

## 攻下清热活血中药对重症胰腺炎大鼠胰腺肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白细胞介素- $1\beta$ 基因表达的影响

叶蔚, 李钢, 王小奇, 刘庆生

(浙江省杭州市中医院, 浙江 杭州 310007)

**【摘要】** 目的: 观察攻下清热活血中药影响重症胰腺炎大鼠胰腺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )的 mRNA 表达。方法: 采用牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射制备大鼠重症胰腺炎模型。将 110 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、中药大、小剂量组、奥曲肽组。制模后, 分别以 16.66 g/kg 和 8.33 g/kg 剂量的攻下清热活血中药灌胃, 以奥曲肽 16  $\mu$ g/kg 皮下注射, 正常对照组和模型组予等量生理盐水灌胃, 均每 8 h 1 次, 共 3 次。随后处死动物取血测淀粉酶含量; 取胰腺组织观察病理学改变并进行病理评分; 用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测胰腺组织中 TNF- $\alpha$  和 IL- $1\beta$  的 mRNA 表达。结果: 模型组大鼠胰腺组织病理评分和血清淀粉酶含量明显增高( $P$  均 $<0.01$ ); 各治疗组治疗后大鼠胰腺组织病理评分和血清淀粉酶均较模型组明显下降( $P$  $<0.05$  或  $P$  $<0.01$ )。而 3 个治疗组间胰腺组织病理评分差异无显著性; 中药大剂量组与奥曲肽组血清淀粉酶含量均较中药小剂量组显著降低( $P$  均 $<0.05$ )。模型组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的 mRNA 表达明显高于正常对照组( $P$  均 $<0.01$ ); 3 个治疗组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的 mRNA 表达均较模型组明显下降( $P$  均 $<0.01$ ), 且 3 组间差异无显著性。结论: 攻下清热活血中药能明显改善重症胰腺炎大鼠胰腺组织病理改变, 抑制胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的 mRNA 表达可能是防治重症胰腺炎的作用机制之一。

**【关键词】** 胰腺炎, 重症; 中药; 细胞因子; 基因表达

中图分类号: R285.5; R259 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)01-0043-04

**Effect of Chinese herb of purgation, heat-clearance and blood-promotion (攻下清热活血中药) on expression of tumor necrosis factor -  $\alpha$  mRNA and interleukin -  $1\beta$  mRNA in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis** YE Wei, LI Gang, WANG Xiao-qi, LIU Qing-sheng. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, Zhejiang, China

**【Abstract】** **Objective:** To observe the effect of Chinese herb of purgation, heat-clearance and blood-promotion (攻下清热活血中药) on the expressions of tumor necrosis factor -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) mRNA and interleukin -  $1\beta$  (IL -  $1\beta$ ) mRNA in pancreatic tissues of rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** SAP model of rat was established by retrograde injection of sodium taurocholate into the pancreatic duct. One hundred and ten rats were randomly divided into normal control group, model group, large and small dosage of Chinese herb groups and octreotide group. After the model being built, the model rats were perfused with different dosages of Chinese herb (16.66 g/kg and 8.33 g/kg respectively) into the stomach in the two Chinese herb treatment groups, the same volume of normal saline was perfused by the same way in the control group and model group, and octreotide (16  $\mu$ g/kg) was subcutaneously injected in the octreotide group. The drug was given once every 8 hours, altogether three times. The pancreatic tissues were taken to observe the pathological changes and to be evaluated by histopathological scores, the expressions of TNF -  $\alpha$  mRNA and IL -  $1\beta$  mRNA were assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT - PCR) method, and serum amylase was detected. **Results:** Compared with the normal control group and three treatment groups, the histopathological scores of pancreatic tissues and serum content of amylase in the model group were obviously higher ( $P$  $<0.05$  or  $P$  $<0.01$ ). There were no differences of histopathological scores of pancreatic tissues in three treatment groups. The large dosage of Chinese herb and octreotide groups got significant decreases of the serum amylase than the small dosage of Chinese herb group (both  $P$  $<0.05$ ). The expressions of TNF -  $\alpha$  mRNA and IL -  $1\beta$  mRNA of the model group were higher than those in the normal control group, and those of Chinese herb groups were lower than those in the model group (all  $P$  $<0.01$ ), no differences being significant in three treatment groups. **Conclusion:** The Chinese herb of purgation, heat-clearance and blood-promotion can ameliorate the histopathologic changes of pancreatic tissues and inhibit the expressions of TNF -  $\alpha$  mRNA and IL -  $1\beta$  mRNA in the pancreatic tissues of the SAP rats.

