

文章编号:1005-6947(2008)03-0224-04

· 胰腺炎专题研究 ·

生长抑素对急性出血坏死性胰腺炎肝损伤的作用机制

张昭¹, 赵刚¹, 王丹², 王春友¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022; 2. 河北医科大学基础医学院 病理学与病理生理学教研室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨生长抑素对大鼠急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)时肝损伤的治疗作用及其机制。方法 逆行胰胆管注射牛磺胆酸钠(TAC)制备AHNP模型。动物分为假手术组(SO组), AHNP生理盐水处理组(AHNP组)和AHNP奥曲肽治疗组。各组动物术后3, 6, 12 h剖杀, 检测肝组织中Toll-样受体(TLR)2, 4 mRNA和细胞核转录因子(NF- κ B)的表达情况。结果 与SO组比较, 胰腺炎组大鼠TLR2, 4 mRNA于3 h开始升高, 于12 h达高峰(均 $P < 0.01$); 肝组织中NF- κ B于3 h开始表达增强, 6 h达高峰。奥曲肽组肝组织中的TLR2, 4 mRNA及NF- κ B各时点表达均较AHNP组降低($P < 0.05$)。结论 生长抑素对AHNP有显著的保护作用。其机制可能是通过抑制胰弹性蛋白酶的分泌与激活, 抑制Toll受体和NF- κ B表达, 降低炎症反应, 从而减轻肝损伤。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 224-227]

关键词: 胰腺炎, 急性坏死性; 肝/病理学; 生长抑素; 受体, Toll; NF- κ B

中图分类号: R 657.51

文献标识码: A

Effect of Somatostatin on the liver injury in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats and its mechanism

ZHANG Zhao¹, ZHAO Gang¹, WANG Dan², WANG Chunyou¹

(1. Pancreatic Surgery Center, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: **Objective** To explore the therapeutic effects and mechanisms of somatostatin on liver injury in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP) in rats. **Methods** Murine model of AHNP was established by retrograde injection of artificial bile into the biliopancreatic duct. The animals were divided into sham operation group (S group), AHNP saline injection group (AHNP group), and AHNP octreotide treated group. TLR2, 4 mRNA expressions and NF- κ B expressions in the liver tissue at 3, 6 and 12 h after operation were measured. **Results** TLR2, 4 mRNA in liver tissue in the AHNP group began to rise at 3 h, and peaked at 12 h ($P < 0.01$); NF- κ B expression in liver tissue also began to rise at 3 h, and peaked at 6 h. In contrast, in the groups treated with Somatostatin, TLR2, 4 mRNA and NF- κ B expression in the liver tissue decreased at each time point ($P < 0.05$). **Conclusions** Somatostatin has a protective effect on AHNP. The mechanism may be by inhibition of the secretion and activation of elastase, inhibition of Toll receptor and NF- κ B expression and decrease of inflammatory reaction, and decrease the liver injury.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 224-227]

收稿日期: 2007-09-27; 修订日期: 2007-12-04。

作者简介: 张昭, 男, 华中科技大学同济医学院附属协和医院硕士研究生, 主要从事胰腺方面临床与基础方面的研究。

通讯作者: 王春友 E-mail: atllt@tom.com

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; Liver/pathol; Somatostatin; Receptor, Toll; NF- κ B

CLC number: R 657.51

Document code: A

急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)是一种级联炎症反应,起病急,病情凶险,发展快,且多合并心肺肾肝等多脏器的功能不全甚至衰竭,病死率高。肝脏是最常受累的器官之一^[1]。本实验通过对比观察牛磺胆酸钠(TAC)诱导的大鼠AHNP模型以及使用生长抑素治疗模型中Toll样受体(TLR)2,4mRNA和细胞核转录因子(NF- κ B)以及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血清淀粉酶(AMY)的变化,初步探讨AHNP时肝损伤的机制以及生长抑素对于AHNP合并肝损伤的治疗作用及机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与主要试剂

