

丹参注射液预防大鼠急性胰腺炎及其机制研究

郑俊全

内蒙古医科大学附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050

摘要: **目的** 观察丹参注射液预防大鼠急性胰腺炎及其对血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-6)、胰腺组织核因子(NF- κ B)及氧自由基的影响。**方法** 将60只SD大鼠随机分为6组,分别为假手术组、模型组、乌司他丁组(20 000 U/kg)以及丹参注射液低、中、高剂量(0.4、0.8、1.6 mL/kg)组。用5%牛磺胆酸钠(1.0 mL/kg)胰管内注入诱导大鼠急性胰腺炎模型,造模前30 min分别尾iv给予丹参注射液。各组大鼠均于造模6 h后行腹主动脉采血,处死大鼠取胰腺组织标本,检测SD大鼠急性胰腺炎模型血清淀粉酶(AMY)、血浆内毒素(ET)、胰腺病理评分和病死率。并用ELISA法检测血清IL-6、TNF- α 浓度的变化,运用免疫组化法检测NF- κ B表达水平,同时切取各时间点大鼠胰腺组织,检测丙二醛(MDA)、组织髓过氧化物酶(MPO)及超氧化物歧化酶(SOD)的水平。**结果** 模型组大鼠的血清AMY、血浆ET、病理评分、死亡率、IL-6、TNF- α 水平及胰腺组织中NF- κ B活性、MDA水平和MPO活性均较假手术组升高($P<0.01$),而SOD活性则明显降低($P<0.05$);乌司他丁组和丹参注射液组上述各项指标均较模型组明显改善($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 丹参注射液可显著降低实验性急性胰腺炎大鼠的IL-6、TNF- α 及NF- κ B,清除氧自由基,减轻脂质过氧化反应,从而减轻急性胰腺炎病理损害程度,降低急性胰腺炎大鼠的死亡率。

关键词: 丹参注射液;急性胰腺炎;大鼠;IL-6;TNF- α ;NF- κ B;氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)01-0013-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.01.003

Prevention of Danshen Injection on rats with acute pancreatitis and its mechanism

ZHENG Jun-quan

Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China

Abstract: **Objective** To investigate prevention of Danshen Injection on rats with acute pancreatitis, and determine the levels of TNF- α , IL-6, nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity and oxygen free radicals. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into Sham group, model group, ulinastatin (20 000 U/kg) group and low-, mid-, and high-dose Danshen Injection (0.4, 0.8, and 1.6 mL/kg) groups. Acute pancreatitis model was developed by retrograde injection of 5% sodium taurocholate (1.0 mL/kg) into pancreatic duct in rats. Danshen Injection was injected into the tail vein 30 min before sodium taurocholate injection. The abdominal aortic blood and pancreatic specimens were taken 6 h after sodium taurocholate injection for measurement of serum amylase (AMY), plasma endotoxin (ET), pathological scores of pancreas and case-fatality rate. The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by ELISA method. Expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in pancreatic tissue was detected by immunohistochemical method, and oxygen free radicals, such as MDA, MPO, and SOD in each group were observed. **Results** The levels of serum AMY, plasma ET, pathological score versus, mortality, IL-6, TNF- α concentration, NF- κ B levels of pancreas, pancreatic tissue, and the content of MDA and activity of MPO were enhanced ($P<0.01$), and the activity of SOD was significantly reduced in model group ($P<0.05$). Danshen Injection groups showed statistical improvement in plasma ET, serum AMY, pathological score, and oxygen free radicals compared with model group ($P<0.05$, 0.01). **Conclusion** Danshen Injection can significantly decrease NF- κ B activity, IL-6, and TNF- α levels, scavenge oxygen free radicals, and reduce lipid peroxidation, and therefore alleviate pancreatic damage in pancreas, leading to lowered level of case fatality in rats with acute pancreatitis.

