

## 实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.14.018

柴芩承气汤对急性坏死性胰腺炎犬肺巨噬细胞  
白细胞介素 1 $\beta$  表达的影响

骆瑞杰, 郭 佳, 王晓翔, 林子琦, 夏 庆, 杨晓楠, 薛 平\*

(四川大学华西医院, 四川省成都市武侯区国学巷 37 号, 610041)

**摘要** 目的 探讨柴芩承气汤对急性坏死性胰腺炎 (ANP) 犬肺巨噬细胞白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 表达的影响。方法 将 15 只比格犬随机分成对照组、模型组及柴芩承气汤组各 5 只, 模型组及柴芩承气汤组采用 50 mg/kg 牛磺胆酸钠逆行胆管注射制作 ANP 模型。造模成功后, 对照组及模型组经胃管注入生理盐水 10 ml/kg, 柴芩承气汤组经胃管注入柴芩承气汤 10 ml/kg, 各组均 2 h 注入 1 次, 共 3 次。第 6 h 取各组犬血清检测 IL-1 $\beta$  水平, 并取肺组织分离巨噬细胞检测 IL-1 $\beta$  mRNA 及蛋白表达。结果 模型组、柴芩承气汤组肺组织巨噬细胞 IL-1 $\beta$  mRNA 表达水平均较对照组明显下调 ( $P < 0.05$ ); 模型组肺组织巨噬细胞 IL-1 $\beta$  蛋白表达及血清 IL-1 $\beta$  水平显著高于对照组, 柴芩承气汤组 IL-1 $\beta$  蛋白表达及血清 IL-1 $\beta$  水平显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。结论 柴芩承气汤可下调 ANP 犬肺组织巨噬细胞 IL-1 $\beta$  蛋白表达, 降低血清 IL-1 $\beta$  水平。

**关键词** 急性坏死性胰腺炎; 柴芩承气汤; 白细胞介素 1 $\beta$ ; 肺巨噬细胞

系统性炎症反应综合征 (SIRS) 是重症急性胰腺炎早期重要的病理生理特征, 也是导致多器官功能障碍综合征的主要原因之一<sup>[1]</sup>。研究证实, 促炎因子大量释放导致体内促炎因子和抗炎因子失衡是 SIRS 发生的根本原因<sup>[2]</sup>。研究发现, 急性坏死性胰腺炎 (ANP) 发生过程中白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 可作为 SIRS 的启动因子, 发挥着与肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 类似的作用<sup>[3]</sup>。因此, 及时恢复机体促炎与抗炎因子的平衡, 可缓解器官功能受损, 改善重症急性胰腺炎患者的预后<sup>[4]</sup>。前期研究发现, 柴芩承气汤可减少 ANP 大鼠白细胞介素 6 (IL-6)、TNF- $\alpha$  释放, 减轻胰腺病理损害<sup>[5]</sup>。本研究拟探讨柴芩承气汤对 ANP 犬肺巨噬细胞 IL-1 $\beta$  表达的影响。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

健康成年比格犬 15 只, 8 月龄, 雌雄不限, 体质量 10 ~ 11 kg, 由四川大学华西医学中心实验动物中心提供, 实验动物许可证号: scxk [川]

2008-01。

### 1.2 药物及试剂

柴芩承气汤组成: 南柴胡 15 g, 黄芩 15 g, 厚朴 15 g, 枳实 15 g, 茵陈 15 g, 栀子 20 g, 大黄 20 g (后下), 芒硝 20 g (冲服)。将中药用清水 500 ml 浸泡 1 h, 然后用煎药机煎 0.5 h, 煎出药液 200 ml。由四川大学基础医学院生化测试中心制作成冻干粉。实验前用注射用水按每毫升含 2.0 g 生药配制备用。

