

文章编号:1005-6947(2008)03-0228-05

· 胰腺炎专题研究 ·

# 1-磷酸鞘氨醇对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤保护作用

杨秀竹, 刘洪斌, 崔乃强, 李东华, 李继坤, 王倩

(天津市中西医结合急腹症研究所 药理研究室, 天津 300100)

**摘要:**目的 探讨1-磷酸鞘氨醇(S1P)对大鼠急性坏死性胰腺炎肺损伤(ANP-LI模型组)的保护作用及机制。方法 36只Wistar大鼠随机分为假手术组、模型组、S1P处理组(S1P组)。3组动物于术后6h留取标本作如下实验:(1)测定血清淀粉酶和脂肪酶。(2)测定左肺组织髓过氧化物酶(MPO)。(3)行左肺组织病理学检查。(4)取左肺进行肺泡灌洗测定蛋白含量;细胞沉淀涂片行白细胞和中性粒细胞计数。(5)行胰腺组织病理学检查。结果 S1P组在造模后6h,肺组织MPO水平、肺泡灌洗液蛋白含量、肺泡灌洗液白细胞及中性粒细胞计数均显著低于模型组(均为 $P < 0.01$ );肺组织病理组织学改变显著减轻。与模型组比,S1P组血清淀粉酶、脂肪酶及胰腺病理无明显改变。结论 S1P对大鼠ANP-LI有明显的保护作用;其有可能作为临床治疗的有效手段。

[中国普通外科杂志,2008,17(3):228-232]

**关键词:** 胰腺炎,急性坏死性;肺损伤;1-磷酸鞘氨醇;内皮细胞屏障

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

## The protective effects of sphingosine-1-phosphate on lung injury in acute necrotizing pancreatitis in rats

YANG Xiuzhu, LIU Hongbin, CUI Naiqiang, LI Donghua, LI Jikun, WANG Qian

(Department of Pharmacology, Tianjin Institute of Acute Abdominal Disease, Tianjin 300100 China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of sphingosine-1-phosphate (S1P) on lung injury (LI) in acute necrotizing pancreatitis rats. **Methods** Thirty-six Wistar rats were allocated to sham operation group, acute necrotizing pancreatitis model group and S1P pretreatment group. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tissues from the left lung and pancreas were collected 6h after the model induction. BALF protein content, BALF leucocyte and neutrophil count, and lung tissue myeloperoxidase (MPO) activity were examined. Serum amylase and lipase were determined. In addition, histopathological changes of the pancreas and lung were observed under light microscope. **Results** BALF protein content, BALF leucocyte and neutrophil count, and lung tissue myeloperoxidase (MPO) activity were all reduced significantly in S1P pretreatment group compared to those in acute necrotizing pancreatitis model group ( $P < 0.01$ ). The pathological injury of the lung was obviously less severe in S1P group compared to that in model group. The serum amylase and lipase levels and the pathological damage of the pancreas were not reduced in S1P group. **Conclusions** S1P has a significant protective effect on LI in SAP rats, and it may be used as a clinical therapeutic strategy for acute necrotizing pancreatitis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 228-232]

