

· 基础研究 ·

经皮导管引流减轻重症急性胰腺炎大鼠炎症损伤的实验研究*

陈光宇,戴睿武,闫洪涛,陈涛,黎冬暄,汤礼军[△]

(中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心,成都 610083)

摘要:目的 探讨经皮导管引流(PCD)对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠炎症反应的影响及意义。方法 42只Wistar大鼠随机分为假手术组(A组,10只)、逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠诱导SAP大鼠模型(B组,16只)和SAP大鼠PCD治疗组(C组,16只),分别于建模后12h取血清及腹腔积液测定肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10及淀粉酶、蛋白酶水平,留取胰腺组织一部分制作石蜡切片行光镜下病理检查、一部分行蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测环氧合酶-2(COX-2)及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达。结果 B组大鼠血清淀粉酶、TNF- α 、IL-6有显著升高($P < 0.05$),与A、C组比较IL-10无明显变化($P > 0.05$);相同时点的C组大鼠血清TNF- α 、IL-6、淀粉酶和腹腔积液TNF- α 、蛋白酶活性与B组比较,有明显下降($P < 0.05$),血清IL-10水平则显著升高($P < 0.05$),光镜病理检查提示C组大鼠胰腺病理损伤较A组大鼠明显改善,Western blotting结果显示C组大鼠胰腺组织COX-2和iNOS表达较A组大鼠明显下降($P < 0.05$)。结论 PCD可缓解SAP大鼠病情并减轻胰腺炎症损伤,其可能机制与引流富含炎症细胞因子及胰酶等有害物质的腹腔积液从而抑制机体炎症反应并降低胰腺组织COX-2和iNOS的表达有关。

关键词:重症急性胰腺炎;炎症反应;经皮导管引流;环氧合酶-2;诱导型一氧化氮合酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2240-03

Effect of percutaneous catheter drainage on inflammatory injury of severe acute pancreatitis rats*

Chen Guangyu, Dai Ruiwu, Yan Hongtao, Chen Tao, Li Dongxuan, Tang Lijun[△]

(Center of General Surgery, General Hospital of the Chinese People's Liberation Army Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan, 610083, China)

Abstract: Objective To study the effect of percutaneous catheter drainage(PCD) on inflammatory injury of severe acute pancreatitis(SAP) rats and its significance. **Methods** Forty-two Wistar rats were randomized into three groups: sham-operation control group(group A, $n=10$), SAP model control group(group B, $n=16$) and PCD treated group(group C, $n=16$). The levels of TNF- α , IL-6, IL-10, amylase, protease in blood and ascites were measured at 12th hour postoperatively, the expression of COX-2 and iNOS in the pancreatic tissue were detected by Western blotting, and pancreatic pathological changes were also observed. **Results** The serum levels of amylase, TNF- α , IL-6 in group B were significantly increased($P < 0.05$), while serum IL-10 had not changed significantly compared with group A and C($P > 0.05$). Compared with group B, the serum levels of IL-6, amylase and ascites levels of TNF- α , protease were significantly decreased($P < 0.05$), serum level of IL-10 was increased($P < 0.05$). The light microscope pathological examination result showed that the pancreatic injury was alleviated in group C compared with group A. Western blotting indicated the expression of COX-2 and iNOS in the pancreatic tissue in group C were higher than that in group A($P < 0.05$). **Conclusion** PCD can relieve SAP-induced systemic and pancreatic injury by draining harmful ascites which contains inflammatory cytokine and trypsin, inhibiting inflammatory reaction and reducing the expression of COX-2 and iNOS in the pancreatic tissue.

Key words: severe acute pancreatitis; inflammatory injury; percutaneous catheter drainage; inducible nitric oxide synthase; cyclooxygenase-2

重症急性胰腺炎(SAP)是常见的消化系统疾病,该病起病急,病程进展快,并发症多,预后极为凶险。目前针对SAP首选治疗手段为开腹坏死组织清除术以除去感染的坏死组织^[1],但是外科手术干预对SAP患者创伤大,且麻醉意外及感染等并发症发生率高^[2]。经皮导管引流(PCD)是一种微创干预措施,现已成为新的治疗SAP的方法在临床上迅速推广。与传统外科手术相比,PCD可减少麻醉意外及感染并发症的发生,有效性也得到了不少临床研究的证实^[3],但是其治疗SAP的具体机制目前尚不完全清楚。本研究通过对诱导SAP后的大鼠行PCD,观察该治疗对SAP大鼠炎症损伤的影响。

1 材料与方

1.1 实验动物与试剂 实验使用健康雄性SPF级Wistar大鼠42只,体质量200~220g,平均(211.3±5.9)g,由四川大学华西医学中心实验动物研究所提供。戊巴比妥钠及牛磺胆

