

文章编号:1005-6947(2008)09-0848-04

· 胰腺炎专题研究 ·

急性胰腺炎胰腺 iNOS mRNA 的表达与肠壁通透性的关系及丹参对其的影响

石承先¹, 李玉祥², 张莹¹

(1. 贵州省人民医院肝胆胰外科, 贵州 贵阳 550002; 2. 广东省深圳市龙华人民医院 外一科, 广东 深圳 518109)

摘要:目的 探讨重症急性胰腺炎(SAP)大鼠胰腺组织诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA的表达及其与肠壁通透性的关系,并观察丹参对其的影响。方法 大鼠随机分为3组:(1)SAP组($n=15$);(2)SAP丹参注射液治疗组(T组, $n=15$);假手术对照组(C组, $n=15$)。原位杂交法检查各组胰腺iNOS mRNA表达,血中一氧化氮(NO),淀粉酶(AML),内毒素(LPS)和血中与肠内¹²⁵I-清蛋白累积指数,以及胰腺和回肠病理检查。结果 SAP组胰腺iNOS mRNA呈强阳性表达,血中NO,AML和LPS含量及¹²⁵I-清蛋白累积指数和腹水量均显著高于C组($P<0.01$)。与SAP组比较,T组胰腺及回肠病理损害明显减轻,胰腺iNOS mRNA表达强度较弱,血中NO,AML,LPS及腹水量均显著下降($P<0.01$),¹²⁵I-清蛋白累积指数亦降低。结论 SAP肠壁通透性增加的原因之一可能与SAP时胰腺iNOS mRNA的过度表达产生过多NO有关。丹参通过下调胰腺iNOS mRNA的表达,对降低SAP的肠壁通透性有一定预防治疗作用。 [中国普通外科杂志,2008,17(9):848-851]

关键词: 胰腺炎,急性坏死性/病理学;一氧化氮合成酶;原位杂交;肠壁通透性;丹参

中图分类号:R 657.5 文献标识码:A

The relationship between pancreatic iNOS mRNA expression and gut permeability and the effect of salviae miltiorrhizae on the change in gut permeability in rats with severe acute pancreatitis

SHI Chengxian¹, LI Yuxiang², ZHANG Ying¹

(1. Department of Liver Biliary Pancreatic Surgery, the People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550002, China; 2. Department of Surgery, the Longhua People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518109, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression of pancreatic tissues and intestinal permeability, and the effect of salviae miltiorrhizae on the change in gut permeability in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** All rats were randomly divided into three groups: Sham operation (group C, $n=15$), SAP group (group SAP, $n=15$), and salviae miltiorrhizae therapeutic group (group T, $n=15$). At 24h After operation, the iNOS mRNA expressions of pancreas were determined by in situ hybridization (ISH), and blood amylase (AMY), nitric oxide (NO) and lipopolysaccharide (LPS) were examined. The histopathologic changes of pancreas and ileum were observed. Intestinal permeability was measured by means of albumin clearance (AC) of ¹²⁵I-labeled rat serum albumin. **Results** The iNOS mRNA expressions of pancreas in group SAP were markedly increased in

基金项目:贵州省优秀科技教育人才省长基金资助项目(黔科教办2001-06)。

收稿日期:2008-01-09; **修订日期:**2008-03-29。

作者简介:石承先,男,贵州省人民医院主任医师,主要从事急性胰腺炎的基础与临床方面的研究。

通讯作者:石承先 E-mail:chengxian@yahoo.com.cn

comparison with group T ($P < 0.01$), while there was no iNOS mRNA expression of pancreas in group C. The blood AML, NO, LPS and ascites and intestinal permeability in group SAP were much higher than those of group C ($P < 0.01$), and also higher than those of group T ($P < 0.01$) except AC. The pathological changes of pancreas and ileum in group SAP were more severe than in group T ($P < 0.01$), however pathology of pancreas and ileum was normal in group C. **Conclusions** Excess NO produced by pancreatic iNOS mRNA overexpression may be a factor related to intestinal permeability in SAP. Salvia miltiorrhiza can down-regulate the iNOS mRNA expression of pancreas and improve the intestinal permeability in SAP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (9): 848 - 851]

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing/pathol; Inducible Nitris Oxide Synthase, ; Situ Hybridization; Intestinal Permeability; Salvia Miltiorrhiza

