

文章编号:1005-6947(2007)10-0979-03

· 基础研究 ·

降钙素原和 C-反应蛋白预测和鉴别大鼠急性胰腺炎并感染的研究

梁浩晖, 詹勇强, 王成友, 张敏杰, 倪勇, 程书榜

(广东省深圳市第二人民医院 肝胆外科, 广东 深圳 518035)

摘要:目的 探讨血浆降钙素原(PCT)及C-反应蛋白(CRP)对早期预测急性胰腺炎并感染的价值。方法 80只SD大鼠随机分为(1)急性胰腺炎并感染组(I组, $n=20$);(2)急性胰腺炎对照组(C组, $n=40$),根据成模后腹腔有感染再分为C1和C2组;(3)假手术对照组(S组, $n=20$),采集成模前(0h)及成模后12,24h及48h时点血液和48h时点胰腺及肝脏组织,用ELISA法检测血浆CRP的浓度,Western Blot检测血浆和肝脏PCT水平结果 (1)B组大鼠腹腔均发生感染,C1组中16例腹腔发生感染,C2组20例未发生感染。(2)B组和C1组血浆CRP水平呈持续上升趋势,在成模后48h均显著高于C2组。(3)B组和C1组血浆及肝脏组织内于成模后48h均能检测到较高水平的PCT,且明显高于C2组及S组。结论 PCT对急性胰腺炎早期感染具有一定的预测作用;联合血浆CRP检测有助于鉴别胰腺炎是否合并感染。肝脏组织可能是PCT的一个重要合成部位。

[中国普通外科杂志,2007,16(10):979-981]

关键词: 胰腺炎/病理学; 感染/并发症; 降钙素原; C-反应蛋白; 疾病模型,动物; 大鼠

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

Procalcitonin and C-reactive protein in the prediction and differentiation of acute pancreatitis with infection in rats

LIANG Hao-hui, ZHAN Yong-qiang, WANG Cheng-you, ZHANG Min-jie, NI Yong, CHENG Shu-bang

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Second People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518035, China)

Abstract: Objective To study the early prediction of infection in acute pancreatitis in rats by plasma procalcitonin (PCT) and c-reactive (CRP) detection. **Methods** Eighty SD rats were randomly assigned into acute infected pancreatitis group (I, $n=20$), pancreatitis control group (C, $n=40$) and sham-operated group (S, $n=20$). Blood samples were collected pre- (0h) and post-operatively (12h, 24h and 48h). Plasma CRP was analyzed by ELISA. Plasma and liver PCT was detected by Western blot. **Results** (1). Ascitic infection occurred in all the group B rats and 16 of 40 rats of group C (analyzed as group C1), and did not occur in the other 20 of 40 rats of group C (analyzed as group C2) and group S. (2). The plasma CRP concentrations elevated gradually after the model setup in group B and C1, which were significantly higher at 48h than those in group C2 and group S. (3). PCT was detected in high levels in plasma and liver tissues in group B and C1 at 48h post-operatively, and they were significantly higher than those in group C2 and group S. **Conclusions** PCT can predict early infection of acute pancreatitis, and detection of PCT combined with plasma CRP may help in the differentiation of acute infected pancreatitis. The liver may be an important organ for synthesis of PCT.

[Chinese Journal of General Surgery,2007,16(10):979-981]

Key words: Pancreatitis/pathol; Infection/compl; Procalcitonin; C-reactive Protein; Disease Model,Animal; Rats

CLC number: R 657.51

Document code: A

基金项目:广东省深圳市科技计划项目(200405031)

收稿日期:2007-07-13; 修订日期:2007-08-13。

作者简介:梁浩晖,男,广东湛江人,深圳市第二人民医院副主任医师,主要从事胆胰外科实验和临床方面的研究。

通讯作者:王成友 E-mail:szgdwk@gmail.com

继发性胰腺感染是急性胰腺炎(AP)发生发展及转归中的一个重要环节。感染性胰腺坏死(IPN)是手术干预的绝对适应征,其预后差^[1]。然而,目前临床上并无有效的早期预测感染发生的指标。降钙素原(PCT)是近年来发现的对细菌感染有特异性的敏感指标。本研究建立大鼠AP模型,检测成模后早期血浆及肝脏组织PCT水平,并与C-反应蛋白(CRP)进行对比,探讨PCT在早期预测和鉴别AP发生感染中的价值。

