

乌司他丁联合三七总皂甙对急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华

■背景资料

AP早期即产生大量氧自由基。氧自由基所致胰腺损伤是各种病因所致AP的共同发病环节。AP及全身并发症的发生与氧自由基所致损伤有关。氧自由基在AP发病及转归中起着中心主导地位的作用。凡能清除氧自由基(OFR)的物质都能防止或减轻氧自由基对组织的过氧化损害。

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 刘俊, 430022, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. liujun_99@126.com

收稿日期: 2007-03-12 接受日期: 2007-04-13

Effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis

Hong-Zhi Wang, Jun Liu, Hui Song, Lei Li, Xiao-Hua Hou

Hong-Zhi Wang, Jun Liu, Hui Song, Lei Li, Xiao-Hua Hou, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Jun Liu, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China. liujun_99@126.com

Received: 2007-03-12 Accepted: 2007-04-13

Abstract

AIM: To investigate the effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins (PNS) on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis (AP).

METHODS: Seventy-five Sprague-Dawley rats were divided into five equal groups: group A (sham-operated), B (AP), C (treated with ulinastatin), D (treated with panax notoginseng saponins) and E (treated with ulinastatin combined with panax notoginseng saponins). A rat model of AP was created by retrogression injection of sodium taurocholate through pancreas biliferous ducts. Serum superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in each experimental group were observed at 3, 6 and 12 h.

RESULTS: The level of SOD in group B decreased while the MDA increased. Levels of SOD in groups C and D were higher than that in group B (274.750 ± 14.44 U/L and 281.420 ± 16.48

U/L vs 204.440 ± 14.87 U/L, $P < 0.05$) while the levels of MDA were lower (6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$ and 6.78 ± 0.56 $\mu\text{mol/L}$ vs 9.25 ± 0.22 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). The level of SOD in group E was higher than that in group C (318.360 ± 13.71 U/L vs 274.750 ± 14.44 U/L, $P < 0.05$) while the level of MDA was lower (5.53 ± 0.45 $\mu\text{mol/L}$ vs 6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Ulinastatin in combination with PNS has therapeutic effects on AP by increasing the protective SOD and decreasing the MDA injury factors. The effect is more evident when ulinastatin is combined with PNS than when applied separately.

Key Words: Acute pancreatitis; Oxygen free radicals; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Ulinastatin; Panax notoginseng saponins

Wang HZ, Liu J, Song H, Li L, Hou XH. Effects of ulinastatin combined with panax notoginseng saponins on oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1956-1959

摘要

目的: 探讨乌司他丁、三七总皂甙合用对急性胰腺炎(AP)大鼠氧自由基的影响。

方法: SD大鼠75只, 随机分为A, B, C, D, E5组。A组为假手术组; B组为急性胰腺炎组; C组为乌司他丁治疗组; D组为三七总皂甙治疗组; E组为乌司他丁联合三七总皂甙治疗组。通过胰胆管逆行性注射牛磺胆酸钠制成AP大鼠模型。分别采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法于术后3 h, 6 h, 12 h测定各组大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)浓度。

结果: B组与A组相比大鼠表现为血清SOD降低和MDA升高。术后6 h, C组和D组较B组血清SOD明显升高(274.750 ± 14.44 U/L, 281.420 ± 16.48 U/L vs 204.440 ± 14.87 U/L, $P < 0.05$), MDA明显降低(6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, 6.78 ± 0.56 $\mu\text{mol/L}$ vs 9.25 ± 0.22 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$); E组较

■研究前沿

急性胰腺炎的发病机制十分复杂, 目前临床尚无确切的治疗方法。研究的热点主要集中于胰酶、血液循环、细胞凋亡、核因子- κB 、炎性介质、细胞内信号转导等。氧自由基作为一种重要的炎性介质, 受到越来越多的关注。

C组血清SOD明显升高(318.360 ± 13.71 U/L vs 274.750 ± 14.44 U/L, $P < 0.05$), MDA明显降低(5.53 ± 0.45 $\mu\text{mol/L}$ vs 6.85 ± 0.65 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$); C组与D组相比没有显著差异。

结论: 乌司他丁、三七总皂甙通过升高SOD保护性因子降低MDA损伤性因子, 对AP起治疗作用。而乌司他丁联合三七总皂甙应用具有协同效应。

关键词: 急性胰腺炎; 氧自由基; SOD; MDA; 乌司他丁; 三七总皂甙

王宏志, 刘俊, 宋慧, 李磊, 侯晓华. 乌司他丁联合三七总皂甙对急性胰腺炎大鼠氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1956-1959
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1956.asp>

