

文章编号:1005-6947(2005)11-0834-04

· 实验研究 ·

血小板活化因子乙酰水解酶对重症急性胰腺炎影响的实验研究

王刚, 孙备, 孟庆辉, 姜洪池

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 肝胆胰外科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 探讨血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)对重症急性胰腺炎(SAP)的影响。方法 45只雄性Wistar大鼠随机分为3组(每组 $n=15$):A组(sham组),B组(SAP组),C组(PAF-AH干预组)。C组于造模1h和24h后经阴茎背动脉注射PAF-AH(5mg/kg)。各组均于术后48h测定血丙二醛(MDA),血栓素(TXB₂),前列腺素(PGI₂),TXB₂/PGI₂,血小板活化因子(PAF),内毒素,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量及肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性;对胰腺进行病理学评分。结果 与B组相比,C组血MDA,TXB₂,TXB₂/PGI₂,PAF,内毒素,TNF- α 含量及肺组织MPO活性、胰腺病理学评分显著降低($P<0.05$);血PGI₂含量无显著差异($P>0.05$)。结论 PAF在SAP病程演进中起关键的作用。应用PAF-AH能够水解PAF、改善胰腺微循环障碍、抑制系统炎症反应、减轻肠道及肺损伤,显著改善SAP病情。

关键词:血小板活化因子;重症急性胰腺炎

中图分类号:R576;Q592.1

文献标识码:A

Experimental study of the effect of platelet-activating factor acetylhydrolase on severe acute pancreatitis

WANG Gang, SUN Bei, MENG Qing-hui, JIANG Hong-chi

(Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) on severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** Forty-five male Wistar rats were randomly divided into three groups ($n=15$ in each group), including group A (sham operation group), group B (SAP group) and group C (PAF-AH treated group). PAF-AH (5 mg/kg) was infused through the dorsal artery of penis after 1 hour and 24 hours of establishing the model in group C. Forty-eight hours after animal models were established, the levels of maleic dialdehyde (MDA), thromboxane B₂ (TXB₂), prostaglandin I₂ (PGI₂), TXB₂/PGI₂, platelet-activating factor (PAF), endotoxin, tumor necrosis factor (TNF- α) in serum, and the activity of myeloperoxidase (MPO) in lung tissue were examined in each group. The pancreas was scored on the basis of pathological changes. **Results** Compared with group B, the levels of MDA, TXB₂, TXB₂/PGI₂, PAF, endotoxin, TNF- α in serum, and MPO activity in lung tissue and the pathological scores of pancreas were significantly lower in group C ($P<0.05$). There was no obvious difference in the level of PGI₂ between group B and group C ($P>0.05$). **Conclusions** PAF plays a critical role during the course of SAP. Administration of PAF-AH can hydrolyze PAF, improve pancreatic microcirculatory dysfunction, suppress systemic inflammatory reaction, relieve pancreatitis-associated intestinal tract injury and lung injury and markedly ameliorate the state of SAP.

Key words: Platelet Activating Factor; Severe Acute Pancreatitis

CLC number: R576; Q592.1

Document code: A

收稿日期:2005-05-23; 修订日期:2005-08-18。

作者简介:王刚(1979-),男,黑龙江哈尔滨人,哈尔滨医科大学第一临床医学院硕士研究生,主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者:孙备 电话:13603656935(手机); E-mail:sunbei70@tom.com。

近年来,随着对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病机制研究的不断深入,胰腺微循环障碍(pancreatic microcirculatory disturbance, PMD)在SAP病程演进中所起的重要作用日益受到关注。作为SAP时的强效脂质炎症介质,血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)在加重PMD的同时,又在全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能不全综合征(MODS)中起到了中心枢纽的作用。血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-acetylhydrolase, PAF-AH)能够降解、失活PAF,对抑制PAF生物学活性的正常发挥及有效改善SAP预后至关重要。本实验旨在探讨重组PAF-AH对SAP病程改变的影响。