酸钠购于美国Sigma公司,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-10酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒购于美国RB公司,淀粉酶、蛋白酶测定试剂盒购于南京建成公司,兔抗大鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和羊抗鼠环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)购于美国Santa Cruz公司,GAPDH内参抗体购于上海康成公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和兔抗羊IgG抗体购于武汉博士德公司,ECL发光试剂盒购于美国Millipore公司,组织蛋白提取试剂盒及BCA蛋白定量测定试剂盒购于南京碧云天公司。

1.2 动物分组及模型制备 所有大鼠按随机数字表法分为A组(假手术组,10只)、B组(SAP大鼠组,16只)和C组(SAP大鼠PCD治疗组,16只)。所有大鼠实验前禁食12h,术后任意进食、进水。(1)A组:仅行开腹手术,翻动胰腺数次后关腹;

(2)B 组:参照文献[4]的经典方法,先予 3%戊巴比妥钠(0.1 mL/100 g)麻醉大鼠,上腹部剃毛常规消毒铺无菌单,取正中切口,微创血管夹暂时阻断肝门部胆管,5 号输液针经十二指肠肠壁无血管区穿刺进入胆胰管约 0.7 cm,同时用血管夹在穿刺部胆管夹住输液针以防注射液体外溢,输液泵以 2 mL/h 匀速注入 5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),注射完毕用创面胶封闭穿刺孔,继续夹闭两端胆管 10 min 后取血管夹并用无菌棉签小心蘸除大鼠腹腔内的渗液及麻醉药物,逐层关腹;(3)C 组:先按上述方法构建 SAP 大鼠模型,关腹前将剪有侧孔、外套套管的塑料导管经腹正中切口右侧皮肤戳孔置入胰腺下方,缝线缝合导管孔并将导管固定于皮下,把内径约 0.4 cm 的弹簧套在导管外以避免大鼠咬破导管,弹簧近大鼠皮肤端穿过一 2 cm×2 cm 大小的塑料片,最后用缝线把塑料片四角与大鼠皮肤缝合固定,导管外接 50 mL 输血袋引流腹腔积液;所有组大鼠在关腹后均皮下注射 37 ℃的生理盐水(4 mL/100 g)以补液。

1.3 检测指标及方法 每组大鼠分别于建模后 12 h 腹腔静脉采血处死,空针抽取 B 组大鼠腹腔内腹腔积液,留取血清、腹腔积液、胰腺组织存于 -80 ℃冰箱待测,另取部分胰腺组织置于 10%多聚甲醛缓冲液中固定,石蜡包埋,4 μm 切片。

1.3.1 HE 染色与镜下病理评分 胰腺组织切片行 HE 染色,由同一病理医师在不知实验分组的情况下观察切片并依据文献[5]标准按空泡形成、感染、水肿、坏死、出血进行评分,10 个视野的平均分数为每张切片的最后评分。

1.3.2 血清及腹腔积液常规指标检测 血清 TNF-α、IL-6、IL-10 及腹腔积液 TNF-α:ELISA 法按试剂盒说明书步骤操作,全自动酶标仪(美国 Thermo 公司)检测;血清淀粉酶、腹腔积液蛋白酶活性按试剂盒说明采用分光光度法检测。

1.3.3 Western blotting 检测胰腺组织 COX-2 及 iNOS 表达 严格按照组织蛋白提取试剂盒说明提取胰腺组织蛋白并测

定蛋白浓度,Western blotting 操作过程如下:制备妥当的胰腺组织匀浆电泳分离和转膜(PVDF 膜,购于美国罗氏公司),用质量浓度 5 g/mL 脱脂牛奶封闭过夜,在 4 ℃下用 COX-2 抗体(1:1 300)、iNOS 抗体(1:1 200)和 GAPDH 的内参抗体(1:1 000)孵育过夜,再分别将膜放入含有对应二抗(1:1 200)的脱脂牛奶中孵育 3h,用 ECL 显色液显影于感光胶片上,最后用 Bandsan 图像分析系统对 Western blotting 目的条带扫描后进行分析,结果用光密度值(OD 值)表示,以此代表 COX-2、iNOS 蛋白的相对表达量。

