

清胰汤对大鼠急性出血坏死性胰腺炎 模型肺损伤的治疗机理研究

李东华*, 刘洪斌, 崔乃强, 王 倩, 薛小平
(天津市中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

[摘要] 目的: 研究清胰汤(QYT)对大鼠急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)肺损伤的治疗机理。方法: Wistar 大鼠经胆胰管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠(1mL/kg, 0. 1mL/min) 诱发 AHNP; QYT 组在造模后 30min 灌胃 QYT(10mL/kg); 善宁组在造模后 30min 皮下注射善宁(50 μ g/kg)。每组又分别随机分为 3、6、12h 三组(每组 8 只), 其余 12 只用于观察 24 小时死亡率。于不同时间点测定血清淀粉酶(AMY)、脂肪酶(LIP)、磷脂酶 A₂(PLA₂)、肿瘤坏死因子(TNF α); 测定肺组织髓过氧化物酶(MPO)、PLA₂、TNF α ; 提取肺泡灌洗液巨噬细胞核蛋白, ELISA 法检测核因子(NF- κ B^{p65})表达; 对肺、胰腺组织行病理检查。结果: QYT 明显降低 AHNP 大鼠死亡率; 减轻肺、胰腺病理损伤; 降低血清、肺组织 PLA₂、TNF α 水平; 显著降低肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性。结论: 清胰汤可通过其多途径多靶点作用, 抑制 PLA₂ 活性, 抑制肺内炎症相关细胞 NF- κ B 活化, 下调多种细胞因子表达, 减轻肺损害, 降低死亡率。

[关键词] 清胰汤; 急性出血坏死性胰腺炎肺损伤; 磷脂酶 A₂; NF- κ B; 细胞因子; 善宁; 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0043-04

Mechanisms of Qing Yi decoction on Acute Lung Injury Induced by Acute Hemorrhagic Necrotizing Pancreatitis in Rats

LI Dong-hua, LIU Hong-bin, CUI Nai-qiang, WANG Qian, XUE Xiao-ping
(Tianjin Acute Abdominal Diseases Institute, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic mechanisms of Qing Yi decoction on acute lung injury induced by acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats. **Methods:** AHNP model was induced by intraductal administration of 5% sodium taurocholate in Wistar rat. Qing Yi decoction was administered orally 30 minutes after model induction. Sandostatin (50 μ g/kg) was administrated by subcutaneous injection after model induction. The other animals were used to observe the 24-hour mortality. Animals were killed on various hours after model induction (3, 6, 12h). Bronchoalveolar lavage (BAL) macrophages NF- κ B activation was determined by ELISA method. Pulmonary TNF α , PLA₂, myeloperoxidase(MPO) were examined. The Levels of Amylase, Lipase, PLA₂ of serum were determined also. Morphologic changes of lung and pancreas were observed under light microscopy. **Results:** In Qing Yi decoction group, the mortality was significantly reduced; Lung and pancreas injury was markedly reduced; Qing Yi decoction significantly attenuated NF- κ B activation of BAL macrophages. PLA₂, TNF α levels of serum and lung tissue were decreased significantly. **Conclusions:** Qing Yi decoction has protective effects on AHNP-ALI through multiple pathways, among these, the inhibitory effect on PLA₂ activity is an important one. Qing Yi decoction can attenuate the "PLA₂-NF- κ B-cytokine cascade" markedly.

[Key words] Qing Yi decoction; pancreatitis-associated lung injury; NF- κ B; phospholipase A₂; cytokines; sandostatin; Pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC)

[收稿日期] 2005-09-22

[通讯作者] 李东华, Tel: (22) 27022268-2241; E-mail: donghualidoctor@yahoo.com

清胰汤是天津市南开医院治疗急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的基本方。经过三十余年全国大范围的临床应用, 已证实清胰汤对各种原因引起的水肿性胰腺炎具有良好的疗效, 对于重型胰腺炎也有肯定的效果。对清胰汤也进行了深入的研究, 但多集中于保护肠屏障、防止菌群移位、抑制肠源性内毒素血症方面。本研究利用大鼠急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)模型, 探讨了清胰汤对 AHNP 肺损伤的治疗机理。

