-1 在 SAP 大鼠胰腺及肠黏膜组织中的表达[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2014, 21(7):822-826.
- [18] Zhang J W, Zhang G X, Chen H L, et al. Therapeutic effect of Qingyi decoction in severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury. [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(12):3537-3546.

(2016-07-31 收稿 责任编辑:徐颖)