

- [20] Kutz JJ, Friedman RA. Congenital middle ear cholesteatoma[J]. Ear Nose Throat J, 2007, 86(11):654.
- [21] Lazard DS, Roger G, Denoyelle F, et al. Congenital cholesteatoma: risk factors for residual disease and retraction pockets—a report on 117 cases[J]. Laryngoscope, 2007, (117):634.

- [22] Potsic WP, Samadi DS, Marsh RR, et al. A staging system for congenital cholesteatoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 128:1009.

(收稿日期:2009-08-24 修回日期:2009-10-19)

· 综 述 ·

重症胰腺炎肝细胞凋亡的机制及展望

刘 宏 综述, 邓明明[△] 审校

(泸州医学院附属医院消化内科, 四川泸州 646000)

关键词: 重症急性胰腺炎; 肝脏损伤; 细胞因子

中图分类号: R576.02

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)09-1153-03

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是局部环境生理或病理性变化引起的、由自身内部机制调节的一种主动的并按一定程序进行的细胞自发性死亡方式。重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)过程中血清、腹水及肝脏各种原因造成的肝损伤都可以出现肝细胞凋亡, 肝细胞凋亡是肝脏损伤的表现及机制之一, 大量的肝细胞凋亡可造成肝功能障碍, 严重时可发展至肝衰竭。因此, 了解重症胰腺炎时肝细胞凋亡的机制将有利于重症胰腺炎肝脏损伤的预防及治疗。

1 胰腺炎时引起肝细胞凋亡因素

1.1 胰腺炎相关性腹水(pancreatitis, associated ascitic fluid, PAAF) 近年来发现胰腺炎相关性腹水在胰腺炎肝脏损伤肝细胞凋亡中有着重要的作用, 在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)时形成腹水不仅作为一种损伤体征出现, 而且具有很强的致病性, 可以促使 AP 病情进一步加剧, 并造成胰外器官的损害。

Takeyama^[1]通过动物实验研究发现胰腺炎相关性腹水能够导致肺泡上皮细胞、肾小管上皮细胞及肝细胞等器官的薄壁细胞凋亡, 并导致急性重症胰腺炎器官功能不全。细胞的凋亡数影响重症胰腺炎的死亡率及发病率, 控制细胞的凋亡对改善重症胰腺炎的临床愈后有重要的意义。Yang 等^[2]又进一步发现, 向大鼠静脉滴注灭菌的 PAAF, 同时将离体人肝细胞株(CCL-13)暴露于 PAAF 24 h 后, 大鼠血清天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)、丙氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)水平和肝细胞凋亡的数量都明显增加。在 CCL-13 中检测到 p38-促分裂原活化蛋白激酶(p38-mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)的激活, 细胞凋亡出现了时间和剂量的依赖性, 而 caspase-3 抑制剂 II 可以减少凋亡。故而认为 PAAF 通过 p38-MAPK 的激活和 caspase-3 依赖的途径引起肝细胞凋亡从而造成了肝损伤。同时也有学者认为, PAAF 通过其含有的细胞毒性物质造成了肝细胞凋亡, 并发现 PAAF 导致肝细胞酸中毒、细胞内钠滞留、线粒体内 ATP 耗竭等, 并认为 PAAF 中含有的血色素可能是造成肝脏损伤的细胞毒性物质之一, PAAF 可造成肝细胞内钙超载。这也可能是 AP 时肝脏受损以及 AP 造成多器官功能损伤的原因之一。

1.2 弹性蛋白酶 在正常情况下, 胰液内的胰蛋白酶原无活性, 待其流入十二指肠, 受到胆汁和肠液中的肠激酶(enterodi-

nase)的激活作用后乃变为有活性的胰蛋白酶。胰腺炎时因某些因素激活了胰蛋白酶, 后者又激活了其他酶反应, 如胰蛋白酶对由脂蛋白构成的细胞膜及线粒体膜并无作用, 而胰液中的磷脂酶 A 被脱氧胆酸激活后, 作用于细胞膜和线粒体膜的甘油磷脂, 使之分解变为脱脂酸卵磷脂, 亦称溶血卵磷脂(lysolecithin), 后者对细胞膜有强烈的溶解作用, 可溶解、破坏胰腺细胞膜和线粒体膜的脂蛋白结构, 致细胞凋亡坏死。