Key words: Danshen Injection; acute pancreatitis; rat; IL-6; TNF- α ; NF- κ B; oxidative stress

收稿日期: 2014-09-04

作者简介: 郑俊全,男,副主任医师,研究方向是急腹症的治疗。Tel: 13074712895 E-mail: jqzheng0401@126.com

急性胰腺炎是胰腺的急性炎症,轻症急性胰腺炎为自限性,无明显的器官功能障碍;重症急性胰腺炎则有胰腺坏死、出血,炎症可波及胰周组织,甚至累及远处器官。可出现局部并发症,如胰腺坏死、胰腺假性囊肿、胰腺脓肿等,亦可并发多器官功能衰竭,死亡率 10%~20%^[1]。丹参注射液的主要组分为丹参,具有活血化瘀的功能,主治疗血闭阻所致的胸痹,症见胸部疼痛、病处固定,或冠心病、心绞痛见上述证候者^[2-3]。研究表明,丹参注射液能够显著降低急性胰腺炎患者的血黏度,改善胰腺的微循环障碍,减轻胰腺病变,被推荐为临床上治疗急性胰腺炎的常用辅助治疗药物,能够有效降低病死率,减少并发症^[4]。本实验考察丹参注射液对急性胰腺炎大鼠血清淀粉酶、血浆内毒素、胰腺病理评分和病死率的影响,判断丹参注射液是否具有改善胰腺病理损害的治疗作用。同时测定血清 IL-6、TNF- α 、NF- κ B 活性及氧自由基,探讨丹参注射液对急性胰腺炎的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

清洁级雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 (280 $\pm$ 20) g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK (沪) 2007-0005。

SD 大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,分别为假手术组、模型组、乌司他丁组 (20 000 U/kg) 以及丹参注射液低、中、高剂量 (0.4、0.8、1.6 mL/kg) 组。在 22 $^{\circ}$ C 恒温房内饲养,标准颗粒混合饲料喂饲。

1.2 药物与试剂

牛磺胆酸钠 (美国 Sigma 公司,批号 TO875,质量分数 $\geq$ 95%);丹参注射液 (上海第一生化药业有限公司,批号 1007291,规格 2 mL/支);IL-6、TNF- α 试剂盒 (北京方程生物科技有限公司);ET-1 试剂盒 (上海恒远生物科技有限公司);淀粉酶、超氧化物歧化酶 (SOD)、组织髓过氧化物酶 (MPO) 试剂盒和丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所);NF- κ B 鼠单克隆抗体 (Santa Cruz 公司);注射用乌司他丁 (广东天普生化医药股份有限公司,批号 20120119,规格 100 000 U/支)。

1.3 方法

1.3.1 急性胰腺炎动物模型的建立 参照 Aho^[5]的方法。SD 大鼠术前禁食 12 h 以上,不禁水,采用 ip 10%水合氯醛溶液麻醉,剂量为 4.0 mL/kg,大鼠

取仰卧位,四肢及头部无创固定于手术台上,去毛备皮,消毒,铺无菌巾。正中切口进腹,切口长约 2.0 cm,沿幽门寻及十二指肠,定位胰胆管十二指肠开口,于胰胆管开口附近十二指肠壁上用 4 号头皮静脉针穿刺进入肠腔内,再穿入胰胆管内,用胆管夹夹闭胆胰管近肝门端,缓慢注入 5%牛磺胆酸钠 (1.0 mL/kg),保持压力 5 min 后拔去胆管、退出穿刺针,缝合十二指肠,逐层关腹。

1.3.2 给药 丹参注射液组在造模前 30 min 分别尾 iv 给予丹参注射液 0.4、0.8、1.6 mL/kg,模型组在造模前尾 iv 给予 1.5 mL/kg 生理盐水,假手术组尾 iv 给予 1.5 mL/kg 生理盐水,进腹后不插管,仅显露、牵拉胰腺即关腹。乌司他丁组于造模后即刻 ip 注射用乌司他丁 20 000 U/kg。造模后 6 h 后行腹主动脉采血,处死大鼠,并剖腹快速取胰腺组织标本,待测。

1.3.3 标本采集 各组大鼠均于造模 6 h 后行腹主动脉采血 2 mL,所采血标本 37 $^{\circ}$ C 静置 20 min,随即 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,移取血清于 EP 管中,置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存备用 (用于血清 IL-6、TNF- α 测定)。

取血 2 mL,迅速注入冷却的酶抑制剂 (10% EDTA $\cdot$ Na₂ 30 μ L 和抑肽酶 40 μ L) 抗凝管中,摇匀,4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,-20 $^{\circ}$ C 保存待测 (用于血浆 ET-1 测定)。

