

本文引用:徐寒,刘欢,陈念,冷大跃.清胰逐瘀汤对急性胰腺炎大鼠微循环的影响及其机制[J].湖南中医药大学学报,2017,37(2):149-152.

清胰逐瘀汤对急性胰腺炎大鼠微循环的影响及其机制

徐寒¹,刘欢²,陈念²,冷大跃^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007)

〔摘要〕目的 探讨清胰逐瘀汤对急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)大鼠微循环的影响及其机制。方法 将Wistar大鼠54只随机分为假手术组、模型组、治疗组。检测各组手术后8h的血清白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平、血清淀粉酶(AMS)、血浆凝血酶原时间(PT)、血浆D二聚体(D-D)及血小板计数(PLT)。结果 与假手术组相比,模型组大鼠的IL-6、TNF- α 、AMS、PT、D-D升高,PLT降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组相比,治疗组大鼠IL-6、TNF- α 、AMS、PT、D-D的升高程度及PLT的降低程度都有减轻,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 清胰逐瘀汤能在一定程度上改善大鼠AP的微循环,其机制与影响AP大鼠的某些炎症介质及凝血纤溶系统,减轻由微循环障碍导致的组织器官损害有关。

〔关键词〕 胰腺炎;微循环;清胰逐瘀汤;白细胞介素6;肿瘤坏死因子 α ;血浆凝血酶原时间;血浆D二聚体

〔中图分类号〕 R285.5;R657.5¹

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.02.009

Effects of Qingyi Zhuyu Decoction on Microcirculation of Rats with Acute Pancreatitis and its Mechanism

XU Han¹, LIU Huan², CHEN Nian², LENG Dayue^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 **Objective** To explore the effect and mechanism of Qingyi Zhuyu decoction on microcirculation of rats with acute pancreatitis. **Methods** Fifty-four Wistar rats were randomly divided into sham-operation group, model group, treatment group. The IL-6, TNF- α , serum amylase (AMS), Prothrombin time (PT), D-dimer (D-D), platelets(PLT) in each group were examined at 8 h after operation. **Results** Compared with the sham-operation group, the IL-6, TNF- α , AMS, PT and D-D were higher in the model group, but the PLT was lower, the difference was statistically significant ($P<0.01$). Compared with the model group, the increased degree of IL-6, TNF- α , AMS, PT and D-D level in treatment group, the reduced degree of PLT were relieved, the difference was statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** Qingyi Zhuyu decoction could improve the microcirculation of rats with acute pancreatitis insome extent. Its mechanism was realated to its influence in the inflammatory mediator and coagulation fibrinolysis system of rats with acute pancreatitis, and alleviation of tissues organ's injure caused by microcirculation disturbance.

〔Keywords〕 acute pancreatitis; microcirculation; Qingyi Zhuyu decoction; IL-6; TNF- α ; PT; plasma D-dimer

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种临床常见的急腹症,其病情凶险,并发症多,死亡率高,中医学名为“胰瘕”。近年来研究表明,微循环障碍可能是始动因素,并作为一种持续损伤机制贯穿于AP发展的整个过程,而促炎性细胞因子TNF- α 、IL-6

是引起AP凝血功能改变的主要炎症介质^[1],对胰腺微循环产生显著的影响。清胰逐瘀汤具有活血化瘀、清热解毒、涤荡脏腑瘀毒的作用,在我院已应用于AP的治疗多年。但其是否可以改善AP的微循环障碍及其相关机制,目前尚不清楚。本实验拟在建立大

〔收稿日期〕 2016-06-26

〔基金项目〕 湖南省科技厅项目(2013sk3101)。

〔作者简介〕 徐寒,女,在读硕士研究生,方向:中西医结合外科学。

〔通讯作者〕 *冷大跃,男,主任医师, E-mail: lengdyaa@126.com。

鼠 AP 模型基础上,研究清胰逐瘀汤对 AP 炎症因子及凝血纤溶指标的影响,从而探讨清胰逐瘀汤对 AP 大鼠微循环的影响及其相关机制,为临床应用清胰逐瘀汤治疗 AP 提供理论基础。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠 54 只,SPF 级,体质量(250~280)g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(湘)2014-0011。

1.2 实验药物

清胰逐瘀汤由生大黄 10 g,牡丹皮 9 g,桃仁 9 g,红花 6 g,赤芍 9 g,丹参 9 g,柴胡 12 g,黄芩 9 g,枳实 9 g,白芍 9 g,败酱草 9 g 组成,饮片购自湖南中医药大学附属第一医院。先将饮片用清水浸泡 1 h,加水 300 mL,后 10 味中药煎沸 35 min 后,加入生大黄再煎 5 min,然后将汤液浓缩成 100 mL,制成 1 g/mL 的药液。

