

文章编号:1005-6947(2008)09-0857-04

· 胰腺炎专题研究 ·

灯盏花素对急性出血坏死性胰腺炎大鼠脑组织的保护作用

王勇飞, 霍亮, 吴阳, 赵永福, 张水军

(郑州大学第一附属医院 普通外科, 河南 郑州 450052)

摘要:目的 探讨灯盏花素对急性出血坏死性胰腺炎大鼠脑组织保护作用的可能机制,为胰性脑病的临床治疗和预防提供新思路。**方法** 将90只雄性SD大鼠随机分为3组,即正常对照组(C组),急性出血坏死性胰腺炎组(AHNP组)和灯盏花素治疗组(T组),每组30只。采用胰胆管逆行穿刺注射5%牛磺胆酸钠建立大鼠AHNP模型。分别在建模后的第6,12,24 h处死动物并取出脑组织标本。采用免疫组化染色法检测脑组织中PKC- α 和NF- κ B的活性,用RT-PCR检测脑组织中PKC- α mRNA的表达,用放射免疫法检测血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的水平,并检测脑组织含水量。**结果** 大鼠脑组织PKC- α 和NF- κ B的蛋白活性、PKC- α mRNA的表达、血清中TNF- α 水平及脑组织含水量,T组均较AHNP组显著降低($P < 0.05$)。**结论** 灯盏花素可以抑制PKC- α 活性,减少炎性介质的产生,减轻AHNP大鼠脑组织的损伤程度。 [中国普通外科杂志,2008,17(9):857-860]

关键词: 胰腺炎,急性坏死性;灯盏花素;胰性脑病;蛋白激酶C;NF- κ B

中图分类号:R 657.5

文献标识码:A

The protective effect of breviscapine on brain tissues in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis

WANG Yongfei, HUO Liang, WU Yang, ZHAO Yongfu, ZHANG Shuijun

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: Objective To explore the possible mechanism of the protective effect of breviscapine on brain tissue in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, and to provide theoretical basis for the clinical treatment and prevention of pancreatic encephalopathy. **Methods** A total of 90 male SD rats were randomly divided into three groups with 30 rats for each group: normal control group (C group), acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis group (AHNP group) and AHNP treated with breviscapine group (T group). The acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis model in rats was induced by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the pancreatobiliary duct. The brain samples were obtained in each group after the rats were killed at 6, 12 and 24 hours respectively after operation. The activity of NF- κ B and PKC- α in brain tissue was detected with immunohistochemistry and the expression of PKC- α mRNA in brain tissue was detected with RT-PCR. The level of serum TNF- α was measured by radioimmunoassay (RIA) and the changes of brain water content were measured. **Results** In T group, the activity of PKC- α and NF- κ B, the expression of PKC- α mRNA in rat brain tissue, the serum TNF- α level and the changes of brain water contents were decreased significantly compared to the AHNP group ($P < 0.05$). **Conclusions** Breviscapine can reduce inflammatory mediators by suppressing the activity of PKC- α , and then alleviate the acute pancreatitis-associated brain injury. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9):857-860]

收稿日期:2008-02-19; 修订日期:2008-07-22。

作者简介:王勇飞,男,郑州大学第一附属医院硕士研究生,主要从事肝胆胰和器官移植的基础与临床方面的研究。

通讯作者:张水军 E-mail:zhangshuijun@zzu.edu.cn

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; Breviscapine; Pancreatic Encephalopathy; Protein Kinase C;

NF- κ B

CLC number: R 657.5

Document code: A

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是临床上常见的急腹症之一, 常并发全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能障碍综合征 (MODS), 病死率高达 20% ~ 30%^[1]。胰性脑病 (pancreatic encephalopathy, PE), 指 SAP 过程中并发的中枢神经系统损害, 是胰腺炎的严重并发症, 国内 PE 病死率 52.6%, 主要死于休克, 多系统器官衰竭 (MSOF), 肾功能衰竭, 酮性酸中毒等^[2]。近年来, 炎症介质在 SAP 和 PE 发病过程中的作用日益受到人们的重视。灯盏花素 (breviscapine, BRE) 是从灯盏花中提取的灯盏甲素、乙素混合物, 它可通过抑制蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 的活性, 下调 PKC 通道的功能状态, 减少炎症介质的产生而发挥作用^[3]。本研究拟从 PKC 信号传导途径的角度探讨 PE 的可能机制, 并观察 BRE 对急性出血坏死性胰腺炎 (AHNP) 大鼠脑组织的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