0 引言

氧自由基(OFR)导致胰腺损伤是各种病因所致急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)的共同发病环节。本研究通过大鼠AP模型, 经尾iv乌司他丁(Ulinastatin)、三七总皂甙(Panax notoginseng saponins, PNS), 动态观察大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、病理改变等, 以判定乌司他丁、三七总皂甙对AP治疗的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 SD δ 大鼠75只(由华中科技大学同济医学院动物中心提供), 体质量200-300 g, 在22℃恒温房内饲养, 标准颗粒混合饲料(由华中科技大学同济医学院动物中心提供)喂养。实验鼠随机分为5组(每组15只): A组, 为假手术组; B组, 为急性胰腺炎组; C组, 为乌司他丁治疗组; D组, 为三七总皂甙治疗组; E组, 为乌司他丁与三七总皂甙合用治疗组。每组又随机分为3个小组(每小组5只): 3 h组、6 h组、12 h组。

1.1.2 药物与试剂 牛磺胆酸钠(美国Sigma公司), 乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司), 三七总皂甙(商品名: 血塞通注射液, 昆明制药股份有限公司), 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 急性胰腺炎模型制备 参照Aho *et al*^[1]的方法制备急性出血坏死型胰腺炎(acute hemorrhagic and necrotizing pancreatitis, AHNP)模型。术前12 h禁食, 自由饮水。采用10 g/L戊巴

表 1 AP时不同时段血清SOD、MDA的变化(mean \pm SD, $n = 5$)

分组	SOD(U/L)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
假手术组3 h	356 150 \pm 14.01	4.70 \pm 0.28
AP组3 h	245 420 \pm 17.73 ^a	7.75 \pm 0.56 ^a
假手术组6 h	365 210 \pm 16.46	4.88 \pm 0.23
AP组6 h	204 440 \pm 14.87 ^a	9.25 \pm 0.22 ^a
假手术组12 h	362 500 \pm 18.11	4.85 \pm 0.42
AP组12 h	175 530 \pm 13.54 ^a	11.12 \pm 0.46 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同时点假手术组。

比妥钠(4 mL/kg)ip麻醉。上腹正中切口进入腹腔, 显露胆总管, 以血管夹阻断近肝门处胆总管后, 用4号头皮静脉针于十二指肠乳头附近经十二指肠壁穿刺, 逆行插入胆总管, 在十二指肠乳头处用手指捏闭胆总管末端。将50 g/L牛磺胆酸钠溶液(0.24 mL/min)注入胆总管, 剂量为1 mL/kg。2 min后松开血管夹, 关腹于背部sc生理盐水(20 mL/kg), 以补充血容量不足。

1.2.2 假手术组 开腹后不进行插管, 仅仅翻动胰腺。其余步骤同上。

1.2.3 治疗组给药方法 急性胰腺炎模型制备成功后20 min, 经尾iv给药, 给予乌司他丁(20 000 U/kg, 浓度为10 000 U/mL)、三七总皂甙(100 mg/kg, 浓度为25 g/L)、合用组(注射乌司他丁10 min后再注射三七总皂甙)。

1.2.4 标本采集 每组大鼠按不同的时间段于术后3 h、6 h、12 h深麻醉后门静脉取血, 装于试管内, 37℃水浴20 min, 随即4℃离心15 min (3000 r/min), 取上清悬液分装于2只EP管中, -20℃冻存。实验结束后, 将大鼠剖腹, 肉眼观察腹水及胰腺炎轻重情况。

1.2.5 检测指标及方法 超氧化物歧化酶(SOD)测定采用黄嘌呤氧化酶法。丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸法(TBA法)试剂盒。

统计学处理 应用SPSS13.0统计软件处理分析。数据均以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 AP时的胰腺病理形态及血清SOD、MDA的变化 腹水: 假手术组无腹水; AP组各时段均有红色或暗红色的混浊腹水, 腹水量均超过6 mL, 并且, 腹水混浊程度和量随时间延长而加重。胰腺大体观察: 假手术组无明显改变; AP组胰腺充血水肿, 可见点片状出血、黑色坏死灶及散在

■创新盘点

乌司他丁、三七总皂甙合用与二者单用相比具有显著的差异性, 说明乌司他丁与三七总皂甙合用, 可以有效提高机体对氧自由基的清除能力, 减轻胰腺组织的损伤。

■应用要点

急性胰腺炎目前在临床尚无确切的治疗方法。本文通过对AP大鼠的实验性治疗,对AP的临床应用有一定的指导意义。

表 2 不同实验组各时段血清SOD含量和MDA含量的变化比较(mean \pm SD, $n = 15$)

