

和解利湿方对乙醇性慢性胰腺炎腺泡细胞凋亡的影响

周钱梅, 张天玲, 苏式兵*

(上海中医药大学复杂系统研究中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:**探讨和解利湿方通过抑制胰腺腺泡细胞凋亡对大鼠乙醇性慢性胰腺炎(ACP)的治疗作用。**方法:**将受试动物 30 只,随机分为 2 组,正常组 6 只,造模组 24 只,给予等热量的 Lieber-De-Carli 流质饮食,每日消毒后定量喂食 14 周;正常对照组 6 只,饲普通饮食 14 周;第 8 周末始模型组大鼠尾静脉注射给予脂多糖(LPS)剂量分别为 1.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3 mg·kg⁻¹, 1 周 1 次,共 5 次,对照组给予等剂量的生理盐水;10 周末造模组重分为模型组、和解利湿方高、中、低剂量(21.7, 10.85, 5.425 g·kg⁻¹)治疗组,每组 6 只,开始 ig 给药,每天 1 次,连续给药 4 周。测定其组织病理变化、细胞凋亡及其相关蛋白的表达。体外观察含药血清对胰腺腺泡 AR42J 细胞生长和凋亡的影响。**结果:**与模型组比较,正常组无明显炎症症状,而和解利湿方组能减少炎症细胞浸润与胰腺腺泡细胞脱落,差异有统计学意义($P < 0.05$);和解利湿方高剂量组减少细胞凋亡,有显著的统计学差异($P < 0.05$),并能抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3 和 caspase-9 活性,增加 B 细胞淋巴瘤/白血病 2 基因(Bcl-2),降低 Bcl-2 相关蛋白基因(Bax)表达,其中和解利湿方高剂量组中 Bcl-2/Bax 是模型组的 1.5 倍。体外试验与含 30% 正常大鼠血清组比较,含 30% 和解利湿方药物血清明显促进胰腺腺泡细胞的生长($P < 0.05$);与乙醛干预并加正常大鼠血清组比较,和解利湿方含药血清组细胞凋亡率减少了 32.66%。**结论:**高剂量的和解利湿方对 ACP 有一定的治疗作用,其机制可能与减少腺泡细胞凋亡、调节胰腺细胞 caspase-3, caspase-9 的活性及 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达有关。

[关键词] 和解利湿方;乙醇性慢性胰腺炎;腺泡细胞;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0168-06

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070168

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130123.1532.007.html>

[网络出版时间] 2013-01-23 15:32

Effect of Hejie Lishi Formula on the Apoptosis of Pancreatic Acinar Cells in Alcohol Chronic Pancreatitis

ZHOU Qian-mei, ZHANG Tian-ling, SU Shi-bing*

(Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Complexity System, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Hejie Lishi formula on rat alcohol chronic pancreatitis (ACP) through inhibiting apoptosis of pancreatic acinar cells. **Method:** Thirty animals were divided into two groups. Model group of 24 animals was established by feeding Lieber-De-Carli Liquid diet after 14 weeks. Normal group of 6 animals was given general diet. The model animals were injected 1.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3 mg·kg⁻¹ lipopolysaccharide (LPS) into caudal vein for five times at 8 weeks, once per one week. The model group was divided into control and different concentrations (21.7, 10.85, 5.425 g·kg⁻¹) of Hejie Lishi formula group at 10 weeks. Then Hejie Lishi formula was given 4 weeks and once per day by ig. After treatment for 4 weeks, all rats

[收稿日期] 20120722(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073134);上海市教委重点学科项目(J50301);上海市教委 E-研究院中医内科建设计划资助项目(E03008)。

[第一作者] 周钱梅,博士,助理研究员,从事中药药理研究, Tel:021-51322755, E-mail:tazhou@163.com

[通讯作者] *苏式兵,博士,研究员,从事中医复杂系统研究、中医药诊疗与评价技术研究和中药药理学研究, Tel:021-51323013, E-mail:shibingsu07@163.com

