

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.12.004

文章编号: 1005-8982(2017)12-0021-04

血必净治疗腹腔感染的实验研究*

张玮,朱艳娜,刘守信

(大连医科大学附属第一医院 药学部,辽宁 大连 116011)

摘要:目的 研究血必净对大鼠腹腔感染急性胰腺炎的作用及其机制。**方法** SD 大鼠 30 只,随机分为 3 组,包括假手术组、胰腺炎组及血必净组。假手术组仅行开关腹手术,胰腺炎组以 3.5%牛磺胆酸钠复制模型,血必净组注射血必净治疗。光镜观察胰腺组织病理改变,酶联免疫吸附法测定血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及白介素 6(IL-6),同时分离中性粒细胞(PMN),进行 PMN 凋亡检测。**结果** 血必净组胰腺组织病理变化与胰腺炎组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),血清淀粉酶、TNF- α 及 IL-6 均低于胰腺炎组,血必净组 PMN 凋亡率与胰腺炎组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 血必净可能通过抑制 TNF- α 、IL-6 的产生,发挥治疗作用,其是否通过诱导 PMN 的凋亡,减轻炎症反应有待进一步研究。

关键词: 血必净;急性胰腺炎;肿瘤坏死因子;中性粒细胞;凋亡

中图分类号: R657.51

文献标识码: A

Therapeutic effect and mechanism of Xuebijing on intra-abdominal infection of rats*

Wei Zhang, Yan-na Zhu, Shou-xin Liu

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116011, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Xuebijing (XBJ) on the acute pancreatitis in rats and its possible mechanism. **Methods** Thirty SD rats were randomized into sham group, pancreatitis group and XBJ group. The rats in the sham group only underwent opening and closure of the abdomen; the rats in the pancreatitis group received Taurocholate sodium administration to establish animal model and the treatment group was intervened by XBJ. The pathological changes of pancreatic tissues were observed under optic microscope. Plasma concentrations of amylase and the expressions of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6 in pancreatic tissues were determined by ELISA. Apoptosis of isolated neutrophils was detected. **Results** The pathological changes of the pancreatic tissues in the XBJ group were much more relieved compared to those in the pancreatitis group; the level of blood amylase was significantly lower in the XBJ group ($P < 0.05$). The expressions of TNF- α and IL-6 in the XBJ group were significantly lower than those in the pancreatitis group ($P < 0.05$). The PMN apoptotic rate in the XBJ group was not significantly different from that in the pancreatitis group ($P > 0.05$). **Conclusions** XBJ could relieve acute pancreatitis in rats by inhibiting the production of TNF- α and IL-6. Whether it could promote apoptosis of PMN needs further research.

Keywords: Xuebijing; acute pancreatitis; tumor necrosis factor- α ; neutrophil; apoptosis

急性胰腺炎是临床上常见的急腹症,发病率逐年增加,常伴有全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)继而发展为多器官

障碍综合征,是患者病死率升高的主要原因^[1-2]。淀粉酶是临床上反映急性胰腺炎发作的一个经典指标。在胰腺组织尚未出现坏死前,可以通过检测淀粉

收稿日期:2016-02-26

*基金项目:2013 年辽宁省教育厅科学研究一般项目(No: L2013355)

[通信作者] 刘守信, E-mail: 18098877520@163.com; Tel: 18098877520

酶来反映胰腺炎的严重程度^[3]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 是引起组织细胞损伤的重要细胞因子, 两者参与急性胰腺炎的病理过程。中性粒细胞 (Neutrophil, PMN) 是正常免疫系统必要的组成部分, 在炎症的发生、发展和转归中起重要作用。研究认为, PMN 的凋亡延迟会增加白细胞的数量, 并导致疾病进一步恶化^[4]。血必净是根据中西医结合“菌、毒、炎并治”理论研究的复方中药制剂, 临床研究表明, 血必净有抗炎、改善微循环的作用^[5]。本实验在急性胰腺炎大鼠模型中给予血必净进行干预, 观察胰腺组织病理改变, 测定血清淀粉酶、TNF- α 及 IL-6, 并分离 PMN 进行凋亡检测, 探讨血必净治疗大鼠急性胰腺炎的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康 SD 大鼠 30 只, 体重 220 ~ 250 g, 大连医科大学实验动物中心提供。随机分为 3 组, 每组 10 只大鼠, 包括假手术组、胰腺炎组及血必净组。假手术组仅行开关腹手术, 胰腺炎组 3% 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 经十二指肠乳头逆行胰胆管缓慢注射 3.5% 牛磺胆酸钠, 复制大鼠胰腺炎模型组^[6-7], 血必净组在模型复制成功后腹腔注射血必净 4 ml/kg, 隔 6 h 后再给药 1 次, 其余两组腹腔注射等剂量的生理盐水 (ml/kg)。模型复制成功 24 h 后, 切取大鼠胰腺标本。