**【Key words】** severe acute pancreatitis; Chinese herb; cytokine; gene expression

近年来,重症胰腺炎的发病率有上升的趋势,其病死率极高。中医药治疗重症胰腺炎具有较好的疗效,但其作用机制及关键环节尚未完全阐明。本研究中采用质量分数为 3.5% 的牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射制备大鼠重症胰腺炎模型,观察胰腺组织肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素- $1\beta$ (IL- $1\beta$ )的 mRNA 表达,并探讨攻下清热活血中药治疗重症胰腺炎的作用机制。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物:清洁级 SD 大鼠 110 只,雌雄各半,体重(250 $\pm$ 20)g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药品及主要试剂:①中药复方流浸膏:由生大黄、茵陈、柴胡、郁金、红藤等组成(杭州市中医院制剂室合成)。②奥曲肽(善宁,诺华公司)。③牛磺胆酸钠(Sigma 公司)。④TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  及  $\beta$ -actin 引物由上海生工生物工程公司合成。引物序列如下:TNF- $\alpha$ (目的片段长度为 437 bp):上游:5'-AGC-ACGGAAAGCATGATCC-3',下游:5'-CCTTG-TCCCTTGAAGAGAACC-3';IL- $1\beta$ (目的片段长度为 207 bp):上游:5'-CCCAAAGATTAA-GGATTGC-3',下游:5'-AGATGAAGGAAAA-GAAGGTGC-3'; $\beta$ -actin(长度为 276 bp):上游:5'-GTCGGT GTGAACGGATTT-3',下游:5'-ACTCCACGACGTACTCAGC-3'。

1.3 动物模型制备:110 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组(10 只)和制模组(100 只),雌雄均各半。正常对照组大鼠自由饮水,标准饲料饲养。制模组大鼠制模前 12 h 禁食,自由饮水。用戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,正中切口切开腹腔,行胰胆管穿刺后,以 3.5% 牛磺胆酸钠 1 ml/kg 在微泵恒压下胰胆管逆行注射<sup>[1]</sup>,然后缝合关腹。

1.4 动物分组与给药:根据预实验的情况,模型组大鼠的死亡率明显高于各治疗组,所以在动物分组时,模型组动物数量是各治疗组的 2 倍。故制模结束后,随机将制模组动物再分成 4 组:模型组(40 只)、中药大剂量组(20 只)、中药小剂量组(20 只)、奥曲肽组(20 只)。制模结束后立即给药,两个中药治疗组予以中药治疗,大剂量组按 16.66 g/kg、小剂量组按 8.33 g/kg 灌胃;奥曲肽组予奥曲肽 16  $\mu$ g/kg 皮下注射;模型组、正常对照组用等量的生理盐水灌

胃,以上均每 8 h 1 次,共 3 次。

## 1.5 标本采集与检测

1.5.1 标本采集:制模结束后 24 h 处死大鼠,取大鼠血清备用;取胰腺组织,一部分以体积分数为 4% 的多聚甲醛固定,逐级乙醇脱水,石蜡包埋、切片;其余胰腺组织立即置于-80  $^{\circ}$ C 低温冰箱保存备用。

1.5.2 组织病理学观察:苏木素-伊红(HE)染色,于光镜下观察各组大鼠胰腺组织病理学改变。根据 Spormann 等<sup>[2]</sup>制定的评定标准评分。

1.5.3 血清淀粉酶:采用酶法测定。

1.5.4 TNF- $\alpha$  和 IL- $1\beta$  的 mRNA 表达:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测大鼠胰腺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的 mRNA 表达,计算目的基因/ $\beta$ -actin 的光密度比值,作为胰腺组织目的基因的表达量。

1.6 统计学方法:使用 SPSS11.5 统计学软件包;计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,分别采用方差分析及  $q$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 攻下清热活血中药对重症胰腺炎大鼠胰腺组织学的影响:光镜下显示,模型组胰腺腺泡极度肿胀,胰腺实质内小血管扩张、充血明显,出现凝固性坏死、出血明显,范围大,可累及胰岛,见大量炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主,少量嗜酸性细胞、淋巴细胞,部分见脂肪坏死;各治疗组见胰腺腺泡肿胀,胰腺实质内见小血管扩张、充血,坏死、出血区域较少,面积较小,可见炎性细胞渗出,但程度较轻,脂肪坏死少见,部分见纤维母细胞增生。

