

• 论著 •

雷公藤内酯醇对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的影响

李兴旺¹, 尚游², 张冰¹, 李军¹, 胡明品¹, 连庆泉¹

(1. 温州医学院附属第二医院麻醉科, 浙江温州 325027; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉科, 湖北武汉 430022)

【摘要】目的 探讨雷公藤内酯醇对重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤大鼠的保护作用及其可能机制。方法将 36 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组(sham 组)、模型组和雷公藤内酯醇处理组(Tri 组)3 组, 每组 6 只。sham 组仅行剖腹术; Tri 组和模型组采用牛磺胆酸钠胆管逆行注射法复制 SAP 肺损伤模型, 然后分别腹腔注射雷公藤内酯醇 0.2 mg/kg 或等量生理盐水。制模后 6 h 处死动物, 取肺组织测定肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)的 mRNA 表达、蛋白含量及核转录因子- κ B(NF- κ B)活性。结果与 sham 组比较, 模型组肺组织 TNF- α mRNA 与 IL-1 β mRNA 表达及蛋白含量、NF- κ B 活性均显著升高; 与模型组比较, Tri 组上述指标均明显降低, 差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。结论 雷公藤内酯醇对 SAP 肺损伤大鼠具有一定保护作用, 与抑制 NF- κ B 活性进而下调 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子表达有关。

【关键词】 雷公藤内酯醇; 胰腺炎, 急性, 重症; 急性呼吸窘迫综合征

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.05.015

Effects of triptolide on severe acute pancreatitis-associated lung injury in rats LI Xing-wang*, SHANG You, ZHANG Bing, LI Jun, HU Ming-pin, LIAN Qing-quan. * Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang, China

【Abstract】Objective To investigate the protective effects of triptolide on severe acute pancreatitis (SAP)-associated lung injury in rats and assess its possible mechanism. **Methods** Thirty-six male Wistar rats 250 - 300 g in weight were randomly divided into three groups ($n=6$ each); sham, model and triptolide (Tri) groups. Sham group only underwent laparotomy. Immediately after undergoing retrograde injection of sodium taurocholate into pancreatic duct, Tri and model groups received intra-peritoneal injection of triptolide 0.2 mg/kg or equal amount of normal saline, respectively. Six hours after sodium taurocholate injection, the rats were sacrificed. The lungs were removed for the determinations of the mRNA and protein expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity. **Results** Compared with sham group, model group showed a significant increase in the mRNA and protein expression levels of TNF- α and IL-1 β , and NF- κ B activity in the lung tissues (all $P<0.01$). In Tri group, all of these indexes were significantly lower than those of model group (all $P<0.01$). **Conclusion** The treatment with triptolide has protective effects against SAP-associated lung injury in rats. The underlying mechanism is probably via a down-regulation in lung inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1 β , through the inhibition of NF- κ B activity.

【Key words】 triptolide; severe acute pancreatitis; acute respiratory distress syndrome

重症急性胰腺炎(SAP)病情凶险, 病死率高达 20%~30%, 1 周内死亡者多由肺损伤所致。SAP 肺损伤发病机制复杂, 其中炎症反应在此过程中发挥了重要作用^[1], 因此, 抗炎疗法的研究就成为人们对该病症最感兴趣的问题之一。雷公藤内酯醇是植物雷公藤分离的一种生物碱, 具有抗炎和免疫抑制的作用, 在临床上已广泛应用^[2-4]。目前, 该药对 SAP

肺损伤的影响尚无定论。本研究旨在通过复制 SAP 动物模型, 观察雷公藤内酯醇对 SAP 肺损伤的影响, 并初步探讨其作用机制, 为防治 SAP 肺损伤提供参考依据。

1 材料与方

1.1 动物分组及模型制备: 36 只雄性 Wistar 大鼠, 8 周龄, 体重 250~300 g (由同济医学院实验动物中心提供)。按随机数字表法分为 3 组: 假手术组 (sham 组)、模型组、雷公藤内酯醇处理组 (Tri 组), 每组 6 只。实验前大鼠禁食 12 h、自由饮水。腹腔注

基金项目: 浙江省温州市科技计划项目(Y2005A144)

作者简介: 李兴旺(1973-), 男(汉族), 黑龙江省人, 医学博士, 主治医师, Email: li-xingwang@163.com.

