



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.010
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3813.shtml

· 胰腺炎专题研究 ·

吴茱萸次碱治疗重症急性胰腺炎的实验研究

谷欢¹, 彭杰¹, 莫吉祥²

(1. 中南大学湘雅医院 消化内科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省湘潭职业技术学院, 湖南 湘潭 411104)

摘要

目的: 探讨吴茱萸次碱对大鼠重症急性胰腺炎(SAP)的疗效及其机制。

方法: 50只SD大鼠随机均分为假手术组和4个实验组,实验组大鼠以5%牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射制作SAP模型后,分别给予生理盐水、乌司他丁、吴茱萸次碱、乌司他丁+吴茱萸次碱处理。术后24h,行病理学检查,并检测各组血清淀粉酶活性及血浆与胰腺组织和内皮素1(ET-1)、降钙素基因相关肽(CGRP)水平。

结果: 除假手术组外,各实验组大鼠均胰腺组织均出现不同程度的胰腺炎病理改变;与假手术组比较,各实验组均出现不同程度的血清淀粉酶活性升高,血浆与胰腺组织ET-1浓度增加,而血浆与胰腺组织CGRP含量在吴茱萸次碱处理组与联合用药组均明显升高(均 $P<0.05$),其余实验组无明显改变(均 $P>0.05$);实验组中,各药物处理组胰腺病变程度、血清淀粉酶活性、血浆与胰腺组织ET-1浓度均较生理盐水处理的模型组明显降低,且均以联合用药组最为明显(均 $P<0.05$)。

结论: 吴茱萸次碱对大鼠SAP具有治疗作用,其作用可能与增加CGRP水平从而改善胰腺组织微循环有关。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(3):314-319]

关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 吴茱萸次碱; 降钙素基因相关肽; 大鼠

中图分类号: R657.5

Experimental study of therapeutic use of rutecarpine in severe acute pancreatitis

GU Huan¹, PENG Jie¹, MO Jixiang²

(1. Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Xiangtan Vocational & Technical College, Xiangtan, Hunan 411104, China)

Corresponding author: PENG Jie, Email: pengjie2@medmail.com.cn

ABSTRACT

Objective: To investigate the therapeutic effect of rutecarpine on rats with severe acute pancreatitis (SAP) and its mechanism.

Methods: Fifty SD rats were equally randomized into sham operation group and 4 experimental groups. Rats in experimental groups underwent retrograde cholangiopancreatic duct injection of 5% sodium taurocholate to induce SAP model, and then were given the treatment with normal saline, ulinastatin, rutecarpine, or ulinastatin plus rutecarpine, respectively. Twenty-four hours after operation in each group, the pathological examination was performed, the serum amylase activity was measured, and the levels of endothelin 1 (ET-1) and calcitonin gene related peptide (CGRP) in the plasma and pancreatic tissue were determined.

收稿日期: 2014-01-11; 修订日期: 2014-02-23。

作者简介: 谷欢, 中南大学湘雅医院主治医师, 主要从事消化系统肿瘤及胰腺疾病方面的研究。

通信作者: 彭杰, Email: pengjie2@medmail.com.cn

Results: Except in sham operation group, all the experimental groups exhibited the pathological profiles of pancreatitis of varying degrees in the pancreatic tissue. Compared with sham operation group, the serum amylase activity, and levels of ET-1 in the plasma and pancreatic tissue in all experimental groups were increased with different degrees, while the contents of CGRP in plasma and pancreatic tissue were significantly increased in rutecarpine treatment group and combination treatment group (all $P < 0.05$), and showed no obvious change in the remaining experimental groups (all $P > 0.05$). Among experimental groups, the pancreatic damage was less severe, and serum amylase activity as well as the levels of ET-1 in plasma and pancreatic tissue were significantly decreased in the groups that received drug treatment, especially combination drug treatment, compared with the model group treated with saline (all $P < 0.05$).