牛磺胆酸钠 (美国 Sigma 公司, 批号: BCBM6398V); 牛血清白蛋白 (BSA, 美国 Sigma 公司, 批号: SLBG8293V); Trizol (美国 Invitrogen 公司, 批号: 84606); 高糖 DMEM (美国 Gibco 公司, 批号: 1359974); L 多聚赖氨酸 (北京博润莱特科技公司, 批号: SLBF7794V); Flu3-AM (Beyotime 公司, 批号: S1056); Pluronic F427 (上海世泽生物科技, 批号: Slgb6026V); 化学发光检测试剂 (ECL, GE 公司, 批号: 9564802); 酶联免疫吸附剂 (ELISA, GBD 公司, 批号: R141120-0076); 细胞裂解液 (美国 Sigma 公司, 批号: CL-797); Bradford 试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司, 批号: PP1102); 兔抗羊二抗 (武汉博士德生物工

基金项目: 国家自然科学基金 (81403252)

\* 通讯作者: duburongcheng@163.com, 18982132775

程有限公司, 批号: BA1110); Taq DNA PCR 反应试剂盒 [TAKARA 宝生物工程 (大连) 有限公司, 批号: CK3501AA]。

### 1.3 主要仪器

试管振荡器 (Maxi-MixII, Barnstead Thermolyne 公司); 超净工作台 (XR TFG-180, 成都芯锐通风空调净化设备有限公司); 水平电泳仪 (MODEL200/2.0, Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统 (Gel Doc 1000, 美国 Bio-Rad 公司); 实时荧光定量基因扩增仪 [iTC-2000, 加拿大枫岭生物技术 (上海) 有限公司]; 细胞分类计数仪 (TC20, Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物分组与处理

实验前将比格犬适应性喂养 7 天, 实验前禁食 12 h, 不禁水。以 SPSS 10.0 统计分析软件生成随机数字, 将 15 只比格犬分成对照组、模型组及柴芩承气汤组, 每组 5 只。模型组及柴芩承气汤组参照文献 [6] 制造 ANP 模型, 犬后肢小隐静脉推注 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 静脉麻醉, 推注时间大于 10 min, 麻醉成功后固定于无菌手术台, 全胸腹部备皮后碘伏消毒, 铺巾, 在剑突下 2 cm 处沿腹中线打开腹腔, 提出十二指肠, 暴露胰腺组织, 在幽门下 7.5 cm、十二指肠胰腺对侧处标记, 沿标记点向两侧切开, 暴露主胰管开口, 沿开口插入直径 2 mm 塑料软管, 插入深度约 1.5 cm, 使用输液泵通过塑料软管匀速泵入 5% 牛磺胆酸钠 (50 mg/kg), 输液泵速度 60 ml/h, 泵入结束后拔出塑料软管, 观察胰腺形态, 整个胰腺组织水肿、出血, 并可见散在钙化斑, 缝合十二指肠并回纳, 逐层缝合腹壁, 造模成功。对照组比格犬手术步骤与模型组同, 注射牛磺胆酸钠改为注射生理盐水。

造模成功后, 对照组和模型组经胃管注入生理盐水 10 ml/kg, 柴芩承气汤组经胃管注入柴芩承气汤 10 ml/kg。各组均每 2 h 注入 1 次, 共 3 次。

### 2.2 肺巨噬细胞分离

灌胃 6 h 后将犬放血处死, 沿肺门剪下右肺下叶, 沿主支气管插入橡胶软管, 在主支气管外缝合线结扎固定软管, 沿软管注入 4℃ PBS 缓冲液 20 ml 充填肺泡, 再注入 PBS 20 ml 后回抽, 反复 5 次后充分回收肺内 PBS。利用差速贴壁法 [7] 分离提取巨噬细胞, 将肺泡灌洗液 1337 r/min 离心 10 min, 弃去上清并用 100 ml PBS 将细胞团重悬

