

文章编号:1005-6947(2005)11-0820-04

· 实验研究 ·

善宁联合乌司他丁对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的保护作用

汤可立, 苗雄鹰, 尹强

(中南大学湘雅二医院 肝胆外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨大鼠重症急性胰腺炎(SAP)合并肺损伤的发病因素和善宁联合乌司他丁对大鼠SAP合并肺损伤模型的保护作用。方法 80只SD大鼠随机均分为5组:假手术组(S),SAP组,善宁处理组(O),乌司他丁处理组(U),善宁+乌司他丁处理组(O+U);每组再分为术后6h和12h亚组。检测血淀粉酶(AMY),TNF- α ,MDA和肺MPO的浓度,并对胰、肺组织进行病理评分,比较各组给药后上述指标的变化。结果 (1)O组,U组,O+U组血AMY,TNF- α ,MDA和肺MPO的浓度及胰病理评分与同时点SAP组相比明显降低($P < 0.05$);12h O+U组肺组织病理评分比同时点SAP组明显下降($P < 0.05$)。 (2)O+U组MPO降低较O组更显著($P < 0.05$),O+U组MDA降低较U组也更显著($P < 0.05$)。 (3)SAP组,TNF- α 在12h比6h明显下降($P < 0.05$)。 (4)血AMY,TNF- α ,MDA和肺MPO浓度与胰、肺病理评分呈正相关($r = 0.343 \sim 0.781, P < 0.01$)。结论 (1)TNF- α ,MDA和肺组织MPO是引起SAP合并肺损伤的重要因素。(2)善宁和乌司他丁均能减轻SAP合并肺损伤,联合用药效果更佳。

关键词:胰腺炎/并发症;胰腺炎/药物治疗;药物治疗,联合;肺疾病/病因学;善宁/治疗应用;乌司他丁/治疗应用;疾病模型,动物

中图分类号:R576;R563 文献标识码:A

Protective effect of octreotide combined with ulinastatin on lung injury of acute pancreatitis in rats

TANG Ke-li, MIAO Xiong-ying, YIN Qiang

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: Objective To investigate the pathogenic factor of severe acute pancreatitis (SAP)-associated lung injury and the protective function of octreotide combined with ulinastatin on SAP-associated lung injury in rats.

Methods Eighty SD rats were randomly divided into 5 groups. Sham operative (S) group, SAP group, octreotide (O) group, ulinastatin (U) group and octreotide + ulinastatin (O + U) group, and each group was divided into 6h, 12h sub-groups. After AP models were induced, the serum concentration of amylase (AMY), tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA), and the concentration of myeloperoxidase (MPO) in lung tissue were determined; and the pancreas and lung pathology were graded, the changes of the above-mentioned indexes after using octreotide and ulinastatin were compared. **Results**

(1) Compared to SAP group, AMY, TNF- α , MDA, MPO, and pancreas pathology score were decreased significantly in each of the 3 therapy groups during the same period; and at 12h, in O + U sub-group, lung pathology score also decreased compared to SAP group ($P < 0.05$). (2) Compared to O group, in O + U group, MPO significantly decreased ($P < 0.05$); and compared to U group, MDA also had significant decline ($P < 0.05$). (3) TNF- α significantly decrease in SAP group at 12h compared to 6h. (4) There was a positive correlation between AMY, TNF- α , MDA, and MPO with pancreas and lung tissue pathology scores ($r = 0.343 \sim 0.781, P < 0.01$). **Conclusions** (1) TNF- α , MDA, and MPO are important pathogenic factors for SAP-associated lung injury. (2) Octreotide and ulinastatin can decrease the degree of SAP-associated lung injury, and a better effect could result from combination of octreotide with ulinastatin.

收稿日期:2005-03-30; 修订日期:2005-09-06。

作者简介:汤可立(1971-),男,湖南湘潭人,中南大学湘雅二医院主治医师,主要从事肝胆胰方面的研究。

通讯作者:汤可立 E-mail:tangkli1898@sina.com.cn。

Key words: Pancreatitis/compl; Pancreatitis/drug ther; Drug Therapy, Combination; Lung Diseases/etiolo; Octreotide/ther use; Ulinastatin/ther use; Disrase Models, Animal

CLC number: R576; R563

Document code: A

重症急性胰腺炎(SAP)的早期死亡病例中有50%合并重度肺损伤^[1],因此防治肺损伤成为降低早期病死率的重要措施。临床上善宁和乌司他丁治疗SAP已广泛使用,但对SAP合并肺损伤的动物实验在国内较少报道,本文探讨两药联合应用对SAP合并肺损伤疾病模型的保护效果,为临床应用提供试验和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

