



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.015  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3958.shtml

· 基础研究 ·

# 温盐水腹腔灌洗减轻大鼠急性坏死性胰腺炎及机制

刘安文, 程书榜, 郭庆云, 郑凯, 文剑锋

(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:** 探讨温盐水腹腔灌洗对大鼠急性坏死性胰腺炎 (ANP) 的影响及机制。

**方法:** 75 只 SD 大鼠随机分为假手术组、ANP 模型组 (模型组)、温盐水腹腔灌洗预处理 +ANP 模型组 (预处理组), 术后 6 h 处死大鼠, 检测各组大鼠血清血清淀粉酶与细胞因子含量, PCR 法检测胰腺组织 HSP70、p38MAPK 的 mRNA 表达, 免疫组化法检测胰腺中 NF- $\kappa$ B 的表达。

**结果:** 与假手术组比较, 模型组与预处理组大鼠血清淀粉酶、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平均明显升高, 但预处理组各指标的升高程度明显低于模型组, 模型组与预处理组胰腺组织 HSP70、p38MAPK 的 mRNA 表达均明显升高, 但预处理组 HSP70 mRNA 表达量高于模型组, p38MAPK mRNA 表达量低于模型组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。假手术组大鼠胰腺组织 NF- $\kappa$ B 呈弱阳性表达, 模型组呈强阳性表达, 而预处理组呈中等阳性表达。

**结论:** 温盐水腹腔灌洗可能通过诱导 HSP70 表达而抑制 p38MAPK 及 NF- $\kappa$ B 活性、下调细胞因子的表达, 进而改善大鼠 ANP 病理生理过程。 [中国普通外科杂志, 2014, 23(7):941-945]

## 关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 腹腔灌洗; HSP70 热休克蛋白质类; 大鼠

中图分类号: R657.5

## Warm saline peritoneal lavage to lessen the process of acute necrotizing pancreatitis in rats and its mechanism

LIU Anwen, CHENG Shubang, GUO Qingyun, ZHENG Kai, WEN Jianfeng

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

Corresponding author: CHENG Shubang, Email: 51699866@qq.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate the effect of warm saline peritoneal lavage on acute necrotizing pancreatitis (ANP) in rats and its mechanism.

**Methods:** Seventy-five SD rats were equally randomized into sham operation group, ANP model group (model group), and warm saline peritoneal lavage pretreatment plus ANP model group (pretreatment group). Rats were sacrificed at 6 h after surgery, and then serum concentration of amylase and cytokines were measured, the HSP70 and p38MAPK mRNA expressions in the pancreatic tissues were determined by RT-PCR, and the NF- $\kappa$ B expression in the pancreatic tissues was examined by immunohistochemical staining, respectively.

**Results:** Compared with sham operation group, the serum levels of amylase, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-8 were markedly increased in both model group and pretreatment group, but the increasing degrees of all the above parameters in

基金项目: 广东省科技局资助项目 (2011B031800355)。

收稿日期: 2014-04-30; 修订日期: 2014-06-03。

作者简介: 刘安文, 广东省深圳市第二人民医院主治医师, 主要从事消化道肿瘤、胆道、胰腺疾病方面的研究。

通信作者: 程书榜, Email: 51699866@qq.com

pretreatment group were less than those in model group; the HSP70 and p38MAPK mRNA expressions in both model group and pretreatment group were remarkably increased, but the HSP70 mRNA expression level was higher while the p38MAPK mRNA expression level was lower in pretreatment group than that in model group, and all the above differences had statistical significance (all  $P < 0.05$ ). The pancreatic NF- $\kappa$ B showed weak-positive expression in sham operation group, strong-positive expression in model group, and moderate-positive expression in pretreatment group.

**Conclusion:** Warm saline peritoneal lavage can improve the pathophysiological process of ANP, and the mechanism may be attributed to its inducing HSP70 expression which may inhibit the p38MAPK and NF- $\kappa$ B activities and reduce the expression of inflammatory cytokines.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(7):941-945]

**KEYWORDS** Pancreatitis, Acute Necrotizing; Peritoneal Lavage; HSP70 Heat-Shock Proteins; Rats

**CLC number:** R657.5

有关急性重症胰腺炎的早期手术治疗和腹腔镜下温盐水腹腔灌洗术有大量报道, 临床观察取得良好疗效<sup>[1-2]</sup>。但具体机制不明确。笔者前期的研究<sup>[3-4]</sup>表明, 热休克蛋白 70 (HSP70) 通过调节炎症因子如 IL-8, TNF- $\alpha$  减轻急性坏死性胰腺炎 (ANP) 的局部和全身炎症反应, 为了进一步探索其机制, 本研究采用荧光定量 PCR 法和免疫组化法检测了 SD 大鼠 ANP 胰腺组织 HSP70、丝裂原活化蛋白激酶 p38 (p38MAPK) 的表达和 NF- $\kappa$ B 的表达, 探讨温盐水腹腔灌洗减轻大鼠急性坏死性胰腺炎的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

