

茵陈承气汤对大鼠重症急性胰腺炎 NF-κB 活性表达的影响 *

金岩柏¹ 郭林泉² 张成雷² 罗志强² 邵江华² 傅华群²

(1 江西省丰城市人民医院 丰城 331100; 2 南昌大学第二附属医院 江西南昌 330006)

摘要:目的:探讨 NF-κB 在重症急性胰腺炎各器官中的表达及其介导的细胞因子 TNF-α、IL-10 表达的变化,并研究茵陈承气汤对 NF-κB 活性及炎症介质表达的影响。方法:采用十二指肠乳头逆行插管注射牛磺胆酸钠法建立大鼠重症急性胰腺炎模型,60 只健康 SD 大鼠随机分为三组,对照组、模型组和中药治疗组,分别采用免疫组织化学法检测胰腺、肺和空肠组织 NF-κB 的活性和放免法检测 TNF-α、IL-10 的表达,并取胰腺、肺和空肠组织甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色后光镜观测组织形态学变化。结果:中药治疗组与模型组比较,胰腺、肺和空肠组织 NF-κB 的活性和 TNF-α、IL-10 的表达水平均明显降低;胰腺、肺和空肠组织损伤病理观察:对照组无明显形态学变化,模型组较重,中药治疗组明显改善。结论: NF-κB 在重症急性胰腺炎的胰腺病变、肺损伤、空肠损害中起重要作用;茵陈承气汤能有效改善病情,可能与抑制 NF-κB 的活性有关。

关键词:重症急性胰腺炎;NF-κB;TNF-α;IL-10;茵陈承气汤

中图分类号:R 576

文献标识码:B

doi:10.3969/j.issn.1671-4040.2011.02.063

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)是临床常见的严重急腹症,发病急,病死率高,并发症多,是当前胰腺外科的难点。实验和临床研究发现^[1],中药茵陈承气汤(茵陈 30 g、栀子 15 g、厚朴 15 g、枳实 15 g、大黄 15 g、芒硝 10 g,其中大黄后下,芒硝冲服)能在多水平、多环节、多位点上起到治疗胰腺炎的综合作用。本文采用十二指肠乳头逆行插管注射牛磺胆酸钠法建立大鼠 SAP 模型,检测胰腺、肺和空肠组织 NF-κB 的活性和 TNF-α、IL-10 的表达,探讨 NF-κB 在各器官中的表达及其介导的细胞因子 TNF-α、IL-10 基因表达的变化,并研究茵陈承气汤对 NF-κB 活性及细胞因子 TNF-α、IL-10 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 牛磺胆酸钠(Sodium Taurocholate),美国 Sigma 公司;NF-κB 一抗、NF-κBp65(F-6)、sc-8008, santa cruz biotechnology inc;肿瘤坏死因子(TNF-α)试剂盒,南京建成生物工程研究所;茵陈承气汤,南昌大学第二附属医院中药房提供;WZ-50c 型微量注射泵,浙江大学医学仪器厂;Olympus C5050z 型荧光显微镜,日本;DFM-90 型放射免疫计数仪,上海医学仪器厂。

1.2 动物模型及分组 实验动物为健康的 SD 大鼠 60 只,体重 250 g 左右,不分雌雄,由南昌大学医学院动物实验中心提供。随机分为三组,对照组、模型组、中药治疗组各 20 只,大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,5%戊巴比妥腹腔注射麻醉(10 mg/kg),腹部去毛消毒,用新鲜配制的 5%牛磺胆酸钠 1.5 mL/kg 十二指肠乳头逆行插管注射建立大鼠 SAP 模型,注射速度为 12 mL/h。对照组在胰腺表面以器械钝性轻划数次关腹,1 h 后经口灌胃给予生理盐

水;中药治疗组和模型组分别在 SAP 模型造模成功 1 h 后经口灌胃给予茵陈承气汤和生理盐水。

1.3 标本采集及指标测定 各组大鼠分别于造模成功后第 1、3、6、12 小时时间点活杀大鼠,取胰腺、肺、空肠组织甲醛固定,石蜡包埋切片,HE 染色后光镜观测组织形态学变化;免疫组织化学法检测胰腺、肺、空肠组织 NF-κB 的活性;另取动脉血 2~4 mL,分离血清置 -70℃冰箱保存,放免法测 TNF-α、IL-10 的表达。

