

文章编号:1005-6947(2008)03-0214-05

· 胰腺炎专题研究 ·

丙酮酸乙酯对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜 HMGB1 表达的影响

栾正刚¹, 何忠野², 张成², 董明², 马晓春¹, 郭仁宣²

(中国医科大学附属第一医院 1. 重症医学科 2. 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨丙酮酸乙酯(EP)对大鼠重症急性胰腺炎(SAP)肠组织中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达的影响,以期对 SAP 的治疗提供思路。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 90 只随机分为 3 组:A 组为 SAP 组;B 组为 SAP + EP 处理组(EP 组);C 组假手术对照组(对照组)。3 组动物于术后 3, 6, 12, 24, 48 h 取材。测定血淀粉酶(AMY)、D-乳酸、肠组织丙二醛(MDA)含量。通过光学显微镜观察肠组织病理变化及免疫组织化学法观察 HMGB1 在肠组织中的表达。Western-blot 法进行 HMGB1 检测。**结果** A, B 组 AMY 和 D-乳酸水平明显升高,但 B 组较 A 组显著降低($P < 0.05$)。A 组肠组织中 MDA 明显高于 C 组($P < 0.01$),B 组肠组织中 MDA 升高幅度较 A 组小($P < 0.05$)。B 组较 A 组肠组织病理损伤明显减轻。A 组 6 h 时肠组织 HMGB1 表达水平显著高于 C 组,于 24 h 达峰值,且持续至 48 h ($P < 0.01$)。B 组肠组织 HMGB1 表达水平明显低于 A 组($P < 0.05$)。**结论** SAP 时, HMGB1 可介导肠黏膜通透性增加。EP 能显著抑制 HMGB1 的表达,改善肠黏膜屏障功能,对 SAP 肠黏膜损伤有明显的保护作用。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 214-218]

关键词: 胰腺炎; 高迁移率族蛋白 B1; 丙酮酸乙酯

中图分类号: R 657.51

文献标识码: A

The effects of ethyl pyruvate on high mobility group box-1 protein expression in murine severe acute pancreatitis

LUAN Zhenggang¹, HE Zhongye², ZHANG Cheng², DONG Ming², MA Xiaochun¹, GUO Renxuan²

(1. Department of Intensive Care Medicine 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of ethyl pyruvate (EP) on high mobility group box-1 protein (HMGB1) expression in severe acute pancreatitis (SAP) rats. **Methods** Ninety male wistar rats were divided randomly into three groups: Group A (SAP group); group B (SAP rats received ethyl pyruvate therapy); group C (control group). Specimens from rats in the three groups were taken at 3, 6, 12, 24 and 48 h after operation respectively. The concentration of plasma amylase and D-lactate the activity of malonyl dialdehyde (MAD) in the intestinal tissue were determined. The changes of morphological damage of intestinal tissue was observed by microscopy. The expression of HMGB1 in intestinal mucosa was observed by SP immunohistochemistry and the activity of HMGB1 was determined by western blot. **Results** Compared with group A, levels of plasma amylase, and D-lactate in group B decreased markedly ($P < 0.05$). Compared with group C, MDA in group A increased significantly ($P < 0.01$). Compared with group A, the pathological lesion of intestinal mucosa was improved and the expression of HMGB1 was obviously down regulated in group B ($P < 0.05$). The expression of HMGB1 in bowel tissues in group A was increased

收稿日期:2007-11-14; 修订日期:2008-02-13。

作者简介:栾正刚,男,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事重症急性胰腺炎发病机制方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 E-mail: zgl17698@sina.com

significantly at 6h and maintained to 24h after SAP model was induced; whereas in group C, HMGB1 expression was significantly lower than that in group A at each time point ($P < 0.05$). **Conclusions** HMGB1 can mediate an increase in penetrability of intestinal mucosal barrier in SAP. EP can down-regulate HMGB1 expression in intestinal tissues of SAP rats, improve the function of intestinal mucosal barrier, and protect intestine from injury induced by SAP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 214 - 218]

Key words: Pancreatitis; High Mobility Group Box-1 Protein; Ethyl Pyruvate

CLC number: R 657.51

Document code: A

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)继发肠黏膜损伤,可诱发肠道细菌和内毒素移位,并最终导致脓毒症和多器官功能障碍^[1-3]。研究表明,高迁移率族蛋白-1(high mobility group box-1, HMGB1)是一类广泛存在于真核细胞内的非组核蛋白,它作为重要的晚期炎症介质参与了脓毒症的病理生理过程^[4-6]。丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是近年来发现的一种有效抗炎物质,具有抗氧化、抗炎症介质和脏器保护作用^[7-8]。本研究通过制作大鼠SAP合并肠黏膜损伤模型,观察EP对模型动物肠黏膜损伤的影响,探讨EP对SAP大鼠肠黏膜损伤的防治机制。