1.3 主要试剂及仪器

牛磺胆酸钠(T4009-250MG),购自美国 sigma 公司,生理盐水配制成 3%的牛磺胆酸钠溶液,-20℃避光保存。4%多聚甲醛溶液(WB03004A),购自长沙维尔生物科技有限公司。IL-6 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(ERC003)、TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(ERC102a),购自深圳欣博盛生物科技有限公司。epoch 型酶联免疫检测仪,美国柏腾(biotek)。徕卡 RM2235 转轮石蜡切片机购自北京中仪光科科技有限公司,BA410 研究型显微镜(Motic),购自杭州明凯科技有限公司,Motic 6.0 数码医学图像分析系统,购自深圳市深沅恒科技有限公司。

2 方法

2.1 动物模型的建立

大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,用 4%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,待麻醉满意后将大鼠固定于手术台上,备皮,75%酒精消毒。AP 模型组和治疗组参照王单松等^[2]介绍的 AP 建模方法。在剑突下作长约 2~3 cm 的正中横行切口,然后逐层切开直至进入腹腔。提起脾和胰尾,用 1 号针头平面朝上沿胰被膜下均匀注射 3%牛磺胆酸钠溶液,依次向胰管开口方向推进,缓慢注入牛磺胆酸

溶液 1.0 mL,使整个胰腺均匀隆起,约 10 min 后胰腺出现肉眼可见的水肿出血,表明制作 AP 模型成功,再缝合切口。假手术组开腹后仅轻揉胰腺及十二指肠,10 min 后缝合切口。术后各组均禁食,限量饮水。

2.2 分组及处理

将 Wistar 大鼠 54 只随机分为假手术组、模型组、治疗组,每组 18 只大鼠。模型组和假手术组在造模前 2 h 和造模后 2、5 h 分别按 10 mL/kg 给予生理盐水灌胃 1 次;治疗组在造模前 2 h 和造模成功后 2、5 h 分别按 10 mL/kg 给予 1 g/mL 清胰逐瘀汤灌胃 1 次,相当于成人剂量的 3.33 倍。假手术组、模型组和治疗组大鼠分别在末次灌胃后 3 h 麻醉处死大鼠,取下腔静脉血及胰腺组织备检,胰腺组织用 4%多聚甲醛溶液保存。随后处死各组大鼠。

2.3 实验标本及观察指标

术后 8 h 以采血针抽取各组大鼠下腔静脉血 3 mL 滴入红色促凝管,2 mL 滴入紫色抗凝管(EDTA-K2 抗凝管),再取 2 mL 滴入蓝色抗凝管(3.2%枸橼酸钠/3.2%柠檬酸钠)中。红色管中血 4 000 r/min 离心 10 min,取一小部分上清液,用于检查血清淀粉酶(AMS),将剩余上清液放入-80℃冰箱保存,用于测定血清 IL-6 和 TNF- α 含量;紫色管中血用于检测血小板计数(PLT);蓝色管中血用于检测血浆凝血酶原时间(PT)、血浆 D 二聚体(D-D)。再取胰腺组织用 4%甲醛固定,石蜡包埋,常规切片,HE 染色,显微镜下观察胰腺的组织学变化。

2.4 统计学方法

应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 AMS、TNF- α 、IL-6 水平比较

与假手术组大鼠比较,模型组和治疗组大鼠血清 IL-6、TNF- α 、AMS 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组大鼠比较,治疗组大鼠血清 IL-6、TNF- α 、AMS 均显著降低($P<0.01$)。见表 1。

3.2 血浆 PT、D-D、PLT 水平比较

与假手术组大鼠比较,模型组和治疗组血浆 PT、D-D 均显著升高,PLT 显著降低($P<0.01$);与模

型组大鼠比较,治疗组大鼠血浆 PT、D-D 均显著降低,PLT 显著升高($P<0.01$)。见表 2。

表 1 各组大鼠 AMS、TNF- α 、IL-6 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	AMS(U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
假手术组	987 $\pm$ 47	19.58 $\pm$ 6.64	53.70 $\pm$ 5.08
模型组	6 885 $\pm$ 73*	115.28 $\pm$ 7.19*	306.03 $\pm$ 6.29*
治疗组	3 392 $\pm$ 50**	88.27 $\pm$ 5.97**	118.54 $\pm$ 5.48**
F 值	16.35	28.18	26.55
P 值	0.00	0.00	0.00

