

## 粉防己碱对脂多糖致大鼠胰腺腺泡细胞损伤的保护作用及其机制研究

张红 李永渝 吴咸中

**【摘要】** 目的 探讨粉防己碱(Tet)对脂多糖(LPS)诱发大鼠胰腺腺泡细胞损伤的保护作用及其机制。方法 胶原酶法分离雄性SD大鼠胰腺腺泡细胞,预先经 Tet(50 μmol/L、100 μmol/L)处理 15 min 后,再经 LPS(10 mg/L)或正常培养液处理,在 0、1、4 和 10 h 采集上清液,检测其中丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)活性;采用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)检测胰腺腺泡细胞存活情况;部分胰腺腺泡细胞经 Fluo-3/AM 荧光探针负载后,于相应时间点采用灌流方式给予 Tet 或 LPS,激光共聚焦显微镜观察单个胰腺腺泡细胞内钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)。结果 Tet 可减轻 LPS 所致的细胞损伤(*P*均<0.05),抑制 LPS 诱发的胰腺腺泡细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高(*P*均<0.05),降低细胞培养上清液中 MDA 含量和 PLA<sub>2</sub> 活性、增加 SOD 活性。结论 Tet 可能通过抑制钙超载、增强抗氧化能力以及减少胰酶活化,减少 LPS 所致胰腺腺泡细胞损伤,从而发挥对胰腺腺泡细胞的保护作用。

**【关键词】** 粉防己碱; 脂多糖; 胰腺; 腺泡细胞; 钙

**Study on protective effect of tetrandrine on lipopolysaccharide induced pancreatic acinar cell damage and its mechanism** ZHANG Hong\*, LI Yong-yu, WU Xian-zhong. \* Department of Pathophysiology, Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, Shanxi, China

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the protective effect of tetrandrine (Tet) on lipopolysaccharide (LPS) - induced pancreatic acinar cell damage and to explore its mechanism. **Methods** SD male rat's pancreatic acinar cells were isolated by collagenase digestion and they were pre-treated with Tet (50 μmol/L and 100 μmol/L), then exposed to LPS (10 mg/L) or conventional culture medium respectively. At 0, 1, 4, 10 hours after treatment with the agents, cell viability was determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), and the supernatant supernate of cells was collected for determination of the content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Some cells were loaded with Fluo-3/AM, and the dynamic change in intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) in single pancreatic acinar cell was determined by laser scanning confocal microscopy. **Results** Tet attenuated LPS - induced cell damage (*P*<0.05 and *P*<0.01) and inhibited the elevation of cytosolic free calcium of rat pancreatic acinar cells. In the supernatant, Tet pretreatment decreased the content of MDA and the activity of PLA<sub>2</sub> and increased the activity of SOD (all *P*<0.05). **Conclusion** Tet attenuates LPS - induced cell damage by blocking [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload, inhibiting superoxidative response, decreasing activity of pancreatic enzyme, thus it shows a protective effect on pancreatic acinar cells.

**【Key words】** tetrandrine; lipopolysaccharide; pancreas; acinar cells; Ca<sup>2+</sup>

粉防己碱(tetrandrine, Tet)是中药防己的主要成分,是天然的非特异性钙通道拮抗剂(calcium channel blocker, CCB)。在体实验中发现, Tet 可以通过抑制胰酶活化减轻组织过氧化损伤和炎症反应,改善去氧胆酸钠诱发胆源性急性胰腺炎(AP)动物胰腺和肺的病理损伤,降低动物死亡率<sup>[1]</sup>。但 Tet 是否对胰腺腺泡细胞有直接保护作用及其具体机制尚有待阐明。本实验中采用离体大鼠胰腺腺泡细胞,

观察 Tet 对 LPS 诱发胰腺腺泡细胞损伤是否具有拮抗作用,并通过生化和激光共聚焦显微镜技术,检测相关指标变化,揭示 Tet 对 LPS 诱发胰腺腺泡细胞损伤发挥保护作用的机制。