Sha 等^[3]和赵万蓉^[4]认为胰蛋白酶是 SAP 多器官功能障碍的罪魁祸首。弹性蛋白酶正常存在于胰腺腺泡细胞的酶原颗粒和胰液中, 被胰蛋白酶激活后水解弹力纤维和多种其他蛋白质, 是消化破坏血管壁的关键酶, 使血管壁水肿、出血、微循环障碍, 从而造成患者早期循环紊乱, 多脏器出血、血性胸腔积液及腹水。这种病理变化最明显的是肝脏, 因为肝脏是第一个接受最高浓度的胰蛋白酶静脉血流的器官。Murr 等^[5]利用含胰弹性蛋白酶(1 u/mL)和/或钆(0.5 mg/mL)的灌洗液灌洗鼠的肝脏, 胰弹性蛋白酶可以使流出液中 AST、ALT、LDH、肿瘤坏死因子(TNF)和细胞坏死凋亡率升高, 且组织中 TNF-mRNA 表达也增加, 而钆则可以减弱弹性蛋白酶的这些作用。

由此可见, 弹性蛋白酶可以导致类似 AP 时的肝损害表现, 与弹性蛋白酶的激活可导致 ASP 时急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生是一致的, 由此而认为弹性蛋白酶是 AP 时全身多器官衰竭中导致炎症细胞广泛激活的重要因子。

1.3 细胞内 Ca²⁺ 超负荷 细胞内 Ca²⁺ 是重要的第二信使, 参与细胞的多种生理功能, 一旦超负荷将从多方面对细胞造成不可逆的损伤和促凋亡作用。Ueda 等^[6]用荧光钙离子指示剂 Fluo-2/AM 检测 PAAF 原代培养的人肝细胞, 发现 PAAF 可以增加细胞内 Ca²⁺, 且在加入 PAAF 1 min 后就有细胞内 Ca²⁺ 的增加。对 PAAF 成分分析发现, 只有分子质量在 5 × 10⁴ 及其以上的成分同时具有升高细胞内 Ca²⁺ 和细胞毒性的特性。且细胞内 Ca²⁺ 释放阻滞剂(TMB-8)和毒胡萝卜素都不能抑制 PAAF 导致的细胞内 Ca²⁺ 升高, 细胞外 Ca²⁺ 螯合剂 EGTA 则能抑制细胞内 Ca²⁺ 升高。这意味着细胞内 Ca²⁺ 的增加是由细胞外向细胞内的转运所致。血小板活化因子受体抑制剂(TCV-309)也有阻断作用; 胰腺炎相关性血清也有升高细胞内 Ca²⁺ 的作用, 由此认为血小板活化因子在细胞内 Ca²⁺ 升高中可能发挥着中心环节的作用。

[△] 通讯作者, E-mail: mingming390@sina.com.

1.4 氧化剂诱导肝细胞凋亡 氧自由基(oxygen free radical, OFR)是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物,包括超氧阴离子、羟自由基以及其与多不饱和脂肪酸作用后衍生的烷氧自由基、烷氧自由基、烷过氧自由基、 H_2O_2 等统称为活性氧(reactive oxygen species,ROS)。正常时机体内自由基产生极少,且有抗氧化防御系统与之对抗,不会对机体造成损伤。但在病理条件下,如缺血、缺氧、炎症介质释放激活中性粒细胞(PMN)时可大量产生 OFR,造成机体的广泛损伤。现已证实,在 AP 时过度的炎症反应产生大量的细胞因子、血管活性因子,如血管紧张素转换酶(ACE)、血栓素 A₂(TXA₂)和前列腺素(PGI₂)在微循环障碍中起重要作用。另外,由于炎症介质的作用,PMN 在各种组织和器官内聚集、活化,众多原因均导致 OFR 以上述途径大量释放^[7]。

已注意到细胞暴露于低水平的氧化剂中容易激发凋亡,如低浓度的过氧化氢可诱导细胞的凋亡,高浓度的则可诱发坏死。

由于肝脏特殊的解剖位置及功能,重症胰腺炎时富含 OFR 物质的静脉血经门静脉到达肝脏引起肝细胞的凋亡从而引起肝细胞损伤,SAP 患者几乎很早都有肝功能异常表现。

1.5 线粒体功能状态与凋亡相关 线粒体在肝细胞凋亡中发挥重要作用,细胞受到凋亡信号刺激后,线粒体发生肿胀,位于线粒体内外膜之间的通透性转换孔道(mitochondrium permeability transition pore, MPTP)开放,使线粒体外膜电位降低、破裂,线粒体内细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、 Ca^{2+} 以及活性氧等释放到胞质中,分别通过破坏核内染色质或激活 caspase 或作用于其他 Ca^{2+} 依赖性蛋白,而引起细胞凋亡。