1 材料与方法

1.1 材料

牛磺胆酸钠、EP、D-乳酸脱氢酶及标准品购自Sigma公司;羊抗HMGB1单克隆抗体购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG为深圳晶美公司产品;免疫组织化学试剂盒购自福州迈新生物技术公司;丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。健康雄性Wistar大鼠90只,体质量270~330g,购自中国医科大学实验动物学部。

1.2 实验方法

1.2.1 建立SAP模型和实验设计 动物于实验前12h禁食,不禁水。随机分成3组,每组30只。A组为SAP组;B组为SAP+EP处理组(EP组);C组为假手术对照组(对照组)。动物模型制作采用Aho等^[9]的方法。腹腔注射10%水合氯醛,以0.3 mL/100 g(体重)剂量麻醉动物后剖腹。在手术显微镜下通过胆胰管逆行注射5%牛磺胆酸钠0.1 mL/100 g(体重),注射速度0.1 mL/min。C组仅翻动胰腺。B组于造模成功后2h开始经尾静脉注射EP溶液40 mg/(kg·6h)(EP溶于乳酸钠林格液中,28 mmol/L)。C组与A组于同一时点注射等量的乳酸钠林格液。各组动物分别在3,6,12,24,48h取材,每时点6只。腹主动脉采血,离心(3 000 r/min,15 min)分离血浆,冻存

于-80℃待测。无菌采取组织,液氮速冻,-70℃贮存备用。

1.2.2 指标测定 测定3组动物各时点的血淀粉酶(AMY)值;以硫代巴比妥酸(TAB)比色法测定MDA;用改良酶学分光光度法检测血浆D-乳酸水平。

1.2.3 免疫组化染色检测肠组织HMGB1的表达 肠组织石蜡切片脱蜡、水化,3% H₂O₂ 孵育5 min, pH 6.0 枸橼酸缓冲液微波修复(95℃, 10 min),加1:100稀释羊抗HMGB1单克隆抗体,4℃过夜。复温后加入生物素标记的兔抗羊IgG抗体,37℃ 30 min, DAB显色。同时设不加一抗的阴性对照。

1.2.4 免疫印迹(Western blot)分析 取肠组织200 mg于RIPA裂解液中研磨后,以Bradford法行蛋白定量。取40 μg蛋白行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜。用5%脱脂奶粉封闭过夜;加入1:400羊抗HMGB1抗体,4℃过夜;漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊IgG,37℃孵育60 min;漂洗后以电化学发光法(ECL)显影。用密度扫描仪测定各条带的光密度值(OD值),以代表蛋白的表达量。

1.2.5 肠组织学观察 在距盲肠5 cm处取回肠2 cm,10%甲醛固定,制成石蜡切片,苏木素/伊红(HE)染色,行常规病理检查。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS统计分析软件行单因素方差分析和 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AMY值的变化

A组各时点AMY明显均高于C组,差异有显著性($P < 0.01$);B组各时点AMY均明显低于A组($P < 0.05$),但均明显高于C组($P < 0.01$)(表1)。

2.2 血浆D-乳酸水平的变化

A组6h后各时点血浆D-乳酸明显高于C组,

差异有显著性 ($P < 0.01$); B 组 6 h 后各时点血浆 D-乳酸明显低于 A 组 ($P < 0.05$), 但均明显高于 C 组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.3 肠组织中 MDA 的变化

B 组各时点肠组织 MDA 水平均显著低于 A 组 ($P < 0.05$), 但高于 C 组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 免疫组化法观察 HMGB1 在肠组织中的表达

