

高迁移率族蛋白 B1 与大鼠急性胰腺炎模型病情严重程度的关系

龙奎, 刘训强, 孙敏

(昆明医科大学第二附属医院腹部微创外科, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 与大鼠急性胰腺炎模型病情严重程度关系. **方法** 制作大鼠重症急性胰腺炎 A 组、轻症急性胰腺炎 B 组、正常对照组 C 组模型各 10 只, 于造模后 12 h、24 h、48 h 采血, 采用酶联免疫法 (ELISA) 检测各组大鼠模型不同时间段血清 HMGB1 含量的变化. **结果** 大鼠血清 HMGB1 在各时间点测量值 A 组高于 B 组高于 C 组, $P < 0.05$, 具有统计学意义. **结论** 大鼠血清 HMGB1 与急性胰腺炎的病情严重程度成正相关.

[关键词] 高迁移率族蛋白 B1; 大鼠急性胰腺炎模型; 病情严重程度.

[中图分类号] R657.5+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0023 - 03

The Relationship between HMGB1 and Serious Degree of Acute Pancreatitis in Rats

LONG Kui, LIU Xun - qiang, SUN Min

(Dept. of Abdominal Minimally Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between high mobility race protein B1 (HMGB1) and serious degree of acute pancreatitis in rats. **Methods** Acute pancreatitis model in rats was established. Rats were divided into 3 groups: group A (severe acute pancreatitis group), group B (mild acute pancreatitis group), and group C (normal control group), and 10 rats in each group. Blood samples of rats in 3 groups were collected at 12 h, 24 h and 48 h after establishing model, and the serum levels of HMGB1 were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result** The serum levels of HMGB1 of rats in group A were higher than group B, and in group B were higher than group C at different time points, the difference had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The serum levels of HMGB1 are positively related with the serious degree of acute pancreatitis.

[Key words] High mobility race protein B1; Acute pancreatitis models in rats; Serious degree of acute pancreatitis

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床上常见的一种急腹症, 尤其是重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 目前仍是临床常见的、严重威胁人类健康的重大疾病, 最近国内外有研究显示^[1] 高迁移率族蛋白 B1 (high mobility race protein B1, HMGB1) 作为新的潜在的晚期炎症介质, 参与了急性胰腺炎、脓毒症和全身炎症反应综

合症 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 的发病过程, 是内毒素致死效应的晚期重要炎症介质, 并可维持和延长炎症, 还是决定细胞选择凋亡或坏死的一个关键信号. 本研究通过对大鼠 AP 模型血清中 HMGB1 水平进行动态观察, 进一步探讨 HMGB1 与 AP 的关系和临床意义.

[基金项目] 云南省卫生厅科技基金资助项目 (2011WS0097)

[作者简介] 龙奎 (1977~), 男, 云南昆明市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事腹部微创外科临床工作.

[通讯作者] 孙敏. E-mail:13888907312@139.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年清洁级 SD 雌性大鼠 30 只, 体重 300 ~ 400 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供。置昆明医科大学实验动物中心饲养, 控制温度 15 °C ~ 25 °C, 规律光照 (12 h:12 h), 保持环境清洁。专用饲料喂养, 自由摄食及饮水, 饲料及饮用水新鲜无污染。

1.2 分组

随机分为 3 组: 重症急性胰腺炎 (SAP) 组 (A 组)、轻症急性胰腺炎 (mild acute pancreatitis MAP) 组 (B 组)、正常对照组 (C 组), 各组 10 只。

1.3 制作动物模型方法

各组大鼠术前禁食 24 h, 禁水 6 h。用 3% 戊巴比妥钠 (1.2 mL/kg 体重) 腹腔内注射麻醉大鼠成功后, 置手术台取仰卧位固定大鼠, 腹部备皮后碘伏消毒; 上腹部右旁正中切口入腹, 暴露胆总管及胃十二指肠。A 组: 仔细寻找、辨认十二指肠降部及胰胆管走向, 用无损伤小血管钳夹闭确认的靠近肝门部的胆总管, 在胆总管对系膜缘肠壁用去尖磨钝的 1 mL 注射器针头插入肠腔, 沿乳头部方向的壶腹中心轻轻地探入胆总管并轻巧的向前推约 0.5 cm, 按以 0.1 mL/min 的速度向胰胆管内逆行注入 5% 牛磺胆酸钠 (ST) 溶液 (0.1 mL/100 g), 并留置针头在胆总管内约 2 min。肉眼观察确认大鼠胰腺组织颜色变为砖红色或见出血点后拔出针头, 去除血管钳, 十二指肠进针处细针线 8 字缝合浆肌层一针, 用消毒棉签吸净腹腔内残留麻药及渗出, 缝合腹壁各层, 建立大鼠 SAP 模型。B 组向胰胆管内逆行注入 0.5% 牛磺胆酸钠 (ST) 溶液, 建立大鼠 MAP 模型。C 组: 开腹后仅轻揉十二指肠、提拉、翻转肠管 5min 后, 缝合腹壁各层。各组大鼠清醒后自由饮水, 禁食。

