

· 论 著 ·

## 己酮可可碱对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用

王 焯, 邓明明, 夏国栋, 康 敏

(四川省泸州医学院附属医院消化内科 646000)

**摘要:**目的 观察己酮可可碱对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠相关肺损伤的保护作用,并探讨其可能的发病机制。方法 36只雌性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、治疗组。采用5%牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射的方法,复制大鼠SAP相关肺损伤模型。治疗组在模型制作前30min给予己酮可可碱。12h后分别对胰腺损伤、肺损伤程度进行病理评分,测定肺系数、胰腺湿重、血清淀粉酶,用ELISA法检测血清和支气管肺泡灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量,用半定量RT-PCR法检测肺组织中NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达。结果 与模型组比较,治疗组胰腺及肺损伤程度明显减轻;其血清和支气管肺泡灌洗液中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量明显下降,肺组织中NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达亦明显减少。结论 己酮可可碱对SAP相关急性肺损伤具有保护作用,其机制可能与抑制肺组织中NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达,从而抑制促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 的产生相关。

关键词:胰腺炎;肺损伤;己酮可可碱;细胞因子

中图分类号:R365.576

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)24-3130-02

## Protective effect of pentoxifylline on severe acute pancreatitis associated lung injury in rats

WANG Xuan, DENG Ming-ming, XIA Guo-dong, et al.

(Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect and possible mechanism of pentoxifylline on severe acute pancreatitis associated lung injury in rats. **Methods** Thirty-six female Sprague-Dawley (SD) rats were divided into sham operated group, model group and treatment group. 1mL/kg body weight of 5% sodium taurocholate was retrogradely injected into the biliopancreatic duct of the rats to induce SAP associated lung injury. In treatment group, pentoxifylline was injected into caudal vein before 30min. Scores of pancreatic and pulmonary injury, plasma amylase, pancreatic wet weight and pulmonary coefficient were assessed. The value of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA. The expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in lung was detected by RT-PCR. **Results** To contrast with model group, the scores of pancreatic and pulmonary injury were lightened, the value of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  in serum and BALF was descended respectively, the expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in lung was decreased in treatment group. **Conclusion** Pentoxifylline has the protective effect on severe acute pancreatitis associated lung injury. The possible mechanism is correlated with that pentoxifylline inhibits the expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in lung, and decreases the output of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ .

Key words: pancreatitis; lung injury; pentoxifylline; cytokine

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)最常见的并发症之一是急性肺损伤(acute lung injury, ALI),目前合并肺损伤的相关机制尚未明确,研究认为ALI是由多种炎性介质(如TNF- $\alpha$ 、IL-6等)及效应细胞(如多形核白细胞、单核-巨噬细胞等)共同参与,并呈级联放大的瀑布样炎症继发性损伤与继发性弥漫性肺实质损伤<sup>[1]</sup>。己酮可可碱是甲基黄嘌呤衍生物,是一种非选择性磷酸二酯酶抑制剂,因其具有抗炎、清除氧自由基等多种功能,成为国内外医学研究的热点。本研究旨在探讨己酮可可碱对大鼠SAP相关肺损伤的保护作用机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与试剂** 雌性SD大鼠,体质量200~240g,由泸州医学院实验动物中心提供饲养。牛磺胆酸钠购自Sigma公司。己酮可可碱粉剂购自上海十六制药厂。大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  ELISA检测试剂盒购自上海晶美生物技术有限公司,RT-PCR试剂盒购自南京凯基生物科技公司。

**1.2 胰腺炎模型的制作及分组** 实验大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组,每组12只。采用5%牛磺胆酸钠(1mL/kg)逆行胰胆管注射的方法,复制大鼠SAP相关肺损伤模型,假手术组开腹后翻动肠壁即关腹,模型组和治疗组在牛磺胆酸

钠逆行胰胆管注射前30min通过大鼠尾静脉分别注射生理盐水和己酮可可碱(25mg/kg)。

**1.3 动物标本的采集** 12h后,12只大鼠中随机挑选6只,腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,自颈总动脉取血3~5mL,3000r/min离心10min取上清液,-20℃保存备用。用血管钳夹闭左侧肺门,取材左肺测量肺系数;用生理盐水4mL经气管导管行右肺灌洗3次,灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)离心取上血清液-80℃冻存备用。剩余6只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,无菌条件下开胸暴露肺脏,右肺下叶4%多聚甲醛固定,常规制备石蜡切片,HE染色;左肺下叶置于-80℃冻存,用于NF- $\kappa$ B p65的检测。剖取胰腺组织,4%多聚甲醛固定,常规制备石蜡切片,HE染色。