1 材料与方 法

1.1 材 料

雄性Wistar大鼠45只,体重250~350g,购自哈尔滨医科大学第一临床医学院动物中心。结晶牛磺胆酸钠购自Sigma公司。血小板活化因子(PAF)试剂盒购自TPI公司。重组血小板活化因子乙酰水解酶(PAF-AH)购自ICOS公司。血栓素(TXB₂)、前列腺素(PGI₂)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒购自人民解放军总医院放免所。内毒素(LPS)试剂盒购自上海伊华科技公司。髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成研究所。

1.2 方 法

1.2.1 模型制备 45只雄性Wistar大鼠随机分为A组(sham组)、B组(SAP组)及C组(PAF-AH干预组),每组15只。禁食、自由饮水12h后,1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。A组模拟造模手术情况,轻度揉搓胰腺、翻转肠管5min后关腹;B组采用胆胰管逆行注入3.5%牛磺胆酸钠(0.1mL/100g)的方法建立SAP模型;C组在SAP成模手术后1h和24h分别经阴茎背动脉注入PAF-AH(5mg/kg)。

1.2.2 标本采集及检测 3组均于造模或术后48h处死,经腹主动脉采血。TBA法检测血MDA。放免法检测血TXB₂, 6-Keto-PGF_{1 α} , TNF- α 。ELISA法检测血PAF。偶氮显色法检测血LPS。比色法检

测肺组织MPO活性。取胰腺、肺组织行病理学检查。对胰腺组织,以5个单项(水肿、炎细胞浸润、脂肪坏死、实质坏死、出血灶)进行病理学评分,每个单项得分的平均分为该单项得分,5个单项得分之和为该标本的病理学评分。得分越高,病理改变越重^[1]。计算胰腺及肺的湿/干重比,间接反映胰腺、肺水肿程度。

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用SPSS10.0统计软件采用 t 检验和直线相关分析处理数据。

2 结 果

2.1 成模率

B组成模率66.7%(10/15),C组成模率80.0%(12/15)。

2.2 病理学结果

2.2.1 大体观 A组胰腺色泽、形态正常,偶见肠道轻度扩张。肺脏形态、结构基本正常。B组胰腺肿胀,广泛出血、坏死,肠道极度扩张。肺脏表面大片坏死,水肿明显。C组胰腺片状出血,少许坏死,肠道轻度扩张。肺脏见少量出血点,坏死面积小于B组,水肿轻。

2.2.2 光镜检查 A组胰腺和肺脏形态、结构基本正常。B组见胰腺水肿明显,大片出血、坏死及大量炎细胞浸润。肺泡壁结构严重紊乱,肺组织大片出血及大量炎细胞浸润。C组见胰腺坏死范围减小,出血减轻,少量炎细胞浸润。肺泡壁结构相对完整,肺组织出血及炎细胞浸润轻。

2.3 PAF含量与胰腺病理评分、LPS含量相关分析

结果表明,PAF含量与胰腺病理评分、LPS含量呈正相关(表1)。

2.4 其它指标

与B组相比,C组血MDA, TXB₂, TXB₂/PGI₂, PAF, 内毒素, TNF- α 含量及肺组织MPO活性、胰腺、肺湿/干重比、胰腺病理学评分显著降低($P < 0.05$),血PGI₂含量无显著差异($P > 0.05$)(表2)。

表1 PAF与胰腺病理学评分、LPS之间相关分析

组别	PAF与胰腺病理学评分				PAF与LPS			
	PAF	病理评分	<i>r</i>	<i>P</i>	PAF	LPS	<i>r</i>	<i>P</i>
B组	13.58 ± 0.36	23.90 ± 0.11	0.636	<0.05	13.58 ± 0.36	0.39 ± 0.05	0.589	<0.05
C组	7.91 ± 0.12	17.23 ± 0.58	0.712	<0.05	7.91 ± 0.12	0.28 ± 0.02	0.664	<0.05

表2 各组指标结果比较($\bar{x} \pm s$)