雄性 SD 大鼠 90 只, 体重 250 ~ 300 g, 购自河南省实验动物中心; 兔 PKC- α 多克隆抗体和兔 NF- κ B P65 多克隆抗体, PV-6001 二步法免疫组化化学检测试剂盒及 SABC 染色试剂盒均购自北京中杉金桥公司; PrimeScript 一步法逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 碘 [¹²⁵I]-肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 放射免疫分析试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型的建立 参照文献^[4]的方法并略加改进。SD 大鼠术前禁食 12 h, 自由饮水。10% 水合氯醛 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定于手术台, 腹部备皮消毒。上腹正中 2 cm 切口进腹, 提起十二指肠, 显露胆胰管, 肝门部无创血管夹阻断胆管。1 mL 注射器经十二指肠前侧壁, 潜行穿刺进入胆胰管约 0.5 cm, 夹闭胆胰管出口, 以 0.2 mL/min 的速度匀速注射 5% 牛磺胆酸钠 (Sigma 公司) 1 mL/kg, 压力约 20 cm H₂O; 拔针后棉签压迫穿刺点 2 min, 以免药液逆流。注射后观察 5 min, 确认大鼠脾胃之间胰腺组织呈暗红色后去掉肝门部血管夹。查腹腔无活动性出血后逐层关腹。

1.2.2 动物分组与样本收集 按随机数字表法将 90 只大鼠分为 3 组, 即正常对照组 (C 组), 急性出血坏死性胰腺炎组 (AHNP 组) 和 AHNP 灯盏花素治疗组 (T 组)。每组 30 只。治疗组 (T 组) 在制成 SAP 模型之后立即经阴茎背静脉注射 BRE 注射液 (云南生物谷灯盏花药业有限公司) (10 mg/kg); C 组的手术操作同上, 但将牛磺胆酸钠改为生理盐水。且 C 组和 AHNP 组在制模后立即经阴茎背静脉注射生理盐水 2.5 mL。各组于术后 6, 12, 24 h 3 个时点各处死 10 只大鼠, 开颅取出脑组织。一部分脑组织放入 4% 的多聚甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色观察其形态学改变, 同时行免疫组化检测。另取部分脑组织置冻存管并立即投入液氮中保存, 以 RT-PCR 法检测 PKC- α mRNA 的表达情况。同时开腹自下腔静脉取血约 3 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 留置血清于 -30℃ 冰箱保存。

1.3 检测指标与方法

1.3.1 血清 TNF- α 的含量 用放射免疫法检测血清中 TNF- α 的含量, 操作按说明书进行。

1.3.2 PKC- α 和 NF- κ B 的表达 用免疫组化染色 (PV 二步法), 操作步骤按试剂的产品说明书进行: 脱蜡、水化组织切片, PBS 缓冲液洗涤 5 min \times 3 次, 抗原修复液中 95℃ 20 min, 3% H₂O₂ 去离子水 37℃ 孵育 10 min, 滴加一抗 4℃ 冰箱过夜, 二抗 37℃ 孵育 30 min。每步骤后均用 PBS 缓冲液洗涤 5 min \times 3 次, DAB 显色, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片。一抗工作浓度 1:100。PBS 代替一抗为空白对照。PKC- α 的阳性细胞为胞质和胞膜染色, NF- κ B 的阳性细胞为胞核染色, 着色呈棕黄色。用 Biosens 数字图像分析系统进行图像分析。随机取 5 个视野, 测出阳性区的平均光密度和阳性细胞的百分数。