射乌拉坦 1 g/kg 麻醉大鼠,采用牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射法复制大鼠 SAP 肺损伤模型,以胰腺出现肿胀、点状出血、坏死、皂化斑形成等改变为制模成功。打开微血管夹,移去硬膜外导管,缝闭小孔后逐层关腹。

1.2 药物干预措施及处理方法:关腹后即刻, Tri 组腹腔注射雷公藤内酯醇(福建省医学科学院研究所提供) 0.2 mg/kg; 模型组给予等量生理盐水; sham 组开腹后仅翻动胰腺和十二指肠后关腹,不注入牛磺胆酸钠,其余操作同模型组。注射牛磺胆酸钠后 6 h 处死动物,采集标本。

1.3 标本采集与指标检测

1.3.1 肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)mRNA 表达:留取部分右肺中叶组织,采用实时定量聚合酶链反应(PCR)测定肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达。所需引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。首先采用一步法提取肺组织匀浆中总 RNA(提取试剂盒购自美国 Promega 公司),按反转录试剂盒说明书操作获得 cDNA(试剂盒购自日本 TaKaRa 公司)。荧光定量 PCR 反应体系为 25 μ l,内含终浓度为 500 ng 的 cDNA 模板、250 nmol/L 的上下游引物及 12.5 μ l 的 2 \times 荧光 DNA 染料混合物。反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,之后 94 $^{\circ}$ C 40 s、60 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 40 s,40 个循环。用双标准曲线法对目的基因进行相对定量测定。荧光 DNA 染料混合物和 7000 型定量 PCR 仪均购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3.2 肺组织 TNF- α 、IL-1 β 蛋白含量:采用酶联免疫吸附法(ELISA),试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司。TNF- α 、IL-1 β 的蛋白含量用实测值与组织匀浆中总蛋白比值表示。总蛋白采用考马斯亮蓝法测定。

1.3.3 肺组织核转录因子- κ B(NF- κ B)活性:取冰冻肺组织,提取核蛋白,测定蛋白浓度。采用 ELISA 法测定 NF- κ B 的 DNA 结合活性,试剂盒由美国 active motif 公司提供,严格按说明书操作。NF- κ B 活性以吸光度(A)值表示。

1.4 统计学处理:采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐时组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时组间比较采用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达及蛋白含量(表 1):与 sham 组比较,模型组和 Tri 组肺组

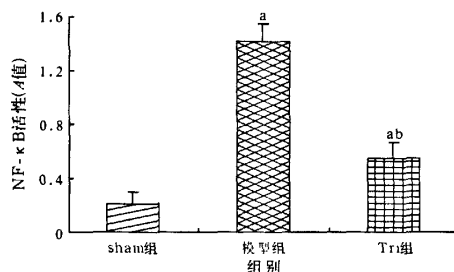
织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达及蛋白含量均显著升高,而 Tri 组则较模型组明显降低(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达及蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	TNF- α 蛋白 (ng/g)	IL-1 β 蛋白 (ng/g)
sham 组	6	0.09 \pm 0.03	0.07 \pm 0.03	4.87 \pm 0.12	2.07 \pm 0.19
模型组	6	0.93 \pm 0.05 ^a	0.53 \pm 0.09 ^a	54.10 \pm 1.10 ^a	30.09 \pm 0.20 ^a
Tri 组	6	0.42 \pm 0.06 ^{ab}	0.17 \pm 0.08 ^{ab}	20.80 \pm 2.31 ^{ab}	14.86 \pm 0.23 ^{ab}

注:与 sham 组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$

2.2 肺组织 NF- κ B 活性(图 1):与 sham 组比较,模型组和 Tri 组肺组织 NF- κ B 活性均明显升高(P 均 <0.01),而 Tri 组 NF- κ B 活性则较模型组明显降低($P<0.01$)。



注:与 sham 组比较,^b $P<0.01$;与模型组比较,^a $P<0.01$

图 1 各组大鼠肺组织 NF- κ B 活性的比较

3 讨论

虞文魁等^[1]观察到,肺损伤贯穿于急性胰腺炎整个病程,肺损伤组患者的病死率明显增加,治愈率下降;肺损伤患者均伴有不同程度的全身炎症反应综合征(SIRS),而且随着时间延长,肺损伤的发生率明显增加。这些结果表明在急性胰腺炎患者中,肺损伤一方面是炎症反应发展的结果;另一方面通过引起机体缺氧、细胞坏死、变性,刺激多种细胞因子和炎症介质释放,又加重了机体炎症反应,对患者的病情和预后造成影响。积极有效地对肺损伤进行干预治疗是非常重要的。

为了探讨雷公藤内酯醇发挥肺保护作用的机制,本研究中观察了其对肺组织炎症因子表达的影响。研究已证实,雷公藤可通过减少嗜酸粒细胞,从而抑制哮喘大鼠的气道炎症及肺纤维化^[5]。SAP 发生后,多种生物活性物质随血液循环作用于肺组织,导致肺脏炎症反应。其中 TNF- α 、IL-1 β 是具有代表性的炎症因子^[6-7]。本实验中模型组 TNF- α 、IL-1 β 的

mRNA 表达及蛋白含量均较 sham 组升高,表明 SAP 肺损伤时它们处于高表达状态。TNF- α 可以直接损伤肺实质细胞,增加肺血气屏障的通透性,促进炎性细胞(如中性粒细胞)在肺内的募集、激活;同时它作为重要的始发因子在细胞和亚细胞水平上发生一系列的级联反应,诱导 IL-1 β 等细胞因子的产生。IL-1 β 也具有类似 TNF- α 的作用,促进中性粒细胞脱颗粒,参与炎症级联反应。使用这两种因子的拮抗剂或抗体可以减轻 SAP 肺损伤。本研究中, Tri 组肺组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达及蛋白含量均较模型组显著降低,说明雷公藤内酯醇能够抑制它们的生成,降低其致损伤作用。由此可见,雷公藤内酯醇对肺损伤的防治效果,至少部分是通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 的产生,从而抑制炎症反应而实现的。