1.4 血清标本的采集

各组均在手术结束后第 12 h、24 h、48 h 各时间点用乙醚吸入麻醉大鼠, 用毛细点样管插入大鼠眶后静脉丛采血约 0.5 mL, 置入 37 °C 恒温箱内 30 min, 3 000 r/min 高速离心, 取出上面血清, 置于 -80 °C 冰箱内保存。

1.5 血清 HMGB1 的检测

采用酶联免疫法 (ELISA) 检测各组 12 h、24 h、48 h 各时间点大鼠血清高迁移率族蛋白 B1

(HMGB1) 浓度。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 统计软件包处理, 数据均采用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对各组各时间点血清 HMGB1 进行方差齐性检验, 方差齐, 用 LSD-*t* 检验; 方差不齐, 用 Wilcoxon 符号秩和检验处理, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间段存活只数

A 组低于 B 组低于 C 组, 说明重症急性胰腺炎组死亡率高, 明显低于轻症急性胰腺炎组, 表 1。

表 1 各组不同时间段存活只数 (只)

Tab. 1 The number of survival animals in different period (only)

组 别	12 h	24 h	48 h
A 组	8	6	4
B 组	10	9	8
C 组	10	10	10

2.2 高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)

C 组血清 HMGB1 水平在 12 h、24 h、48 h 各时间点分别为 (1.50 \pm 0.27) μ g/L、(1.75 \pm 0.42) μ g/L、1.62 \pm 0.46 μ g/L, 无明显差异。造模后 12 h 大鼠 A、B 组血清 HMGB1 测量值升高, 随着时间的延长, 血清 HMGB1 逐渐升高, 24 h、48 h 仍维持在高水平。血清 HMGB1 测量值在 12 h、24 h、48 h 各时间点 A 组高于 B 组高于 C 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 表 2。

表 2 各组高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平比较
[($\bar{x} \pm s$), μ g/L]

Tab. 2 Changes of HMGB1 in rats in all groups
[($\bar{x} \pm s$), μ g/L]

组 别	12 h	24 h	48 h
A 组	2.52 \pm 0.48*	2.83 \pm 0.56*	3.16 \pm 0.58*
B 组	1.80 \pm 0.39 [△]	2.54 \pm 0.73 [△]	2.63 \pm 0.43 [△]
C 组	1.50 \pm 0.27	1.75 \pm 0.42	1.62 \pm 0.46

与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

3 讨论

MAP 是胰腺腺体水肿充血增大, 被膜紧张, 及时解除病因, 则炎症较易消退. SAP 是以胰腺自身消化及坏死为主要特征的一种全身性疾病, 可以引发局部和全身性过度炎症反应, 造成低血容量、血管渗出、休克和多器官功能不全综合征 (multiple organ dysfunction, MODS). 具有病情凶险、病程进展快、并发症多和病死率高等特点^[1].

急性胰腺炎的发病机制是一个综合的、复杂的病理生理过程, 主要经历了胰酶激活、自身消化和炎症反应等过程. 本实验选择大鼠做实验的原因是: HMGB1 高度保守, 人与啮齿动物氨基酸序列同源性高达 98% 以上, 而大小鼠氨基酸序列同源性高达 100%. 鼠和人仅 C 端后一个氨基酸不同, 人为谷氨酸, 鼠为天冬氨酸^[2]. HMGB1 广泛分布于脑、肺、肝、肾、心、脾、淋巴等组织中, HMGB1 在大多数组织中存在胞核, 少数存在于胞浆中, 主要在肝脑组织. 胞核 HMGB1 参与 DNA 修复、类固醇激素调控、DNA 重组、细胞分化等生命活动. 人类 HMGB1 基因位于 13q12 染色体上, HMGB1 基因包括 4 个内含子和 5 个外显子, 以及包含一个沉默元件, 因此, 在一般环境条件下, HMGB1 的表达量维持在基础水平^[3]. 越来越多的研究表明, 胞外 HMGB1 是内毒素致死性效应中的一种重要的晚期炎性介质, 是一种新的促炎细胞因子. AP (特别 SAP) 时 HMGB1 在促炎因子作用下由中性粒细胞和单核巨噬细胞释放, 也可由胰腺坏死细胞被动放, HMGB1 可在细胞外与肿瘤坏死因子 (TNF α)、白细胞介素 -1 (IL-1)、脂多糖 (LPS) 等重要促炎因子相互作用, 相互促进分泌, 形成了正反馈作用, 从而使 HMGB1 分泌增加 3-5 倍, 这样就使炎症反应不断得以放大、加重. 在炎症反应的后期, 这种正反

馈效应对 AP (特别 SAP) 全身炎症反应的维持起到了相当重要的作用^[4].