1.3.3 脑组织中 PKC- α mRNA 的表达 采用文献^[5]中的 Trizol (Promega 公司) 一步法提取脑组织中的总 RNA。将提取出的总 RNA 行 RNA 电泳观察 18 s 和 28 s 条带, 分光光度计检测 260/280 吸光度比值, 计算 RNA 浓度。用 PrimeScript 一步法 RT-PCR 试剂盒反转录 RNA 并扩增。PKC- α 的上游引物序列为 5-CGACTGTCTGTAGAAATCTGG-3, 下游引物为 5-CACCATGGTGCCTCCACGTC-3, 扩增产物片段为 443 bp。内参 β -actin 上游引物为 5-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3, 下游引物为 5-

CCCATACCC ACCATCACACC-3; 扩增产物片段为 207 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。50 °C 反转录 30 min, 94 °C RTase 失活 2 min, 94 °C 变性 30 s, PKC-α 引物 55.8 °C 退火 30 s, β-actin 引物 54.5 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 共 30 个循环。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 用凝胶分析系统测定各扩增带的 A 值, 并将 PKC-α 电泳条带的 A 值和内参 β-actin 条带 A 值的比值, 作为 PKC-α mRNA 相对表达量。

1.3.4 病理组织学检查 脑组织 HE 染色, 光镜下观察其形态学改变。

1.3.5 脑组织含水量的测定 用干重、湿重法测定。取脑皮层 1 块, 约 5 mm × 5 mm × 5 mm 大小, 电子天平称湿重后, 置于真空恒温干燥箱, 100 °C 烘烤 24 h 称干重, 并计算脑组织含水量。脑组织含水量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.4 统计学处理

用 SPSS13.0 对实验数据进行分析。数值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方差分析和 t 检验进行显著性检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中 TNF-α 的变化

C 组各时点 TNF-α 的含量无明显变化。T 组和 AHNP 组同一时点较 C 组均明显升高。T 组同一时点较 AHNP 组明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 3 各组脑组织 PKC-α mRNA 表达的相对光密度值和 PKC-α 蛋白阳性表达的平均积分光密度的比较

组别	n	6 h		12 h		24 h	
		PKC-α mRNA	PKC 蛋白	PKC-α mRNA	PKC 蛋白	PKC-α mRNA	PKC 蛋白
C 组	30	1.2178 ± 0.0141	94.3121 ± 1.1091	1.2108 ± 0.01405	94.4153 ± 1.1423	1.2013 ± 0.0112	92.1843 ± 1.2305
AHNP 组	30	1.4573 ± 0.0094 ¹⁾	108.0790 ± 1.3306 ¹⁾	1.4749 ± 0.0093 ¹⁾	111.6320 ± 2.1432 ¹⁾	1.4519 ± 0.0124 ¹⁾	110.7512 ± 1.5016 ¹⁾
T 组	30	1.3282 ± 0.007 ^{1),2)}	105.4320 ± 2.0517 ^{1),2)}	1.3823 ± 0.0084 ^{1),2)}	107.9130 ± 1.5206 ^{1),2)}	1.3657 ± 0.0111 ^{1),2)}	106.3521 ± 1.7826 ^{1),2)}

注:1)与 C 组比较, $P < 0.05$; 2)与 AHNP 组比较, $P < 0.05$

2.4 脑组织的病理变化

光镜下 C 组各时点脑组织未见异常, AHNP 组可见多灶性毛细血管出血, 血管周围水肿, 有巨噬细胞反应, 并有多量炎性细胞浸润及弥漫性脱髓鞘化的现象, 以 24 h 为明显。T 组各时点较 AHNP 组相比有所减轻。

