

3.3 综合评价以上结果,一滴清的退热效果快速、稳定、持久,优于西药泰诺,而且与目前现有治疗小儿外感发热的中药制剂比较,一滴清具有以下特点:①纯中药组成,用量少。②经临床试验未见明显毒副

反应。③鼻粘膜给药,途径新,吸收快,效果好。④经济、方便、实用。因此,一滴清是治疗小儿外感发热的有效药物,是中药剂改实施于儿科急症之新创,有相当的临床应用价值。

活血化瘀注射液对急性重型胰腺炎大鼠胰腺、肺白细胞聚集的影响

张艳军¹,赵连根²,吴咸中^{2*}

(1. 天津中医学院 中药系,天津 300193; 2. 天津市中西医结合急腹症研究所,天津 300100)

摘要:目的 对实验性急性重型胰腺炎(SAP)大鼠胰腺、肺的白细胞聚集进行定量研究。方法 应用胆胰管内逆行注射牛磺酸钠的方法引起大鼠 SAP,造模前经颈 iv ^{99m}Tc 标记白细胞,记录 SAP 后 3、6、12、24 h 胰腺、肺放射量,测定各脏器髓过氧化物酶(MPO)活性,进行白细胞聚集定量,并观察了组织病理改变。结果 SAP 大鼠 3 h 胰腺、肺白细胞聚集即显著增加,而且逐渐增多,活血化瘀注射液(HHI-I)能够明显抵制白细胞在胰腺、肺的聚集。结论 HHI-I 通过抑制白细胞内皮细胞粘附,减少白细胞在组织的聚集,从而对胰外脏器起保护作用。

关键词:活血化瘀注射液;急性重型胰腺炎;^{99m}Tc 标记白细胞;髓过氧化物酶;白细胞聚集

中图分类号: 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)06-0537-04

Inhibitory effect of HUOXUEHUAYU INJECTION (HHI-I) on leukocyte aggregation of acute and severe type pancreatitis in pancreas and lung of rat

ZHANG Yan-jun¹, ZHAO Lian-gen², WU Xian-zhong²

(1. Department of Chinese Materia Medica, Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China; 2. Tianjin Institute of Acute Abdomen in Combination of Chinese Traditional and Western Medicine, Tianjin 300100, China)

Key words HUOXUEHUAYU INJECTION (HHI-I); SAP; ^{99m}Tc labelled leukocyte; MPO; leukocyte aggregation

急性重型胰腺炎(SAP)实质上是一种全身性炎症反应综合征(SIRS),继续发展,则最终导致多脏器功能衰竭(MOF)。大量临床研究表明,早期或晚期出现的 MOF 是急性重型胰腺炎的主要死亡原因^[1],白细胞特别是中性粒细胞的过度激活与 SAP 时胰腺局部的病理变化和胰外脏器的损害有密切关系^[2]。已证实活血化瘀注射液(HHI-I)能够明显减少 SAP 发生时肠系膜毛细血管后静脉白细胞滚动、粘附的增加,并使血流速度和壁切率恢复恢复正常^[3]。我们对大鼠实验性 SAP 病理生理过程中,胰腺、肺组织白细胞的聚集进行了动态、定量研究,并观察了 HHI-I 的作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组:健康 Wistar 大鼠(购于军事医学科学院四所)130只,体重 220~300 g,雌雄各半,用

标准颗粒混合饲料喂养 1 周后开始实验。将实验动物随机分为假手术对照组($n=10$);SAP 模型组($n=40$),SAP+HHI-I 组($n=40$),SAP+复方丹参注射液组($n=40$),后 3 组又分为 3、6、12、24 h 亚组,每亚组各 10 只。

1.2 药物:HHI-I 由南开医院药厂制备每毫升相当生药 1 g。复方丹参注射液由上海第一生化制药公司生产,批号 971002。牛磺酸钠为 Sigma 公司产品。

1.3 实验方法:禁食一夜开始实验,将大鼠以 20% 乌拉坦 0.5 mg/kg 体重麻醉。无菌条件下进行手术,右颈静脉插管(PE50 医用塑料管,内径 0.5 mm,外径 0.8 mm,日本夏目制作所制),以备输液用。开腹,其中 SAP 组、SAP+HHI-I 组、SAP+丹参组结扎大鼠总胆管,经十二指肠乳头将插管插入胆胰管 0.5 cm,逆行注入 5% 牛磺酸钠溶液(0.1

