

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.22.004

川芎嗪防治大鼠重症急性胰腺炎肾损伤机制研究

牟燕飞¹, 穆小松¹, 唐显军¹, 杨燕¹, 胡敏^{2△}

(1. 重庆大学附属肿瘤医院·重庆市肿瘤研究所·重庆市肿瘤医院, 重庆 400030; 2. 中国人民解放军第三二四医院, 重庆 400020)

摘要:目的 探讨川芎嗪能否通过调节细胞凋亡和炎性介质的释放防治大鼠重症急性胰腺炎(SAP)肾损伤。方法 将84只健康雌性大鼠随机均分为对照组、SAP组、川芎嗪组,各28只。对照组开腹后翻动胰腺,即关闭腹腔;SAP组建立SAP动物模型;川芎嗪组在SAP建模成功后注射川芎嗪注射液。分析3组大鼠不同时间点的腹腔积液量、胰腺组织病理评分、炎性介质、肾损伤相关指标及肾脏组织细胞凋亡指数。结果 对照组无明显腹腔积液聚积;SAP组术后6,12,24,48 h腹腔积液呈逐渐增多趋势,且显著多于川芎嗪组($P < 0.05$);对照组的胰腺组织在各个时间点均无明显病理损害,SAP组术后48 h的水肿、炎症、出血、坏死评分均明显大于川芎嗪组($P < 0.05$);SAP组术后6,12,24,48 h的白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)均显著高于对照组,且术后24,48 h显著高于川芎嗪组($P < 0.05$);SAP组术后6,12,24,48 h的淀粉酶、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(Cr)均显著高于对照组,川芎嗪组术后12,24,48 h的淀粉酶、BUN、Cr显著高于对照组($P < 0.05$);川芎嗪组6,12,24,48 h的肾脏组织细胞凋亡指数显著低于SAP组,但明显高于对照组($P < 0.05$)。结论 川芎嗪能有效改善细胞凋亡与炎性介质的释放,从而保护大鼠的胰腺组织,降低肾损伤。

关键词:川芎嗪;细胞凋亡;炎性介质;重症急性胰腺炎;肾损伤

中图分类号:R965;R692

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)22-0011-03

Mechanism of Ligustrazine in Preventing and Treating Renal Injury in Rats with Severe Acute Pancreatitis

Mu Yanfei¹, Mu Xiaosong¹, Tang Xianjun¹, Yang Yan¹, Hu Min²

(1. Cancer Hospital Affiliated to Chongqing University, Chongqing Cancer Institute, Chongqing Cancer Hospital, Chongqing, China 400030; 2. 324 Hospital of PLA, Chongqing, China 400020)

Abstract: Objective To investigate whether ligustrazine can protect renal injury in rats with severe acute pancreatitis(SAP) by regulating the cell apoptosis and the release of inflammatory mediators. **Methods** Totally 84 healthy female rats were randomly divided into the control group, SAP group, ligustrazine group, 28 cases in each group. In the control group, laparotomy were performed, the pancreas was flipped only, and then the abdominal cavity was closed. SAP model was made in the SAP group, based on this, the ligustrazine group received Ligustrazine Injection. The amount of ascites, histopathological scores of pancreas, inflammatory mediators, renal injury-related indicators, and renal cell apoptosis indexes at different times were analyzed in the three groups. **Results** The control group had no significant accumulation of ascites. At the postoperative 6, 12, 24, 48 h, the amount of ascites showed a increasing trend in the SAP group, and which was significantly higher than that of the ligustrazine group($P < 0.05$). The pancreatic tissue in the control group had no obvious pathological lesions at all time points. The scores of edema, inflammation, hemorrhage and necrosis at postoperative 48 h in the SAP group were significantly higher than those in the ligustrazine group($P < 0.05$). The levels of IL-6, IL-10 and TNF- α at postoperative 6, 12, 24, 48 h in the SAP group were significantly higher than those in the control group, and the above levels at the postoperative 24, 48 h in the SAP group were significantly higher than those in ligustrazine group($P < 0.05$). The levels of amylase, BUN and Cr at the postoperative 6, 12, 24, 48 h in the SAP group were significantly higher than those in the control group, and the above levels at the postoperative 12, 24, 48 h in the ligustrazine group were significantly higher than those in the control group($P < 0.05$). The apoptotic index of renal tissue in the ligustrazine group was significantly lower than that in the SAP group at postoperative 6, 12, 24, 48 h, but which was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** Ligustrazine can effectively improve the cell apoptosis and the release of inflammatory mediators, so as to protect rat pancreas tissue and reduce renal injury.