2.2 各组大鼠胰腺组织病理评分(表 1):与正常对照组比较,模型组、中药大、小剂量组和奥曲肽组的大鼠胰腺组织病理评分均明显升高,差异有显著性( $P$  均 $<0.01$ )。与模型组比较,中药大、小剂量组和奥曲肽组大鼠胰腺组织病理评分均显著下降,差异有显著性( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );而中药大、小剂量组和奥曲肽组 3 组的大鼠胰腺组织病理评分比较差异无显著性( $P>0.05$ )。

2.3 攻下清热活血中药对重症胰腺炎大鼠血清淀粉酶的影响(表 2):与正常对照组比较,模型组、中药大、小剂量组和奥曲肽组血清淀粉酶明显升高,差异均有显著性( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。与模型组比较,中药大、小剂量组和奥曲肽组血清淀粉酶显著下降,差异均有显著性( $P$  均 $<0.01$ );其中与中药小剂量组比较,中药大剂量组和奥曲肽组血清淀粉酶下降更为明显,差异均有显著性( $P$  均 $<0.05$ );而中药

基金项目:浙江省中医药管理局项目(2004Y023)

作者简介:叶蔚(1974-),男(汉族),浙江省人,博士,主治医师,从事中西医结合消化系统疾病研究。

大剂量组与奥曲肽组血清淀粉酶比较, 差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠胰腺组织病理评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of histopathological scores in pancreatic tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	剂量	组织病理评分(分)
正常对照组	9	等量生理盐水	0
模型组	9	等量生理盐水	6.11 ± 1.05**
中药大剂量组	8	16.66 g/kg	4.25 ± 1.04**△△
中药小剂量组	9	8.33 g/kg	4.33 ± 1.41**△△
奥曲肽组	7	16 μg/kg	4.42 ± 1.51**△△

注: 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: △  $P < 0.05$ , △△  $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清淀粉酶比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of serum amylase of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	剂量	血清淀粉酶(kU/L)
正常对照组	9	等量生理盐水	701.17 ± 123.08
模型组	9	等量生理盐水	3 352.09 ± 1 241.92**
中药大剂量组	8	16.66 g/kg	1 159.81 ± 270.70**△△#
中药小剂量组	9	8.33 g/kg	1 580.08 ± 477.69**△△
奥曲肽组	7	16 μg/kg	1 334.57 ± 743.24**△△#

注: 与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: △△  $P < 0.01$ ; 与中药小剂量组比较: #  $P < 0.05$

2.4 攻下清热活血中药对重症胰腺炎大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达影响(图 1, 图 2, 表 3): 与正常对照组比较, 模型组、中药大、小剂量组、奥曲肽组胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达均明显升高, 差异有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ )。与模

型组比较, 中药大、小剂量组和奥曲肽组胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达均显著下降, 差异有显著性 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 中药大、小剂量组和奥曲肽组 3 组间胰腺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Expression of TNF- $\alpha$  mRNA and IL-1 $\beta$  mRNA in pancreatic tissues of rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

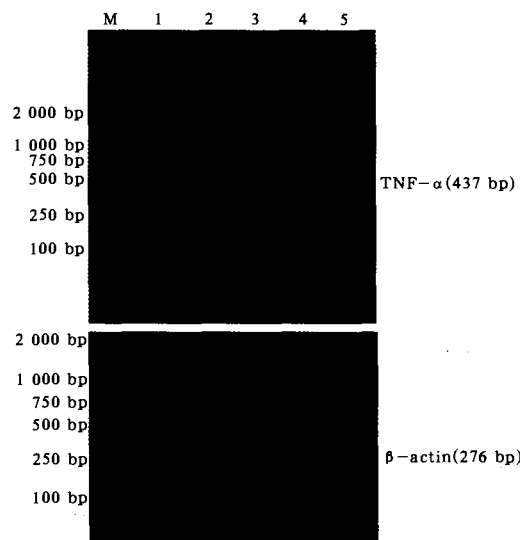
组别	动物数(只)	剂量	TNF- $\alpha$ mRNA	IL-1 $\beta$ mRNA
正常对照组	9	等量生理盐水	0.39 ± 0.02	0.44 ± 0.04
模型组	9	等量生理盐水	0.98 ± 0.10**	0.87 ± 0.06**
中药大剂量组	8	16.66 g/kg	0.76 ± 0.07**△△	0.69 ± 0.06**△△
中药小剂量组	9	8.33 g/kg	0.75 ± 0.07**△△	0.62 ± 0.03**△△
奥曲肽组	7	16 μg/kg	0.75 ± 0.06**△△	0.63 ± 0.05**△△