* 收稿日期:2000-12-10

基金项目:天津市卫生局科研基金资助课题(98KY-9)

作者简介:张艳军(1967-),男,2000年6月天津医科大学中西医结合专业博士研究生毕业,主要从事活血化瘀中药作用机制研究,发表

论文 10余篇,获天津市科技进步三等奖 2项。

mL/100 g 体重 /min)复制 SAP模型,注射完毕后松开结扎胆总管的丝线 随即用微量 蠕动泵分别经颈静脉插管输入生理盐水 HHI-I和复方丹参注射液, 2 mL/h,给药剂量按 60 kg成人每公斤体重剂量的 15倍换算 各亚组分别于 3, 6, 12, 24 h颈椎脱臼处死 假手术组不复制 SAP模型,仅经颈静脉输入生理盐水,12 h后颈椎脱臼处死 取出胰腺 肺组织以备检测放射活性 髓过氧化物酶 (MPO)、组织病理形态

1.4 ^{99m}Tc标记白细胞^[4]

1.4.1 供体大鼠白细胞的分离:健康 Wistar大鼠,无菌心脏取血,肝素抗凝,按体积比 1:1加入无菌的 6%相对分子质量为 50万 u的右旋糖苷 (Dextran 500)生理盐水溶液,反复翻覆 40次,使其混匀; 竖直静置于 37℃温箱内使其沉降;10 min后可见清晰分层,以吸管小心吸取上层富含白细胞的血清, 其余部分继续沉降,出现清晰分层后即可吸取上清, 如此沉降 1.5 h,将富含白细胞的上清收集于离心管, 1 500 r/min离心 10 min,弃上清;加入 8 mL冷三蒸水,轻轻混匀,使红细胞被低渗破坏,1 min后加入 2 mL 4.5%氯化钠溶液,轻轻摇匀;以生理盐水洗 2次,1 500 r/min离心 10 min

1.4.2 ^{99m}Tc标记白细胞:将获得的白细胞团重悬与生理盐水溶液,加入 ^{99m}Tc-Exametazime,室温孵育 15 min,1 500r/min离心 10 min,将白细胞团用生理盐水重悬,浓度为 1.5×10^6 cfu/mL, γ 计数器检测放射活性后备用

每只实验动物在复制 SAP模型以前,经颈静脉插管注入 ^{99m}Tc标记的白细胞悬液 0.2 mL,待实验结束处死动物,分别取胰腺 肺组织 (0.2-0.4 g),生理盐水冲洗,滤纸吸干表面水分,称重后 γ 计数器检测放射活性 结果用每克组织放射量占注射白细胞的放射量的百分比表示 [% ID/g]

1.5 MPO检测^[4,5]:分离的胰腺 肺组织用生理盐水冲洗,滤纸吸干表面水分,称重,液氮速冻,-80℃储存备检测 10%胰腺组织匀浆,匀浆液为含有 0.5%十六烷基三甲基溴铵和 5%刀豆胰蛋白酶抑制剂的 0.05 mol/L磷酸钾缓冲液 (pH6) 将匀浆液

40 W下超声震荡 1 min,干冰冷冻,融化后再重复上述过程,如此反复 3次 将此悬液低温离心, 20 000 g,0~4℃,15 min 取 100 μ L上清加入 2.9 mL含有 0.167 mg/mL邻联二茴香胺和 0.0005%过氧化氢的 0.05 mol/L磷酸钾缓冲液中,分光光度计 460 nm检测吸光度 (A_{460}) 3 min,计算 1~3 min之间的 A_{460} 变化率 (δA_{460})代表 MPO活性 肺组织 MPO活性检测除组织匀浆液不加胰蛋白酶抑制剂外,其余均与胰腺组织 MPO检测相同

