

大鼠重症急性胰腺炎内毒素血症、细胞因子和一氧化氮的变化及善宁的治疗作用

王艳蕾, 张凤宇, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤

■背景资料

重症急性胰腺炎发病急, 变化快, 并发症多, 是目前最为棘手的急腹重症之一。尽管围绕胰腺炎的研究已历时百余年, 但迄今有关SAP的发病机制尚未完全阐明, 治疗药物也不够满意。

王艳蕾, 景友玲, 赵景霞, 赵春秀, 段国贤, 华北煤炭医学院
生理教研室 河北省唐山市 063000

张凤宇, 唐山市丰润区第一人民医院消化科 河北省唐山市
064000

通讯作者:

Changes of endotoxemia, cytokines and nitric oxide and therapeutic effects of sandostatin in rats with severe acute pancreatitis

Yan-Lei Wang, Feng-Yu Zhang, You-Ling Jing, Jing-Xia Zhao, Chun-Xiu Zhao, Guo-Xian Duan

Yan-Lei Wang, You-Ling Jing, Jing-Xia Zhao, Chun-Xiu Zhao, Guo-Xian Duan, Department of Physiology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China

Feng-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Fengrun District, Tangshan 064000, Hebei Province, China

Correspondence to: Yan-Lei Wang, Department of Physiology, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, Hebei Province, China. xiaolei1973@yahoo.com.cn

Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-30

Abstract

AIM: To study the roles of endotoxemia, cytokines and nitric oxide in the development of severe acute pancreatitis (SAP) and the therapeutic effects of sandostatin (SS) in rats.

METHODS: SAP models were induced by retrograde injection of 15 g/L sodium deoxycholate and then treated by SS. The plasma levels of endotoxin (ET), lipid peroxide (LPO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO), as well as the expression LPO, TNF- α , IL-6 and NO in pancreatic tissues, were measured. The changes of pancreatic histology were examined under light microscope.

RESULTS: As Compared with those in sham

operation group, the plasma levels of ET, LPO, TNF- α , IL-6 and NO were markedly higher in SAP group ($P < 0.01$), and the changes of ET, LPO, TNF- α and NO at 6 h were higher (898 ± 114 EU/L, 24.58 ± 1.23 μ mol/L, 246.3 ± 16.5 ng/L, 162.8 ± 10.9 mmol/L, $P < 0.05$) than those at 12 and 24 h. The changes of LPO, TNF- α , IL-6 and NO in pancreatic tissues of SAP group were obviously higher in comparison with those of sham group (3.31 ± 0.85 μ mol/g vs 0.33 ± 0.04 μ mol/g, $P < 0.01$; 2.57 ± 0.14 ng/g vs 0.16 ± 0.04 ng/g, $P < 0.01$; 85.6 ± 24.6 ng/g vs 32.5 ± 5.7 ng/g, $P < 0.01$; 15.3 ± 1.2 mmol/g vs 6.6 ± 1.4 mmol/g, $P < 0.01$); and severe damages of pancreatic tissues were observed under light microscope. In SAP group, the plasma levels of LPO, TNF- α , IL-6 and NO were significantly correlated with ET level ($r = 0.858$, $P < 0.01$; $r = 0.958$, $P < 0.01$; $r = 0.918$, $P < 0.01$; $r = 0.875$, $P < 0.01$). The indexes mentioned above in SS group were obviously ameliorated in comparison with those in SAP group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Endotoxemia, cytokines and NO play important roles in the development of severe acute pancreatitis. Sandostatin can block the chain reaction caused by these factors.

Key Words: Pancreatitis; Endotoxin; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin 6; Nitric oxide; Lipid peroxide; Sandostatin

Wang YL, Zhang FY, Jing YL, Zhao JX, Zhao CX, Duan GX. Changes of endotoxemia, cytokines and nitric oxide and therapeutic effects of sandostatin in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(15):1520-1523

摘要

目的: 探讨内毒素血症、细胞因子和一氧化氮在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发展中的作用及善宁的治疗作用。

方法: 经胰管逆行注射15 g/L去氧胆酸钠建立SAP模型, 给予善宁治疗, 观察造模后各

■研发前沿

目前有关重症急性胰腺炎发病机制的研究热点集中在细胞因子、胰腺微循环、肠道细菌移位等疾病发生和发展中的作用。研究重点是在分子生物学的水平上对免疫应答、全身炎症反应、细胞因子、胰腺微循环障碍等的深入研究。

时间点血中内毒素(ET)、过氧化脂质(LPO)、TNF- α 、IL-6、一氧化氮(NO)的变化,并进行相关分析;于24 h后取胰腺组织,测定胰腺组织中LPO、TNF- α 、IL-6和NO水平,同时进行相关分析及胰腺组织病理学检查。