善宁注射剂(Octreotide)为瑞士Ssandaz药厂产品;乌司他丁注射剂(Ulinastatin)为广州天普生物制药厂产品。

80只清洁级SD大鼠(由中南大学湘雅医学院动物实验部提供),雌雄各半,体重160~180g,随机分为5组,每组16只,即假手术组(S)、SAP组、善宁处理组(O)、乌司他丁处理组(U)、善宁+乌司他丁处理组(O+U);O组、U组和O+U组统称为治疗组。各组分别于术后6h及12h取材及处死。

1.2 实验与方 法

1.2.1 动物模型的建立 SAP组:5%氯胺酮(50mg/kg)腹腔内注射麻醉,剑突下正中切口入腹,在肝十二指肠韧带找到胆管。近肝门处用无创血管夹阻断,4号去尖端头皮针从十二指肠对系膜缘进针,顺着十二指肠乳头进入胆管内,外用4号丝线暂时把胆管和针头结扎固定,确保3.5%牛黄胆酸钠(深圳赛泰克生物科技公司提供,0.15mL/100g,3min内均速注射)不进肝也不流入十二指肠内。3min后观察胰腺出现水肿、坏死,证实模型成功后,去血管夹、拔针、拆线、用7号丝线连续缝合关腹。S组:开腹后仅轻翻十二指肠和胰腺,7号丝线连续缝合关腹。治疗组:O组在模型制备成功后,立即于左前肢的皮下注射善宁(0.5μg/100g),6h后在右前肢的皮下再重复1次。U组于术中大鼠在肠系膜上静脉分支上穿刺后缓慢将乌司他丁(2千U/100g,5min)均速推入,然后结扎穿刺处以防出血。O+U组同时给予善宁、乌司他丁。

1.2.2 标本的收集和观察

1.2.2.1 血清标本 从股静脉抽取1~2mL血,

低温离心(4℃,10min,3000r/min),血清保存在-20℃冰箱内备用。

1.2.2.2 组织标本 脱颈椎处死大鼠后,切开胰腺置于10%甲醛液内固定留作行病理检查;右上肺保存在-20℃冰箱内已备髓过氧化物酶(MPO)检查;右中肺放入2%戊二醛液内固定行电镜检查;右下肺放入10%甲醛液内固定行病理检查。

1.2.3 标本的观察与检测

1.2.3.1 形态学检测 (1)光镜下观察胰腺病理改变并按Schmidt法^[2]进行评分,按胰腺出血、水肿、坏死范围不同计为0~4分;按肺水肿、充血、出血、炎性细胞浸润及肺不张情况和程度,分为0~III级^[3],计为0~3分。所有标本均由同一病理科医师观察,进行盲法评分。(2)电镜下主要观察肺I,II型细胞的形态、细胞器的改变,尤其是线粒体、细胞膜绒毛、呼吸膜厚度的变化。

1.2.3.2 实验室检查 (1)血清AMY的测定:采用南京建成生物工程研究所试剂盒,碘-淀粉法。(2)血清肿瘤坏死因子α(TNF-α)的测定:采用上海森雄试剂有限公司ELISA试剂盒,严格按照试剂盒说明书操作,酶标仪读值后,绘好标本曲线,算出TNF-α的浓度。(3)血丙二醛(MDA)的检测:采用南京建成生物工程研究所试剂盒,硫代巴比妥法。(4)肺MPO的检查:采用南京建成生物研究所试剂盒,超声细胞粉碎机制成均浆,水浴、比色。根据公式计算出结果。MPO(U/g)湿片=(测定管OD值-对照组OD值)/11.3×取样量(g)。

1.3 统计学分析

数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,同一指标之间比较采用方差分析;不同指标与胰、肺病理评分之间的相关性采用直线相关分析,所有数据用SPSS12.0统计软件包处理。

2 结 果

2.1 实验动物死亡数及各组胰肺病理评分

大鼠死亡共6只,分别是SAP组3只,O组1只,U组2只,均死亡于术后6~12h之内。其余大鼠6h及12h处死后病理检查显示,S组无腹水,胰腺腺泡无水肿、坏死,肺间质不增厚。SAP组有暗

红色血性腹水,胰腺腺泡严重水肿,大片腺泡坏死;肺间质增厚,肺泡内积液,可见大量红、白细胞。各治疗组胰腺坏死范围缩小;肺组织白细胞浸润减少,电镜下见 II 型细胞线粒体空泡样变和呼吸膜增厚减轻,以 O + U 组减轻更明显。根据胰、肺病理评分标准,各组评分见表 1。

2.2 血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 的变化

(1) SAP 组与同时间 S 组相比,血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 明显升高 ($P < 0.01$); (2) 各治疗组与同时间 SAP 组相比血 AMY, TNF- α ,