浮, 重复上述过程 2 次后使用 DMEM 将细胞团重悬浮, 将细胞浓度调制为  $1 \times 10^6$  /ml, 置于细胞培养皿中在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 环境下培养 1 h, 弃去培养液, 用 PBS 轻柔冲洗培养皿 3 次, 洗去细胞碎片及未贴壁细胞, 弃去冲洗液, 再用 10 ml PBS 用力冲洗培养皿并保留冲洗液, 使用细胞分类计数仪确定巨噬细胞 > 95%, 将冲洗液在 4℃、1337 r/min 下离心 5 min, 弃去上清, 分离所得巨噬细胞团备用。

### 2.3 观察指标方法

2.3.1 肺巨噬细胞 IL-1 $\beta$  mRNA 表达 灌胃 6 h 后取肺组织分离巨噬细胞。肺巨噬细胞总 RNA 的提取采用 Trizol 试剂冰上提取。本研究所用探针、内参基因及引物均由上海生物科技有限公司合成。选择机体相对保守的甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因作为内参基因 ( $\beta$ -actin), 检测 IL-1 $\beta$ 。IL-1 $\beta$  探针: 5'-GATACCTGTGCTCTTGGGCATC-3'; 上游引物: 5'-CAAACAAGTGGTGTTCACATG-3'; 下游引物: 5'-TTCCATCTTCCTCTTTGGGTAG-3'。 $\beta$ -Actin 探针: 5'-CTGTCCACCTTCCAGCAGA-3'; 上游引物: 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTCCT3'; 下游引物: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'。45 个循环的扩增反应结束后, 系统将采集到的每一循环反应时的各反应管的荧光强度增长指数 (DRn) 进行分析, 绘制每一反应管的扩增动力学曲线。根据动力学曲线确定每个样品管中荧光强度增加到某一特定阈值时的扩增循环数 (Ct 值)。

2.3.2 肺巨噬细胞 IL-1 $\beta$  蛋白表达 细胞分离完成后, 取 10  $\mu$ l 弃去培养液, PBS 漂洗 2 次, 加细胞裂解液裂解, Bradford 法测细胞蛋白浓度。各组细胞蛋白样品于 100℃ 水浴 5 min, 取等量蛋白 (80  $\mu$ g) 上样进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺胶电泳 (SDS-PAGE), 并把蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 丽春红染色, 依次加 50 g/L 的脱脂奶粉封闭, 目标蛋白的特异性多克隆抗体 (1:100) 孵育过夜、洗涤, 兔抗羊二抗 (1:2000) 孵育 2 h、洗涤, ECL 试剂于暗室自显影, 按 ECL 检测试剂盒说明书进行。实验以  $\beta$ -actin 为内参照。采用 Band Scan 5.0 软件测定蛋白条带的灰度值 3 次, 以目的条带灰度值与对应  $\beta$ -actin 条带的灰度值之比 (即相对灰度值) 代表样本目标蛋白的表达水平。

2.3.3 血清 IL-1 $\beta$  水平检测 灌胃 6 h 后取各组犬血清, 采用 ELISA 试剂盒检测, 操作步骤按说明进行。

## 2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组资料比较采用方差分析和  $\chi^2$  检验。

## 3 结果

表 1 示, 与对照组比较, 模型组及柴芩承气汤组 IL-1 $\beta$  mRNA 水平明显下调 ( $P < 0.05$ ); 模型组与柴芩承气汤组 IL-1 $\beta$  mRNA 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。模型组 IL-1 $\beta$  蛋白表达及血清 IL-1 $\beta$  水平均较对照组升高 ( $P < 0.05$ ); 柴芩承气汤组 IL-1 $\beta$  蛋白表达及血清 IL-1 $\beta$  水平均较模型组下降 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组犬肺巨噬细胞 IL-1 $\beta$  mRNA、蛋白表达及血清 IL-1 $\beta$  水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 犬数 | IL-1 $\beta$ mRNA (HU) | IL-1 $\beta$ 蛋白 (相对灰度值) | 血清 IL-1 $\beta$ (ng/L)   |
|--------|----|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 柴芩承气汤组 | 5  | 24.9 $\pm$ 1.4*        | 0.8 $\pm$ 0.4 $\Delta$  | 20.6 $\pm$ 5.5* $\Delta$ |
| 模型组    | 5  | 25.1 $\pm$ 1.2*        | 1.4 $\pm$ 0.5*          | 34.5 $\pm$ 9.1*          |
| 对照组    | 5  | 27.9 $\pm$ 1.6         | 0.6 $\pm$ 0.3           | 7.3 $\pm$ 2.7            |