Key words: ligustrazine; cell apoptosis; inflammatory mediators; severe acute pancreatitis; renal injury

重症急性胰腺炎(SAP)属急性胰腺炎(AP)的特殊类型,占AP的10%~20%,具有病情发展迅速、并发症多、病死率高的特点,其发生、发展与抗炎因子、促炎因子、蛋白酶及蛋白酶抑制剂、细胞凋亡等密切相关^[1-2]。李聘等^[3]研究发现,AP患者的胃肠道、血清中存在的大

量炎性介质,参与了SAP发生与演变的整个过程,并可使单核巨噬细胞、中性粒细胞及内皮细胞过度激活,而引起体内废物、毒物代谢异常,导致肾脏损伤和加重微循环障碍。因此,改善微循环和抑制炎性介质的释放对SAP至关重要。目前很多学者提出,川芎嗪具有钙通

第一作者:牟燕飞,女,大学本科,主治医师,研究方向为肿瘤的防治,(电子信箱)26850922@qq.com。

△通信作者:胡敏,女,大学本科,主治医师,研究方向为肾病的防治,(电子信箱)148454559@qq.com。

道阻滞剂的作用,可有效阻滞细胞外钙内流,抑制炎性介质释放,改善细胞凋亡与微循环障碍^[4]。基于此,本研究中将川芎嗪用于SAP模型大鼠的治疗中,以观察川芎嗪能否通过调节细胞凋亡和炎性介质的释放而防治大鼠SAP导致的肾损伤。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

84只健康雌性SD大鼠,体质量180~260g(四川省医学实验中心)。7170A型全自动生化分析仪(日本日立公司);DG5031型酶联免疫检测仪(上海医疗仪器设备厂)。川芎嗪注射液(遂成药业股份有限公司,国药准字H20043412,规格为每支2mL:40mg);牛磺胆酸钠(上海研生实业有限公司);原位细胞凋亡、白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等试剂盒均购自上海心语生物科技有限公司。

1.2 方法

将84只大鼠随机均分为对照组、SAP组、川芎嗪组,各28只。所有大鼠均禁食但不禁饮12h,后用2.5%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉。对照组开腹后翻动胰腺,即缝合关闭腹腔。SAP组大鼠上腹正中切口进腹,提起胃、十二指肠,找到胰管开口,于开口下15mm处切开十二指肠,并置入无菌塑料管;分别结扎胰管开口远端、近端,以形成20mm左右的十二指肠闭袢;向闭袢内注入5%牛磺胆酸钠0.3mL,使整个胰腺均匀隆起后退出针头;5~10min见胰腺出现肉眼可见的水肿出血,则表示SAP动物模型建模成功,随即缝合关闭腹腔。川芎嗪组在动物模型制作成功后,立即给予0.6%川芎嗪注射液,腹腔注射,用量为每100g体质量1mL。对照组、SAP组给予等量生理盐水腹腔注射。

于术后6,12,24,48h相应时间点每组各随机选取

5只大鼠处死,开腹观察胰腺和肾脏形态,吸取腹腔积液并计量,观察其颜色与浑浊度。取胰腺组织以10%福尔马林溶液固定,行苏木素-伊红(HE)染色。取左肾组织迅速置液氮中,-80℃保存。经心脏穿刺采血4mL,室温下静置30min凝固后,4℃下以3000r/min的速率离心10min,-20℃保存。

1.3 观察指标

测定不同时间的腹腔积液量;胰腺组织病理评分:将经福尔马林溶液固定的胰腺组织按常规流程进行石蜡包埋、切片,HE染色,光镜下观察,并根据Kusske法^[15]进行病理评分;炎性介质:将-20℃保存的标本于室温复融,根据IL-6,IL-10,TNF- α 试剂盒说明分别配置标准品,再使用DG5031型酶联免疫检测仪进行检测;肾损伤相关指标:取500 μ L血清,用全自动生化分析仪检测淀粉酶、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr);肾脏组织细胞凋亡指数:参照原位细胞凋亡试剂盒说明书进行检测,显色使用DAB试剂盒进行。在光镜下,肾脏细胞核中有棕黄色颗粒即为阳性细胞,在阳性表达分布区域、200倍光镜下随机选择5个无重叠视野,计数阳性细胞。细胞凋亡指数(AI)为凋亡阳性细胞数占总细胞数的百分比。