MDA 及肺组织 MPO 明显减少 ($P < 0.01$ 或 0.05); (3) O + U 组比同时间 O 组比肺组织 MPO 更低 ($P < 0.05$); (4) SAP 组, TNF- α 的浓度在 12h 明显低于 6h ($P < 0.05$)。血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 的具体值见表 2。

2.3 血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 与胰、肺病理评分的相关分析

血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 与胰、肺病理评分呈正相关 (r 在 $0.343 \sim 0.781$ 范围内,均 $P < 0.01$)。具体结果见表 3。

表 1 胰和肺病理评分的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

检查指标	时间	S	SAP	O	U	O + U
胰腺病理评分	6h	0	10.33 \pm 2.80 ¹⁾	6.66 \pm 1.21 ²⁾	7.66 \pm 1.36 ^{2),3)}	7.16 \pm 1.16 ^{2),4)}
	12h	0	14.00 \pm 2.00 ¹⁾	9.83 \pm 2.78 ²⁾	9.50 \pm 1.87 ^{2),3)}	9.66 \pm 1.21 ^{2),4)}
肺病理评分	6h	0	1.14 \pm 1.06 ¹⁾	0.83 \pm 0.98 ²⁾	1.00 \pm 0.89 ^{2),3)}	0.33 \pm 0.51 ^{2),3)}
	12h	0	1.66 \pm 1.36 ¹⁾	0.83 \pm 0.98 ²⁾	1.50 \pm 1.04 ^{2),3)}	0.50 \pm 0.83 ^{2),4)}

注:1)与同时间 S 组比较, $P < 0.01$; 2)与同时间 SAP 组比较, $P < 0.05$ 或 0.01 ; 3)与同时间 O 组比较, $P > 0.05$; 4)分别与 O 组或 U 组比较, $P > 0.05$

表 2 血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

检查指标	时间	S	SAP	O	U	O + U
血 AMY (U/L)	6h	106.9 \pm 59.3	4757.5 \pm 2797.8 ¹⁾	2539.3 \pm 1865.8 ²⁾	2867.9 \pm 1110.4 ^{2),3)}	2684.3 \pm 1135.0 ^{2),4)}
	12h	74.5 \pm 34.8	6600.2 \pm 3169.8 ¹⁾	3363.2 \pm 828.9 ²⁾	2656.6 \pm 1361.1 ^{2),3)}	3085.9 \pm 1341.5 ^{2),4)}
血 TNF- α (ng/L)	6h	30.17 \pm 4.82	186.35 \pm 36.07 ^{1),6)}	67.36 \pm 8.18 ²⁾	71.97 \pm 16.60 ^{2),3)}	51.43 \pm 14.04 ^{2),4)}
	12h	25.94 \pm 4.53	140.81 \pm 23.67 ¹⁾	56.87 \pm 11.32 ²⁾	66.08 \pm 67.54 ^{2),3)}	53.17 \pm 12.31 ^{2),4)}
血 MDA (nmol/L)	6h	3.88 \pm 0.72	7.50 \pm 1.11 ¹⁾	5.87 \pm 0.65 ²⁾	6.05 \pm 1.27 ^{2),3)}	4.32 \pm 0.64 ^{2),5)}
	12h	3.99 \pm 0.43	8.40 \pm 1.04 ¹⁾	6.80 \pm 1.04 ²⁾	7.08 \pm 0.68 ^{2),3)}	5.09 \pm 0.84 ^{2),5)}
肺组织 MPO (U/g)	6h	2.01 \pm 0.46	5.67 \pm 1.30 ¹⁾	4.31 \pm 0.97 ²⁾	3.47 \pm 0.92 ^{2),3)}	2.75 \pm 0.87 ^{2),4)}
	12h	1.87 \pm 0.13	6.89 \pm 0.91 ¹⁾	4.24 \pm 0.45 ²⁾	3.38 \pm 0.56 ^{2),3)}	3.00 \pm 0.59 ^{2),4)}

注:1)与同时间 S 组相比较, $P < 0.01$; 2)与同时间 SAP 组比较, $P < 0.05$ 或 0.01 ; 3)与同时间 O 组比较, $P > 0.05$; 4)分别与 O 组或 U 组比较, $P > 0.05$; 5)分别与 O 组或 U 组比较, $P < 0.05$; 6)SAP 组两时间比较, $P < 0.05$

表 3 血 AMY, TNF- α , MDA 及肺组织 MPO 与胰、肺病理评分的相关分析

指标		胰腺病理评分	肺病理评分
AMY (μ /L)	r	0.781	0.549
	P	0.000	0.000
TNF- α (ng/L)	r	0.527	0.365
	P	0.000	0.004
MDA (nmol/L)	r	0.740	0.450
	P	0.000	0.000
MPO (U/g)	r	0.637	0.343
	P	0.000	0.007

