

· 论 著 ·

乙酰胺半胱氨酸及氢化可的松对重症急性胰腺炎治疗作用的实验研究

蔡笃雄¹, 陈卫昌², 曾仕平¹, 汤 净¹, 林尤冠¹

(1. 海南医学院附属医院消化内科, 海口 570102; 2. 苏州大学附属第一医院消化内科, 苏州 215006)

摘要:目的 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)及氢化可的松对重症急性胰腺炎(SAP)的治疗保护作用及作用机制。方法 72 只 SD 大鼠随机分为 4 个组,假手术(SO)组、SAP 组、NAC 处理组及氢化可的松治疗组。采用胰胆管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠诱导大鼠 SAP 模型;NAC 处理组于模型制作前 30min 腹腔内注射 NAC(200mg/kg)进行预处理;氢化可的松治疗组于 SAP 模型制作成功后 10min 给予舌下静脉注射氢化可的松琥珀酸钠(10mg/kg);假手术(SO)组开腹后仅翻动胰腺,即关腹。分别观察各组大鼠血浆淀粉酶、TNF- α 、IL-6、肺湿/干比值、胰腺及肺组织病理以及组织髓过氧化物酶(MPO)的变化,采用 RT-PCR 法检测肺组织 TNF- α mRNA 的表达。结果 SAP 组血浆淀粉酶、TNF- α 、IL-6、肺湿/干比值、肺组织 TNF- α mRNA 的表达、胰腺及肺组织 MPO 均较 SO 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),NAC 处理组及氢化可的松治疗组上述各检测指标均较 SAP 组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),NAC 处理组胰腺及肺组织病理损伤明显减轻,氢化可的松治疗组肺组织病理损伤较 SAP 组减轻。结论 NAC 及氢化可的松可通过减少细胞因子 TNF- α 、IL-6 的产生,对 SAP 具有一定的治疗保护作用。

关键词:胰腺炎;乙酰胺半胱氨酸;激素;细胞因子

中图分类号: R576; R977.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)02-0137-03

An experimental study of therapeutic effect of antioxidant and cortisone on severe acute pancreatitis

CAI Du-xiong¹, CHEN Wei-chang², ZENG Shi-ping¹, et al.

(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China;

2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effect and mechanism of antioxidant and cortisone on severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** Seventy-two SD rats were randomized into four groups: sham operation (SO) group, SAP group, N-acetylcysteine (NAC)-pretreated group and hydrocortisone-treated group. The model of SAP was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the bile-pancreatic duct in SD rats, NAC-pretreated group was given 200mg/kg NAC intraperitoneally 30 min before inducing SAP, hydrocortisone-treated group was given 10mg/kg hydrocortisone 10 min after inducing SAP. The levels of amylase, TNF- α , IL-6, the wet/dry ratio of lung, and myeloperoxidase (MPO) in the pancreas and lung were measured. The histopathological changes of pancreatic and pulmonary tissue were evaluated. Intrapulmonary TNF- α mRNA was detected. **Results** The levels of amylase, TNF- α , IL-6, the MPO in the pancreas and lung, the wet/dry ratio of lung, and the expression of TNF- α mRNA in the lung were significantly increased in SAP group compared with those in SO group ($P < 0.05$). Compared with SAP group, the indexes were significantly decreased in NAC-pretreated group and hydrocortisone-treated group ($P < 0.05$), the severity of pancreas and lung injury also significantly decreased in NAC-pretreated group, the severity of lung injury was decreased in hydrocortisone-treated group. **Conclusion** Antioxidant (N-acetylcysteine) and cortisone (hydrocortisone) may have the therapeutic effect on SAP by decreasing the production of TNF- α and IL-6.