雄性SD大鼠120只购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,体重200~250g。奥曲肽注射液为诺华制药公司产品;NF- κ B P65和TNF- α 试剂盒购自武汉晶美生物工程有限公司;Trizol购自Progema公司(中国,香港);逆转录酶试剂盒及聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自TOYOBO CO, LTD。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组与模型制备 采用随机数字表法分组。(1)假手术组(SO组,对照组),40只;(2)AHNP生理盐水处理组(AHNP组),40只;(3)AHNP+奥曲肽治疗组(治疗组),40只。AHNP组和治疗组采用牛磺胆酸钠(TAC, Sigma公司,美国)逆行胰胆管注射制备AHNP模型,剂量为5%的TAC 0.1 mL/100 g,持续1 min,滞留4 min。治疗组^[2]术后2,5,8,11 h分次背部皮下注射奥曲肽生理盐水溶液(100 μ g/100 mL),剂量为15 μ g/kg(体重)。AHNP组注射等容积生理盐水。SO组(对照组)开腹翻动肠管后关腹。SO组、AHNP组和奥曲肽治疗组大鼠于3,6,12 h活杀留取静脉血和肝标本待测。3组各留10只观察24 h病死率。

1.2.2 指标检测 (1)碘-淀粉比色法测定血清淀粉酶;(2)酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肝组织中TNF- α ;(3)腹水量(mL);(4)24 h病死率;(5)免疫组织化学SABC法(免疫组化)测定肝组织中NF- κ B。免疫组化阳性产物为棕黄色颗粒着色强度判断:(-)为未着色;(+)为浅黄色;(++)为黄色;(+++为棕黄色。每个标本取6个高倍视野计算阳性细胞占总细胞的百分率作为阳性比例。

1.2.3 肝组织TLR2,4 mRNA的表达 无菌留取肝组织约50 mg,采用Trizol一步法提取细胞总RNA。用半定量逆转录聚合酶链(RT-PCR)技术测定TLR2,4mRNA的表达,以肌动蛋白(β -action)作为内参对照。大鼠TLR2序列为:5'CGCTTCCTGAACCTGTCC 3'(正义链),5GGTTGTCACCTGCTTCCA 3'(反义链),扩增片段为300 bp。大鼠TLR4序列为:5,ATCAGTGTATCGGTGGTC-3(正义链),5,GGCTCTGGATAAAGTGTGTC-3(反义链),扩增片段为350 bp。内参照引物 β -actin:上游为5'-CTATCGGCAATGACCGGTTC-3',下游为5'-CTTAGGAGTTGGGGTGGCT-3',扩增片段长度760 bp。引物均由上海生工生物工程有限公司合成。TLR2一般条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 7 min,循环25~30次。TLR4一般条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,51 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 7 min,循环25~30次。 β -action一般条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 45 s,53 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 7 min,循环25~30次。以目的基因TLR2,4mRNA与内参对照 β -actin mRNA的积分吸光度比值表示mRNA相对表达量。

1.3 统计学处理

数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 11.0统计软件包进行t检验及方差分析等。 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结 果

2.1 血清淀粉酶和肝组织TNF- α 的变化

AHNP组淀粉酶和TNF- α 于术后3 h开始升高,12 h达高峰,且均明显高于SO组(均 $P < 0.01$),各时间点间有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组淀粉酶及TNF- α 明显低于AHNP组($P < 0.05$),但仍明显高于对照组($P < 0.05$)(表1)。

2.2 腹水量和病死率

SO组大鼠未见腹水积聚。AHNP组大鼠术后3,6,12 h腹水量分别为(5.8 \pm 1.1) mL,(10.93 \pm 2.0) mL和(13.6 \pm 3.5) mL。治疗组大鼠于各时点腹水量均较AHNP组减少,3,6,12 h腹水量分别为(4.3 \pm 0.7) mL,(7.4 \pm 1.3) mL和(10.1 \pm 2.3) mL($P < 0.05$)。对照组大鼠未见死亡,治疗组12,24 h病死率分别为10.0%和30.0%,明显低于AHNP组的50.0%和90.0%($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠血清 AMY, 肝组织 TNF- α 水平的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	时点(h)	淀粉酶(U/L)	TNF- α (pg/mg)
SO	3	1105 \pm 166	1.05 \pm 0.24
	6	1214 \pm 205	1.13 \pm 0.28
	12	1296 \pm 175	1.34 \pm 0.21
AHNP	3	6931 \pm 1398 ¹⁾	2.59 \pm 0.340 ¹⁾
	6	10812 \pm 1926 ¹⁾	2.860 \pm 0.36 ¹⁾
	12	16835 \pm 2635 ¹⁾	3.540 \pm 0.49 ¹⁾
治疗	3	4039 \pm 1020 ^{1),2)}	1.86 \pm 0.30 ^{1),2)}
	6	8194 \pm 1315 ^{1),2)}	2.08 \pm 0.39 ^{1),2)}
	12	10325 \pm 1856 ^{1),3)}	2.44 \pm 0.32 ^{1),2)}

