

血必净对重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用^{*}

湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院) 王晓君^{*} 陈曾凤 方兴刚,十堰 442000

摘要 目的:研究血必净对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肝损伤的保护作用及其对肝脏信号传导与转录激活因子3(p-STAT3)表达的影响。方法:60只6~8周龄清洁级雄性SD大鼠按照随机数字表法分成3组:胰腺炎模型组、假手术组、血必净组,每组20只。胰腺炎模型组和血必净组采用5%牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射制备重症SAP大鼠模型,假手术组打开腹腔后不注射药物,血必净组在造模后腹腔内1次性注射血必净4mL/kg。造模成功后12、24h,3组随机各取大鼠10只,心脏穿刺取血5mL,应用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST),ELISA法检测血清IL-6、TNF- α 水平,Western blotting法检测肝脏p-STAT3蛋白表达,取血后处死,取一叶肝组织制作石蜡切片,进行HE染色和免疫组化染色,观察肝组织损伤程度及p-STAT3蛋白表达情况。结果:胰腺炎模型组和血必净组大鼠ALT、AST水平显著升高,炎性因子IL-6、TNF- α 及p-STAT3蛋白表达较假手术组均明显升高(均P<0.05),血必净组转氨酶ALT、AST水平、IL-6、TNF- α 、p-STAT3蛋白表达水平均较胰腺炎模型组低(均P<0.05)。结论:血必净对大鼠SAP肝损伤有保护作用,可能与调控p-STAT3信号通路,抑制促炎细胞因子过度表达有关。

关键词 重症急性胰腺炎; 急性损伤; 血必净; p-STAT信号通路

中图分类号 R576 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzz20190519

Protective effect of Xuebijing injection on liver injury in severe acute pancreatitis and its effect on the expression of hepatic signal transduction and activator of transcription (p-STAT3) WANG Xiao-jun, CHEN Zeng-feng, FANG Xing-gang. Taihe Hospital of Shiyan City, Hubei Province. Shiyan 442000 China

Abstract Objective: To investigate the effect of Xuebijing on severe acute pancreatitis (SAP)-associated acute liver injury in the rats and explore the underlying mechanisms. Methods: Male Sprague-Dawley (SD) rats ($n=60$) were randomly divided into sham-operated group ($n=20$), SAP model group ($n=20$), and treatment group ($n=20$). SAP model was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate (1mL/kg) into the biliopancreatic duct. The rats in Xuebijing treatment group were intraperitoneally injected with 4mL/kg Xuebijing. The rats were sacrificed at 12 h ($n=10$) and 24 h ($n=10$) after the treatment. The levels of serum ALT and AST were determined by the puncture through inferior vena cava. The serum levels of TNF- α and IL-6 were examined by ELISA, and the protein levels of p-STAT3 in the liver were evaluated by Western blotting. Results: As compared with sham-operated group, the levels of serum ALT, AST, IL-6 and TNF- α in SAP model group were significantly increased, and those in Xuebijing treatment group were significantly decreased as compared with those in model group. Meanwhile, the phosphorylation levels of p-STAT3 were significantly increased in model group as compared with sham-operated group. The rats in Xuebijing treatment group had lower phosphorylation levels of STAT3. Conclusion: Xuebijing exerts a protective effect on pancreatitis-associated acute liver injury in the rats possibly via inhibiting p-STAT3 signaling pathway.

Key words Severe acute pancreatitis; Acute liver injury; Xuebijing; P-STAT3 signaling pathway

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis,SAP)属于临床常见的疾病,主要是胰酶异常激活造成对胰腺自身组织消化,引发胰腺水肿和坏死,产生一系列并发症,诸如腹腔感染、休克的全身炎症性疾病,病死率较高^[1]。研究发现SAP发病过程中会释放较多炎症介质,有报道显示IL-6水平反映了SAP严重程度,同时IL-6可以诱发其下信号传导与转录激活因子3(p-STAT3)活化,促进炎症进一步发展。本研究观察血必净对SAP大鼠肝脏损伤保护作用

