

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01183

• 论 著 •

## 参麦注射液减轻大鼠重症急性胰腺炎相关性肺损伤

于齐宏, 杜奕奇\*, 李兆申, 谢沛, 郭杰芳

第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 观察参麦注射液能否减轻大鼠重症急性胰腺炎(SAP)相关性肺损伤,并初步探讨其相关机制。**方法** 将30只SD大鼠随机分为假手术组、SAP模型组和参麦注射液干预组,每组10只。采用经胰胆管注射5%牛黄胆酸钠诱发SAP大鼠肺损伤模型,参麦注射液干预组在建模前10 min经尾静脉注射8 mL/kg参麦注射液。模型制作24 h后经心脏取血1 mL测定血淀粉酶,取胰腺组织及左肺组织用于病理学与免疫组织化学检测;取右肺组织匀浆后检测匀浆液中髓过氧化物酶(MPO)活性及丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )与白介素 $1\beta$ (IL- $1\beta$ )含量。**结果** 假手术组大鼠各项指标未见明显异常。SAP模型组大鼠经胰胆管注射5%牛黄胆酸钠24 h后,血浆淀粉酶明显升高,胰腺组织小叶结构严重破坏;肺泡结构破坏,肺泡内大量炎性细胞浸润;肺组织氧化应激指标MPO活性与MDA含量明显升高,炎性指标TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$ 含量亦升高,与假手术组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ );肺组织ICAM-1与caspase-3呈强阳性表达。参麦注射液干预组大鼠各项指标均较SAP模型组减轻。**结论** 参麦注射液能减轻SAP相关性肺损伤的原发病及肺损伤,其对肺的保护作用与抗氧化损伤、抗炎症反应及抗凋亡等有关。

**[关键词]** 重症急性胰腺炎;肺损伤;参麦注射液;氧化性应激;炎症;细胞凋亡

**[中图分类号]** R 576.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1183-04

### *Shenmai injection improves lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats*

YU Qi-hong, DU Yi-qi\*, LI Zhao-shen, XIE Pei, GUO Jie-fang

Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of *Shenmai* injection on severe acute pancreatitis (SAP)-associated lung injury and the possible mechanism in rats. **Methods** The animals were randomly divided into three groups: sham operation group (sham group,  $n=10$ ), severe acute pancreatitis (SAP group,  $n=10$ ) and *Shenmai* injection treatment group (SM group,  $n=10$ ). The rat model of SAP was induced by injection of 5% sodium taurocholate to the pancreatic duct. The rats in SM group were given *Shenmai* injection (8 mL/kg) via tail vein 10 min before sodium taurocholate injecting. 24 h after the model was made, 1 mL blood was drawn for serum amylase detection. Left lung tissues and pancreatic tissues were harvested for pathology and immunohistochemistry. Right lung tissue was homogenated for detection of myeloperoxidase (MPO) activity and levels of malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ). **Results** There were no obvious damages to pancreas and lung in the sham group. While in the SAP group, the plasma amylase was greatly increased, the pancreatic lobular structures were severely damaged, and the pulmonary alveoli were destroyed with inflammatory cell infiltration. The MPO activity, MDA, TNF- $\alpha$ , and IL- $1\beta$  levels in the SAP lung tissues were significantly increased compared with those in the sham group ( $P < 0.01$ ). ICAM-1 and caspase-3 were strongly positive in the lung tissues of SAP group. These parameters in the SM group were improved compared with those in the SAP group. **Conclusion** *Shenmai* injection has a protective effect on SAP-associated lung injury, and the mechanism may be related to the inhibition of apoptosis and reduction of oxygen free radical and inflammatory content.