注:1)与SO组同时点比 $P < 0.01$; 2)与AHNP组同时点比 $P < 0.05$; 3)与AHNP组同时点比 $P < 0.01$

2.3 肝组织 HE 病理切片和 NF- κ B 表达的变化

SO 组大鼠肝小叶结构正常,肝索排列整齐,肝细胞形态正常。AHNP 组术后 3h 可见肝细胞气泡样变性,肝细胞界边不清,胞浆呈颗粒状;术后 6h 汇管区内可见炎性细胞浸润,小叶周边的肝细胞发生嗜酸性变性,并可见浓缩的凋亡小体;术后 12 h 肝小叶出现大片状出血坏死及灶性坏死。治

疗组于各时点均较 SAP 组病变明显减轻。SO 组 NF- κ B 少量表达;AHNP 组于 3 h 时 NF- κ B 蛋白表达增强,6h 达高峰,12 h 稍降低,均较 SO 组明显升高 ($P < 0.05$);治疗组明显低于 AHNP 组但显著高于 SO 组的表达,且均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2 - 3)。

表2 各组大鼠肝脏 NF- κ B 表达阳性比例比较 (例, $n = 30$)

组别	时点(h)	0~2%	2%~29%	30%~69%	70%~100%
SO	3	10	0	0	0
	6	10	0	0	0
	12	10	0	0	0
AHNP ¹⁾	3	0	2	8	0
	6	0	0	2	8
	12	0	2	5	3
治疗 ^{1),2)}	3	0	7	3	0
	6	0	1	7	2
	12	0	3	7	0

注:1)与SO组同时时间点比 $P < 0.05$;2)与AHNP组同时时间点比 $P < 0.05$

表3 各组大鼠 NF- κ B 表达强度比较 (例, $n = 30$)

组别	时点 3h				时点 6h				时点 12h			
	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
SO	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
AHNP ¹⁾	0	8	2	0	0	0	1	9	0	4	5	1
治疗 ¹⁾²⁾	1	6	3	0	0	2	5	3	1	3	6	0

注:1)与SO组同时时间点比 $P < 0.05$; 2)与AHNP组同时时间点比 $P < 0.05$

2.4 肝组织 TLR2, 4 mRNA 的表达

SO 组 TLR2, 4mRNA 少量表达(0.020 \pm 0.005 和 0.024 \pm 0.004)。AHNP 组肝组织 TLR2, 4mRNA 于 3 h 开始升高(0.097 \pm 0.020 和 0.342 \pm 0.057), 6 h 继续升高(0.1750 \pm .035 和 0.612 \pm 0.154), 于 12 h 达高峰(0.628 \pm 0.146

和 1.033 \pm 0.172), 各时点间均有显著性差异(均 $P < 0.01$)。治疗组肝组织的 TLR2, 4mRNA 表达降低 3 h 为 0.033 \pm 0.06 和 0.157 \pm 0.03; 6 h 为 0.120 \pm 0.03 和 0.286 \pm 0.08; 12 h 为 0.229 \pm 0.07 和 0.710 \pm 0.20, 各时点间均有显著性差异(均 $P < 0.05$)。

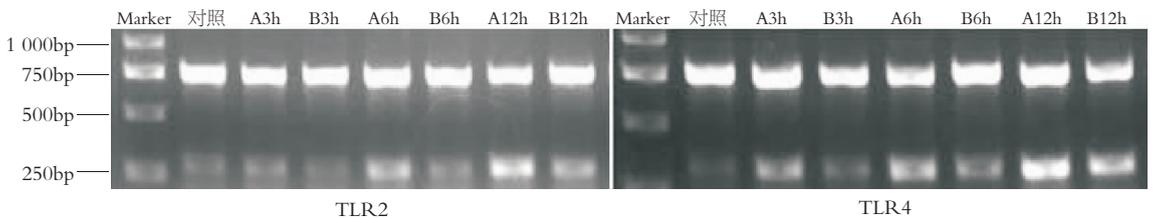


图1 胰腺炎组和治疗组 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达变化 A:胰腺组; B:治疗组

3 讨论

大量研究表明, AHNP 时多器官功能不全 (MODS) 和全身炎症反应综合征 (SIRS) 与白细胞过度活化和炎症细胞因子大量释放密切相关, 但对于其上游途径即 AHNP 时如何导致炎症细胞因子与白细胞活化则仍不清楚。