CLC number: R 657.5

Document code: A

重型急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 并发症多, 病死率高。胰腺及胰周组织的感染是 SAP 中后期的严重并发症, 临床上死亡的病例中 80% 是由胰腺继发感染所致^[1]。这种感染主要是由于肠黏膜屏障功能受损, 细菌移位的结果^[2]。研究发现, 胰腺一氧化氮合成酶 (nitris oxide synthase, NOS) 的表达和血中一氧化氮 (NO) 水平与急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 的程度有关^[3-4], NO 水平与 SAP 时肠道损伤有关^[5]。丹参已被用于治疗 AP^[6]。至于 SAP 时胰腺组织诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitris oxide synthase, iNOS) mRNA 的表达与血浆中 NO 浓度及其肠壁通透性的关系, 以及丹参是否对其产生影响并不明了。本研究通过观察大鼠 SAP 时胰腺组织 iNOS mRNA 的表达和血浆中 NO 浓度及其与肠壁通透性的关系, 并观察丹参对其影响, 旨在探讨 SAP 继发感染的机制及预防的方法。

1 材料和方法

1.1 动物分组与处理

健康 Wistar 大鼠 (购自遵义医学院动物室) 45 只, 雌雄不限, 体重 230 ~ 320 g。随机分为 3 组: (1) 假手术对照组 (C 组); (2) SAP 组; (3) SAP 丹参治疗组 (T 组), 每组各 15 只。所有动物术前禁食 12 h。1% 戊巴比妥钠 (购自上海试剂二厂) 腹腔内注射 (30 mg/kg) 麻醉。按外科无菌操作进行手术。上腹正中切口入腹。C 组仅原位翻动胰腺数次后关腹。SAP 组寻及十二指肠和胰胆管后, 用小动脉夹夹闭胰胆管近肝门端, 用 4.5 号针头刺入胰管肠端, 用微量泵以 0.2 mL/min 的速度向胰管内逆行注射 5% 牛磺胆酸钠 (购自 Sigma 公司) 溶液, 剂量 0.15 mL/100 g; 注毕压迫穿孔 5 min 后去除压迫及动脉夹, 见胰腺明

显水肿后关腹。T 组在 SAP 成模关腹后, 在即刻、8 h 及 18 h 时点予丹参注射液 (四川省宜宾五粮液集团宜宾制药厂生产) 肌肉注射, 剂量 2 mL/(kg · d)。术后分笼饲养, 自由饮水。术后 23 h, 3 组大鼠按上述方法麻醉后行颈动脉插管, 由此管缓慢推注¹²⁵I - 清蛋白 1 mL 后动脉夹夹闭颈动脉近端; 1 h 后去除动脉夹取血标本, 加少许肝素混匀, 2 500 r/min 离心 15 min, 取血浆 - 20 °C 保存待批量测定。24 h 时放血处死动物后立即剖腹结扎 10 cm 末端回肠; 收集并称取肠内容物, 取胰腺及回肠组织作标本。

1.2 观察项目及检测指标

观察动物一般状况、腹水及腹腔大体病理改变后测定下列指标。

1.2.1 血 AMY 取保存待测样本, 用全自动生化分析仪 (瑞士 COBAS MIRA 公司生产) 测定 AMY (AMY 试剂盒为上海科华一东菱诊断用品有限公司生产)。

1.2.2 血浆 NO 取保存待测样本, 按 NO 硝酸还原酶法试剂盒说明书 (南京建成生物工程研究所提供) 的方法 3 个月内批量测定 NO。

1.2.3 血 LPS 取保存待测样本, 按鲎试剂盒 (II) (上海伊华临床医学科技公司提供) 说明的方法进行。

1.2.4 ¹²⁵I - 清蛋白测定 术后 23 h, 如前所述麻醉动物后行颈动脉插管, 缓慢推注¹²⁵I - 清蛋白 (购自北京福瑞生物工程公司, 浓度 19.5×10^5 cpm/mL) 1 h 后剖腹, 结扎 10 cm 末端回肠, 收集并称取肠内容物; 同时采血 0.5 mL。两者均用 GAMBYT-CR γ -计数器 (美国德普公司生产) 测定放射性。用累积指数表示肠黏膜通透性^[5]。累积指数 = 肠内容物放射性 (cpm/g) \times 100/血液放射性 (cpm/mL)。

1.2.5 胰腺组织 iNOS mRNA 原位杂交 按试剂盒(购自武汉博士德生物工程公司)要求进行原位杂交。主要步骤:处死动物后立即剖腹,按无菌操作要求取相同部位胰腺组织固定于4%多聚甲醛中,2 h后按原位杂交要求进行脱水、透明、浸蜡及包埋,以后按原位杂交试剂盒说明书的方法进行原位杂交。阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替原位杂交液。

判断结果的标准:阳性表达的细胞胞浆中出现棕黄色颗粒。用 Biomias99 图像分析系统(四川大学图像图形研究所),在 10×20 倍视野下,对每张原位杂交切片取 50% 面积测定积分光密度(IOD)表示阳性颗粒相对含量。