**[Key words]** severe acute pancreatitis; lung injuries; *Shenmai* injection; oxidative stress; inflammation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1183-1186]

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床危重症疾病之一,病情凶险,死亡率高<sup>[1]</sup>。SAP在演变过程中,释放大量炎性细胞与介

质,促成全身炎症反应综合征的发生,继而引发多脏器功能不全。腹腔外脏器损害以肺损伤最为常见和突出,轻则引起轻度氧合障碍,重则导致急性呼吸窘

**[收稿日期]** 2013-06-11 **[接受日期]** 2013-08-13

**[作者简介]** 于齐宏,博士生。E-mail: yuqihong1979@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161347, E-mail: yqdu\_ch@126.com

迫综合征<sup>[2]</sup>。如何治疗或预防并减轻 SAP 后肺损伤的程度一直是临床医生十分关注的问题。

参麦注射液为中药复方制剂,其药理作用广泛,具有抗炎、抗应激、抑制白细胞的聚集和血栓形成等功效<sup>[3]</sup>。理论上参麦注射液可以通过抗炎达到减轻 SAP 相关性肺损伤的目的。本实验通过建立 SAP 大鼠模型,探讨参麦注射液能否减轻 SAP 诱发的大鼠肺损伤,并对其相关机制进行初步探讨。

## 1 材料和方法

1.1 动物分组 成年雄性 SD 大鼠 30 只,购自第二军医大学实验动物中心[动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0003;使用许可证号:SYXK(沪)2012-0003],体质量(200±20)g,随机分为 3 组:假手术组、SAP 模型组和参麦注射液干预组,每组各 10 只。

1.2 模型制备 术前 12 h 禁食不禁水。称量后给予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉(0.4 mL/100 g)。大鼠麻醉后仰卧位固定,腹正中切口。于肝十二指肠韧带肝门侧用小动脉夹暂时夹闭胰胆管,由十二指肠前壁进套管针,进入胰胆管内,夹闭胆胰管出口,匀速缓慢注入 5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),注射完后去除动脉夹,逐层关腹。参麦注射液干预组术前 10 min 经尾静脉缓慢注射 8 mL/kg 参麦注射液(正大青春宝药业有限公司,批号:1302054),SAP 模型组给予同等容量的生理盐水。假手术组仅予以开腹与关腹。以上操作均在无菌条件下进行。术后 24 h 经心脏取血 1 mL 后用大剂量水合氯醛处死大鼠。即刻取胰腺组织及左肺组织以 4%多聚甲醛固定,用于病理学与免疫组织化学检测。取右肺组织储存于-80℃冰箱,以备细胞因子等检测。所取血液经低温离心后留取血浆,保存于-80℃冰箱,以备淀粉酶检测。

1.3 检测指标 胰腺组织及部分左肺组织行常规病理检测。剩余部分左肺组织行细胞间黏附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和 caspase-3 免疫组织化学检测(试剂盒购自美国 Abcam 公司)。每只大鼠随机取 2 张切片,每张切片随机选取 6 个视野,应用图像分析系统测定阳性产物的光密度值,取平均积分光密度值作为 ICAM-1 阳性表达强度;取平均阳性着色细胞个数作为 caspase-3 阳性表达强度。右肺组织放入冰盐水研磨匀浆后离心取上清,采用 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  含量(试剂盒购自美国 R&D 公司),化学比色法检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性和丙二醛(malondialdehyde,

MDA)含量(试剂盒购自南京建成生物有限公司)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析进行比较。检验水准( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 参麦注射液减轻胰腺损伤 假手术组、SAP 模型组和参麦注射液干预组大鼠血浆淀粉酶水平分别为(1 085.4±227.1)、(7 395.7±1 518.3)、(5 912.0±1 437.9) U/L,3 组之间差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。说明参麦注射液能减轻 SAP 导致的淀粉酶升高。从病理学来看,假手术组大鼠胰腺组织未见明显病理改变;SAP 模型组大鼠胰腺组织炎性细胞浸润,胰腺小叶结构破坏,腺泡水肿,部分坏死;参麦注射液干预组大鼠胰腺组织也有炎性细胞浸润、腺泡水肿,但损伤的程度明显较模型组轻(图 1)。

2.2 参麦注射液减轻 SAP 相关性肺损伤 假手术组肺组织形态基本正常;SAP 模型组大鼠肺组织肺泡结构破坏,明显渗出、水肿,肺泡腔内大量炎性细胞浸润;参麦注射液干预组大鼠肺组织炎性细胞浸润与肺泡破坏的程度较 SAP 模型组明显减轻(图 1)。