目前认为, 胰酶的过早激活对于 AHNP 的发病是最直接的因素。有研究^[3-4]探讨了胰弹性蛋白酶在胰腺外(炎性)细胞因子的产生过程中起主要作用, 在胰腺的局部炎症与胰外器官损害全身炎症反应的发生之间起桥梁作用。

近来研究表明, Toll 样受体及其信号途径在炎症反应过程中发挥重要作用^[5-8]; TLR 与其配体相结合后, 激活 NF- κ B 移入核内^[9-10]。NF- κ B 是广泛存在于细胞中具有多种转录调节作用的核转录因子, 它能参与多种炎症细胞因子过度表达, 参与多种疾病过程。Jaffray 等^[11]发现, 腹腔内注射胰弹性蛋白酶在 30min 内即可激活 NF- κ B, 表明急性胰腺炎 (AP) 病程与 NF- κ B 活化密切相关。

本研究观察到, SO 组肝脏中 NF- κ B 少量表达, 而 AHNP 肝脏中 NF- κ B 表达增强, 且 6 h 达高峰。AHNP 组在 3 h 时 TLR2, 4 mRNA 表达开始增高, 6~12 h 继续升高。同时 TNF- α 在 AHNP 组亦明显升高。提示 TLR, NF- κ B, TNF- α 这一信号通路参与 AHNP 的发生。

本实验显示, AHNP 组 TLR2, 4 mRNA 和 NF- κ B 表达明显增强 ($P < 0.01$), 而治疗组各指标表达均较 AHNP 组明显降低。提示生长抑素在胰腺炎中可以抑制 TLR2, 4 mRNA 和 NF- κ B 的表达。Hietaranta 等^[12]认为胰弹性蛋白酶激活全身系统免疫反应, 导致胰外脏器功能障碍, 在 AHNP 的病理过程中发挥重要作用; 并认为胰弹性蛋白酶是通过激活 TLR 受体和 NF- κ B 所介导的。本实验同时看到治疗组腹水量、24 h 病死率、血清淀粉酶及肝组织的 TNF- α 均明显降低 ($P < 0.05$)。由此可推测生长抑素可能系通过抑制胰弹性蛋白

酶的激活, 抑制 TLR2, 4 mRNA 和 NF- κ B 的表达, 进而抑制 TNF- α 等炎症因子而发挥治疗作用。本文结果为临床使用生长抑素治疗胰腺炎提供了进一步的实验依据。

参考文献:

- [1] Miyahara S, Isaji S. Liver injury in acute pancreatitis and mitigation by continuous arterial infusion of an antibiotic via the superior mesenteric artery [J]. *Pancreas*, 2001, 23 (2): 204 - 211.
- [2] 王兴鹏, 陆琪, 吴建新, 等. 奥曲肽对急性坏死性胰腺炎炎症介质的调节作用 [J]. *中华内科杂志*, 2000, 39 (30): 156 - 159.
- [3] Eryani S, Payer J, Huorka M, et al. Etiology and pathogenesis of acute pancreatitis [J]. *Bratisl Lek Listy*, 1998, 99 (6): 303 - 311.
- [4] Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis induced hepatic injury via inflammatory mediators [J]. *J Surg Res*, 2000, 90 (2): 95 - 101.
- [5] Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4 [J]. *J Immunol*, 2004, 172 (1): 20 - 24.
- [6] Zhang D, Zhang G, Matthew S, et al. A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. *Science*, 2004, 303 (5663): 1522 - 1526.
- [7] 张磊, 吴河水, 于鑫, 等. Toll-样受体 2, 4 mRNA 在急性出血坏死性胰腺炎肺损伤中的表达变化 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14 (11): 838 - 841.
- [8] Velayudham A, Hritz I, Dolganiuc A, et al. Critical role of Toll-like receptors and the common TLR adaptor, MyD88, in induction of granulomas and liver injury [J]. *J Hepatol*, 2006, 45 (6): 813 - 824.
- [9] Musikacharoen T, Matsuguchi T, Kikuchi T, et al. NF- κ B and STAT5 play important roles in the regulation of mouse Toll-like receptor 2 gene expression [J]. *J Immunol*, 2001, 166 (7): 4516 - 4524.
- [10] Pandey S, Agrawal DK. Immunobiology of Toll-like receptors: Emerging trends [J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84 (4): 333 - 341.
- [11] Jaffray C, Mendez C, Denham W, et al. Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor- α : role of nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B proteins [J]. *J Gastrointest Surg*, 2000, 4 (4): 370 - 378.
- [12] Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, et al. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF- κ B [J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2004, 323 (1): 192 - 196.