**基金项目:**天津市卫生局科技基金资助项目(05KY19)。

**收稿日期:**2007-12-28; **修订日期:**2008-02-29。

**作者简介:**杨秀竹,女,天津市中西医结合急腹症研究所主管技师,主要从事急腹症基础方面的研究。

**通讯作者:**杨秀竹 E-mail:xiuzhuy@yahoo.com.cn

**Key words:** Pancreatitis, Acute Necrotizing; Lung Injury; Sphingosine-1-Phosphate; Endothelial Cell Barrier

**CLC number:** R 657.51

**Document code:** A

1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-phosphate, S1P)是近年来新发现的细胞外递质和细胞内第二信使,具有重要的生理功能<sup>[1-3]</sup>。S1P对增强血管内皮细胞屏障功能具有重要作用,它可通过内皮分化基因(Edg)受体连接和Rac GTPase依赖细胞的增殖,强化细胞皮质actin骨架的重排以增强血管内皮细胞结构的完整性,抵抗肺脏的炎症反应,减轻肺损伤<sup>[4-5]</sup>。因此,推测S1P极有可能成为治疗肺损伤的有效手段,但目前尚缺乏关于S1P对胰腺炎肺损伤治疗的研究报道。本研究旨在观察S1P对大鼠ANP-LI保护作用,为可能的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康Wistar大鼠36只,250~280g,雌雄各半,由中国药品生物制品检定所动物中心提供(动物合格证号SCXK11-00-0010)。牛磺胆酸钠溶液和S1P为Sigma公司产品;髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒、淀粉酶(AMY)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;脂肪酶测定试剂盒购自北京利德曼生化技术有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 大鼠ANP模型的建立 参照Aho<sup>[6]</sup>的方法并加以改进<sup>[7]</sup>。大鼠术前12h禁食,不禁水。以10%水合氯醛(0.3g/kg)腹腔注射麻醉。经腹壁正中切口入腹。于胆管出肝门处以无损伤小动脉夹暂时阻断胆管以防止注射时反流入肝,寻找到胆胰管十二指肠乳头开口处,在其对系膜缘用4号注射针头刺一小孔,用PE50导管经乳头部逆行插入胆胰管0.5cm,妥善固定。匀速注入5%牛磺胆酸钠溶液(1ml/kg体重,0.1mL/min),注毕拔管;5min后去除小动脉夹,以无损伤缝线缝合十二指肠穿孔,缝合腹壁。

1.2.2 实验分组及处理 将大鼠随机分为假手术组(S组)、模型组(P组)、S1P处理组(S1P组),每组12只。假手术组仅开腹翻动腹腔器官数次即关腹。模型组成模后不进行处理。S1P组在造模前1h经腹腔注射S1P溶液[溶于生理盐水,50μg/kg(体重)]。3组动物于术后6h留取标本进行相关指标检测。

### 1.2.3 检测指标及方法

1.2.3.1 血清淀粉酶(AMY)测定 经腹主动脉取血。采用碘比色法,用全自动生化仪检测。结果以U/L苏式单位表示。

1.2.3.2 血清脂肪酶测定 采用脂肪酶测定试剂盒,以双光束紫外分光光度计在570nm波长下,根据产物红色的甲基试卤灵生成速率测定脂肪酶活性。操作步骤按试剂盒说明书进行。结果以U/L表示。

1.2.3.3 肺组织髓过氧化物酶(MPO)测定 将肺组织用匀浆缓冲液制成5%匀浆,依次加入反应试剂;在460nm处测定吸光度值。操作步骤按试剂盒说明书进行。结果以mU/mg(蛋白)表示。

1.2.3.4 肺泡灌洗液(BALF)蛋白含量测定及白细胞(WBC)、中性粒细胞计数 取左肺以生理盐水行支气管插管反复灌洗,每次3mL,共3次。回收全部灌洗液,静置10min。取1mL行瑞氏染色,光镜下行白细胞和中性粒细胞计数。剩余的BALF离心,取上清液,双缩脲法测定蛋白含量。

1.2.3.5 肺、胰腺组织病理组织学检查 10%中性甲醛溶液固定,常规HE染色,光镜下观察。胰腺、肺脏病理评分<sup>[8]</sup>。

### 1.3 统计学处理

数据及统计处理采用SPSS11.0统计分析软件处理。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;各组平均数间的差异采用单因素方差分析进行检验。

## 2 结果

### 2.1 各组血清AMY及脂肪酶水平

P组和SP组血清AMY及脂肪酶水平均显著高于S组(均 $P < 0.01$ ),但P组与S1P组间无显著性差异( $P > 0.05$ )(表1)。

表1 各组血清AMY及脂肪酶测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	淀粉酶(U/L)	脂肪酶(U/L)
S组	12	342.5 ± 34.3	500.1 ± 67.2
P组	10	13450.5 ± 1670.5 <sup>1)</sup>	1870.3 ± 171.3 <sup>1)</sup>
S1P组	12	12550.0 ± 1950.5 <sup>1)</sup>	1751.3 ± 121.41 <sup>1)</sup>