1 材料和方法

1.1 动物分组及模型的建立

80只180~220g雄性SD大鼠(SPF级,由南方医科大学实验动物中心提供)随机分为急性胰腺炎并感染组(I组, $n=20$)、急性胰腺炎对照组(C组, $n=40$)及假手术对照组(S组, $n=20$)。术前6~8h禁食不禁水。

2%氯胺酮腹腔注射麻醉。开腹后,于十二指肠壁斜行穿刺至胰胆管,动脉夹夹闭肝总管及十二指肠乳头,经微泵注入3.5%脱氧胆酸钠(美国Sigma公司)0.3mL/5min,保留5min后松开动脉夹。当观察到胰腺组织明显水肿,被膜下见点状及片状出血灶时,则认为AP动物模型制作成功。

I组:成模后,胰腺被膜下注射 1×10^9 /mL的大肠杆菌0.1mL,关腹;术后每日分4次经背部皮下注射生理盐水15mL。

C组:成模后,胰腺被膜下注射无菌生理盐水0.1mL,关腹。根据术后腹腔有无感染分为C1组和C2组。术后处理同I组。

S组:按AP制模方法操作,但胰胆管穿刺后不注药,待10min后拔穿刺针关腹。关腹前仅S组腹腔内留置头孢哌酮钠/舒巴坦钠(新瑞普欣,丽珠制药)50mg/kg+奥硝唑(圣诺安,南京圣和药业)30mg/kg。术后处理方法同I组。

1.2 标本采集及检测

成模前(0h)及成模后12,24,48h时点采集抗凝眼底静脉血1mL,离心后取血浆^[2]。成模48h后处死动物,采集腹水及胰腺和肝脏组织标本。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 胰腺病理学 观察术后48h腹腔及胰腺的大体改变。另取胰腺组织,常规苏木素伊红(HE)染色。

1.3.2 细菌学检测 取腹水及胰腺组织行细菌培养及鉴定(Vitek-32全自动微生物鉴定系统)。

1.3.3 血清淀粉酶检测 采用碘比色法。

1.3.4 血浆CRP检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法(试剂盒购自美国R&D公司)。

1.3.5 血浆及肝脏PCT检测^[3] 采用Western blot法。取血浆或肝脏组织制匀浆,裂解后提取胞浆蛋白,重悬。SDS-PAGE凝胶电泳分离,转硝酸纤维素膜,杂交后DAB显色。羊抗大鼠降钙素

前体(sc-7786)、蛋白杂交盒(sc-2053)及DAB显色盒均购自美国Santa Cruz公司。

1.4 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。动物存活率比较用 χ^2 (Person Chi-Square)检验;组间及组内CRP浓度比较采用方差分析(One Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。统计学处理使用SPSS 10.0软件完成。

2 结果

2.1 动物大体观察

S组死亡大鼠腹腔内少量积液,肠腔高度膨胀,胰腺未见异常。I组大鼠呈典型急性坏死性胰腺炎改变,可见网膜、肠系膜及肠管壁有明显的皂化斑,胰腺有不同程度的肿胀及液化坏死,大网膜包裹液化坏死的胰腺组织。镜下见胰腺间质及小叶大量炎症细胞浸润、出血及大片坏死,坏死灶内及周围胰腺小叶结构消失。I组术后48h腹水细菌学检验均呈阳性。C1组大鼠16例腹水细菌培养阳性,即发生胰腺炎自发感染组;C2组中20例细菌培养阴性,即未发现胰腺炎合并感染组。C1组与C2组病理改变与B组类似,亦呈典型急性坏死性胰腺炎改变,3组间胰腺病理改变未见明显差异。

S组胰腺组织未见明显异常。解剖见I组、C1组和C2组胰腺广泛坏死,腹腔内有中大量积液,且I组和C1组积液呈稀薄腥臭脓液。

2.2 实验动物存活情况

术后于24h内共死亡动物9只,I组死亡4只,C1组3只,C2组和S组各1只。4组间病死率差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 血淀粉测定