2.3 参麦注射液降低肺组织 MPO 活性与 MDA 含量 如表 1 所示,SAP 模型组肺组织 MPO 活性和 MDA 含量较假手术组增高,参麦注射液干预组 MPO 活性与 MDA 含量均较模型组降低,3 组间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.4 参麦注射液降低肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量 如表 1 所示,SAP 模型组肺组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量较假手术组升高,参麦注射液干预组 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  含量较 SAP 模型组降低,3 组间差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.5 参麦注射液降低肺组织 ICAM-1 和 caspase-3 表达 如图 2 所示,假手术组大鼠肺组织内可见少量肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞呈弱阳性染色,而 SAP 模型组肺组织血管内皮细胞、肺泡上皮细胞和支气管上皮细胞呈强阳性表达,参麦注射液干预组肺组织 ICAM-1 表达较模型组减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。如图 3 所示,caspase-3 免疫组化染色阳性结果为细胞质呈棕黄色着色。假手术组大鼠肺组织偶见 caspase-3 阳性表达细胞,SAP 模型组大鼠肺组织 caspase-3 阳性表达细胞数量增加,而参麦注射液干预组肺组织 caspase-3 阳性表达细胞数量较模型组减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

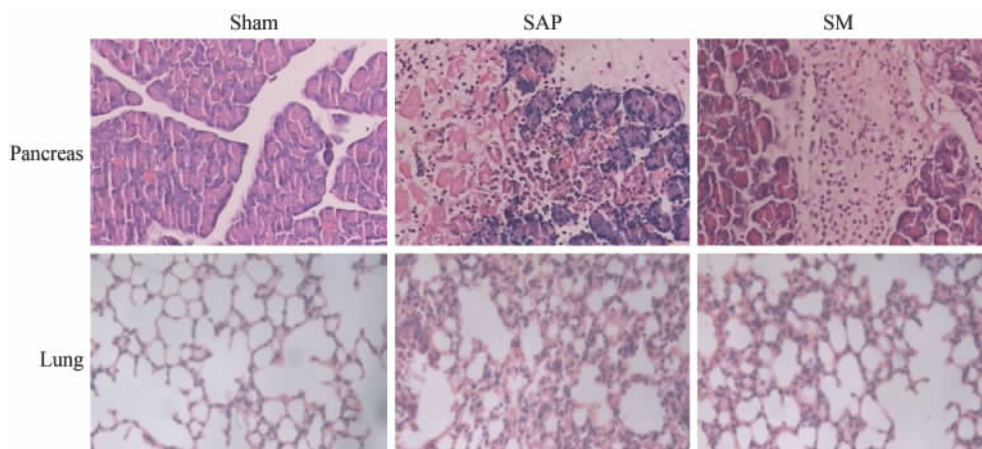


图 1 三组大鼠胰腺组织及肺组织病理学改变(H-E 染色)

Fig 1 Morphological changes of pancreas and lung in the three groups (H-E staining)

SAP: Severe acute pancreatitis; SM: Shenmai injection treatment. Original magnification:  $\times 400$

表 1 三组大鼠肺组织 MPO 活性及 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量的比较

Tab 1 Activity of MPO and contents of MDA, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the lung tissues of three groups

$n=10, \bar{x} \pm s$

Group	MPO $z_B/(U \cdot g^{-1})$	MDA $m_B/(\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$	TNF- $\alpha$ $w_B/(\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1})$	IL-1 $\beta$ $w_B/(\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1})$
Sham	$0.42 \pm 0.07$	$1.32 \pm 0.17$	$6.25 \pm 2.14$	$4.25 \pm 1.23$
SAP	$1.95 \pm 0.21^{**}$	$2.38 \pm 0.40^{**}$	$23.71 \pm 6.08^{**}$	$14.01 \pm 3.50^{**}$
SM	$1.54 \pm 0.16^{**\Delta\Delta}$	$1.95 \pm 0.31^{**\Delta\Delta}$	$17.93 \pm 4.55^{**\Delta\Delta}$	$9.13 \pm 3.19^{**\Delta\Delta}$