Conclusion: Rutecarpine has protective effect against SAP in rats, which may be associated with its increasing CGRP level and thereby improving the microcirculation of pancreatic tissue.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(3):314-319]

KEYWORDS Pancreatitis, Acute Necrotizing; Rutecarpine; Calcitonin Gene-Related Peptide; Rats

CLC number: R657.5

急性胰腺炎(AP)是一种消化系统常见急症,其中重症急性胰腺炎(SAP)病情凶险,易并发多器官功能障碍,是一种病死率较高的疾病。诸多的事实证明胰腺微循环障碍与急性胰腺炎的发生发展关系密切^[1-3],胰腺微循环障碍可以诱导出急性胰腺炎模型的事实说明胰腺微循环障碍可以启动急性胰腺炎,是急性胰腺炎的发病原因之一,更重要的是微循环障碍在胰腺炎的发展过程中起着加重胰腺炎病变的作用,在胰腺炎的早期,往往存在微循环障碍,毛细血管先缺血继而血流淤积、毛细血管通透性增加和微血栓形成。

吴茱萸次碱(rutecarpine)是传统的中药吴茱萸的主要活性成分,近年来的研究^[4-5]发现,吴茱萸次碱具有广泛的药理学效应,包括舒张血管、降低血小板凝聚、松弛血管平滑肌、利尿、抗炎、胃肠黏膜保护作用等。本文通过观察SAP大鼠模型内皮素1(ET-1)、降钙素基因相关肽(CGRP)的变化探讨吴茱萸次碱对AP防治作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品试剂与仪器

乌司他丁(广东天普生化医药股份有限公司);吴茱萸次碱(中南大学药学院);牛磺胆酸钠(美国Sigma公司);降钙素基因相关肽、内皮素豁免试剂盒(北京东亚免疫技术研究所);酶标仪(美国Molecular公司);Hitachi7600型全自动生化仪(日本日立公司);微量注射泵(深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

1.2 实验动物与分组

由湖南斯莱克景达动物中心提供50只雄性SD大鼠,清洁级,体质量(200 ± 10)g。将大鼠随机分为以下5组:(1)假手术组:打开腹腔,显露出胰脏,但不注入牛磺胆酸钠;(2)模型组:经胆胰管逆行注入5%牛磺胆酸钠;(3)乌司他丁组:建模后1h,静脉注射乌司他丁;(4)吴茱萸次碱组:造模后1h,给予吴茱萸次碱灌胃;(5)乌司他丁+吴茱萸次碱组(联合用药组):造模后1h,同时乌司他丁静脉注射和吴茱萸次碱灌胃。各组分为2个亚组,分别用于相关指标的检测。

1.3 方法

SD大鼠术前自由饮水,禁食12h。使用3%戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射麻醉大鼠,然后在大鼠颈背部及腹部备皮。

1.3.1 大鼠静脉输液装置 大鼠呈仰卧位,做颈正中切口并分离出颈外静脉后在其上穿线备用,将硬膜外导管通过预先做好的颈背部皮肤小切口穿至颈部,切开颈外静脉,结扎远心端后将导管插入其近心端并结扎固定,然后将颈部切口缝合好。翻转大鼠并缝合颈背部切口,用一金属丝夹紧并固定导管。硬膜外导管待接输液泵。

1.3.2 大鼠SAP模型制作 铺无菌巾,做腹正中切口,沿十二指肠内侧找到片状分布的胰腺后,将胰腺及十二指肠均暴露于切口外,用无损伤动脉夹于临近肝门处夹闭胆胰管,磨钝4.5号注射器针头,于十二指肠乳头对侧肠壁穿刺至胆胰管,动脉夹固定针头,接微量注射泵注射5%牛磺胆酸钠(剂量:0.1mL/100g,速度:0.05mL/min),注射

后 5 min 松开动脉夹，退出针头，关闭腹腔。

1.3.3 给药方法与药物剂量 乌司他丁（剂量为 5 万 U/只，用生理盐水溶解，）于造模后 1 h 静脉给予，首先将 1 万 U 乌司他丁经由尾静脉缓慢推注，然后将 4 万 U 乌司他丁通过静脉微泵输入，输液速度：3 mL/h，推注体积：0.5 mL，输液体积：30 mL；吴茱萸次碱固体分散剂（剂量：100 mg/kg，用蒸馏水溶解）于造模后 1 h，按 10 mL/kg 灌胃。