注: 与正常对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: △△  $P < 0.01$

### 3 讨论

重症胰腺炎属中医“腹痛”、“结胸”、“阳明腑实证”范畴。认为其发病特点是饮食不节、暴饮暴食、酗酒或七情内伤等多种病因导致邪热蕴积, 伤及脏腑、气血, 致使腑气不通、气滞血瘀。根据其发病原因和临床特点, 我们认为邪热、腑实、血瘀为本病的枢机所在, 所以我们运用攻下清热活血法制定复方中药来进行治疗。本结果表明, 攻下清热活血中药能有效改善胰腺组织病理, 降低血清淀粉酶含量, 对重症胰腺炎大鼠有较好的治疗作用, 与西药奥曲肽相当。

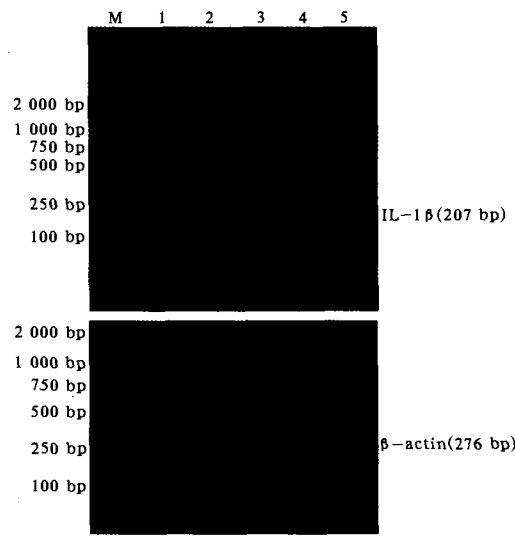
重症胰腺炎并发全身炎症反应综合征(SIRS)、



M 为 Marker; 1 为模型组; 2 为中药大剂量组; 3 为中药小剂量组; 4 为奥曲肽组; 5 为正常对照组

图 1 各组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达

Figure 1 Expression of TNF- $\alpha$  mRNA in pancreatic tissues of rats in each group



M 为 Marker; 1 为模型组; 2 为中药大剂量组; 3 为中药小剂量组; 4 为奥曲肽组; 5 为正常对照组

图 2 各组大鼠胰腺组织 IL-1 $\beta$  mRNA 表达

Figure 2 Expression of IL-1 $\beta$  mRNA in pancreatic tissues of rats in each group

多器官功能障碍综合征(MODS)或多器官功能衰竭(MOF),是其死亡率居高不下的主要原因。所以有人将重症胰腺炎的发病全过程归纳为:急性疾病—过度持久的应激反应—SIRS—MODS—MOF。而重症胰腺炎及其引发的 SIRS、MODS、MOF 与多种细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等有关。研究表明,在胰腺炎发生后,血中炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 迅速升高,6 h 后抗炎症细胞因子转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 和 IL-10 也随之升高,证明在急性胰腺炎病程中存在一个免疫过激和免疫抑制先后并存的双向免疫异常状态<sup>[3]</sup>。陈晓理等<sup>[4]</sup> 研究结果显示,急性胰腺炎发病后 24 h 内,免疫抑制性细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  明显增高,提示急性胰腺炎病程中亦存在一个代偿性抗炎症反应综合征的病理过程。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的主要来源是内毒素刺激单核/巨噬细胞,它们是炎症急性反应早期的重要细胞因子,被称为促炎症细胞因子。两者能促进内皮细胞黏附白细胞,刺激内皮细胞分泌炎症介质,激活凝血系统,抑制纤溶,增加炎性渗出和中性粒细胞溶酶体酶释放及氧自由基产生,促进单核/巨噬细胞释放 IL-1、IL-6、IL-8、TNF 和前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 等功能<sup>[5]</sup>。目前研究认为,TNF- $\alpha$  是炎症反应的启动介质,介导胰腺局部和全身炎症反应<sup>[6]</sup>;而 IL-1 $\beta$  虽不是急性胰腺炎启动的必须因子,但可能是炎症开始后加剧及播散炎症的主要角色。在重症胰腺炎早期,胰腺内的炎性细胞及胰腺腺泡细胞就开始产生并释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等细胞因子,使 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达明显增加<sup>[7]</sup>。王健等<sup>[8]</sup> 报道,IL-10 可减轻或抑制由一些免疫细胞分泌产生 TNF- $\alpha$  等炎症细胞因子引起的全身炎症反应,从而延缓或阻遏疾病的迅速发展。路小光等<sup>[9]</sup> 研究发