**1.4 肺系数测量** 肺系数=肺干重/肺湿重。大鼠左肺取材后,滤纸擦干肺表面液体,立即称重(湿重);再置于80℃恒温干燥箱72h至重量恒定,即为干重。计算肺系数。

**1.5 胰腺损伤、肺损伤评分** 参照Pozsar等<sup>[2]</sup>的方法对胰腺损伤进行评分;参照Hofbauer等<sup>[3]</sup>的方法,根据肺实质组织和空肺泡所占面积的百分比判断肺损伤的程度。

**1.6 血清淀粉酶的测定** 用全自动生化分析仪测定大鼠血清淀粉酶。

表 1 各组肺损伤评分、胰腺损伤评分、血清淀粉酶、肺系数及胰腺湿重的情况 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	肺损伤评分	胰腺损伤评分	血清淀粉酶(U/L)	肺系数	胰腺湿重
模型组	2.33±1.03*	9.50±1.87*	12 833.32±872.65*	0.13±0.08*	2.02±0.32*
治疗组	1.33±0.52*#	5.83±0.98*#	7 666.98±1 316.89*#	0.17±0.04*#	1.81±0.29*#
假手术组	0.17±0.41	0.67±0.52	1 266.48±198.76	0.21±0.03	1.24±0.06

与假手术组比较, \* : P<0.001;与模型组比较, # : P<0.01(每组 6 只,造模过程中大鼠有 12%左右死亡率)。

1.7 血清及 BALF TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的测定 按 ELISA 操作说明进行。

1.8 RT-PCR 法检测肺组织中 NF- $\kappa$ B p65 的表达 NF- $\kappa$ B p65 引物序列为:上游引物 5'-CAAGATCAATGGCTA-CACGG-3';下游引物 5'-CGCATTCAAGTCATAGTCCC-3';产物长 286bp。GAPDH 作内参,其引物序列为:上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCAT CAC-3';下游引物 5'-TCCAC-CACCCTGTTGCTGTA-3';产物长 452bp。反应条件:95 $^{\circ}$ C 2min(95 $^{\circ}$ C 30s、Tm:56 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 45s) 30 个循环、72 $^{\circ}$ C 5min、4 $^{\circ}$ C 1min,PCR 反应产物作 1%琼脂糖凝胶,用紫外凝胶成像分析系统 FUJILmLAS-300 测算每条带的光密度值,用目的基因扩增产物带之光密度值与内参扩增产物带之光密度值的比值表示每个样本目的基因的表达水平。

1.9 统计学方法 采用 SPSS13.0 统计软件,经方差齐性检验后,均数两两比较采用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺炎大鼠胰腺及肺组织病理变化

2.1.1 胰腺病理变化 模型组大鼠腹胀明显,剖腹后可见腹腔内大量血性腹水,肠管淤胀,胰腺与周围脏器粘连严重,表面呈灰褐色并可见坏死灶及皂化斑。镜下见胰腺损伤十分显著,表现为胰腺组织水肿、出血及片状坏死,大量炎性细胞浸润、部分腺叶正常结构消失。治疗组大鼠仅轻微腹胀,剖腹后见胰腺肿大,周围有少许渗液,镜下见胰腺组织水肿,无明显坏死,各组病理评分,见表 1。

2.1.2 肺组织病理改变 模型组大鼠肺组织损伤明显,部分大鼠出现胸水,镜下肺泡间隔明显增宽,大量炎性细胞浸润,肺泡腔内出现渗出液,肺组织结构紊乱,部分肺泡出现出血、肺泡腔塌陷。治疗组镜下见肺泡间隔增宽,腔内有少许渗液及炎性细胞浸润。各组病理评分见表 1。

表 2 各组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的浓度 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
模型组	211.74±38.26*	74.57±10.33*	654.48±125.64*
治疗组	138.62±17.51*#	42.87±9.15*#	267.29±91.44*#
假手术组	89.35±12.58	11.34±2.32	68.52±18.76