1.6 病理形态:取出 12 h时间段大鼠胰腺、肺组织,生理盐水冲洗,福尔马林固定,石蜡包埋,5 μ m切片,HE染色,光镜观察

1.7 统计学处理:方差分析用 F检验,两两比较用 q检验

2 结果

2.1 胰腺 肺组织放射量: SAP组胰腺 ^{99m}Tc 标记白细胞水平明显高与假手术组,造模后 6, 12, 24 h比 3 h明显增加,HHI-I治疗组可显著降低胰腺组织 ^{99m}Tc标记白细胞水平,丹参治疗组则没有明显作用,见表 1

肺组织 ^{99m}Tc标记白细胞水平 SAP组明显高与假手术组,造模后 3, 6, 12, 24 h之间没有明显差异, HHI-I治疗组可显著降低肺组织 ^{99m}Tc 标记白细胞水平,丹参治疗组则没有明显作用,见表 2

2.2 胰腺 肺组织 MPO活性:胰腺、肺组织 MPO活性 SAP组明显高与假手术组,而且造模后 3, 6, 12, 24 h呈进行性增加,HHI-I治疗组可显著降低胰腺 肺组织 MPO活性,丹参治疗组则没有明显作用,见表 3,4

2.3 各组 12 h时间段胰腺 肺组织病理学改变:假手术组胰腺、肺无明显病理学改变,无炎细胞浸润. SAP组大鼠胰腺组织大片出血性坏死,小叶结构破坏,细胞轮廓不清,有大量弥漫炎细胞浸润,其中主要为中性粒细胞及少许单核细胞 肺组织表现为肺泡壁增厚,可见典型的局灶性肺不张,间质内有大量炎细胞浸润,弥漫性肺泡壁毛细血管淤血 SAP+ 复方丹参注射液组大鼠胰腺组织大片出血性坏死,小叶结构破坏,细胞轮廓不清,有明显炎细胞浸润 肺

表 1 各组胰腺组织放射量 (% ID/g)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组			0.014 $\pm$ 0.003 [#]	
SAP组	0.173 $\pm$ 0.008	0.232 $\pm$ 0.009 $\Delta\Delta$	0.243 $\pm$ 0.012 $\Delta\Delta$	0.248 $\pm$ 0.012 $\Delta\Delta$
SAP+ 丹参	0.173 $\pm$ 0.011	0.235 $\pm$ 0.011	0.240 $\pm$ 0.010	0.249 $\pm$ 0.011
SAP+ HHI-I	0.017 $\pm$ 0.005 [#]	0.021 $\pm$ 0.005 [#]	0.021 $\pm$ 0.007 [#]	0.024 $\pm$ 0.005 [#]

与 3 h相比: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 SAP组、SAP+ 丹参组相比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

表 2 各组肺组织放射量 (% ID/g)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组			0.164± 0.011 [#]	
SAP组	0.545± 0.010	0.532± 0.014	0.529± 0.010	0.540± 0.011
SAP+ 丹参	0.512± 0.014	0.528± 0.018	0.537± 0.011	0.540± 0.024
SAP+ HHI-I	0.232± 0.018 [#]	0.240± 0.016 [#]	0.240± 0.019 [#]	0.0241± 0.020 [#]

与 SAP组、SAP+ 丹参组相比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

表 3 各组胰腺组织 MPO活力 (δA_{460})

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组			0.218± 0.017 [#]	
SAP组	0.382± 0.013	0.63± 0.012 [*]	0.683± 0.011 ^{*☆☆}	0.71± 0.007 ^{*☆☆△△}
SAP+ 丹参	0.373± 0.018	0.622± 0.010	0.686± 0.014	0.710± 0.007
SAP+ HHI-I	0.222± 0.013 [#]	0.346± 0.024 [#]	0.333± 0.019 [#]	0.34± 0.021 [#]

与 3 h相比: ^{*} $P < 0.01$; 与 6 h相比: ^{☆☆} $P < 0.01$; 与 12 h相比: ^{△△} $P < 0.01$

与 SAP组、SAP+ 丹参组相比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

表 4 各组肺组织 MPO活性 (δA_{460})

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组			0.37± 0.015 [#]	
SAP组	0.630± 0.020	0.79± 0.013 [*]	0.875± 0.016 ^{*△△}	0.888± 0.018 ^{*△△}
SAP+ 丹参	0.620± 0.015	0.775± 0.020	0.866± 0.017	0.883± 0.015
SAP+ HHI-I	0.419± 0.009 [#]	0.489± 0.034 [#]	0.504± 0.041 [#]	0.494± 0.029 [#]

