·博士之窗·

丹参对重症急性胰腺炎大鼠诱导型一氧化氮合成酶 mRNA 的表达与器官损伤的影响

张　莹[1]　石承先[1]　李玉祥[2]　黄　平[3]

摘要　目的　探讨重症急性胰腺炎(SAP)大鼠诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA 的表达与器官损伤的关系和丹参对其影响。**方法**　Wistar 大鼠随机分为 3 组,模型组和丹参组均以 5% 牛磺胆酸钠经胰管内逆行注射复制 SAP 模型,丹参组则在制模后立即肌肉注射丹参注射液(每天 2 ml/kg),每 6 h 1 次,共给药 4 次;对照组仅行假手术,模型组和对照组同期给予等体积生理盐水。各组大鼠在术后 24 h 测定血淀粉酶(AMY)、一氧化氮(NO)和腹水量,用原位杂交法和图像分析检测胰、肺、肾 iNOS mRNA 的表达强度,并观察其病理变化。**结果**　血浆中 AMY、NO 和腹水量,模型组显著高于丹参组及对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。iNOS mRNA 在胰、肺、肾中的表达:模型组、丹参组均增高,模型组显著高于丹参组($P<0.01$)。胰、肺、肾病理改变丹参组较模型组减轻。**结论**　SAP 时胰、肺、肾组织的 iNOS mRNA 高表达导致 NO 过度生成并参与胰腺及胰外器官损伤。丹参早期治疗能抑制胰、肺、肾组织的 iNOS mRNA 的过度表达,对胰腺、肺及肾起保护作用。

关键词　丹参注射液;重症急性胰腺炎;一氧化氮合成酶 mRNA;器官损伤

Effect of Salviae Miltiorrhizae on mRNA Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Organ Injury in Rats with Severe Acute Pancreatitis ZHANG Ying, SHI Cheng-xian, LI Yu-xiang, et al *Department of General Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang (550000)*

Abstract　Objective　To investigate the relationship between mRNA expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and organ injury, and the effect of Salviae Miltiorrhizae on iNOS mRNA in severe acute pancreas (SAP) rats. **Methods**　Forty-five Wistar rats were randomly divided into 3 groups, the model group (MG), the Salviae Miltiorrhizae group (SMG), and the control group (CG), with 15 rats in each group. Rats in MG and SMG were established to SAP model by intraductal injection with 5% sodium taurocholate in a dose of 1.0 ml/kg, while rats in CG were merely performed sham-operation. Immediately after modeling, rats in SMG were injected with Salviae Miltiorrhizae injection (SMI) 2 ml/kg every 6 h for 4 times in total, but to rats in other two groups same volume of normal saline were administered. The level of serum amylase (AMY), nitric oxide (NO) and the volume of ascites of rats were determined 24h after modeling, and intensity of iNOS mRNA expression in pancreas, lung and kidney were detected in the same time using in situ hybridization and image analysis. The pathologic change was observed as well. **Results**　The volume of ascites and serum levels of AMY and NO in MG were significantly higher then those in SMG and CG ($P<0.05$ and $P<0.01$). The expression of iNOS mRNA in pancreas, lung and kidney increased in MG and SMG, it was significantly higher in MG than that in SMG. And the pathological change of pancreas, lung and kidney in SMG was milder than that in MG. **Conclusions**　Over-expression of iNOS mRNA could cause excessive synthesis of NO, and lead to injury of pancreas, lung and kidney in SAP. Salviae Miltiorrhizae in early stage of the disease can inhibit the over-expression of iNOS mRNA to ameliorate the injury of the pancreas, lung and kidney.