SD 大鼠 75 只, 体质量 200~250 g, 雌雄不限, 购自广东省医学实验动物中心 [SCXK (粤) 2008-0002]; 牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司, 免疫组化试剂盒购自迈新公司, IL-6、TNF- $\alpha$  elisa 试剂盒购自 dakewe 公司, IL-8 ELISA 试剂盒, 购自 Biotech 公司, p38MAPK 抑制剂 (SB202190) 购自上海蓝木化工有限公司。

### 1.2 动物分组

将大鼠随机均分为: (1) 假手术组, 大鼠麻醉后, 在无菌条件下于上腹部正中切小口后, 提出十二指肠, 找到胆胰管, 并用动脉夹夹闭胆胰管 5 min 后, 移除动脉夹, 摆好肠管后关腹; (2) 模型组, 大鼠行胆胰管注射牛磺胆酸钠法制作 ANP 模

型; (3) 预处理组, 温生理盐水腹腔灌洗预处理后制作 ANP 模型。

### 1.3 生理盐水腹腔灌洗预处理

水合氯醛 (3 g/kg) 腹腔注射麻醉后, 在无菌条件下, 于上腹正中切小口, 置输液皮条于腹腔为输入管, 下腹正中切小口, 置输液皮条于腹腔为输出管, 快速输入温生理盐水 (输入管末端水温保持 42~43 °C, 2 000 mL/h), 控制输出管使大鼠腹部稍隆, 持续 30 min, 关腹, 术后 8 h 制作 ANP 模型。

### 1.4 ANP 模型制作<sup>[3-5]</sup>

术前禁食 24 h, 不禁水。水合氯醛腹腔注射麻醉, 麻醉后, 消毒, 铺巾, 上腹正中切口, 无菌条件下开腹, 提起胃十二指肠, 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 (光照可见 1 小白点, 即为穿刺点) 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, 注入 5% 牛磺胆酸钠 (0.001 mL/g), 速度为 0.2 mL/min, 注入压力约 30 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 指压穿刺点 2 min, 并去除动脉夹, 检查无漏胆, 15 min 后可见胰腺组织充血、水肿、被膜下散在出血标志制模成功, 关腹。

### 1.5 指标及检测方法

(1) 血清细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-8 按 ELISA 试剂盒说明检测; (2) 血清淀粉酶使用全自动生化分析仪检测; (3) 胰腺中 HSP70/p38MAPK mRNA 使用 RT-PCR 法检测 (引物序列见表 1); (4) 胰腺中 NF- $\kappa$ B 表达, 胰腺中 HSP70/p38-MAPK 蛋白表达采用免疫组化检测。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primer sets

名称	序列	片段长度
β-actin	正向: 5'-AAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3'	159bp
	反向: 5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGA-3'	
HSP70	正向: 5'-GCAGGTGAACTACAAGGAAAGA-3'	288bp
	反向: 5'-TCGAAGATGAGCAGTTGCG-3'	
p38MAPK	正向: 5'-TGCCATCTGACATCACCGAC-3'	148bp
	反向: 5'-TCGGTCTCCCTTTGTTCCG-3'	

1.6 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件建立数据库并进行统计分析。各组数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 正态分布资料采用两个或多个独立样本的 *t* 检验

(方差齐性) 或 *t'* 检验 (方差不齐), 非正态分布资料采用非参数检验的 Mann-Whitney *U* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血清淀粉酶含量及炎症因子水平

与模型组比较, 模型组与预处理组血清淀粉酶含量、TNF-α、IL-6、IL-8 水平均明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 但预处理组各指标升高的程度明显低于模型组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 2)。

表2 各组血清淀粉酶和 TNF-α、IL-6、IL-8 水平

Table 2 The serum levels of amylase, TNF-α, IL-6 and IL-8 in each group

组别	淀粉酶 (U/L)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)
假手术组	1 221.47 ± 54.58	0.300 ± 0.016	0.226 ± 0.026	0.300 ± 0.016
模型组	4 064.93 ± 188.97 <sup>1)</sup>	0.745 ± 0.064 <sup>1)</sup>	0.482 ± 0.022 <sup>1)</sup>	0.591 ± 0.018 <sup>1)</sup>
预处理组	2 845.70 ± 204.78 <sup>1), 2)</sup>	0.487 ± 0.022 <sup>1), 2)</sup>	0.351 ± 0.026 <sup>1), 2)</sup>	0.412 ± 0.023 <sup>1), 2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与模型组比较,  $P < 0.05$