Key words: pancreatitis; N-Acetylcysteine; Hydrocortisone; cytokine

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床上常见的危重疾病,病情进展迅速,早期容易并发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),死亡率高。因此,早期干预治疗防止急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)由轻型向重症发展成为目前重要的研究课题。本实验通过建立大鼠 SAP 模型,并给予 N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine, NAC)预处理及氢化可的松治疗,以探讨 NAC 及氢化可的松对 SAP 的治疗保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 健康 SD 大鼠 72 只,清洁级,体重 200~250g,由苏州大学医学院实验动物中心提供。牛磺胆酸钠(95%)购自 Sigma 公司,IL-6 试剂盒购自 Bender Medsystems 公司, TNF- α 试剂盒购自北京晶美生物工程公司,组织髓过氧化物酶(MPO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所, TNF- α 及 β -actin 引物由上海生工生物工程公司合成, N-乙酰-L-半胱氨酸

(NAC)购于上海源聚生物科技公司,氢化可的松琥珀酸钠注射剂购自天津市生物化学制药厂。

1.2 实验分组及动物模型的制备 72 只 SD 大鼠随机分为 4 个组。(1)SAP 组:18 只,参照钱明平等^[1]的制模方法以 0.1 mL/3min 的速度向胰胆管内逆行注入 5% 牛磺胆酸钠(1mL/kg)建立大鼠 SAP 模型。大鼠 SAP 的诊断以病理检查胰腺组织出现腺泡细胞的变性坏死、炎症细胞浸润及胰腺周围出血为标准并参照 Schmidt 的病理学评分标准。(2)NAC 处理组:18 只,于模型制作前 30min 腹腔内注射 5% NAC(200mg/kg)进行预处理。(3)氢化可的松治疗组:18 只,于 SAP 模型制作成功后 10min 给予舌下静脉注射氢化可的松琥珀酸钠(10mg/kg)。(4)假手术(SO)组:18 只,开腹后仅翻动胰腺,即关腹。各组分别于术后 3、6h 和 12h 腹主动脉抽血(各组每时点 6 只),分离血浆保存于-20℃中各测,将大鼠处死,留取胰头部胰腺组织并分为两部分,一部分用 10% 甲醛固定,用于光镜组织病理学检查,另一部分快速置液氮中保存,用于提取组织匀

表 1 各组大鼠各时点血浆 AMY、TNF- α 、IL-6 水平、胰腺及肺组织 MPO 的水平、肺湿/干比值、肺组织 TNF- α mRNA 的表达水平及胰腺组织病理学评分