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长基金资助课题(黔科教办:2001—06)

作者单位:1.贵州省人民医院普外科(贵阳 550000);2.广东省深圳市龙岗区医院外科;3.遵义医学院组胚教研室

通讯作者:张　莹,现为第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所(重庆 400038)在读博士,Tel:13072318365,E-mail:zhangyingdoc@163.com

万方数据

Key words Salviae Miltiorrhizae; severe acute pancreatitis; nitric oxide synthase mRNA; organ injury

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)起病急,变化快,病情凶险,常并发多器官衰竭(multiple organ failure, MOF),MOF 是 SAP 恶化发展的结果。我们的研究表明,胰管压力对胰腺血流量的作用作为重要因素之一,可以影响 SAP 发生与发展[1,2]。另有研究表明,微循环障碍在 SAP 发生与发展中起重要作用[3,4]。一氧化氮(nitric oxide, NO)是调节血液循环的重要介质。近年研究表明,NO 在急性胰腺炎的发病过程中起着重要的作用[5]。但是,SAP 时胰、肺、肾组织中诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)mRNA 的表达如何,与血中 NO 水平及这些器官病理改变的关系尚不清楚。丹参作为调节血液循环的药物,对上述环节是否有影响,也值得探讨。

材料与方法

1 药品、试剂和主要仪器 丹参注射液(10 ml/支,每毫升含生药 1 mg)购自四川五粮液集团宜宾制药厂。牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司,配制成 5% 牛磺胆酸钠溶液。iNOS mRNA 原位杂交试剂盒、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。α 淀粉酶试剂盒购自上海科华-东菱诊断用品有限公司。γ 计数器为 DBC 公司产品。721 型分光光度计为山东高密实验仪器厂产品。

2 动物、分组和模型制备 动物:45 只健康 Wistar 大鼠(遵义医学院动物饲养中心提供),体重 220~280 g,雌雄不限。随机分成 3 组,模型组、丹参组和对照组,每组 15 只。SAP 模型制备:各组动物术前禁食 12 h,禁水 4 h,1% 戊巴比妥钠 25 mg/kg 腹腔内注射麻醉,按外科无菌要求手术,采用上腹壁正中切口入腹。模型组、丹参组动物用一小动脉夹夹闭胆管近肝门端,4.5 号针头经肠壁从十二指肠乳头刺入胰胆管约 0.8 cm,以 0.2 ml/min 的速度向胰胆管内逆行推注 5% 牛磺胆酸钠溶液 1.0 ml/kg,注毕压迫 5 min,见胰腺出血坏死后去除小动脉夹关腹。对照组仅开腹并轻轻触动十二指肠后关腹。丹参组关腹时腹股沟肌肉注射丹参注射液(每天 2 ml/kg),以后按上述剂量每 6 h 肌肉注射 1 次,共给药 4 次。模型组、对照组肌肉注射等体积生理盐水。3 组动物均分笼饲养,自由进水。制模至 24 h,在 1% 戊巴比妥钠 15 mg/kg 腹腔内注射麻醉下经颈动脉插管采血并处死动物,取胰、肺、肾组织备检。

3 观察指标和方法

3.1 血浆 NO 和血淀粉酶(AMY)测定 采血样 1 ml,加少许肝素混匀,2500 r/min 离心 15 min,取血浆 -20 ℃ 保存批量测定。NO 检测按试剂盒说明书操作。AMY 检测用全自动生化分析仪按试剂盒说明书操作。

3.2 病理观察 取胰、肺、肾组织标本(1 cm × 0.5 cm × 0.5 cm)固定于 4% 多聚甲醛溶液中(含 0.1% DEPC),常规脱水,石蜡包埋。切片做 HE 染色和原位杂交。

3.3 iNOS mRNA 原位杂交 杂交过程按试剂盒说明操作,以细胞胞浆中出现棕黄色颗粒为判断 iNOS mRNA 阳性表达。

4 图像分析和半定量分析 应用 Biomias99 图像分析系统(四川大学图像图形研究所提供),在 10 × 20 倍视野下,每张切片取 50% 组织测定积分光密度(IOD)以此表示阳性颗粒相对含量。

