

三七总皂甙对大鼠急性胰腺炎腺泡细胞钙超载的调节

刘志恒, 董文志, 莫小华

(昆明医科大学第二附属医院肝胆外科, 云南 昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨三七总皂甙 (PNS) 对急性重症胰腺炎 (SAP) 大鼠胰腺腺泡细胞的保护作用及其机制。 **方法** 30 只 SD 大鼠分为假手术组 (SO 组)、急性重症胰腺炎 (SAP)、三七总皂甙预处理组 (PNS 组)。采用经肠壁逆行行胰胆管注射法建立大鼠急性重症胰腺炎模型, SO 组进腹后仅翻动胰腺和十二指肠后关腹, 不注入牛磺胆酸钠。其中 PNS 组模型建立后立即予以腹腔注射三七总皂甙 (50 mg/mL 血塞通注射液 (0.1 mL/100 g), 假手术组 (SO 组)、急性重症胰腺炎 (SAP) 组建模后注射生理盐水 (0.1 mL/100g)。建模 4 h 后检测大鼠血清淀粉酶 AMS、胰腺病理学变化了解胰腺炎的发病阶段。处死大鼠后取胰腺组织, 采用钙荧光指示剂 Fluo-3-AM 作用腺泡细胞, 在荧光显微镜下观察胰腺腺泡细胞荧光强度。使用流式细胞仪定量分析、计算出单个腺泡细胞内荧光强度 (fluorescent intensity, FI) 的平均值, 荧光强度值可以表示细胞内钙离子的浓度。 **结果** PNS 和 SAP 两组大鼠血清 AMS 水平均显著增高 ($P < 0.05$), SAP 组大鼠血清 AMS 水平显著高过 PNS 组 ($P < 0.05$)。PNS 和 SAP 两组大鼠胰腺组织病理学评分水平均显著增高 ($P < 0.05$)。PNS 组大鼠胰腺组织病理学评分显著低于 SAP 组 ($P < 0.05$)。通过流式细胞仪检测钙离子浓度提示: SO 组、SAP 组、PNS 组三组胰腺细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光强度具有统计学差异。SAP 组和 PNS 组较 SO 组大鼠胰腺细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光强度均有显著升高 ($P < 0.05$)。与 SAP 组相比, PNS 组大鼠胰腺细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的荧光强度均有显著降低 ($P < 0.05$)。 **结论** SAP 的发生与细胞钙超载有关, 并且钙超载程度越高, SAP 的病情越重。PNS 可以减轻胰腺腺泡细胞内钙超载, 可以减轻胰腺组织病理学改变。

[关键词] 三七总皂甙; 急性重症胰腺炎; 钙超载

[中图分类号] R576 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0017-04

Effect of *Panax notoginseng* Saponins on Calcium Overload of Acinar Cells in Rats with Acute Pancreatitis

LIU Zhi-heng, DONG Wen-zhi, MO Xiao-hua

(Hepatopancreatobiliary Surgery Dept. of The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To demonstrate the protective effect and its mechanism of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on severe acute pancreatitis (SAP) in rats of pancreatic acinar cell. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group (group SO), severe acute pancreatitis group (group SAP), and PNS preconditioning group (group PNS). There were 10 rats in each group. Rat SAP model was induced by retrograde injection of 5% taurocholic acid sodium to pancreatic duct. Group SO was just treated with pancreas and duodenum turning after abdominal closure, not with taurocholic acid sodium injection. The rats in group PNS were given by intraperitoneal injection of 0.1 mL/100g PNS 50 mg/mL (xuesetong injection 0.1 mL/100g) once the models were established. And rats in the other two groups were given 0.9% physiological saline. Rats serum AMS were detected at 4 hours after modeling, and pancreatic pathological changes were observed to understand the pathogenesis of acute pancreatitis. The pancreatic tissue was obtained and the fluorescence intensity (FI) of acinar

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2007C138M); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2014S16)