和对p-STAT3表达影响,以期为临床提供治疗参考依据。

材料与方法

实验动物 6~8周龄清洁级雄性SD大鼠60只,体质量250~300g,由湖北医药学院动物实验中心提供,自由进食和摄水,28℃明暗周期12h,适应性饲养1周。

仪器及试剂 全自动生化分析仪购自西门子公司,超声波细胞粉碎机购自宁波新芝科器研究所,血必净注射液为天津红日药业股份有限公司生产(批号:20160211)。

*基金项目:湖北省教育厅科研项目(No:B2016116)

*通信作者:王晓君,E-mail:liang63521@163.com

动物分组及制模 用随机数字法将实验大鼠分为胰腺炎模型组 20 只、假手术组 20 只、血必净组 20 只。3 组术前禁食 12 h、不禁水, 用 10% 水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉, 假手术组打开腹腔后不注射药物, 胰腺炎模型组、血必净组以 0.1 mL/min 速度向胆胰管内注入 5% 牛磺胆酸钠(1 mL/kg) 制备 SAP 大鼠模型^[2], 制模后模型组关腹, 血必净组腹腔内一次性注射血必净注射液(4 mL/kg) 后关腹。

观察指标

1. 胰腺、肝功能指标、炎性因子表达情况

造模成功后 12、24 h, 3 组随机各取大鼠 10 只, 水合氯醛腹腔麻醉后心脏穿刺取血 5 mL, 4℃ 3 000 r/min 离心 15 min 后取上清, -20℃ 冷冻保存, 应用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)水平; ELISA 法检测血清 IL-6、TNF-α 水平。

2. 肝组织 p-STAT3 表达

Western blotting 法检测肝脏 p-STAT3 蛋白表达。3 组取血后脱颈椎处死, 取新鲜肝左叶, 4% 甲醛溶液固定 24 h, 常规方法制作石蜡切片, 脱蜡后免疫组化染色后观察肝脏组织 p-STAT3 蛋白表达。

统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计学软件, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 t 检验; 计数资料以百分数(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肝功能指标 造模 12 h 及 24 h 后, 模型组

ALT、AST 水平均高于假手术组($P < 0.05$), 血必净组低于模型组($P < 0.05$)。模型组大鼠各指标检测水平均随造模后时间的增加而呈现显著增加趋势, 而血必净组在 24 h 时各指标较造模 12 h 时显著下降($P < 0.05$), 见表 1。

炎性因子水平 造模 12 h 后, 模型组 IL-6、TNF-α 水平较假手术组明显升高($P < 0.05$), 血必净组 IL-6、TNF-α 水平较模型组下降($P < 0.05$)。造模 24 h 后, 模型组 IL-6、TNF-α 水平进一步升高, 血必净组 IL-6、TNF-α 水平下降, 较模型组显著降低, 与假手术组差异无统计学意义, 见表 2。

肝组织 p-STAT3 表达 造模 12 h 及 24 h 时, 模型组及血必净组肝脏石蜡切片免疫组化染色均可见胞质和胞核 p-STAT3 阳性表达, 以胞核为主, 且模型组肝脏 p-STAT3 表达均强于血必净组, 模型组肝脏 p-STAT3 在 12 h 及 24 h 均呈强阳性表达, 而血必净组仅在造模 12 h 时呈强阳性表达, 24 h 后表达明显减弱; 假手术组肝组织 p-STAT3 不表达或弱阳性表达, Western blotting 法检测肝脏 p-STAT3 蛋白表达结果与免疫组化结果一致, 见表 3、图 1。

讨 论

研究发现 SAP 会产生大量炎症介质与细胞因子, 引发全身炎症反应综合征, 肝脏是胰腺血液回流的第一站, 同时也是体内多种细胞因子灭活场所, 因此成为了 SAP 受累的主要胰外脏器, 肝脏损伤程度同 SAP 严重程度呈正相关, 肝脏功能损伤导致肝脏解毒作用下降, 致病因子容易进入体循环, 对全身其他脏器产生损伤^[3~5]。