5 统计学方法 3 组间比较用方差分析,两组间比较采用 t 检验。

结 果

1 动物造模情况 所有动物均在术后 0.5~1 h 清醒,模型组大鼠表现萎靡,对外界刺激反应迟钝,进食饮水差,畏寒,肌力弱,在制模后 20~24 h 死亡 6 只(40%);丹参组大鼠清醒,对外界刺激反应较敏捷,进食饮水尚可,肌力较强,在制模后 20~24 h 死亡 3 只(20%);对照组大鼠一般状况良好,神志清,活动敏捷,肌力基本正常,无死亡。

2 病理观察

2.1 肉眼观察结果 在濒死时取大鼠血和胰、肺、肾组织标本。模型组大鼠开腹见淡红色或淡黄色腹水,量多,胃肠胀气明显;胰腺大片出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜见皂化斑;肺表面高度充血,可见点状出血,胸腔内少量积液,呈血性;肾体积增大,皮质明显增厚。丹参组大鼠见中少量腹水,呈淡红色或淡黄色,胃肠胀气较模型组轻;胰腺见片状出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜可见皂化斑;肺表面充血明显,无胸腔积液;肾皮质增厚。对照组大鼠无腹水,腹内器官及肺、肾未见异常改变。

2.2 光镜观察结果 (1)胰腺:模型组大鼠胰腺小叶间质水肿明显,叶间隔及小叶间隔弥漫性增宽,部

万方数据

分小叶轮廓不清，大片状出血和变性坏死，毛细血管高度扩张，血管周围、小叶间有大量粒细胞浸润，按 Schimdt 胰腺组织病理评分[6]为(12.05±1.28)分。丹参组大鼠胰腺的病理改变较模型组轻，主要表现在胰腺为片状出血，粒细胞浸润少，脂肪坏死较轻，病理评分为(10.45±1.42)分(与模型组比较，$P<0.05$)。对照组大鼠胰腺结构完整未见异常。(2)肺脏：模型组大鼠部分肺泡腔内有出血，少量渗出，肺泡大小不一，肺泡壁明显增厚，毛细血管高度充血，有炎症细胞浸润，支气管壁水肿，管腔内有渗出物；丹参组大鼠仅有肺泡壁轻度增厚，间质毛细血管扩张、充血，少量炎症细胞浸润，以中性粒细胞为主，支气管壁轻度水肿；对照组大鼠肺脏结构完整未见异常。(3)肾脏：模型组大鼠肾小球体积增大，毛细血管扩张，少数肾小囊内可见红细胞渗出，近曲小管上皮细胞胞浆疏松，管腔纹状缘消失；髓质内间质血管扩张、出血，少量炎细胞浸润；丹参组大鼠仅有肾皮质增厚，多数肾小球体积增大，毛细血管扩张，肾小管上皮细胞水肿，肾间质扩张、充血，有少量炎细胞浸润。对照组大鼠肾脏结构完整未见异常。

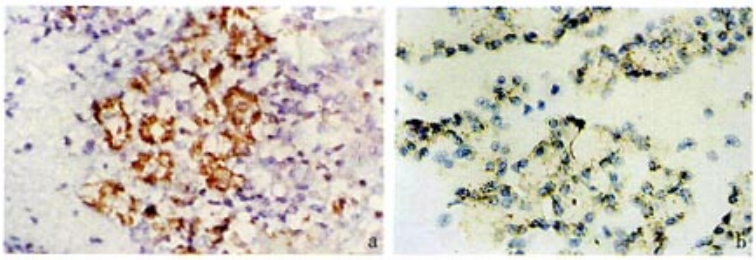
3　3 组大鼠血浆 NO、AMY 和腹水变化　见表 1。模型组、丹参组大鼠血浆 NO、AMY 和腹水均显著高于对照组($P<0.01$)，丹参组 NO、AMY 和腹水明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 1　3 组大鼠血浆 NO、AMY 和腹水量测定结果比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NO(μmol/L)	AMY(U/L)	腹水量(ml)
模型	15	163.36±20.40△	2156.05±355.87△	9.87±2.34
丹参	15	146.27±24.30*△	1439.21±332.99**△	5.27±2.81**
对照	15	69.84±18.06	215.67±37.27	0

