

丹参酮 IIA 磺酸钠对大鼠急性胰腺炎高迁移率族蛋白 B1 下调作用的研究

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** 探讨丹参酮 IIA 磺酸钠注射液是否对大鼠急性胰腺炎模型血清高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 有下调作用. **方法** 复制重症急性胰腺炎组 (A1 组) 及重症急性胰腺炎治疗组 (A2 组), 轻症急性胰腺炎组 (B1 组) 及轻症急性胰腺炎治疗组 (B2 组) 动物模型, 每组 10 只大鼠, A2、B2 组于造模后 3、27 h 在大鼠后大腿外侧肌注丹参酮 IIA 磺酸钠注射液 (4 mg/kg). 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** 血清 HMGB1 测量值在各时间点 A1 组均高于 A2 组 ($P < 0.05$), B1 组均高于 B2 组 ($P < 0.05$), 差异具有统计学意义. **结论** 丹参酮 IIA 磺酸钠注射液对大鼠急性胰腺炎模型血清 HMGB1 有拮抗作用.

[关键词] 丹参酮 IIA 磺酸钠注射液; 大鼠急性胰腺炎模型; 高迁移率族蛋白 B1; 下调作用

[中图分类号] R657.5+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 11 - 0032 - 03

Downregulating Effect of Chinese Medicine Sulfotanshinone Sodium on HMGB1 in Rats with Acute Pancreatitis

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 downregulating effect of Chinese medicine Sulfotanshinone Sodium on HMGB1 in rats with acute pancreatitis. **Methods** Forty rats were randomly divided into 4 groups: Severe acute pancreatitis (A1) group, Severe acute pancreatitis treatment (A2) group, mild acute pancreatitis (B1) group and mild acute pancreatitis treatment (B2) group. Rats in A2 and B2 groups were given injection of sulfotanshinone Sodium (4 mg/kg) 3 and 27 hours after establishment of acute pancreatitis. The blood samples of rats in 4 groups were collected at 12 h, 24 h and 48 h after establishment of acute pancreatitis. The serum levels of HMGB1 were detected by enzyme league immune method (ELISA). **Result** The serum levels of HMGB1 in group A1 were higher than the group A2 at different time points ($P < 0.05$), in group B1 were higher than the group B2 at different time points ($P < 0.05$). **Conclusion** Chinese medicine Sulfotanshinone Sodium has downregulating effect on HMGB1 in rats with acute pancreatitis.

[Key words] Sulfotanshinone Sodium; Acute pancreatitis models in rats; HMGB1; Downregulating role

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, 高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein, HMGB1) 作为一种重要的炎性介质

[基金项目] 云南省卫生厅内设研究机构基金资助项目 (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

参与多种炎症反应, 尤其是急性胰腺炎, AP 患者血清 HMGB1 水平明显升高且与病情严重程度相关^[4]. 目前, 学术界对于 AP 和 HMGB1 的关系的研究多集中在发病机制和针对其机制所采取的抑制炎症因子的治疗措施上, 但对于其发病的详细过程还不甚明了, 国外已经在研究用 HMGB1 的拮抗剂 (如抗 HMGB1 抗体、丙酮酸乙酯、HMGB1A 盒、正丁酸钠、第 2 相酶诱导剂等) 在动物急性胰腺炎模型上试验性用药, 但这些药物还未用于临床, 而且上述这些药物的临床效果和其在人体内是否会产生不良反应以及消除这些不良反应尚有待研究. 但对中药提取物丹参酮 IIA 磺酸钠注射液研究甚少. 本研究通过丹参酮 IIA 磺酸钠注射液对大鼠 AP 模型血清中 HMGB1 水平的下调作用, 进一步探讨丹参酮 IIA 磺酸钠注射液对大鼠 AP 治疗作用的机制.