were executed. The pathological changes of pancreas, apoptosis and its associated proteins were detected in pancreatic tissue. Moreover, apoptosis and cell growth were observed in AR42J cells with serum contained drug treatment. **Result:** There were inflammatory cell infiltration, bleeding and pancreatic acinar cell shedding in control group, compared with normal. Compared to control, Hejie Lishi formula decreased inflammatory cell infiltration and pancreatic acinar cell shedding ($P < 0.05$). The high concentration of Hejie Lishi formula reduced apoptosis ($P < 0.05$) and inhibited the activation of caspase-3 and caspase-9, increased the level of Bcl-2 and decreased the expression of Bax. The ratio of Bcl-2 to Bax in the high concentration of Hejie Lishi formula is 1.5-fold higher than control group. Compared with 30% normal rats serum, 30% containing Hejie Lishi formula serum enhanced pancreatic acinar cell growth ($P < 0.05$). Apoptosis was reduced 32.66% by containing Hejie Lishi formula serum. **Conclusion:** High concentration of Hejie Lishi formula may prevent inflammatory and injury of pancreatic cells in ACP of rat. The mechanism may be involved in reducing apoptosis of pancreatic acinar cells through down-regulating caspase-3, -9 activities and bax expression, and up-regulating Bcl-2 expression.

[**Key words**] Hejie Lishi formula; alcohol chronic pancreatitis; pancreatic acinar cells; apoptosis

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是由各种原因引起的胰腺组织和功能的不可逆性损伤,主要表现为顽固性疼痛、胰腺内分泌和外分泌功能下降及胰石和假性囊肿的形成。自1878年Fricdreich报道乙醇可诱发胰腺炎以来,乙醇性胰腺炎逐渐被临床医生所重视。慢性胰腺炎发生率与饮酒量及持续时间呈正比,近10%的酗酒者最终发展成慢性胰腺炎^[1]。研究表明,胰腺能通过氧化和非氧化两个途径代谢乙醇。氧化途径主要依赖乙醛还原酶(ADH),可能还有细胞色素P4502E1(CYP2E1)的参与,生成乙醛。乙醇主要在胰腺腺泡细胞代谢^[2]。近年来的研究结果显示,柴胡桂枝汤能改善胰腺组织病变及分泌功能^[3-6],茵陈蒿汤亦能明显改善实验性胰腺炎的胰腺功能,减轻动物胰腺组织的病理改变^[7]。我们针对乙醇性慢性胰腺炎(alcohol chronic pancreatitis, ACP)肝郁脾虚、湿热内盛的病机,以“和解利湿”为治法,用柴胡桂枝汤和解,茵陈蒿汤利湿,共成“和解利湿方”,探讨本方对乙醇性慢性胰腺炎中胰腺腺泡细胞的影响。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级SD大鼠30只,体重(150±10)g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,生产许可证号SCXK(沪)2008-0016,于上海中医药大学动物实验中心清洁级饲养室喂养。

1.2 药物 和解利湿方制剂是柴胡桂枝汤与茵陈蒿汤(均出自《伤寒论》)的合方,由桂枝(去皮)4.5g,黄芩4.5g,人参4.5g,甘草3g(炙),炙半夏7.5g,芍药4.5g,大枣6枚(擘),生姜4.5g,柴胡12g,茵陈蒿12g,栀子9g,大黄9g组成。经典原方合方,传统方法熬制。其煎制均按照《伤寒论》中所述方法在

中医复杂系统中心实验室自行完成。动物用量按照人鼠剂量关系换算而来,和解利湿方高、中、低剂量组分别含生药量21.7,10.85,5.425g·kg⁻¹浓度。

1.3 Lieber-DeCarli乙醇流质饲料 Lieber-DeCarli乙醇流质饲料的配方、材料和用量参照文献[8]。Lieber-DeCarli乙醇流质饲料的配方:无水乙醇36%(上海国药化学试剂有限公司,批号20100807),干酪素41.4g·L⁻¹(上海试一化学试剂有限公司,批号090603),DL-甲硫氨酸0.3g·L⁻¹(郑州嵩桦商贸有限公司,批号3090911),玉米油0.9g·mL⁻¹(上海裴林公司,cj26012649326),橄榄油0.91g·mL⁻¹(上海嘉里食品工业有限公司,8001-25-0),红花油0.92g·mL⁻¹(新疆塔城红花缘科技有限公司,6937185900105),麦芽糖糊精25.6g·L⁻¹(上海广拓化学有限公司,9050-36-6),微晶纤维素10g·L⁻¹(美国FMC BioPolymer公司,批号P108819440),酒石酸氢胆碱0.53g·L⁻¹(济南华菱药业有限公司,87-67-2),黄原胶3g·L⁻¹(山东淄博中轩生化公司,批号090201),盐混合物8.75g·L⁻¹(上海国药化学试剂有限公司,批号F20100307),维生素混合物2.5g·L⁻¹(白云山东泰商丘药业有限公司)等。