### 1 材料与方 法

**1.1 胰腺腺泡细胞分离:** 雄性 SD 大鼠,由中科院上海实验动物中心提供(SPF 级,合格证号 SYXX 2002-0023),体重 200~250 g,实验前禁食 12 h。采用胶原酶法分离大鼠胰腺腺泡细胞<sup>[2]</sup>。将细胞接种于含体积分数为 10% 牛血清的羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液中孵育,细胞密度为 1×10<sup>8</sup>/L,胰腺腺泡细胞纯度>80%,存活率>90%。

**1.2 细胞培养和处理:** 将胰腺腺泡细胞分别接种于

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370643)

作者单位:712046 咸阳,陕西中医学院(张红);200092 上海,同济大学医学院(李永渝);300070 天津医科大学(吴咸中)

作者简介:张红(1972-),女(汉族),陕西铜川人,医学博士,副教授,主要研究方向为急性胰腺炎发病机制(Email:zhangh1227@sohu.com)。

24 孔、96 孔和 3.5 cm 培养板中,CO<sub>2</sub> 孵箱中 37 ℃ 孵育 4 h 后,随机分为对照组(正常培养液)、LPS (10 mg/L)组、LPS + 50 μmol/L Tet 组和 LPS + 100 μmol/L Tet 组(Tet 组先用不同浓度的 Tet 处理 15 min,再给予 10 mg/L LPS)。各组胰腺腺泡细胞分别孵育 0、1、4 和 10 h 后进行指标检测。

**1.3 细胞存活率测定:**采用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)定量检测细胞存活情况。细胞活性与吸光度(A)值成正比。细胞存活率采用 490 nm 处 LPS 组与对照组(新鲜分离)的 A 值比值表示,即细胞存活率(%) =  $A_{LPS组} / A_{对照组} \times 100\%$ 。

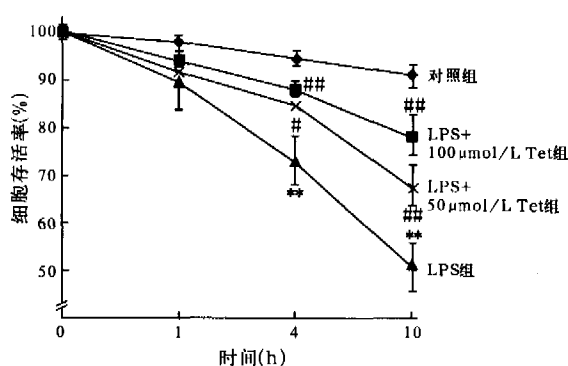
**1.4 单个胰腺腺泡细胞内钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)测定:**将胰腺腺泡细胞接种于 3.5 cm 培养皿中的载玻片上,加入 10 μmol/L Fluo-3/AM 荧光探针负载,将有细胞贴壁的载玻片安装固定于灌流装置上,于灌流管中准备好待测的刺激剂,以 1 ml/min 的速度灌流,488 nm 波长激光激发样品,530 nm 检测发射的荧光,用 Lasersharp 软件收集荧光图像,首先观测 100 s 静息状态下[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>水平,然后于相应时间点采用灌流方式给予不同浓度 Tet (50 μmol/L 和 100 μmol/L)、LPS (10 mg/L)或正常培养液,动态观测细胞内荧光图像变化 5 min 以上。荧光变化的相对值采用 Microsoft Excel 2000 进行处理分析。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>变化以荧光强度的相对变化值表示<sup>[3]</sup>,即荧光强度变化相对值(%) =  $\frac{\text{刺激后胞浆荧光强度变化值}(\Delta F)}{\text{静息状态荧光强度值}(F_0)} \times 100\%$ 。

**1.5 细胞培养上清液中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和磷脂酶 A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)活性检测:**各组胰腺腺泡细胞经刺激剂作用至相应时间后,采集培养上清液,用硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量;邻苯三酚法检测 SOD 活性;参照文献[4]方法测定 PLA<sub>2</sub>活性。

