

白藜芦醇联合乌司他丁治疗急性胰腺炎的疗效分析

刘 涵¹ 王春全² 朱崇涛³ 何中林² 刘明华^{1△}

(1 第三军医大学西南医院急诊科 重庆 400038 ;2 重庆市第九人民医院 ICU 重庆 400700 ;

3 成都军区昆明总医院 云南 昆明 650032)

摘要 目的 观察白藜芦醇联合乌司他丁对大鼠急性胰腺炎(AP)的治疗效果。方法 将 250 只雄性 Wister 大鼠随机分为 5 组,分别为假手术(A)组、急性胰腺炎组(B 组)、白藜芦醇组(C 组)、乌司他丁组(D 组)和白藜芦醇联合乌司他丁治疗组(C+D 组)。制备各组 AS 大鼠模型,观察各组腹水量及血淀粉酶、脂肪酶、TNF- α 、NF- κ B、丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)水平,并观察胰腺病理改变。结果 B 组与 A 组相比, SOD 水平明显降低($P<0.05$), MDA 水平明显升高($P<0.05$), C、D 及 C+D 组与 B 组相比,血清 SOD 水平明显升高($P<0.05$), MDA 水平明显降低($P<0.05$), C+D 组与 C 组、D 组相比,血清 SOD 水平明显升高($P<0.05$),血清 MDA 水平明显降低($P<0.05$)。与 B 组比较, C 和 D 组血淀粉酶、脂肪酶、TNF- α 、病理学评分均降低,细胞超微结构损伤减轻,有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。C+D 组上述指标改善较 C 组和 D 组更明显,差异有显著性($P<0.05$)。结论 乌司他丁、白藜芦醇通过升高 SOD 保护性因子、降低 MDA 损伤性因子,对急性胰腺炎有治疗作用,尤其在乌司他丁与白藜芦醇合用时效果更显著。

关键词 白藜芦醇;乌司他丁;急性胰腺炎

中图分类号 R657.51 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)11-2090-04

Resveratrol and Ulinastatin for Acute Pancreatitis

LIU Han¹, WANG Chun-quan², ZHU Chong-tao³, HE Zhong-lin², LIU Ming-hua^{1△}

(1 Emergency department, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

2 Department of ICU, The ninth People Hospital of Chongqing, Chongqing 400700;

3 KunMing General Hospital, Kunming, 650032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the therapeutic effects of resveratrol and ulinastatin on acute pancreatitis (AP) of rats. **Methods:** A total of two hundred and fifty male Wister rats were randomly divided into sham group(A group), AP model group(B group), resveratrol (C group), ulinastatin group (D group) and resveratrol combined with ulinastatin group (C+Dgroup). Plasma concentrations of amylase and lipase, tumor necrosis factor- α (TNF- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B), blood levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined. The pathological changes of pancreas were studied under light and electron microscopes. **Results:** SOD activity was decreased and the concentrations of amylase, lipase, TNF- α , MDA level in AP rats, while the pathological change of pancreas was severe. Compared with B group, the plasma concentrations of amylase and lipase, TNF- α , the pathological scores and MDA in C group and D group were decreased, while SOD activity was increased and ultrastructural injury was markedly attenuated; **Conclusion:** Resveratrol combined with ulinastatin is more effective than either of them used alone in treatment of severe AP.

Key words: Resveratrol; Ulinastatin; Acute pancreatitis

Chinese Library Classification(CLC): R657.51 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2090-04

前言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种常见的严重消化系统急腹症,其发病率在近年有明显增多的趋势^[1],因其具有起病急、并发症多,病死率高等特点,若治疗不及时,可引发 MODS,甚至死亡。近年来有研究证实氧自由基(oxygen free radicals, OFR)和各种酶对胰腺自身的消化作用与 AP 的发生发展有密切关系。白藜芦醇^[2-3](resveratrol, Res)是一种自由基清除