1.4 统计学处理

全部数据初步以EpiData 3.1软件校正,采用SPSS 22.0统计学软件进行处理。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表1至表5。

3 讨论

SAP的发展常累及机体多个重要脏器,并伴大量炎性介质的释放,可在较短时间内引发瀑布样级联反应,

表1 3组大鼠胰腺组织病理评分、炎性介质及肾损伤相关指标比较($\bar{X} \pm s, n=5$)

组别	胰腺组织病理评分(分)				炎性介质(pg/mL)			肾损伤相关指标		
	水肿	炎症	出血	坏死	IL-6	IL-10	TNF- α	淀粉酶(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)
对照组										
术后6h	0	0	0	0	27.65 $\pm$ 4.75	108.15 $\pm$ 3.84	34.37 $\pm$ 4.25	1127.85 $\pm$ 94.78	3.43 $\pm$ 1.02	35.34 $\pm$ 5.21
术后12h	0.34 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.05	0	0	36.14 $\pm$ 4.84	113.48 $\pm$ 4.06	41.12 $\pm$ 3.92	1185.64 $\pm$ 101.82	4.32 $\pm$ 1.01	38.54 $\pm$ 6.29
术后24h	0.41 $\pm$ 0.10	0.23 $\pm$ 0.08	0	0	41.52 $\pm$ 5.01	125.72 $\pm$ 4.11	48.25 $\pm$ 4.14	1211.63 $\pm$ 105.60	5.11 $\pm$ 1.08	42.19 $\pm$ 6.54
术后48h	0.46 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.06	0	0	52.29 $\pm$ 5.20	134.31 $\pm$ 4.33	53.27 $\pm$ 4.27	1252.23 $\pm$ 106.75	5.83 $\pm$ 1.04	46.28 $\pm$ 4.69
SAP组										
术后6h	2.85 $\pm$ 0.74 ^a	2.61 $\pm$ 0.82 ^a	2.66 $\pm$ 0.87 ^a	2.63 $\pm$ 0.83 ^a	39.36 $\pm$ 5.68 ^a	902.33 $\pm$ 43.71 ^{ab}	48.67 $\pm$ 6.65 ^{ab}	3239.76 $\pm$ 275.20 ^{ab}	5.33 $\pm$ 0.97 ^a	50.71 $\pm$ 6.95 ^a
术后12h	3.03 $\pm$ 0.88 ^a	3.34 $\pm$ 0.96 ^a	2.94 $\pm$ 0.93 ^a	2.77 $\pm$ 0.95 ^a	46.48 $\pm$ 7.21 ^a	1010.83 $\pm$ 78.96 ^{ab}	60.73 $\pm$ 5.81 ^{ab}	5546.82 $\pm$ 317.28 ^{ab}	9.16 $\pm$ 1.36 ^a	72.43 $\pm$ 7.31 ^{ab}
术后24h	3.45 $\pm$ 1.01 ^a	3.57 $\pm$ 1.06 ^a	3.25 $\pm$ 1.04 ^a	3.29 $\pm$ 1.03 ^a	65.42 $\pm$ 7.85 ^{ab}	1325.45 $\pm$ 84.14 ^{ab}	78.93 $\pm$ 6.78 ^{ab}	7766.58 $\pm$ 487.92 ^{ab}	15.47 $\pm$ 2.14 ^{ab}	106.29 $\pm$ 16.12 ^{ab}
术后48h	4.62 $\pm$ 1.10 ^{ab}	4.46 $\pm$ 1.13 ^{ab}	4.87 $\pm$ 1.17 ^{ab}	4.35 $\pm$ 1.16 ^{ab}	84.29 $\pm$ 8.16 ^{ab}	1742.89 $\pm$ 90.86 ^{ab}	103.12 $\pm$ 8.01 ^{ab}	9785.49 $\pm$ 568.66 ^{ab}	25.39 $\pm$ 3.87 ^{ab}	195.52 $\pm$ 30.91 ^{ab}
川芎嗪组										
术后6h	2.61 $\pm$ 0.69 ^a	2.46 $\pm$ 0.75 ^a	2.63 $\pm$ 0.65 ^a	2.54 $\pm$ 0.62 ^a	31.95 $\pm$ 4.73	683.52 $\pm$ 40.68 ^a	38.46 $\pm$ 4.87	2131.95 $\pm$ 294.63 ^a	4.02 $\pm$ 1.12	42.16 $\pm$ 5.87
术后12h	2.83 $\pm$ 0.72 ^a	2.60 $\pm$ 0.76 ^a	2.79 $\pm$ 0.81 ^a	2.76 $\pm$ 0.73 ^a	37.83 $\pm$ 4.98	815.64 $\pm$ 60.26 ^a	45.84 $\pm$ 4.93	4237.38 $\pm$ 304.65 ^a	7.69 $\pm$ 1.31 ^a	55.67 $\pm$ 6.53 ^a
术后24h	2.95 $\pm$ 0.79 ^a	2.75 $\pm$ 0.84 ^a	2.90 $\pm$ 0.78 ^a	2.93 $\pm$ 0.70 ^a	43.85 $\pm$ 6.51	1013.55 $\pm$ 71.15 ^a	53.85 $\pm$ 6.04	5748.74 $\pm$ 376.48 ^a	10.55 $\pm$ 2.15 ^a	89.39 $\pm$ 8.04 ^a
术后48h	3.09 $\pm$ 0.95 ^a	2.89 $\pm$ 0.86 ^a	3.02 $\pm$ 1.01 ^a	3.11 $\pm$ 0.93 ^a	57.18 $\pm$ 7.10	1340.86 $\pm$ 80.32 ^a	84.87 $\pm$ 7.17 ^a	6587.89 $\pm$ 457.17 ^a	14.78 $\pm$ 3.27 ^a	124.37 $\pm$ 12.72 ^a