与 3 h相比: ^{*} $P < 0.01$; 与 6 h相比: ^{△△} $P < 0.01$; 与 SAP组、SAP+ 丹参组相比: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

组织表现为肺泡壁增厚,间质闪有炎细胞浸润,肺泡壁毛细血管中度淤血。SAP+ HHI-I组大鼠胰腺组织大片出血性坏死,小叶结构破坏,细胞轮廓不清,但极少见炎细胞浸润。肺组织肺泡壁轻度增厚,肺泡壁毛细血管轻度瘀血,散在炎细胞浸润。

3 讨论

近年来,缺血再灌注以及白细胞内皮细胞相互作用在急性胰腺炎(AP)微循环损伤中的作用受到重视。Menger^[6]实验发生,大鼠胰腺缺血再灌后可见白细胞沿内皮细胞衬层的滚动增加,持续粘附的细胞增加 50~ 100倍。同时可见血清脂肪酶大幅度升高,胰组织检查见白细胞浸润明显增加。Wemer^[4]用锝-99m(^{99m}Tc)标记白细胞研究了大鼠不同程度的AP后的白细胞组织浸润的情况。实验结果表明,水肿性胰腺炎胰组织中标记白细胞明显增加;随AP严重性的增加还有进一步增加。作者认为,胰组织白细胞浸润与胰腺炎严重程度有关。胰蛋白酶原激活是早期现象,白细胞在组织中的募集的增加则使AP不断加重。我们的实验结果也表明,大鼠胆胰管逆行性注射 5%牛黄胆酸钠造成SAP后 3, 6, 12, 24 h白细胞在胰组织募集持续增多。

肺损害在SAP时极为常见,在发生的MOF中,肺损害发生最早,多表现为成人呼吸窘迫综合征(ARDS)。近年认为多形核白细胞(PMN)在ARDS的发生和发展中起重要作用。SAP时,有众多因素

促使PMN激活并向肺微血管内皮细胞粘附,在肺组织中募集。激活的PMN释放大量的炎性介质和细胞因子,进一步损伤微血管内皮细胞,破坏内皮细胞的完整性,同时还能增加促凝血物质活性,导致缺血和血栓形成,最终引起肺肺血管通透性增加,肺间质增宽水肿,肺出血坏死和低氧血症^[7]。Murakami等^[8]发现AP时粒细胞被激活并产生O₂⁻及H₂O₂,它们可增加白细胞内皮细胞粘附以及嗜中性白细胞向肺腔的浸润,在ARDS发生中起最重要的作用。我们的实验结果亦表明实验性SAP大鼠肺组织^{99m}Tc标记白细胞放射活性、MPO活性3 h时已明显升高,提示肺组织已开始有大量的白细胞募集,而且在24 h内持续增高,肺组织组织形态表现为大量弥漫性中性粒细胞浸润,肺泡壁明显增厚,广泛肺泡壁毛细血管瘀血。

基于现代医学对中医血瘀和血瘀证的大量研究,血瘀证的主要病理基础是微循环障碍,血瘀与现代医学的微循环障碍症,以及活血化瘀疗效与现代医学微循环障碍的改善关系密切。而白细胞内皮细胞过度粘附又可导致明显的微循环障碍,所以,我们明确提出抗白细胞内皮细胞过度粘附可能为活血化瘀中药的作用机制之一,活血化瘀中药可能对白细胞内皮细胞过度粘附有调节作用。HHI-I是我们将临床治疗SAP有效方剂中的活血化瘀药,通过正交设计,筛选出最有效药物组分,制成的静脉注射剂,

主要由桃仁、赤芍等提取物组成,本研究发现,HHI-I治疗组胰组织的白细胞聚集明显减少,但 HHI-I治疗并不能改善胰腺的坏死,这也许是胰管逆行性注射 5% 牛黄胆酸钠已造成了胰腺不可逆的出血坏死的缘故 HHI-I可明显降低肺组织放射活性,减少 MPO活性,提示 HHI-I通过抑制白细胞内皮细胞的过度粘附而减轻了中性粒细胞在肺组织的聚集,从而发挥了对 SAP相关肺损伤的保护作用。