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠血浆 PT、D-D、PLT 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	PT(s)	D-D(μ g/L)	PLT($\times 10^9$ /L)
假手术组	16.89 $\pm$ 0.95	252.06 $\pm$ 11.17	830.52 $\pm$ 6.36
模型组	22.04 $\pm$ 0.65*	338.21 $\pm$ 8.75*	711.18 $\pm$ 6.3*
治疗组	19.94 $\pm$ 0.69**	289.89 $\pm$ 8.8**	782.14 $\pm$ 7.82**
F 值	54.8	14.56	30.78
P 值	0.00	0.00	0.00

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

3.3 胰腺组织光镜检查

假手术组表现为正常的胰腺组织,模型组表现为大量胰腺组织出血、坏死,治疗组表现为少量胰腺组织出血、坏死。见图 1。

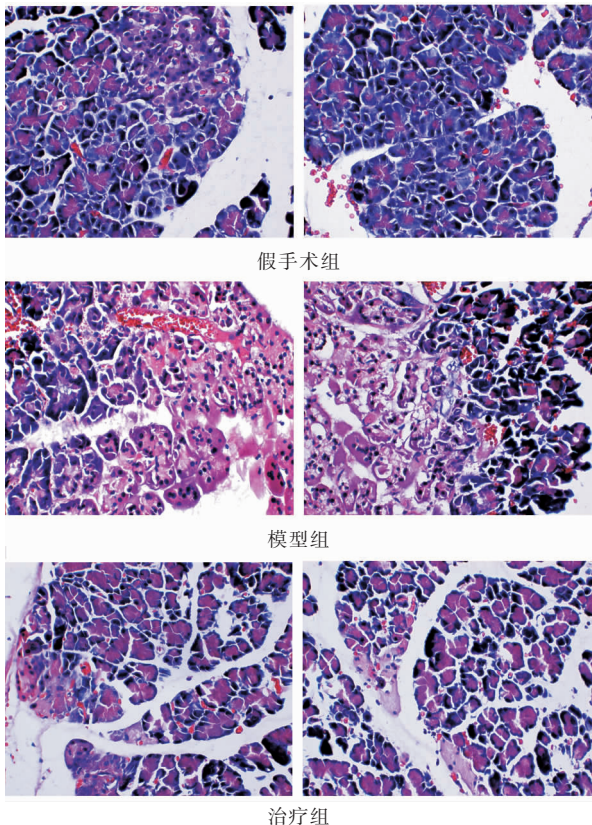


图 1 各组大鼠胰腺组织病理光镜图(HE $\times$ 400)

4 讨论

AP 是胰腺腺泡细胞内胰蛋白酶原激活引起细胞自溶的过程,但近年来大量研究表明 AP 的发生与发展不仅取决于胰酶的自家消化,还与胰腺缺血造成的胰腺微循环障碍及炎症递质导致的多脏器损害有关^[3]。AP 时,损伤的胰腺组织释放大量的炎症介质和细胞因子进入血循环,激活凝血途径,使胰腺内微血栓形成,导致胰腺组织的局部缺血,并促发炎症介质瀑布样级联反应^[4],进而引起胰腺及其它脏器微血管内皮细胞的损伤,影响胰腺的微循环。

研究表明,TNF- α 主要由单核/巨噬细胞产生,大量失控性释放时具有细胞毒性作用,介导胰腺局部和全身的凝血反应和炎症反应^[5],被认为是 AP 发生的触发因子,还可以直接损伤多种脏器的细胞层,导致缺血、出血、坏死、炎症及水肿。IL-6 主要来源于胰腺内活化的单核巨噬细胞,是在内毒素、TNF- α 、IL-1 诱导下产生的,具有广泛的前炎症效应,影响血液凝固及纤溶系统,导致组织损伤^[6],其水平高低与胰腺炎的严重程度及并发症的发生率呈正相关。血浆 D-D 能反映体内纤溶酶和凝血酶的活性,可作为体内高凝状态的分子标志物之一,增高时多见于各种栓塞,AP 患者体内凝血功能发生紊乱,D-D 明显升高^[7]。PT 是外源性凝血途径的筛选指标。PT 缩短见于血液高凝状态,PT 延长见于凝血因子缺乏、纤溶亢进等。AP 早期出现微循环障碍,其微循环内血栓的形成需消耗大量凝血因子,表现出 PT 明显延长^[8]。AP 早期 PLT 明显降低,说明参与了血管内血栓的形成,可能与生成减少,自身破坏增多有关。凝血纤溶的指标变化与炎症反应存在因果关系,机制可能为:胰腺炎症致组织细胞损害、血小板聚集、凝血因子消耗、纤维蛋白降解产物增加,从而引起弥漫性血管内凝血,凝血功能紊乱,导致系统炎症反应,器官功能障碍^[9]。