1.3.4 标本采集与指标检测 根据文献^[6]报道，造模后 24 h 胰腺病变最为稳定，为得到有效可靠的结论，在造模后 24 h 麻醉并心脏采血 5 mL，常规分离血清并置 -80 ℃ 冰箱保存待测。收集胰腺标本，胰腺组织放入 4% 福尔马林溶液中固定。

(1) 病理学检查：将胰腺石蜡包埋组织块以 4 μm 厚度进行连续切片，经苏木精-伊红（HE）染色后，通过光镜观察并照相。(2) 血清淀粉酶检测：用全自动生化分析仪测定大鼠血清淀粉酶活性。(3) 血清浆和胰腺组织 CGRP，ET-1 含量检测均采用放射免疫法检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 14.0 统计软件包分析数据，所有数据正态分布参数用 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析和 *q* 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺病理形态学改变

2.1.1 胰腺大体病理学改变 造模 24 h 后解剖大鼠观察胰腺及腹腔病变，除假手术组未观察到病理学改变外，其余各组大鼠均观察到不同程度的胰腺及腹腔病理改变，模型组大鼠胰腺呈广泛的水肿、出血性坏死或脂肪坏死，腹腔内可见大量腹水，多为黄色或血性，肠系膜和大网膜上可以观察到大量黄白色皂化斑；乌司他丁组与吴茱萸次碱组大鼠均存在类似病理改变，但病变程度明显轻于模型组；联合用药组仅存在轻微的病理学改变，胰腺病变范围局限，而且腹腔内无明显腹水和皂化斑（图 1）。