结果:与对照组比较, SAP组各时间点血浆ET、LPO、TNF- α 、IL-6、NO的水平明显升高($P<0.01$), 其中ET、LPO、TNF- α 和NO 6 h尤为显著(898 ± 114 EU/L, 24.58 ± 1.23 μ mol/L, 246.3 ± 16.5 ng/L, 162.8 ± 10.9 mmol/L, $P<0.05$ vs 12, 24 h)。胰腺组织LPO、TNF- α 、IL-6、NO的水平SAP组明显高于对照组(3.31 ± 0.85 μ mol/g vs 0.33 ± 0.04 μ mol/g, $P<0.01$; 2.57 ± 0.14 ng/g vs 0.16 ± 0.04 ng/g, $P<0.01$; 85.6 ± 24.6 ng/g vs 32.5 ± 5.7 ng/g, $P<0.01$; 15.3 ± 1.2 mmol/g vs 6.6 ± 1.4 mmol/g, $P<0.01$)。光镜下胰腺组织病理损害明显。相关分析显示SAP组血浆LPO、TNF- α 、IL-6、NO水平分别与ET水平呈显著正相关($r = 0.858$, $P<0.01$; $r = 0.958$, $P<0.01$; $r = 0.918$, $P<0.01$; $r = 0.875$, $P<0.01$)。善宁治疗后上述各指标均较SAP组明显改善($P<0.01$)。

结论:ET血症、细胞因子、NO等相互激发、相互促进,在SAP的发展中起着重要的协同作用。善宁能阻断这些损伤因子的连锁反应。

关键词:胰腺炎;内毒素;肿瘤坏死因子;白细胞介素6;一氧化氮;过氧化脂质;善宁

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1520.asp>

0 引言

SAP是一种胰腺出血坏死所致的全身炎症反应综合征,往往发展迅速,难以控制,其确切病因和发病机制迄今尚未完全阐明。在SAP的发展过程中,有许多因素参与,我们从SAP时的内毒素(ET)血症、细胞因子和一氧化氮(NO)的动态变化着手,探讨他们在SAP发展中的作用,并观察善宁在阻断这些因子连锁反应中的作用,从而为临床治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠36只,体质量180-220 g,雌雄不拘。动物实验前12 h禁食不禁水,在乙醚麻醉下作无菌手术,剖腹后经十二指肠乳头向胰管内

缓慢逆行注入15 g/L去氧胆酸钠0.5 mL/kg,诱发重症急性胰腺炎,注射时阻断胆总管,以免药液进入肝胆。注药后5 min胰腺即出现均匀性出血、坏死、肿胀、渗出,待确定SAP模型成功,关腹。对照组向胰管内注射等量生理盐水。造模后动物随机分为3组($n = 12$):对照组(Sham)、胰腺炎组(SAP)、善宁治疗组(SS)。善宁治疗组于造模后1, 6, 12 h背部sc善宁13.5 μ g/kg(善宁购自瑞士诺华制药有限公司)。

1.2 方法 各组分别于造模后6, 12, 24 h经内眦采血测定血浆ET、LPO、TNF- α 、IL-6、NO的水平,24 h后处死动物取胰腺留待胰腺组织生化检测及组织学检查。ET的测定采用鲎试剂偶氮显色法作定量测定(试剂购自上海伊华临床医学科技公司);NO的测定采用硝酸还原酶法(试剂购自晶美生物工程有限公司);TNF- α 、IL-6的测定均用ELISA法(试剂购自晶美生物工程有限公司);LPO的测定采用TBA法即硫代巴比妥酸法。

统计学处理 结果以mean \pm SD表示,应用SPSS8.0统计软件分析,组与组间均数比较采用方差分析和 q 检验,相关系数的显著性用 t 检验。以 $P<0.05$ 为显著性检验界限。

2 结果

2.1 血浆ET、LPO、TNF- α 、IL-6、NO的变化 SAP组各时间点血浆ET、LPO、TNF- α 、IL-6、NO明显高于对照组($P<0.01$), 其中ET、LPO、TNF- α 、NO以造模后6 h最高,与12 h和24 h相比差异显著($P<0.05$);IL-6以造模后12 h最高,与6 h和24 h相比有显著差异($P<0.05$, 表1)。善宁治疗组在各时间点上上述各指标均较模型组明显改善($P<0.01$)。SAP组血浆LPO、TNF- α 、IL-6、NO水平分别与ET水平呈显著正相关($r = 0.858$, $P<0.01$; $r = 0.958$, $P<0.01$; $r = 0.918$, $P<0.01$; $r = 0.875$, $P<0.01$);SAP组血浆LPO、IL-6、NO水平分别与TNF- α 水平呈正相关($r = 0.847$, $P<0.01$; $r = 0.968$, $P<0.01$; $r = 0.936$, $P<0.01$)。