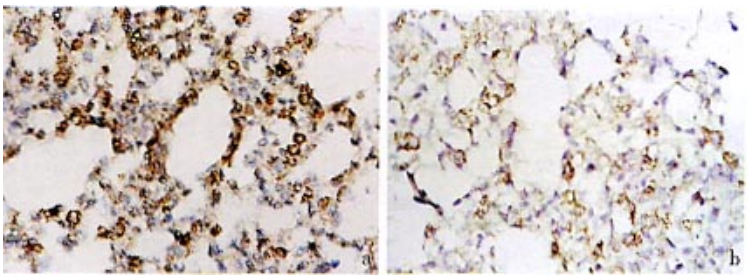
注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与对照组比较，△$P<0.01$

4　3 组大鼠胰、肺、肾中 iNOSmRNA 的表达　见表 2。对照组大鼠胰腺偶见 iNOS mRNA 的表达，



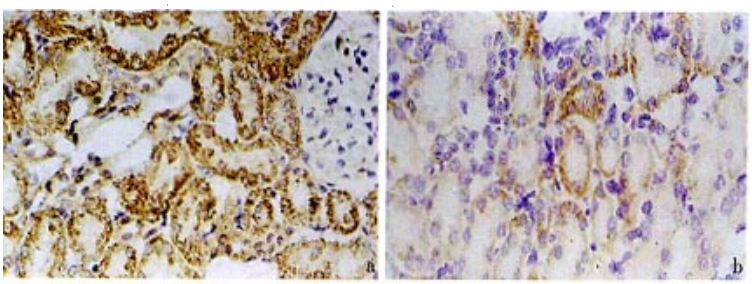
注：a 为模型组，b 为丹参组

图 1　胰腺组织 iNOS mRNA 的表达(×400)



注：a 为模型组，b 为丹参组

图 2　肺脏组织 iNOS mRNA 的表达(×400)



注：a 为模型组，b 为丹参组

图 3　肾脏组织 iNOS mRNA 的表达 (×400)

万方数据

肺、肾未见表达。模型组、丹参组大鼠胰、肺、肾均见 iNOS mRNA 于胞浆中表达(见图 1—3),丹参组显著低于模型组($P<0.01$)。

表 2 3 组大鼠胰腺、肺、肾中 iNOS mRNA 表达

(IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS mRNA 表达		
		胰腺	肺	肾
模型	15	28.11±1.01	28.57±1.18	27.53±1.26
丹参	15	21.41±1.54*	22.84±1.37*	23.90±1.06*
对照	15	偶有表达	0	0

注:与模型组比较,* $P<0.01$

讨 论

牛磺胆酸钠是致炎性最强的胆汁成分,可使胰腺小胰管和胰腺腺泡细胞膜损伤。本实验采用胰管内逆行注入 5% 牛磺胆酸钠诱发大鼠胆源性 SAP,与临床 SAP 相似。因此,目前认为此制模方式适合于了解 SAP 的发病机理和评价 SAP 的药物效应。