表 1 3 组大鼠 ALT、AST 水平比较

(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	ALT		AST	
		12h	24h	12h	24h
假手术组	20	52.5 ± 12.8	49.8 ± 5.2	121.4 ± 21.8	119.7 ± 19.3
模型组	20	232.3 ± 42.6 ^{##}	368.3 ± 48.6 ^{* * ##}	467.2 ± 67.8 ^{##}	541.2 ± 67.8 ^{* * ##}
血必净组	20	214.4 ± 35.5 ^{△△}	174.4 ± 36.5 ^{* * △△}	331.9 ± 39.1 ^{△△}	287.9 ± 35.1 ^{* * △△}

注: 与同组 12 h 比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与假手术组同时间节点比较, $^# P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$; 与模型组同时间节点比较,

$^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

表 2 3 组血清炎性因子表达水平比较

(ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	IL-6		TNF-α	
		12h	24h	12h	24h
假手术组	20	32.79 ± 5.13	31.58 ± 5.42	29.12 ± 8.43	28.34 ± 10.12
模型组	20	125.90 ± 19.64 ^{##}	198.90 ± 27.84 ^{* * ##}	114.56 ± 17.35 ^{##}	167.56 ± 25.35 ^{* * ##}
血必净组	20	111.36 ± 10.35 ^{△△}	95.36 ± 10.35 ^{* * △△}	109.15 ± 19.36 ^{△△}	89.26 ± 12.15 ^{* * △△}

注: 与同组 12 h 比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与同时间节点假手术组比较, $^# P < 0.05$, $^{##} P < 0.01$; 与同时间节点模型组比较,

$^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

表3 3组肝组织p-STAT3蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例	12 h	24 h
假手术组	20	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.04
模型组	20	3.58 ± 0.05	4.35 ± 0.05 *
血必净组	20	2.34 ± 0.16	2.09 ± 0.12 *

注:与同组12 h 比较, * $P < 0.01$

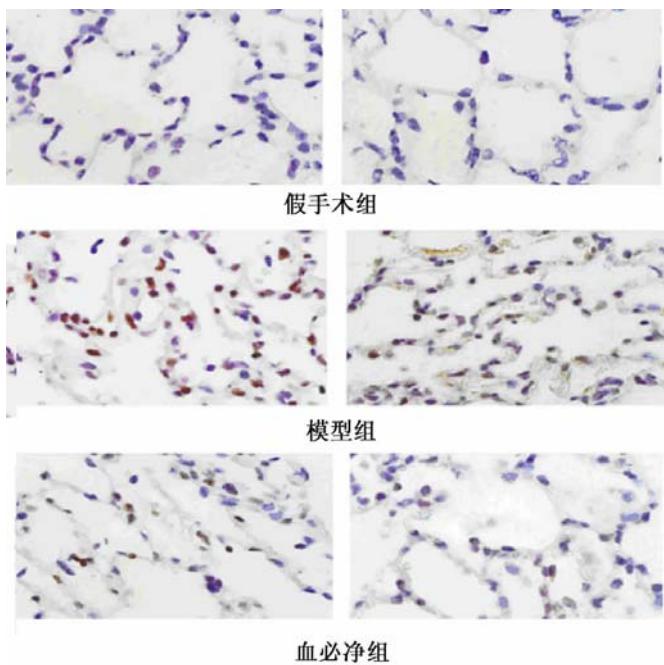


图1 3组大鼠肝组织病理学改变

STAT3 属于信号转导与转录激活家族中的一员,具有信号转导与转录调控的双重作用,也是 IL-6 介导炎症反应通路的重要组成成分,可以在多种类型细胞和组织中表达,其可通过酪氨酸磷酸化激活为 p-STAT3,后者表达水平是 STAT3 活化程度的体现,临床对于结肠炎信号通路的研究显示,过度生成的 IL-6 通过与其受体结合,引发酪氨酸激酶磷酸化活化过程,造成下游 Sata3 磷酸化,进而形成二聚体,进入到细胞核同特异 DNA 序列结合,调节下游相关靶基因转录和表达^[6~8]。本研究表明 SAP 大鼠胰腺组织 STAT3 蛋白表达明显增加,STAT3 活化可能参与了诱发的急性胰腺炎进展过程,应用血必净治疗可在一定程度上抑制 STAT3 蛋白的活化过程。本研究中 SAP 模型组 IL-6 与肿瘤坏死因子 α 浓度显著升高,且浓度增加程度随着造模时间增加而增加,说明 SAP 时炎症细胞发生过度浸润,诱导了炎症因子大量释放,因此胰腺炎患者肝脏损伤程度和病变程度与炎症因子高表达有关^[9,10]。