**1.6 数据收集及统计学处理:**实验数据按完全随机对照的要求收集、整理、建立数据库,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 Microsoft Excel 2000 软件包,单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Tet 对 LPS 致胰腺腺泡细胞损伤的保护作用(图 1):**随着 LPS 作用时间的延长,细胞存活率逐渐下降,与对照组同时间点比较差异均有显著性( $P$ 均 $< 0.01$ )。LPS + 50 μmol/L Tet 组细胞存活率明显增加,LPS + 100 μmol/L Tet 组细胞存活率增加更明显,与 LPS 组同时间点比较差异均有显著性( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。



注:与对照组同时间点比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 LPS 组同时间点比较:## $P < 0.05$ ,### $P < 0.01$

图 1 Tet 对 LPS 致胰腺腺泡细胞损伤的保护作用  
Figure 1 Protective effect of Tet on LPS-induced damage in pancreatic acinar cells

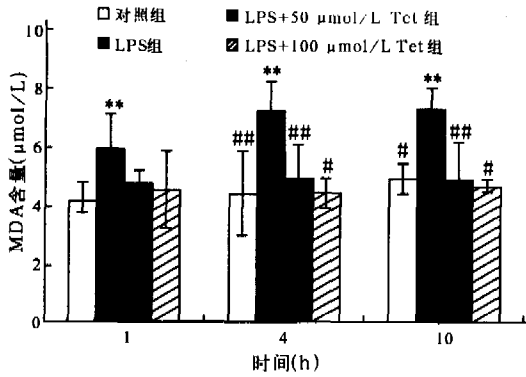
**2.2 Tet 对胰腺腺泡细胞钙稳态的影响:**基础状态下胰腺腺泡[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>呈现很小的波动。LPS 可引起胞浆[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>显著增加,[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>峰值出现在 LPS 10 mg/L 刺激后 150 s 内,此时胞浆荧光强度变化相对值可达(173.64 ± 20.85)%,与对照组(69.89 ± 21.51)%比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。在正常培养液中加入 50 μmol/L 和 100 μmol/L Tet,对胰腺腺泡细胞胞浆荧光强度无明显影响,但与 LPS 共孵育的体系中,50 μmol/L 和 100 μmol/L Tet 均可降低胰腺腺泡细胞胞浆荧光强度,荧光强度变化相对值分别为(139.43 ± 4.95)%和(127.43 ± 7.66)%,与 LPS 组比较,差异均有显著性( $P$ 均 $< 0.05$ )。

**2.3 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 MDA 含量的影响(图 2):**10 mg/L LPS 作用 1 h 可致胰腺腺泡细胞培养上清液中 MDA 含量明显增加,且随作用时间延长而进一步增加,与对照组同时间点比较差异均有显著性( $P$ 均 $< 0.01$ )。而 LPS + 50 μmol/L 或 100 μmol/L Tet 组上清液中 MDA 含量明显低于 LPS 组,于 4 h 和 10 h 与 LPS 组同时间点比较差异均有显著性( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

**2.4 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 SOD 活性的影响(图 3):**10 mg/L LPS 作用后可致胰腺腺泡细胞培养上清液中 SOD 活性明显下降,与对照组同时间点比较差异均有显著性( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。而 LPS + 50 μmol/L 或 100 μmol/L Tet 组上清液中 SOD 活性高于 LPS 组同时间点,差异均有显著性( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