Note: 1)  $P < 0.05$  vs. sham operation group; 2)  $P < 0.05$  vs. model group

2.2 各组大鼠腺组织 p38MAPK、HSP70 mRNA 的表达

与假手术组比较, 模型组与预处理组大鼠胰腺组织 p38MAPK 与 HSP70 的 mRNA 表达均明显升高, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 但预处理组 p38MAPK mRNA 表达量低于模型组, 而 HSP70 mRNA 表达量高于模型组, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ) (表 3)。

预处理组织则呈中等阳性表达 (图 1)。

2.3 各组大鼠胰腺组织 NF-κB 表达

NF-κB 定位于细胞核内, 阳性为细胞核被染成黄色或黄褐色, 假手术组胰腺组织 NF-κB 成弱阳性表达, 而模型组胰腺组 NF-κB 呈强阳性表达,

表3 大鼠胰腺组织中 HSP70、p38MAPK mRNA 相对表达量

Table 3 Relative expression levels of HSP70 and p38MAPK mRNA in rat pancreatic tissues

组别	p38MAPK	HSP70
假手术组	1.099 ± 0.249	1.086 ± 0.269
模型组	2.277 ± 0.300 <sup>1)</sup>	1.285 ± 0.220 <sup>1)</sup>
预处理组	1.274 ± 0.140 <sup>1), 2)</sup>	1.524 ± 0.249 <sup>1), 2)</sup>

注: 1) 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与模型组比较,  $P < 0.05$

Note: 1)  $P < 0.05$  vs. sham operation group; 2)  $P < 0.05$  vs. model group

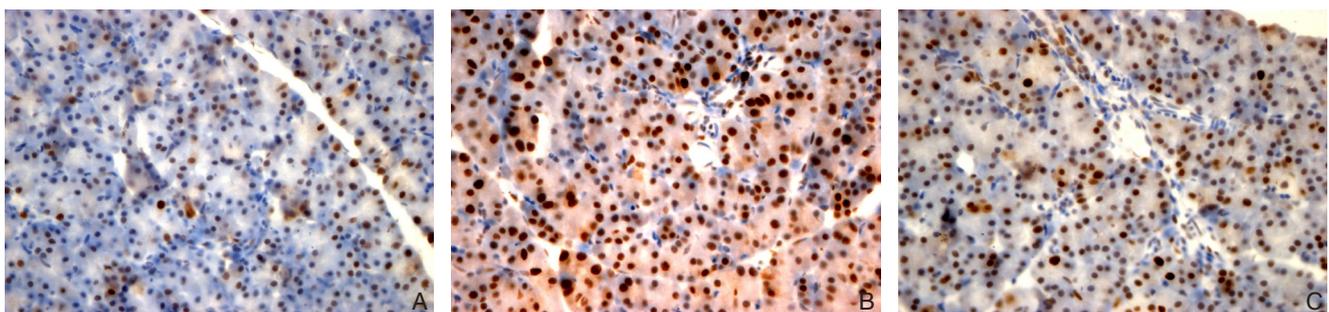


图1 胰腺组织 NF-κB 免疫组化染色 (×400)

A: 假手术组; B: 模型组; C: 预处理组

Figure 1 Immunohistochemical staining for pancreatic NF-κB (×400)

A: Sham operation group; B: Model group; C: Pretreatment group

### 3 讨 论

研究<sup>[6]</sup>表明, ANP 时早期异常激活的胰酶在引起胰腺细胞本身损伤的同时, 导致胰腺局部炎症反应, 激活胰腺内的炎症细胞及胰腺腺泡细胞产生、释放炎性介质, 进而刺激物激活巨噬细胞等炎症细胞, 释放大量细胞因子, 从而触发炎症介质瀑布样级联反应, 使得 AP 易于从局部病变迅速发展成为全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能衰竭 (MOF)。在众多细胞因子中, TNF- $\alpha$  是 ANP 时最早升高的细胞因子并起着核心作用, 介导胰腺局部和全身的炎症反应。TNF- $\alpha$  表达呈时间依赖性增加, 阻断其升高可减轻 SAP 的病情严重程度<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  可促进炎症部位白细胞的聚集和活化, 释放多种炎症介质; 促进白细胞黏附和渗出、毛细血管渗漏和组织损伤。大量的 TNF- $\alpha$  进一步激发一系列级联反应, 诱导 IL-1、IL-6、IL-8 等的表达, 使细胞因子过度激活引起胰腺细胞坏死, 最终导致胰腺及胰腺外组织的损伤, IL-6、IL-8 的升高与胰腺炎病变程度成正相关<sup>[8]</sup>。