剂,有降低自由基的活性和干扰氧化代谢的作用。乌司他丁是蛋白酶抑制剂,对多种蛋白水解酶和淀粉酶、脂肪酶等糖类及磷脂酶 A2 等脂类水解酶有明显的抑制作用。本研究通过建立大鼠 AP 模型,采用白藜芦醇联合乌司他丁治疗急性胰腺炎,为进一步研究急性胰腺炎的治疗策略奠定理论基础。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 Wistar 大鼠 250 只,体重 250-300g,第三军医大学实验动物中心提供。置于实验环境中 1 周,室温 18-22℃。

1.2 实验动物分组

作者简介 刘涵(1979-)男,学士,主要研究方向 危重病基础与临床。电话 023-68773047, E-mail:18436572@qq.com

△通讯作者 刘明华 教授,主任医师,电话 023-68773047,

E-mail:jjbicu@sohu.com

(收稿日期 2011-03-23 接受日期 2011-04-18)

将 250 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 5 组，分别为假手术(A)组、急性胰腺炎组(B 组)、白藜芦醇组(C 组)、乌司他丁组(D 组)和白藜芦醇联合乌司他丁治疗组(C+D 组)。每组 50 只。

1.3 大鼠 ASP 模型的制作

参照经典 ASP 模型制作动物模型，动物于术前 12h 禁食，自由饮水，戊巴比妥溶液 22mg/kg 行腹腔内麻醉、固定。经上腹正中切口入腹，提起十二指肠以小号血管夹分别夹住十二指肠段和肝门部胰胆管。在肝门处用 TB 针（4.5 号针头，1mL 注射器）穿刺胰胆管，注射牛黄胆酸钠 50mg/kg，持续 1min，停留 5min，然后拔出针头，去除血管夹。观察到大鼠胰腺组织明显水肿、出血，缝合腹壁各层。此时造模成功。A 组打开腹腔，翻动胰腺组织后关腹。B 组不给予任何处理。C 组于术后 5min 将 10g/L 的白藜芦醇溶液通过阴茎背静脉给药。D 组乌司他丁（900U/100g）治疗，C+D 组同时给予白藜芦醇和乌司他丁联合治疗。各组均在手术结束时以 10mL/kg 一次性皮下注射 8.5g/L 氯化钠液于大鼠背部，以补充术后大鼠水分。

1.4 观察指标

术后 12h，开腹采血致死。

1.4.1 一般观察 观察腹水性状。

1.4.2 酶学测定 血淀粉酶、脂肪酶活性和肿瘤坏死因子-α（TNF-α）含量血标本置于按比例加入肝素及消炎痛乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝剂的试管中，并立即于 4℃ 下 3000 r/min 离心 15min，分离血浆和血清，分装于 4 只离心管中，20℃ 保存。淀粉酶测定采用 α 淀粉酶测定试剂盒，以 EPS 速率法测定。脂肪酶用酶显色法测定。TNF-α 采用酶联免疫吸附法（ELISA）检测，方法按试剂盒（Endogen 产品）说明书进行。

1.4.3 MDA 和 SOD 测定 处死后立即取胰腺、肝、肾、肺、小肠

壁组织制成匀浆，采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD，硫代巴比妥酸（TBA）比色分析法测定 MDA。

1.4.4 病理形态学观察 动物处死后，取胰腺、肝、肺、肾、小肠组织，甲醛固定，石蜡包埋切片，苏木精 / 伊红（HE）染色，光镜下观察。并参照 kusske 法进行胰腺组织病理评分，按照水肿、炎症、出血、坏死程度，进行盲法评分，计分为 0-4 分。

1.4.5 NF-κ B 免疫组化染色 参照 SABC 试剂盒说明书行免疫组化染色，测定 NF-κ B 活性水平，胰腺细胞质和胞核染有棕黄色颗粒为阳性，以每高倍视野下阳性细胞所占细胞总数的百分率为阳性率。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验进行组间比较。病理损伤积分采用 H 检验 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 腹水及器官大体病理学观察