1.2 主要试剂与设备

台式高速低温离心机 (5840R) (德国 Eppendorf 公司), 超净工作台 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。牛磺胆酸钠 (美国 Sigma 公司), 血必净注射液 (天津红日药业股份有限公司), 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (美国 Sigma 公司), 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) (北京中衫金桥公司)。

1.3 组织病理学检查

切取胰腺标本, 制成石蜡切片后行苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 光镜下观察胰腺组织病理学改变。

1.4 ELISA 检测

测定血清淀粉酶、TNF- α 及 IL-6 含量, 按试剂盒说明书进行。

1.5 PMN 分离和凋亡检测

PMN 分离采用自然沉降法结合密度梯度离心法。取下腔静脉血 2.5 ml, 37℃ 孵育 12 h, 加 1 ml PMN 分离液于 20 ml 离心管中, 取标本上层血浆层细胞加于分离液上, 700 r/min 离心 8 min, 可见离心管中液体由上到下分为血浆、血小板及粒细胞层核底层红细胞层。加入 2 ml 分离液于离心管中备用。取已分离的中间细胞层加入备用离心管中, 沿壁缓慢滴入, 将离心管 700 r/min 离心 2 min, 沉淀细胞用 1640 液 3 ml 洗涤 3 次, 1 200 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 加入 1640 液冲洗, 计数板调整细胞浓度至 1×10^6 /ml。用 4℃ PBS 洗涤分离的 PMN 2 次, 以 250 μ l 结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节细胞浓度为 1×10^6 /ml, 取 100 μ l 细胞悬液于 5ml 流式管中, 加入 5 μ l Annexin V/异硫氰酸荧光素、20 μ l/ml 碘化丙啶液 10 μ l, 室温避光孵育 15 min, 在反应管中加入 400 μ l PBS, 流式细胞仪检测 PMN 凋亡指数^[8]。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 11.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用方差分析, 方差齐则两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学结果

假手术组的大鼠胰腺组织切片结果显示, 胰腺小叶结构清晰, 其间质无红细胞、炎症细胞; 胰腺炎组胰腺腺泡结构消失, 腺泡细胞萎缩, 胞核溶解消失, 胰腺组织大片坏死; 血必净组大鼠胰腺组织结构破坏程度轻, 而且破坏范围小, 镜下可以观察到胰腺腺泡水肿, 实质及间质内 PMN 核淋巴细胞浸润。见图 1。

2.2 血清淀粉酶、TNF- α 及 IL-6 含量

血清淀粉酶含量在假手术组、胰腺炎组及血必净组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 胰腺炎组和血必净组分别与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($t = 3.121$ 和 2.821 , $P = 0.013$ 和 0.020), 血清淀粉酶含量胰腺炎组和血必净组高于假手术组, 分别增加 5.56 和 4.25 倍。同时, 胰腺炎组与血必净组的淀粉酶含量比较, 差异有统计学意义 ($t = 2.486$, $P = 0.038$), 血必净组的淀粉酶含量降低, 下降 22.23%。模型复制成功 24 h 后, 胰腺炎组 TNF- α 和 IL-6 含量与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($t = 3.690$ 和 3.426 , $P = 0.005$ 和 0.008); 血必净组 TNF- α 和 IL-6

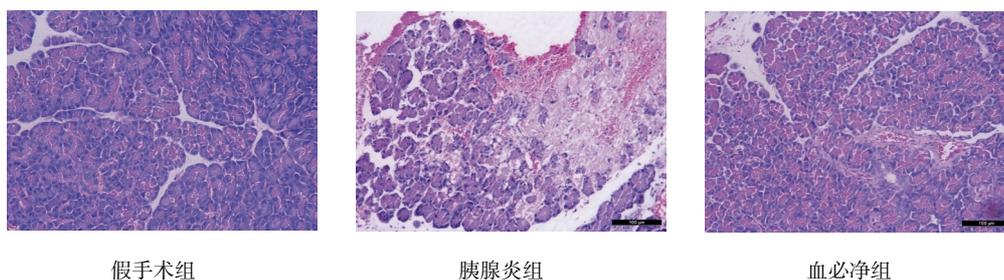


图 1 大鼠胰腺组织切片结果 (HE × 200)