2.2 胰腺组织LPO、TNF- α 、IL-6、NO的变化 SAP组胰腺组织匀浆中LPO、TNF- α 、IL-6、NO水平较对照组明显升高,两组间有显著性差异($P<0.01$);善宁治疗后胰腺组织中上述各指标下降,与SAP组比较差异明显($P<0.01$, 表2)。SAP组胰腺组织LPO、TNF- α 、IL-6水平与NO呈明显正相关($r = 0.897$, $P<0.01$; $r = 0.952$, $P<0.01$; $r = 0.949$, $P<0.01$)。

2.3 胰腺组织学改变 SAP组胰腺小叶轮廓破坏,

■创新盘点

本文从不同时间点研究细胞因子、内毒素、氧自由基、一氧化氮在重症急性胰腺炎发生和发展中的作用,寻求始动因素,并探讨善宁的治疗作用。

■名词解释

全身炎症反应综合征(SIRS): 是1992年在美国危重医学和胸科两个学会主持的协议会上由Bone提出的。SIRS是指由于各种原因, 巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等免疫细胞或炎性细胞受到刺激、诱导, 产生并分泌释放各种细胞因子入血, 进入全身循环引起全身的炎症反应的一种病理生理状态, 实质是“高细胞因子血症”。

表 1 SAP大鼠血浆ET, LPO, TNF- α , IL-6, NO的变化. (mean \pm SD, $n = 12$)

分组	t/h	ET (EU/L)	LPO (μ mol/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	NO (mmol/L)

表 2 SAP大鼠胰腺组织LPO, TNF- α , IL-6, NO的变化. (mean \pm SD, $n = 12$)

分组	LPO (μ mol/g)	TNF- α (ng/g)	IL-6 (ng/g)	NO (mmol/g)

呈大面积坏死, 间质水肿, 炎细胞浸润, 血管充血伴有红细胞渗出。善宁治疗组胰腺组织损伤程度明显轻于SAP组, 仅有部分胰腺小叶轮廓破坏, 未见明显炎细胞浸润。

3 讨论

重症急性胰腺炎是外科凶险的疾病, 其最严重的并发症是引起全身炎症反应综合征(SIRS), 最终导致多系统器官功能衰竭(MSOF)^[1-2]。近年来, 一系列实验研究均证实SAP能够引起肠道细菌、ET移位, 发生ET血症^[3-4]。目前认为肠黏膜屏障功能障碍和肠道细菌微生态平衡的破坏及机体免疫功能的损害是导致肠道细菌、ET移位的3个基本要素。SAP时氧自由基、炎症介质和NO大量产生, 损伤肠黏膜, 再加上肠运动受到抑制, 肠黏膜微循环障碍, 造成肠黏膜通透性增加, 大量细菌、ET移位发生ET血症^[5-6]。而SAP还可引起肠道菌群失调, G⁻菌(尤其是大肠杆菌)呈几何级数增长, 更是促进了肠道细菌、ET移位的发生^[7]。本实验结果显示, SAP早期血浆ET水平明显升高, 6 h达到最高; 同时血中LPO和NO含量也升高, 并且具有相关性。表明氧自由基和NO可破坏肠道屏障, 加重ET血症的发生。

