

文章编号:1005-6947(2006)08-0619-03

· 简要论著 ·

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

付林, 程书榜, 高海斌, 宋建明, 陈剑雄

(广东省深圳市第二人民医院 普通外科, 广东 深圳 518035)

摘要:为探讨 IL-10 区域动脉灌注(LAI)对急性胰腺炎(AP)大鼠肺损伤的保护作用。笔者以 5% 牛磺胆酸钠胰胆管注射(1 mL/kg)制成大鼠急性胰腺炎模型,IL-10(40 000 UI/kg) LAI,以生理盐水为对照,取大鼠肺组织、胰腺组织进行病理学比较。结果示,AP 组大鼠肺泡结构破坏,可见明显出血和白细胞浸润;胰腺细胞坏死,大片液化,粒细胞浸润。IL-10 治疗组大鼠肺出血和白细胞浸润较 AP 组明显改善;胰腺细胞坏死、液化,血管周围可见粒细胞浸润。两组动物肺和胰腺病理损害评分 AP 组显著高于 LAI 组($P < 0.05$)。提示 IL-10 LAI 能显著减轻 AP 动物的胰腺和肺组织损害,IL-10 有望成为 AP 综合治疗的药物之一。

关键词:胰腺炎/并发症;呼吸窘迫综合征/病理学;白细胞介素-10/药理学;动脉灌注

中图分类号:R392.12;R576 **文献标识码:**B

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是消化系统常见的急腹症之一,胰腺、肺组织炎性细胞因子瀑布样级联反应是 AP 并发急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)甚至死亡的重要因素^[1]。本研究采用白细胞介素 1(IL-10)区域动脉灌注(local arterial infusion, LAI)治疗大鼠急性胰腺炎,观察大鼠胰腺和肺组织的病理变化,探讨 IL-10 LAI 对 AP 肺损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物及分组

10~12 周龄的雄性 SD 大鼠 100 只,体重 200~250 g,清洁级,购自南方医科大学实验动物中心(2001A059)。随机分为 A 组(假手术组,10 只),B 组(AP 对照组,30 只),C 组(AP + IL-10 LAI 组,30 只)和 D 组(AP + 生理盐水 LAI,30 只)。

1.2 动物模型制作

1.2.1 急性胰腺炎模型的制作^[2-3] 大鼠术前

24h 禁食,不禁水,氯胺酮(25 mg/kg)腹腔注射麻醉,无菌条件下开腹,显露胰腺,确认胆胰管,用加工的皮试针头经肠壁浆肌层距胆胰管 0.3 cm 处潜行穿刺胆胰管,插入 0.7 cm,近肝门处用动脉夹暂行阻断肝总管,SP-80RS 微量注射泵(速度为 0.2 mL/min)注入 5% 牛磺胆酸钠(1 mL/kg, Sigma 公司),注射完毕后去动脉夹,指压穿刺点,检查无漏胆,5 min 后见胰腺组织充血、水肿、被膜下散在出血标志制模成功,关腹。B, C, D 组均按上法成模, A 组开腹后仅翻动胰十二指肠。

1.2.2 LAI 方法 大鼠成模后经右侧股动脉插管(PE50)至腹腔干稍下(开腹引导),灌注液经 SP-80RS 微量注射泵于 0.5 h 内注射完毕。C 组采用 IL-10 40 000 UI/kg(Peprotech)溶于 2 mL 生理盐水, D 组采用生理盐水 2 mL 作 LAI。

1.3 胰腺组织、肺组织病理学检查

对各组动物分别于术后 3, 6h 和 12h 放血处死,取肺和胰腺标本置于 4% 甲醛溶液浸泡,常规 HE 染色,在光镜下观察,并进行病理评分。

1.3.1 胰腺组织学评分^[4] (1)坏死评分:无坏死计 0 分,坏死面积 1%~10%计 1 分,坏死面积 11%~20%计 2 分,坏死面积 21%~30%计 3 分,坏死面积 > 31%计 4 分。(2)每个高倍视野内白

基金项目:广东省医学科研基金项目(A2000621)。

收稿日期:2006-06-14; **修订日期:**2006-08-01。

作者简介:付林,男,四川珙县人,广东省深圳市第二人民医院主任医师,主要从事胰腺外科临床和病理生理学方面的研究。

通讯作者:程书榜 电话:0755-81916988。

细胞计数评分: 0 ~ 1 个计 0 分, 2 ~ 10 个计 1 分, 11 ~ 20 个计 2 分, 21 ~ 30 个计 3 分, > 30 个或出现微脓肿计 4 分。