线粒体通过释放出凋亡诱导因子和/或细胞色素 C 诱导凋亡。如线粒体内膜发生损伤,则可导致线粒体功能的改变和肝细胞坏死。另外,一系列的单细胞的研究发现,在缺氧或高氧的情况下,激活线粒体的渗透转换能力能促进细胞死亡^[8]。

研究发现狗和人的 PAAF 均可以增加离体培养的鼠肝细胞线粒体呼吸的氧消耗率。并且人的 PAAF 增加耗氧率的作用更大,线粒体的 ATP 酶也被激活。进一步研究认为 PAAF 中的血红蛋白是导致肝细胞损害的主要物质之一。血红蛋白可能是实验中 PAAF 中存在的可透析性的线粒体毒性物质之一,通过干扰线粒体呼吸功能,导致肝细胞内环境平衡和能量代谢失衡,参与 SAP 时肝细胞的损害。

2 凋亡相关基因的调控

2.1 Bax 和 Bcl-2 实验发现,SAP 大鼠肝脏的细胞凋亡数明显增多,凋亡指数增高,凋亡发生部位与病理改变明显的部位吻合,肝脏细胞凋亡指数与肝功能的损害程度呈正相关,说明 SAP 肝脏损伤至少部分是通过细胞凋亡机制引起的,而且细胞凋亡是造成肝功能进一步恶化的重要因素之一。细胞凋亡调控基因中最受关注的就是 Bcl-2 家族,其中 Bcl-2 和 Pax 都是 Bcl-2 家族成员,Bcl-2 的生理功能主要是抑制细胞凋亡,延长细胞寿命。Bcl-2 与 Bax 可形成同二聚体或异二聚体来改变线粒体的通透性,从而决定细胞的生存与死亡。当 Bcl-2 相对量高于 Bax 时,Bcl-2 同二聚体增多并促进形成 Bcl-2-Bax 异二聚体,而 Bcl-2 同二聚体和 Bcl-2-Bax 异二聚体都可抑制细胞凋亡;相反当 Bax 的量相对高于 Bcl-2 时,则 Bax 同二聚体增多,从而促进细胞凋亡^[9]。因而 Bcl-2/Bax 两蛋白的比例是决定细胞凋亡或存活的关键因素^[10]。除此以外,Bcl-2 还可以通过直接或间接的影响细胞信号传递蛋白,如抑制 WTP53 介导

的细胞凋亡^[11]。而应用 DDFA(D:地塞米松,D:低分子右旋糖酐,F:5-氟脲嘧啶,A:抑肽酶)治疗后,Bax 基因表达明显下调,而 Bel-2 基因表达明显上调,Bel-2/Bax 比值上升。SAP 时随着肝脏凋亡细胞数增多,Bax 基因表达明显上升,Bel-2 的表达下调,肝功能进一步恶化,DDFA 使 Bax 基因表达明显下调,而 Bel-2 基因表达明显上调,减少肝脏细胞凋亡可明显改善肝功能。因此认为,DDFA 对肝功能的保护作用可能部分是通过调节凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 从而影响细胞凋亡实现的^[12]。

2.2 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) TGF- β_1 是一种广泛存在的生长抑制因子,可抑制肝细胞、胃肠道上皮细胞等多种上皮细胞的增殖。有研究发现,在肝脏、桔梗细胞、窦状内皮细胞、贮脂细胞和窦周细胞均表达 TGF- β_1 。虽然正常肝脏细胞或刚分离的新鲜肝细胞不表达 TGF- β_1 的 mRNA 或蛋白,但培养后的肝细胞和肝细胞瘤中的细胞可获得表达 TGF- β_1 的能力,另外肝脏处于其他疾病时也可检测到有 TGF- β_1 生成,而且和肝细胞的凋亡密切相关。Kusaka 等^[13] 研究发现 TGF- β_1 的含量与肝细胞的凋亡数成正比。Nakamura 等^[14] 发现,大鼠 AP 时 TGF- β_1 在血浆、PAAF、肝组织和腹膜巨噬细胞中的水平都升高,其中和抗体可以减少肝细胞的凋亡,降低血清谷丙转氨酶,而巨噬细胞的清除明显降低了血浆和 PAAF 中 TGF- β_1 蛋白的水平,且明显抑制了肝组织中 TGF- β_1 的激活。因此认为,AP 肝损伤与巨噬细胞引起的凋亡有关,而其衍生的 TGF- β_1 是诱导肝细胞凋亡的重要因子。有研究同时发现急性出血坏死性胰腺炎(ANP)时 PAAF、血浆和肝组织中有较高的 TGF- β_1 浓度,用 TGF- β_1 抗体中和技术可以减少肝细胞的凋亡。可见 PAAF 中的 TGF- β_1 由腹膜巨噬细胞产生,也可经腹膜吸收入血,从而介导远隔脏器细胞的凋亡。