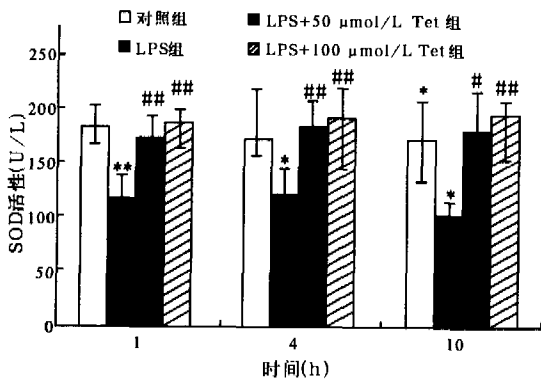
**2.5 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub>活性的影响(图 4):**10 mg/L 的 LPS 作用后可导致胰腺腺泡细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub>活性明显增加,与对照组同时间点比较差异均有显著性

( $P$ 均 $<0.01$ )。而 LPS+50  $\mu\text{mol/L}$  或 100  $\mu\text{mol/L}$  Tet 组细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub> 活性明显下降,与 LPS 组同时时间点比较差异均有显著性( $P$ 均 $<0.01$ )。



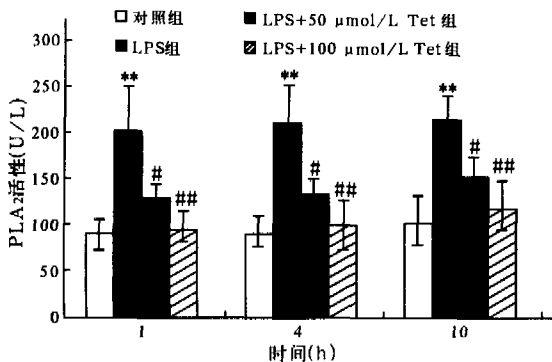
注:与对照组同时时间点比较: \*\* $P<0.01$ ;与 LPS 组同时时间点比较: # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图 2 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 MDA 含量的影响  
Figure 2 Effect of Tet on content of MDA in the supernatant of LPS-stimulated pancreatic acinar cells



注:与对照组同时时间点比较: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ;与 LPS 组同时时间点比较: # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图 3 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 SOD 活性的影响  
Figure 3 Effect of Tet on activity of SOD in the supernatant of LPS-stimulated pancreatic acinar cells



注:与对照组同时时间点比较: \*\* $P<0.01$ ;与 LPS 组同时时间点比较: # $P<0.05$ , ## $P<0.01$

图 4 Tet 对 LPS 刺激胰腺腺泡细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub> 活性的影响  
Figure 4 Effect of Tet on activity of PLA<sub>2</sub> in the supernatant of LPS-stimulated pancreatic acinar cells

### 3 讨论

AP 的发病机制错综复杂,有多个病理环节参与。胰腺腺泡细胞钙超载在 AP 发病机制中的作用日益受到人们的重视<sup>[5,6]</sup>。钙超载不仅是 AP 的多个发病环节之一,而且作为 AP 发病机制中的枢纽,通过作用于其他诸个发病环节而促进 AP 的进程。钙超载与氧自由基、炎症介质、细胞因子的过度生成等也有着密切关系<sup>[7,8]</sup>。我们在本实验中发现,将胰腺腺泡细胞暴露于 LPS 刺激体系中,最先观察到的变化是刺激后几百秒内即出现的细胞胞浆  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  增加,这一变化早于它们所引发细胞损伤中的其他病理变化。