与假手术组比较, \* : P<0.001;与模型组比较, # : P<0.01。

表 3 各组肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的浓度 ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-1 $\beta$
模型组	128.26±15.82*	91.64±12.52*	467.23±75.69*
治疗组	64.38±9.45*#	53.18±8.96*#	172.36±54.61*#
假手术组	21.65±5.86	5.64±1.76	38.74±11.27

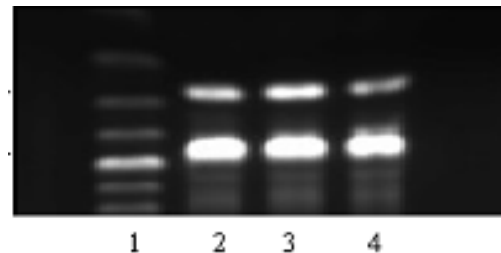
与假手术组比较, \* : P<0.001;与模型组比较, # : P<0.01。

2.2 血清淀粉酶、肺系数和胰腺湿重 各组血清淀粉酶、肺系数及胰腺湿重的情况,见表 1。

2.3 各组血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  浓度 见表 2。

2.4 各组肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  浓度 见表 3。

2.5 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达 见图 1 和表 4。



1:GAPDH(相对分子质量 146kd);2:假手术组;3:治疗组;4:模型组(2、3、4 是不同组 NF- $\kappa$ B p65)。

图 1 NF- $\kappa$ B p65 mRNA RT-PCR 产物电泳分析

表 4 各组中肺组织 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	NF- $\kappa$ B p65 mRNA
模型组	0.632±0.162*
治疗组	0.325±0.075*#
假手术组	0.186±0.053

与假手术组比较, \* : P<0.001;与模型组比较, # : P<0.01。

3 讨 论

本研究结果显示,己酮可可碱能有效减轻 SAP 胰腺和肺损伤的程度,降低肺组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达,血浆和 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的含量明显降低,表明己酮可可碱可能是通过抑制肺组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达,从而抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的产生而发挥其对肺组织的保护作用。

NF- $\kappa$ B 是一种多极性细胞转录核因子,是真核细胞中普遍存在的转录因子,也是目前发现的细胞内最重要的转录因子之一,研究显示其与机体免疫、炎症和细胞再生凋亡等过程密切相关。活化的 NF- $\kappa$ B 能够调控如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等细胞因子以及黏附分子、消化酶等的生成表达,使这些炎症介质和消化酶一起参与炎症反应和组织损伤,它的这种作用不仅表现在胰腺的腺泡细胞和单核巨噬细胞,同时也表现在肺等远处器官<sup>[4]</sup>。本研究结果显示,在 SAP 肺组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达明显增加,己酮可可碱抑制 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达后肺损伤程度明显减轻,这与 De 等<sup>[5-6]</sup> 研究结果相一致,说明 NF- $\kappa$ B p65 在 SAP ACI 发病过程中起着至关重要的作用。

TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  是细胞因子网络中非常重要的促炎细胞因子。TNF- $\alpha$  是最重要的炎症和免疫反应调节物,是由激活的巨噬细胞或淋巴细胞分泌的,与其相应受体结合后发挥作用。IL-6 由单核细胞、内皮细胞和成纤维细(下转第 3134 页)

胞受到损伤时,细胞膜和线粒体破裂,通透性增加,胞内大量的 LDH、AST 漏出胞外,检测心肌细胞 LDH 和 AST 的漏出率,可判断 DOX 对细胞的损伤程度<sup>[7]</sup>。因本实验为心肌细胞的体外研究,不存在其他组织细胞的影响,所选择检测指标仅需考虑敏感性,而不需考虑其特异性,因此,本院仅检测了细胞培养上清液中 LDH 和 AST 的浓度,未进行其他心肌坏死标志物的检测。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡方式,在机体生命活动过程中,细胞凋亡过多或过少都会诱发疾病,而病理性细胞凋亡是心肌细胞丧失的形式之一,是心血管疾病发生和发展的基础<sup>[8]</sup>。本研究结果提示,一定浓度的 DOX 对乳鼠心肌细胞有明显的抑制作用,可使心肌细胞的存活率下降,这种抑制作用与 DOX 的浓度以及作用时间呈正相关;同时,DOX 对心肌细胞膜和线粒体膜产生了不可逆的损伤,导致 LDH 和 AST 释放增加,线粒体功能紊乱,心肌细胞收缩力下降,并激活了心肌细胞的凋亡途径,这种损伤作用呈浓度依赖性。

建立合适的损伤心肌细胞模型是研究 DOX 毒性作用的关键所在,DOX 浓度过低,对心肌细胞损伤不足,DOX 浓度过高,则过度损伤心肌细胞,对实验观察均不利。本研究数据表明,DOX 对体外培养心肌细胞的毒性作用与其介导的氧化损伤及促凋亡作用有关,1.0mg/L 的浓度作用 4h 可建立可靠的心肌细胞毒性损伤模型,为 DOX 心脏毒性作用机制的研究奠定了一定的实验基础。

#### 参考文献:

[1] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomy-

opathy: from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330.