1 SAP 时胰、肺、肾 iNOS mRNA 的表达与器官损伤的关系 NOS 可分为结构型(cNOS)和诱导型(iNOS),前者又可分为内皮细胞型(eNOS)和神经元型(nNOS)。cNOS 依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白(CaM)激活。iNOS 表达于多种细胞,通常在细菌脂多糖、干扰素、IL-1、TNF 等诱导下表达,其活性不依赖于 Ca^{2+}-CaM,而且 iNOS 比 cNOS 存在时间长,可产生更多的 NO。NO 是一种内皮依赖性舒血管物质,具有强烈的血管舒张作用,NO 过度生成,导致低血压和低灌流,并有自由基损伤作用[3-5,7]。本实验研究显示模型组大鼠胰腺、肺、肾的 iNOS mRNA 呈高表达状态,相应的血液中 NO 水平明显升高,胰腺及肺、肾病理损伤也较显著,大鼠死亡较多。丹参组大鼠的情况则相反。提示在 SAP 时首先胰腺 iNOS mRNA 的高表达状态迅速地诱发肺和肾的 iNOS mRNA 也呈高表达状态,诱发瀑布反应,从而使血液中 NO 水平明显升高,由此可能造成全身的低灌流状态,肺和肾病理损伤随之也较明显,这可能是在 SAP 早期易诱发全身炎症反应综合征(SIRS),发生肺和肾功能不全或衰竭的重要原因之一。

2 早期丹参干预的作用 有实验表明丹参注射液具有增加动物肠系膜微血管血流速度、抗凝和抗氧化作用[8,9]。本实验发现使用丹参注射液的动物,胰、肺、肾的 iNOS mRNA 表达均比模型组动物的表达明显下调,血浆中 NO 水平亦显著降低,相应的 3 个器官病理改变也减轻,动物死亡较少,提示丹参具有器官保护效应。其作用机理可能是通过抑制 SAP 时 iNOS mRNA 的过度表达,减少 NO 的生成,从而发挥其器官保护效应的作用;另一方面也有可能是丹参具有抗氧自由基的作用,拮抗 NO 的自由基损伤。本研究结果提示 SAP 早期使用丹参干预能明显抑制胰、肺、肾的 iNOS mRNA 表达,降低早期的 SIRS,从而减轻组织器官的损伤程度,对病变的转归起有益的保护作用。

参 考 文 献

1 石承先,余 舰,杨新华,等.胰管压力对犬胰血流量、胰酶释放及胰组织的影响.贵州医药 1996;20(3):138—139.
Shi CX, Yu J, Yang XH, et al. The influence of pancreatic duct pressure on volume blood flow, pancreatin release and pancreatic tissue in dogs. Guizhou Med J 1996;20(3):138—139.

2 Shi CX, Chen JW, Carati CJ, et al. Effects of acute pancreatic duct obstruction on pancreatic perfusion: implication of acute pancreatic duct decompression. Scand J Gastroenterol 2002;37(11):1328—1333.

3 Al-Mufti RA, Williamson RA, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis. Gut 1998;43(4):564—570.

4 Ayub K, Serraeino Inglott F, Williamsom R, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischemia and reperfusion. Br J Surg 2001;88(9):1189—1193.

5 Viola G, al-Mufti RA, Sohail M, et al. Nitric oxide induction in a rat model of selective pancreatic ischemia and reperfusion. Hepatogastroenterology 2000; 47(35):1250—1255.

6 Schmidt T, Lewandrowski K, Fernandez-Del CC, et al. Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis. Dig Dis Sci 1992;37(9):1426—1433.

7 Alhan E, Kucutulu U, Ercin C. The effects of nitric oxide synthase inhibitors on acute necrotising pancreatitis in rats. Eur J Surg 1998; 164(9): 697—702.

8 吴咸中,田在善主编.证与治则的现代研究.天津:天津科技翻译出版公司,1999:141—156.
Wu XZ, Tian ZS, editors. The modern study on the syndrome and therapeutic principle. Tianjin: Tianjin Science and Techndolgy Translation Publishing Corp, 1999:141—156.

9 黄忠耀,廖崇先,陈道中.丹参对体外循环中肺内氧自由基产生的影响.中国中西医结合杂志 1996;16(8):451—453.
Huang ZY, Liao CX, Chen DZ. Effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on production of free radical products from lung during cardiopulmonary bypass operation. Chin J Integr Tradit West Med 1996;16(8):451—453.

(收稿:2005-04-01 修回:2005-06-30)

万方数据