我国传统医学认为胰腺炎属“胰瘕”范畴,多表现为腹痛、腹胀、恶心、呕吐、便秘、黄疸等症状,历代医家认为其病机是外邪侵袭、饮食不节、情志失畅、虫积内积等导致的气滞、瘀血、热盛、邪结及厥逆夹杂。但近年来不少医家认为“毒、瘀”是 AP 的发病基础,也是 AP 病机演变的必然,与现代医学之微循环障碍、细胞因子与炎症介质、氧自由基等发病学说相

吻合^[10]。

近年来,应用中药治疗AP在动物和临床实验方面均取得了一定的进展,清胰逐瘀汤具有抗感染、抗炎性介质释放、改善胰腺微循环障碍作用,方中生大黄苦寒,泄热通便,同时具有抗菌作用,且能活血;牡丹皮凉血清热,活血散瘀,二者合用,共泻肠腑湿热瘀结。桃仁性善破血,助大黄以通瘀滞,红花活血祛瘀以止痛。丹参、赤芍祛瘀止痛、凉血消肿,合牡丹皮、桃仁、红花活血祛瘀之力倍增。败酱草清热解毒,祛瘀排脓。柴胡疏肝解郁,黄芩和解清热,两药合用可调肝胆之气机。白芍柔肝缓急止痛,与大黄相配可治腹中实痛,与枳实相伍可以理气和血,以除心下满痛。诸药合用,共奏祛瘀泄热之效。

清胰逐瘀汤是我院冷大跃教授治疗AP的经验方,具有活血化瘀、清热解毒、涤荡脏腑瘀毒的作用,已取得显著疗效。因此笔者推测其治疗AP的机制与其对炎症因子IL-6、TNF- α 及PLT和凝血纤溶系统的影响有关。本实验结果发现,清胰逐瘀汤治疗组大鼠的IL-6、TNF- α 、AMS、PT、D-D升高程度及PLT降低的程度均较AP模型组有所减轻。胰腺组织病理学观察结果显示,较之AP模型组,清胰逐瘀汤治疗组大鼠组织学水肿、出血和坏死情况均有明显改善。以上结果表明清胰逐瘀汤可明显降低AP大鼠血清淀粉酶的活性,减轻大鼠胰腺出血、坏死程度,其改善胰腺微循环的机制可能是抑制了

TNF- α 和IL-6水平的升高,从而减轻了其它炎症因子的暴发,进而在一定程度上阻断这些炎性介质对PLT和凝血纤溶系统的破坏及凝血—炎症间相互促发的恶性循环。

参考文献:

- [1] 易治中,黄伟雄,谢志东,等.川芎嗪对实验性急性胰腺炎大鼠血浆凝血和纤溶功能的影响[J].湖南中医杂志,2012,28(1):96-98.
- [2] 裴一爽,冯涛.急性胰腺炎大鼠模型的研究进展[J].医学信息(中旬刊),2010,5(5):1328-1329.
- [3] 车涛,曹农.急性胰腺炎微循环障碍发病机制的研究进展[J].山东医药,2009,49(33):112-113.
- [4] 周春立,顾振纶,梁中琴,等.川芎嗪对大鼠重症急性胰腺炎的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2011,31(10):3-6.
- [5] Hirota M SM, Baba H. Significance of elevated serum IL-18 levels in patients with acute pancreatitis [J]. J Gastroenterol, 2006,41(2): 182-183.
- [6] 侯斐,刘瑞霞,阴赅宏.急性胰腺炎微循环障碍的发生机制及其治疗进展[J].临床肝胆病杂志,2014,30(8):815-818.
- [7] Fritz-Rdzanek A, Grzybowski W, Beta J, et al. HE4 protein and SMRP: Potential novel biomarkers in ovarian cancer detection[J]. Oncol Let, 2012, 4(3): 385-389.
- [8] 王皓,王昀,田青山,等.急性胰腺炎患者微循环障碍的动态变化[J].江苏医药,2012,38(1):69-71.
- [9] Levi M SM, van der Poll T. Sepsis and thrombosis [J]. Semin Thromb Hemost, 2013, 39(5).
- [10] 黄天生,朱生樑,何立人,等.中医对于急性胰腺炎发病机制的认识[J].时珍国医国药,2007,18(8):2041-2041.

(本文编辑 杨 瑛)