3 讨论

处死各实验组大鼠时大体观察见胰腺变黑、大量血性腹水、肺实变;病检见胰腺点片状坏死,肺泡积液、白细胞浸润;电镜见肺组织 II 型细胞线粒体空泡变、呼吸膜增厚;血 AMY 和肺 MPO 升高,说明大鼠 SAP 合并肺损伤模型制备成功。

SAP 早期是一种系统炎症反应综合征 (SIRS), TNF- α 是早期启动 SIRS 的一个非常关键的因子,早期显著升高,然后下降。本实验结果表明 12h

较6h低,与Czako等^[4]的研究相一致。Denham等^[5]用大鼠含细胞因子的胰性腹水注入无TNF- α 受体的大鼠体内,未诱导出肺损伤,表明在SAP合并肺损伤中TNF- α 有着重要作用。氧自由基攻击生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸而损伤细胞膜和细胞器的功能。MPO酶为中性粒细胞内的一种酶,其活力的大小可以反映中性粒细胞的数目。中性粒细胞是一种非常重要的炎性介质释放细胞,其数量远远大于巨噬细胞。大量中性粒细胞在肺实质内聚集,脱颗粒释放蛋白水解酶而启动炎症级联反应导致肺损伤。Inoue等^[6]发现,应用抗中性粒细胞多克隆抗体及CD18单抗能阻断SAP肺损伤的发生,间接证明了中性粒细胞在SAP合并肺损伤中的作用。

本实验发现SAP组血TNF- α ,血MDA及肺组织MPO水平明显增高,与胰腺和肺损伤的病理评分呈正相关。说明血MDA,TNF- α ,肺组织MPO在SAP合并肺损伤的发生、发展中起了重要作用,可作为判断SAP合并肺损伤严重程度的重要指标。善宁是人工合成的八肽生长抑素,是目前胰腺炎治疗的基本药物。但其作用机制仍不十分清楚。可能主要是抑制胰酶分泌和胰酶活性^[7],早期降低血中TNF- α 等细胞因子和促进胰腺细胞的修复^[8~10]作用有关。善宁通过上述机制在早期即可抑制SIRS和促进胰腺的修复,从而减轻胰腺和肺的损伤。乌司他丁是从健康成人尿中提取的一种蛋白酶抑制剂,能稳定细胞溶酶体,减少细胞因子和氧自由基的产生,减轻胰腺和肺的损伤^[11,12]。善宁和乌司他丁分别从不同的环节保护胰腺和肺,故胰腺和肺能更好地受到保护。本实验表明联合用药比单独用药更能降低血TNF- α ,血MDA和肺组织MPO的浓度以及胰、肺的病理评分。说明联合用药能更好地减轻SAP合并肺损伤。

参考文献:

[1] Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases

[J]. *Respir Physiol*, 2001, 128(1):13-16.

- [2] Schmidt J, Lewandowski K, Warshaw AI, *et al.* Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. *Int J Pancreatol*, 1992, 12(1):41-51.
- [3] 雷文章, 韦靖江, 沈文律. 实验性坏死性胰腺炎多器官损伤与内毒素血症的关系 [J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 12(3):131-133.
- [4] Czako L, Hegyi P, Takacs T, *et al.* Effects of octreotide on acute necrotizing pancreatitis in rabbits [J]. *World J Gastroenterol*. 2004, 10(14):2082-2086.
- [5] Denham W, Yang J, Norman J. Evidence for an unknown component of pancreatic ascites that induces adult respiratory distress syndrome through an interleukin-1 and tumor necrosis factor-dependent mechanism [J]. *Surgery*, 1997, 122(2):295-301.
- [6] Inoue S, Demols A, Von laethem JL, *et al.* N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice [J]. *Arch Surg*, 1995, 130(1):93-98.
- [7] Guan D, Maouyo D, Sarfati P, *et al.* Effects of SMS 201-995 on basal and stimulated pancreatic secretion in rats [J]. *Endocrinology*, 1990, 127(1):298-304.
- [8] Karalis K, Mastorakos G, Chrousos GP, *et al.* Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction in vivo [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5):2000-2006.
- [9] 夏璐, 楼恺娴, 龚自华, 等. 生长抑素类似物对急性胰腺炎大鼠胰腺组织表生长因子基因表达的影响及机制 [J]. *胃肠病学*, 2000, 5(4):216-219.
- [10] 保红平, 方登华, 高瑞岗, 等. 善宁和生长激素联合应用治疗重症急性胰腺炎的临床研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(12):914-917.
- [11] Koizumi R, Kanai H, Maezawa A, *et al.* Therapeutic effects of ulinastatin on experimental crescentic glomerulonephritis in rats [J]. *Nephron*, 2000, 84(4):347-353.
- [12] 秦仁义, 王春友, 邹声泉. 乌司他丁治疗急性胰腺炎的实验及临床研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(4):292-295.