注: 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

## 4 讨论

根据病因、临床症状, ANP 应归属中医学“腹痛”“脾心痛”“胰瘕”等范畴。据《黄帝内经·厥病》载“腹胀胸满, 心尤痛甚, 胃心痛也, ……痛如以锥针刺其心, 心痛甚者, 脾心痛也。”ANP 主要与胆道疾患 (包括创伤)、过量饮酒、暴饮暴食、高脂血症及情志等因素有关。饮食不节, 过食辛辣肥甘, 暴饮暴食, 饮酒过度, 导致肝胆疏泄失司, 胃肠熟腐传导失司, 实热内积, 湿热邪毒壅积, 腑气不通。ANP 病性以里、实、热证为主, 病位主要在脾、胃、肝、胆, 基本病机为“不通则痛”。病机演变以湿、热、瘀、毒蕴结中焦而致脾胃升降传导失司, 肝失疏泄为中心。“通”贯穿治疗的整个过程, “通”不仅仅是通腑, 还包括理气消滞、清热解毒、活血化瘀使六腑畅通、气血通调<sup>[8-9]</sup>。

柴芩承气汤方中柴胡疏肝理气; 黄芩清热化湿; 厚朴行气消胀; 芒硝润燥软坚、清热消肿、泻热通便; 生大黄具有攻坚导泻、活血通络、泄热通腑之功, 其泻下力强; 木香行气止痛; 枳实破气消积、化痰除痞, 全方共奏活血化瘀、清热解毒、通里攻下、荡涤脏腑热毒之功<sup>[10-11]</sup>。研究发现, 大黄与芒硝配伍不仅具有抑菌、排菌作用, 且具有清除肠道内自由基、炎症因子等重要物质, 促进肠蠕

动, 增加肠黏膜血流量, 防止肠内致病菌过度增殖, 松弛括约肌等作用, 从而达到抑制胰腺分泌、扩张血管、降低胰管内压、改善微循环和供氧, 利于胰腺和胰腺周围器官正常生理功能的早期恢复<sup>[12-13]</sup>。

IL-1 $\beta$  是 ANP 发病过程中的始动因子, 是 ANP 早期出现多器官功能衰竭的根本原因<sup>[3,14]</sup>。本研究结果显示, 柴芩承气汤可下调 ANP 犬肺巨噬细胞 IL-1 $\beta$  蛋白表达, 降低血清 IL-1 $\beta$  水平。因此, 柴芩承气汤可在一定程度上抑制炎症反应水平, 缓解器官功能受损, 改善 ANP 患者的预后。