在本次试验中, 笔者动态观察轻重症急性胰腺炎大鼠模型血清中 HMGB1 水平的变化, SAP 由于严重的腺泡破坏, 淀粉酶生成减少, 血、尿淀粉酶值反而不升高, 在 SAP 的诊断中缺乏特异性. 此项研究结果证明了高迁移率族蛋白 B1 与急性胰腺炎病情严重程度相关, 尤其与重症急性胰腺炎有关系, 可以考虑将 HMGB1 作为诊断急性胰腺炎的一项化验检查, 其和临床表现、体征、血尿淀粉酶、脂肪酶、CT、血细胞分析共同来诊断重症急性胰腺炎, 在以后的临床中通过对急性胰腺炎患者血清 HMGB1 的检测, 判断患者病情的轻重, 尽早诊断 SAP, 并在现有的治疗中增加 HMGB1 拮抗剂辅助治疗 AP, 减少并发症, 降低死亡率, 为以后的临床诊断 AP 提供理论和实验依据.

[参考文献]

- [1] ZHANG X P, LIU D R, SHI Y. Study progress in therapeutic effects of traditional Chinese medicine monomer in severe acute pancreatitis [J]. Zhejiang Univ Sci B, 2007, 8: 147 - 152.
- [2] WARSHAW A L. Improving the treatment of necrotizing pancreatitis step up [J]. N Engl J Med, 2010, 362: 1535 - 1537.
- [3] 卿伯华, 曾之耀, 王湘英, 等. NF- κ B、HMGB1 在重症急性胰腺炎肠黏膜损伤中的时点表达及其意义 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(33): 3390 - 3396.
- [4] LUM H K, LEE K L. The human HMGB1 promoter is modulated by a silencer and an enhancer containing intron [J]. Biochim Bio-phys Acts, 2001, 1520(1): 79 - 84.
- [5] CHEN G, WARD M F, SAMA A E, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine [J]. J Interferon Cytokine Res, 2004, 24(6): 329 - 333.

(2012-07-06 收稿)

去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在大鼠体内的生物转化

黄敏洁, 郝静超, 王继良, 王伟

(昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在大鼠体内的生物转化。 **方法** 去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱对大鼠经口投药 30 min 内收集到的胆汁样品进行高效液相色谱串联质谱仪 (LC-MS) 测定。 **结果** 发现去氢钩藤碱的底物和 2 个 I 相代谢物、2 个 II 相代谢物可以检出, 而异去氢钩藤碱的 I 相代谢物没有检出, 但 II 相代谢物检出 4 个。 **结论** 分析结果显示这 2 个四环氧化吲哚生物碱的代谢与钩藤碱、异钩藤碱的肝脏代谢非常相似, 并且都存在经口投药之后的肝首过效应。体外实验验证了以上代谢过程的结论, 并显示是肝微粒体酶 CYP450 对去氢钩藤碱、异去氢钩藤碱在肝脏的生物转化起催化作用。

[关键词] 去氢钩藤碱; 异去氢钩藤碱; 生物转化; 代谢

[中图分类号] R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 10 - 0026 - 06

Biotransformation of Corynoxine and Isocorynoxine in Rats

HUANG Min - Jie, HAO Jing - Chao, WANG Ji - Liang, WANG Wei

(School of Pharmaceutical Sciences and Yunnan Provincial Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the biotransformation of Corynoxine and Isocorynoxine in Rats. **Methods** Corynoxine and isocorynoxine were administered orally to rats, and the bile samples of rats were collected to analyze by LC-MS. **Results** It was found for the bile samples taken for first 30 mins that two phase I metabolites and two phase II ones were detected for corynoxine by LC-MS. However for isocorynoxine there were 4 phase II metabolites found but no phase I ones in the same sample. **Conclusions** There is a hepatic first-pass effect after their oral administration. According to analysis of samples in vivo and in vitro by LC-MS and comparison with the fate of rhynchophylline and isorhynchophylline in rats, corynoxine and isocorynoxine seem to have a similar biotransformation. Also incubation of the substrates with rat liver microsomes show that CYP450 plays a key role in their metabolic catalysis.

[Key words] Corynoxine; Isocorynoxine; Biotransformation; Metabolism

钩藤钩是茜草科钩藤属植物的带钩茎枝, 作为钩藤散与抑肝散等传统中药的主要成分广泛应用于治疗头痛、眩晕、高血压等临床症状。1999 年经过临床试验, Terasawa Katsutoshi 等推荐钩藤散作为治疗血管性痴呆的有效汉方药^[1]。2003 年 Watanabe Hiroshi 等论证了钩藤散的抗痴呆作用源于钩藤钩中所含有的四环氧化吲哚生物碱——钩藤碱 (Rhynchophylline)、异钩藤碱 (Isorhynchophylli-

ne)、去氢钩藤碱 (Corynoxine)、异去氢钩藤碱 (Isocorynoxine) 的消除自由基、抗高血压及抗兴奋毒素作用^[2]。

去氢钩藤碱与异去氢钩藤碱在化学结构上的唯一区别在于 C-7 的构型, 前者是 R 型, 后者是 S 型, 化学式都是 $C_{22}H_{26}N_2O_4$, 相对分子量都是 382.5, 见图 1。

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011Y177); 云南省高校药学重点实验室重点项目 (2011YXZD02)

[作者简介] 黄敏洁 (1986~), 女, 四川雅安市人, 在读硕士研究生, 主要从事药物代谢与药物动力学研究工作。

[通讯作者] 王伟. E-mail:wangwei.kmu@hotmail.com