

文章编号:1005-6947(2008)03-0233-04

· 胰腺炎专题研究 ·

急性胰腺炎大鼠脾脏核因子 κ B 表达的意义

陈占峰, 陈启龙

(新疆医科大学第一附属医院 普通外科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 探讨脾脏在急性胰腺炎(AP)发病中作用。方法 实验大鼠随机分成4组:假手术组,脾切除组,AP组,脾切除+AP组。制模后3,6,12h分批处死动物,取材待检。光镜下观察胰腺组织病理改变并进行病理学评分。采用免疫组织化学方法检测大鼠脾脏NF- κ B(nuclear factor- κ B) p65活化表达水平。结果 脾切除+AP组6,12h胰腺病理学评分均低于AP组(6h: 7.83 ± 0.753 vs 9.67 ± 1.211 ; 12h: 9.67 ± 0.816 vs 13 ± 0.894) ($P < 0.01$); AP大鼠模型中脾脏NF- κ Bp65活化阳性表达3h即明显(46.967 ± 1.148),6h最强(56.333 ± 1.588),12h表达减弱(36.900 ± 0.756),与假手术组(3.400 ± 0.800)差异均有显著性。结论 脾脏可以明显促进炎症介质的产生和释放,在AP发病中起重要作用。

[中国普通外科杂志,2008,17(3):233-236]

关键词: 胰腺炎/病理学; 脾脏; 炎症介质; 核因子 κ B

中图分类号: R 657.51

文献标识码: A

The significance of activation of splenic nuclear factor κ B in rats with acute pancreatitis

CHEN Zhanfeng, CHEN Qilong

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

Abstract: Objective To investigate the role of the spleen in the pathogenesis of acute pancreatitis (AP).

Methods The studied rats were divided randomly into four groups: Sham operation group, splenectomy group, AP group and AP with splenectomy group. The rats were sacrificed at 3h, 6h and 12h after operation, and spleen and pancreas were removed for examination. Light microscopy was used to examine pancreatic tissues for pathologic change and to assess pathology score. Immunohistochemical method was used to observe the activity of splenic NF- κ B (p65) in the rats with AP. **Results** The pancreas pathology score in the AP with splenectomy group was significantly lower than that in AP group at 6h (7.83 ± 0.753 vs 9.67 ± 1.211) and 12h (9.67 ± 0.816 vs 13 ± 0.894) after operation ($P < 0.01$). The positive expression of splenic NF- κ B (p65) began to be intensified at 3h (46.967 ± 1.148), peaked at 6h (56.333 ± 1.588), attenuated at 12h (36.900 ± 0.756) in the rats with AP, and all showed significant differences compared with that in sham operation group (3.400 ± 0.800). **Conclusions** The spleen can significantly promote the production and release of inflammatory mediators in AP, which plays an important role in the pathogenesis of AP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 233-236]

Key words: Pancreatitis/pathol; Spleen; Inflammatory Mediator; Nuclear Factor κ B

CLC number: R 657.51

Document code: A

收稿日期:2008-01-03; 修订日期:2008-02-04。

作者简介:陈占峰,男,新疆医科大学第一附属医院主治医师,主要从事胃肠、胰腺的基础与临床方面的研究。

通讯作者:陈启龙 E-mail:chenqilong651003@sohu.com

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的发病涉及多种机制,是个多因素、多步骤的病理过程^[1]。“炎症因子级联瀑布效应”不仅是 AP 的致病机制之一,而且是所有致病因素的共同病理阶段^[2]。而脾脏是人体最大的外周免疫器官,含有多种免疫活性细胞和免疫因子,其在 AP 病程中的作用如何还知之甚少。笔者制作大鼠 AP、切脾 + AP 动物模型,检测脾脏核因子 κ B (NF- κ B) 的表达,以期探讨脾脏在 AP 发病中作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

SD 大鼠 72 只,雌雄分笼饲养,体重 250~350 g,随机分为 4 组:(1)假手术组;(2)切脾组;(3)AP 组;(4)切脾 + AP 组,每组 18 只。

1.2 实验试剂

牛磺胆酸钠(购自美国 sigma 公司),检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 试剂盒(购自上海森雄科技实业有限公司)。兔抗大鼠 NF- κ B p65 单克隆抗体、通用二抗及 DAB 显色剂购自北京中杉公司。

