

急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林

■背景资料

急性胆源性胰腺炎通常是由于胆总管、胰管受到不同程度的梗阻, 造成胆汁返流入胰管, 激活胰酶, 损害胰腺细胞, 或造成胰液排出受阻, 胰管内压升高, 导致胆源性胰腺炎的发生。近年来, 大量的研究发现, 在不同程度的急性胰腺炎动物模型中胰腺炎的严重程度与胰腺腺泡细胞凋亡呈负相关的, 表明细胞凋亡可能是对胰腺细胞损伤有益的保护反应, 并有可能减轻急性胰腺炎的严重程度。在梗阻早期腺泡细胞以坏死为主, 随着梗阻时间的延长坏死细胞逐渐增多; 在解除梗阻后腺泡细胞凋亡率增加而坏死减少。

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林, 南京医科大学第一附属医院胰腺外科 江苏省南京市 210029
通讯作者: 范志宁, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化内镜中心。
fanzhining@hotmail.com
电话: 025-58509932 传真: 025-58509931
收稿日期: 2006-01-17 接受日期: 2006-02-08

Change of acinar cell apoptosis in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction

Zhi-Ning Fan, Xun-Liang Liu, Guan-Ying Xiong, Wei Wen, Lin Miao

Zhi-Ning Fan, Xun-Liang Liu, Guan-Ying Xiong, Wei Wen, Lin Miao, Department of Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr. Zhi-Ning Fan, Center of Endoscopy, the Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210011, Jiangsu Province, China. fanzhining@hotmail.com
Received: 2006-01-17 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To analyze the correlations of the degrees of acute pancreatitis with the duration of bile-pancreatic duct obstruction (BPDO) and acinar cell apoptosis by observing the change of bile duct pressure.

METHODS: The model of acute pancreatitis was established by ligation of bile-pancreatic duct. Bile duct pressure was examined 4, 8, and 12 h after BPDO as well as 1 and 3 d after removal of BPDO. Flow cytometry was used to detect the acinar cell apoptosis (AnnexinV-FITC/PI assay) and the expression of Caspase-3.

RESULTS: Compared with that in control group (16.42 ± 1.03), the pressure of bile-pancreatic duct increased with the prolonging of obstruction duration (49.98 ± 3.05 , 90.20 ± 8.66 , 589.00 ± 60.10 for 4, 8, 12 h after obstruction, respectively). When BPDO was removed, the pressure decreased and returned to the normal level within 1 d (17.50 ± 2.84 , 16.37 ± 0.46 for 1 and 3 d after

removal of obstruction, respectively), and the difference was significant ($P < 0.01$). AnnexinV-FITC/PI assay showed that the number of apoptotic cells increased significantly 4 h after BPDO, but it decreased while the number of dead cells increased 12 h after BPDO. However, after removal of BPDO, acinar cell apoptosis increased while cell death decreased markedly with the prolonging of BPDO ($P < 0.01$). Caspase-3 detection confirmed that apoptosis reached the peak at 4 h, and then decreased gradually. Cell death was mostly observed at 12 h. One day after removal of BPDO, cell death still covered the most percentage, but 3 d later, apoptosis was significantly observed ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Enhancement of bile duct pressure is one of the mechanisms in the pathogenesis of acute pancreatitis, which leads to a decrease of acinar cell apoptosis. It is effective to resume the enhanced pressure to normal level at the early stage in the prevention of the disease from development.

Key Words: Acute obstructive pancreatitis, Bile duct pressure; Acinar cell apoptosis

Fan ZN, Liu XL, Xiong GY, Wen W, Miao L. Change of acinar cell apoptosis in rats with acute pancreatitis induced by bile-pancreatic-duct obstruction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(9):912-915

摘要

目的: 结合胆管压力的变化来探讨胰腺炎轻重程度与胆胰管梗阻时间及腺泡细胞凋亡的关系。

方法: 采用结扎胆胰管的方法制成胰腺炎模型。分别于梗阻后4、8、12 h以及解除梗阻后1、3 d分别测定胆管压力。流式细胞分析法检测胰腺腺泡细胞AnnexinV-FITC/PI和Caspase-3的表达。

结果: 与正常对照组(16.42 ± 1.03)相比, 随着梗阻时间的延长, 胆管压力明显增高(4, 8, 12 h分别为 49.98 ± 3.05 , 90.20 ± 8.66 , 589.00