1.4 试剂 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS; Escherichia coli 055:B5,美国Sigma公司);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase-3),caspase-8,caspase-9,B细胞淋巴细胞/白血病2基因(Bcl-2),Bcl-2相关蛋白基因(Bax),GAPDH抗体(美国Cell Signaling Technology公司);TUNEL试剂盒(中国南京凯基公司);MTT(美国Sigma公司),细胞凋亡检测试剂盒(美国Beckman Coulter公司)等。

1.5 仪器 Odyssey双色红外荧光成像系统(美国

LI-COR 公司); Synergy 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司); 流式细胞技术(美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 造模分组和治疗 参照文献[9]及预实验结果进行造模,将受试动物 30 只,随机分为 2 组,模型组 24 只,给予等热量的 Lieber-De-Carli 流质饮食(乙醇占总热量的 36%),单居,采用特制负压式带刻度玻璃容器,每日消毒后定量喂食 500 mL,14 周;正常对照组 6 只,普通饮食 14 周。第 8 周末始模型组大鼠尾静脉注射给予 LPS,1 周 1 次,共 5 次,剂量分别为 1.5, 1.5, 2.0, 2.5, 3 mg·kg⁻¹体重,对照组给予等剂量的生理盐水;10 周末模型组重新分为模型组、和解利湿方高、中、低剂量治疗组 21.7, 10.85, 5.425 g·kg⁻¹,每组 6 只,开始 ig 给药,每天 1 次,每周 6 次,连续给药 4 周。

2.2 取材 给药 4 周末 20% 乌拉坦麻醉大鼠取材,腹主动脉取血,分离出血清, -80 °C 保存备用;取出胰腺,分为两部分,一部分液氮速冻后, -80 °C 保存备用,一部分放入中性福尔马林固定备用。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 一般情况观察 大鼠的精神状态,食量,活动、分泌物及大小便情况;胰腺外观,胰重及胰重与体重的比值

2.3.2 胰腺组织病理变化 对固定的胰腺组织,进行包埋、切片、脱蜡、水合,HE 染色,常规脱水,透明,封片。在光学显微镜下观察胰腺病理组织的变化情况及拍片,并参照文献[5]报道的方法判定胰腺病变程度。即依据光学显微镜下观察炎细胞浸润、出血、水肿,腺泡细胞变性、以及成纤维增生的组织病理学改变范围,按各项病理学改变占整个观察视野面积的百分比多少予以记分。其中,无变化,0 分; < 25%, 1 分; 25% ~ 50%, 2 分; > 50%, 3 分^[5]。

2.3.3 TUNEL 法检测胰腺组织细胞凋亡 实验具体流程按其试剂盒说明书操作。光镜下观察凋亡细胞被 DAB 染成棕色。每张切片,在 200 倍光镜下随机选取 5 个视野,拍照后运用 Image Pro[®] Plus7.0 软件对凋亡细胞数进行半定量统计。

2.3.4 Western blot 法观察细胞凋亡相关蛋白的表达 裂解组织提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,Western blot 法检测 caspase-3, caspase-8, caspase-9, Bcl-2, Bax 及 GAPDH 蛋白的表达。常规 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭,分别将膜稀释好的一抗(1:1 000, 5% 脱脂奶粉稀释)封入杂交袋内,4 °C 摇荡过夜。

然后,分别将膜稀释好的荧光二抗(1:10 000 稀释)封入杂交袋内,避光室温摇荡 1 h。Odyssey 红外荧光扫描成像系统读膜,并进行半定量分析处理。

2.3.5 体外胰腺腺泡 AR42J 细胞生长实验(MTT 法) 选用对数生长期细胞,以 5 × 10⁴/mL 细胞密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后换新鲜培养基,空白与细胞对照组每孔 200 μL,每组设 4 个平行孔。AR42J 细胞预先用乙醛处理 4 h,再分别加入不同浓度含药血清后继续培养,24 h 后,避光环境下每孔加入 MTT (5 g·L⁻¹)溶液 20 μL,37 °C,5% CO₂ 培养箱内继续培养 4 h,吸弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO,微量振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用 MTT 比色法测定吸光度(A),即对应的活细胞数。选择 490 nm 波长在酶联免疫检测仪上测各孔的 A。实验结果以下公式计算:

$$\text{细胞存活率} = \frac{A_{\text{药物}}}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