1 材料与方法

1.1 材料 健康 Wistar 大鼠, 由中国药品生物制品检定所动物中心提供; 清胰汤全方由柴胡 15g、黄芩 10g、胡连 10g、杭芍 15g、木香 10g、元胡 10g、大黄 15g、芒硝 10g 组成, 由急腹症研究所药物研究室煎煮浓缩至每 mL 相当于 1g 生药备用; 善宁 (Sandostatin, 0.1mg/mL) 由瑞士山道士药厂生产; 牛磺胆酸钠、卵磷脂、吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidone dithiocarbamate) 为 Sigma 产品; RPMI1640 培养基、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品; 肿瘤坏死因子 α (TNF α) ELISA 试剂盒为 TPI 公司产品; TransAMTM NF- κ B^{P65} 化学发光 ELISA 试剂盒购自 Active Motif 公司; 髓过氧化物酶 (MPO)、淀粉酶 (AMY) 试剂盒购自南京建成生物技术研究所。CO₂ 培养箱 (美国 Forma Scientific) Centrol LB 960 型微孔板化学发光检测仪 (Bethold 公司) Anthos 2010 型酶标仪。

2 方法

2.1 大鼠急性出血坏死性胰腺炎模型的建立 大鼠术前 12h 禁食、不禁水, 以 10% 水合氯醛 (0.3g/kg) 腹腔注射麻醉, 无菌条件下经腹壁正中切口入腹, 于胆管出肝门端以无损伤小动脉夹暂时阻断胆管, 寻找到胆胰管十二指肠乳头开口处, 在其相对的系膜缘用 4 号注射针头刺一小孔, 用 PE50 导管经乳头部逆行插入胆胰管 0.5cm, 妥善固定, 以 5% 牛磺胆酸钠匀速注入 (1mL/kg, 0.1mL/min), 注毕后拔管, 5min 后去除小动脉夹, 以无损伤缝线缝合十二指肠穿孔, 缝合腹壁。

2.2 实验分组 Wistar 大鼠 144 只, 随机分为 4 组: 假手术组、模型组、清胰汤组、善宁组 (每组 36 只)。假手术组只开腹翻动腹腔脏器数次即关腹; 模型组经胆胰管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠诱发急性出血坏死性胰腺炎; 清胰汤组在造模后 30min 灌胃清胰汤 (10mL/kg); 善宁组在造模后 30min 皮下注射善宁

(50 μ g/kg)。4 组动物分别随机分为 3、6、12h 三组 (每组 8 只, 其余 12 只用于观察 24h 死亡率)。于 3 个时间点, 麻醉状态下经腹主动脉取血, 测定血清淀粉酶、脂肪酶、PLA₂、TNF α ; 取左肺一部分匀浆, 测定 MPO、PLA₂、TNF α , 一部分经 10% 甲醛固定作病理组织学检查; 留取胰腺组织进行组织病理学观察。

2.3 肺泡巨噬细胞的收集、分离、纯化与核蛋白的提取 取右肺行支气管肺泡灌洗。以冷的 (4 $^{\circ}$ C) 5mL Hanks 液经支气管插管入右肺, 保留 30s 后回收, 重复 3 次, 将回收的肺泡灌洗液 1500r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 弃去上清, 以 RPMI1640 培养液 5mL 重悬, 离心 1 次, 细胞沉淀重悬于 RPMI1640 培养液中 (含青霉素 100u/mL、链霉素 100mg/mL)。取 1 滴计数, 调整细胞浓度, 接种于 6 孔培养板中 (1×10^6 /孔), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下培养 6h, 将未贴壁细胞及培养液弃去, 加入含 0.25% 胰蛋白酶的 RPMI1640 培养液消化 10min, 加入胎牛血清终止消化, 以 RPMI1640 培养液洗涤细胞两次, 细胞沉淀先后加入细胞裂解液 A (10mmol/L HEPES, pH7.9; 10mmol/L KCl; 0.1mmol/L EDTA; 0.1mmol/L EGTA; 1mmol/L DTT; 1mmol/L PMSF)、缓冲液 C (20mmol/L HEPES, pH7.9; 0.4mol/L NaCl; 1mmol/L EDTA; 1mmol/L EGTA; 1mmol/L DTT; 1mmol/L PMSF), 提取核蛋白, Bradford 法蛋白定量后, -80 $^{\circ}$ C 保存, 备测 NF- κ B。

