

· 论 著 ·

# 氢气生理盐水对创伤性胰腺炎大鼠氧化应激损伤作用的研究\*

骆助林, 任建东, 田伏洲<sup>△</sup>, 汤礼军, 汪涛, 闫洪涛, 黄竹, 王华

(成都军区总医院全军普通外科中心, 成都 610083)

**摘要:**目的 研究氢气生理盐水(HS)抑制氧化应激,减轻大鼠创伤性胰腺炎(TP)损伤的作用。方法 将 24 只雄性Wistar大鼠随机分为假手术组(sham组)、TP组、生理盐水处理组(TP+NS组)和氢气生理盐水处理组(TP+HS组),利用压缩气流冲击暴露的大鼠胰腺,建立大鼠TP模型,于术后12h取胰腺组织观察其病理学变化,并观察胰腺内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)变化。结果 与TP+NS组比较,术后TP+HS组胰腺组织病理损伤情况明显改善( $P<0.05$ ),胰腺组织MDA水平较低( $P<0.05$ ),SOD活性和GSH含量较高( $P<0.05$ )。结论 HS能减轻大鼠TP损伤,其机制可能与抑制胰腺创伤后氧化应激反应有关。

**关键词:**模型,动物;氢气生理盐水;氧化应激;创伤性胰腺炎

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.04.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)04-0361-02

## Effects of hydrogen-rich saline on the oxidative stress injury of traumatic pancreatitis in rats\*

Luo Zhulin, Ren Jiandong, Tian Fuzhou<sup>△</sup>, Tang Lijun, Wang Tao, Yan Hongtao, Hang Zhu, Wang Hua

(Department of General Surgery, Chengdu General Military Hospital, Chengdu 610083, China)

**Abstract:** Objective To investigate the protective effects of hydrogen-rich saline by inhibiting the oxidative stress injury of traumatic pancreatitis in rats. Methods Twenty four male Wistar rats were randomly allocated into 4 groups: sham operation group, traumatic pancreatitis(TP) group, TP treated with normal saline(TP+NS) group and TP treated with hydrogen-rich saline(TP+HS)group. An impact machine was used to produce compressed air to impact the exposed pancreas of rats, and animal models of traumatic pancreatitis were established. The changes in histopathology and the variation of SOD, MDA and GSH were observed 12 h after the operation. Results The damage pancreas tissue in TP+HS group are slighter than that in TP+NS group after operation. The levels of plasma MDA are lower in TP+HS group than that in TP+NS group( $P<0.05$ ). The levels of plasma SOD and GSH are higher in TP+HS group than that in TP+NS group( $P<0.05$ ). Conclusion The current results show that employing hydrogen-rich saline may reduce the damage of traumatic pancreatitis in rat. Its mechanism may be correlated with the inhibition of oxidant stress induced by traumatic pancreatitis.

**Key words:** models, animal; hydrogen-rich saline; oxidative stress; traumatic pancreatitis

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是胰酶在胰腺内被激活后引起胰腺和周围组织自身消化、水肿、出血甚至坏死的炎症反应。胰腺炎加重时导致胰腺出血坏死,常继发感染、腹膜炎、休克等多种并发症,导致多器官功能障碍综合征(MODS),其病死率明显升高<sup>[1]</sup>。AP发病的常见原因有胆管结石、感染、肿瘤等<sup>[2]</sup>,胰腺损伤也是AP的重要原因之一,目前越来越多的交通事故中腹部遭受钝性撞击,经常造成胰腺的创伤,由创伤导致的胰腺炎通常称为创伤性胰腺炎(traumatic pancreatitis, TP),但是目前TP的发病机制和病理生理过程尚不明确,因此研究TP的发病机制及其临床处理措施具有重要的临床意义。最近发现氢气能抑制炎症相关的细胞因子、缓解炎症发展,抑制氧化应激损伤,具有潜在的治疗炎症应激性疾病的作用<sup>[3]</sup>,作者推测氢气生理盐水(hydrogen-rich saline, HS)在TP氧化应激损伤中也起着一定的作用,因此本实验采用压缩气体冲击大鼠胰腺制作的TP模型,对HS在TP损伤中的作用进行研究,现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 成年健康雄性清洁级Wistar大鼠24只,体质量(200±50)g,由第三军医大坪医院动物中心提供,动物合格证