注:1)与假手术组比较, $P < 0.01$

**表2** 蛋白含量测定及白细胞、中性粒细胞计数结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	BALF蛋白含量(mg/L)	WBC( $1 \times 10^6/L$ )	中性粒细胞计数( $1 \times 10^6/L$ )
S组	12	89.5 ± 11.2 <sup>1)</sup>	101.5 ± 19.5 <sup>1)</sup>	0.1 ± 0.04 <sup>1)</sup>
P组	10	495.4 ± 87.5	556.5 ± 79.5	9.5 ± 1.1
S1P组	12	165.5 ± 34.5 <sup>1)</sup>	195.5 ± 27.5 <sup>1)</sup>	3.1 ± 0.8 <sup>1)</sup>

注:1)与模型组比,  $P < 0.01$ 

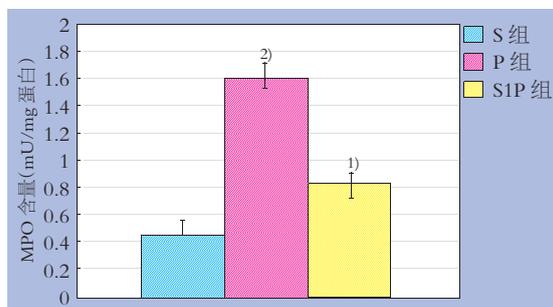
### 2.3 各组肺组织 MPO 水平

S组和S1P组肺组织MAO水平均显著低于P组(均 $P < 0.01$ ),而S组与S1P组间差异无显著性( $P > 0.05$ )(图1)。

### 2.4 胰腺病理组织学检查

光镜观察,假手术组胰腺基本正常(图2A)。模型组6h胰腺病变主要以坏死为主要表现,胰小叶结构消失(图2B)。S1P组6h胰腺病变显示部分胰小叶坏死,细胞胞浆溶解,胞核固缩,小

叶支架尚存(图2C)。病理组织学评分结果显示,与假手术组比,模型组胰腺组织的间质水肿、炎性浸润、出血、坏死、空泡化程度均显著增高(均 $P < 0.001$ );S1P组胰腺组织各项病理改变与模型组比,差异均无显著性(表3)( $P > 0.05$ )。