细胞内的热休克蛋白有充当分子伴侣、抗凋亡、参与炎症反应等一系列的作用<sup>[9]</sup>, 有文献<sup>[10]</sup>报道, 高热诱导 HSP70 高表达能阻止胰腺内的胰蛋白酶原激活, 从而显著改善雨蛙肽诱导的胰腺炎。笔者前期的研究<sup>[3-4]</sup>表明, 温生理盐水持续腹腔灌洗能诱导大鼠胰腺组织高表达 HSP70, 同时通过下调 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等细胞因子改善牛胆酸钠诱导的急性胰腺炎。但 HSP70 如何下调细胞因子机制不详。

近年来, p38MAPK 在 AP 发病过程中的作用日益受到关注。p38MAPK 是一种重要的胞内信号转导分子, 属于应激反应型的 MAPK, 其活化形式为 P-p38MAPK, 可以对应激刺激、细胞因子、紫外线、热休克等做出反应, 可以影响细胞的增殖、分化、凋亡和迁移等生命过程<sup>[11]</sup>。P38MAPK 信号通路在炎症反应中起着重要作用, 一方面炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) 可通过活化 P38MAPK 信号通路发挥其功能, 如诱导巨噬细胞活化、促使组织细胞凋亡等, 另一方面 P38 的磷酸化可促进核转录因子 NF- $\kappa$ B 活化并向核区转位, 进而促进 TNF- $\alpha$  等炎症因子的合成。在大鼠 AP 模型研究中发现, AP 发病早期胰腺腺泡细胞受损后, 会

产生应激性刺激和细胞因子释放, 促使胰腺细胞 p38MAPK 的活化, 其中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 可以激活通过 MAPK 激酶 3 (MKK3) 来触发 p38MAPK 的磷酸化<sup>[12]</sup>。

NF- $\kappa$ B 最初从 B 淋巴细胞核中提取而出, 是一类主要参与炎性分子表达调控的转录因子, 能与多种基因启动因子或增强子的  $\kappa$ B 位点特异性结合的转录因子, 在 AP 早期起着重要作用。研究<sup>[13]</sup>表明, 在 ANP 病理生理过程中, 活化的 NF- $\kappa$ B 进入细胞核, 与特异的 DNA 位点结合, 启动 IL-6、TNF- $\alpha$  等许多炎症因子的基因表达, 控制他们的转录, 同时, 炎症因子又反过来促进 NF- $\kappa$ B 活化, 形成级联反应。

本研究通过建立大鼠急性胰腺炎模型及温盐水预处理后再制作动物模型探讨温盐水腹腔灌洗对减轻大鼠胰腺炎可能作用机制。本研究观察到, 在牛胆酸钠诱导的 ANP 模型中, HSP70 表达明显升高, p38MAPK mRNA 含量明显升高, 免疫组化显示, NF- $\kappa$ B 在细胞核强阳性染色, 说明活化状态的 NF- $\kappa$ B 明显增多。同时, 细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等也明显升高, 而温生理盐水腹腔灌洗预处理大鼠后, p38MAPK mRNA 含量下降。以上结果提示, HSP70 可能通过调控 p38MAPK 及 NF- $\kappa$ B 水平, 从而下调细胞因子的表达, 进而改善大鼠 ANP 病理生理。

ANP 时炎症介质瀑布样级联反应十分复杂, 正负反馈环路的平衡决定了 ANP 的病理生理进程及病情程度, 温盐水预处理能提高大鼠 HSP70 表达, 下调细胞因子的表达, 进而改善大鼠 ANP 病理生理有望成为临床治疗 ANP 的重要措施。