2.4 检测指标

2.4.1 血清 AMY 测定 采用碘比色法, 结果以 U/L 苏氏单位表示。

2.4.2 血清、肺组织中 PLA₂ 的测定 采用酸滴定法。

2.4.3 血清 TNF α 测定 采用 ELISA 法, 酶标仪检测。

2.4.4 肺组织 MPO 测定 采用 MPO 试剂盒按说明书进行。

2.4.5 肺泡巨噬细胞中 NF- κ B 活性测定 准确吸取各组肺组织及巨噬细胞核蛋白提取物 1.25 μ g, 用细胞裂解液稀释到 20 μ L, 加入到包被有 NF- κ B 特异寡核苷酸双链探针的样品孔中, 设阳性对照 (1.25 μ g Hela 细胞蛋白提取物, 稀释于 20 μ L 细胞裂解液) 及空白对照 (只含细胞裂解液), 于室温振荡 1h (100r/min), 洗板 3 次, 加稀释的 NF- κ B P⁶⁵ 一抗 (1:1000), 室温反应 1h (勿振荡), 再次洗板 3 次, 加入 1:10000 稀释的二抗, 室温反应 1h, 洗板 4 次, 用吸水纸吸干

水分后,加入化学发光工作液,反应 10min 后,经微孔板化学发光检测仪检测 RLU (relative light units) 值。

2.4.6 肺 胰腺病理组织学检查 10% 中性甲醛固定,常规 HE 染色,光镜下观察,肺脏按病理评分标准^[1]进行评分。

2.5 统计学方法 实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件,多组间均数比较采用 One-Way-ANOVA 进行统计分析。

3 结果

3.1 24h 死亡率 假手术组术后 24h 内无死亡,死亡率为 0;急性出血坏死性胰腺炎模型(AHNP)组术后 24h 内有 7 只死亡(7/12),死亡率为 58.3%;清胰汤组术后 24h 内有 2 只死亡(2/12),死亡率为 16.7%;善宁组术后 24h 内有 3 只死亡(3/12),死亡率为 25.0%。清胰汤组死亡率与 AHNP 组比差异均有显著性(P 值均小于 0.05),善宁组 24h 死亡率与 AHNP 组比无显著差异($P > 0.05$)。

3.2 血清酶学检测结果 由表 1 可见,AHNP 大鼠在不同时间段血清 AMY, LIP 及 PLA₂ 水平均显著升高;清胰汤和善宁可显著降低三种酶的血清水平。

表 1 各组血清淀粉酶、脂肪酶、磷脂酶 A₂ 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	淀粉酶(U/L)	脂肪酶(U/L)	磷脂酶 A ₂ (U)
3h			
假手术组(n=8)	499.4 ± 86.3	492.5 ± 57.4	55.4 ± 14.7
模型组(n=8)	10444.5 ± 1863.2 ¹⁾	1751.3 ± 121.4 ¹⁾	97.4 ± 19.8 ¹⁾
清胰汤组(n=8)	6120.3 ± 1052.3 ²⁾	1105.3 ± 192.5 ²⁾	70.2 ± 18.3 ²⁾
善宁组(n=8)	5520.7 ± 1123.5 ²⁾	1002.4 ± 123.5 ²⁾	62.4 ± 15.7 ²⁾
6h			
假手术组(n=8)	503.8 ± 91.2	500.1 ± 67.2	57.2 ± 15.4
模型组(n=7)	13316.4 ± 1374.1 ¹⁾	1870.3 ± 171.3 ¹⁾	113.2 ± 27.3 ¹⁾
清胰汤组(n=7)	6900.5 ± 1005.3 ²⁾	1200.3 ± 212.3 ²⁾	81.2 ± 19.3
善宁组(n=6)	6720.7 ± 895.3 ²⁾	1000.5 ± 190.2 ²⁾	69.3 ± 14.2 ²⁾
12h			
假手术组(n=8)	501.5 ± 96.4	495.5 ± 60.3	56.2 ± 16.2
模型组(n=6)	15272.6 ± 2354.6 ¹⁾	2010.4 ± 200.6 ¹⁾	121.2 ± 21.3 ¹⁾
清胰汤组(n=6)	10072.3 ± 1789.5 ²⁾	1573.5 ± 323.7 ²⁾	97.3 ± 20.5 ²⁾
善宁组(n=6)	9300.4 ± 1250.1 ²⁾	1356.2 ± 200.5 ²⁾	85.2 ± 17.9 ²⁾

与假手术组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 血清 TNF α 测定结果 由图 1 可见,AHNP 大鼠在不同时间段血清 TNF α 水平均显著升高;清胰汤、善宁可显著降低 TNF α 的血清水平。

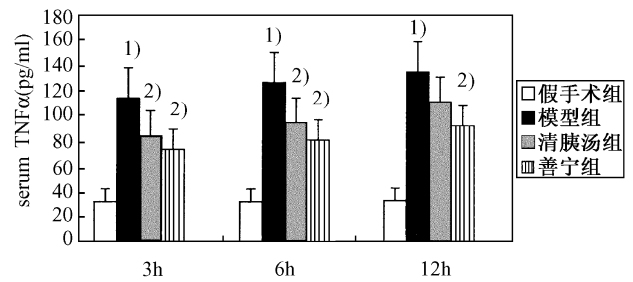


图 1 各组血清 TNF α 水平 (pg/mL)