1 材料与方 法

1.1 实验动物

健康成年清洁级 SD 雌性大鼠 40 只, 体重 300 ~ 400 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供. 饲养温度 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

40 只 SD 大鼠随机分为 4 组: 重症急性胰腺炎组 (A1 组)、重症急性胰腺炎治疗组 (A2 组), 轻症急性胰腺炎组 (B₁ 组), 轻症急性胰腺炎治疗组 (B2 组), 正常对照组各组 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, 暴露胆总管及十二指肠. A1 组、A2 组: 辨认十二指肠降部肠管壁内潜行的十二指肠乳头及胆总管走向, 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, 沿乳头部的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. B1 组、B2 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. A2 组、B2 组于建模后 3 h、27 h 时间点肌注丹参酮 IIA 磺酸钠注射液 (4 mg/kg).

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.

1.6 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.

1.5 统计学处理

应用 SPSS 统计软件包处理, 数据均采用均值 ± 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组不同时间段存活只数

A1、A2 组低于 B1、B2 组, 说明重症急性胰腺炎组死亡率高; A1 组低于 A2 组, 统计分析支持丹参酮 IIA 磺酸钠注射液有降低大鼠重症急性胰腺炎死亡率的作用, 见表 1.

表 1 各组不同时间段存活只数

Tab. 1 The number of survival animals at different period

组 别	12 h	24 h	48 h
A1 组	8	6	4
A2 组	9	7	6
B1 组	10	9	8
B2 组	10	9	9

2.2 高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)

造模后 12 h 大鼠四组血清 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 A1 组高于 A2 组, B1 组高于 B2 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2.

表 2 各组高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 水平比较 $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/L}]$
Tab. 2 Changes of HMGB1 in rats of all groups $[(\bar{x} \pm s), \mu\text{g/L}]$

组 别	12 h	24 h	48 h
A1 组	2.52 ± 0.48	2.83 ± 0.56	3.16 ± 0.58
A2 组	2.23 ± 0.41*	2.47 ± 0.63*	2.75 ± 0.66*
B1 组	1.80 ± 0.39	2.54 ± 0.73	2.63 ± 0.43
B2 组	1.70 ± 0.32 [▲]	2.04 ± 0.41 [▲]	2.11 ± 0.52 [▲]

与 A1 组比较, * $P < 0.05$; 与 B1 组比较, [▲] $P < 0.05$.

3 讨论

HMGB1 是一种高度保守的核蛋白, 广泛分布于哺乳动物细胞. 随着其晚期促炎作用的发现, HMGB1 成为近年来危重医学研究的热点之一. 人 HMGB1 基因位于染色体 13q12, 编码的 HMGB1 分子由 215 个氨基酸组成, 相对分子质量为 30000, 含两个与 DNA 结合的结构域 A 盒、B 盒, 并有一富含酸性氨基酸的 C 末端. HMGB1 广泛分布于淋巴组织、脑、肝、肺、心、脾、肾等组织中. 胞核 HMGB1 参与细胞分化、DNA 修复、DNA 重组、类固醇激素调控等生命活动. 急性胰腺炎时, HMGB1 要从细胞核转移至细胞浆, 然后再进入细胞浆内分泌性溶酶体中, 其膜与细胞膜融合后出胞至细胞外. HMGB1 一旦分泌到细胞外, 即可发挥致炎作用. 胞外 HMGB1 是启动和维持细胞因子网络级联瀑布式反应的中心分子, HMGB1 出现较晚且持续时间较长, 在 AP (特别 SAP) 的发病中具有重要作用. HMGB1 作为重要的一种晚期炎症因子参与了急性胰腺炎的全局炎症反应, SAP 机体早期大量细胞因子和炎症介质 (包括 TNF、IL 和 HMGB1 等^[2]) 过度释放导致严重的全身炎症反应综合征, 是造成全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)^[3]和多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF) 重要原因.

近年国内外有关研究单位非常重视 HMGB1 拮抗剂的发展, 研发了多种在动物实验中有明显效果的 HMGB1 拮抗剂, 如抗 HMGB1 抗体、丙酮酸乙酯 (EP)、HMGB1A 盒、正丁酸钠、第 2 相酶诱导剂、拟胆碱药物、胎球蛋白、抗 HMGB1B 盒、热休克蛋白 72 等, 但这些药物均还未用于临床, 且对人的不良反应也是未知数, 故等到药物用到

患者身上还有很长的时间.