±60.10), 而在解除梗阻后, 压力迅速下降并在1 d即恢复正常(1, 3 d分别为 17.50 ± 2.84 , 16.37 ± 0.46), 变化显著($P < 0.01$). AnnexinV-FITC/PI检测显示梗阻4 h时细胞凋亡较多, 至梗阻12 h时, 腺泡细胞凋亡明显减少而坏死增加; 在解除梗阻后, 随着时间的延长凋亡明显增多, 坏死逐渐减少, 变化显著($P < 0.01$). Caspase-3检测显示在梗阻4 h时凋亡表达最高, 梗阻8 h已明显减少, 12 h则以坏死为主要表达方式; 解除梗阻后1 d仍以坏死为主, 到第3天则表现出大量的凋亡, 变化显著($P < 0.01$).

结论: 胆管压力升高引起的胆胰液返流是胰腺炎的发病机制之一, 并可引起胰腺腺泡细胞的凋亡减少, 而早期恢复正常胆胰管压力可使细胞凋亡增多, 有效的阻止急性胰腺炎的病情发展.

关键词: 急性梗阻性胰腺炎; 胆胰管压力; 腺泡细胞凋亡

范志宁, 刘训良, 熊观瀛, 文卫, 缪林. 急性梗阻性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的变化. 世界华人消化杂志 2006;14(9):912-915
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/912.asp>

0 引言

急性胰腺炎的死亡率高达10%以上, 急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)占急性胰腺炎的34%-54%. 常因结石通过或嵌顿在壶腹部, 胆胰管共同通路梗阻, 导致胆汁反流至胰管, 诱发胰腺实质损伤而引起^[1]. 急性胰腺炎病情的严重程度与胰腺腺泡细胞凋亡程度密切相关, 凋亡基因及其信号的传导在该作用中起着重要的调节作用.

我们通过结扎胆胰管制成急性胰腺炎模型, 检测解除梗阻前后胰腺腺泡细胞凋亡的情况, 结合胆管压力的变化来探讨胰腺炎轻重程度与腺泡细胞凋亡及梗阻时间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 ♂ SD大鼠(清洁型)35只, 质量为200-250 g, 上海西普尔公司提供. 随机分为6组: 正常对照组, 梗阻4 h组, 8 h组及12 h组; 解除梗阻1 d组及3 d组.

1.1.2 主要试剂及溶液 胶原酶XI、透明质酸酶、胰蛋白酶抑制因子、Fluo-3/AM(荧光标记细胞内钙离子示踪剂)、多聚赖氨酸, 均购自美

国Sigma公司; Hanks液; 无钙Hanks液; HBSS液(含2.5 g/L牛血清白蛋白和0.1 g/L的刀豆胰蛋白酶抑制因子的Hanks平衡盐溶液); 无钙HBSS液; Caspase-3和AnnexinV-FITC/PI试剂盒购自晶美生物公司.

1.1.3 主要仪器 微型生物换能器(安徽蚌埠微型电子仪器设备公司). 流式细胞分析仪(FACS Vamcage SE, 美国B-D公司).

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 采用结扎胆胰管的方法制成梗阻型胰腺炎模型. 用2 g/L的乌拉坦腹腔注射麻醉(6 mL/kg), 将大鼠仰卧固定, 上腹剑突下正中开腹后, 确认胆胰管, 沿十二指肠寻找并确认胆胰管, 将腰麻管(塑料经改良与大鼠胆胰管直径基本吻合)逆行刺入胆胰管末端, 将胆胰管末端与腰麻管一起扎紧, 固定后逐层关腹, 在体外结扎腰麻管使胆管梗阻. 梗阻组分别于梗阻后4、8和12 h测定胆管压力后处死大鼠取胰腺组织检测. 解除梗阻组于梗阻12 h后解除梗阻, 并于解除梗阻后1、3 d分别测定胆管压力后处死大鼠取胰腺组织检测.