分组		3 h	6 h	12 h
SOD(U/L)	B组(AP组)	245 420 \pm 17.73	204 440 \pm 14.87	175 530 \pm 13.54
	C组(乌司他丁组)	296 400 \pm 14.30 ^a	274 750 \pm 14.44 ^a	247 310 \pm 14.43 ^a
	D组(三七总皂甙组)	305 620 \pm 12.57 ^a	281 420 \pm 16.48 ^a	252 630 \pm 13.75 ^a
	E组(合用组)	337 280 \pm 15.26 ^{ac}	318 360 \pm 13.71 ^{ac}	287 420 \pm 14.35 ^{ac}
MDA(μ mol/L)	B(AP组)	7.75 \pm 0.56	9.25 \pm 0.22	11.12 \pm 0.46
	C(乌司他丁组)	6.25 \pm 0.43 ^a	6.85 \pm 0.65 ^a	7.70 \pm 0.56 ^a
	D(三七总皂甙组)	6.03 \pm 0.47 ^a	6.78 \pm 0.56 ^a	7.62 \pm 0.62 ^a
	E(合用组)	5.08 \pm 0.38 ^{ac}	5.53 \pm 0.45 ^{ac}	6.15 \pm 0.52 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 同时点B组; ^c $P < 0.05$ vs 同时点C、D组。

的皂化斑,病理改变随时间延长而加重。胰腺光镜观察:假手术组无明显改变;AP组胰腺间质水肿,红细胞漏出,腺泡细胞水肿,灶性坏死,部分腺导管扩张,点片状出血坏死,炎细胞浸润。AP组与同时点假手术组相比,血清SOD水平降低($P < 0.05$),血清MDA水平升高($P < 0.05$,表1)。

2.2 乌司他丁、三七总皂甙及两药合用对AP大鼠病理形态及血清SOD、MDA的影响 腹水:AP组为暗红色混浊腹水,量均在6 mL以上;治疗组腹水量明显减少,量约3 mL左右,混浊程度明显低于AP组。胰腺大体观察:AP组胰腺均充血水肿,可见点片状出血坏死、黑色坏死灶及散在皂化斑;治疗组病理改变明显减轻。

各治疗组与同时点AP组相比,血清SOD水平平均明显升高($P < 0.05$),血清MDA水平平均明显降低($P < 0.05$)。乌司他丁治疗组与三七总皂甙治疗组同时点相比,血清SOD、MDA水平无明显改变($P > 0.05$)。乌司他丁、三七总皂甙合用组与乌司他丁治疗组、三七总皂甙治疗组同时点相比,血清SOD水平平均明显升高($P < 0.05$),血清MDA水平平均明显降低($P < 0.05$,表2)。

3 讨论

急性胰腺炎的发病机制极为复杂,尚未完全阐释清楚。目前已知胰酶、炎性介质、胰腺血液循环紊乱、细胞凋亡等因素参与了急性胰腺炎的发生、发展。其中,氧自由基与急性胰腺炎的发病以及胰腺炎时胰外脏器的损伤均有密切关系。研究表明,多种原因诱发的AP均有氧自由基的产生^[2]。Urunuela *et al*^[3]通过结扎胰管(PDO)诱导急性大鼠胰腺炎模型,并用二氢若丹(dihydrorhodamine-123)荧光染色检测胰腺细胞内氧自由基,发现大鼠急性胰腺炎在6 h、12 h氧自由基显著升高,表明急性胰腺炎早期即产

生大量氧自由基。氧自由基在急性胰腺炎组织的损伤过程中起着重要的介导作用,氧自由基所致胰腺损伤是各种病因所致胰腺炎的共同发病环节。而氧自由基的产生主要发生于胰腺缺血后。同时,氧自由基还参与了急性胰腺炎并发肝、肾、肺损害的病理过程。胰腺血流量和微循环灌注量减少导致的微循环障碍可促使水肿性AP转变为重症急性胰腺炎(SAP)^[4]。