1.3 动物模型的制作及标本留取

AP 制作:大鼠术前禁食 12 h。3% 水合氯醛腹腔内注射 (0.1 mL/100 g) 麻醉后,上腹正中切口,用丝线结扎胆胰管入十二指肠下方肠管,胆胰管肝门端用小动脉夹阻断,用 4 号针头从胆胰管远端行逆行胰胆管穿刺,4% 牛磺胆酸钠 (0.1 mL/100 g 体重) 缓慢注入约 2 min。注毕后去除结扎丝线及小动脉夹,逐层缝合腹壁。所有动物无术中死亡。假手术组仅行简单剖腹术,进腹后用手翻动胃、脾及胰腺后复位,即关腹。脾切

+ AP 组在切脾后再用上述方法制作 AP。术后禁食,清醒后自由进水。术后大鼠均于背部皮下注入生理盐水 2 mL/100 g 体重。标本留取:按随机原则将各组大鼠分别于制模后 3, 6, 12 h 后分 3 批处死;麻醉后开腹,腹主动脉取血。切取脾脏、胰腺的体部组织以 4% 甲醛溶液固定。

1.4 检测指标

病理切片采用苏木素 - 伊红 (HE) 染色,光镜观察脾脏、胰腺病理改变并参照 Rongione 等^[3]方法对胰腺病变程度进行评分。免疫组织化学法 (SP) 检测脾脏 NF- κ B 的表达情况:阴性细胞胞浆呈棕黄色,胞核蓝染;阳性细胞胞浆、胞核均为棕黄色。高倍光镜下随机取 10 个视野的阳性细胞数的平均数作为阳性表达细胞数。ELISA 法测定血清 TNF- α 。

1.5 统计学处理

所有资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。差异显著性检验采用方差分析,组间均数比较用 q 检验。

2 结 果

2.1 各组大鼠不同时点 TNF- α 水平

AP 组及脾切除 + AP 组与假手术组及脾切除组相比, TNF- α 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 随着时间的延长 AP 组和脾切除 + AP 组 TNF- α 水平均有升高; AP 组不同时点间差异均有显著性。切脾 + AP 组 6 h 与 3 h, 12 h 与 6 h 组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 但 12 h 组与 3 h 组差异有显著性。AP 组与脾切除 + AP 组相比, 6 h 和 12 h TNF- α 水平均增高, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 3 h 则无统计学差异 (表 1)。

表 1 血清 TNF- α 各时相浓度 ($n=6$) (pg/L, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 制模后 3 h | 制模后 6 h | 制模后 12 h |
|-----------|--|---|--|
| 假手术组 | 0.299 \pm 0.601 | 0.257 \pm 0.610 | 0.409 \pm 0.446 |
| 切脾组 | 0.680 \pm 1.301 | 0.464 \pm 0.843 | 1.100 \pm 1.286 |
| AP 组 | 10.751 \pm 3.887 ^{(1), (2)} | 22.260 \pm 4.806 ^{(1), (2), (4)} | 41.628 \pm 9.975 ^{(1), (2), (4), (5)} |
| 切脾 + AP 组 | 10.031 \pm 4.989 ^{(1), (2)} | 16.743 \pm 5.651 ^{(1), (2), (3)} | 21.133 \pm 6.324 ^{(1), (2), (3), (4)} |

注:同时点不同组之间比较,1)与假手术组比较 $P < 0.05$, 2)与切脾组比较 $P < 0.05$, 3)与 AP 组比较 $P < 0.05$; 同组不同时点之间比较, 4)与 3 h 比较 $P < 0.05$, 5)与 6 h 比较 $P < 0.05$

2.2 大鼠胰腺病理学改变

2.2.1 大体观察 AP 及脾切 + AP 组 3 h 时点

胰腺组织轮廓消失,呈黏冻状出血坏死改变,腹水呈淡红色; AP 组 6, 12 h 时点胰腺组织广泛出

血坏死,范围扩大,胰腺周围大网膜及腹膜有较多皂化斑点,腹腔内大量血性腹水。切脾 + AP 组腹水量及病变程度在 6, 12 h 均较 AP 组明显减轻。假手术组及脾切组胰腺肉眼观呈淡粉红色,颜色均匀一致。

2.2.2 光镜检查 AP 组和脾切除 + AP 组可见胰腺腺泡细胞肿胀,灶性坏死,腺泡细胞间有大量炎症细胞浸润;小叶排列紊乱,其间充斥大量炎性渗出;坏死区内腺泡结构消失,胞核溶解;叶