A 组大鼠肠黏膜细胞 HMGB1 表达阳性率较 C 组显著升高, B 组 HMGB1 表达阳性细胞数较 A 组明显减少, 但较 C 组明显升高 (图 1)。

表 1 各组血 AMY, D-乳酸和肠组织 MDA 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

检测指标	组别	n	时点 (h)				
			3	6	12	24	48
AMY (U/L)	A	6	2 246 ± 218 ¹⁾	3 834 ± 457 ¹⁾	5 207 ± 582 ¹⁾	8 604 ± 483 ¹⁾	11 742 ± 526 ¹⁾
	B	6	1 348 ± 163 ^{1), 2)}	2 164 ± 185 ^{1), 2)}	2 860 ± 224 ^{1), 2)}	4 261 ± 508 ^{1), 2)}	7 253 ± 472 ^{1), 2)}
	C	6	662 ± 82	746 ± 156	727 ± 221	682 ± 116	740 ± 124
D-乳酸 ($\mu\text{g/mL}$)	A	6	3.34 ± 0.76	9.62 ± 3.24 ¹⁾	11.45 ± 2.83 ¹⁾	17.52 ± 4.54 ¹⁾	15.64 ± 2.37 ¹⁾
	B	6	3.21 ± 0.72	5.61 ± 2.43 ^{1), 2)}	8.27 ± 1.24 ^{1), 2)}	12.14 ± 2.21 ^{1), 2)}	9.96 ± 2.64 ^{1), 2)}
	C	6	3.16 ± 0.65	3.06 ± 1.64	4.02 ± 0.78	4.24 ± 1.63	4.11 ± 0.82
MDA (nmol/mg)	A	6	13.5 ± 0.8 ¹⁾	18.1 ± 1.3 ¹⁾	20.4 ± 1.6 ¹⁾	26.2 ± 0.7 ¹⁾	33.4 ± 2.6 ¹⁾
	B	6	7.5 ± 0.6 ²⁾	9.5 ± 1.2 ^{1), 2)}	12.8 ± 1.4 ^{1), 2)}	16.7 ± 0.9 ^{1), 2)}	20.2 ± 1.7 ^{1), 2)}
	C	6	7.3 ± 0.5	6.8 ± 1.3	8.4 ± 1.5	7.6 ± 1.1	8.2 ± 1.6

注: 1) 与 C 组比较 $P < 0.01$; 2) 与 A 组比较 $P < 0.05$

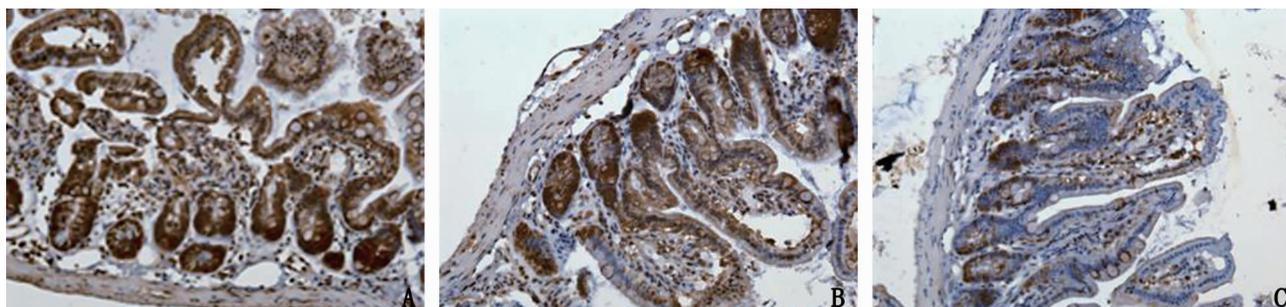


图 1 各组大鼠肠组织细胞中 HMGB1 的表达 (IHC $\times 20$) A: SAP 组 (A 组); B: SAP + EP 组 (B 组); 假手术对照组 (C 组)

2.5 HMGB1 蛋白表达的变化

光密度扫描结果显示 C 组各时点大鼠肠组织 HMGB1 表达较低; 与 C 组相比, A 组 6 h 后各时点可见肠组织中出现明显增强的 HMGB1 表达条带 ($P < 0.01$); SAP 6 h 后, A, B 两组蛋白条带表

达均明显升高; A 组 12 h 后蛋白条带信号持续升高, 至 SAP 48 h 时蛋白条带表达在较高水平; 与 A 组相比, B 组 HMGB1 表达信号减弱 ($P < 0.05$) (表 2) (图 2)。

表 2 Western-blot 分析 HMGB1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时点 (h)				
		3	6	12	24	48
A	6	31.2 ± 5.5	66.4 ± 5.4 ¹⁾	83.7 ± 13.2 ¹⁾	128.4 ± 30.7 ¹⁾	105.2 ± 22.7 ¹⁾
B	6	27.7 ± 4.5	46.1 ± 8.6 ^{1), 2)}	50.6 ± 11.3 ^{1), 2)}	68.8 ± 8.6 ^{1), 2)}	65.2 ± 8.3 ^{1), 2)}
C	6	27.3 ± 4.8	28.2 ± 5.2	27.6 ± 4.5	29.3 ± 4.7	30.1 ± 5.6