1.4 病理观察 取胰腺、肺、空肠组织各 0.1 g 浸泡于 AF 固定液中,石蜡包埋切片,常规苏木素-伊红染色,另切片通过免疫组织化学法检测 NF-κB 的活性,NF-κB 一抗用 PBS 液 1:50 倍稀释,PBS 代替一抗作空白对照,参照 SP 试剂盒免疫组织化学法进行染色,细胞浆染成棕黄色为强阳性,黄色、淡黄色为弱阳性,不着色为阴性。

1.5 统计学处理 所有数据均以均数±标准差($\bar{X} \pm S$)表示,各组均数比较用 *t* 检验或方差分析。统计分析在 SPSS11.0 for windows 上进行,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 病理观察 镜下所见,对照组大鼠胰腺、肺、空肠组织未见明显病理改变。模型组:胰腺组织水肿明显,肺泡间隔增宽,炎性细胞浸润;肺组织可见肺泡壁断裂、增厚,肺间隔水肿增宽,炎性细胞浸润,肺泡内可见渗出物,肺泡腔塌陷和肺大泡的形成;空肠黏膜下层增厚、水肿,各层组织中可见大量淋巴细胞、单核细胞浸润。中药治疗组与模型组相比,胰腺组织损伤无明显改善,但肺组织、空肠组织损伤已明显减轻,炎性细胞浸润减少,肺组织水肿表现较轻。免疫组化结果:对照组胰腺、肺及空肠组织

* 基金项目:江西省中医管理局课题(030041)

少见 NF-κB 活化细胞,而模型组 3 h、6 h、12 h 各时点均可见大量活化细胞呈棕黄色,中药治疗组活化细胞明显减少并着色为淡黄色。

2.2 TNF-α 水平 模型组各时间点动脉血 TNF-α 水平明显高于对照组,中药治疗组与模型组比较,各时间点动脉血 TNF-α 水平下降明显。见表 1。

组别	表 1 各组血 TNF-α 水平比较 (X̄±S) ng/mL			
	TNF-α			
	1 h	3 h	6 h	12 h
对照组	0.89± 0.07	0.87± 0.14	0.95± 0.11	1.01± 0.09
模型组	1.18± 0.21 [△]	1.21± 0.19 [△]	1.38± 0.32 [△]	1.60± 0.23 [△]
中药治疗组	1.06± 0.15*	1.11± 0.10*	1.14± 0.08*	1.19± 0.09*

注:模型组与对照组比较,[△]P<0.05;中药治疗组与模型组比较,*P<0.05。

2.3 IL-10 水平 模型组各时间点动脉血 IL-10 表达水平明显高于对照组,中药治疗组与模型组比较,各时间点动脉血 IL-10 水平明显降低。见表 2。

组别	表 2 各组血 IL-10 水平比较 (X̄±S) pg/mL			
	IL-10			
	1 h	3 h	6 h	12 h
对照组	13.00± 1.26	13.08± 1.34	14.02± 0.79	13.95± 0.37
模型组	25.43± 3.17 [△]	24.39± 2.25 [△]	27.05± 3.52 [△]	29.60± 1.78 [△]
中药治疗组	17.70± 2.24*	16.82± 1.17*	16.32± 2.44*	14.98± 1.06*

注:模型组与对照组比较,[△]P<0.05;中药治疗组与模型组比较,*P<0.05。

3 讨论

重症急性胰腺炎时大量细胞因子及炎症介质的释放,造成白细胞过度激活,形成全身性炎症反应状态,引发胰腺局部及全身器官损伤,继而造成多器官功能衰竭。急性肺损伤(ALD)是 SAP 最常见的早期并发症,约 70%的 SAP 病人合并肺损伤,15%的 SAP 病人在第一周内出现 ARDS^[2]。