术后 12h，A 组腹腔内可见少量淡黄色腹水，胰腺轻度水肿，模型组、治疗组均可见淡红色腹水，C 组和 D 组大鼠腹水量明显减少，浑浊程度减轻，散在皂化斑减少。C+D 组较 C 组和 D 组病理损伤程度更轻。假手术组胰腺的外观未见明显异常，模型组、治疗组胰腺均可见胰体弥漫性肿胀，浆膜下可见出血斑，胰周少许皂化斑形成。肝、肾、肺、小肠外观各组未见明显异常。AP 组大鼠各项病理组织学评分较正常组均明显升高。给予白藜芦醇和乌司他丁治疗后各项病理组织学评分下降，C+D 组各项病理组织学评分低于 C 组和 D 组（P 均 < 0.05），提示白藜芦醇和乌司他丁联用对于胰腺病理学损伤的减轻作用更为显著，结果见表 1。

表 1 各组大鼠腹水量及胰腺病理学评分

Table 1 The amount of ascites and pancreatic pathological score of each group

Group	n	Ascites (ml)	Pancreatic Pathological Score
A	50	1.25± 0.44	2.57± 0.25
B	50	5.12± 0.71#	11.57± 0.61#
C	50	3.54± 0.45*	8.25± 0.56*
D	50	3.47± 0.39*	7.04± 0.47*
C+D	50	1.89± 0.36*	4.03± 0.37*

Note : #P<0.05 compared with control group ,*P<0.05 compared with B group

2.2 血淀粉酶、脂肪酶、TNF-α 变化

C 组和 D 组血淀粉酶、脂肪酶及 TNF-α 水平较 B 组均下

降，差异具有显著性（P 均 < 0.05）。C+D 组下降更明显，与 B 组、C 组和 D 组间差异均有显著性（P 均 < 0.05）。具体结果见表 2。

表 2 各组大鼠血淀粉酶、脂肪酶及 TNF-α 水平

Table 2 Comparison of amylase, lipase and TNF-α in serum of each group

Group	n	amylase (U/L)	lipase (U/L)	TNF-α (ng/L)
A	50	905.5± 201.3	135.6± 25.4	12.3± 3.2
B	50	2703.2± 301.5#	403.1± 54.2#	39.5± 5.1#
C	50	1765.3± 215.4*	297.5± 37.2*	27.6± 4.9*
D	50	1694.2± 197.5*	284.3± 40.1*	26.5± 5.7*
C+D	50	1013.4± 187.3*	189.6± 48.2*	19.9± 4.8*

Note : #P<0.01 compared with control group ,*P<0.05 compared with B group

2.3 两药合用对 AP 大鼠血清 SOD、MDA 的影响

各治疗组与同时相点 AP 组相比,血清 SOD 水平明显升高($P<0.05$) ,血清 MDA 水平均明显降低($P<0.05$)。乌司他丁治疗组与白藜芦醇组与模型组相比,血清 SOD、MDA 水平明显

改变($P<0.05$)。乌司他丁、白藜芦醇合用组与乌司他丁治疗组、白藜芦醇治疗组同时点相比,血清 SOD 水平均明显升高($P<0.05$) ,血清 MDA 水平均明显降低($P<0.05$) (见表 3)。

表 3 不同实验组血清 SOD、MDA 含量的变化比较
Table 3 Comparison of SOD and MDA in serum of each group

Group	n	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
A	50	385± 20.3	5.3± 0.9
B	50	165.8± 19.5#	13.4± 1.5#
C	50	278.5± 34.8*	8.6± 1.4*
D	50	259.3± 29.7*	7.8± 0.8*
C+D	50	351.2± 34.2*	6.2± 0.7*

Note : # $P<0.01$ compared with control group ;* $P<0.05$ compared with B group

2.4 NF- κ B 免疫组化染色

高倍镜下可见 A 组阳性染色主要位于胞浆,细胞核基本不着色 ;B 组有深染的 NF- κ B 阳性细胞,其染色以细胞核为主,染色重,胞核轮廓清晰,胞浆可见少量着色 ;C 组、D 组和 C+D 组细胞核及胞浆 NF- κ B 染色较 B 组明显变淡,细胞轮廓不清。