1.2.6 病理学检查 取相同部位胰腺及回肠组织,用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片后 HE 染色,光镜观察。胰腺病理评分参考 Schmidt 评分标准^[7]。

1.3 统计学处理

数据以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间数据比较采用方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 动物一般情况

C 组动物活动反应敏捷,进食饮水良好。SAP 组动物精神萎靡、卷曲、活动少差,进食饮水差,有呕吐等现象。T 组一般情况较 C 组差,但较 SAP 组好。

2.2 血 AMY 及腹水

SAP 组和 T 组的 AMY 及腹水量显著高于 C 组($P < 0.01$), T 组明显低于 SAP 组($P < 0.01$)(表1)。

2.3 3组动物的胰腺及回肠病理变化

C 组胰腺和回肠结构未见异常。SAP 组胃肠

积液积气明显,腹水为血性,腹腔内广泛皂化斑;胰腺广泛出血、坏死及皂化斑形成,胰腺间质内大量中性粒细胞浸润,部分有小脓肿形成;回肠黏膜间质层明显水肿,淋巴管扩张,绒毛增粗,部分绒毛脱落、缺损,并见单核及中性粒细胞浸润。T 组病理改变较 C 组重,但较 SAP 组轻,胰腺仅有点状坏死;回肠黏膜绒毛基本完整无水肿。SAP 组的病理评分分值明显高于 T 和 C 组($P < 0.01$),而 T 组显著低于 SAP 组($P < 0.01$)(表1)。

表1 3组动物血 AMY 和腹水量及胰腺病理评分的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMY(u/L)	腹水量(mL)	胰腺病理评分
SAP	15	2145.76 ± 541.58 ¹⁾	9.51 ± 4.73 ¹⁾	14.97 ± 0.35 ¹⁾
T	15	1657.41 ± 648.41 ¹⁾²⁾	3.04 ± 1.94 ¹⁾²⁾	7.43 ± 1.91 ¹⁾²⁾
C	15	215.67 ± 37.27	0	0

注:1)与C组比较 $P < 0.01$, 2)与SAP组比较 $P < 0.01$

2.4 胰腺 iNOS mRNA 表达与血中 NO 浓度的变化

C 组胰腺组织 iNOS mRNA 无表达(图1), SAP 组呈强阳性表达(图2), T 组虽见阳性表达,但表达数量较少,强度较 SAP 组弱(图3)。图像分析结果及血中 NO 浓度变化显示:T 组的 iNOS mRNA 表达和血中 NO 浓度比 SAP 组明显降低($P < 0.01$), T 组的 iNOS mRNA 表达高于 C 组,但血 NO 浓度与 C 组无明显差别($P > 0.05$)(表2)。

2.5 ¹²⁵I-清蛋白累积指数和血 LPS 浓度的变化

SAP 组和 T 组的 ¹²⁵I-清蛋白累积指数及 SAP 组的 LPS 明显高于 C 组($P < 0.01$), T 组的 ¹²⁵I-清蛋白累积指数和 LPS 均低于 SAP 组,尤以 LPS 为著($P < 0.01$)(表3)。

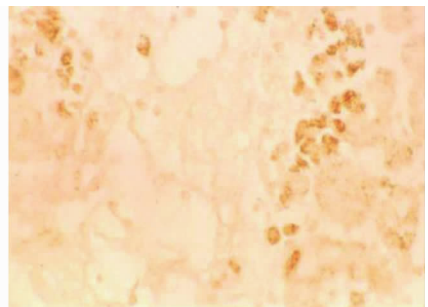
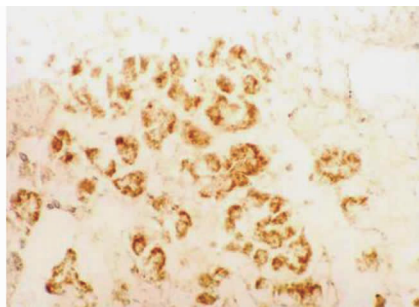


图1 C 组胰腺无 iNOS mRNA 表达($\times 400$)

图2 SAP 组胰腺 iNOS mRNA 表达增强($\times 400$)

图3 T 组胰腺 iNOS mRNA 表达较弱($\times 400$)

表 2 3组动物胰腺 iNOS mRNA 表达与血中 NO 浓度的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS	NO($\mu\text{mol/L}$)
SAP	15	28.11 \pm 1.01 ¹⁾	144.99 \pm 32.29 ¹⁾
T	15	21.41 \pm 1.54 ²⁾	87.51 \pm 22.13 ²⁾
C	15	无表达	84.58 \pm 23.44