组别	时间	血浆 AMY (u/L)	血浆 TNF- α (pg/mL)	血浆 IL-6 (pg/mL)	胰腺 MPO (u/g)	肺 MPO (u/g)	肺湿/干比值	肺组织 TNF- α / β -actin	胰腺组织 病理学评分
SO 组	3h	1 318 \pm 437	52.38 \pm 22.04	96.75 \pm 15.79	0.56 \pm 0.25	3.65 \pm 1.00	4.35 \pm 0.28	0.27 \pm 0.78	0.55 \pm 0.16
	6h	1 705 \pm 793	66.65 \pm 16.41	90.49 \pm 16.01	0.59 \pm 0.43	3.95 \pm 1.13	4.38 \pm 0.24	0.30 \pm 0.64	0
	12h	1 530 \pm 515	60.33 \pm 17.48	98.86 \pm 19.52	0.60 \pm 0.28	4.03 \pm 1.08	4.46 \pm 0.20	0.25 \pm 0.57	0
SAP 组	3h	4 793 \pm 1 592 $\Delta\Delta$	85.31 \pm 26.30 Δ	125.92 \pm 18.94 Δ	1.18 \pm 0.51 Δ	5.06 \pm 1.17 Δ	4.61 \pm 0.50	0.52 \pm 0.58 $\Delta\Delta$	3.67 \pm 0.82 $\Delta\Delta$
	6h	5 676 \pm 2 311 $\Delta\Delta$	117.00 \pm 28.90 $\Delta\Delta$	132.44 \pm 28.05 $\Delta\Delta$	1.39 \pm 0.38 $\Delta\Delta$	6.08 \pm 1.57 $\Delta\Delta$	5.07 \pm 0.49 $\Delta\Delta$	0.92 \pm 0.96 $\Delta\Delta$	6.08 \pm 1.36 $\Delta\Delta$
	12h	6 487 \pm 2 123 $\Delta\Delta$	99.18 \pm 22.75 $\Delta\Delta$	148.88 \pm 20.36 $\Delta\Delta$	1.87 \pm 0.70 $\Delta\Delta$	8.92 \pm 0.79 $\Delta\Delta$	6.03 \pm 0.94 $\Delta\Delta$	0.72 \pm 0.59 $\Delta\Delta$	8.00 \pm 1.05 $\Delta\Delta$
NAC 处理组	3h	2 844 \pm 1 365 $\ast\Delta$	54.71 \pm 20.60 \ast	103.59 \pm 17.36 \ast	0.58 \pm 0.40 \ast	3.81 \pm 0.68 \ast	4.39 \pm 0.27	0.43 \pm 0.66 $\ast\Delta\Delta$	3.08 \pm 1.63 Δ
	6h	3 109 \pm 1 411 \ast	82.88 \pm 18.24 \ast	99.20 \pm 21.74 \ast	0.89 \pm 0.39 \ast	4.42 \pm 0.55 \ast	4.55 \pm 0.30 \ast	0.77 \pm 0.11 $\ast\Delta\Delta$	4.67 \pm 1.25 $\ast\Delta\Delta$
	12h	3 573 \pm 2 347 \ast	68.32 \pm 24.76 \ast	133.48 \pm 22.84 Δ	0.90 \pm 0.17 $\ast\ast$	7.14 \pm 1.61 $\ast\Delta\Delta$	4.80 \pm 0.88 \ast	0.62 \pm 0.74 $\ast\Delta\Delta$	6.00 \pm 1.30 $\ast\Delta\Delta$
氢化可的松治疗组	3h	4 498 \pm 1 580 Δ	57.31 \pm 15.63 \ast	101.80 \pm 18.25 \ast	0.74 \pm 0.29	3.85 \pm 0.64 \ast	4.41 \pm 0.12	0.41 \pm 0.54 $\ast\Delta\Delta$	3.41 \pm 0.86 $\Delta\Delta$
	6h	4 717 \pm 1 800 $\Delta\Delta$	85.73 \pm 17.91 \ast	92.56 \pm 14.36 \ast	0.90 \pm 0.47	4.28 \pm 1.16 \ast	4.48 \pm 0.24 \ast	0.80 \pm 0.11 $\ast\Delta\Delta$	5.00 \pm 1.22 $\Delta\Delta$
	12h	4 647 \pm 1 105 $\Delta\Delta$	70.49 \pm 21.51 \ast	104.07 \pm 19.06 $\ast\ast$	1.20 \pm 0.61	7.44 \pm 1.37 $\ast\Delta\Delta$	4.55 \pm 0.82 \ast	0.64 \pm 0.85 $\ast\Delta\Delta$	6.50 \pm 1.41 $\Delta\Delta$

与 SO 组相应时点比较, Δ : $P < 0.05$, $\Delta\Delta$: $P < 0.01$; 与 SAP 组相应时点比较, \ast : $P < 0.05$, $\ast\ast$: $P < 0.01$ 。

浆检测组织 MPO; 留取肺组织, 右上肺组织用 10% 甲醛固定, 用于光镜组织病理学检查, 剩余肺组织分 3 部分置液氮中保存, 右下肺组织用于提取组织匀浆检测组织 MPO, 左上肺组织用于检测肺湿/干比值, 左下肺组织用于检测肺组织中 TNF- α mRNA 的表达。

1.3 观察指标和检测方法

1.3.1 血浆淀粉酶 采用全自动生化分析仪 (Olympus AU-2700) 检测, 血浆 TNF- α 、IL-6 采用 ELISA 方法检测, 严格按试剂盒说明进行操作。