SAP: Severe acute pancreatitis; SM: Shenmai injection treatment; MPO: Myeloperoxidase; MDA: Malondialdehyde; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$ .  $^{**} P < 0.01$  vs sham group;  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$  vs SAP group

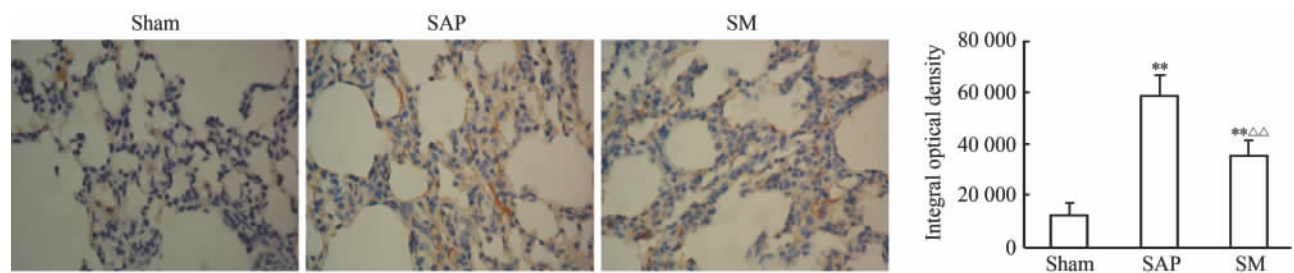


图 2 三组大鼠肺组织 ICAM-1 表达水平

Fig 2 Expression of ICAM-1 in the lung tissues of three groups

SAP: Severe acute pancreatitis; SM: Shenmai injection treatment; ICAM-1: Intercellular adhesion molecule-1. Original magnification:  $\times 400$  (Immunohistochemical staining).  $^{**} P < 0.01$  vs sham group;  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$  vs SAP group.  $n=10, \bar{x} \pm s$

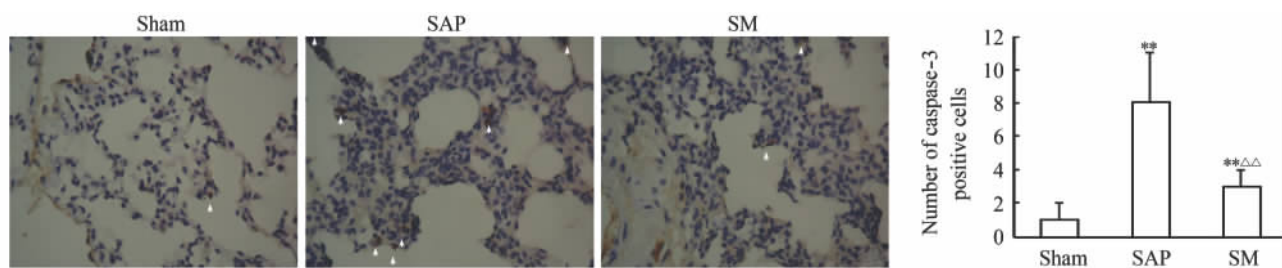


图 3 三组大鼠肺组织 caspase-3 表达水平

Fig 3 Level of caspase-3 expression in the lung tissues of three groups

SAP: Severe acute pancreatitis; SM: Shenmai injection treatment. Arrows indicate caspase-3 positive cells. Original magnification:  $\times 400$  (Immunohistological staining).  $^{**} P < 0.01$  vs sham group;  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$  vs SAP group.  $n=10, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

SAP 常伴有全身炎症反应综合征,并导致其他重要脏器功能受损,包括肺、肾、肝甚至心脏<sup>[4]</sup>。合并肺损伤导致急性呼吸窘迫综合征是 SAP 患者早期死亡的最主要原因之一。目前认为大量中性粒细胞在肺内聚集、黏附并促进炎性介质释放导致的肺血管内皮损伤是 SAP 后急性肺损伤的重要特征。SAP 释放的胰酶及炎性介质经血液循环至肺截留,继而激活肺部组织免疫细胞,释放氧自由基及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎性介质<sup>[5]</sup>。TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  等可激活肺内皮细胞,促使其上调 ICAM-1 等黏附分子。血液中的中性粒细胞借助 ICAM-1 等黏附分子黏附于微血管内皮细胞表面,跨血管迁移于炎症部位积聚,促进并加重急性肺损伤的进展<sup>[6-7]</sup>。另外,有研究表明,caspase-3 在大鼠急性胰腺炎相关性肺损伤的发病机制中也发挥了重要作用<sup>[8]</sup>。活化的 caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键酶类,一般以无活性前体存在于细胞质中,通过特异性的裂解底物而发挥其执行细胞凋亡的功能<sup>[9]</sup>。