编号:SCXK(渝)20020002;BIM-III型多功能生物撞击机由第三军医大学大坪医院提供;HS(0.6 mmol/L)由第二军医大学孙学军教授提供<sup>[4]</sup>,储存于密封的塑胶袋中4℃下保存,使用前经γ射线消毒。

**1.2 动物分组** 将24只大鼠分成4组,每组6只。假手术组(sham组)、TP组、生理盐水处理组(TP+NS组)和氢气生理盐水处理组(TP+HS组)。sham组动物只接受开腹、关腹手术;TP+NS组和TP+HS组处理剂量为HS(0.6 mmol/L, 6 mL/kg)或者生理盐水(6 mL/kg)在手术完成15 min后经腹腔注射入腹腔。

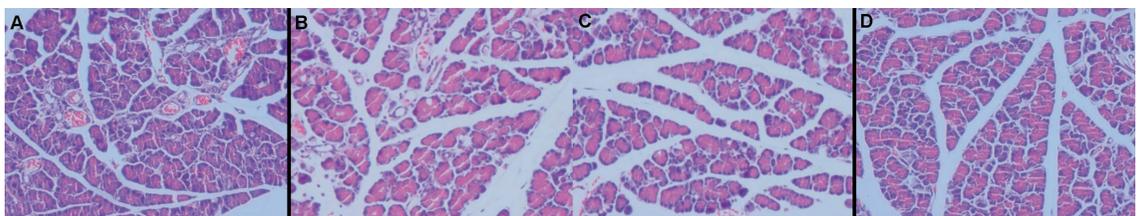
**1.3 模型建立** 大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠麻醉(2.5 mL/kg),麻醉成功后将大鼠仰卧固定于大鼠手术台,腹部正中切口开腹找到胰腺后将一薄的硬质塑料垫片放置在胰腺下面提供支持。采用200 kPa压缩空气一次冲击造模,气体冲击后仔细复原腹部的器官组织,缝合关闭肌肉层和皮肤,术后大鼠自然清醒并自由饮水。

**1.4 检测指标及方法** 术后12 h处死大鼠,统一取大鼠部分组织胰腺,用10%甲醛固定并常规制作石蜡病理切片,苏木精-伊红(HE)染色法后由专门的病理学医师进行病理观察,剩下

\* 基金项目:全军医学科学技术研究“十一五”课题资助项目(08Z012)。作者简介:骆助林(1976~),主治医师,硕士,主要从事肝胆胰疾病的基础和临床研究。<sup>△</sup> 通讯作者, Tel:(028)86570351; E-mail:tfz30061@yahoo.com。

的胰腺组织 0℃生理盐水中冰浴保存。胰腺组织内超氧化物歧化酶(SOD)活性,丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)含量均采用检测试剂盒(南京建成生物制品公司)并按说明书进行操作。SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法),通过使用黄嘌呤(Xanthine)/黄嘌呤氧化酶(XOD)体系生成超氧化物阴离子,然后加入发色基团,发色基团可被由上述体系产生的超氧化物阴离子还原成为水溶性的黄色甲染料,这样SOD活性通过在波长550 nm处吸光度(A)值的减少来测定。GSH含量测定采用化学比色法,是通过5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB)与巯基化合物反应时生成一种黄色化合物,通过比色进行定量,在波长412 nm处比色测A值来测定。MDA含量的检测硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA含量,在波长586 nm处比色测A值来测定。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用单因素方差分析和 $t$ 检验做统计学处理。结果采用SPSS13.0统计软件包分析,



A: sham组; B: TP组; C: TP+NS组; D: TP+HS组。

图1 各组术后12 h胰腺组织病理(HE×200)

2.2 胰腺组织内SOD活性和GSH、MDA含量的检测 TP组、TP+NS组与TP+HS组动物于造模术后12 h胰腺组织内MDA含量明显升高,SOD活性和GSH含量下降;与TP+NS组比较,TP+HS组术后胰腺组织内MDA含量较少( $P<0.05$ ),SOD活性和GSH含量较高( $P<0.05$ ),见表1。

表1 胰腺组织内SOD活性和GSH、MDA含量的检测( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	SOD(U/mg)	MDA(pmol/mg)	GSH(pmol/mg)
sham组	38.2±4.9	22.5±9.1	2 490±164
TP组	10.9±2.2	79.4±13.6	1 054±127
TP+NS组	10.4±3.1	83.1±20.8	1 177±181
TP+HS组	23.6±2.5 <sup>△</sup>	38.5±11.2 <sup>△</sup>	1 961±93 <sup>△</sup>