1.2.2 胰腺腺泡细胞的分离 参照Zhou *et al*^[2]和Padfield *et al*^[3]方法并改良. 处死大鼠取胰腺组织, 于大试管内剪碎组织, 加入10 mL消化液(含0.2 g/L XI胶原酶和0.4 g/L透明质酸酶的Hanks液), 37℃振荡水浴温孵10 min, 并通以950 mL/L O₂和50 mL/L CO₂混合气体, 静置. 更换消化液再温孵10 min, 静置. 重复两次, 将收集的上清液用200目尼龙网过滤, 500 r/min离心3 min, 弃上清液, HBSS液洗2次, 收集胰腺腺泡细胞. 将胰腺腺泡细胞混悬于无钙的HBSS液中, 经台盼蓝排斥实验证实细胞存活90%以上, 计数在 10^9 - 10^{13} 个细胞/L间.

1.2.3 腺泡细胞凋亡的检测 按试剂盒说明在细胞悬液中加入AnnexinV-FITC, 避光孵育10 min, 再加入碘化丙啶液(终浓度为1 mg/L), 采用流式细胞分析. AnnexinV-FITC阳性而PI阴性为凋亡, AnnexinV-FITC阴性而PI阳性为坏死.

1.2.4 Caspase-3的检测 按试剂盒说明在细胞悬液中加入缓冲液后在冰中孵育10 min, 再加入含10 mmol/L DTT的缓冲液和含1 mmol/L DEVD-AFC的酶化物后于37℃孵育1 h, 立即在流式细胞仪上进行分析.

统计学处理 所测数据用mean±SD表示, 通过SPSS11.0统计软件, 采用单因素方差分析对各组均数进行显著性检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异.

■ 创新盘点

本文结合梗阻前后胆胰管的压力变化、梗阻的时间及解除梗阻的时间来探讨细胞凋亡和胰腺炎的病情变化.

■应用要点

近10 a, 对急性胆源性胰腺炎早期治疗性ERCP虽被认可, 但是仍缺乏相应的研究资料, 在临床上广泛推广仍有一定的难度, 因此本课题通过研究胰腺炎轻重程度与胆胰管梗阻时间及腺泡细胞凋亡的关系来探讨临床早期治疗性ERCP的应用意义。

表 1 急性胰腺炎大鼠模型在梗阻解除前后的胆管压力变化的表达

组别	正常对照	梗阻4 h	梗阻8 h	梗阻12 h	解除梗阻1 d	解除梗阻3 d
鼠数 (n)	6	6	7	6	5	5
胆管压力	16.42 ± 1.03	49.98 ± 3.05 ^b	90.20 ± 8.66 ^b	589 ± 60.1 ^b	17.50 ± 2.84	16.37 ± 0.46

^bP<0.01 vs 正常对照组。

表 2 急性胰腺炎大鼠模型在梗阻解除前后腺泡细胞凋亡的表达

组别	正常对照	梗阻4 h	梗阻8 h	梗阻12 h	解除梗阻1 d	解除梗阻3 d
鼠数 (n)	6	6	7	6	5	5
AnnexinV	0.58 ± 0.55	16.96 ± 2.96 ^b	17.10 ± 4.27 ^b	3.63 ± 0.43 ^b	18.47 ± 6.87 ^b	69.81 ± 5.46 ^b
Caspase-3	7.85 ± 1.49	48.65 ± 5.08 ^b	9.74 ± 2.31 ^{bd}	0.65 ± 0.38 ^b	9.34 ± 3.98 ^b	52.2 ± 9.25 ^{bf}

^bP<0.01 vs 正常对照组; ^dP<0.01 vs 梗阻4 h; ^fP<0.01 vs 解除梗阻1 d。

2 结果

2.1 形态学改变 正常对照组胰腺组织无明显病理改变。在胰腺炎各组大体可见胰腺肿大, 呈灰白色, 严重者胰腺大片出血、有黄色坏死灶, 腹水, 腹腔脏器黏连, 大网膜、肠系膜和脏器表面可见皂化斑。光镜下可见叶间隙增宽、水肿, 中性粒细胞渗出, 血管充血变形, 血管破裂、大量出血, 胰腺腺泡解体、胞质空泡形成及坏死。以上表现均随梗阻时间延长而加重, 解除梗阻后随时间延长有所好转。