2 种积分累加计为胰腺组织学评分。

1.3.2 肺组织学评分^[5] (1) 水肿评分: 无水肿计 0 分, 轻度肺泡壁水肿计 1 分, 中度肺泡壁水肿计 2 分, 肺泡和间质广泛水肿计 3 分。(2) 炎性细胞浸染评分: 以肺泡组织中中性粒细胞 (PMN) 及肺间质单核细胞 (M) 浸润程度进行评分。无 PMN, M 浸润计 0 分, 间质少量 PMN, M 浸润计 1 分, 间质及部分肺泡腔内有较多的 PMN 及中等量 M 浸润计 2 分, 大部分肺泡和间质有 PMN 聚集成团, 显著的 M 浸润计 3 分。(3) 组织出血评分: 未见明显出血计 0 分, 间质及肺泡腔少量出血范围 $\leq 25\%$ 计 1 分, 毛细血管淤血, 出血范围 $25\% \sim 50\%$ 计 2 分, 肺泡腔出血范围 $> 50\% \sim 70\%$ 计 3 分。

3 种积分累加计为胰腺组织学评分。

1.4 统计学处理

资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本 t 检验, $P < 0.05$

为有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺组织病理学比较

A 组胰腺组织未见明显异常, B, C 和 D 组均见不同程度的胰腺组织液化坏死及炎性细胞浸润 (图 1-2)。A 组胰腺组织病理评分为 0.2 ± 0.1 , B, C 和 D 组各时间段胰腺评分较 A 组均有明显升高 ($P < 0.05$), B 组与 C 组及 C 组与 D 组病理评分比较有明显差异 ($P < 0.05$), B 组与 D 组差异无显著性 (附表)。

2.2 肺组织病理学比较

A 组肺组织未见明显异常, B, C, D 组均见不同程度的肺泡组织破坏和出血, 可见大量炎性浸润 (图 3-4)。A 组肺组织病理评分 0.3 ± 0.1 , B, C, D 组各时间段胰腺评分较 A 组均有明显升高 ($P < 0.05$), B 组与 C 组和 C 组与 D 组病理评分比较有明显差异 ($P < 0.05$), B 组与 D 组差异无显著性 (附表)。

附表 B, C, D 组大鼠术后 2, 6, 12h 胰腺组织和肺组织病理评分

| 组别 | 胰腺组织评分 | | | 肺组织 | | |
|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 术后 3h | 术后 6h | 术后 12h | 术后 3h | 术后 6h | 术后 12h |
| B | 2.0 ± 0.9 | 4.5 ± 1.0 | 6.8 ± 1.3 | 2.8 ± 0.3 | 5.2 ± 1.4 | 7.5 ± 1.8 |
| C | $0.9 \pm 0.4^\dagger$ | $3.3 \pm 1.1^\dagger$ | $5.1 \pm 1.1^\dagger$ | $1.3 \pm 0.3^\dagger$ | $3.7 \pm 0.9^\dagger$ | $5.6 \pm 1.4^\dagger$ |
| D | 2.1 ± 0.8 | 4.3 ± 0.9 | 6.3 ± 1.2 | 2.7 ± 0.4 | 4.8 ± 1.2 | 7.0 ± 1.6 |

注: † 与 B, D 组同时段比较, $P < 0.05$

图 1 B 组胰腺细胞坏死, 大片液化, 粒细胞浸润 ($\times 400$)

图 2 C 组胰腺细胞坏死、液化, 血管周围可见粒细胞浸润 ($\times 100$)

图 3 B 肺泡结构破坏, 可见明显出血和白细胞浸润 ($\times 100$)

图 4 C 组肺出血和白细胞浸润较 AP 组明显改善 ($\times 100$)

2.3 肺组织病理学比较

A 组肺组织未见明显异常, B, C, D 组均见不同程度的肺泡组织破坏和出血, 可见大量炎性浸润 (图 3-4)。A 组肺组织病理评分 0.3 ± 0.1 , B,

C, D 组各时间段胰腺评分较 A 组均有明显升高 ($P < 0.05$), B 组与 C 组和 C 组与 D 组病理评分比较有明显差异 ($P < 0.05$), B 组与 D 组差异无显著性 (附表)。