注:与对照组同时点比较,^a $P < 0.05$;与川芎嗪组同时点比较,^b $P < 0.05$ 。下表同。

表2 3组大鼠不同时间腹腔积液量比较($\bar{X} \pm s$, mL, $n=5$)

组别	术后6h	术后12h	术后24h	术后48h
对照组	0	0	0	0.51 ± 0.19
SAP组	3.45 ± 1.09 ^{ab}	3.96 ± 1.12 ^{ab}	4.21 ± 1.05 ^{ab}	4.68 ± 1.07 ^{ab}
川芎嗪组	2.03 ± 0.92 ^a	2.24 ± 0.96 ^a	2.46 ± 1.01 ^a	2.72 ± 1.03 ^a

表3 3组大鼠肾脏组织细胞凋亡指数比较($\bar{X} \pm s$, %, $n=5$)

组别	术后6h	术后12h	术后24h	术后48h
对照组	1.19 ± 0.42	1.31 ± 0.44	1.38 ± 0.46	1.43 ± 0.40
SAP组	5.36 ± 1.12 ^{ab}	10.06 ± 1.15 ^{ab}	14.16 ± 1.79 ^{ab}	18.09 ± 2.17 ^{ab}
川芎嗪组	3.73 ± 0.94 ^a	6.44 ± 0.98 ^a	9.04 ± 1.81 ^a	11.52 ± 2.13 ^a

使肾脏无法正常代谢机体废物、毒物,最终导致全身炎症反应综合征,甚至死亡^[6]。本研究结果显示,3组大鼠不同时间点的腹腔积液量两两比较有明显差异($P < 0.05$),表明川芎嗪能有效控制SAP的发展,减轻胰腺组织的进一步损伤。川芎嗪是从川芎中提取的吡嗪生物碱,具有抗血小板聚集、扩张小动脉、改善微循环等作用,对促进炎症介质代谢、抑制炎症细胞因子的释放有重要价值^[7]。本研究结果显示,SAP组与川芎嗪组术后6,12,24h的水肿、炎症、出血、坏死评分比较无明显差异($P > 0.05$),但川芎嗪组术后48h的评分均明显低于SAP组($P < 0.05$),且川芎嗪组与对照组术后6,12,24,48h的IL-6比较无明显差异($P > 0.05$),表明川芎嗪在抑制巨噬细胞释放炎症因子,降低SAP大鼠炎症水平的同时,也可减轻胰腺病理性改变,从而提高SAP的治疗效果,这与母传贤等^[8]的研究结论相似。