间隙增宽,间质微血管破裂,大量红细胞溢出;病变严重程度随术后时间延长而加重。脾切除 + AP 组在 6, 12 h 时腺泡坏死范围及炎症浸润程度均较 AP 组减轻。假手术组和脾切除组除部分胰腺腺泡细胞水肿外,小叶结构存在,间质清晰,间质内偶见炎症细胞浸润。胰腺病理学评分中,3h 时 AP 组和脾切除 + AP 组之间差异无显著性。6 h, 12 h 时脾切除 + AP 组评分较 AP 组降低且差异有显著性(表 2)。

表 2 各组大鼠胰腺病变严重程度评分比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 制模后 3 h | 制模后 6 h | 制模后 12 h |
|-----------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 假手术组 | 1.33 ± 0.516 | 1.33 ± 0.516 | 1.33 ± 0.516 |
| 脾切组 | 2.17 ± 0.408 | 1.83 ± 0.408 | 1.83 ± 0.408 |
| AP 组 | 6.33 ± 0.516 ^{1),2)} | 9.67 ± 1.211 ^{1),3)} | 13 ± 0.894 ^{1),3),4)} |
| 脾切 + AP 组 | 5.83 ± 0.753 ^{1),2)} | 7.83 ± 0.753 ^{1),2),3)} | 9.67 ± 0.816 ^{1),2),3)} |

注:同时点不同组之间比较;1)与假手术组比较 $P < 0.05$;2)与切脾组比较 $P < 0.05$,同组不同时间点之间比较;3)与 3h 比较 $P < 0.05$;4)与 6h 比较 $P < 0.05$

2.3 免疫组化法 (SP) 检测脾脏 NF- κ B p65 表达的结果

假手术组脾脏中罕见 p65 表达阳性细胞。AP 组 3h 脾脏中可见 NF κ B P65 表达阳性细胞广泛分布,有较多核转移,胞核内 p65 阳性细胞数 46.967 ± 1.148 与假手术组的 3.567 ± 0.197 比

较差异有显著性 ($P < 0.01$);6 h p65 阳性细胞数为 56.333 ± 1.588 增加最明显,12h 阳性细胞数减少 36.900 ± 0.756 ,与假手术组 3.400 ± 0.800 比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。6 h 组与 3, 12 h 组差异均有显著性(图 1)。

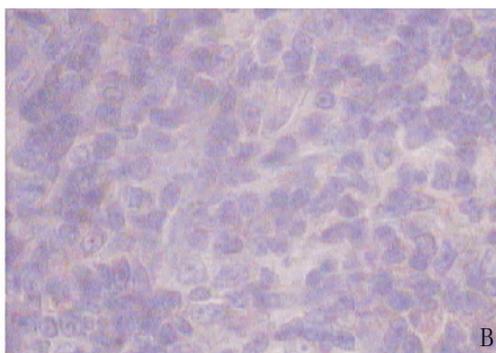
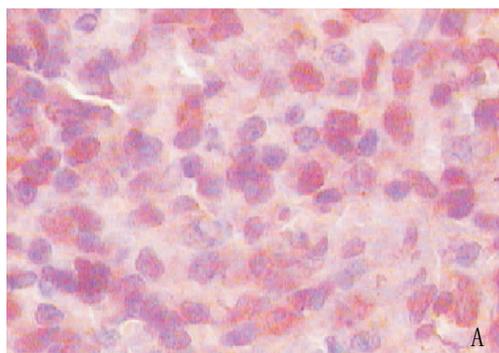


图 1 脾脏 NF- κ B 的表达 A: AP 组 6h; B: 假手术组 6 h (SP $\times 400$)

3 讨论

NF- κ B 是一类能与多种基因启动子或增强子的 κ B 位点特异性结合,并启动基因转录的蛋白质。其常见的作用形式是 p50 和 p65 组成的异源二聚体。研究显示,NF- κ B 参与了 AP 的发病,并认为它的活化是 AP 早期的重要事件^[4],TNF- α

等因子所启动的级联反应起始于 NF- κ B 的活化,活化的 NF- κ B 进入细胞核,与特异的 DNA 位点结合,从而启动白细胞介素 6 (IL-6),TNF- α 等许多细胞因子、炎症介质、黏附分子和急性期反应蛋白的基因表达,控制它们的转录^[5-6]。产生的大量炎症细胞因子,引发炎症介质的“级联瀑布反应”。其中 TNF 是具有广泛生物学活性的非特异