参麦注射液源于《症因脉治》中的参冬饮,主要含有人参皂苷、人参多糖、甾苷、有机酸等有效成分,这些成分能加强机体器官抗应激能力,调节和促进机体免疫功能<sup>[10]</sup>,临床上主要用于心肺功能不全的治疗<sup>[11-12]</sup>。本实验着重观察了参麦注射液对 SAP 诱发肺损伤的影响,发现在造模前给予参麦注射液干预,可以减轻胰腺和肺的损伤,同时降低 SAP 后肺组织 MPO 活性和 MDA 含量。MPO 是中性粒细胞嗜苯胺蓝颗粒中一种重要的含铁溶酶体,是中性粒细胞的特异性标记,其活性升高反映了中性粒细胞的激活<sup>[13]</sup>。而中性粒细胞是产生氧自由基的主要细胞,氧自由基可以攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化损伤,并由此形成脂质过氧化物如 MDA、酮基等。本实验结果表明,参麦注射液具有显著的抗氧化损伤效果。同时参麦注射液可以降低肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量及 ICAM-1 表达,提示其抗炎反应效果显著。另外,本研究还显示参麦注射液干预组 caspase-3 表达降低,提示其可通过抑制肺组织细胞凋亡而达到减轻肺损伤的目的。

综上所述,参麦注射液能够减轻 SAP 相关性肺损伤,该作用是对原发病的治疗和对肺的直接保护双重作用的结果;其对肺的直接保护作用与抗氧化损伤、抗炎反应和抗凋亡等有关。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Mayerle J, Dummer A, Sendler M, Malla S R, van den Brandt C, Teller S, et al. Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(Suppl 2): 47-51.
- [2] Elder A S, Saccone G T, Dixon D L. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms underlying augmented secondary injury[J]. Pancreatol, 2012, 12: 49-56.
- [3] 黄翠萍, 杨和平, 张珍祥. 参麦注射液对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤防护机制探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28: 67-68.
- [4] Beger H G, Rau B M. Severe acute pancreatitis: clinical course and management [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13: 5043-5051.
- [5] Liu M, Shi L, Chen M, Chen S, Zou X. Effects of c-Jun N-terminal kinase signaling pathway on severe acute pancreatitis-associated lung injury[J]. Pancreas, 2012, 41: 358-366.
- [6] Ward P A. Oxygen radicals, cytokines, adhesion molecules, and lung injury [J]. Environ Health Perspect, 1994, 102(Suppl 10): 13-16.
- [7] Zhang X, Wu D, Jiang X. ICAM-1 and acute pancreatitis complicated by acute lung injury[J]. JOP, 2009, 10: 8-14.
- [8] Sha H, Ma Q, Jha R K, Wang Z. Resveratrol ameliorates lung injury via inhibition of apoptosis in rats with severe acute pancreatitis[J]. Exp Lung Res, 2009, 35: 344-358.
- [9] Miura M. Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4: 1-16.
- [10] 曹旭东, 丁志山, 陈建真. 参麦注射液药理及临床研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17: 104-106.
- [11] Ma R G, Wang C X, Shen Y H, Wang Z Q, Ma J H, Huang L S. Effect of *Shenmai* injection on ventricular diastolic function in patients with chronic heart failure: an assessment by tissue Doppler imaging[J]. Chin J Integr Med, 2010, 16: 173-175.
- [12] Li J S, Wang H F, Li S Y, Yu X Q, Wang Z W. *Shenmai* injection for chronic pulmonary heart disease: a systematic review and meta-analysis[J]. J Altern Complement Med, 2011, 17: 579-587.
- [13] Liu H B, Cui N Q, Li D H, Chen C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 403-407.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