2.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 凋亡检测采用 Annexin V-FITC 流式细胞技术,按试剂盒说明书进行操作。取对数生长期胰腺腺泡 AR42J 细胞用无血清的 DMEM 培养 24 h。实验共分 6 组,每组设 3 个复孔,分别加入 8 mmol·L⁻¹乙醛、30% 正常大鼠血清、8 mmol·L⁻¹乙醛 + 30% 正常大鼠血清、30% 和解利湿方含药血清、8 mmol·L⁻¹乙醛 + 30% 和解利湿方含药血清,细胞对照组不加药(加入与药物处理组等量的无血清培养基)。12 h 后收集不同处理组细胞,4 °C 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,调整细胞密度为 1 × 10⁶/mL,将细胞沉淀溶于含有 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)的溶液中,避光室温反应 15 min 后流式细胞仪检测细胞荧光表达。未处理细胞分别用 Annexin V-FITC 和 PI 染色用于标准定量。

2.4 统计学方法 所有数据均使用 SPSS 16.0 软件包进行统计学分析,计量资料变量用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胰腺病理组织学观察 胰腺病理组织学变化如图 1 所示,正常组:胰腺腺泡胞浆丰满,胰腺小叶轮廓清晰,分布均匀;模型组腺泡萎缩变形,形成炎性肉芽肿。和解利湿方治疗组炎细胞浸润明显减少。病理变化半定量结果如表 1 所示,与正常组比较,模型组炎症细胞浸润、出血、腺泡细胞脱落均明显,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,和解利湿方组能减少炎症细胞浸润与胰腺腺

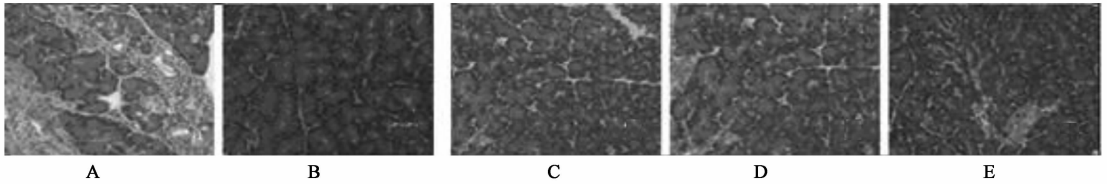


图1 和解利湿方对大鼠胰腺病理组织学的影响(HE染色,200)

3.2 对胰腺组织中细胞凋亡的影响 模型组胰腺组织中凋亡细胞明显增多,与模型组比较,和解利湿方高剂量组细胞凋亡也有一定的减少,有显著的统计学差异(见表1,图2)。Western blot法检测了相应组织中细胞凋亡相关蛋白的表达。结果显示,模型组激活了胰腺组织中 caspase-3 与 caspase-9 的活性,降低了 Bcl-2 的表达,增加了 Bax 的表达;与模型组比较,和

解利湿方组抑制了 caspase-3 与 caspase-9 的活性,增加了 Bcl-2 的表达,降低了 Bax 的表达,并且其 Bcl-2/bax 是模型组的 1.5 倍。caspase-8 的活性各处理组均无明显差异。因此,和解利湿方保护胰腺组织中腺泡细胞凋亡可能与其抑制了线粒体凋亡途径有关。见表2,图3。

表1 大鼠胰腺组织 HE 染色的病理评分及腺泡细胞凋亡评分($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	炎症细胞浸润	出血	腺泡细胞脱落	TUNEL
正常	-	0.00 ± 0.00 ¹⁾	0.00 ± 0.00 ¹⁾	0.00 ± 0.00 ¹⁾	0.00 ± 0.00
模型	-	2.67 ± 0.52	1.00 ± 0.00	1.67 ± 0.52	4.96 ± 0.36
和解利湿方	21.7	1.17 ± 0.41 ¹⁾	0.67 ± 0.52	1.00 ± 0.00 ¹⁾	3.94 ± 0.36 ¹⁾
	10.9	1.33 ± 0.52	0.83 ± 0.41	1.17 ± 0.41 ¹⁾	4.82 ± 0.37
	5.4	1.50 ± 0.55	0.83 ± 0.41	1.33 ± 0.52	4.92 ± 0.42