3 讨论

急性肺损伤是 AP 时胰外最常见的并发症,临床发生率高达 70%,相当一部分患者进展为 ARDS,是 AP 患者早期死亡的主要原因^[1]。目前肺损伤的发病机理尚未完全阐明。近来研究表明,AP 急性肺损伤的发生、发展与中性粒细胞、炎症介质等密切相关。Werner 等^[6]应用 ^{99m}Tc 标记的白细胞对 AP 中性粒细胞的分布进行了研究,发现 AP 时肺组织内的中性粒细胞明显增多。Bhatia 等^[7]应用抗中性粒细胞血清清除循环中的中性粒细胞,结果发现实验动物不仅胰腺炎的严重程度明显减轻,而且还预防肺损伤的发生,说明 AP 时活化的中性粒细胞在介导肺损伤中起关键作用。另外,Inoue 等^[8]发现,应用抗中性粒细胞多克隆抗体及 CD18 单抗均能阻断中性粒细胞的黏附功能,可阻断 ASP 肺损伤的发生,间接证明了中性粒细胞在急性肺损伤中的作用。中性粒细胞活化后可产生许多活性物质,如 NO、细胞因子和花生四稀酸等代谢产物,这些产物相互的网络作用产生一系列连锁反应和放大效应,即瀑布效应,导致全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能衰竭综合征(MODS)。

实验和临床研究表明,AP 炎症反应过程中也产生抗炎细胞因子(IL-10、TNF α 等),这些抗炎细胞因子能限制炎症反应^[9]。夏时海等^[10]通过观察 AP 患者 IL-10 动态变化的结果发现,IL-10 在 AP 早期明显升高,与正常人对比有显著差异,以后逐渐下降,第 15 天仍有显著差异,IL-10 的升高水平与患者的病情呈反比。Jean 等^[11]实验发现,IL-10 在减轻胰腺组织病理损伤的同时,能显著降低 IL-6 和 TNF- α 的水平,提示 IL-10 在改善 AP 炎症反应中起重要作用,IL-10 可以用来治疗 AP。Gloor 等^[12]在去除 IL-10 基因的 C57BL/6J 鼠 AP 模型中证实,鼠肺组织水肿、中性粒细胞浸润和肺组织髓过氧化物、超氧化物歧化酶均显著高于对照组。王单松等^[13]观察人 IL-10 基因治疗大鼠 SAP 时发现 IL-10 基因明显降低 AP 大鼠的血淀粉酶和胰腺组织学评分,胰腺、肝脏和肺组织 TNF 浓度明显下降。本研究采用 IL-10 LAI 治疗大鼠 AP,结果表明,IL-10 能减轻 AP 大鼠胰腺和肺组织的损伤,有利于预防 MODS 发生。

近年来,细胞因子在 AP 发病机制中的作用受到广泛关注 and 重视,并提出从源头阻断细胞因子级联放大恶性循环以提高 AP 的治愈率,但细胞因子的网络作用及其免疫机制的复杂性表明 IL-10 的治疗不能完全替代传统的 AP 治疗方案,IL-10 的临床治疗价值亦有待于进一步的研究探讨。

参考文献:

- [1] Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure [J]. Surg Clin North Am, 1995, 75(2):257-277.
- [2] 徐敏,王成友,程书榜,等. 尿激酶区域动脉灌注治疗重症急性胰腺炎的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003,10(9):616-618.
- [3] 詹勇强,王成友,张敏杰,等. C-反应蛋白及白细胞介素 6 早期预测急性胰腺炎合并感染的实验研究[J]. 中国普通外科杂志,2005,14(7):512-515.
- [4] Schmidt J, Lewandowski K, Warshaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. Int J Pancreatol, 1992,12(1):41-51.
- [5] 程石,何三光,张佳林. 肺巨噬细胞活化在急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用[J]. 中华外科杂志,2002,40(3):609-612.
- [6] Werner J, Dragotakes SC, Fernandez-delCastillo C, et al. Technetium-99m-labeled white blood cells: a new method to define the local and systemic role of leukocytes in acute experimental pancreatitis [J]. Ann Surg, 1998, 227(1):86-94.
- [7] Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, et al. The effects of neutrophil depletion on a completely noninvasive model of acute pancreatitis-associated lung injury [J]. Int J Pancreatol, 24(2):77-83.
- [8] Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, et al. Anti-neutrophil antibody attenuates the severity of acute lung injury in rats with experimental acute pancreatitis [J]. Arch Surg, 1995, 130(1):93-98.
- [9] Norman JG. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis [J]. Am J Surg, 1998, 175(1):76-83.
- [10] 夏时海,赵晓晏,郭萍. 急性胰腺炎促炎因子和抗炎因子的动态变化及其作用[J]. 临床消化病杂志, 2001, 13(2):51-53.
- [11] Jean L, Arnaud M, Anned D, et al. Interleukin-10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis [J]. Gastro, 1995,108(6):1917-1924.
- [12] Gloor B, Todd KE, Laoc JS, et al. Mechanism of increased lung injury after acute pancreatitis in IL-10 knockout mice [J]. J Surg Res, 1998, 80(1):110-116.
- [13] 王单松,勒大勇,吴肇汉,等. 人白细胞介素 10 基因治疗大鼠重症急性胰腺炎实验研究[J]. 中华医学杂志, 2002,82(12):844-846.