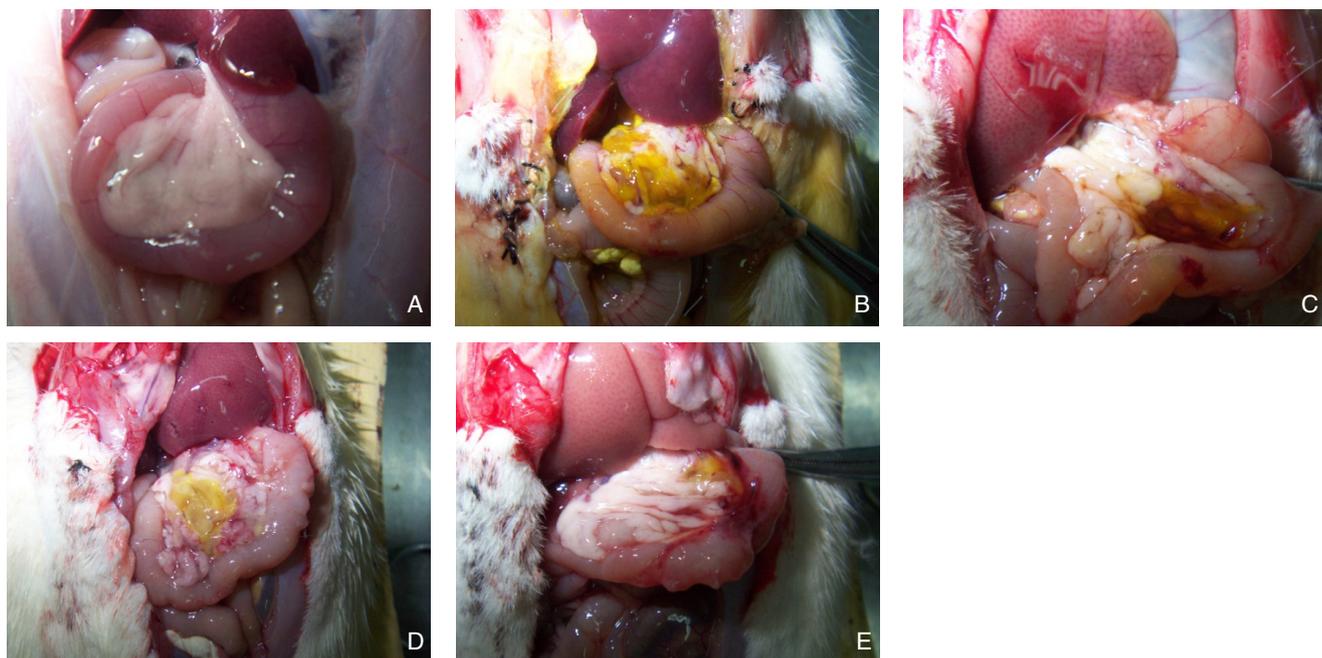


图 1 各组大鼠大体形态学改变 A: 假手术组; B: 模型组; C: 乌司他丁组; D: 吴茱萸次碱组; E: 联合用药组
Figure 1 The gross pathological appearances in each group of rats A: Sham operation group; B: Model group; C: Ulinastatin treatment group; D: Rutaecarpin treatment group; E: Combination treatment group

2.1.2 胰腺组织病理学改变 假手术组大鼠胰腺腺泡及间质未见明显异常，其他组表现出不同程度的 SAP 的病理变化。模型组大鼠呈现出大片胰腺坏死及广泛的胰腺间质充血水肿，小叶间隙和腺泡明显增宽，伴明显渗液，小叶腺泡细胞结构模糊，甚至完全破坏，间质及腺泡有大量炎症细胞及红细

胞浸润，有微血栓形成。吴茱萸次碱组和乌司他丁组与模型组相比，在胰腺坏死、出血、胰腺间质水肿及炎症细胞浸润方面有所减轻。乌司他丁组 + 吴茱萸次碱组大鼠病变程度最轻，胰腺呈轻度出血或局灶性坏死，间质轻度水肿，少量炎性细胞浸润（图 2）。