**图1** 各组 MPO 含量 注:1)与P组比较,  $P < 0.01$ ; 2)与S组比较,  $P < 0.01$ **表3** 胰腺病理组织学评分结果

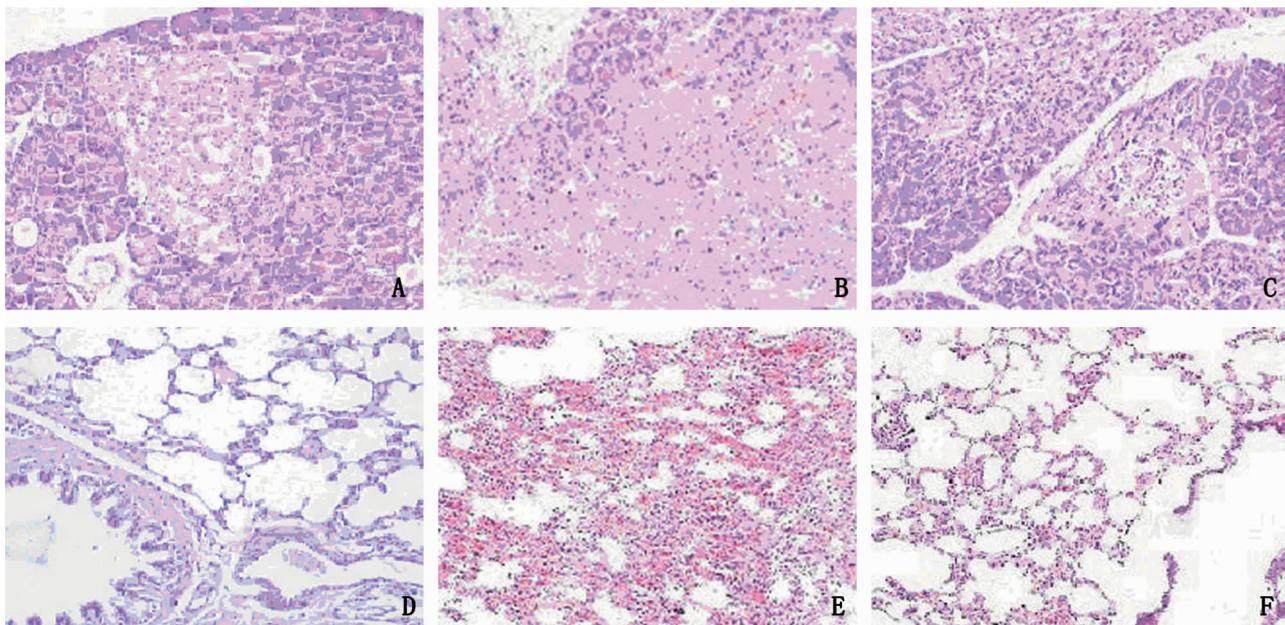
分组	n	间质水肿	炎性浸润	出血	坏死	空泡化
假手术组	12	0.17 ± 0.05	0	0	0	0
模型组	10	2.33 ± 0.82 <sup>1)</sup>	2.33 ± 0.48 <sup>1)</sup>	2.17 ± 0.52 <sup>1)</sup>	2.65 ± 0.53 <sup>1)</sup>	2.00 ± 0.32 <sup>1)</sup>
S1P组	12	2.16 ± 0.57 <sup>1)</sup>	2.35 ± 0.31 <sup>1)</sup>	2.10 ± 0.35 <sup>1)</sup>	2.24 ± 0.45 <sup>1)</sup>	2.10 ± 0.38 <sup>1)</sup>

注:1)与假手术组比,  $P < 0.001$ 

### 2.5 肺病理组织学检查

光镜观察,假手术组肺组织基本正常(图2D),模型组造模后6h肺组织病变以广泛肺泡出血、肺间质瘀血、大量炎性细胞浸润为主(图2E),肺组织病理学评分显著高于假手术组

( $P < 0.01$ );S1P组造模后6h肺组织病变以肺间质轻度瘀血、少量炎性细胞浸润为主,病理组织学评分[(1.24 ± 0.17)分]显著低于模型组[(2.62 ± 0.47)分]( $P < 0.01$ )(图2F);假手术组肺组织基本正常[(0.15 ± 0.04)分](图3)。

**图2** 肺组织病理学图片(HE × 100) A:S组胰腺组织; B:P组胰腺组织; C:S1P组胰腺组织; D:S组肺组织; E:P组肺组织; F:S1P组肺组织

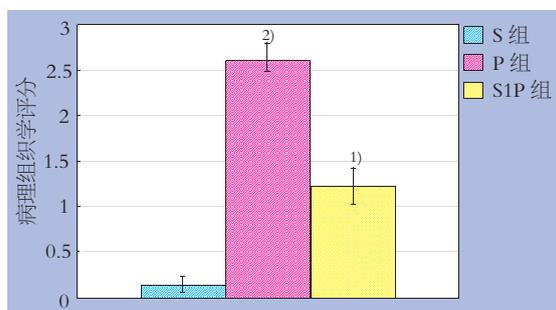


图3 肺组织病理学评分 注: 1) 与P组比较,  $P < 0.01$ ; 2) 与S组比较,  $P < 0.01$

### 3 讨论

ANP发病急骤,病情凶险,治疗困难,病死率高。目前研究证实,ANP继发肺损伤(LI)高达60%~70%,而发展成为急性呼吸窘迫综合症(ARDS)达20%左右,LI是ANP的主要死亡原因。ANP继发的急性肺损伤及ARDS原因甚多,但尚无十分明确的结论。其基本病理改变为肺毛细血管壁和肺泡壁损害,即肺毛细血管内皮屏障功能障碍<sup>[9]</sup>。因此,如何保护肺毛细血管内皮屏障则成为治疗ANP急性肺损伤的重要途径。