处死大鼠后迅速剖腹分离胰腺,将其中一部分迅速保存于液氮罐中,然后转移至-80 $^{\circ}$ C 冰箱中冻存,用于组织匀浆 (用于胰腺组织 SOD、MDA 及 MPO 测定)。将另外一部分胰腺组织用 10%福尔马林固定,用于病理组织学分析。

1.3.4 组织病理学观察 处死大鼠后迅速摘取每只大鼠胰腺,取部分胰腺组织常规制成石蜡切片,HE 染色,由病理科医生对大鼠胰腺组织切片,在光学显微镜下观察胰腺组织病理变化,并按照 Schmidt 法半定量评分标准进行组织病理学评分^[6]。

1.3.5 指标检测 采用酶法,由贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪进行检测。采用放射免疫法检测血浆 ET-1,试剂盒可检测范围 20~1 000 pg/mL,灵敏度为 5 pg/mL;采用 Indogen 法行 ¹²⁵I ET-1 标记,比放射性为 1 750 Ci/mmol;取采集好的血清标本采用双抗体夹心法酶联免疫法吸附试验 (ELISA) 检测血清 IL-6、TNF- α 含量,操作步骤严格按试剂盒说明书进行,最后于酶标仪 450 nm 处

测定各孔吸光度值,重复测 3 次。通过标准曲线计算样品中大鼠血清中 IL-6、TNF- α 浓度;取大鼠胰腺组织石蜡切片,常规脱蜡,梯度水化,然后采用链霉亲和素-过氧化物酶(S-P)法检测胰腺细胞 NF- κ B 活性;取冻存的胰腺组织用冷生理盐水制备成 10%组织匀浆,超声粉碎后,4℃下 10 000 r/min 高速离心 15 min,取上清液,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD、MDA。蛋白定量采用考马斯亮蓝法。MPO 活性采用比色法测定,460 nm 波长,1 cm 光径,比色。以上操作均严格按照试剂盒说明书完成。

1.3.6 死亡率观察 实验期间观察各组大鼠死亡情况,计算各组死亡率,进行比较。

1.3.7 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 胰腺病理组织评分

模型组病理评分明显高于假手术组,两组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$);乌司他丁组和丹参注射液组病理评分均显著低于模型组,其中丹参注射液高剂量组的病理评分最接近假手术组($P < 0.01$ 、 0.05)。见表 1。

2.2 各组大鼠干预后血淀粉酶等指标检测

模型组血清淀粉酶(AMY)活性、IL-6、TNF- α 水平、血浆 ET、胰腺组织 NF- κ B 活性明显高于假

手术组($P < 0.01$),丹参注射液组上述指标均得改善,与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$ 、 0.05);丹参注射液高、中剂量组 6 h 病死率与模型组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 各组大鼠胰腺组织中 SOD、MDA、MPO 水平的比较

模型组大鼠胰腺组织 SOD 活性与假手术组比较明显降低($P < 0.01$),但丹参注射液组 SOD 活性显著升高,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 、 0.05)。丹参注射液组胰腺组织 MPO 活性、MDA 水平高于假手术组,但明显低于模型组($P < 0.01$ 、 0.05)。见表 3。

表 1 各组大鼠胰腺病理评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Pancreatic pathology score in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	病理评分/分
假手术	—	0.26±0.48
模型	—	6.31±0.55**
乌司他丁	20 000 U kg ⁻¹	4.94±0.78 ^{##}
丹参注射液	0.4	5.86±0.49
	0.8	5.14±0.63 [#]
	1.6	5.09±0.33 ^{##}