现,中药大黄附子汤能下调血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 的水平,故而起到防治急性胰腺炎的作用。本实验中发现,正常对照组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 有少量表达,模型组大鼠胰腺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达较正常对照组明显增强;而应用大、小剂量攻下清热活血中药和西药奥曲肽治疗后,均能显著降低胰腺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达。可见,攻下清热活血中药的治疗作用可能是通过抑制胰腺组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的 mRNA 表达来实现的。

#### 参考文献:

- [1] 许永春,李兆申,屠振兴,等.改良逆行胰胆管注射法制备轻重不同两种大鼠急性胰腺炎模型[J].第二军医大学学报,2004,25(11):1251-1252.
- [2] Spormann H, Sokolowski A, Letko G. Effect of temporary ischemia upon development and histological patterns of acute pancreatitis in the rat[J]. Pathol Res Pract, 1989, 184(5): 507-513.
- [3] 吴浩,陈晓理,黄兴兰,等.氨甲喋呤治疗急性胰腺炎的实验研究[J].中国危重病急救医学,2002,14(6):332-335.
- [4] 陈晓理,黄兴兰,吴浩,等.急性胰腺炎血中抗炎性细胞因子的变化和生长抑制的调节作用[J].中国危重病急救医学,2001,13(4):223-225.
- [5] Sheare G M. Molecular medicine: cytokines in health and diseases [J]. J Inflammation, 1996, 46: 61-63.
- [6] Norman J G, Franz M, Fink G S, et al. Decreased mortality of severe acute pancreatitis after proximal cytokine blockade [J]. Ann Surg, 1995, 221(6): 625-631.
- [7] Makhija R, Kingsnorth A N. Cytokine storm in acute pancreatitis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2002, 9(4): 401-410.
- [8] 王健,易继林,白介素-10 治疗急性胰腺炎的实验研究[J].中国危重病急救医学,2002,14(6):371-374.
- [9] 路小光,战丽彬,曲明阳,等.大黄附子汤对重症急性胰腺炎大鼠细胞因子的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(6): 352-354.

(收稿日期:2006-08-26 修回日期:2006-10-08)

(本文编辑:李银平)

#### · 读者 · 作者 · 编者 ·

### 《中国危重病急救医学》杂志投稿须知

为缩短稿件修改时间,提高效率,加快文稿刊发速度,请作者在投稿时注意以下问题:①来稿须实事求是、数据可靠,具有科学性、逻辑性和时效性,文字精练,引用资料应给出文献依据。②论著类文章在正文前应有内容、格式完全相同的中英文摘要(按目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)、结论(Conclusions)4个部分分别说明)以及关键词(3~8个),全部作者的中、英文姓名及单位,中、英文摘要均一式2份。③文稿作者顺序排名(不排并列作者),作者单位及邮政编码在作者姓名后注明。英文的作者顺序及单位写法与中文完全相同。④在文稿首页下脚注明第一作者姓名(出生年),性别(民族),籍贯,硕士以上学位,职称,主要研究方向、研究成果及业绩,发表论文数,国外进修情况及学术地位等。⑤如文稿属科研基金资助项目或重点攻关、研究课题,请在文稿首页的脚注中一并注明,出示课题号,并务必同时寄上述证明复印件(A4复印纸)。⑥投稿须提供软盘(WPS、WORD打字,如用方正、华光系统打字,请另存为“纯文本”文件,文件名控制在8个字符以内),并交文字稿2份。

(期刊编辑部)