含量与假手术组比较,差异有统计学意义($t=2.728$ 和 $2.616, P=0.025$ 和 0.031),表明模型复制成功。另一方面,胰腺炎组 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 含量与血必净组比较,差异有统计学意义($t=2.653$ 和 $2.467, P=0.029$ 和 0.039),相比于胰腺炎组,血必净组 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 含量降低。见附表。

2.3 PMN 凋亡率的变化

模型复制成功后,血必净组 PMN 凋亡率与胰腺炎组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。胰腺炎组

的 PMN 凋亡率与假手术组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

附表 各组血清淀粉酶、 $TNF-\alpha$ 及 $IL-6$ 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血清淀粉酶 I/(u/L)	$TNF-\alpha$ /(ng/L)	$IL-6$ /(ng/L)
假手术组	768.53 ± 107.30	86.32 ± 8.11	105.64 ± 17.44
胰腺炎组	4298.23 ± 756.89	302.01 ± 24.28	367.02 ± 21.01
血必净组	3342.87 ± 423.33	263.69 ± 25.20	253.62 ± 16.26
F 值	5.621	4.452	4.027
P 值	0.008	0.021	0.034

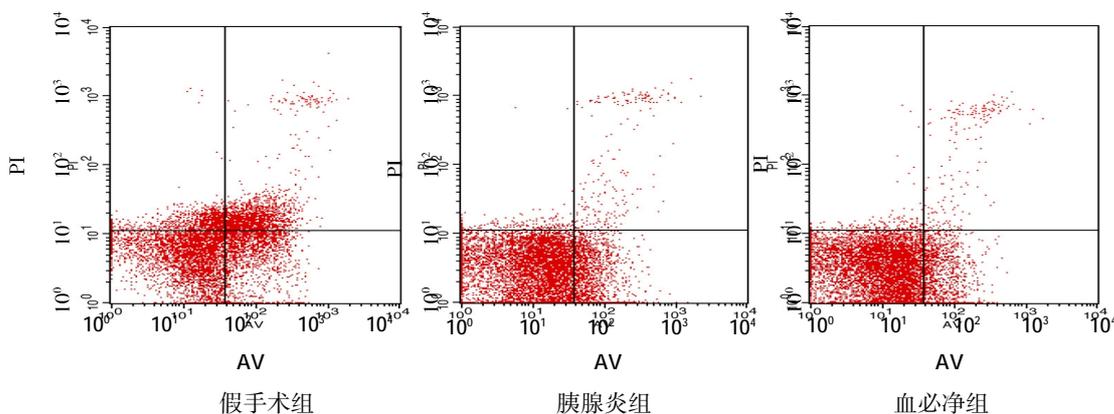


图 2 各组大鼠外周血 PMN 凋亡率的变化

3 讨论

逆行性胰胆管注射法复制急性胰腺炎模型已被广泛应用于胰腺炎发病机制、病理生理变化及防治效果的研究。本实验对大鼠进行逆行性胰胆管注射 3.5%牛磺胆酸钠,从而诱发大鼠急性胰腺炎,大鼠腹腔内出现大量腹水,组织切片中可见胰腺组织大片坏死,大量炎症细胞浸润,血管破裂出血,符合急性胰腺炎标准。同时,血清淀粉酶结果表明,胰腺炎组淀粉酶含量与假手术组比较,差异有统计学意义。本模型复制成功,为后续的炎症因子的测定和药物治疗提供可靠基础。

细胞因子作为一种重要的炎症介质,对于维持机体内环境稳定起重要的作用。 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 是机

体的促炎细胞因子,在急性胰腺炎的发病,以及全身并发症的发生过程中发挥重要作用,是判断急性胰腺炎严重程度的早期指标。 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 促进 PMN 释放,诱导单核细胞核和多核粒细胞趋化浸润到炎症局部,并进一步促进两者的释放,而形成一种恶性循环^[9-10]。其中 $IL-6$ 是炎症初期最重要的促炎细胞因子。 $IL-6$ 主要是由单核细胞产生,其升高程度、持续水平与胰腺炎的严重程度密切相关^[11]。本实验结果说明, $IL-6$ 可以作为急性胰腺炎严重程度的指标,应用血必净治疗后,血必净组血清中 $IL-6$ 水平与胰腺炎组比较,差异有统计学意义,提示血必净降低 $IL-6$ 水平,减轻胰腺炎的炎症反应。同时血必净组与胰腺炎组 $TNF-\alpha$ 水平比较,差异有统计学意义。