指标	A组	B组	C组
MDA (nmol/mL)	5.78 ± 1.65	11.89 ± 0.59	7.31 ± 2.15 ¹⁾
TXB ₂ (pg/mL)	311.92 ± 10.80	1304.79 ± 51.48	812.76 ± 63.68 ^{1),2)}
6-keto-PGF _{1α} (pg/mL)	52.37 ± 15.31	119.10 ± 26.97	104.18 ± 22.37 ²⁾
TXB ₂ /6-keto-PGF _{1α}	5.87 ± 1.02	11.15 ± 2.49	7.25 ± 0.41 ¹⁾
PAF (pg/L)	1.28 ± 0.74	13.58 ± 0.36	7.91 ± 0.12 ^{1),2)}
LPS (EU/mL)	0.14 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.28 ± 0.02 ^{1),2)}
TNF-α (ng/mL)	1.18 ± 0.61	2.39 ± 0.53	1.46 ± 0.76 ¹⁾
MPO (U/g)	2.95 ± 0.71	8.39 ± 1.42	5.24 ± 1.34 ^{1),2)}
胰腺湿/干比	1.63 ± 0.27	4.83 ± 0.19	2.60 ± 0.89 ¹⁾
肺湿/干比	2.35 ± 0.61	5.89 ± 0.26	3.17 ± 0.57 ¹⁾
病理学评分	0	23.90 ± 0.11	17.23 ± 0.58 ^{1),2)}

注:1)与B组比较, $P < 0.05$; 2)与A组比较, $P < 0.05$

3 讨论

SAP早期的血液流变学改变可迅速导致胰腺小叶微动脉痉挛、血液淤滞和微血栓形成,诱发PMD,引起胰腺持续缺血、坏死^[2]。这是SAP发病的始动因子和持续损伤因子。

PAF是一种具有广泛生物学活性的内源性磷脂,通过多个环节参与SAP的发生、发展,作用机制可归纳为:(1)促进血小板聚集、活化,增加胰腺血液黏稠度和血管通透性,降低胰腺血流灌注,诱发PMD;(2)诱导中性粒细胞移行、活化,激发其它炎症介质及细胞因子的大量产生;(3)促进氧自由基(OFR)释放;(4)减弱肠道屏障功能,导致细菌、内毒素移位,诱发肠源性感染和内毒素血症。本实验B组胰腺病理评分与PAF含量变化呈正相关,表明升高的PAF通过多效应途径加重了胰腺损伤,进而放大了SIRS和MODS的打击作用。

PAF在体内代谢较快,生成后不久便失活。

PAF-AH是PAF降解失活过程中的主要溶解酶,属于磷脂酶A2家族,主要由巨噬细胞和中性粒细胞合成分泌,具有明显的底物选择性和对Ca²⁺非依赖性,与PAF含量密切相关。PAF-AH通过特异性水解PAF分子中Sn-2位上带有乙酰基团侧链的磷脂底物而使其降解为无活性的溶血性PAF^[3]。因此,PAF-AH可以看作是PAF的“非特异性受体拮抗剂”。本实验C组胰腺病理评分、PAF含量显著低于B组,表明应用重组PAF-AH可降低PAF含量,减轻胰腺损伤,其原因可能为:(1)PAF-AH水解PAF,抑制其生物活性的发挥;(2)PAF-AH直接阻断SAP时局部、系统的炎症反应。

TXA₂为体内强烈微血管收缩物质,诱导血小板变形、聚集,损伤血管内皮细胞。PGI₂为强烈的血管扩张剂,具有拮抗TXA₂、抑制血小板、中性粒细胞活化的作用。正常情况下,TXA₂和PGI₂处于动态平衡。SAP时,两者含量均显著升高且TXA₂