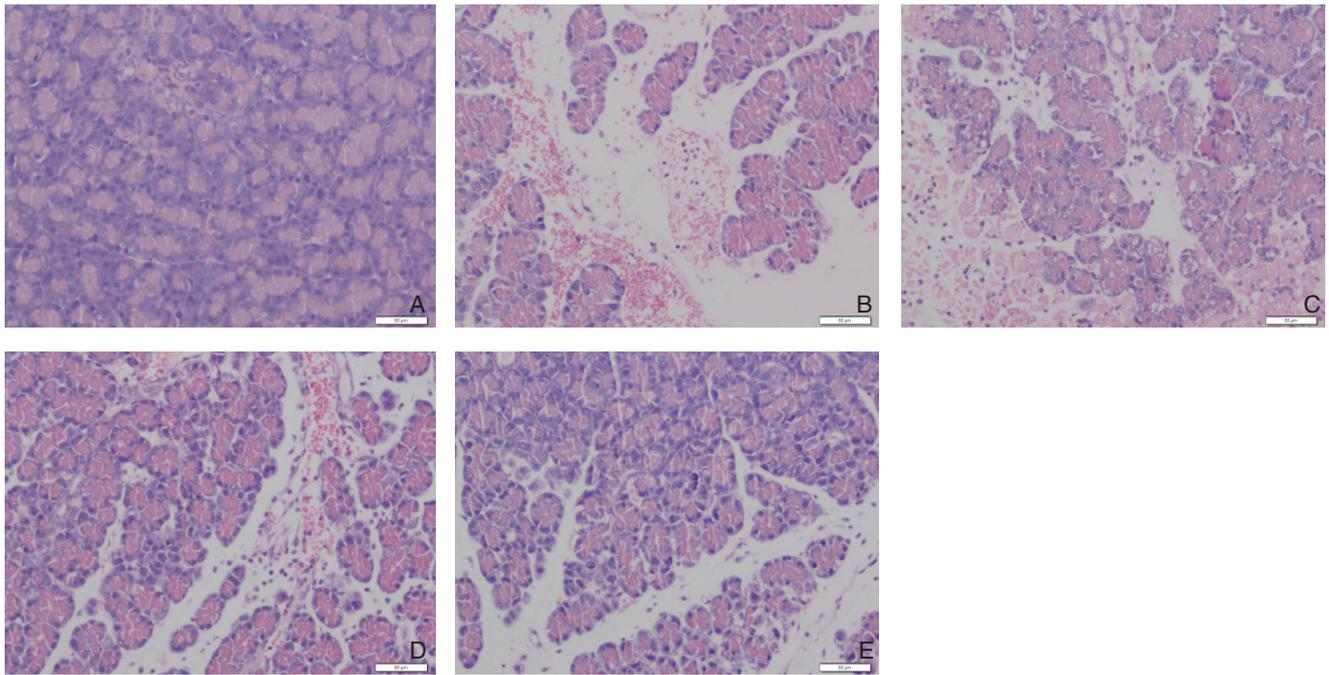


图2 各组胰腺组织病理切片(HE ×400) A: 假手术组; B: 模型组; C: 乌司他丁组; D: 吴茱萸次碱组; E: 联合用药组

Figure 2 Pathological sections of pancreatic tissue in each group (HE ×400) A: Sham operation group; B: Model group; C: Ulinastatin treatment group; D: Rutaecarpin treatment group; E: Combination treatment group

2.2 各组大鼠血清淀粉酶含量

假手术组大鼠血清淀粉酶含量为(467.54 ± 87.99) U/L, 维持在低水平, 其他各组大鼠血清淀粉酶含量均明显升高, 且与假手术组间差异均有统计学意义(均 P<0.05)。模型组大鼠血清淀粉酶活性升高最显著, 为(4 399.51 ± 2 014.70) U/L。乌司他丁组血清淀粉酶含量为(2 813.22 ± 1 752.17) U/L, 吴茱萸次碱组大鼠血清淀粉酶含量为(3 075.70 ± 2 017.89) U/L, 与模型组相比均有所下降, 且差异有统计学意义(均 P<0.05), 但乌司他丁组与吴茱萸次碱组之间差异无统计学意义(P>0.05)。联合用药组大鼠血清淀粉酶含量为(1 921.08 ± 654.20) U/L, 较两个单独用药组均有所下降, 且与这两组之间的差异均有统计学意义(均 P<0.05)(图3)。

2.3 各组大鼠血清CGRP, ET-1含量

造模后24 h, 模型组血浆CGRP浓度较假手术组有所升高, 但差异无统计学意义(P>0.05), 乌司他丁组血浆CGRP浓度也相对升高, 但与假手术组及模型组间差异亦无统计学意义(均 P>0.05)。吴茱萸次碱组血浆CGRP浓度相对于前3组明显升高, 差异有统计学意义(P<0.05), 而乌司他丁与吴茱萸次碱联合用药后, 血浆CGRP浓度升高更加明显, 与单独的吴茱萸次碱组比较, 差

异有统计学意义(P<0.05)(图4A)。

与假手术组比较, 模型组血浆ET-1浓度显著升高, 差异有统计学意义(P<0.05)。3个药物处理组血浆ET-1浓度均较模型组明显降低, 差异均有统计学意义(均 P<0.05), 联合用药组ET-1浓度降低尤为明显, 已基本接近假手术组水平(P>0.05)(图4B)。

胰腺组织CGRP, ET-1含量的变化趋势与血浆中的基本一致(图4C-D)。

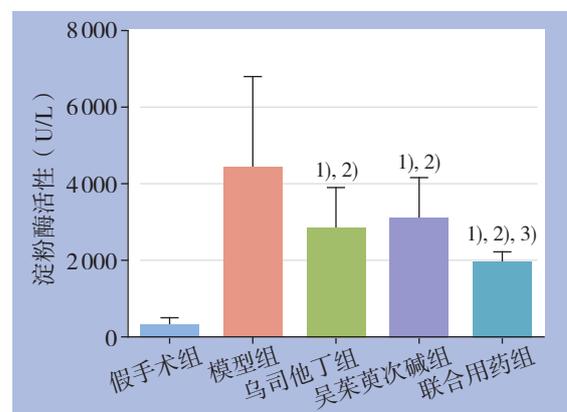


图3 各组大鼠血清淀粉酶活性 1) 与假手术组比较, P<0.05; 2) 与模型组比较, P<0.05; 3) 与乌司他丁组或吴茱萸次碱组比较, P<0.05

Figure 3 Serum amylase activities in each group 1) P<0.05 vs. sham operation group; 2) P<0.05 vs. model group; 3) P<0.05 vs. ulinastatin or rutaecarpin treatment group