与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 肺组织 MPO、PLA₂、TNF α 测定结果 由表 2 可见,AHNP 大鼠在不同时间段肺组织 MPO, PLA₂, TNF α 水平均显著升高;清胰汤、善宁可显著降低其水平。

表 2 各组肺组织 MPO、PLA₂、TNF α 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	MPO(U/g)	PLA ₂ (U/g)	TNF α (pg/mg)
3h			
假手术组(n=8)	0.51 ± 0.13	37.5 ± 7.7	17.0 ± 8.4
模型组(n=8)	1.59 ± 0.26 ¹⁾	59.3 ± 11.3 ¹⁾	88.4 ± 15.4 ¹⁾
清胰汤组(n=8)	1.07 ± 0.31 ²⁾	42.3 ± 12.3 ²⁾	50.3 ± 12.5 ²⁾
善宁组(n=8)	1.01 ± 0.24 ²⁾	40.5 ± 17.3 ²⁾	47.5 ± 17.5 ²⁾
6h			
假手术组(n=8)	0.50 ± 0.17	39.2 ± 8.9	17.9 ± 9.2
模型组(n=7)	1.79 ± 0.23 ¹⁾	71.7 ± 10.9 ¹⁾	95.2 ± 13.6 ¹⁾
清胰汤组(n=7)	1.17 ± 0.45 ²⁾	49.2 ± 10.2 ²⁾	60.8 ± 17.5 ²⁾
善宁组(n=6)	1.18 ± 0.54 ²⁾	42.5 ± 17.2 ²⁾	55.2 ± 19.5 ²⁾
12h			
假手术组(n=8)	0.49 ± 0.18	39.2 ± 9.1	18.1 ± 7.9
模型组(n=6)	1.87 ± 0.21 ¹⁾	87.5 ± 12.3 ¹⁾	108.5 ± 19.2 ¹⁾
清胰汤组(n=6)	1.21 ± 0.35 ²⁾	57.3 ± 11.7 ²⁾	69.8 ± 20.2 ²⁾
善宁组(n=6)	1.17 ± 0.47 ²⁾	48.2 ± 13.7 ²⁾	62.2 ± 27.5 ²⁾

与假手术组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较,²⁾ $P < 0.05$ 。

3.5 肺泡灌洗液巨噬细胞 NF- κ B 活性 采用 ELISA 化学发光法检测不同实验组肺泡灌洗液中巨噬细胞中 NF- κ B 活性(结果见图 2)。AHNP 造模后 3、6、12h NF- κ B 活性显著升高,明显高于假手术组(P 均小于 0.01);清胰汤、善宁可显著降低巨噬细胞中 NF- κ B 活性(P 均小于 0.05)。

4 肺组织学检查

4.1 大体观察 AHNP 组 3、6、12h 肺组织体积增大,重量增加,呈暗红色,包膜下可见出血灶,切面有血性液体渗出;清胰汤、善宁组造模后 3、6、12h 体积稍增大,外观呈粉红色,包膜下无出血,切面无明显

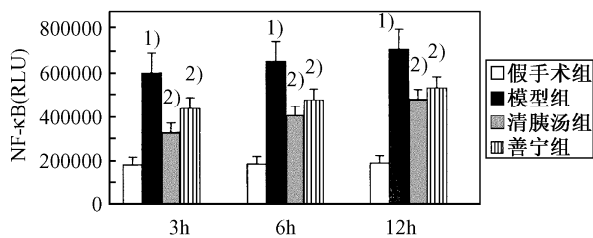


图 2 各组肺泡灌洗液巨噬细胞 NF-κB 活性 (RLU)

与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

血性渗液渗出; 假手术组大鼠肺外观色泽粉红, 无明显异常。

4.2 光镜检查 AHNP 组 3、6、12h 肺组织病变以广泛肺泡出血、肺间隔增厚、肺间质淤血、大量炎性细胞浸润为主, 按雷文章肺组织病理评分标准, 组织学评分显著高于假手术组 (P 值均小于 0.01); 清胰汤、善宁组造模后肺组织病变以肺间质水肿及间质充血为主, 炎性细胞浸润显著减轻, 组织学评分显著低于 AHNP 组 (P 值均小于 0.05)。假手术组肺组织基本正常 (肺组织学评分见表 3)。