升高幅度大于 PGI_2 , $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 失衡,导致胰腺微血管血栓形成,加重 PMD。 TXB_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 为 TXA_2 和 PGI_2 的稳定代谢产物,可间接反映此两者含量。本实验表明,C组应用重组 PAF-AH 可显著降低胰腺湿/干重比,调节 $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 平衡。笔者认为,PAF-AH 一方面抑制血小板聚集、活化,稳定 $\text{TXA}_2/\text{PGI}_2$ 平衡,降低微血栓生成率,增加胰腺血流灌注;另一方面抑制大量细胞因子及 OFR 释放,减轻血管内皮细胞损伤,从而改善 PMD。

肠道是 SAP 时机体应激反应的“中心器官”。体循环中异常升高的 PAF 引起肠黏膜微循环障碍,产生大量的 OFR 及细胞因子,加重肠黏膜缺血、坏死,肠道通透性增加,导致肠内细菌和内毒素移位,形成“二次打击”。内毒素主要由肠道内 G^- 杆菌释放的脂多糖组成,即 LPS。SAP 时,大量 LPS 释放入血,在加重全身微循环障碍的同时,强力刺激单核-巨噬细胞系统,引发细胞因子和炎症介质的“瀑布样”连锁放大反应。 $\text{TNF-}\alpha$ 是 SAP 全身炎症反应的核心介质之一^[4],可损伤血管内皮细胞,诱导中性粒细胞移行、活化,促进 OFR 和其它细胞因子大量分泌,加重机体损伤。本实验表明,应用重组 PAF-AH 可有效减轻肠缺血-再灌注损伤,降低血 LPS 和 $\text{TNF-}\alpha$ 水平,增强肠道屏障功能,机理可能为:(1)降解 PAF,增加肠道血液灌注,降低肠黏膜通透性,LPS 移位率下降。LPS 降低减弱了对单核-巨噬细胞的刺激,使 $\text{TNF-}\alpha$ 和 PAF 分泌减少,形成“良性循环”;(2)PAF-AH 清除 OFR、抑制中性粒细胞激活,减轻肝脏损伤,增强肝脏对 LPS 的解毒能力,降低血 LPS 水平。

急性肺损伤是 SAP 时胰外常见并发症。MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒释放的过氧化物酶类,

可作为中性粒细胞数量和活性的标志。MDA 是 OFR 脂质过氧化作用的产物,可间接反映 OFR 含量。本实验表明,应用重组 PAF-AH 可显著降低肺 MPO 活性、血 MDA 含量和肺湿/干重比,缓解肺水肿程度,保护肺组织,机理可能为:(1)降解 PAF,抑制中性粒细胞聚集、黏附,堵塞肺毛细血管形成的肺组织微循环障碍;(2)阻断中性粒细胞“呼吸爆发”反应,抑制 OFR 和弹力蛋白酶的产生,提高细胞溶酶体膜稳定性,减轻对肺脏直接毒性作用;(3)扩张肺血管,增加肺血流灌注;(4)降低血 $\text{TNF-}\alpha$ 和 LPS 含量,从而减轻 $\text{TNF-}\alpha$ 及 LPS 对肺血管内皮细胞的直接损伤,保持血管壁的完整,减轻肺组织损伤。

如何有效地抑制体内 PAF 产生或阻断已产生的 PAF 发挥其生物学效应已成为改善 SAP 预后的关键。本实验结果证实,PAF-AH 可从减轻微循环障碍、抑制急性炎症反应和防治 MODS 等多个“靶点”协同治疗 SAP,同时控制引发 SAP 的多种因素,为治疗 SAP 提供了一条潜在而有效的手段。

参考文献:

- [1] Gross V, Andreesen R, Leser H G, *et al.* Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis [J]. *Eur J Clin Invest*, 1992, 22 (1): 200 - 203.
- [2] 钟守先. 重症急性胰腺炎研究方向的几点建议 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (5): 321 - 322.
- [3] Marques M, Pei Y, Southall MD, *et al.* Identification of platelet-activating factor acetylhydrolase II in human skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2002, 119 (4): 913 - 919.
- [4] 陈善正, 李宜雄, 吕新生. 环氧合酶-2 在重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中表达的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (6): 419 - 423.