1.3.2 胰腺及肺组织 MPO 采用酶化学法测定, 以每克组织湿片在 37 $^{\circ}$ C 的反应体系中 H₂O₂ 被分解 1 μ mol 为 1 个酶活力单位, MPO(单位/克湿片) = [测定管吸光度(A)值 - 对照管 A 值] / (11.3 \times 取样量), 该指标反映组织中中性粒细胞的聚集程度。

1.3.3 肺组织湿干比值测定 将左下肺组织从液氮中取出后称重, 然后将肺组织置于 60 $^{\circ}$ C 烘箱内烘烤 72h, 去除水分, 取出称干重, 所得的数值为肺干重, 肺湿/干比值为肺湿重/肺干重, 该指标反映肺水肿的程度。

1.3.4 病理学检查及评分 胰腺及肺组织经 10% 甲醛固定、石蜡包埋、HE 染色后于光镜下观察, 并根据 Schmidt 等的病理学评分标准对胰腺组织进行评分。

1.3.5 肺组织 TNF- α mRNA 的表达 采用半定量逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 技术检测, PCR 反应条件分别为 β -actin: 94 $^{\circ}$ C \times 30s, 60 $^{\circ}$ C \times 30s, 72 $^{\circ}$ C \times 30s; TNF- α : 94 $^{\circ}$ C \times 30s, 60 $^{\circ}$ C \times 30s, 72 $^{\circ}$ C \times 30s 共 30 个循环, 结束前 72 $^{\circ}$ C \times 7min 以充分延伸。TNF- α 引物序列如下: TNF- α (312bp) 正义 5'-CTC AAA GAC AAC CAA CTG GTG GTA C-3', 反义 5'-ACA GAG CAA TGA CTC CAA AGT AGA CC-3', 以 β -actin (219bp) 为内参照, 用 TNF- α / β -actin 的光密度比值作为肺组织 TNF- α mRNA 表达量的测定指标。

1.4 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 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, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆淀粉酶、TNF- α 、IL-6 水平 SAP 组各时间点血浆淀粉酶水平均较 SO 组显著升高 ($P < 0.01$), NAC 处理组各时间

点血浆淀粉酶均较 SAP 组明显降低 ($P < 0.05$), 差异均有统计学意义。氢化可的松治疗组各时间点血浆淀粉酶水平均较 SAP 组降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。SAP 组各时间点血浆 TNF- α 、IL-6 水平均明显高于 SO 组 (TNF- α : 3h 时 $P < 0.05$, 6、12h 时 $P < 0.01$; IL-6: 3、6h 时 $P < 0.05$, 12h 时 $P < 0.01$), NAC 处理组各时间点血浆 TNF- α 水平及 3、6h 时 IL-6 水平均较 SAP 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 12h 时 IL-6 水平与 SAP 组相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。氢化可的松治疗组各时间点血浆 TNF- α 、IL-6 水平均较 SAP 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

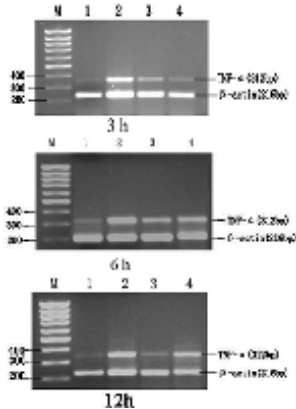
2.2 胰腺及肺组织 MPO 水平 SAP 组各时间点胰腺及肺组织 MPO 水平均明显高于 SO 组 (胰腺 MPO: 3h 时 $P < 0.05$, 6、12h 时 $P < 0.01$, 肺组织 MPO: 3h 时 $P < 0.05$, 6、12h 时 $P < 0.01$), NAC 处理组各时间点胰腺及肺组织 MPO 水平均较 SAP 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。氢化可的松治疗组各时间点胰腺 MPO 水平与 SAP 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 各时间点肺组织 MPO 水平均较 SAP 组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肺组织湿/干比值 SAP 组 6、12h 肺组织湿/干比值均明显高于 SO 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), NAC 处理组及氢化可的松治疗组 6、12h 肺组织湿/干比值均明显低于 SAP 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), NAC 处理组及氢化可的松治疗组各时间点与 SO 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 肺组织中 TNF- α mRNA 的表达 SO 组肺组织中 TNF- α mRNA 呈微弱表达, SAP 组各间点肺组织 TNF- α mRNA 表达水平均较 SO 组明显增加 ($P < 0.01$), NAC 处理组及氢化可的松治疗组各时间点肺组织中 TNF- α mRNA 的表达水平均较 SAP 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1、图 1)。