表 3 各组肺组织病理评分 ($\bar{x} \pm s$)

分组	时间		
	3h	6h	12h
假手术组	0.17 ± 0.04	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.05
模型组	2.50 ± 0.55 ¹⁾	2.67 ± 0.52 ¹⁾	2.92 ± 0.43 ¹⁾
清胰汤组	1.49 ± 0.34 ²⁾	1.57 ± 0.34 ²⁾	1.98 ± 0.32 ²⁾
善宁组	1.74 ± 0.27 ²⁾	2.01 ± 0.45 ²⁾	2.27 ± 0.43

与假手术组比较, ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$ 。

4.3 胰腺病理组织学检查 AHNP 组 3h 胰腺可见明显出血、坏死灶, 大量炎性细胞浸润; 6h 胰腺病变主要以坏死为主要表现, 坏死较为彻底; 12h 胰腺坏死彻底, 胰小叶结构消失。清胰汤、善宁组胰腺病变明显减轻, 胰小叶坏死减少, 小叶结构较完整, 病变以白细胞浸润、腺泡细胞变性为主。

5 讨论

中医认为重型胰腺炎系由肝胆失疏、湿热蕴结之病机, 进一步演变为热毒炽盛、瘀热内阻, 或上迫于肺, 或内陷心包, 或热上血络所致。其病机之关键是“实热血瘀”, 所以治法应以“通腑泄热, 活血化瘀”。中药清胰汤由柴胡、黄芩、胡连、杭芍、木香、元胡、大黄、芒硝 8 味中药组成, 具有理气开郁、清热解毒、活血化瘀、通里攻下的功效。其中柴胡、杭芍、木香调气疏肝、缓急止痛; 元胡理气活血; 黄芩、胡连清肝胃之热; 大黄、芒硝通里攻下, 以泻中焦之实热。

经过三十余年全国大范围的临床应用, 已证实

清胰汤对各种原因引起的水肿性胰腺炎具有良好的疗效, 对于重型胰腺炎也有肯定的效果^[2]。对清胰汤的基础研究多集中于保护肠屏障、防止菌群移位、抑制肠源性内毒素血症方面。吴承堂等人证明清胰汤直接参与了重型胰腺炎时肠粘膜损伤的修复过程, 包括细胞增殖、分化和再生等, 对肠粘膜损伤修复有显著促进作用, 可保护肠粘膜, 对减轻或防止 AHNP 后因肠粘膜损伤而导致的肠源性内毒素血症具有重要作用^[3]。

倪绍忠^[4]等人的临床研究证实, 重型胰腺炎患者早期应用清胰汤除能促进肠功能恢复以外, 还能显著降低血中 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平。其他多项研究提示清胰汤可有效减少急性胰腺炎时血中细胞因子水平, 对胰外器官起到保护作用。但对于其降低细胞因子的具体机制尚不清楚, 相关的研究还较少见。鉴于炎性细胞因子激活机制在 AHNP-ALI 中的重要作用, 本课题进一步探讨了清胰汤对 AHNP-ALI 的治疗机理。

实验结果表明, 清胰汤治疗组不同时间血清及肺组织中 TNF- α 水平显著降低, 肺泡巨噬细胞中 NF- κ B 活性显著下降, 肺组织及血中 PLA₂ 水平亦降低, 同时肺组织病理改变也明显减轻, 提示清胰汤能有效抑制 PLA₂ 活性, 从而阻止 NF- κ B 的活化, 进而减少相关炎性细胞因子的过度分泌, 减轻肺的损伤, 降低动物死亡率。

总之, 我们认为中药清胰汤是通过其多途径多靶点作用而发挥治疗作用的。本实验证实清胰汤可抑制 PLA₂ 活性, 进而抑制肺内炎症相关细胞的 NF- κ B 活化, 下调多种细胞因子表达, 减轻肺及其它器官的损害, 降低死亡率。

[参考文献]

- [1] 雷文章, 韦靖江, 沈文律, 等. 实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系[J]. 中华实验外科杂志, 1995, 12(3): 131-133.
- [2] 吴承堂, 黎洁良, 黄祥成, 等. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎的肠道细菌移位影响的比较研究[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(6): 525-528.
- [3] 吴承堂, 黎洁良. 中药清胰汤对犬急性坏死性胰腺炎肠黏膜损伤修复的影响[J]. 1998, 5(6): 326-328.
- [4] 倪绍忠, 时开网, 杨坤兴. 清胰汤对急性胰腺炎治疗中细胞因子的影响[J]. 江苏医药杂志, 2003, 29(1): 60.