### 参考文献

- [1] 许军, 孙备, 白雪巍, 等. 经腹腔镜灌洗引流治疗早期重症急性胰腺炎 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(4):336-338.
- [2] 兰明银, 周猛, 菅志远, 等. 经腹腔镜灌洗引流治疗重症急性胰腺炎疗效分析 [J]. 腹部外科, 2010, 23(1): 18-19.
- [3] 程书榜, 王成友, 徐敏, 等. 热休克蛋白 70 对急性胰腺炎时 TNF- $\alpha$ 、IL-8 的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2003, 9(11):684-686.
- [4] 程书榜, 王成友, 徐敏, 等. 热休克蛋白 70 对急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国医师杂志, 2006, 8(12):1593-1595.
- [5] Schmidt J, Lewandrowski 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.
- [6] Song JM, Liu HX, Li Y, et al. Extracellular heat-shock protein 70 aggravates cerulein-induced pancreatitis through toll-like receptor-4 in mice[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(15):1420-1425.
- [7] Dios ID. Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis[J]. *World JGastrointest Pharmacol Ther*, 2010, 1(1):15-20.
- [8] Sempere L, Martinez J, de Madaria E, et al. Obesity and fat distribution imply a greater systemic inflammatory response and a worse prognosis in acute pancreatitis[J]. *Pancreatology*, 2008, 8(3):257-264.
- [9] Li YY, Lu S, Li K, et al. Down-regulation of HSP60 expression by RNAi increases lipopolysaccharide-and cerulein-induced damages on isolated rat pancreatic tissues[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2010, 15(6):965-975.
- [10] Bhagat L, Singh VP, Hietaranta AJ, et al. Heat shock protein70 prevents secretagogue -induced cell injury in the pancreas by preventing intracellular trypsinogen activation[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(1):81-89.
- [11] Takekawa M, Kubota Y, Nakamura T, et al. Regulation of stress-activated MAP kinase pathways during cell fate decisions[J]. *Nagoya J Med Sci*, 2011, 73(1/2):1-14.
- [12] Samuel I, Zaheer A, Fisher RA. In vitro evidence for role of ERK, p38, and JNK in exocrine pancreatic cytokine production[J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(10):1376-1383.
- [13] Algül H, Tando Y, Schneider G, et al. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation[J]. *Pancreatology*, 2002, 2(6):503-509.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 刘安文,程书榜,郭庆云,等. 温盐水腹腔灌洗减轻大鼠急性坏死性胰腺炎及机制 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(7):941-945. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.015  
 Cite this article as: LIU AW, CHENG SB, GUO QY, et al. Warm saline peritoneal lavage to lessen the process of acute necrotizing pancreatitis in rats and its mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(7):941-945. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.07.015

## 2014 中国临床普外科前沿与争论高峰论坛

我国现代外科学奠基人, 现代外科一代宗师, 著名外科学家, 中国科学院资深院士裘法祖教授亲笔题名的“中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”, 遵循“学术交流促发展, 探索前沿勇创新, 精英荟萃增友谊, 弘扬医学为民众”的宗旨, 由“华中科技大学同济医学院附属同济医院”“海峡两岸外科医学会”“中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”组委会共同主办, “大连医科大学附属第二医院”承办的“2014 中国临床普外科前沿与争论高峰论坛”定于 2014 年 10 月 17 日至 19 日在大连市隆重召开。本次盛会时逢裘法祖教授诞辰 100 周年, 将举行隆重的纪念活动。

我们非常真诚地邀请全国普外科广大同仁踊跃投稿, 积极参会。本次大会邀请中华外科杂志、中华普通外科杂志、中华肝胆外科杂志、中华实用外科杂志、中华消化外科杂志、中华实验外科杂志、中华胃肠外科杂志等作为本会“学术支持单位”。本次论坛将授予国家级继续教育学分。

1. 征文内容: (1) 外科基础研究、肝胆胰腺外科、胃肠外科、甲状腺乳腺外科、血管外科的临床研究与实践; (2) 普外科各亚专科微创外科手术的规范和创新等。

2. 征文要求: 国内外未公开发表的论文(论著、病例报告、综述、述评)600字以内的中文摘要(按“目的、方法、结果、结论”四项撰写, 并列 3 个关键词)一份, 需注明作者单位、姓名、职务或职称、通信地址、邮政编码、联系电话和 Email, 以便联系。

3. 投稿方式: 请将您的电子版稿件发到以下 Email 地址: gaofengltdl2014@163.com, 邮件主题请写明“2014 高峰论坛征稿”。投稿截止日期: 2014 年 8 月 30 日。

如希望了解更多征文或会务信息, 请联系:

1. 辽宁省大连市沙河口区中山路 467 号 邮编: 116027 电话: 0411-84671619

大连医科大学附属第二医院 刘彩刚: 15566892506 高振明: 15541178317 Email: gaofengltdl2014@163.com.

2. 湖北省武汉市硚口区解放大道 1095 号 邮编: 430030 电话: 027-83665315 (留言)

华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科 传真: 027-83665375

王兵: 13307171656 李红波: 18071457497 Email: gaofengltdl2014@163.com