## 参考文献

- [1] 芦波, 钱家鸣. 重症急性胰腺炎病因及发病机制研究进展 [J]. 中国实用外科杂志, 2012, 32 (7): 590-592.
- [2] 郭权, 毕伟. 大承气汤对重症胰腺炎 SIRS 大鼠腹腔巨噬细胞 sCD14 作用的实验研究 [J]. 大连医科大学学报, 2011, 33 (1): 36-39.
- [3] 杨健鹰, 方茂勇, 徐周纬, 等. 血清 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 IL-10 对急性胰腺炎预后判断的研究 [J]. 安徽医药, 2013, 17 (7): 1185-1189.
- [4] 赵玉雪, 何伟, 荣培晶, 等. 胆碱能抗炎通路的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (11): 3312-3316.
- [5] 薛平, 邓力琨, 张肇达, 等. 柴芩承气汤减轻急性胰腺炎大鼠胰腺钙超载的机制研究 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6 (10): 1054-1058.
- [6] Guo J, Xue P, Yang XN, et al. The effect of Chaiqin Chengqi Decoction on modulating serum matrix metalloproteinase 9 in patients with severe acute pancreatitis [J]. Chin J of Integr Med, 2013, 19 (12): 913-917.
- [7] 李辰运, 陈剑秋, 孙晋津, 等. 差速贴壁法培养大鼠骨髓内皮祖细胞的实验研究 [J]. 天津医药, 2011, 39 (4): 353-356.
- [8] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 急性胰腺炎中西医结合诊治方案 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19 (3): 207-209.
- [9] 中华中医药学会脾胃病分会. 急性胰腺炎中医诊疗专家共识意见 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (6): 1826-1831.
- [10] 刘红霞. 柴芩承气汤内服联合六合丹外敷治疗急性胰腺炎效果观察及护理 [J]. 中国社区医师, 2014, 30 (9): 125-130.
- [11] Xue P, Guo J, Yang XN, et al. Changes of neuronal acetylcholine receptor alpha 7 of peritoneal macrophage in experimental acute pancreatitis treated by Chaiqin Chengqi Decoction [J]. Chin J Integr Med, 2014, 20 (10): 770-775.
- [12] 李接兴, 罗羽宏. 促红细胞生成素预处理对重症急性胰腺炎促炎抗炎失衡的影响 [J]. 南方医科大学学报,

2012, 32(1): 93-96.

[[3] 吴成中, 崔乃强. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎的沿革. 现况与展望 [J]. 中西医结合外科杂志, 2012, 18(16): 543-546.

[[4] Villegas-Bastida A, Torres-Rosas R. Electrical Stimula-

tion at the ST36 Acupoint Protects against Sepsis Lethality and Reduces Serum TNF Levels through Vagus Nerve- and Catecholamine-Dependent Mechanisms [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014; 451674. doi: 10.1155/2014/451674.

# Effect of *Chaiqin Chengqi Tang* (柴苓承气汤) on the Interleukin-1 Expression in Pulmonary Macrophage of Dogs with Acute Necrotic Pancreatitis

LUO Ruijie, GUO Jia, WANG Xiaoxiang, LIN Ziqi, XIA Qing, YANG Xiaonan, XUE Ping

(West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041)

**ABSTRACT Objective** To observe the effect of *Chaiqin Chengqi Tang* on expression of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in pulmonary macrophage of dogs with acute necrotic pancreatitis (ANP). **Methods** Fifteen beagle dogs were randomly assigned into control group, model group and *Chaiqin Chengqi Tang* group, with five dogs in each group. 50 mg/kg of sodium taurocholate was retrograde injected through bile duct to establish ANP model. Dogs in control and model groups were administered with 10 ml/kg of saline via gastric tubes, while those in *Chaiqin Chengqi Tang* group were administered with *Chaiqin Chengqi Tang* in the same dosage and delivery route. Every group was administered one time per two hours, for three times. In the sixth hour, canine serum was collected for detecting interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and pulmonary tissue was obtained to isolate macrophages for detecting IL-1 $\beta$  mRNA and protein expression. **Results** IL-1 $\beta$  mRNA expression in pulmonary macrophages was significantly decreased in model and *Chaiqin Chengqi Tang* groups compared with that in control group ( $P < 0.05$ ). IL-1 $\beta$  protein and serum IL-1 $\beta$  expressions in pulmonary macrophages were significantly higher in model group than those in control and *Chaiqin Chengqi Tang* groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Chaiqin Chengqi Tang* can decrease the IL-1 $\beta$  protein expression of canine pulmonary macrophages, leading to the reduction of serum IL-1 $\beta$ .