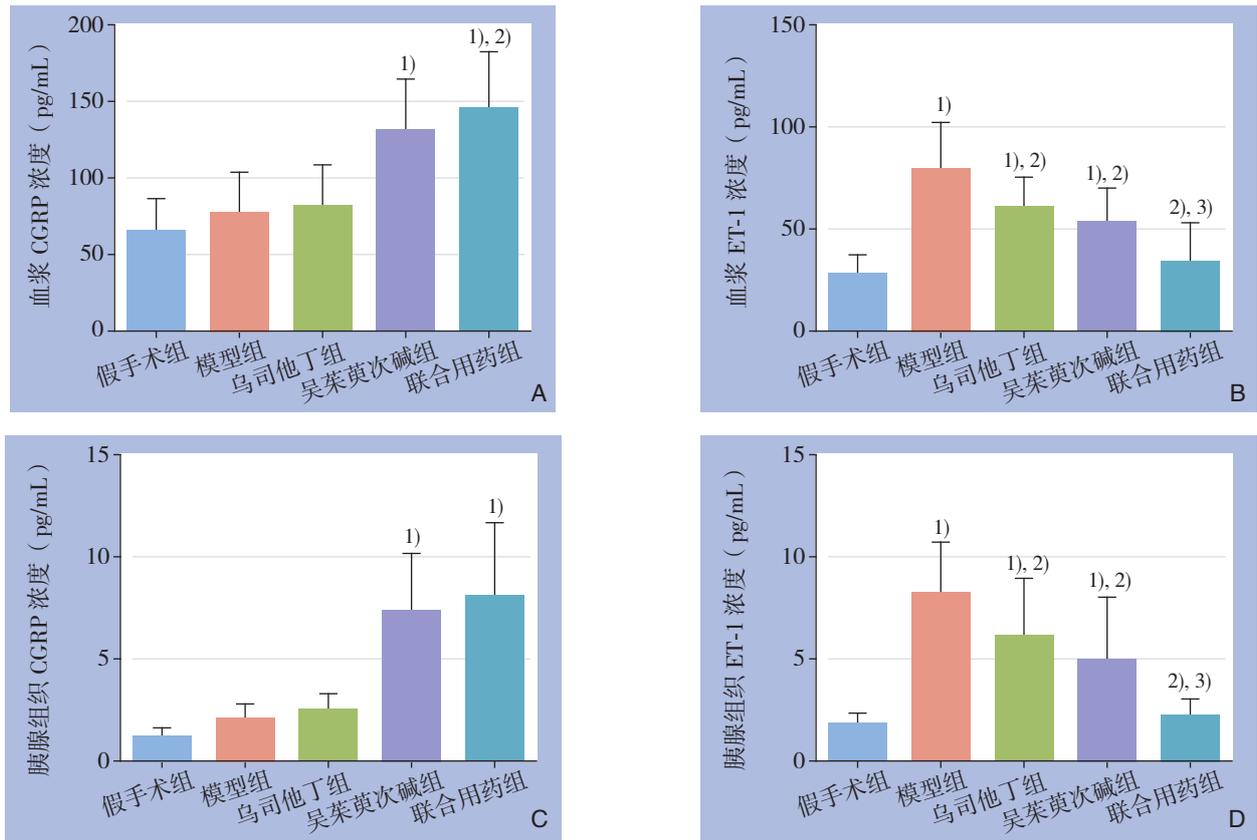


图 4 各组大鼠血浆及胰腺组织 CGRP, ET-1 浓度 A: 血浆 CGRP 浓度; B: 血浆 ET-1 浓度; C: 胰腺组织 CGRP 含量; D: 胰腺组织 ET-1 含量 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$; 3) 与乌司他丁组或吴茱萸次碱组比较, $P < 0.05$