本次实验中采用离体大鼠胰腺腺泡细胞,发现 Tet 可减轻 LPS 所致的细胞损伤,对 LPS 作用下的离体胰腺腺泡细胞有直接保护作用,其机制主要为:①Tet 可以抑制 LPS 诱发的胰腺腺泡  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高,防止细胞内钙超载发生。LPS 既可以引起细胞内贮钙的释放,又可以引起胞外钙内流,导致胰腺腺泡胞浆内钙超载<sup>[9]</sup>。Tet 作为一种天然的非特异性 CCB,能阻滞质膜电压或受体依赖性钙通道,抑制细胞外钙内流和细胞内钙动员<sup>[10]</sup>,所以抑制 LPS 诱发胰腺腺泡  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高,从而防止钙超载发生,维持胰腺腺泡细胞内的钙稳态,有效阻止了由细胞钙稳态失衡引起细胞不可逆性损伤的发生。②Tet 可以增加胰腺腺泡细胞培养上清液中 SOD 活性,降低 MDA 含量。在 LPS 作用下,胰腺腺泡细胞培养上清液中 SOD 活性降低,MDA 含量增加。提示此时胰腺腺泡细胞的氧自由基清除系统受损,清除氧自由基能力下降,造成脂质过氧化反应增强。Tet 可降低细胞内钙超载,使钙依赖性蛋白水解酶活性降低,黄嘌呤氧化酶生成减少,次黄嘌呤产物氧自由基产生亦降低。另外,减少线粒体内钙超载可以防止刺激剂所引发的 SOD 生成减少,保持细胞清除自由基的能力<sup>[10]</sup>,减弱细胞脂质过氧化反应,减轻细胞的损伤。③Tet 可以降低胰腺腺泡细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub> 活性。AP 时钙依赖性 PLA<sub>2</sub> 活性升高,可能会通过分解细胞膜磷脂,导致胰腺腺泡细胞膜的溶解和破坏,引起细胞损伤,甚至导致肺损伤<sup>[11]</sup>。LPS 可增强胰腺腺泡细胞培养上清液中 PLA<sub>2</sub> 活性。Tet 可能通过阻止胰腺腺泡细胞钙超载而抑制钙依赖性 PLA<sub>2</sub> 的活化,减轻其对细胞膜磷脂的水解作用,减少细胞损伤,同时可减少膜磷脂降解产物生成,阻断其所引发胰腺组织的进一步损伤,有效遏制 AP 的进展<sup>[12,13]</sup>。

## 参考文献:

- 1 张红,李永渝,白君丽,等. 汉防己甲素对大鼠急性胰腺炎治疗作用及机制的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22: 125-127.
- 2 Kitagawa M, Williams J A, Lisle R C. Amylase release from streptolysin O - permeabilized pancreatic acini[J]. Am J Physiol, 1990, 259: G157-164.
- 3 Wang L Z, Zhang Q Z, Hu X Z. Verapamil, cyproheptadine, and anisodamine antagonized  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by TNF- $\alpha$  in a single endothelial cell[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22: 918-922.
- 4 陈思锋, 吴中立. 体液和组织匀浆磷脂酶 A<sub>2</sub> 的简便快速测定法[J]. 第二军医大学学报, 1989, 10: 254-256.
- 5 张红, 李永渝, 吴威中. 核因子- $\kappa$ B 及钙超载与急性胰腺炎[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 764-767.
- 6 张红, 李永渝. 急性胰腺炎的发病机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 121-125.
- 7 Hughes C B, El din A B, Kotb M. Calcium channel blockade inhibits release of TNF alpha and improves survival in rat model of pancreatitis[J]. Pancreas, 1996, 13: 22-29.
- 8 Weber H, Roesner J P, Nebe B, et al. Increased cytosolic  $Ca^{2+}$  amplifies oxygen radical induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatitis [J]. Digestion, 1998, 59: 175-185.
- 9 ZHANG Hong, LI Yongyu, WANG Shengnian, et al. Effects of Lipopolysaccharide on calcium homeostasis in isolated rat pancreatic acinar cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 790-795.
- 10 王志荣, 李定国, 陆汉明. 粉防己碱药理作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2000, 16: 488-492.
- 11 张红, 李永渝. 磷脂酶 A<sub>2</sub> 在大鼠急性胰腺炎并发肺损伤中的作用及维拉帕米的治疗效应[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 418-421.
- 12 Pu Q F, Yan L N, Liu X B, et al. Disturbance of calcium homeostasis and PG during the development of acute pancreatitis from edema to necrosis[J]. Chin J Exp Surg, 1998, 15: 391-392.
- 13 Laine V J O, Nyman K M, Peuravuori H J, et al. Lipopolysaccharide induced apoptosis of rat pancreatic acinar cells[J]. Gut, 1996, 38: 747-759.