[作者简介] 刘志恒 (1987~), 男, 陕西宝鸡市人, 在读硕士研究生, 主要从事肝胆胰外科学临床工作。

[通讯作者] 莫小华. E-mail: 18314541437@163.com

cells was observed by calcium fluorescent tracer Fluo-3-AM using fluorescence microscope observation. The average value of single acinar cell FI was analyzed and calculated quantitatively using flow cytometry, which could represent the concentration of calcium ion in cells. **Results** In groups PNS and SAP, rats serum AMS levels and pancreatic tissue pathology scores were significantly increased ($P < 0.05$), and those in group SAP rats were significantly higher than in group PNS rats ($P < 0.05$). The calcium ion concentrations showed that there were statistical differences in pancreas FI of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ among three groups. Compared with group SO, the pancreas FI of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ in rats of groups SAP and PNS were significantly increased ($P < 0.05$). And compared with group SAP, FI of $[Ca^{2+}]_i$ in PNS group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The occurrence of SAP was related to cellular calcium overload, and the state of SAP became more serious with the higher degree of calcium overload. PNS could reduce the pancreatic intracellular calcium overload and the change of pancreatic tissue pathology.

[**Key words**] *Panax notoginseng saponins*; Severe acute pancreatitis; Calcium overload

急性重症胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是临床常见的急腹症, 起病急, 病情变化快, 发展凶险. 常在早期合并全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能衰竭 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) [1], 其病死率高达 20% ~ 30%. 而目前对于胰腺炎的发病机制目前还没有一个十分全面的解释. 随着人们的研究的深入, 关于胰腺炎钙超载学说越来越引起人们的重视. 三七总皂甙在治疗胰腺炎方面有着较为悠久的历史, 目前在临床中也广为使用, 其疗效也受到广泛认可. 本文通过建立大鼠急性重症胰腺炎模型, 并给予三七总皂甙进行干预, 观察三七总皂甙对 SAP 胰腺腺泡细胞钙超载的影响.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 30 只 (第三军医大学实验动物中心提供), 体质量 200 ~ 220 g, 分成假手术组 ($n = 10$), 急性重症胰腺炎(SAP)组 ($n = 10$), 三七总皂甙预处理组 (PNS 组) ($n = 10$).

1.1.2 主要药品和试剂

三七总皂甙 (血塞通注射液昆明兴中制药有限公司); 牛磺胆酸钠 (Sigma 公司); 3%戊巴比妥钠 (昆明医学院动物实验中心提供); FLUO-3-AM 试剂盒 (Sigma 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 采用抽签随机将上列大鼠 SD 随机编号分成 3 组, 每组 10 只;假手术模型组 (SO 组)、急性重症胰腺炎组 (CSAP 组)、三七总皂甙预

处理组 (PNS 组).

1.2.2 模型制作及给药方式 急性重症胰腺炎组: 实验大鼠建模前禁食 24 h, 不禁水. 使用 3%戊巴比妥钠 (0.1 mL/100 g) 腹腔内注射麻醉. 麻醉成功后, 大鼠平卧固定, 常规备皮消毒铺巾, 经上腹正中切口, 切口长度约 3 cm. 逐层切开, 进入腹腔, 使用棉签探及十二指肠, 找到胆胰管. 观察胰胆管的走行, 于胰胆管肝门处用无损伤丝线活结结扎胰胆管. 辨认潜行在十二指肠内的乳头的位置, 使用皮试注射针头于十二指肠乳头对侧肠壁无血管区戳一小孔, 去尖磨平的注射针头从小孔进入肠腔后沿乳头方向逆行通过乳头进入胆胰管, 并随胰胆管进入 1.0 cm, 用显微血管镊夹管固定注射器针头. 逆行注入 5%牛磺胆酸钠溶液 (0.1 mL/100 g) 以 0.2 mL/min 速度注射毕, 注射完毕后停留 3 min. 同时观察到胰胆管周围组织出现肿胀、出血、坏死等改变, 即为造模成功. 松开微血管夹, 移去穿刺针, 解开结扎在肝门部丝线. 逐层关腹. 其中假手术模型组 (SO 组) 模型制作: 进腹后仅翻动胰腺和十二指肠后关腹, 不注入牛磺胆酸钠, 其他术前准备及开腹方式同急性重症胰腺炎组 (SAP 组). 三七总皂甙预处理组 (PNS 组) 建立模型方式与 SAP 组相同, 但在关腹前使用 50 g/mL 血塞通注射液 (0.1 mL/100 g) 注入腹腔后逐层关腹. SAP 组及 SO 组大鼠腹腔注射 0.9%生理盐水 (0.1 mL/100 g). 在造模 4 h 后处死大鼠, 心脏采血, 经腹腔取胰腺组织标本.