王兴鹏 *et al*报道,氧自由基增多引起的组织损伤可能与两方面因素有关:(1)脂质过氧化损伤:氧自由基与膜内多价不饱和脂肪酸结合,形成多种脂质过氧化物(LPO),导致细胞膜多价不饱和脂肪酸与蛋白质比例失调,影响膜通透性,并可使钙离子大量内流,线粒体和溶酶体膜被破坏,最后造成细胞死亡;(2)共价键结合性损伤:氧自由基作用于含巯基的氨基酸,使蛋白质变性和失活,作用于辅基使辅酶活性下降。^[5] SOD活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力。MDA的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,因此,MDA的高低可以间接反映机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。乌司他丁是从人尿中提取精制而成的糖蛋白,是一种广谱的酶抑制剂,可抑制磷脂酶A₂(PLA₂)、胰淀粉酶、弹性蛋白酶及纤溶酶等的活性,同时可稳定溶酶体膜,抑制溶酶体酶和心肌抑制因子的产生,抑制炎症介质的释放。秦仁义 *et al*^[6]报道,重症急性胰腺炎大鼠模型给予乌司他丁后,血清中肿瘤坏死因子、淀粉酶、氧自由基、一氧化氮明显下降,并显著降低重症急性胰腺炎实验动物的死亡率。乌司他丁作为一种高效广谱的酶抑制剂,阻断了蛋白酶所介导的中性粒细胞在肺内的聚集,抑制了中性粒细胞溶酶体酶活性和吞噬作用,从而减轻了炎性介质与氧自由基的释放,有效制约了

酶、细胞因子、氧自由基级联反应所形成的恶性循环和放大效应^[7]。三七总皂甙是五加科植物三七的提取物, 具有活血祛瘀, 通脉活络的功效, 其药理机制与扩张血管、改善微循环、保护组织抗氧化能力、抑制脂质过氧化反应、减少钙离子内流、影响自由基生成等有关。三七总皂甙不仅具有清除自由基的作用, 而且也有钙通道阻断作用^[8]。王学梅 *et al*^[9]研究表明, 三七皂苷能有效地清除超氧自由基(O_2^-)、羟自由基(OH^\cdot), 其中以清除 OH^\cdot 较为显著。罗伟 *et al*^[10]研究表明, 三七总皂甙具有较强的抗氧自由基损伤和抗脂质过氧化损伤作用, 其作用机制可能在于其一方面减少氧自由基的产生, 一方面通过激活抗氧化酶SOD活性, 抑制氧自由基, 降低脂质过氧化物, 从而发挥抗脂质过氧化损伤的作用。

研究表明, 与对照组相比, 乌司他丁、三七总皂甙二者单用与合用均可升高各组SOD水平及降低各组MDA水平, 并明显减轻AP所导致的病理损害。而乌司他丁、三七总皂甙二者合用与二者单用相比具有显著的差异性, 说明乌司他丁与三七总皂甙合用, 可以有效提高机体对氧自由基的清除能力, 减轻胰腺组织的损伤, 延长急性胰腺炎大鼠的生存时间。本结果显示, 乌司他丁与三七总皂甙合用具有协同作用, 比单独使用乌司他丁或三七总皂甙效果好。

4 参考文献

- 1 Aho HJ, Nevalainen TJ, Lindberg RL, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. The role of phospholipase A in sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 1027-1031
- 2 范学良, 李永渝, 葛树培. 大鼠实验性急性胰腺炎时观察血浆和组织脂质过氧化物的变化. *中国病理生理杂志* 1991; 7: 430-433
- 3 Urunuela A, Sevillano S, de la Mano AM, Manso MA, Orfao A, de Dios I. Time-course of oxygen free radical production in acinar cells during acute pancreatitis induced by pancreatic duct obstruction. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588: 159-164
- 4 Plusczyk T, Witzel B, Menger MD, Schilling M. ETA and ETB receptor function in pancreatitis-associated microcirculatory failure, inflammation, and parenchymal injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G145-153
- 5 袁耀宗. 消化系统疾病临床新技术. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 169
- 6 秦仁义, 王春友, 邹声泉. 乌司他丁治疗急性胰腺炎的实验及临床研究. *中国普通外科杂志* 2001; 10: 292-295
- 7 谭朝华, 徐军美, 杨昭云, 杨东林, 吕志平. 乌司他丁对急性肺损伤兔炎症细胞因子及氧自由基的影响. *中国医师杂志* 2004; 6: 1360-1362
- 8 Guan YY, Kwan CY, He H, Sun JJ, Daniel EE. Effects of Panax notoginseng saponins on receptor-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1994; 15: 392-398
- 9 王学梅, 戴云, 张建圣, 高云涛. 分光光度法测定三七皂苷清除活性氧自由基的研究. *云南中医中药杂志* 2006; 27: 41-42
- 10 罗伟, 田明, 张新, 李保东. 三七总甙对高血压病患者氧自由基及红细胞流变性的影响. *安徽中医临床杂志* 2000; 12: 369-371

■同行评价

本文工作细致, 材料和方法较成熟, 对急性胰腺炎的治疗有一定临床意义。

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。