体外研究证实,血小板的释放产物以及S1P均可对抗血栓素对人肺动脉内皮细胞屏障功能的破坏,显著增强血栓素刺激下的内皮单层细胞的电阻率(electrical resistance),同时降低内皮单层细胞的通透性;而血小板释放产物中起作用的正是S1P<sup>[10]</sup>。动物实验发现,S1P可显著降低由血小板活化因子所引起的大鼠肠系膜小静脉通透性升高<sup>[11]</sup>。另外,给予外源性S1P以及S1P的类似物-FTY720均可以显著降低由内毒素所致的肺血管内皮通透性,减轻肺损伤,降低病死率<sup>[12]</sup>。因此S1P极有可能成为治疗肺损伤的一种重要手段。

鉴于ANP继发的急性肺损伤的基本病理特点亦为肺毛细血管内皮屏障功能障碍,故本研究针对S1P对胰腺炎肺损伤的保护作用进行了观察及分析。通过对数项反映肺损伤指标的检测,结果显示S1P组肺组织MPO水平、肺泡灌洗液蛋白含量、BALF中WBC及中性粒细胞计数均显著低于模型组。目前认为BALF蛋白含量和肺组织MPO活性是衡量肺损伤程度的重要指标;前者主要反映肺组织通透性的改变程度,后者是中性粒

细胞释放的过氧化物酶类,可反映肺组织内中性粒细胞数量和活性,均反映肺组织的炎症程度。此外,病理组织学检查显示,S1P组肺组织病理改变及病理学评分均显著减轻。以上实验结果显示,S1P明显减轻了ANP的LI程度。推测其机理与S1P增强肺血管内皮屏障完整性、降低肺血管床通透性有关。

综上所述,S1P对大鼠ANP-LI有明显保护作用,其机制可能与S1P增强肺血管内皮屏障完整性、降低肺血管床通透性有关,但具体机制仍需进一步研究。目前,由瑞士诺华制药公司生产的FTY720(S1P的一种类似物)正在进行III期临床实验。虽然这是一种用于移植术后的免疫抑制剂,但研究发现其具有显著增强内皮屏障功能的作用<sup>[12-13]</sup>,实验研究已证实其治疗内毒素所致肺损伤有效。提示S1P及其类似物极有可能成为一种重要的治疗手段;它不仅可以用于治疗包括胰腺炎肺损伤在内的多种肺损伤,对其他涉及内皮屏障障碍的疾病也可能有治疗价值。

### 参考文献:

- [1] Hla T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate[J]. *Semi Cell Dev Biol*, 2004, 15(5): 513 - 520.
- [2] Wenckstern H, Zimmermann K, Kleuser B. The role of the lysophospholipid sphingosine 1-phosphate in immune cell biology [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2006, 54(4): 239 - 251.
- [3] Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1582(1-3): 204 - 215.
- [4] McVerry BJ, Garcia JG. Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate [J]. *J Cell Biochem*, 2004, 92(6): 1075 - 1085.
- [5] McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, et al. Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(9): 987 - 993.
- [6] Aho HJ, Nevalainen TJ, Aho AJ. Experimental pancreatitis in the rat, sodium taurocholate induced acute hemorrhagic pancreatitis [J]. *Eur Surg Res*, 1983, 15(1): 28 - 36.
- [7] HB Liu, NQ Cui, DH Li, et al. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated injury of rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(3): 403 - 407.
- [8] 付林,程书榜,高海斌,等. IL-10区域动脉灌注减轻急性胰腺炎大鼠肺损伤的实验研究 [J]. *中国普通外科*

杂志,2006,15(8):619-620.

- [9] 程石,宋茂民,史敬东.氯化钆对急性坏死性胰腺炎大鼠肺泡巨噬细胞分泌炎症介质的影响[J].中国普通外科杂志,2006,15(11):836-839.
- [10] Schaphorst KL, Chiang E, Jacobs KN, *et al.* Role of sphingosine-1 phosphate in the enhancement of endothelial barrier integrity by platelet-released products [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003,285(1):L258-267.
- [11] Minnear FL, Zhu L, He P. Sphingosine 1-phosphate prevents platelet activating factor-induced increase in hydraulic conductivity in rat mesenteric venules: pertussis toxin sensitive

[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 9(2): 840-844.