2.2 胆管压力的变化 随着梗阻时间的延长, 胆管压力明显增高。而在解除梗阻后, 压力迅速下降, 在1 d内即恢复正常(表1)。

2.3 腺泡细胞凋亡的表现 与正常对照组相比, AnnexinV-FITC/PI染色显示梗阻4 h时细胞凋亡较多, 梗阻12 h时, 腺泡细胞凋亡明显减少而坏死增加。梗阻8 h与4 h相比无明显变化。解除梗阻后, 凋亡细胞明显增多, 坏死逐渐减少。Caspase-3在梗阻4 h时凋亡表达最高, 梗阻8 h已明显减少, 12 h以坏死为主要表达方式; 解除梗阻后1 d仍以坏死为主, 第3天则表现出大量的凋亡(表2)。

3 讨论

胆石嵌顿于壶腹部或排石损伤引起壶腹部水肿, 壶腹部压力超过胰管分泌压, 造成胆胰液返流入胰管是急性胆源性胰腺炎发病的重要原因。临床上行早期治疗性经内镜逆行胰胆管造影(ERCP)可有效的缓解病情, 然而早期解除梗阻对急性胰腺炎的病程发展所起作用机制尚不清

楚。近年来大量的文献报道认为, 急性胰腺炎的病情轻重程度与腺泡细胞的凋亡程度呈负相关。轻型胰腺炎时腺泡细胞以凋亡为主, 此时胞膜完整, 凋亡小体被巨噬细胞吞噬, 无溶酶体和炎症介质等的释放。重症胰腺炎时腺泡细胞以坏死为主, 胞膜破裂, 引起多种酶和炎症介质的释放, 诱发了更严重的炎症反应, 产生瀑布样效应, 最终可导致死亡。可见细胞凋亡是机体对胰腺腺泡受损的一种保护性反应^[4]。

由于多种原因导致的壶腹部暂时性或功能性的梗阻, 导致胆管压力大于胰管压力(正常生理情况下胰管压力大于胆管压力), 胰液引流不畅。当胰管被暂时或持久阻塞, 胰管内压力升高(正常值不超过12 cm H₂O)达60 cm H₂O时, 可引起胰腺腺泡膜的破裂, 胰酶释放入胰腺间质组织, 引发胰腺炎。曾有人通过增加狗的腹压来制造胰腺炎模型, 发现由于腹压上升引起胆管压力的升高, 可使胰腺炎加重^[5]。Acosta *et al*^[6]也认为胆源性胰腺炎的严重程度与壶腹部梗阻的持续时间呈正相关。在本研究中, 结扎大鼠胆胰管可在短时间内明显增高胆管内压力, 并随着时间的延长, 压力增高幅度也随着增加。与此相应, 胰腺组织水肿坏死也逐渐加重; 胰腺腺泡细胞凋亡逐渐减少, 而坏死明显增加。在解除梗阻后, 1 d内胆管压力恢复至正常水平, 至第3天时, 胰腺组织的水肿坏死情况明显好转, 腺泡细胞凋亡也明显增加。可见梗阻所引起的胆胰管返流是胰腺炎的发病机制之一, 而早期恢复正常胆胰管压力可有效的阻止急性胰腺炎的病情发展。

在细胞凋亡早期, 细胞表面发生变化, 细胞膜内部的磷脂酰丝氨酸(PS)迁移到细胞外层表面, 巨噬细胞就是通过识别凋亡细胞表面细胞的磷脂酰丝氨酸将凋亡细胞或凋亡小体吞噬, 保护机体避免因细胞内部暴露引起的炎症反应. AnnexinV是一种对 Ca^{2+} 依赖, 对PS有高度亲和力的磷脂结合蛋白, 可作为探针识别细胞膜表面是否有PS, 从而识别凋亡细胞. Caspase是半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate-specific proteinase)的简称, 参与细胞凋亡和炎症反应. 其中Caspase-3(CPP32 apopain)是哺乳动物细胞凋亡中的关键酶. 临床常用Caspase 3来检测早早期的细胞凋亡.

在急性胰腺炎中, Caspase通过多种途径参与腺泡细胞的凋亡, 包括细胞膜途径、线粒体途径和内质网途径^[7-8]. Frossard *et al*^[9]用Cx32基因缺失的大鼠制作急性胰腺炎模型, 表现出胰腺炎连续的发病过程, 腺泡细胞数目减少, Caspase-3活性下降. Gallagher *et al*^[10]对胰腺炎细胞凋亡情况进行检测发现, FasL、FasL-mRNA和Caspase-3增加. 在本研究中, 随着梗阻时间的延长, Caspase-3的活性逐渐减少; 而在解除梗阻后, 随着时间的延长, 残留的腺泡细胞再生, 逐步恢复了胰腺腺泡细胞的功能, 其死亡方式也逐渐转为凋亡, Caspase-3的活性也逐渐增加.