血必净为血府逐瘀汤作为底方,方中当归、川

芍、赤芍、桃仁、红花可以活血化瘀,牛膝能够祛瘀血通经络,引淤血下行,柴胡可以疏肝解郁,上升清阳,桔梗能够宣肺气,载药上行,枳壳能够降肺气,行气止呕,一升一降可以开胸行气,气行则血行,生地能够清热凉血,养阴润燥,祛瘀血而不伤阴,炙甘草可以调和诸药,全方行血分瘀滞,解气分郁结,活血不耗血,化瘀能生新,合用起到了活血化瘀、行气止痛作用^[11,12]。现代药理学证实血必净可以抑制炎症因子释放,减轻炎症反应,在脓毒症中可以抑制炎症细胞因子产生的级联反应,防止肝脏等脏器的继发性损伤。早期给予血必净能够减轻炎症反应程度,增加肝脏蛋白合成能力,减少肝脏损伤^[13]。血必净对 SAP 大鼠肝损伤有保护作用,可能是与调控 p-STAT3 信号通路,抑制促炎细胞因子过度表达有关。

参 考 文 献

- 1 高鹏辉,胡占升. 血必净与生长抑素联合治疗重症急性胰腺炎的临床疗效观察[J]. 中成药,2016,38(3):714-716.
- 2 Park JH, Van WH, McMillan DC, et al. Signal transduction and activator of transcription-3 (STAT3) in patients with colorectal cancer: associations with the phenotypic features of the tumor and host[J]. Clin Cancer Res,2017,23(7):1698.
- 3 周英,马成才,吴运福,等. 不同剂量雨蛙素诱导小鼠急性胰腺炎模型的对比研究[J]. 现代生物医学进展,2016,16(35):6804-6807.
- 4 杜军卫,赵海平,靳君华,等. 急性胰腺炎动物模型研究进展[J]. 中国现代普通外科进展,2017,20(2):157-161.
- 5 虞洋生,丁浩平,付堂清. 乌司他丁腹腔灌洗治疗重症胰腺炎的动物实验研究[J]. 西南国防医药,2016,26(6):600-602.
- 6 兰涛,崔乃强. 急性出血坏死性胰腺炎大鼠血清二胺氧化酶水平变化及意义[J]. 山东医药,2016,56(38):37-39.
- 7 冯辉,吴标,赵习德,等. 生长抑素联合大柴胡汤对重症急性胰腺炎大鼠的作用[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(7):1297-1301.
- 8 朱志坚,于燕妮,陶欣,等. 酪氨酸激酶/信号转导和转录激活子在氟中毒大鼠肝脏中表达[J]. 中华地方病学杂志,2015,34(10):733-738.
- 9 石乔,陈辰,赵亮,等. 氢饱和生理盐水对重症急性胰腺炎大鼠肾损伤的保护机制[J]. 中华消化外科杂志,2016,15(7):715-722.
- 10 徐胜,邓文宏,孙荣泽,等. 不同剂量 Apocynin 对重症急性胰腺炎模型大鼠肠组织的保护作用[J]. 天津医药,2016,44(12):1428-1431.
- 11 丁志燕,王艳芬,王璇,等. 信号转导及转录激活因子 6 在孤立性纤维性肿瘤中的表达和意义[J]. 中华病理学杂志,2017,46(4):235-239.
- 12 袁伟燕,黄中伟,陈卫昌,等. 血必净对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用及其机制[J]. 山东医药,2016,56(8):30-32.
- 13 赵建锋,兑丹华,代静静,等. 清胰II号对重症急性胰腺炎大鼠胰腺损伤的保护作用及机制探讨[J]. 山东医药,2016,56(10):25-26.

(2017-12-07 收稿 2019-09-03 修回)