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表2同)。

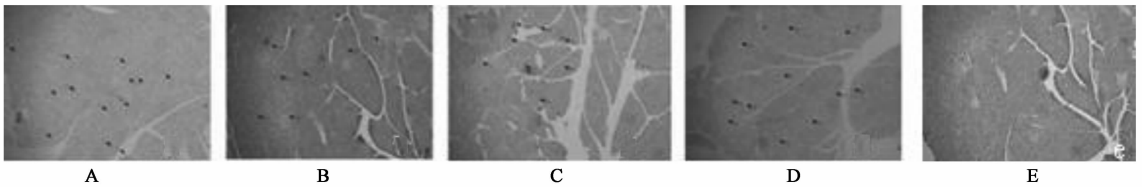


图2 和解利湿方对胰腺组织细胞凋亡的影响(TUNEL法检测,×200)

表2 和解利湿方药物血清对胰腺腺泡细胞凋亡相关蛋白表达的影响半定量分析($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	caspase-3	caspase-9	caspase-8	Bcl-2	Bax
正常	-	24.3 ± 1.9	36.1 ± 2.7	28.8 ± 2.8	28.9 ± 3.4	32.3 ± 3.6
模型	-	39.4 ± 2.9	52.4 ± 3.1	29.4 ± 2.6	23.6 ± 2.4	42.0 ± 3.8
和解利湿方	21.7	32.3 ± 2.2 ¹⁾	45.0 ± 2.7 ¹⁾	28.5 ± 3.6	27.6 ± 2.7	31.6 ± 2.6 ¹⁾
	10.9	35.4 ± 2.1	49.4 ± 1.4	29.5 ± 3.5	28.9 ± 2.4	41.9 ± 2.5
	5.4	37.0 ± 3.2	48.0 ± 3.8	28.8 ± 3.7	28.1 ± 2.4	41.5 ± 3.0

3.3 对胰腺腺泡细胞生长的影响 乙醛处理胰腺腺泡 AR42J 细胞 12 h 的半数抑制浓度(IC_{50})约为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于乙醛本身具有较强的挥发性,所以其处理细胞 24 和 36 h 后细胞的存活率比 12 h 时更多。据此,选择乙醛 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理细胞 12 h 这一条件进行后续实验。见表3。

含药血清对 AR42J 细胞存活率影响的实验结果如表4所示,与含 30% 正常大鼠血清组比较,含 30% 和解利湿方药物血清明显促进了胰腺腺泡细胞的生长($P < 0.05$)。因此,体外药物血清实验进一步说明和解利湿方可保护胰腺腺泡生长。

3.4 和解利湿方对胰腺腺泡细胞凋亡的影响 8

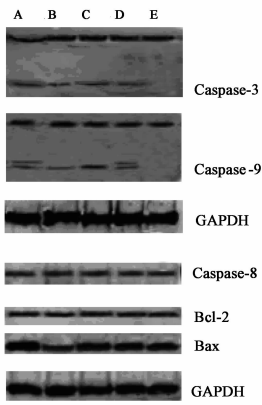


图 3 Western blot 法检测胰腺组织中凋亡相关蛋白表达

表 3 乙醛不同时间点干预胰腺腺泡 AR42J 细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

乙醛浓度 /mmol·L ⁻¹	12 h	24 h	36 h
0	100 ± 9.5	100 ± 5.2	100 ± 10.7
2	72.6 ± 5.6	90.8 ± 2.8	95.2 ± 1.9
4	57.7 ± 8.2	83.9 ± 4.3	90.8 ± 8.2
8	48.3 ± 5.2	80.9 ± 0.8	88.9 ± 9.7
16	27.7 ± 2.3	78.1 ± 4.6	80.2 ± 7.7
32	12.8 ± 1.8	75.7 ± 0.3	78.9 ± 5.1