SAP肾损伤是导致SAP患者死亡的主要因素。本研究中通过对血清淀粉酶、BUN、Cr的分析可知,SAP大鼠均存在不同程度的肾脏损伤,且随着时间的推移不断加重。这不仅促使微循环阻力增大,血液瘀滞,也会增强中性粒细胞的趋化作用,刺激中性粒细胞黏附于血管内皮而出现颗粒状脱落,进而促进自由基生成及IL-10, TNF- α 等炎症介质释放;并加重局部组织损伤,增加毛细血管通透性,导致血流灌注下降,组织缺氧坏死^[9-10]。因此,借助川芎嗪的作用机制降低大鼠炎症介质水平,能缓解大鼠的肾损伤,使血清淀粉酶及BUN、Cr显著下降^[11]。肾脏损伤与细胞凋亡呈正相关,若细胞被广泛破坏,细胞膜磷脂将过度氧化,酶、蛋白质、核酸等随之变性,致机体处于严重的应激状态^[12]。廖雯靓^[13]指出,肾小管上皮细胞与急性肾衰竭早期就可出现凋亡现象,故调控细胞凋亡对改善SAP预后,保护肾脏组织,降低死亡率至关重要。本研究结果显示,3组大鼠术后6,12,24,48h的肾脏组织细胞凋亡指数均呈增高趋势,对照组各个时间点均明显低于川芎嗪组和SAP组,且川芎嗪组各个时间点均较SAP组明显下降。提示川芎嗪可通过对抗大鼠体内自由基的氧化,改善肾血管灌注,达到保护肾小管上皮细胞及减少凋亡的目的^[14]。

综上所述,川芎嗪能增加溶酶体膜的稳定性,扩张肾毛细血管,增加肾血流量,缓解组织缺血、缺氧状态,加快机体代谢。但AP发病机制复杂,受多种致病因素影响,川芎嗪对胰腺、肾脏之外的组织器官是否有保护作用,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang G, Zhang J, Xu C, et al. Inhibition of SOCs Attenuates Acute Lung Injury Induced by Severe Acute Pancreatitis in Rats and PMVECs Injury Induced by Lipopolysaccharide[J]. Inflammation, 2016, 39(3):1049-1058.
- [2] 田 园, 李运鹏, 韩若东. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡及caspase 12表达的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(1):16-19.
- [3] 李 聘, 刘召明, 张 华, 等. 丹参川芎嗪注射液治疗重症急性胰腺炎的临床研究[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(20):3035-3037.
- [4] 张瑞宁, 傅淑霞, 陈亚坤, 等. 川芎嗪对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24(25):5-10.
- [5] 张益维, 陈益君, 玉 珏, 等. 川芎嗪对感染性坏死性急性胰腺炎患者器官功能的保护作用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(12):2737-2739.
- [6] Li G, Wu X, Yang L, et al. TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic injury in mice with severe acute pancreatitis[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2016, 37(1):99-107.
- [7] 饶丽华, 赵诗云, 尹小明. 川芎嗪抗血小板聚集的实验研究[J]. 检验医学, 2014, 29(9):976-977.
- [8] 母传贤, 刘国玲, 田 华, 等. 川芎嗪对胶原性关节炎大鼠血清IL-1、IL-6、IL-2水平及关节浸液NO、PGE2的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(2):214-217.
- [9] Giorda CB, Sacerdote C, Nada E, et al. Incretin-based therapies and acute pancreatitis risk: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. Endocrine, 2015, 48(2):461-471.
- [10] 罗梓垠, 宋 冬, 陈辉乐, 等. 氧化应激在兔肾缺血/再灌注损伤中的作用及川芎嗪干预[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(11):947-950.
- [11] Kitamura K, Horibe M, Sanui M, et al. The Prognosis of Severe Acute Pancreatitis Varies According to the Segment Presenting With Low Enhanced Pancreatic Parenchyma on Early Contrast-Enhanced Computed Tomography: A Multicenter Cohort Study[J]. Pancreas, 2017, 46(7):867-873.
- [12] 奉 镭, 穆小松, 刘 翼, 等. 川芎嗪对重症胰腺炎大鼠肾细胞凋亡的影响[J]. 中国中医急症, 2013, 22(1):36-39.
- [13] 廖雯靓. 丹参川芎嗪注射液治疗慢性肾脏病基础上急性肾损伤44例[J]. 医药导报, 2017, 36(s1):29-30.
- [14] Tang QQ, Su SY, Fang MY. Zinc Supplement Modulates Oxidative Stress and Antioxidant Values in Rats with Severe Acute Pancreatitis[J]. Biological Trace Element Research, 2014, 159(1-3):320-324.

(收稿日期:2018-04-09)