<sup>△</sup>:  $P<0.05$ ,与TP+NS组比较。

### 3 讨论

目前AP发病时胰腺损伤和由此引起的失控全身炎症反应的关系仍然不清楚,但是越来越多的证据证实,氧化应激损伤是AP局部及全身性严重并发症的重要原因<sup>[6-7]</sup>。因此作者推测HS在TP发病过程中也能缓解氧化应激损伤,减轻胰腺创伤时的局部和全身损害。但目前TP的动物模型存在致伤因素不纯、致伤范围难以控制、稳定性和重复性差等特点<sup>[8]</sup>,使TP的发病机制和临床救治研究难以深入展开。本研究使用第三军医大学大坪医院研制的BIM-III型生物撞击机,以压缩气体直接冲击大鼠暴露的胰腺,通过调整冲击气体的压力造成不同程度的胰腺损伤来诱导TP的发生<sup>[9]</sup>,经过反复试验,建立了单纯、稳定的TP模型,并利用该模型探讨氢气减轻TP损伤的作用及其机制。

氢气是质量最轻的小分子气体,很容易扩散并轻易地穿过细胞膜。最近Ohsawa等<sup>[10]</sup>研究发现氢气的抗氧化特性,在临床治疗氧化应激损伤方面有广阔的应用前景,为氢气的临床应

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胰腺的组织病理学变化 sham组大鼠术后12 h胰腺组织结构清晰,无明显炎症细胞,肝细胞无变性坏死(图1A)。TP组和TP+NS组大鼠术后12 h胰腺细胞明显肿胀变性,其间可见少量细胞坏死,胰腺组织结构疏松,部分组织结构不完整,间质内炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,胰腺内出血明显(图1B、C);TP+HS组大鼠术后12 h胰腺细胞肿胀性,胰腺组织结构完整,间质内少量炎症细胞浸润,胰腺内出血不明显(图1D)。胰腺组织损伤评分由专门的病理学医师进行光学显微镜下进行组织病理学评价。通过Rongione等<sup>[5]</sup>建立的评分系统对胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、坏死进行了评估。病理学评分显示与TP+NS组(7.6±2.8)分比较,TP+HS组(4.9±1.4)分病理损伤较轻( $P<0.05$ ),Sham组、TP组分别为0分和(7.7±2.2)分。

用提供了方向,氢气的选择性抗氧化作用引起广泛关注<sup>[11-13]</sup>。将氢气溶解于细胞培养基中,则能防止细胞在氧化损伤后出现的线粒体去极化、三磷酸腺苷(ATP)缺乏、DNA氧化、脂质过氧化反应和细胞的坏死、凋亡,增强细胞活力。Chen等<sup>[14]</sup>采用HS处理L-精氨酸(L-arginine)诱导的大鼠胰腺炎模型,发现HS能抑制氧化应激,减轻AP损伤作用,但尚无研究证实HS在胰腺创伤中的作用。本研究利用压缩气体冲击大鼠胰腺,建立稳定的TP大鼠动物模型,能观察HS在TP这类特殊胰腺炎中的作用机制。

本研究中压缩气体冲击胰腺造模后,通过病理学评分显示与TP+NS组比较,TP+HS组病理损伤明显较轻,说明HS处理能明确减轻TP病理损伤。SOD和GSH对机体的氧化与抗氧化的平衡起着关键作用,能加速清除体内自由基和过氧化物,降低脂质过氧化物的生成,自由基和过氧化物对细胞和组织的损伤。MDA是细胞膜的重要成分——非饱和脂质过氧化反应的终产物,组织内MDA含量是体内氧化应激反应水平及程度的敏感指标<sup>[15]</sup>。与TP+NS组比较,TP+HS组术后胰腺组织内MDA含量较少( $P<0.05$ ),SOD活性和GSH含量较高( $P<0.05$ ),提示HS处理后的TP大鼠明显地改善了氧化应激的损伤。本研究证实,HS能够通过抑制胰腺创伤后的氧化应激反应,减轻TP损伤,但其具体过程和机制有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Bakoyiannis A, Delis S, Dervenis C. Pathophysiology of acute and infected pancreatitis[J]. Infect Disord Drug Targets, 2010, 10(1): 2-4.
- [2] Wang GJ, Gao CF, Wei D, et al. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis[J]. World(下转第366页)

- nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4):697-701.
- [5] Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 259(2):344-348.
- [6] Yang B, Houlberg K, Millward A, et al. Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in type 1 diabetes mellitus and its complications[J]. *Cytokine*, 2004, 26(3):114-121.
- [7] Kim HL, Lee DS, Yang SH, et al. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE[J]. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40(6):1146-1152.
- [8] Karrer S, Bosserhoff AK, Weiderer P, et al. The -2518 promoter polymorphism in the MCP-1 gene is associated with systemic sclerosis[J]. *J Invest Dermatol*, 2005, 124(1):92-98.
- [9] Lee SH, Ryu JK, Jeong JB, et al. Polymorphisms of the MCP-1 and HSP70-2 genes in Korean patients with alcoholic chronic pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(6):1721-1727.
- [10] Jemaa R, Rojbani H, Kallel A, et al. Association between the -2518G/A polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) gene and myocardial infarction in Tunisian patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2008, 390(1/2):122-125.
- [11] Attar R, Agachan B, Kuran SB, et al. Association of CCL2 and CCR2 gene variants with endometrial cancer in Turkish women[J]. *In Vivo*, 2010, 24(2):243-248.
- [12] Guerra SD, D'Aleo V, Gualtierotti G, et al. A common polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) gene regulatory region influences MCP-1 expression and function of isolated human pancreatic islets[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(6):2247-2249.
- [13] Chen CY, Lee CM, Hsu HC, et al. Proteomic approach to study the effects of various oxidatively modified low-density lipoprotein on regulation of protein expression in human umbilical vein endothelial cell[J]. *Life Sci*, 2007, 80(26):2469-2480.
- [14] 于南南, 程晓亮, 李郑芳. MCP-1A-2518G 基因多态性与 2 型糖尿病的相关研究[J]. *云南医药*, 2011, 32(1):6-8.
- [15] Karadeniz M, Erdogan M, Cetinkalp A, et al. Monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) 2518G/A gene polymorphism in Turkish type 2 diabetes patients with nephropathy[J]. *Endocrine*, 2010, 37(3):513-517.
- [16] Moon JY, Jeong L, Lee S, et al. Association of polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 promoter with diabetic kidney failure in Korean patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Korean Med Sci*, 2007, 22(5):810-814.
- [17] 聂锦山. 苏州地区汉族人群 MCP-1-2518 A/G, IL-8-251 A/T 基因多态性和种族差异的研究[J]. *吉林医学*, 2011, 32(6):1146-1148.
- (收稿日期:2012-09-03 修回日期:2012-10-11)
- 
- (上接第 362 页)
- J Gastroenterol*, 2009, 15(2):1427-1430.
- [3] Ohsawa M, Ishikawa K, Takahashi M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):688-694.
- [4] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(5):478-484.
- [5] Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(3):960-967.
- [6] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species[J]. *Int Microbiol*, 2000, 3(1):3-8.
- [7] Escobar J, Pereda J, Arduini A, et al. Cross-talk between oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in acute pancreatitis: a key role for protein phosphatases[J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(26):3027-3042.
- [8] Raju GS, Gomez G, Xiao SY, et al. Effect of a novel pancreatic stent design on short-term pancreatic injury in a canine model[J]. *Endoscopy*, 2006, 38(3):260-265.
- [9] 尹志勇, 王正国, 刘海鹏, 等. 多功能小型生物撞击机的研制与应用[J]. *生物医学工程学杂志*, 2000, 17(3):309-312.
- [10] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):688-694.
- [11] Wood KC, Gladwin MT. The hydrogen highway to reperfusion therapy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):673-674.
- [12] Singhal AB, Lo EH. Advances in emerging nondrug therapies for acute stroke 2007[J]. *Stroke*, 2008, 39(10):289-291.
- [13] Sun XJ, Zhang JH. Hydrogen an endogenous antioxidant in the body[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29(3):233-235.
- [14] Chen H, Sun YP, Li Y, et al. Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of L-arginine induced acute pancreatitis in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393(2):308-313.
- [15] Taysi S, Cikman O, Kaya A, et al. Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc-deficient diet[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2008, 123(1/3):161-167.
- (收稿日期:2012-09-05 修回日期:2012-10-22)