I组成模后48h血淀粉酶为 $(11\ 986 \pm 2280)$ U/L,C1组为 $(10\ 244 \pm 1\ 900)$ U/L,C2组为 $(12\ 220 \pm 1\ 500)$ U/L,3组间差异无显著性,但均显著高于S组的 (193 ± 287) U/L($F = 207.039$, $P = 0.000$)。

2.4 各组间血浆CRP浓度的比较

成模后I,C1及C2组各时点血浆CRP浓度均显著高于S组(表1),其升高趋势以12h及24h最为明显,但I组及C1组在48h时仍呈明显升高趋势,而C2组在24h和48h已显著低于I组及C1组($P < 0.01 \sim 0.05$)。S组在12h即显著升高,此后则无继续升高趋势(表1)(图1)。

表1 各组血浆CRP(ng/mL)浓度比较

组别	n	0h	12h	24h	48h
B	16	13.7±6.3	114.2±14.4 ^{(1),(2),(4),(6)}	157.1±34.7 ^{(1),(2),(5)}	176.4±42.2 ^{(1),(3)}
C1	16	12.7±6.9	72.2±17.2 ^{(1),(6)}	132.4±33.2 ^{(1),(5)}	186.6±25.1 ^{(1),(3),(5)}
C2	20	14.2±7.1	86.1±11.9 ^{(1),(6)}	102.1±14.7 ^{(1),(5)}	122.4±24.2 ⁽¹⁾
S	19	16.2±6.8	33.5±11.1 ⁽⁶⁾	35.0±12.0	32.0±10.0

注:1)与S组比较, $P < 0.01$;与C2组比较,2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$;4)与C1组比较, $P < 0.01$;组内各指标与前一时点比较,5) $P < 0.05$,6) $P < 0.01$

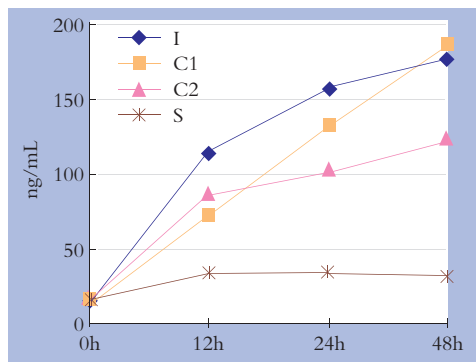


图1 血浆CRP浓度的动态变化

2.5 48 h 时血浆及肝脏组织 PCT 检测

I 组和 C1 组血浆及肝脏组织内均能检测到较高水平的 PCT, 而 C2 组及 S 组仅能检测出微量的 PCT (图 2)。

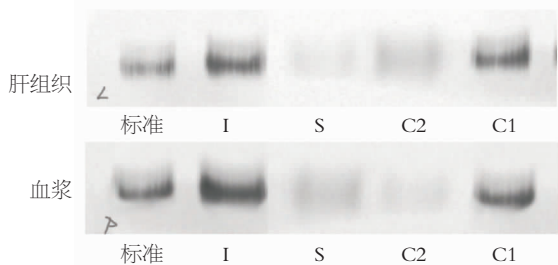


图2 48 h 时肝组织及血浆 PCT Western Blot (免疫印迹) 结果 (标准品的浓度为 1 ng/mL)

3 讨论

关于 AP 并感染的临床诊断主要依靠临床表现, 确诊则需要穿刺细菌学证据。目前尚缺乏无创性的特异性检查方法^[4-5]。CRP 是一种广泛出现在感染性和创伤性炎症中的急性期蛋白。有报道, 重症 AP 时, CRP > 150 mg/L^[6]。鉴于此, 笔者检测了细菌感染性和非感染性胰腺炎大鼠血浆 CRP 水平。结果表明, 成模后 24 h 内 B 组、C1 组和 C2 组均呈显著升高; 但 48 h 时胰腺炎合并感染者 (I 组和 C1 组) 血浆 CRP 水平显著高于非感染者 (C2 组)。假手术组大鼠 CRP 仅在 12 h 时点明显升高, 以后则处于平稳水平。急性胰腺炎并感染大鼠血液 CRP 持续升高的趋势, 可能与继发性感染的“二重打击”所致炎性介质及细胞分子的升高相一致^[7-9]。这表明, CRP 可能对早期预测 AP 并感染的发生有一定的提示作用。