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

表 3 3组动物累积指数和血中 LPS 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	累积指数	LPS(Eu/L)
SAP	15	5.49 \pm 0.82 ¹⁾	198.11 \pm 42.34 ¹⁾
T	15	5.07 \pm 1.48 ¹⁾	106.53 \pm 21.18 ²⁾
C	15	3.50 \pm 0.67 ³⁾	87.67 \pm 22.40

注:1)与C组比较 $P < 0.01$;2)与SAP组比较 $P < 0.01$;3)与T组比较 $P < 0.01$

3 讨论

本研究发现,与对照组相比,SAP时肠绒毛水肿明显,部分绒毛脱落、缺损,血中LPS水平明显升高,¹²⁵I-清蛋白累积指数显著增加,从形态和功能两方面证明SAP时肠黏膜屏障功能损伤,肠壁通透性增加。

SAP发生肠壁通透性增高的原因,一方面此时胰腺病理损害引起有效循环血量不足,肠道处于缺血缺氧状态,同时SAP过度激活肠道局部释放血小板活化因子等均可损伤肠黏膜屏障功能^[8];另一方面,重要的原因之一还与SAP时胰腺iNOS mRNA过度表达,导致血中NO明显升高有关。NOS是合成NO的关键酶,正常情况下iNOS基因不表达,只有在内、外毒素和某些细胞因子如肿瘤坏死因子(TNF)等刺激下才能进行转录和翻译,主要是生成大量NO^[9]。SAP早期,适量NO通过舒血管效应可使肠道血流量增加,改变微血管通透性,减少白细胞渗出对肠组织的损伤,此时NO对肠损伤具有保护作用。但SAP时,由于高水平 and 长时间iNOS的诱导生成过量NO,则会加重SAP早期休克和肠组织缺血缺氧;底物L-精氨酸耗竭后,iNOS还可还原O₂生成O₂和H₂O₂,两者均加强氧自由基的毒性作用,进一步加重对肠黏膜的损伤^[3,10]。

本实验研究显示,与SAP组相比,T组动物在丹参治疗后胰腺iNOS mRNA表达明显下调,胰腺炎症明显减轻,血中AML,NO,LPS浓度均显著下降,¹²⁵I-清蛋白累积指数有所下降,且回肠病理损害减轻,肠壁通透性降低。此结果提示,丹参对SAP及其肠道损伤有一定的治疗作用。其机制之一可能是通过抑制iNOS mRNA的过度表达,减少NO的大量生成,从而发挥其保护作用。此外,改善微循环也可减轻AP的炎症^[11],这也可能是丹参的另一种保护机制之一。

参考文献:

- [1] Widdison AL, Karanjia ND. Pancreatic infection complicating acute pancreatitis [J]. Br J Surg, 1993, 80(2): 148 - 154.
- [2] Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, et al. Treatment outcome of selective digestive decontamination and enteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis [J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007, 14(5): 503 - 511.
- [3] 赵平. 急性胰腺炎胰腺组织中一氧化氮合成酶的表达 [J]. 局解手术学杂志, 2003, 12(3): 196 - 197.
- [4] 徐娴, 孙士其, 张军, 等. 急性胰腺炎血清sTNF-R、IFN- γ 、IL-6、IL-8、NO、NOS水平与其严重程度的研究 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2003, 12(3): 289 - 290.
- [5] 吴承堂, 黎洁良. 一氧化氮、内皮素在急性坏死性胰腺炎肠道损伤中的作用 [J]. 中国普通外科杂志, 1999, 8(3): 210 - 212.
- [6] 秦仁义, 邹声泉. 丹参对胆源性胰腺炎的防治作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(4): 333 - 334.
- [7] Schmidt T, Lewandowski K, Fernandez - Del CC, et al. Histo - pathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis [J]. Dig Dis Sci, 1992, 37(11): 1426 - 1433.
- [8] Roland A, Wang XD, Robert R, et al. Effect of a plate - activating factor antagonist on pancreatitis - associated gut barrier dysfunction in rats [J]. Pancreas, 1994, 17(1): 107 - 110.
- [9] 张登海. 一氧化氮合成酶分子生物学进展 [J]. 生命科学, 1994, 17(3): 25 - 28.
- [10] Molero X, Guarner F, Salas A, et al. Nitric oxide modulates pancreatic basal secretion and response to cerulein in threat: effects in acute pancreatitis [J]. Gastroenterology, 1995, 108(8): 1855 - 1862.
- [11] 胡国潢, 段炼, 周军, 等. 低分子量肝素预防 ERCP 术后急性胰腺炎的临床研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(10): 784 - 787.