1.3 标本处理方法

1.3.1 血清淀粉酶监测 心脏取血, 送往昆明医科大学第二附属医院检验科进行血清淀粉酶检测.

1.3.2 胰腺组织病理学评分 经腹腔获取胰腺组织, 取大小约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 胰腺组织用

10%甲醛溶液固定, 送往昆明医科大学第二附属医院病理科, 由病理科医师进行苏木素 - 伊红 (hematoxylin-eosin) 染色. 在光学显微镜下观察并按照采用改良 Grewal 等^[2]的方法对 SAP 大鼠胰腺组织损伤进行定量评估.

1.3.3 胰腺腺泡细胞内钙离子浓度的检测 胶原酶消化法获得胰腺腺泡细胞悬液. 将 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3-AM 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光加载细胞 30 min, 洗净细胞外荧光, 在荧光显微镜下观察胰腺细胞内钙离子的显影 (图 1). 所得胰腺细胞悬液使用流式细胞仪中调整细胞浓度为 5×10^8 个/L. 将 5 $\mu\text{mol/L}$ Fluo-3-AM 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光加载细胞 30 min, 洗净细胞外荧光, 应用 FCM (激发波长 488 nm) 随机测定单个胰腺细胞的荧光强度值, 取 1×10^4 个/L 胰腺细胞内钙离子的荧光强度的平均值.

1.4 统计学处理

以 SPSS 软件进行统计分析. 所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行方差齐性检验, 根据样本的性质采用 t 检验、单因素方差分析、LSD- t 检验. $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血清淀粉酶

与 SO 组比较, PNS 组和 SAP 组 2 组大鼠血清 AMS 水平均显著增高 ($P < 0.05$), 与 PNS 组比较, PNS 组大鼠血清 AMS 水平显著增高 ($P < 0.05$). 而 PNS 组与 SAP 组相比, PNS 组大鼠血清 AMS 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1.

2.2 胰腺组织病理学评分

SAP 组、PNS 组胰腺组织均出现了肿胀、渗出、点状出血、局灶性坏死. 与 SO 组比较, PNS 组和 SAP 组 2 组大鼠胰腺组织病理学评分水平均显著增高 ($P < 0.05$). 而 SAP 组与 PNS 组相比较, PNS 组大鼠胰腺组织病理学评分显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2.

2.3 胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度

SO 组、SAP 组、PNS 组 3 组胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度具有统计学差异. SAP 组和 PNS 组较 SO 组大鼠胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度均有显著升高 ($P < 0.05$). 与 SAP 组相比, PNS 组大鼠胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度均有显著降低 ($P < 0.05$), 见表 1.

3 讨论

近年来针对胰腺炎发病机制的研究逐渐深入. 各种发病机制的学说也日益涌进. 这其中“钙超载”学说成为目前研究的焦点. 而“钙超载”作为胰腺炎发病“扳机点”的假说是 Ward 等早在 1995 年提出的^[3]. 随后, 在动物实验中使用正是用胆囊收缩八肽 CCK8 进行干扰胰腺细胞, 从而引起细胞内钙离子迅速升高, 同时出现腺泡细胞坏死, 表达了胰腺炎状态, 进一步明确了“钙超载”与急性胰腺炎的关系^[4]. 大鼠胰胆管内逆行注射 CaCl_2 , 认为增加胰腺组织钙离子, 进而提高细胞内游离钙离子浓度, 随后大鼠的胰腺组织即出现炎症的病理改变^[5]. 蒲凡青等^[6]在其研究中发现, 胰腺细胞内钙离子浓度的高低与胰腺炎的病情的发展有一定关系, 腺泡内游离钙离子浓度逾高, 其炎症逾严重. 在通过研究急性胰腺炎发病中 NO 与 ET 关系时, 有学者也提出“钙超载”是 SAP 发生发展的枢纽^[7]. 这一系列观点都说明了钙离子与胰腺炎的发病及病情变化有着密切的关系.