ET是G⁻菌细胞壁的脂多糖成分, 是刺激细胞因子生成的重要因素。大量研究表明, 肠源性

ET可触发多种细胞因子的释放和炎症介质的级联反应, 进而诱发SIRS和MSOF^[4,8]。我们发现, 造模后血浆TNF- α , IL-6明显升高, 而且其水平与血浆ET水平呈明显正相关。SAP时ET大量入侵, 激活巨噬细胞, 引起TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8等细胞因子的大量释放。在本研究中, TNF- α 在SAP早期即明显升高, 6 h达高峰, 而IL-6在12 h达高峰, 并且模型组血浆IL-6水平与TNF- α 水平呈正相关, 这表明TNF- α 可能是细胞因子连锁反应中最早启动的因子。TNF- α 的致病机制是他能激活中性粒细胞等炎性细胞, 释放大量的介质如氧自由基、蛋白酶等, 介导胰腺组织细胞损伤^[9]; 他还可以诱导IL-1, IL-6, IL-8等其他细胞因子的瀑布样释放。IL-6是单核细胞和血管内皮细胞产生的重要炎症介质之一。他可刺激活化B细胞增殖及免疫球蛋白的生成, 还可刺激肝脏产生急性期反应蛋白。血浆IL-6水平与胰腺的病理损害程度明显相关, 可作为预测胰腺病理变化的重要指标^[10]。细胞因子是一个“大家族”, 由复杂的网络系统所调节。一旦一种细胞因子产生, 就能促进他自身和其他细胞因子的生成, 并形成级联和扩展。SAP时, 正是由于上述这些因子相互激发、协同作用, 导致全身炎症反应, 最终造成组织损害。NO是极强的血管舒张因子, 他在SAP的发生、发展过程中起着重要作用^[11]。我们发现SAP早期血浆NO水平即明显升高, 6 h达峰值, 而且其水平与血浆ET, TNF- α 和IL-6水平呈明显正相关。ET、炎症细胞因子刺激巨噬细胞、血管平滑肌细胞等, 使诱导型NO合酶(iNOS)活性增加是SAP时NO大量生成的主要原因^[12]。NO除了能引起血管过度扩张, 血流淤滞, 造成胰腺血供低灌注外, 还可以与超氧阴离子反应生成具有强氧化性的过氧化亚硝酸根(ONOO⁻), 对胰腺产生直接毒性作用^[13]。此外过

量的NO还参与SAP时肠道损伤的病理生理过程,引起肠通透性增加^[14],加剧细菌移位和内毒素血症。

可见SAP早期所诱发的全身炎症反应综合征是与过量的细胞因子、氧自由基、ET、NO等损伤因子的参与有关,这些因子相互激发、相互影响,在SAP的发生、发展中起重要的协同作用。本研究观察到给予善宁可以使血浆和胰腺组织中ET、LPO、NO、TNF- α 、IL-6接近正常水平,并明显减轻胰腺的损伤程度。从而推测善宁可抑制炎症介质、细胞因子的过度表达,并能减轻ET血症、NO和氧自由基的损伤作用,进而阻断这些损伤因子的连锁反应。因此在SAP早期应用善宁对防治全身炎症反应综合征将有所裨益。

4 参考文献

- 1 Bhatia M, Wong FL, Cao Y, Lau HY, Huang J, Puneet P, Chevali L. Pathophysiology of acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 132-144
- 2 Zhang Q, Ni Q, Cai D, Zhang Y, Zhang N, Hou L. Mechanisms of multiple organ damages in acute necrotizing pancreatitis. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114: 738-742
- 3 Vasilescu C, Herlea V, Buttenschoen K, Beger HG. Endotoxin translocation in two models of experimental acute pancreatitis. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 417-424
- 4 Giamarellos-Bourboulis EJ, Nikou GC, Matsaggoura M, Toumpanakis C, Grecka P, Giannikopoulos G, Katsilambros N. Alterations of systemic endotoxemia over the course of acute edematous pancreatitis. correlation to the advent of an infection? *Pancreatol* 2003; 3: 323-328
- 5 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 417-421
- 6 Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 26-35; discussion 35-36
- 7 徐桂芳, 路箴, 邹晓平, 李兆申, 屠振兴, 潘雪. 肠内免疫微生态营养支持对重症急性胰腺炎犬肝损害的影响. *胰腺病学* 2005; 5: 89-92
- 8 Bhatia M. Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury. *Scand J Surg* 2005; 94: 97-102
- 9 Yang YL, Li JP, Li KZ, Dou KF. Tumor necrosis factor alpha antibody prevents brain damage of rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2898-2900
- 10 Jiang CF, Shiao YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004; 67: 442-446
- 11 Leindler L, Morschl E, Laszlo F, Mandi Y, Takacs T, Jarmai K, Farkas G. Importance of cytokines, nitric oxide, and apoptosis in the pathological process of necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2004; 29: 157-161
- 12 Rahman SH, Ammori BJ, Larvin M, McMahon MJ. Increased nitric oxide excretion in patients with severe acute pancreatitis: evidence of an endotoxin mediated inflammatory response? *Gut* 2003; 52: 270-274
- 13 Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep* 2004; 24: 452-474
- 14 Simsek I, Mas MR, Yasar M, Ozyurt M, Saglamkaya U, Deveci S, Comert B, Basustaoglu A, Kocabalkan F, Refik M. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces bacterial translocation in a rat model of acute pancreatitis. *Pancreas* 2001; 23: 296-301

■同行评价

本研究利用大鼠SAP模型观察了内毒素、细胞因子和NO在SAP发展中的作用,并探讨了善宁治疗后各项指标的变化规律,在指导临床治疗上有重要意义。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行,现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3000字及摘要800字各1份,电脑打印(附软盘),2006-06-15截稿。

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授; 电话: 13313695959; E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.