2.5 脑组织含水量的变化

C 组各时点脑组织含水量无明显变化, T 组和 AHNP 组同一时间点较 C 组明显升高, T 组同一时点较 AHNP 组明显降低, 差异均有统计学意

2.2 脑组织中 NF-κB 的表达

C 组各时间点脑组织中只有少量细胞的 NF-κB 活化, T 组和 AHNP 组同一时间点较 C 组均明显升高。T 组同一时点较 AHNP 组明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1 各组血清 TNF-α 水平的比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	12 h	24 h
C 组	30	0.6060 ± 0.0222	0.6220 ± 0.0204	0.6124 ± 0.0187
AHNP 组	30	1.6580 ± 0.0123 ¹⁾	1.7530 ± 0.0149 ¹⁾	1.7152 ± 0.0137 ¹⁾
T 组	30	0.8480 ± 0.0193 ^{1),2)}	0.8956 ± 0.0251 ^{1),2)}	0.8517 ± 0.0236 ^{1),2)}

注:1)与 C 组比较, $P < 0.05$; 2)与 AHNP 组比较, $P < 0.05$

表 2 脑组织中 NF-κB 阳性表达细胞的百分数 (%) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	6 h	12 h	24 h
C 组	30	15.5300 ± 1.6773	16.2710 ± 1.3216	17.3027 ± 1.5980
AHNP 组	30	74.0350 ± 2.2562 ¹⁾	85.2560 ± 2.0357 ¹⁾	79.6327 ± 2.1643 ¹⁾
T 组	30	44.9760 ± 2.2227 ^{1),2)}	54.9385 ± 2.1878 ^{1),2)}	51.3891 ± 2.2846 ^{1),2)}

注:1)与 C 组比较, $P < 0.05$; 2)与 AHNP 组比较, $P < 0.05$

2.3 脑组织中 PKC-α 的表达

C 组各时点脑组织中 PKC-α 蛋白和 PKC-α mRNA 的表达较低, T 组和 AHNP 组同一时点较 C 组明显升高。T 组同一时点较 S 组明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 4 脑组织含水量的测定结果 (%)

组别	n	6 h	12 h	24 h
C 组	30	77.62 ± 0.79	78.61 ± 0.62	78.21 ± 1.04
AHNP 组	30	83.38 ± 1.71 ¹⁾	84.81 ± 1.58 ¹⁾	85.94 ± 1.55 ¹⁾
T 组	30	80.98 ± 1.55 ^{1),2)}	82.21 ± 1.38 ^{1),2)}	83.01 ± 1.74 ^{1),2)}

注:1)与 C 组比较, $P < 0.05$; 2)与 AHNP 组比较, $P < 0.05$

义 ($P < 0.05$) (表 4)。

3 讨论

胰性脑病 (pancreatic encephalopathy, PE) 是胰腺炎的严重并发症, 主要表现为精神症状、脑膜刺激征、脑脊髓病综合征等^[6]。其发病机制目前尚未完全阐明。近年来研究发现, 白细胞过度激活、细胞因子过度释放与 PE 的发病机制密切相关^[7]。在重症急性胰腺炎的发病过程中引起单核/巨噬细胞激活, 这类细胞激活后释放出各种细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及白细胞介素 1 (IL-1) 等, 可引起全身的炎症反应; 同时进一步引起粒细胞及内皮细胞的过度激活, 大量释放损伤性炎症介质, 促使血脑屏障通透性增加, 从而破坏血脑屏障^[8]。有学者^[9] 研究发现, 血清 TNF- α 和 IL-6 水平在 PE 患者大脑中的不同区域均显著增高。Valen 等^[10] 的研究也发现 TNF- α 在 PE 动物模型的脑脊液中显著升高。这些炎症细胞因子的增高进一步促进了 SAP 时脑组织损害的发生和发展。

本实验结果显示, 未给予任何处理的 AHNP 组, 脑组织含水量及血清 TNF- α 含量均较 C 组各时点显著升高, 且脑组织的损伤程度随时间的延长逐渐加重, 与 TNF- α 的升高程度平行。提示炎症介质在 PE 的发生发展中起重要作用。