本实验使用荧光显微镜直视下观察到与 fluo3-am 试剂结合的胰腺细胞内 Ca 离子的荧光显影. 并且使用流式细胞仪通过计算, 得出客观的荧光强度的数据. 数据表明: SAP 组腺泡细胞内钙离子浓度较假手术组显著升高, 可以说明钙超载是急性重症胰腺炎时细胞发生水肿、坏死的关键步骤.

三七作为云南省特色植物, 是中药中最珍贵的药物之一. 在临床多种疾病中也广为使用. 针对胰腺炎治疗, 三七总皂苷应用更为频繁, 但是目前对于其治疗胰腺炎的机制方面仍然是停留在炎症因

表 1 三七总皂甙对大鼠胰腺炎的血清淀粉酶 (AMS)、胰腺组织病理学评分、胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Panax Notoginseng Saponins on the effect of pancreatitis in rats serum amylase (AMS), pancreas histopathological grading, the fluorescence intensity of pancreas cells $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | <i>n</i> | 血清淀粉酶水平变化 (U/L) | 胰腺组织损伤评分 | 胰腺细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的荧光强度 |
|----------|----------|------------------|-----------------|----------------------------------|
| SO 组 | 10 | 782 \pm 20.55 | 2.26 \pm 0.44 | 3.45 \pm 0.48 |
| PNS 组 | 10 | 2862 \pm 65.04 | 7.88 \pm 0.33 | 7.91 \pm 0.93 |
| SAP 组 | 10 | 2615 \pm 37.41 | 6.92 \pm 0.27 | 7.03 \pm 0.73 |
| <i>P</i> | | <0.001 | <0.001 | <0.001 |

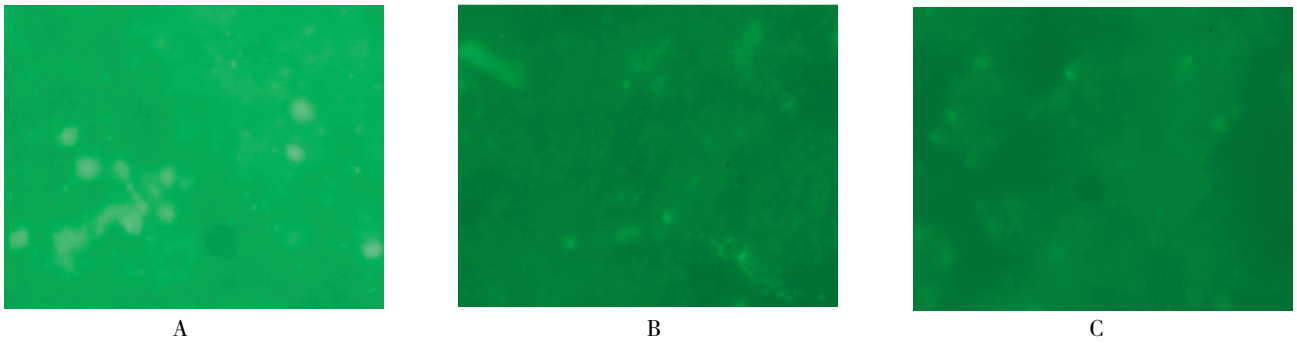


图 1 各组胰腺组织在荧光显微镜下显影情况
Fig. 1 Fluorescence microscopic imaging of each group in the pancreas
 A:4 h 的 SO 组; 1B:4 h 的 SAP 组; C:4h 的 PNS 组.