注: 1) 与 C 组比较 $P < 0.01$; 2) 与 A 组比较 $P < 0.05$

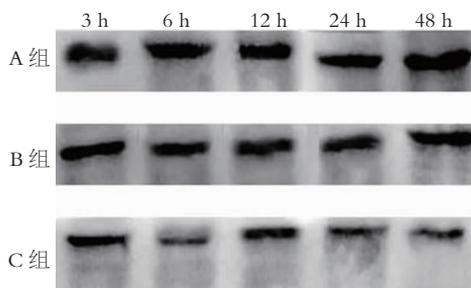


图2 各组肠组织中 HMGB1 的表达

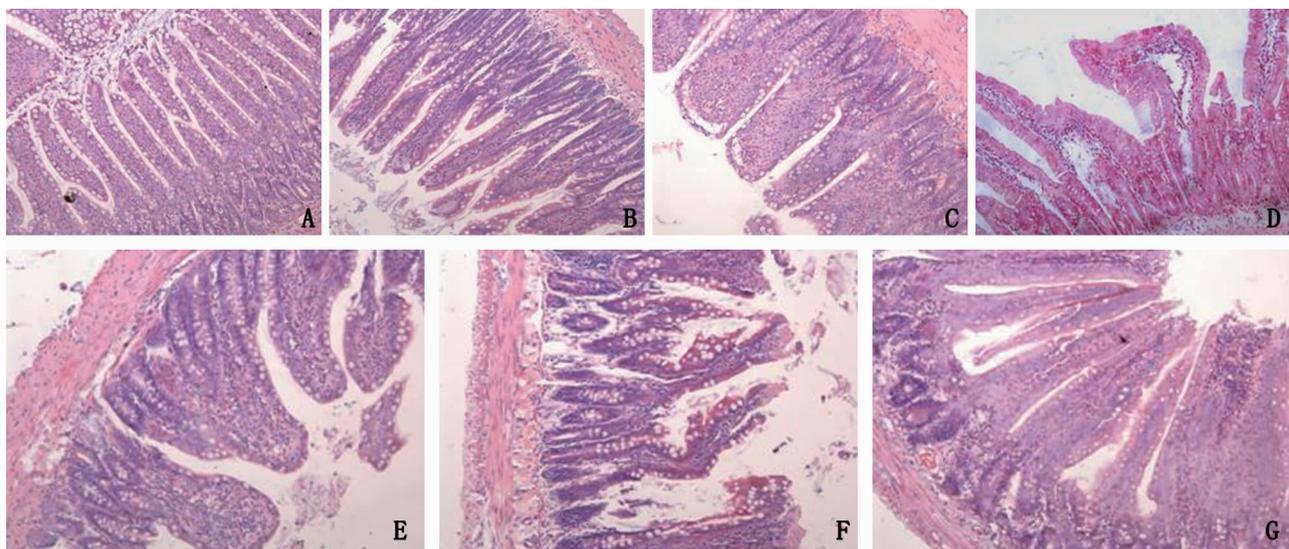


图3 各组肠黏膜组织学表现(HE × 20) A: C组大鼠肠黏膜的组织学形态基本正常; B: SAP 6 h 肠绒毛顶部上皮细胞脱落, 间质排列疏松呈水肿表现, 但绒毛排列尚整齐; C: SAP 12 h 肠绒毛顶部上皮腔隙扩大并与固有层分离, 中性粒细胞浸润, 绒毛两两融合; D: SAP 24 h 中央乳糜管扩张; E: SAP 24 h 肠绒毛排列不规则并两两融合; F: SAP 后 48 h, 肠黏膜上皮出现变性萎缩, 绒毛变短, 间距增宽, 间质充血水肿; G: EP 治疗后肠组织病理损伤明显减轻

3 讨论

SAP 来势凶猛, 病程进展快, 病死率高达 20% ~ 30%^[10]。肠道是应激反应的中心器官之一。研究显示, SAP 容易发生肠屏障功能障碍是 SAP 并发感染, 诱发和加重全身炎症反应综合征、多器官功能障碍综合征且病死率居高不下的症结所在^[11-13]。研究表明, 在感染性脓毒血症、败血症和烧伤等情况下, HMGB1 作为晚期细胞介质在循环和组织中显示出延迟和高水平表达, 可明显影响肝、肺、肠等重要器官的功能, 并进一步诱导其他细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 的产生; 它们是内毒素血症的致死效应的重要细胞介质^[14]。