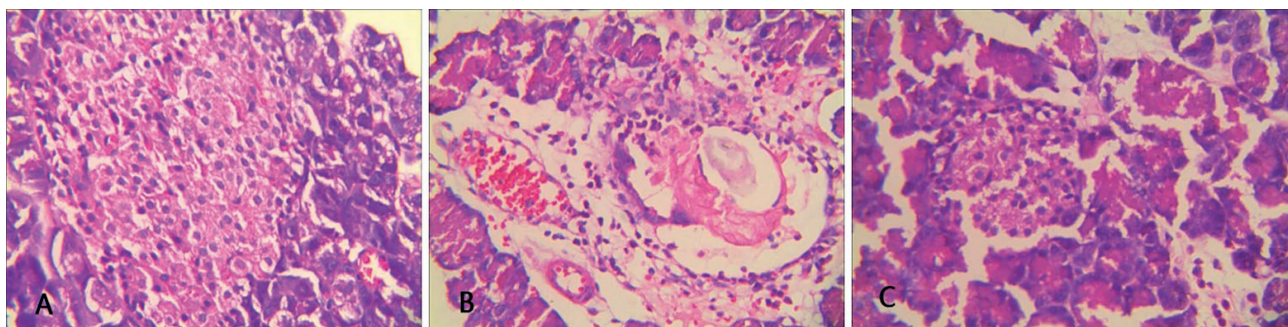
1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析进行两组间均数比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺组织镜下病理改变及评分 各组大鼠胰腺光镜图片(图 1),A 组极少量腺泡细胞水肿;B 组腺泡细胞肿胀明显,呈片状坏死,伴有大量炎性细胞浸润,局部血管壁坏死、破溃,较多红细胞渗出,腺体部分扩张呈空泡状;C 组病变较 B 组明显好转,局部有少许坏死灶。病理评分见表 1。

2.2 血清、腹腔积液各组指标检测结果 C 组血清 TNF-α、IL-6 水平及淀粉酶活性与 B 组比较有显著下降,而 C 组 IL-10 水平较 B 组有明显升高($P < 0.05$),A 组血清 IL-10 水平与 B 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1;C 组腹腔积液中 TNF-α 水平及蛋白酶活性较 B 组明显降低($P < 0.05$),见表 2(A 组大鼠无腹腔积液产生)。

2.3 Western blotting 检测胰腺组织 COX-2 及 iNOS 表达 A 组大鼠胰腺组织内 COX-2 及 iNOS 的表达极为微弱,B 组及 C 组大鼠胰腺组织均有相当量的 COX-2 及 iNOS 表达,但 C 组强度较 B 组低(图 2),采用 Bandsan 图像分析系统测出各条带的 OD 值定量地显示出 COX-2 及 iNOS 在胰腺组织内的表达情况,见表 3。



A:A 组;B:B 组;C:C 组。

图 1 建模 12 h 后 3 组大鼠胰腺组织镜下病理改变(×400)

表 1 光镜下胰腺组织病损程度评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	空泡形成	感染	水肿	坏死	出血
A 组	10	0	0.24±0.10	0.31±0.15	0	0
B 组	16	2.80±0.14*	2.56±0.27*	3.19±0.22*	2.24±0.19*	2.18±0.17*
C 组	16	0.97±0.16*△	1.03±0.14*△	1.55±0.11*△	0.54±0.12*△	0.39±0.13*△

*: $P < 0.05$,与 A 组比较;△: $P < 0.05$,与 B 组比较。

表 2 术后 12 h 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-10 水平及淀粉酶活性($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-10(pg/mL)	淀粉酶(U/L)
A 组	10	42.57±4.23*	52.43±11.25*	36.50±9.22	1 752.41±317.29*
B 组	16	291.41±32.64	307.87±33.92	46.23±10.46	6 142.52±1 325.58
C 组	16	85.28±28.61*	98.25±19.41*	148.71±34.19*	2 703.69±366.43*

*:与 B 组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 术后 12 h B 组和 C 组大鼠腹腔积液中 TNF- α 水平及蛋白酶活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α (pg/mL)	蛋白酶(U/L)
B 组	16	372.43 \pm 52.61	307.82 \pm 47.92
C 组	16	89.75 \pm 28.43*	114.57 \pm 19.41*

*: $P < 0.05$, 与 B 组比较。

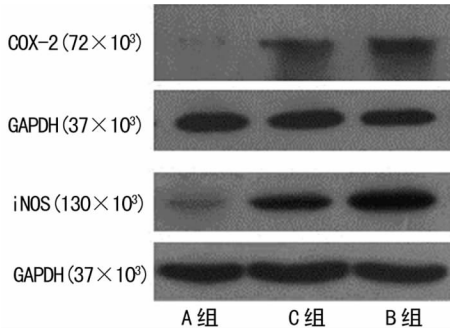


图 2 Western blotting 检测胰腺组织内 COX-2 及 iNOS 的表达

表 3 Western blotting 检测胰腺组织内 COX-2 及 iNOS 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX-2	iNOS
A 组	10	3.45 \pm 1.27*	10.31 \pm 3.86*
B 组	16	137.19 \pm 18.02	269.60 \pm 30.41
C 组	16	75.26 \pm 8.71 Δ	153.74 \pm 22.35 Δ