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

表 2 各组大鼠干预后各指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Indices after intervention in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	AMY/(U·L ⁻¹)	ET/(EU·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF- α /(ng·L ⁻¹)	NF- κ B	死亡率/%
假手术	—	1 326.2±108.5	0.21±0.08	126.02±12.33	86.42±10.28	9.29±1.25	0
模型	—	5 456.4±113.1**	0.61±0.02**	197.22±11.89**	214.35±11.71**	18.44±1.65**	8**
乌司他丁	20 000 U kg ⁻¹	3 368.1±113.2 ^{##}	0.31±0.06 ^{##}	153.29±12.28 ^{##}	124.65±16.31 ^{##}	12.88±1.69 ^{##}	1 ^{##}
丹参注射液	0.4	4 927.8±124.2 [#]	0.52±0.08 [#]	186.15±14.33 [#]	182.19±18.25 [#]	16.74±1.86 [#]	6
	0.8	4 319.5±131.9 [#]	0.45±0.07 [#]	173.42±9.25 [#]	169.27±15.34 [#]	14.88±1.72 [#]	2 ^{##}
	1.6	3 526.6±136.4 ^{##}	0.38±0.09 ^{##}	160.07±10.47 ^{##}	132.44±19.01 ^{##}	13.19±1.88 ^{##}	2 ^{##}

与假手术组比较:** $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

急性胰腺炎是胰酶在胰腺内被激活后引起胰腺组织自身消化的化学性炎症,临床以急性上腹痛、恶心、呕吐、发热、血与尿淀粉酶增高为特点。急性胰腺炎的发病机制尚不完全清楚,目前已报道胰

酶、炎性介质、氧自由基、胰腺微循环紊乱、细胞凋亡等诸多因素均与急性胰腺炎的发生、发展密切相关^[7]。

本病属于祖国医学的“腹痛”、“腰痛”、“结胸”等范畴。丹参注射液主要由丹参组成,主要化学成

表3 各组大鼠胰腺组织中 SOD、MDA、MPO 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 3 Comparison on SOD, MDA, and MPO in pancreatic tissue in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)	MDA/(μmol·L ⁻¹)	MPO/(U·g ⁻¹)
假手术	—	326.221 ± 10.57	5.21 ± 0.48	1.46 ± 4.13
模型	—	196.472 ± 11.81**	9.63 ± 0.32**	7.72 ± 4.19**
乌司他丁	20 000 U kg ⁻¹	304.550 ± 14.24 ^{##}	6.15 ± 0.65 ^{##}	3.97 ± 5.33 ^{##}
丹参注射液	0.4	227.328 ± 12.32 [#]	8.19 ± 0.56 [#]	6.65 ± 7.33 [#]
	0.8	249.521 ± 12.89 [#]	6.74 ± 0.27 [#]	5.37 ± 5.15 [#]
	1.6	296.641 ± 13.44 ^{##}	6.17 ± 0.42 ^{##}	4.19 ± 6.27 ^{##}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

分为丹参酮。方中丹参味苦,性微寒,善入血分,疗诸般血证。精制成丹参注射液后具有活血化瘀、通脉养心的功效,主要适用于心绞痛、冠心病、病毒性心肌炎及急性心肌梗死等症,近年来也用于急性胰腺炎的治疗。实验证明丹参能降低大鼠全血黏度、全血还原黏度、血细胞比容、红细胞刚性指数和红细胞聚集指数,降低血清丙二醛(MDA)含量。升高血清超氧化物歧化酶含量,对肝细胞损伤有保护作用^[8-9]。在治疗急性胰腺炎的过程中具有改善微循环、抗氧化、阻止钙内流、调控炎症因子、抗胰纤维化、抑制星形细胞活化和保护胰外器官等作用^[10]。

血清淀粉酶(AMY)的测定应用于诊断急性胰腺炎已有50多年的历史,具有重要的临床价值。急性胰腺炎时胰淀粉酶自腹膜腔吸收入血后,大部分从尿中排出体外,AMY的正常值范围为60~160 U/dL^[11]。本实验结果显示,模型组AMY活性明显高于假手术组,丹参注射液组则明显降低,与模型组比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$, 0.01)。

TNF- α 和IL-6是目前研究最多的促炎细胞因子,在急性胰腺炎的发生、发展中起着关键性的介导作用。TNF- α 是介导多种炎症介质释放的始动因子,参与了IL-1、IL-6等炎症介质的产生,并能刺激氧自由基和NO的生成,增加血管内皮细胞通透性并促使白细胞趋化、黏附,造成胰腺组织损害^[12]。IL-6主要由巨噬细胞、T细胞等多种细胞产生,在机体的抗感染免疫反应中发挥重要作用^[13]。NF- κ B是具有基因转录调控作用的蛋白质因子,调控多种炎症介质和细胞因子的基因表达,其中包括调节TNF- α 的生成^[14-15]。ET参与了胰腺微循环损害,主要表现在减少胰腺血流、致使胰腺缺血,具有内源性损伤胰腺组织的作用^[16]。本实验结果显示,丹参