[2] Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339(13): 900.

[3] 白永虹,田杰,江德勤,等.大鼠心肌病模型的建立及彩色超声心动图监测的研究[J]. *重庆医学*, 2005, 34(2): 168.

[4] Michiko I, Shinji T, Takeshi N, et al. Bone marrow mononuclear cell transplantation had beneficial effects on doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Heart Lung Transplant*, 2004, 23(4): 436.

[5] Lou H, Kaur K, Sharma AK, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes [J]. *Pathophysiology*, 2006, 7(13): 103.

[6] Lobo AO, Antunes EF, Machado AHA, et al. Cell viability and adhesion on as grown multi-wall carbon nanotube films [J]. *Mater Sci Eng*, 2008, 28(2): 264.

[7] 王秀丽,董解菊,蒲晓允,等.天门冬氨酸转氨酶同工酶测定对心、肝疾病诊断的临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(10): 917.

[8] Lockshin RA. Programmed cell death: history and future of a concept [J]. *Soc Biol*, 2005, 199(3): 169.

(收稿日期:2009-07-15)

(上接第 3131 页)

胞等多种细胞产生。IL-1 $\beta$  在生物学活性上,可以使嗜碱性及中性粒细胞脱颗粒。已有研究显示, TNF- $\alpha$  是 SAP 发病后较早产生的细胞因子,可激活 PMN 促进多种炎症介质的释放,在 SAP 发病及其全身并发症发生过程中起着重要作用, TNF- $\alpha$  可以增加肺微循环的通透性,促进 PMN 在肺内的黏附和聚集、诱导中性粒细胞释放 NE 等。同时, IL-1 $\beta$  和 IL-6 在胰腺炎患者中亦明显升高。早期检测 TNF- $\alpha$  和 IL-6 不仅能反映 SAP 严重程度,同时有助于预测肺损伤发生及其严重程度。另外, 3 种细胞因子又相互作用,共同促进炎症的产生, TNF- $\alpha$  作为重要的始发因子在细胞和亚细胞水平上发生一系列的级联反应,诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及其自身的产生; TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  可刺激单核细胞和内皮细胞产生 IL-6<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,上述 3 种细胞因子的水平与 NF- $\kappa$ B 的表达密切相关,己酮可可碱通过调控 NF- $\kappa$ B 相关的细胞信号传导通路,从而控制了细胞因子所致炎症级联放大效应,达到减轻肺损伤的作用。

综上所述,己酮可可碱主要是通过抑制肺组织中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达,从而抑制促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  的产生而发挥其抗炎作用,己酮可可碱有望成为治疗 ALI 的药物之一。

#### 参考文献:

[1] 高冬娜,张璇.急性肺损伤研究进展[J]. *中国急救医学*, 2008, 28(1): 72.

[2] Pozsar J, Berger Z, Simon K, et al. Biphasic effect of prostaglandin E1 on the severity of acute pancreatitis induced by a closed duodenal loop in rats [J]. *Pancreas*, 1996, 12(2): 159.

[3] Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experiment acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(5): 1238.

[4] Rakonczay ZJR, Hegyi P, Takács T, et al. The role of NF- $\kappa$ B activation in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. *Gut*, 2008, 57(2): 259.

[5] De Campos T, Deree J, Martins JO, et al. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2008, 37(1): 42.

[6] Deree J, Martins J, De Campos T, et al. Pentoxifylline attenuates lung injury and modulates transcription factor activity in hemorrhagic shock [J]. *J Surg Res*, 2007, 143(1): 99.

[7] 陆海华,史忠,刘波,等.急性胰腺炎相关性肺损伤患者早期血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的变化及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2007, 36(18): 1818.

(收稿日期:2009-03-28 修回日期:2009-06-05)