*: $P < 0.05$, 与 B、C 组比较; Δ : $P < 0.05$, 与 B 组比较。

3 讨论

SAP 的发病及病情进展和系统性炎症反应相关, TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、一氧化氮等炎症相关因子在 SAP 起病早期即可显著升高。已有的研究证明促炎细胞因子的水平与 SAP 病情的严重程度密切相关^[6], 因此降低体内炎症细胞因子或者拮抗机体炎症反应可减轻 SAP 的病情。在 SAP 发病过程中 TNF- α 等炎症因子的大量产生会造成腺泡细胞的损伤^[7], 腺泡细胞损伤后可释放出细胞内的胰酶及溶酶体成分, 从而引起周围组织消化及炎症反应并促成激活的炎症细胞在胰腺组织的迁移, 这些炎症细胞也释放损伤机体内部其他器官的炎症细胞因子^[8]。SAP 发病后患者腹腔内可产生大量含有胰酶及炎症细胞因子等有害物质的腹腔积液, 腹腔积液中的胰酶可对包括胰腺在内的腹腔内器官产生直接消化作用, 胰酶和炎症细胞因子也可经过腹膜吸收或者直接通过受损的微血管进入循环系统对局部和全身系统造成损伤^[9], 有效引出腹腔积液可减少这些毒性物质的产生、减轻机体系统性炎症反应、降低血清细胞因子的水平^[10], 在本实验中经 PCD 引出富含 TNF- α 、蛋白酶的腹腔积液后 SAP 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 的水平与未引流组相比有明显下降, 表明机体的炎症反应得到控制。同时作者观察到 PCD 治疗可升高 SAP 大鼠血清中抗炎细胞因子 IL-10 的水平, 降低促炎细胞因子的水平并升高抗炎细胞因子的水平对 SAP 的治疗显然是有利的, 但是 IL-10 升高的具体机理目前尚不清楚, 推测可能与引出促炎因子后刺激机体抗炎反应的发生有关。

COX-2 和 iNOS 在 SAP 发病后的炎症反应中起着重要作用, 在 SAP 研究中他们被作为经典的炎症指标。SAP 发病早期 COX-2 便可协同 iNOS 参与疾病的进展, 他们在胰腺组织产生强大的促炎效应并使毛细血管通透性增加, 引起胰腺组织

水肿、加剧炎症细胞在机体的迁移^[11], COX-2 也能直接损伤胰腺导管上皮细胞加重组织损伤^[2], 本研究中 Western blotting 结果显示 PCD 治疗组大鼠胰腺组织 COX-2 和 iNOS 表达较之未引流组大鼠明显下降, 提示胰腺炎症反应有所缓解, 行胰腺组织病理检查也发现 PCD 治疗组大鼠胰腺炎症损伤程度有明显改善。

目前 PCD 作为一种新颖的微创治疗 SAP 的方法在临床已经得到广泛的应用, 但是已有的临床研究尚未展示出 PCD 治疗的有效性。本实验从基础研究的角度表明, PCD 治疗可抑制 SAP 大鼠的炎症反应并降低胰腺组织 COX-2 和 iNOS 的表达、减轻胰腺组织的损伤, 但是其具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Werner J, Feuerbach S, Uhl W, et al. Management of acute pancreatitis; from surgery to interventional intensive care[J]. Gut, 2005, 54(3): 426-436.
- [2] van Baal MC, van Santvoort HC, Bollen TL, et al. Systematic review of percutaneous catheter drainage as primary treatment for necrotizing pancreatitis[J]. Br J Surg, 2011, 98(1): 18-27.
- [3] Tang LJ, Wang T, Cui JF, et al. Percutaneous catheter drainage in combination with choledochoscope-guided debridement in treatment of peripancreatic infection[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(4): 513-517.
- [4] Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat. Development of pancreatic necrosis, ischemia and edema after intraductal sodium taurocholate injection[J]. Eur Surg Res, 1983, 15(1): 28-36.
- [5] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg, 1992, 215(1): 44-56.
- [6] Papachristou GI. Prediction of severe acute pancreatitis: current knowledge and novel insights[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(41): 6273-6275.
- [7] Malmström ML, Hansen MB, Andersen AM, et al. Cytokines and organ failure in acute pancreatitis: inflammatory response in acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2012, 41(2): 271-277.
- [8] Machado MC, Coelho AM, Pontieri V, et al. Local and systemic effects of hypertonic solution (NaCl 7.5%) in experimental acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2006, 32(1): 80-86.
- [9] Ho YP, Chiu CT, Sheen IS, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-10 contribute to immunoparalysis in patients with acute pancreatitis[J]. Hum Immunol, 2011, 72(1): 18-23.
- [10] Zhang XP, Li ZJ, Zhang J. Inflammatory mediators and microcirculatory disturbance in acute pancreatitis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(4): 351-357.
- [11] de Almeida JL, Jukemura J, Coelho AM, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 in experimental severe acute pancreatitis[J]. Clinics, 2006, 61(4): 301-306.