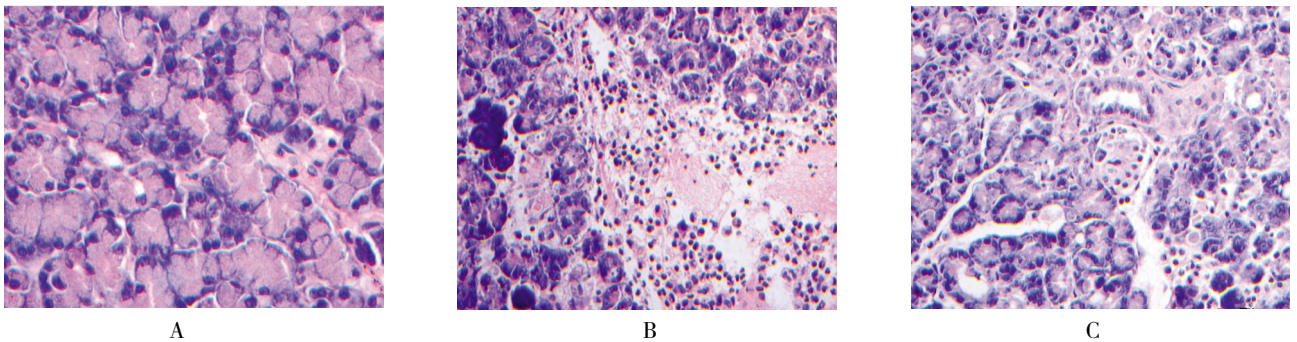


图 2 各组胰腺组织病理改变情况
Fig. 2 The pathological change situation of each group in the pancreas
 A:4 h 的 SO 组; B:4 h 的 SAP 组; C:4 hPNS 组 (均为苏木精 - 伊红染色 $\times 200$) .

子、氧自由基方面^[8], 对于钙超载还未有所涉及。有实验研究在大鼠巨噬细胞内三七总皂苷可以降低细胞内的IP3含量, 减少IP3与细胞内质网上的IP3R结合, 从而降低细胞内钙离子浓度^[9]。

在试验中显示, 通过流式细胞仪所得数据表明: PNS组细胞内钙离子荧光强度较SAP组均有显著降低, 可见三七总皂甙对于胰腺炎发生过程中的钙超载有较为明显的抑制作用。

综上所述, 在胰腺炎发生过程中, “钙超载”扮演着十分重要的角色。三七总皂甙在胰腺炎的治疗方面有着广泛的作用。在试验中三七总皂甙可以降低胰腺腺泡内钙离子浓度, 从而减轻胰腺腺泡细胞的病理损伤, 而针对三七总皂甙在胰腺炎中如何发挥其减轻钙超载, 通过何种途径抑制细胞钙超载的发生, 尚需进一步研究讨论。

【参考文献】

- [1] MALLEO G, MAZZON E, SIRIWARDENA A K, et al. Role of tumor necrosis factor- α in acute pancreatitis: from biological basis to clinical evidence [J]. *Shock*, 2007, 28(2):130 - 140.
- [2] GREWAL H P, MOHEY EL DIN A, GABER L, et al. Amelioration of the physiologic and biochemical changes of acute pancreatitis using an anti-TNF- α polyclonal antibody [J]. *Am J Surg*, 1994, 167(1):214 - 218.
- [3] WARD J B, PETERSEN O H, JENKINS S A, et al. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis [J]. *Lancet*, 1995, 346(8981):1016 - 1019.
- [4] PETERSEN O H, SUTTON R. Ca^{2+} signaling and pancreatitis: effects of alcohol bile and coffee [J]. *Trends Pharmacol. Sci*, 2006, 27(2):113 - 120.
- [5] KIM J Y, LEE J A. Transporter-mediated bile acid uptake cause Ca^{2+} dependent cell death in rat pancreatic acinar cells [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(7):1941 - 1953.
- [6] 蒲凡青, 严律南, 沈骥, 等. 胰腺腺泡细胞钙超负荷在诱发大鼠由水肿性向坏死性胰腺炎转中的作用 [J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(2):143 - 145.
- [7] 张喜平, 李建秋, 程琪辉. 急性胰腺炎中NO和ET作用的两面性 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(3):85 - 86.
- [8] 刘明伟, 安明顺, 曲艳. 三七皂甙对急性坏死性胰腺炎大鼠胰腺NF-KB活性及胰腺损伤的影响 [J]. *实用全科医学*, 2007, 5(12):1037 - 1038.
- [9] 罗中华, 蔡绍丽, 黄文华, 等. 三七皂甙对烫伤小鼠巨噬细胞IP3 \rightarrow CaM信号途径的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23(8):925 - 927.

(2014-09-13 收稿)