SAP 时胰腺微循环障碍、坏死感染,产生大量的细胞因子入血循环至各器官,再通过炎症介质复杂的网络,介导核因子-κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)活化,启动和调控 TNF-α、IL-10 等一系列参与炎症反应的炎症因子的表达,其效应级联放大而形成恶性循环,导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)^[3]。研究表明^[4],NF-κB 是具有基因转录调节作用的蛋白质因子,能够和许多基因上启动子区域的固定核苷酸序列结合而启动基因转录,是细胞因子和炎症介质调控的关键因素。在静止细胞中,NF-κB 与抑制因子结

合形成复合体,以无活性形式存在于细胞浆内,当细胞受到刺激后,NF-κB 抑制因子发生磷酸化而降解,使 NF-κB 游离活化并进入细胞核,与目的基因结合位点结合,启动和调控一系列参与炎症反应的炎症因子基因表达,如促炎因子、黏附因子、环氧化酶等,介导全身器官功能的损害。TNF-α、IL-10 是 SAP 时多器官功能障碍的重要损害性介质,同时也是 NF-κB 介导表达的一种重要促炎介质。研究表明^[5],乌司他丁抑制重症急性胰腺炎大鼠 NF-κB 活性后,TNF-α 等炎症介质明显减少。本实验结果亦表明,SAP 大鼠模型组胰腺、肺、空肠组织 NF-κB 的活性明显高于对照组,动脉血 TNF-α、IL-10 的表达亦升高。

实验和临床研究发现^[6],中药茵陈承气汤在提高机体免疫力、减少自由基的生成、调节和改善组织中氧化和抗氧化系统的平衡失调、减少肠黏膜损害、减少内毒素的生成和吸收、加快对内毒素的灭活等方面发挥作用。本实验结果表明,中药治疗组较模型组胰腺、肺、空肠组织 NF-κB 活性减低,且 TNF-α、IL-10 的表达下降,提示在 SAP 合并多器官功能障碍的发生发展过程中,NF-κB 起重要作用,其机制可能为调节炎性介质的表达。而中药茵陈承气汤可能具有抑制 NF-κB 的活性,从而减少 TNF-α、IL-10 等炎性介质的作用,达到治疗 SAP 的目的。

参考文献

[1]Shang D,Guan FL,Jin PY,et al.Effect of Yinchenchengqi decoction and endoscopic sphincterotomy for endotoxemia in acute cholangitis [J].WJG,1998,4(5):443
[2]Steer ML.Relation between pancreatitis and lung diseases[J].Respir Physiol,2001,12:13-16
[3]雷文章,韦靖江,沈文律,等.实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系[J].中华实验外科杂志,1995,12(3):131-132
[4]Schwartz MD,Moore EE,Shenkar R,et al.Nuclear factor-κB is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome[J].Crit Care Med,2004,24:1 285-1 292
[5]郭林泉,张玉惠,王志刚.急性坏死性胰腺炎肺损伤的实验研究及乌司他丁治疗的影响[J].中华肝胆外科杂志,2005,11(10):703-704
[6]Wu CT,Li ZL,Xiong DX.An experimental study on curative effect of Chinese medicine “qing yi tang”in acute necrotizing pancreatitis[J].CJIM,2005,4:201-204

(收稿日期: 2010-12-31)

书 讯

为更方便、有效、快捷地使广大医药卫生科技人员和广大读者、论文作者、期刊编辑者全面、正确地掌握和标准、规范使用和参考及著录国外英文期刊及缩写语,《中国临床新医学》杂志编辑部收集国外 3 000 多种英文生物医学、药学期刊,对其规范的英文全名、缩写语和中文名称进行了编译,并注明出版版(地),按英文字母顺序进行编排,便于读者、论文

作者和期刊编者查阅和对照。

本书大 32 开本,由接力出版社出版,定价每册 30 元,请通过邮局直接汇款(书价 30 元,挂号邮寄费 5 元,共计 35 元)到编辑部订阅(汇款单注明:购手册)。地址:广西南宁市桃源路 6 号《中国临床新医学》杂志编辑部,邮政编码:530021,联系人:韦颖。