细菌、毒素及炎症介质对炎症反应的激活主要是通过细胞内多条信号转导通路而实现的, 其中 PKC-NF- κ B 通路在炎症细胞因子的表达调控中起重要作用。该通路可以启动和调节多种细胞因子和炎症介质的基因转录, 进而启动一系列炎症反应过程, 最终导致器官功能损害。本实验发现, 在未给予任何处理的 AHNP 组, 各时点大鼠脑组织中 PKC- α 和 NF- κ B 的表达、脑组织含水量及血清中 TNF- α 含量均较 C 组显著升高, 光镜下脑组织均有不同程度的病理损害, 且随时间而逐渐加重, 以 24h 最重。以上结果表明, 该通路在早期即参与了 AHNP 脑组织的损害过程, 并起重要作用。因此早期干预该信号转导通路的激活, 有可能在早期便可遏制过度炎症反应, 防止器官功能的损害。

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 可直接激活其催化底物核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B); 活化后的 NF- κ B 可发生核易位, 于靶基因启动子或增强子上的 κ B 结合位点结合, 从而启动或增强这些基因的转录^[11]。由于 TNF- α 等多种炎症细胞因子的启动子上存在着 NF- κ B 的结合位点, 因而导致 TNF- α 等炎症细胞因子的大量

产生, 促进了 PE 的发生和发展。

灯盏花素目前被认为是 PKC 的有效抑制剂^[12], 它可通过抑制 PKC-NF- κ B 通路的信号传导而发挥多种生理作用。在给予灯盏花素后, T 组大鼠脑组织中 PKC- α 和 NF- κ B 的表达、脑组织含水量及血清 TNF- α 含量较 AHNP 组同一时点显著下降, 且脑组织的病理损害程度均有所减轻。这表明灯盏花素明显地减轻了脑组织的损伤程度。这可能是灯盏花素抑制了 PKC 的活性, 干预了该信号转导通路的激活, 从而抑制了其催化底物 NF- κ B 的活化, 减少了炎症细胞因子的产生, 减轻了脑组织的损伤程度。此结论为临床治疗 PE 提供了一种新的可能有效的方法; 即应用可抑制 PKC 活性的药物, 达到治疗 PE 的目的。但该通路在 PE 中的作用机制及灯盏花素在其他方面的作用还待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chiang DT, Anozie A, Fleming WR, *et al.* Comparative study on acute pancreatitis management [J]. ANZ J Surg, 2004, 74(5): 218 - 221.
- [2] 卢崇亮. 胰性脑病的研究现状 [J]. 中国普外科杂志, 2001, 10(4): 362 - 365.
- [3] 孟婕. 蛋白激酶 C 与肺泡巨噬细胞的功能调节 [J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2001, 21(3): 185 - 189.
- [4] Bocknum DE, Cuo J, Buehler P, *et al.* Origin and development of the precursor in experimental pancreatic cancer in rats [J]. Lab Invest, 2003, 83(6): 853 - 859.
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 581 - 585.
- [6] 张鸿彦, 夏庆. 胰性脑病的临床特点分析 [J]. 中国综合临床, 2005, 21(12): 1108 - 1109.
- [7] 杨雁灵, 徐小平, 窦科峰, 等. 肿瘤坏死因子抗体对大鼠胰性脑病保护作用的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(12): 45 - 48.
- [8] 万赤丹, 熊炯斯, 刘涛, 等. 重症胰腺炎并发胰性脑病的临床分析 [J]. 腹部外科, 2004, 17: 157 - 159.
- [9] 李军成, 田斌, 陈易人, 等. 大鼠急性胰腺炎急性期脑脊液肿瘤坏死因子- α 和脑组织 CD44 表达 [J]. 中华消化杂志, 2004, 24: 373 - 374.
- [10] Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(2): 307 - 314.
- [11] Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, *et al.* Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. J Neuroimmunol, 2003, 136(1-2): 125 - 129.
- [12] 吴阳, 张弓, 李震, 等. 灯盏花素对脑死亡巴马小型猪肺脏形态变化与 PKC- α mRNA 及其蛋白表达的影响 [J]. 复旦学报·医学版, 2006, 33(4): 530 - 534.