性炎症介质。在实验性 AP 中, TNF- α 在疾病初期即开始升高, 2 h 后达峰值, 是 AP 的始动因子之一^[7], 也是导致胰腺外器官损伤的主要因子, 对 AP 的进展起着重要的作用, 并且和 AP 的严重程度有关^[8]。尽管 NF- κ B 存在于许多细胞, 但巨噬细胞和其他免疫细胞是目前已知 NF- κ B 的主要来源。脾脏是人体最大的免疫器官, 含有多种免疫活性细胞和免疫因子, 在机体炎症反应中发挥一定的作用^[9]。脾脏内与炎症反应有关的免疫细胞主要有 M Φ 、自然杀伤(NK)细胞、B 细胞及 T 细胞等。M Φ 分泌的细胞因子主要包括 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-8。脾脏与胰腺相毗邻, 胰脾血管相互有许多交通支。脾脏在炎症反应时所分泌的炎症因子迅速大量地进入胰腺组织, 可能加重胰腺炎的病情。鲁正等^[10]通过实验证实, 脾切除 + AP 组的 TNF- α 和 IL-1 β 含量及细菌移位率均显著低于 AP 组, 且肠黏膜病变减轻, 说明脾脏在炎症反应中, 可明显促进炎症介质的产生和释放, 加重炎症反应, 脾脏切除可改善病情。可能是由于脾脏切除使免疫促进作用丧失, 因而免疫活性细胞对外源性刺激的敏感性下降, 导致炎症介质产生及释放减少, 阻止了 AP 病情的发展。本实验制作 AP 及切脾 + AP 模型, 也支持此结论。本资料显示切除脾脏后 6, 12 h 胰腺病变明显减轻, 较 AP 组有显著差异; TNF- α 的水平随病变加重而升高。脾切除 + AP 组的 TNF- α 在 6 h 和 12 h 较 AP 组明显降低。而 6h 组和 12 h 组比较差异无显著性, 此现象有异于 AP 组。研究发现, 作为炎症调节的关键性因子 NF- κ B, 在 AP 模型的脾脏中明显表达, 较假手术组有显著差异; 其表达高峰出现在 6h, 12 h 时降低。可见脾脏切除后, 失去了脾脏的大量细胞内 NF- κ B 的激活, 从而减少了其下游 TNF- α 等炎症介质的产生, 减弱了炎症反应强度, 进而减轻了胰腺的损伤。脾脏在 AP 发病的作用中是早期事件。并观察到脾切除 + AP 组 6 h 和 12 h 的病变还是有差异, 表现为加重。提示单纯切脾不能完全阻止胰腺炎

的病情进展, 仍有较多使病情加重的其他因素, 如腹腔巨噬细胞、肝脏的库普弗细胞等的作用^[11]。

参考文献:

- [1] 姚玮艳, 袁耀宗. 急性胰腺炎发病机制的新进展[J]. 现代实用医学, 2005, 17(9): 525 - 527.
- [2] Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators [J]. Shock, 2005, 24 (Suppl 1): 45 - 51.
- [3] Rongione AJ, Kussk AM, Kwan K, *et al.* Interleukin-10 reduces the severity of acute pancreatitis in rat [J]. Gastroenterology, 1997, 112(3): 960 - 967.
- [4] 张翼, 吕新生, 孙维佳, 等. 甘遂对重症急性胰腺炎大鼠核因子- κ B 活化的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(10): 761 - 765.
- [5] Algul H, Tando Y, Schneideu G. Acute experimental pancreatitis and NF-KappaB/Rel activation [J]. Pancreatology, 2002, 2(6): 503 - 509.
- [6] 余泉, 李永国. NF- κ B 在重症急性胰腺炎中作用研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(12): 930 - 932.
- [7] Mews P, Philips P, Fahmy R, *et al* Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis [J]. Gut, 2002, 50: 535 - 541.
- [8] Norman JG, Fink Gu, Denham W, *et al.* Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis, A probable mechanism for distant organ dysfunction [J]. Dig Dis Sci, 1997, 42(8): 1783 - 1788.
- [9] Braselmann S, Taylor V, Zhao H, *et al.* R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 319(3): 998 - 1008.
- [10] 鲁正, 朱言亮, 何长林, 等. 大鼠急性胰腺炎反应中脾脏对肠屏障功能的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(5): 335 - 337.
- [11] Yukio M, Kazunori T, Kazuhiko S, *et al.* Do peritoneal macrophages play an essential role in the progression of acute pancreatitis in rats? [J]. Pancreas, 2003, 27(3): 253 - 260.