PCT 是近年来发现的一个新的蛋白分子, 可能是降钙素的前体, 其来源目前尚未明确。创伤及感染早期即在血液循环中可检出 PCT。若将其归类于炎性介质抑或急性期蛋白, 目前尚存争议^[10-11]。有研究^[12-13]认为, CRP 及 PCT 是诊断早期细菌感染较为敏感的指标, 甚至可以鉴别感染性炎性介质释放和非感染性 SIRS, 以及鉴别细菌

感染性炎症和病毒性炎症。笔者对成模后 48 h 时点血浆 PCT 的检测表明, AP 大鼠并发感染时 (I 组, C1 组) 血液 PCT 水平显著高于非感染性 AP 组 (C2 组) 和 S 组大鼠, 这种差异与 CRP 一致。表明 PCT 也可能早期预测和鉴别胰腺炎是否并存感染。

在生理情况下, PCT 是由甲状腺 C 细胞产生, 含量极微, 几乎测不到^[9]。在严重细菌感染时血浆 PCT 水平则明显升高, 即使甲状腺切除的患者也如此, 因此, 重症感染时降钙素原主要由甲状腺外组织产生^[10-11, 14]。然而其具体部位并未明确, 有报道肺、肝及神经内分泌细胞可能是病理性 PCT 产生的部位, 但无定论^[10-11, 14]。本研究中, AP 合并感染 (I 组, C1 组) 时, 血浆 PCT 水平显著升高, 且在肝脏组织检测到与血液水平相一致的 PCT 表达。因此, 在 AP 合并感染时, 肝脏可能血液 PCT 的来源之一。据此, 笔者认为, CRP 及 PCT 对 AP 早期感染具有一定的预测价值, 联合两者有助于鉴别胰腺炎是否合并感染。肝脏组织可能是 PCT 的一个合成部位。

参考文献:

- [1] Uhl W, Warshaw A, Imrie C, *et al.* IAP guidelines for the surgical management of acute pancreatitis [J]. *Pancreatology*, 2002, 2 (6): 565 - 573.
- [2] 汪谦. 现代医学实验方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 1052 - 1056.
- [3] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 金冬雁, 等译. 北京: 科学出版社, 1999. 874 - 894.
- [4] Raraty MG, Connor S, Criddle DN, *et al.* Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2004, 6 (2): 99 - 103.
- [5] 中华医学会外科学会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊治草案 [C]. 全国第八届胰腺外科学术研讨会. 杭州. 2000.
- [6] UK Working Party on Acute Pancreatitis. UK guidelines for the management of acute pancreatitis [J]. *Gut*, 2005, 54 (Sup III): iii1 - iii9.
- [7] Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2002, 9 (4): 401 - 410.
- [8] Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, *et al.* Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis [J]. *Surgery*, 2003, 133 (3): 257 - 262.
- [9] 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.
- [10] Maruna P, Nedelnikova K, Gurlich R. Physiology and genetics of procalcitonin [J]. *Physiol Res*, 2000, 49 (Suppl 1): S57 - 61.
- [11] Schroder J, Staubach KH, Zabel P, *et al.* Procalcitonin as a marker of severity in septic shock [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 1999, 384 (1): 33 - 38.
- [12] Toikka P, Irjala K, Juven T, *et al.* Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2000, 19 (7): 598 - 602.
- [13] Laborada G, Rego M, Jain A, *et al.* Diagnostic value of cytokines and C-reactive protein in the first 24 hours of neonatal sepsis [J]. *Am J Perinatol*, 2003, 20 (8): 491 - 501.
- [14] Nylen Es, Snider RH Jr, Thompson KA, *et al.* Pneumonitis associated hyperprocalcitoninemia [J]. *Am J Med Sci*, 1996, 321 (1): 12 - 17.