NF- κ B 是普遍存在于真核细胞中具有序列特异性的转录因子,是与 SAP 肺损伤关系密切的关键信号转导因子^[6]。通常情况下, NF- κ B 存在于细胞质中,与其抑制蛋白结合,处于功能失活状态。SAP 发生后,一系列细胞刺激因子(如致炎细胞因子、内毒素、活性蛋白酶)作用于肺脏组织细胞,使这些细胞内与 NF- κ B 结合的抑制蛋白降解, NF- κ B 得以激活并移位进入细胞核并结合于特定基因的 κ B 序列。如 TNF- α 、IL-1 等炎症因子的基因调控区(启动子/增强子)上存在 κ B 结合位点, NF- κ B 被激活后可诱导这些炎症介质基因的表达。因此, NF- κ B 在 SAP 肺损伤的发生发展中起了重要作用^[9]。有研究证实,抑制 NF- κ B 活化对 SAP 时肺脏具有保护作用^[10]。本研究中,模型组 NF- κ B 活性较 sham 组显著升高; Tri 组 NF- κ B 活性较模型组显著降低,说明雷公藤内酯醇能够降低 SAP 后肺组织 NF- κ B 活性,进而

抑制了 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达。

综上所述,雷公藤内酯醇可减轻 SAP 肺损伤,这种保护作用与其抑制肺组织 NF- κ B 激活,进而下调 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子的表达有关。

参考文献

[1] 虞文魁,李维勤,李宁,等.急性胰腺炎并发急性肺损伤的影响因素及临床意义[J].中国危重病急救医学,2004,16(2):100-102.

[2] Qiu D, Kao PN. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* hook. f[J]. *Drugs R D*, 2003, 4(1): 1-18.

[3] 曲政海.小剂量雷公藤多甙治疗儿童难治性 Still 病的对比研究[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):156-158.

[4] 施欣红.正清风痛宁与雷公藤多甙治疗强直性脊柱炎的比较研究[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10(3):154.

[5] 曲政海,谢宁,刘小梅,等.雷公藤对哮喘大鼠气道炎症及重塑影响的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(1):26-28.

[6] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2): 145-156.

[7] Browne GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(44): 7087-7096.

[8] Zhang XP, Zhang L, Chen LJ, et al. Influence of dexamethasone on inflammatory mediators and NF- κ B expression in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4): 548-556.

[9] de Campos T, Deree J, Martins JO, et al. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2008, 37(1): 42-49.

[10] 刘牧林,刘瑞林,马良龙.核转录因子- κ B 在大鼠急性胰腺炎发病机制中的作用研究[J].中国危重病急救医学,2005,17(7):434-435.

(收稿日期:2008-12-19 修回日期:2009-04-20)
(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

瑞西巴库治疗吸入性炭疽的疗效观察

吸入性炭疽的高死亡率与炭疽杆菌毒素介导的损伤作用有很大关系。瑞西巴库是人类 IgG λ 轻链的单克隆抗体,美国的科研人员发现瑞西巴库对炭疽毒素自身的保护性抗原具有明显的破坏作用。他们以感染炭疽杆菌的兔和猴进行随机对照实验,评估瑞西巴库治疗的有效性。将动物暴露在炭疽杆菌孢子气体中,剂量相当于半数致死量的 200 倍,自动物出现症状开始监测保护性抗原。一次性分别单独静脉注射安慰剂或瑞西巴库 40 mg/kg,观察兔和猴的存活时间点分别是 14 d 和 28 d。再向 333 例健康人体静脉注射瑞西巴库 40 mg/kg 进行安全性试验。在所有动物中,检测出保护性抗原的时间与菌血症出现时间相关($r=0.9, P<0.001$)。注射瑞西巴库治疗后,兔的存活率(44%)和猴的存活率(64%)显著高于安慰剂组(存活率均为 0,兔 $P=0.003$,猴 $P<0.001$)。安全性试验中,瑞西巴库的半衰期约为 20~22 d,足够浓度是机体能够获得治疗作用的前提,可给机体提供强大的保护作用,却未发现明显副作用。研究人员认为,瑞西巴库能提高吸入性炭疽动物的存活率,健康人群预防使用可提高人体抵抗力,是安全可靠的。

杨明星,编译自(N Engl J Med),2009,361(2):135-144;胡森,审校