并且我们发现, 在梗阻4 h组和8 h组间, Caspase-3和AnnexinV变化的幅度不大, 而12 h组与上两组相比两项指标均发生明显的变化, 即凋亡明显减少, 大量的细胞走向坏死. 相应的在梗阻解除后第1天, Caspase-3和AnnexinV所反映的细胞凋亡增加并不明显, 而在第3天两项指标发生了明显变化, 细胞凋亡明显增加. de Dios *et al*^[11]的研究也认为对于梗阻24 h以上的胰腺腺泡细胞的坏死是无法逆转的, 只有在解除梗阻3 d后胰腺腺泡细胞才能通过凋亡方式死亡.

由本研究可见, 在胆管梗阻早期, 胆管的压力上升还不多, 此时胰腺腺泡细胞尚有一定的

代偿能力, 其死亡方式以凋亡为主; 而当压力持续上升, 腺泡细胞膜破裂, 大量坏死引起急性胰腺炎的发生. 当梗阻解除后, 胆管压力迅速下降, 但在开始时仍有大量腺泡细胞坏死, 只有经过一定的时间后才逐步恢复正常. 因此在临床上, 对于胆源性胰腺炎患者采用早期ERCP+十二指肠乳头括约肌切开术(EST)的治疗, 可以有效减轻甚至阻止急性胰腺炎的发生与发展.

4 参考文献

- 1 李兆申, 许国铭主编. 胰腺疾病内镜诊断与治疗学. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 251-253
- 2 Zhou W, Levine BA, Olson MS. Platelet-activating factor: a mediator of pancreatic inflammation during cerulein hyperstimulation. *Am J Pathol* 1993; 142: 1504-1512
- 3 Padfield PJ, Panesar N. Ca^{2+} -dependent amylase secretion from SLO-permeabilized rat pancreatic acini requires diffusible cytosolic proteins *Am J Physiol* 1995; 269: G647-G652
- 4 Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G189-G196
- 5 田伏州, 黎冬暄, 陈玉琼, 袁成良, 邵洪, 李小军. 胰胆管压力变化及胆胰返流的原因分析. *中华实验外科杂志* 1997; 7: 207-208
- 6 Acosta JM, Rossi R, Galli OM, Pellegrini CA, Skinner DB. Early surgery for acute gallstone pancreatitis: evaluation of a systematic approach. *Surgery* 1978; 83: 367-370
- 7 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316
- 8 Tibbetts MD, Zheng L, Lenardo MJ. The death effector domain protein family: regulators of cellular homeostasis. *Nat Immunol* 2003; 4: 404-409
- 9 Frossard JL, Rubbia-Brandt L, Wallig MA, Benathan M, Ott T, Morel P, Hadengue A, Suter S, Willecke K, Chanson M. Severe acute pancreatitis and reduced acinar cell apoptosis in the exocrine pancreas of mice deficient for the Cx32 gene. *Gastroenterology* 2003; 124: 481-493
- 10 Gallagher SF, Yang J, Baksh K, Haines K, Carpenter H, Epling-Burnette PK, Peng Y, Norman J, Murr MM. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. *J Surg Res* 2004; 122: 201-209
- 11 de Dios I, Urunuela A, Manso M. Effects of early decompression and cholecystokinin inhibition in rats with acute pancreatitis induced by bilepancreatic duct obstruction. *J Lab Clin Med* 2003; 141: 265-271

■同行评价

急性胆源性胰腺炎在急性胰腺炎中占重要比例, 本研究以动物模型胆管压力变化来探讨胰腺炎轻重程度与细胞凋亡及梗阻时间关系, 研究目的明确, 研究设有对照组, 研究观察指标合理, 科学性强. 实验数据经统计学处理图表简明、清晰, 结果可信度强, 结论分析与实验结合较紧密, 逻辑性好. 结论论证了急性胰腺炎早期治疗重要性和尽早解除梗阻(引流)的重要性作出了理论上的支持, 具有一定的理论和临床指导意义.

电编 韩江燕 编辑 王瑾晖