(收稿日期: 2005-12-01 修回日期: 2006-02-24)

(本文编辑: 郭方)

## • 科研新闻速递 •

## 急诊手术后危重老年患者不复苏指令确立的性别差异

急诊手术后部分老年患者病情危重至心肺复苏术无效而被给予“不复苏(DNR)”指令。最近美国科研人员研究了 DNR 指令及发病率和病死率的影响因素。他们对 2000 年 1 月 1 日后收住重症监护室(ICU)前接受了急诊手术的患者进行了前瞻性研究。研究指标包括年龄、性别、入院诊断、原始急性生理学与慢性健康状况评分Ⅲ(APACHEⅢ)和年龄修正的 APACHEⅢ评分(aAⅢ)、DNR 指令的发布、发病率及病死率。主要结果为 DNR 状态、发病率及病死率。研究按年龄(>75 岁和≤75 岁)和性别进行分组,总计纳入了 723 例达到研究标准的急诊手术患者(消化道 35.0%, 创伤 20.0%, 神经系统 17.0%)。92 例患者(12.7%)被下达了 DNR 指令,病死率为 82.6%。女性患者发生 DNR 状态较多(16.4%比 9.5%,  $P<0.01$ ),但病死率女性与男性患者差异无显著性(18.2%比 17.5%,  $P=0.850$ )。Logistic 分析显示,与多器官功能障碍评分〔优势比(OR)为 1.410,  $P<0.0001$ 〕、年龄(OR 为 1.054,  $P<0.0001$ )和 aAⅢ(OR 为 0.995,  $P=0.355$ )相比,性别(OR 为 2.512,  $P=0.005$ )对 DNR 状态的发生最有预测价值。因此研究者认为:急诊术后患者发生 DNR 状态的预测指标首先为女性性别,其次为年龄。DNR 状态与女性性别的相关性是一个出乎意外的结果,值得进一步分析。

牛梅梅, 周国勇, 编译自《J Trauma》, 2006, 60: 193-198; 胡森, 审校

## 粒细胞集落刺激因子改善失血复合脓毒症双相打击动物模型的存活率

最近德国科研人员研究了粒细胞集落刺激因子(G-CSF)在两个临床相关模型中的防治作用,即出血同时感染模型(如创伤)和急性出血继发感染模型(如手术并发症)。实验中采取出血复合多种细菌腹膜污染和感染(PCI)动物模型,研究了 G-CSF 对细菌清除率、细胞因子类型以及动物预后的影响。实验一将 132 只雄性大鼠随机分为术前 PCI 处理(a)组;术前出血+PCI 处理(b)组和术前出血+PCI+G-CSF 预防(c)组 3 组( $n=18$ )。实验二用同样设计评估术中出血。研究指标主要为 120 h 存活率以及中性粒细胞计数、细菌清除率和局部细胞因子水平。结果显示:实验一 a 组存活率为 56%, b 组为 17%, c 组为 61% ( $P<0.01$ )。实验二 a 组存活率为 33%, b 组为 17%, c 组为 50% ( $P<0.05$ )。实验二中,出血后 1 h 中性粒细胞计数升高至 66% ( $P<0.05$ ),肺和肝脏细菌菌落形成单位降低至( $166\pm 56$ )CFU 和( $134\pm 28$ )CFU(与出血前比,肝脏  $P<0.05$ );c 组和 b 组相比,巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)反转录 DNA 在肺的表达减少至( $0.88\pm 0.06$ )pg ( $P<0.05$ )。因此研究者得出结论:出血(一次打击)使宿主对腹膜多细菌污染和感染(二次打击)更为敏感,其致敏性不依赖于时间。预防性使用 G-CSF 能提高此模型动物的存活率和细菌清除率,降低肺 MIP-2 水平。

牛梅梅, 周国勇, 编译自《Crit Care Med》, 2006-01-25(电子版); 胡森, 审校