3 讨论

急性胰腺炎是由于胰酶对胰腺的自我消化,对其周围组织的消化,从而继发一系列的器官的功能障碍。在病程早期,即存在全身性炎症反应,单核 / 巨噬细胞激活,大量胰酶激活,胰腺坏死产物诱导氧自由基释放,活化 NF- κ B,导致大量促炎介质释放,引起粒细胞活化、释放氧自由基,形成黏附级联反应使胰腺毛细血管后微静脉中大量白细胞与内皮细胞黏附、小静脉血流淤滞、血流阻力增加,加重组织缺血、缺氧,提高了胰腺的可消化性,导致局部及全身损害^[4,5]。

白藜芦醇又称芪三酚,是植物体内具有抵抗病原侵犯作用的一种二苯乙烯芪类多酚物质^[6]。具有 NF- κ B 活化的调节和抗氧化等作用^[7,8]。作为一种抗氧化剂,白藜芦醇可清除自由基和干扰氧化代谢^[9],在炎症治疗中具有重要作用。研究表明:白藜芦醇在一定范围内对过氧化氢所致的小鼠肝细胞氧化损伤有明显的抗氧化作用,能提高肝细胞的 SOD 和 GSH-PX 活性,减少 GSH 的消耗,降低 MDA 含量,从而减轻氧化物对肝细胞的损害,此研究表明白藜芦醇可通过抗氧化保护 MODS 脏器的功能。在重症急性胰腺炎疾病进程中,NF- κ B 活化是炎症反应和细胞凋亡反应的早期事件。NF- κ B 是一类能与多种细胞基因的启动子或增强子 κ B 位点发生特异性结合并启动基因转录的蛋白质,可调节多种炎症介质的表达^[10]。本实验中,我们选用白藜芦醇对大鼠重症急性胰腺炎早期进行治疗,并于术后 12h 时测定各组 NF- κ B 活化阳性率情况,发现 C 组和 C+D 组的 NF- κ B 阳性率均明显低于其他组,差异有统计学意义($P<0.05$) ,提示白藜芦醇能够抑制 NF- κ B 活性。而且,随着治疗后 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症介质的表达水平也相应下降。与此同时,大鼠胰腺和其他脏器的损害程度也明显减轻、大

鼠腹水量减少、死亡率也随之下降^[11-14]。这提示白藜芦醇可以通过降低炎症介质水平,阻断 AP 过程中炎症介质释放的级联反应,从而达到治疗 AP 的作用。

血浆 MDA 通过反映体内过氧化程度即氧自由基水平来间接反映细胞损伤程度,MDA 是脂质过氧化的终产物之一,其下降反映脂质过氧化的减少,提示白藜芦醇减轻大鼠各器官组织病理损害,可通过减轻脂质过氧化物对器官组织损伤而发挥作用。本研究表明治疗组大鼠各器官 MDA 水平下降,器官组织病理改变减轻。AP 组 SOD 降低而 MDA 升高,SOD 水平与淀粉酶、脂肪酶水平呈反比而 MDA 与其呈正比。表明 AP 机体氧自由基明显升高而清除能力下降。

乌司他丁是从健康成年男性新鲜尿液中提取的一种糖蛋白,是一种蛋白酶抑制剂,对多种蛋白水解酶和淀粉酶、脂肪酶等糖类及脂类水解酶均有明显抑制作用,还有稳定溶酶体膜、抑制溶酶体酶释放、减少细胞因子的产生、抑制炎症介质释放的作用。乌司他丁还可以调节血管内皮细胞的功能,改善微循环并可减轻组织损伤,减少心肌抑制因子的产生,对阻断休克的发生和发展具有重要作用^[15]。黄文峰等研究认为,其治疗胰腺炎的作用可能与其能纠正细胞代谢障碍和血液动力学紊乱的作用有关,从而阻止各种胰酶启动的全身炎症反应综合征。黄福利等^[9]的研究也显示乌司他丁能有效调控患者血浆细胞因子水平,通过上调抗炎因子和下调促炎因子抑制过度的炎症级联反应,对 SIRS 有较好的治疗效果。秦仁义等^[16]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。