2.3 Kupffer 细胞与 Fas/FasL 基因 研究发现,AP 时 Kupffer 细胞衍生的 Fas 配体(FasL1、p38-MAPK)、caspase-3 表达增加,并且诱导了肝细胞的凋亡损伤^[15-16]。Gallagher 等^[17] 又进一步发现,在 Fas/FasL 基因敲除大鼠中,AP 诱导的 p38-MAPK 表达显著降低,肝细胞的凋亡也明显减少。推测 Fas/FasL 在 AP 肝细胞的凋亡中起关键作用。Peng 等^[18] 通过胆碱缺乏和乙硫氨酸补充饮食(CDE)诱导大鼠 AP 模型,并用胰弹性蛋白酶在 p65 siRNA 转染的大鼠离体 Kupffer 细胞株中模拟 AP 损伤模型,实验发现 CDE 胰腺炎引起 p65 NF-kappa B/RelA 核转位、Fas/FasL 和 caspase-3 表达增加以及大鼠肝细胞核内 DNA 断裂。而在体外实验中,p65-siRNA 的转染减弱了弹性蛋白酶诱导的 p65 NF-kappa B/RelA 核转位和 Kupffer 细胞的凋亡,证明 AP 通过 NF-kappa B 途径诱导 Kupffer 细胞凋亡,并认为 Kupffer 细胞衍生的 Fas/FasL 诱导的肝细胞凋亡和 NF-kappa B 途径诱导的 Kupffer 细胞凋亡之间的平衡失调程度决定了 AP 时肝脏损伤的程度。

3 阻断肝细胞过度凋亡在重症胰腺炎肝损伤中的应用前景

肝细胞凋亡在重症胰腺炎肝脏损伤中发挥着重要的作用。重症胰腺炎时机体通过多种途径导致肝细胞的凋亡,其中以 PAAF 的毒性作用及氧自由基损伤和缺血损伤占有重要的作用。大量实验研究发现,重症胰腺炎时肝脏的损伤情况与肝细胞的凋亡呈正相关,且组织损伤与病理改变相符合。对于肝细胞凋亡在重症胰腺炎时肝脏损伤中作用的认识,促使人们探讨新的阻止肝细胞死亡的方法来治疗及预防重症胰腺炎对肝脏的损伤。有研究发现,对重症肝炎的小鼠注射抑制 caspase 蛋白酶核心的三肽,可以阻止肝细胞凋亡和肝功能衰竭的发生,使小鼠的肝脏功能改善。熊去氧胆酸可通过结合并排出有毒

的胆盐阻止凋亡,这种胆盐存在于鼠的肝细胞线粒体中,可以阻止线粒体的渗透性转换,保护线粒体功能。

如何阻止肝细胞的过度凋亡,将成为治疗重症胰腺炎肝脏损伤及肝病研究领域的新的热点,也将为胰腺炎肝脏损伤的治疗带来新的方法。

参考文献:

- [1] Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis[J]. *J Gastroenterol*, 2005, 40(1): 1.
- [2] Yang J, Fier A, Carter Y, et al. Liver injury during acute pancreatitis; the role of pancreatitis-associated ascitic fluid (PAAF), p38-MAPK, and caspase-3 in inducing hepatocyte apoptosis[J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7: 200.
- [3] Sha H, Ma Q, Jha RK. Trypsin is the culprit of multiple organ injury with severe acute pancreatitis[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 72(2): 180.
- [4] 赵万蓉. 急性重症胰腺炎诊断治疗进展——诊断和内科治疗[J]. *重庆医学*, 1996, 25(5): 300.
- [5] Murr MM, Yang J, Fier A, et al. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa[J]. *B J Gastrointest Surg*, 2002, 6(3): 474.
- [6] Ueda T, Takeyama Y, Takase K, et al. Hematin is one of the cytotoxic factors in pancreatitis-associated ascitic fluid that causes hepatocellular injury[J]. *Surgery*, 2002, 131(1): 66.
- [7] 白启轩, 冯子坛, 于兰, 等. 氧化损伤与急性胰腺炎所致多脏器损伤的研究进展[J]. *临床误诊误治*, 2006, 19(11): 71.
- [8] 肖经纬. 肝细胞凋亡机制及其检测方法的研究进展[J]. *国外医学卫生学分册*, 2006, 33(2): 93.
- [9] Yu XD, Wang SY, Chen GA, et al. Apoptosis induced by depsiptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells[J]. *Cancer J*, 2007, 13: 105.
- [10] Jung JW, Cho SD, Ahn NS, et al. Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by p38 M AP kinase inhibition in rat liver epithelial cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 1767.
- [11] 张毓芳, 刘恩桥. 细胞凋亡与心血管疾病研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2004, 9: 385.
- [12] 何邹骏, 方驰华, 朱明德. DDFA 对重症急性胰腺炎大鼠肝细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 基因表达的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(2): 220.
- [13] Kusaka K, Imamura H, Tomiya T, et al. Expression of transforming growth factor-alpha and -beta in hepatic lobes after hemihepatic portal vein embolization[J]. *Dig Dis Sci*, 2006, 51(8): 1404.
- [14] Nakamura H, Tashiro M, Yamaguchi T, et al. Preferential increase of extracellular matrix expression relative to transforming growth factor beta1 in the pancreas during the early stage of acute hemorrhagic pancreatitis in rats[J]. *Pancreas*, 2007, 35: e23.
- [15] Gallagher SF, Yang I, Baksh K, et al. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver[J]. *Surg Res*, 2004, 122: 201.
- [16] Yang J, Gallagher SF, Haines J, et al. Kupfer cell-derived Fas ligand plays a role in liver injury and hepatocyte death[J]. *Gastrointest Surg*, 2004, 8: 166.
- [17] Gallagher SF, Peng Y, Haines K, et al. Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis[J]. *Gastrointest Surg*, 2005, 9: 467.
- [18] Peng Y, Gallagher SF, Landmann R, et al. The role of p65 NF-kappaB/RelA in pancreatitis induced Kupffer cell apoptosis[J]. *R Gastrointest Surg*, 2006, 10: 837.

(收稿日期: 2009-08-17 修回日期: 2009-10-20)

(上接第 1138 页)

- [3] 董志伟, 谷铎之. 临床肿瘤学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 827.
- [4] 王永岗, 战祥辉, 张德超, 等. 纵隔良性畸胎瘤的诊断及外科治疗特点[J]. *实用癌症杂志*, 2005, 20(3): 298.
- [5] 仇五七, 李俊成, 王颖, 等. CT 对纵隔肿瘤的诊断[J]. *现代医学影像学*, 2005, 14(1): 10.
- [6] 郑家豪, 曹子昂, 梁而慷, 等. 原发性纵隔肿瘤的外科治疗[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2006, 13(1): 49.
- [7] 陈昶, 丁嘉安, 姜格宁, 等. 纵隔畸胎类肿瘤临床表现和外科治疗[J]. *肿瘤*, 2000, 4(20): 64.
- [8] 杨文锋, 杨国涛, 王善政, 等. 纵隔畸胎瘤的诊断与手术治疗[J]. *山东医药*, 2002, 42(2): 62.
- [9] 张文林, 杨晋平, 朴庆云. 原发性纵隔肿瘤及囊肿 16 例诊治体会[J]. *重庆医学*, 2000, 29(1): 49.
- [10] 朱佰锁, 孙玉鸮, 黄孝迈. 纵隔畸胎类肿瘤临床特点和外科治疗[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 1993, 9(4): 325.
- [12] Allen MS, Trastek VF, Pairolero PC. Benign germ cell tumors of the mediastinum. In: Shields TW, Logigero III J, Ponn RB, et al. *General Thoracic Surgery*[M]. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000: 2275.
- [12] 昌盛, 毛志福, 程邦昌, 等. 侵及胸廓上口大血管的纵隔肿瘤的外科治疗[J]. *临床外科杂志*, 2005, 13(2): 103.
- [13] 马炎炎, 廉建红, 张敏, 等. 141 例纵隔畸胎类肿瘤的外科治疗[J]. *肿瘤研究与临床*, 1996, 8(1): 28.

(收稿日期: 2009-05-21 修回日期: 2009-10-19)