**Keywords** acute necrotic pancreatitis; *Chaiqin Chengqi Tang*; interleukin-1 $\beta$ ; pulmonary macrophage

(收稿日期: 2014-10-21; 修回日期: 2015-01-08)

编辑: 王利芬

## 中医杂志社医海林音像书店邮购图书目录

●国医大师临床丛书  
李济仁医论医选集 98  
中医古籍文献学 (第2版) 228  
张琪学术思想探赜 78  
●名老中医方药心得丛书  
祁宝玉眼科方药心得 50  
晁恩祥临证方药心得 58  
俞长荣临床经验集 68  
姜良铎内科方药心得 68  
段富津方剂学讲读实录 78  
周文泉老年病临证经验集 79  
徐福松男科纲目 88  
白兆芝临证经验集萃 88  
●名医讲学荟萃  
裘沛然讲《内经》 38  
张琪讲临床 42  
孟庆云讲中医经典 58  
●农村卫生适宜技术推广丛书  
地方性疾病中医诊疗技术 27  
中药炮制实用技术 29.8  
农村实用针灸技术 34  
农村实用液体疗法 37  
灾害医学救治技术 39.8  
●社区医师中西医结合诊疗规范丛书  
心血管病 22  
社区康复 22  
肿瘤 24  
呼吸疾病 24

骨伤病 24  
神经精神疾病 24  
儿科疾病 25  
老年疾病 25  
风湿免疫及内分泌疾病 28  
社区常见疾病预防与保健 29  
社区急症 29  
流行病与传染病 29  
社区医学检查诊断技术 29.8  
肾脏及血液疾病 29.9  
耳鼻咽喉及口腔疾病 29.9  
泌尿生殖疾病 30  
外科疾病 30  
眼科疾病 35  
消化疾病 35  
社区护理 35  
●中医药科学方法学研究系列丛书  
中医学科学方法特征与沿革 69  
当代中医药学家谈科学思维与方法 88  
古代中医药名家学术思想与认识论 98  
中医理论技术发展的方法学思考 118  
中医临床基础医学研究 128  
●重读中医经典丛书  
金匱要略临床运用 48  
金匱要略临床精要 58  
伤寒论临床精要 59  
伤寒论临床运用 59  
内经临床精要 59

伤寒论临床发挥 68  
内经临床运用 79  
●其它图书  
抗微生物药物合理应用手册 39  
让“胰岛”动起来——我是这样战胜糖尿病的 (第3版) 39  
中药药对表解 (修订版) 39  
手法治疗骨科软组织损伤图谱 39.8  
章次公《药理学》点校 48  
病毒性感染性疾病中医治疗学概要 54  
全国名老中医柴瑞霭临床经验集萃 78  
病毒性传染病中医治疗概要 58  
黄德彰医文精华 68  
陈雨苍中医妇科临床经验 68  
中医学概论 (英文版) 68  
中医学导论 69.8  
常见肿瘤的非手术治疗 79  
张灿理医论医案纂要 79  
中医学名词内科学妇科学儿科学 88  
脊髓损伤的中西医结合治疗 98  
中国的藏医 (汉文、藏文、英文) 98  
现代中成药的药材炮制 98  
刘炳凡医论医案 118  
华廷芳学术经验集 128  
临床常见疾病影像诊断及治疗原则 128  
糖络杂论 (第2版) 128  
伤寒论方剂当代研究 128

柴浩然医论医案集 128  
林沛湘学术经验集 138  
康复评定学 148  
现代脉诊学 148  
岭南本草集锦 148  
章次公医案经验集 (增补版) 158  
中药血清药物化学 188  
天然产物化学研究 198  
广西特色中草药资源选编 498  
千金翼方译注 110  
当代中医外治精要 48  
中医百年百名中医临床家丛书 340  
张氏医通 49  
简明实用中医学 63  
冯氏锦囊秘录 94  
医宗金鉴 86  
伤寒论现代研究与临床应用 38  
国医大师医案精粹 (内科篇) 58  
经方化裁——伤寒论现代研究丛刊 36  
以上书均免费邮寄, 欲购者请汇款至北京市东直门内南小街16号中医杂志社医海林音像书店图书部收, 邮政编码: 100700。电话: (010) 64035632。请在汇款单附言栏写清所购书名、册数及邮编。