本研究发现: A 组在发病 6 h 即有肠黏膜充

2.6 光学显微镜观察肠组织病理变化

C 组肠黏膜未见异常。A 组在 6 h 后即可见到小肠黏膜和黏膜下层间质水肿、血管充血; 黏膜层有中性粒细胞浸润, 肠绒毛毛细血管充血, 部分区域肠绒毛顶部上皮细胞脱落。上述病理损害随着时间的延长而逐渐加重。24 h 后出现绒毛间质充血水肿, 绒毛上皮坏死脱落, 中性粒细胞浸润等表现。48 h 后黏膜上皮出现变性萎缩, 绒毛变短。B 组肠组织病理损伤明显减轻(图 3)。

血水肿伴中性粒细胞浸润, 并随病程发展而加重; 与之相伴随的是绒毛上皮变性坏死脱落, 肠道屏障通透性增加。蛋白半定量分析表明, SAP 发病后大鼠肠组织中 HMGB1 表达延迟增高, 并于发病 24 h 后 HMGB1 表达处于高水平并持续至 48 h。HMGB1 可时间 - 剂量依赖性地增加肠上皮通透性^[15], 而这必将引发肠源性感染和内毒素血症, 进而导致全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征。

研究揭示, EP 是一种稳定的亲脂性的丙酮酸衍生物, 是有效的氧自由基清除剂, 广泛应用于医学领域。EP 也是一种有效的抗炎药物, 可调节多种炎症介质的释放, 包括早期 TNF- α , 一氧化氮(NO)和晚期 HMGB1 等炎症介质^[16-17], 对 SAP

和脓毒症等原因引起的全身炎症反应综合征组织损伤有显著保护作用^[18-19];并可降低失血性休克、脓毒症、缺血/再灌注动物的病死率^[17,20]。

本研究发现,经EP治疗后,肠组织HMGB1表达水平明显低于SAP组,肠组织病理损伤明显减轻,肠黏膜屏障功能得以明显改善。进一步揭示EP对SAP大鼠肠黏膜屏障的保护作用,为SAP的治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Pitchumoni CS, Patel NM, Shah P. Factors influencing mortality in acute pancreatitis: can we alter them? [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(9): 798 - 814.
- [2] Bank S, Singh P, Pooran N, *et al.* Evaluation of factors that have reduced mortality from acute pancreatitis over the past 20 years [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2002, 35(1): 50 - 60.
- [3] Jamdar S, Siriwardena AK. Contemporary management of infected necrosis complicating severe acute pancreatitis [J]. *Crit Care*, 2006, 10(1): 101.
- [4] Muller S, Scaffidi P, Degryse B, *et al.* New EMBO members' review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal [J]. *EMBO J*, 2001, 20(16): 4337 - 4340.
- [5] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 in sepsis [J]. *Scand J Infect Dis*, 2003, 35(9): 577 - 584.
- [6] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis [J]. *J Intern Med*, 2004, 255(3): 320 - 331.
- [7] Yang R, Han X, Delude RL, *et al.* Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol-induced liver injury and inflammation in mice [J]. *J Lab Clin Med*, 2003, 142(5): 322 - 331.
- [8] Miyaji T, Hu X, Yuen PS, *et al.* Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice [J]. *Kidney Int*, 2003, 64(5): 1620 - 1631.
- [9] Aho HJ, Kosken Salo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4): 411 - 416.
- [10] Gerlach H. Risk management in patients with severe acute pancreatitis [J]. *Crit Care*, 2004, 8(6): 430 - 432.
- [11] Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2003, 26(2): 122 - 129.
- [12] Derveniz C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2003, 10(6): 415 - 418.
- [13] Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis [J]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2004, 101(5): 502 - 509.
- [14] Wang H, Bloom O, Zhang M, *et al.* HMGB1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248 - 251.
- [15] Sappington PL, Yang R, Yang H, *et al.* HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(3): 790 - 802.
- [16] Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent [J]. *J Intern Med*, 2007, 261(4): 349 - 362.
- [17] Fink MP. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(4): 515 - 518.
- [18] Yang R, Uchiyama T, Alber SM, *et al.* Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis [J]. *Critical Care Medicine*, 2004, 32(7): 1453 - 1459.
- [19] Ulloa L, Ochani M, Yang H, *et al.* Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12351 - 12356.
- [20] Yang H, Ochani M, Li J, *et al.* Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 296 - 301.