本研究表明,与对照组相比,乌司他丁、白藜芦醇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、白藜芦醇二者合用与二者单用相比具有显著的差异性,说明乌司他丁与白藜芦醇合用,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。本结果显示,乌司他丁与白藜芦醇合用具有协同作用,比单独使用乌司他丁或白藜芦醇效果更好。但其在临床中的实际应用亟待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Kong L, Santiago N, Han TQ, et al. Clinical characteristics and prognostic factors of severe acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (22): 3336-3338
- [2] Meng Y, Zhang M, Xu J, et al. Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (3):433-435
- [3] 李震东, 马清涌, 徐军等. Fas 和 FasL 在急性胰腺炎中的共表达及其与凋亡的关系[J]. J South Med Univ, 2006, 26 (1):25-28
Li Zhen-dong, Ma Qing-yong, Xu Jun, et al. Colocalized expression of Fas and Fas-Ligand in acute pancreatitis and its correlation with cell apoptosis[J]. J South Med Univ, 2006, 26 (1):25-28
- [4] 陈靖华, 陈垦, 王晖. 急性胰腺炎的发病机制研究进展[J]. 世界华人消化杂志 2009, 24:121
Chen Jing-hua, Chen Ken, Wang Hui. Advances in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. World Chinese Journal of Digestology 2009, 24: 121
- [5] 夏芹, 房林. 细胞因子在急性胰腺炎发病中的作用 [J]. 同济大学学报(医学版), 2010, (02): 435
Xia Qin, Fang Lin. The effects of cytokine in acute pancreatitis [J]. Journal of Tongji University(Medical Science)
- [6] Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol [J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 3 (6):1041-1042
- [7] AGGARWAL BB, BHARDWAJ A, AGGARWAL RS, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies[J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A): 278-284
- [8] Donnelly LE, Newton R, Kennedy GE, et al. Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: Molecular mechanisms[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(4): L774-783
- [9] 黄福利. 乌司他丁对急性重症胰腺炎患者血清 IL26、TNF2 α 水平及肝肾功能的影响[J]. 山东医药, 2009, 49(43):84-85
- [10] Abrahame. NF- κ B activation [J]. Crit Care Med, 2000, 28 (4 Suppl): N100-104
- [11] MENG Y, MA QY, KOU XP, et al. Effect of resveratrol on activation of nuclear factor κ B and inflammatory factors in rat model of acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(4): 525-528
- [12] Meng Y, Liu XM, Ma QY, et al. Effect of resveratrol on microcirculation disorder and lung injury following severe acute pancreatitis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (3):433-435
- [13] 沙焕臣, 马清涌, JHARK. 白藜芦醇对重症急性胰腺炎大鼠肝脏的保护作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 30(1):529
Sha Huan-chen, Ma Qing-yong. The protective effect of resveratrol on the hepatic injury in rats with severe acute pancreatitis [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2008, 30(1):529
- [14] 秦勇, 马清涌, 党晓燕. 白藜芦醇对早期重症急性胰腺炎大鼠多器官组织氧自由基的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2007, 28 (5):572-574
Qin Yong, Ma Qingyong, Dang Xiaoyan. Effect of resveratrol on oxygen free radicals of multiple organs in rats with severe acute pancreatitis of early stage [J]. Journal of Xi'an Jiaotong University(Medical Sciences), 2007, 28 (5):572-574
- [15] 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(4):228
Shao Yiming, Zhang Liangqing, Deng Liehua, et al. Clinical study on effects of ulinastatin on patients with systemic inflammatory response syndrome[J]. Chinese Critical Care Medicine, 2005, 17(4):228
- [16] 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[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(4):292-295
Qin Ren yi, Wang Chun you, Zou Sheng quan. Clinical and experimental studies on ulinastatin in the treatment of acute pancreatitis[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2001, 10(4):292-295