PMN 是机体免疫系统的重要组成部分,是白细胞中功能最活跃的部分。在炎症的发生、发展及转归中发挥重要作用。目前研究表明,PMN 凋亡延迟或凋亡障碍是造成急性胰腺炎发生 SIRS 的重要机制之一,循环中炎症因子和细胞间信号的转导与 PMN 的凋亡相关。有研究表明,低浓度的 TNF- α 能诱导细胞凋亡。同时,在损伤因子的作用下,激活单核/巨噬细胞,从而释放出多种细胞因子,如 TNF- α 、白细胞介素等,进而引起 PMN 和内皮细胞的过度激活,释放大量炎症介质,加重胰腺损伤,还可以引起胰腺外其他重要脏器的功能障碍^[12-13]。血必净具有强有效的抗内毒素作用,可以拮抗内毒素诱导单核/巨噬细胞产生的内源性炎症介质失控性释放,临床上常用于治疗急性危重病,如细菌感染引起 SIRS,疗效满意^[14]。同时,临床上血必净治疗胰腺炎所引起的 SIRS 疗效确切,但是发挥治疗作用的药理机制尚未明确。基于该点,本研究表明,血必净可以通过降低血清中 TNF- α 和 IL-6 水平,来减轻胰腺炎的炎症反应,同时 TNF- α 和 IL-6 又促进 PMN 的释放,血必净是否会引起 PMN 释放减少,是否会通过诱导 PMN 的凋亡来进一步减轻炎症反应。关于 PMN 凋亡检测的数据有一定变化,但是差异无统计学意义,只能说目前提供一个方向,笔者会继续重复实验,进一步研究,以解决问题,从而为急性胰腺炎和急性重症胰腺炎所致 SIRS 治疗提供思路及理论支持。

参 考 文 献:

- [1] GRAVANTE G, GARCEA G, ONG S L, et al. Prediction of mortality in acute pancreatitis: a systematic review of the published evidence[J]. *Pancreatology*, 2009, 9(5): 601-614.
- [2] 赵丽梅,冯志杰,高军萍,等. α -硫辛酸对大鼠急性胰腺炎相关肾损伤的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 1(35): 431-434.
- [3] 余泉,黄生福,李永国,等. 奥曲肽作用大鼠急性胰腺炎胰腺病理改变及对淀粉酶分泌影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(15): 13-15.
- [4] CHEN H M, HSU J T, CHEN J C, et al. Delayed neutrophil apoptosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2005, 31(4): 360-364.
- [5] 张伟,朱艳娜,王艳. 血必净注射液对感染性疾病的临床应用研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(5): 1189-1191.
- [6] 王冬冬,刘红山,岳学良. ω -3 多饱和脂肪酸对大鼠急性胰腺炎炎症介质及 p38 丝裂原活化蛋白激酶影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5): 1066-1068.
- [7] 周新泽,曹勇,章文毅,等. 大黄素对大鼠急性胰腺炎的治疗作用[J]. *中华笑话外科杂志*, 2008, 7(6): 416-418.
- [8] KEEL M, UNGETHUM U, STECKHOLZER U, et al. Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis[J]. *Blood*, 1997, 90(9): 3356-3363.
- [9] 朱雏铭,纂介寿. 重症急性胰腺炎与促炎细胞因子和炎症介质的关系[J]. *医学研究生学报*, 2000, 13(2): 106-110.
- [10] 牛万成,蒋孔斐,张绍辉,等. 血必净对大鼠胰腺炎治疗作用的机制探讨[J]. *临床军医杂志*, 2011, 39(5): 815-817.
- [11] 王洪禄,孙家邦. 肥大细胞在重症急性胰腺炎发病机制中的作用[J]. *国际外科学杂志*, 2007, 34(5): 313-315.
- [12] JIMENEZ M F, WATSON R W, PARODO J, et al. Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome[J]. *Arch Surg*, 1997, 132(12): 1263.
- [13] SCHOENBERG M H, BUCHLER M, BEGER H G. Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis[J]. *Hepato Gastroenterol*, 1994, 41: 313-319.
- [14] 张万祥,李志军,王今达. 血必净注射液治疗重症急性胰腺炎 42 例疗效观察[J]. *中国急救医学*, 2006, 26(8): 635-636.

(童颖丹 编辑)