2.5 胰腺及肺组织病理改变 SO 组光镜下胰腺组织基本正常, SAP 组可见胰腺腺泡水肿及腺泡结构消失, 叶间隔、小叶间隔及腺泡间隔显著增宽, 大量炎症细胞浸润, 腺泡细胞呈不同程度变性坏死, 胰腺周围出血, 随着时间的延长, 病变呈进行性加重。NAC 处理组各时间点胰腺水肿、出血及炎症细胞浸润均较 SAP 组减轻, 少数偶见局灶性腺泡细胞变性坏死, 氢化

可的松治疗组胰腺水肿、出血、坏死及炎性细胞浸润仍较明显,各时间点与 SAP 组比较未见明显减轻。病理学评分:SAP 组各时间点胰腺组织病理学评分均显著高于 SO 组($P < 0.01$),NAC 处理组 6、12h 胰腺组织病理学评分均明显低于 SAP 组($P < 0.05$),氢化可的松治疗组各时间点胰腺组织病理学评分与 SAP 组相比差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。SO 组光镜下肺组织无明显变化,SAP 组可见肺泡壁水肿,肺间质及肺泡腔有大量中性粒细胞及单核细胞浸润,肺泡结构紊乱,肺内可见散在出血灶,肺血管内可见血栓形成,且随着时间的延长,病变逐渐加重。NAC 处理组及氢化可的松治疗组各时间点肺泡壁、肺间质水肿均较 SAP 组减轻,炎症细胞浸润明显减少,肺泡结构基本正常,肺内未见出血灶。



M: Marker; 1: SO 组; 2: SAP 组; 3: NAC 处理组; 4: 氢化可的松治疗组。

图 1 4 个组大鼠各时点肺组织 TNF- α mRNA 的表达电泳图

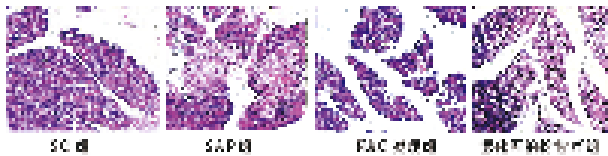


图 2 各组 6h 时胰腺组织的病理改变(HE $\times 100$)

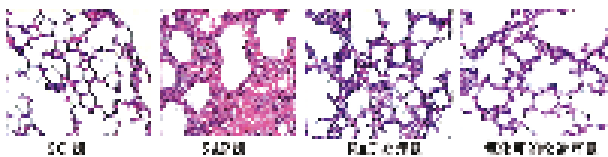


图 3 各组 12h 时肺脏组织的病理改变(HE $\times 100$)

3 讨论

重症急性胰腺炎(SAP)的发病机制尚未完全阐明,研究表明,重症急性胰腺炎由于众多炎症介质和细胞因子的瀑布样级联反应,从而导致 SIRS 和 并发症急性肺损伤,其中 TNF- α 、IL-6 在 SAP 的发生、发展中具有重要的作用^[2],早期对 SAP 发病过程中的 TNF- α 、IL-6 进行干预对 SAP 具有重要的治疗保护作用^[3]。