表 4 和解利湿方药物血清对胰腺腺泡 AR42J 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	乙醛浓度 /mmol·L ⁻¹	血清浓度 /%	存活率 /%
细胞对照	-	-	100 ± 6.3
乙醛	8	-	55.8 ± 3.9
乙醛 + 正常大鼠血清	8	10	64.8 ± 4.2
	8	20	73.1 ± 6.5
	8	30	84.9 ± 7.1
乙醛 + 和解利湿方含药血清	8	10	69.2 ± 11.3
	8	20	81.5 ± 10.1
	8	30	110.2 ± 5.4 ¹⁾
正常大鼠血清	-	10	114.7 ± 4.6
	-	20	118.6 ± 4.9
	-	30	140.1 ± 7.5
和解利湿方含药血清	-	10	120.3 ± 4.0
	-	20	128.7 ± 10.4
	-	30	156.6 ± 1.1

注:与乙醛 + 正常大鼠血清组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

mmol·L⁻¹乙醛干预细胞 12 h 诱导的细胞凋亡率为 41.89%,此结果与细胞存活率实验基本一致。与乙醛干预并加正常大鼠血清组比较,和解利湿方含药血清组细胞凋亡率减少了 32.66%。因此,和解利湿方通过减少胰腺腺泡细胞凋亡保护其细胞增殖。

4 讨论

慢性胰腺炎是多种病因造成的,总体来说,随着生活水平的提高,饮酒成为我国 CP 发病的主要病因^[10]。乙醇性胰腺炎是酗酒的主要并发症,常始于急性坏死性炎症,即急性乙醇性胰腺炎,其反复急性发作导致慢性胰腺炎改变(腺泡萎缩和纤维化),即慢性乙醇性胰腺炎。

迄今,CP 的发病机制、病理生理和疾病过程仍不很清楚。常见的治疗方法仅限于缓解症状或对其并发症的处理,效果也不理想。中医药通过整体调理,能够缓解患者症状,提高其生活质量^[11]。已报道柴胡桂枝汤对 CP 实验动物模型具有抗炎^[3]、抗纤维化^[4]和抗细胞凋亡^[5]作用,能够改善实验动物的炎症细胞浸润、胰腺实质纤维化以及细胞凋亡引起的腺泡细胞萎缩等。而且,柴胡桂枝汤、桂枝汤具有优于卡莫司他抑制胰腺炎相关蛋白(PAP)表达和改善组织病理学上的胰腺炎变化的效果^[6];胆乐宁能够有效地对抗慢性胰腺炎形成过程中的胰腺组织损伤^[12]、糖脂平对胰腺组织氧化应激的影响^[13]。但未见从胰腺腺泡细胞凋亡角度治疗 ACP 的研究报道。

近年来,乙醇在胰腺中的代谢及其毒性作用日益引起人们重视^[14]。乙醇性慢性胰腺炎出现的病理变化可能出现在胰腺的腺泡细胞内,腺泡细胞本身对损伤的反应,即细胞的死亡方式(坏死或凋亡),是决定病变严重程度以及后续病理过程发生、发展的关键^[15]。本实验运用乙醇性慢性胰腺炎大鼠模型和乙醇的代谢产物乙醛诱导的胰腺腺泡细胞凋亡模型,观察了解利湿方对其细胞凋亡与生长的影响。与模型组比较,和解利湿方明显减轻了大鼠胰腺组织出现的水肿、炎症细胞浸润、出血、腺泡细胞脱落以及纤维细胞增生等病理改变。提示和解利湿方对大鼠乙醇性慢性胰腺炎具有一定的疗效。

细胞凋亡是指细胞在一定的生理或病理条件下,发生的程序性死亡。线粒体膜电位的改变是细胞发生凋亡的一种途径。线粒体膜电位改变与 caspase 家族关系密切,caspase-2,-8,-9 主要负责对执行者的前提进行切割,caspase-3,-6,-7 主要负责切割细胞核内、细胞质中的结构蛋白和调节蛋白。同时,线粒体膜电位改变也与 Bcl-2 家族有关,其中 Bcl-2 是抑制凋亡的因子,Bax 是促进凋亡的因子^[16]。本研究的实验结果显示,与模型组比较,和解利湿方组的腺泡细胞凋亡减少。可见,和解利湿方对乙醇性慢性胰腺炎的治疗作用可能与其减少了