Figure 4 ET-1 and CGRP levels in the plasma and pancreatic tissue in each group A: Plasma CGRP level; B: Plasma ET-1 level; C: Pancreatic CGRP level; D: Pancreatic ET-1 level 1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. model group; 3) $P < 0.05$ vs. ulinastatin or rutaecarpin treatment group

3 讨论

本研究在大鼠 SAP 模型上, 通过观察病理形态学改变及检测淀粉酶、ET-1、CGRP 变化发现, 与乌司他丁相比, 吴茱萸次碱亦能明显改善大鼠胰腺的损害, 且与乌司他丁联用后的疗效比两者单用更为显著, 两者均为治疗 SAP 的有效药物。

SAP 的发病是一个多因素参与、多步骤形成的复杂过程^[7-10], 胰腺血运障碍贯穿于 AP 的发生发展的全过程。作为胰腺微循环的基本形态学单位, 胰腺小叶的血供呈现为树枝状分支, 相邻小叶内动脉之间及其分支之间无吻合支存在, 属终末动脉, 所以胰腺组织对缺血高度敏感。有研究者^[11]观察到胰腺小叶内动脉在 AP 发病的早期就已经出现括约肌痉挛、平滑肌肌浆中多发空泡, 而缺血后再灌注^[12-14]则使胰腺功能毛细血管密度减少, 间质水肿, 细胞内水肿, 细胞膜通透性增加, 离子通道电荷改变, 因此胰腺炎性改变加重。另外,

大量的血管活性物质如缓激肽 (BK)、血小板活化因子 (PAF)、内皮素 (ET)、一氧化氮 (NO) 等均在胰腺微循环障碍中起重要作用, 它们^[15-16]可通过影响血浆白蛋白渗入间质、白细胞滚动、黏附与游走和微血管管径、通透性而使得内脏微循环障碍加重, 导致胰腺和肠道持续缺血直至坏死, 并可累及全身多处组织器官诱发 MODS 甚至多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF)^[17]。因此认为微循环障碍是 AP 恶化的一个重要因素。

吴茱萸次碱属于吡啶唑啉类生物碱, 具有广泛的药理学作用, 其主要作用机理为通过激活辣椒素受体, 促进 CGRP 的合成与释放而产生^[18]。CGRP 是辣椒素敏感感觉神经的主要肽类递质, CGRP 及其受体几乎存在于所有血管床, 主要分布在中枢与外周神经系统, 特别是胃肠道及胰腺均含有丰富的 CGRP 神经纤维。CGRP 在维持循环稳定中起重要作用, 是目前已知最强的内源性舒血管活性物质。ET 的释放与表达, 收缩小血管致使微循

环障碍,导致组织器官功能受损。

本研究结果发现,大鼠在造模后血浆及胰腺组织 ET-1 水平明显增加,而 CGRP 水平有轻度上调,但与假手术组间无统计学差异 ($P>0.05$),可能与机体保护性反应有关。CGRP 对 ET-1 有极强的对抗效应,滴注 CGRP 能使 ET-1 水平显著降低^[19]。本研究发现,吴茱萸次碱组血浆及胰腺组织 CGRP 水平明显增高,ET-1 水平明显下降,而乌司他丁对血浆及胰腺组织 CGRP 水平无明显影响,虽能降低 ET-1 水平,但不如吴茱萸次碱明显。虽然本研究未进行胰腺组织血流量改变的检测,但谭敦勇等^[20]研究表明,给予外源性 CGRP 后,检测到胰腺组织的血流量明显增加,从而减少雨蛙素诱导的 SAP 大鼠的胰腺损伤。因此,笔者推测,吴茱萸次碱对 SAP 损伤的保护作用可能与其改善微循环,保护胰腺组织的活力有关,且该作用通过增加 CGRP 水平介导。此外,吴茱萸次碱的其他药理作用,如:抗炎、稳定溶酶体膜、抗血小板凝聚等,可能也参与了对 SAP 的治疗作用,但这有待于进一步的研究证实。