注射液能降低胰腺炎大鼠血清IL-6、TNF- α 水平、血浆ET、胰腺组织NF- κ B活性,从而减轻胰腺组织的病理损害,改善微循环,使胰腺炎大鼠病死率下降。

SOD活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。MDA为脂质过氧化物,是由于机体产生的氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用而形成的。髓过氧化物酶MPO主要存在于中性粒细胞中,在细胞中的含量是一定的,MPO活性的增加主要反映血液中多形核白细胞在组织中的滞留增多^[17-18]。本研究中,模型组MPO活性和MDA含量均显著增加,而丹参注射液组MPO活性和MDA含量均明显降低,与模型组比较差异均有统计学意义,其中丹参注射液高剂量组上述指标的降低幅度最大($P < 0.01$)。

从本研究结果可以看出,丹参注射液下调了胰腺炎大鼠血清AMY、TNF- α 、IL-6、血浆ET等水平,胰腺组织NF- κ B、MPO活性和MDA水平均显著降低,并呈现出一定的剂量相关性,表现为剂量越高,降幅越大,而丹参注射液治疗后大鼠SOD活性增高,表明丹参注射液控制了炎症介质激活和氧自由基的释放,减轻了胰腺病理损害,改善了微循环,减缓了病程的进展,最终降低了胰腺炎大鼠的病死率。

参考文献

- [1] 安永亮. 内科疾病安全用药[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2010: 132-133.
- [2] 陈德兴. 中成药学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 195.
- [3] 岳海涛, 吕铭洋, 吕文伟, 等. 丹参注射液对急性心肌梗死犬血清微量元素和心肌形态学的影响[J]. 中草药, 2011, 42(9): 1799-1801.

- [4] 王友帆, 罗良坚. 丹参注射液对重症急性胰腺炎患者的治疗作用及对血黏度的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2013, 21(6): 296-298.
- [5] Aho H J, Koskensalo S M, Nevalainen T J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4): 411-416.
- [6] Rongione A J, Iusske A M, Kwan K, *et al*. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats [J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(3): 960-967.
- [7] Hazem Z M. Acute biliary pancreatitis: diagnosis and treatment [J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2009, 15(3): 147-155.
- [8] 张瑶华. 国家基本药物用药手册 [M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2009: 493.
- [9] 叶娜, 万丽, 杨秋楠, 等. 丹参注射液对人肝微粒体酶CYP2C9,CYP2C19,CYP2D6 体外抑制作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(6): 502-506.
- [10] 贺文煜, 郑国荣, 徐维田. 丹参制剂治疗急性胰腺炎的机制研究 [J]. 医学综述, 2012, 18(5): 763-765.
- [11] 张正良, 白郑海, 杜立峰, 等. 清胰汤联合 DAR 治疗急性胰腺炎的临床疗效 [J]. 2013, 22(7): 760-764.
- [12] Binker M G, Cosen-Binker L I. Acute pancreatitis: the stress factor [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(19): 5801-5807.
- [13] Zhang J, Niu J, Yang J. Interleukin-6, interleukin-8 and interleukin-10 in estimating the severity of acute pancreatitis: an updated meta-analysis [J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 61(129): 215-220
- [14] Xiao W Q, Yin G J, Fan Y T, *et al*. Catalpol ameliorates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats via Inhibiting Activation of nuclear factor kappa B [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 11957-11972.
- [15] Yu G, Wan R, Yin G, *et al*. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- κ B [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(5): 2133-2142.
- [16] Li J P, Yang J, Huang J R. Immunosuppression and the infection in patients with early SAP [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2013, 18: 892-900.
- [17] Tang Q Q, Su S Y, Fang M Y. Zinc supplement modulates oxidative stress and antioxidant values in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 159 (1-3): 320-324.
- [18] Hall J C, Crawford H C. The conspiracy of autophagy, stress and inflammation in acute pancreatitis [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014, 30(5): 495-499.