TNF- α 、IL-6 等细胞因子的转录、合成受核因子- κ B(NF- κ B)的调控,在 SAP 时大量的氧自由基激活 NF- κ B,并进一步激活 IL-1、IL-6、TNF- α 等细胞因子的转录、合成,促进细胞因子的大量生成,从而导致 SIRS 和 MODS。Hyeyoung 等^[4]研究发现,运用抗氧化剂 NAC 能抑制大鼠 AP 时胰腺组织 NF- κ B 的激活,使胰腺细胞内上述细胞因子表达显著降低,从而改

善 AP 的病情。另外,动物研究表明,给予氢化可的松预处理或治疗后能显著降低 SAP 时 TNF- α 、IL-6 水平,明显提高动物生存率^[5]。本实验中,SAP 组血浆 TNF- α 、IL-6 水平显著升高,给予 NAC 预处理及氢化可的松治疗能显著降低血浆 TNF- α 、IL-6 水平,结果表明,NAC 及氢化可的松可通过减少 TNF- α 、IL-6 的产生发挥抗炎症效应,改善 SAP 的病情。

研究发现,SAP 时肺组织中 TNF- α mRNA 呈现强烈与持久的表达,TNF- α mRNA 的表达水平与肺损害程度呈正相关^[6]。本实验中,SAP 组肺组织 TNF- α mRNA 的表达显著增加,NAC 处理组及氢化可的松治疗组肺组织 TNF- α mRNA 表达水平均较 SAP 组显著降低,肺组织病理损伤较 SAP 组明显减轻,表明给予 NAC 预处理及氢化可的松治疗对 SAP 肺损伤可能具有重要的治疗保护作用。

本实验中,给予 NAC 预处理能显著降低 SAP 时胰腺及肺组织 MPO 水平,明显降低肺湿/干比值,并能明显减轻胰腺及肺组织的病理损伤,表明给予 NAC 预处理能明显减轻胰腺及肺组织中中性粒细胞的浸润,减轻胰腺及肺组织的炎症反应,改善 SAP 时胰腺及肺组织损伤。另外,给予氢化可的松治疗能显著降低 SAP 肺组织中 MPO 的水平及肺组织湿/干比值,并能明显减轻各时间点肺组织的病理损伤,提示给予氢化可的松治疗能明显减轻肺组织炎症反应及肺水肿,改善肺组织损伤。但在本实验中,氢化可的松治疗组血浆淀粉酶水平、胰腺组织 MPO 水平、胰腺组织病理学评分与 SAP 组比较均无明显差异,胰腺组织病理损伤与 SAP 组相比未见明显减轻,说明氢化可的松治疗并不能改善 SAP 时胰腺组织的病理损伤。

综上所述,NAC 及氢化可的松可通过减少细胞因子 TNF- α 、IL-6 的产生,改善 SAP 的病情,早期应用抗氧化剂及激素进行干预对重症急性胰腺炎具有一定的治疗保护作用。

参考文献:

- [1] 钱明平,房林,沈蓉蓉,等. BD 针在大鼠急性胰腺炎模型中的应用[J]. 重庆医学,2008,37(11):1219.
- [2] 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- α 、IL-1、IL-6 的变化及其临床意义[J]. 重庆医学,2007,36(18):1818.
- [3] Sevillano S,De la Mano AM,Manso MA,et al. N-acetylcysteine prevents intra-acinar oxygen free radical production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis[J]. Biochim Biophys Acta,2003,1639:177.
- [4] Hyeyoung K,Jeong YS,Kwan HR,et al. Suppression of NF- κ B activation and cytokine production by N-Acetylcysteine in pancreatic acinar cells[J]. Free Radic Biol Med,2000,29:674.
- [5] Osman MO,Jacobsen NO,Kristensen JU,et al. Beneficial effects of hydrocortisone in a model of experimental acute pancreatitis[J]. Dig Surg,1999,16(3):214.
- [6] 张刚,修瑞龄,杨训,等. 肿瘤坏死因子 α 基因表达、细胞凋亡与急性胰腺炎肺损伤关系的实验研究[J]. 中华消化杂志,2002,22(1):22.