本实验通过以大鼠模型为基础的研究,证明了吴茱萸次碱对 SAP 具有治疗作用,并初步探讨了其作用机制,为吴茱萸次碱治疗 SAP 的临床应用打下了基础。

参考文献

- [1] 张青顺,孙洪伟,朱柳凡,等.重症急性胰腺炎区域动脉灌注药物序贯组合方案的研究[J].中国普通外科杂志,2012,21(3):249-252.
- [2] 汪文峰,方茂勇.急性胰腺炎微循环障碍的治疗进展[J].临床医学,2012,32(5):117-119.
- [3] 夏亮,吕农华.胰腺微循环障碍与重症急性胰腺炎发病的关系[J].中华消化杂志,2006,26(4):284-286.
- [4] Liu YZ, Zhou Y, Li D, et al. Reduction of asymmetric dimethylarginine in the protective effects of rutaecarpine on gastric mucosal injury[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2008, 86(10):675-681.
- [5] Li JZ, Peng J, Xiao L, et al. Reversal of isoprenaline-induced cardiac remodeling by rutaecarpine via stimulation of calcitonin gene-related peptide production[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88 (10):949-959.
- [6] 白槟,徐斌,刘朝旭,等.逆行胆总管注射牛黄胆酸钠诱导重症急性胰腺炎模型多器官损害观察[J].科学技术与工程,2013,13(15):4141-4147.
- [7] Talukdar R, Swaroop Vege S. Early management of severe acute pancreatitis[J]. Curr Gastroenterol Rep, 2011, 13(2):123-130.
- [8] Gupta K, Wu B. In the clinic. Acute pancreatitis[J]. Ann Intern Med, 2010, 153(9):ITC51-55.
- [9] Pezzilli R, Zerbi A, Di Carlo V, et al. Practical guidelines for acute pancreatitis[J]. Pancreatol, 2010, 10(5): 523-535.
- [10] Waldthaler A1, Sch ü tte K, Malfertheiner P. Causes and mechanisms in acute pancreatitis[J]. Dig Dis, 2010, 28(2): 364-372.
- [11] Zhou ZG, Chen YD, Sun W, et al. Pancreatic microcirculatory impairment in experimental acute pancreatitis in rats[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(5):933-936.
- [12] Obermaier R, Drogitz O, Benz S, et al. Pancreatic ischemia/reperfusion injury: impact of different preservation temperatures[J]. Pancreas, 2008, 37(3):328-332.
- [13] 常华,严际慎,王平瑜,等.缺血-再灌注损伤对大鼠急性胰腺炎胰腺细胞凋亡的影响[J].中国普外基础与临床杂志,2005,12(2):150-152.
- [14] Woeste G, Wullstein C, Meyer S, et al. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia[J]. Transplantation, 2008, 86(7):961-967.
- [15] Zhou ZG, Chen YD. Influencing factors of pancreatic microcirculatory impairment in acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2002,8(3): 406-412.
- [16] 李国东,吴德全.急性胰腺炎发病机制研究进展[J].肝胆胰外科杂志,2005,17(2):172-174.
- [17] Foitzik T, Eibl G, Hotz B, et al. Persistent multiple organ microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: experimental findings and clinical implications[J]. Dig Dis Sci 2002, 47(1): 130-138
- [18] Yi HH, Rang WQ, Deng PY, et al. Protective effects of rutaecarpine in cardiac anaphylactic injury is mediated by CGRP[J]. Planta Med, 2004, 70(12):1135-1139.
- [19] Warzecha Z, Dembi ń ski A, Ceranowicz P, et al. Protective effect of calcitonin gene-related peptide against caerulein-induced pancreatitis in rats[J]. J Physiol Pharmacol, 1997, 48(4):775-787.
- [20] 谭敦勇,张继峰,牛大地,等.降钙素基因相关肽拮抗内皮素生物效应的研究[J].中国病理生理杂志,1993,9(5):653-655.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:谷欢,彭杰,莫吉祥.吴茱萸次碱治疗重症急性胰腺炎的实验研究[J].中国普通外科杂志,2014,23(3):314-319. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.010

Cite this article as: GU H, PENG J, MO JX. Experimental study of therapeutic use of rutaecarpine in severe acute pancreatitis[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(3):314-319. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.03.010