腺泡细胞凋亡有关。而且,和解利湿方降低了 caspase-3 与 caspase-9 的活性,增加了 Bcl-2 的表达,且降低了 Bax 的表达,增加 Bcl-2 与 Bax 的比值。因此,和解利湿方可能通过线粒体途径抑制腺泡细胞凋亡。

为了进一步证实和解利湿方通过保护胰腺腺泡细胞生长对乙醇性慢性胰腺炎起到一定的治疗作用,我们观察了解利湿方药物血清对体外胰腺腺泡生长及凋亡情况的影响。实验结果显示,高浓度和解利湿方药物血清能够通过抑制乙醛诱导的腺泡细胞凋亡从而保护胰腺腺泡细胞。

综上所述,和解利湿方能够减轻大鼠 ACP 炎症病变,并通过抑制 caspase-3 和 caspase-9 活性,增加 Bcl-2 与 Bax 的比值,减少细胞凋亡,保护胰腺腺泡细胞生长,对大鼠 ACP 起到一定的治疗作用。

[参考文献]

[1] 蔡振寨. 酒精性慢性胰腺炎发病机制研究进展[J]. 国外医学:消化系疾病分册,2005, 25(6): 391.

[2] Apte M V, Phillips P A, Fahmy R G, et al. Does alcohol directly stimulate pancreatic fibrogenesis? Studies with rat pancreatic stellate cells [J]. Gastroenterology, 2000, 118: 780.

[3] Su S B, Motoo Y, Xie M J, et al. Expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in rat spontaneous chronic pancreatitis: effect of herbal medicine Saiko-keshi-to (TJ-10) [J]. Pancreas, 1999, 19(3): 239.

[4] Su S B, Motoo Y, Xie M J, et al. Anti-fibrotic effect of herbal medicine Saiko-keshi-to (TJ-10) on the pancreatic fibrosis in the WBN/Kob rat [J]. Pancreas, 2001, 22(1): 8.

[5] Su S B, Xie M J, Sawabu N, et al. Suppressive effect of herbal medicine Saikokeishito on acinar cell apoptosis in rat spontaneous chronic pancreatitis [J]. Pancreatology, 2007, 7: 28.

[6] 苏式兵,李益群,沈红艺,等. 中药对大鼠自发性慢性胰腺炎的干预作用及其方证病态基础[J]. 中西医结合学报,2006, 4(4): 358.

[7] 么国旺,张淑坤,崔乃强,等. 康胰汤对大鼠慢性胰腺炎的防治作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2010, 16(5): 567.

[8] 彭景华,方志红,崔剑巍,等. 健脾活血方对酒精复合内毒素脂多糖诱导的肝损伤大鼠库普弗细胞活化信号通路的干预[J]. 中西医结合学报,2007, 3(5): 302.

[9] Vonlaufen A, Xu Z, Daniel B, et al. Bacterial endotoxin: a trigger factor for alcoholic pancreatitis? evidence from a novel, physiologically relevant animal model [J]. Gastroenterology, 2007, 133(4): 1293.

[10] 李兆申. 我国慢性胰腺炎临床流行病学特征[J]. 中国实用外科杂志,2011, 31(9): 770.

[11] 梁晓强,方邦江,张静喆. 中医药在慢性胰腺炎治疗中的作用[J]. 中国临床康复,2006, 10(47): 124.

[12] 赵铁华,唐晓勇,盛丽,等. 胆胰宁对慢性胰腺炎大鼠血清及胰腺组织中超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(20): 230.

[13] 李步满,高彦彬,吴丽丽,等. 糖脂平对2型糖尿病大鼠糖、脂毒性及胰腺组织氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(14): 140.

[14] 巫协宁. 酒精性胰腺炎的乙醇代谢和胰腺纤维化的关系[J]. 胰腺病学,2005, 5(1): 58.

[15] 谢荣俊,张树友,李峰,等. 急性胰腺炎时腺泡细胞凋亡与 Bax 表达[J]. 中国医学创新,2012, 9(10): 4.

[16] Yamochi T, Kaneita Y, Akiyama T, et al. Adenovirus-mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-X(L) [J]. Oncogene, 1999, 18(2): 487.

[责任编辑 聂淑琴]