目前, 国内外对 HMGB1 拮抗剂中药的研究比较少, 天然药物 (当归、绿茶提取物^[4])、中药活性成分 (丹参酮 I、小檗碱、大黄素^[5]等) 对炎症介质 HMGB1 的基因表达和胞外释放具有明显抑制作用, 并提高重症炎症小鼠的存活率. 但中药丹参酮 IIA 磺酸钠注射液对大鼠急性胰腺炎高迁移率蛋白 B1 (HMGB1) 影响的实验研究的相关报道极少.

在本次试验中, 动态观察中药提取物丹参酮 IIA 磺酸钠注射液治疗轻重症大鼠急性胰腺炎模型血清中 HMGB1 水平的变化, 实验表明: 中药提取物丹参酮 IIA 磺酸钠注射液对大鼠 AP (包括 MAP 和 SAP) 模型的血清 HMGB1 的表达有下调作用, 对 SAP 有降低死亡率的作用. 其机制可能是丹参酮 IIA 磺酸钠注射液可选择性地废除 LPS 诱导的 HMGB1 向胞浆转位和释放^[6]. 笔者治疗急性胰腺炎时可在现有的治疗中增加 HMGB1 拮抗剂丹参酮 IIA 磺酸钠注射液进行辅助治疗, 减少并发症, 降低死亡率, 为以后的临床使用丹参酮 IIA 磺酸钠注射液辅助治疗急性胰腺炎患者 (特别是重症急性胰腺炎患者) 提供理论和实验依据, 为以后临床治疗重症急性胰腺炎提供了一条新的方法.

[参考文献]

- [1] 王洪亮, 吴传新. 重症急性胰腺炎时 HMGB1 与肝损害的关系 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32 (2): 210 - 211.
- [2] 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.
- [3] 白斗, 王东. 急性胰腺炎发病机制中炎症因子的作用

(下转第 37 页)

降解而失活的性质, 对大肠杆菌有良好抗菌性的功能, 为蛇毒 cathelicidin 抗菌肽在机体内能够发挥很强的抑菌效果提供了理论基础, 为抗菌肽生物活性的进一步研究打下了基础, 为抗菌肽临床应用的提供了新的方向。

[参考文献]

- [1] 李明. Cathelicidin 抗菌肽的特征及其应用[J]. 免疫学杂志, 2006, 3:345 - 347.
- [2] MATSUZAKI K. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1376(3):391 - 400.
- [3] DATHEM, WIEPRECHT T, NIKOLENKO H, et al. Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides [J]. FEBS Lett, 1997, 403(2):208 - 2123.
- [4] DATHE M. Structural features of helical antimicrobial peptides; their Potential to modulate Activity on model membranes and biological cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 462(1-2):71 - 87.
- [5] GIANGASPERO A, SANDRI L, TOSSI A. Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides [J]. Eur J Biochem, 2001, 268(21):5 589 - 5 600.
- [6] CIRIONI O, GIACOMETTI A, GHISELLI R, et al. Pretreatment of central venous catheters with the cathelicidin BMAP-28 enhances the efficacy of antistaphylococcal agents in the treatment of experimental catheter-related infection [J]. Peptides, 2006, 27:2 104 - 2 110.
- [7] PESCHEL A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides [J]. Trends Microbiol, 2002, 10:179 - 186.

(2012 - 08 - 21 收稿)

(上接第 34 页)

- 研究进展 [1]. 吉林医学, 2011, 32(3):572 - 573.
- [4] WANG H, LI W, LI J, et al. The aqueous extract of a popular herbal nutrient supplement, *Angelica sinensis*, protects mice against lethal endotoxemia and sepsis [J]. J Nutr, 2006, 136(2):360 - 365.
- [5] 陈国千, 吴国荣, 赵琪, 等. 小檗碱对 HMGB1 胞外释放的影响 [J]. 中华中医药, 2009, 24(11):1 530 - 1 532.
- [6] XU M, DONG M Q, CAO F L, et al. Tanshinone IIA reduces lethality and acute lung injury in LPS-treated mice by inhibition of PIA2 activity [J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 6076:194 - 200.

(2012 - 09 - 07 收稿)