SAP时胰腺及胰外脏器损害的共同特征是大量活化的白细胞在受损脏器聚集,白细胞在组织中的定量将有助于评估白细胞在 SAP中的作用及其评价治疗效果。关于白细胞的定量方法,主要有组织学评定和 MPO活性检测,另外,Wemer还推荐了一种新的方法— ^{99m}Tc 标记白细胞^[4]。3种方法各有优缺点,组织学评定只能半定量,但可以定性定位;MPO活性检测是人们使用率最高的一种定量方法,MPO是白细胞特有的一种酶,储存于嗜苯胺蓝颗粒中,MPO活性可以间接反映白细胞水平。但是由于一些药物可以影响此酶活性如肝素等,这就相对影响了该方法的准确性。 ^{99m}Tc 标记白细胞方法作为一种新的定量方法,已被常规用于一些疾病炎性部位的检测,也可以更好的用实验研究中白细胞在组织中聚集的定量^[4]。我们将3种方法联合应用,定量检

测了 SAP过程中白细胞在组织聚集,并观察了 HHI-I的治疗作用,结果显示3种方法的结果还是比较一致的。

参考文献:

- [1] Malfertheiner P, Enrique D M. Clinical and laboratory diagnosis of acute pancreatitis [J]. Ann Ital Chir, 1995, 66: 165-170.
- [2] Rinderknecht II. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation [J]. Inter J pancreatol, 1988, 3: 105-112.
- [3] 赵连根,张艳军,陈玉玲,等. 活血化瘀注射液对急性胰腺炎大鼠肠系膜活体微循环的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2001, 7 (1): 18-20.
- [4] Wemer J, Dragotekes S C, Castillo C F, et al. Technetium-99m-Labeled White Blood Cell. A New Method to Define the Local and Systemic Role of Leukocyte in Acute Experimental Pancreatitis [J]. Ann Surg, 1998, 227 (1): 86-94.
- [5] Magnotti L J, Upperman J S, Xu D Z, et al. Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock [J]. Ann Surg, 1998, 228 (4): 518-527.
- [6] Menger M D, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-Reperfusion-Induced Microvascular Injury [J]. Dig Dis Sci, 1996, 41 (5): 823-830.
- [7] Blease K, Burke-Gaffney A, Hellewell P G. Modulation of cell adhesion molecule expression and function on human lung microvascular endothelial cells by inhibition of phosphodiesterases 3 and 4 [J]. Br J Pharmacol, 1998, 124 (1): 229-237.
- [8] Murakami H, Nakao A, Kishimoto W, et al. Detection of O_2^- generation and neutrophil accumulation in rat lungs after necrotizing pancreatitis [J]. Surg, 1995, 118: 547-554.

大量供应蚂蚁、雄蚕蛾、兔胆

新华养殖场是一家经工商、质量技术监督局等行政职能部门注册的企业,以一流的品级、优越的价格性能比赢得国内外客户的赞誉。现供:

- 1 拟黑多刺蚂蚁干:是可入药的品种,对治疗风湿关节炎、乙型肝炎等疾病有较好的疗效,我场年供能力达 36 000 kg
- 2 雄蚕蛾:丝绸产业的特定产品,量多价廉。雄蚕蛾是制药、保健食品、抗疲劳保健品的主要原料,我场年供能力达 50 000 kg
- 3 兔胆:药用价值经国内外医学界研讨证实,兔胆的药用价值接近熊胆,我场年供兔胆能力达 65 000个。

热忱欢迎医药界同仁前往我场参观指导!

地址:浙江省海盐县通元镇东郊路 86号新华养殖场

邮编:314306

电话:0573-6611178 6613354 6611360

网址:www.xhants.com

美国 ALPHA 实验室认可

美中国际合作中国企业

葡萄籽提取物

(原花青素≥95%)

专业生产厂家

电话:0086-22-27451423, 27451796

传真:0086-22-27454676



网址: <http://www.jf-natural.com.cn>

Tianjin Jianfeng Natural Product R & D Co., Ltd

天津尖峰天然产物公司