- [12] Peng X, Hassoun PM, Sammani S, *et al.* Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004,169(11):1245-1251.
- [13] Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function [J]. *Am J Transplant*, 2004,4(7):1019-1025.

文章编号:1005-6947(2008)03-0232-01

· 病案报告 ·

## 胆总管后壁穿孔 1 例

李庆会

(河北省隆化县医院 外一科, 河北 隆化 068150)

**关键词:**胆结石/并发症;胆总管穿孔;病例报告

**中图分类号:**R 657.4 **文献标识码:**D

**患者** 男,24岁。因突发右上腹疼痛3d,加重并波及全腹1d入院。既往无右上腹疼痛史。体查:腹平坦,未见胃肠型。全腹弥漫性压痛、反跳痛、肌紧张,以右上腹为重。墨菲氏征阳性。肝浊音界正常,移动性浊音阳性。肠鸣音减弱。腹穿抽出黄色似胆汁样液体。B超提示:胆囊腔内可探及多个强回声,后伴声影,随体位移动。胆管无增宽,胆总管直径5mm。胰腺回声正常。腹腔肝肾隐窝可探及8mm深液性暗区。腹部透视:膈下未见游离气体。诊断:结石性坏疽性胆囊炎穿孔继发弥漫性腹膜炎。行急诊剖腹探查术。术中探查见:胆囊壁水肿,可触及结石,但未见坏死灶、无穿孔。腹腔内吸出黄色胆汁样液500mL。切除胆

囊。继续探查见腹膜后组织水肿,黄绿色。打开胰腺被膜、十二指肠侧腹膜,见有黄色胆汁样液溢出。胃、十二指肠、胰腺、胆总管前、侧壁正常。因探查结果与病情不符,故决定探查胆总管。切开前壁,见有少量脓性胆汁,吸净见后壁有一直径3mm的椭圆形穿孔,管壁增厚,管腔内无结石,于下端取出少量干豆渣样脓苔。下端能通过5号探子,证实无梗阻。用无创可吸收线修补2针,置5号T形管。缝合前壁,冲洗腹腔,温氏孔及胆囊窝分别置胶管引流。术后3d拔胆囊窝引流,2周拔温氏孔引流,3周经T管胆道造影,肝内胆管显示清晰,胆总管下端通畅,带管出院。术后6周拔T管。

**讨论** 胆总管穿孔临床少见,1980年统计世界文献仅95例,其中国内文献刊载约50例<sup>[1]</sup>。以往文献报道穿孔部位多位于前壁和侧壁,而后壁穿孔罕见报道。引起胆总管穿孔的病因,成人以胆管结石、胆管炎症为多见,儿童以胆道蛔虫、胆管先天畸形多见。胆总管穿孔术前确诊

率极低,常被误诊为“胆囊穿孔”、“上消化道穿孔”、“阑尾穿孔”。吴红军等<sup>[2]</sup>报道1982—1998收治11例,无1例确诊。其它个案报道也均为术中确诊。分析误诊原因,主要是其发病率极低,医师缺乏认识,临床遇有腹膜炎,首先想到常见病、多发病。即使考虑到胆系穿孔,也多诊断胆囊穿孔。但如遇到胆囊已切除的患者,应想到本病的可能。

胆总管穿孔均会形成不同程度的腹膜炎,需急诊手术。因此,笔者认为术前能否确诊并不重要,重要的是及时手术探查,探查时要全面细致。发生于前壁、侧壁的穿孔容易发现,当探查结果与病情不符时,应想到后壁穿孔的可能。

**参考文献:**

- [1] 陈淑珍,夏振龙.腹部急症学[M].北京:人民卫生出版社,1990.106.
- [2] 吴红军,马亚利,刘亚刚.胆总管穿孔11例分析[J].临床误诊误治杂志,1999,12(3):203.

**收稿日期:**2008-02-27.

**作者简介:**李庆会,男,河北省隆化县医院主治医师,主要从事普外临床方面的研究。

**通讯作者:**李庆会 E-mail:lqh9988@126.com