

文章编号:1005-6947(2005)05-0327-04

· 急性胰腺炎专题研究 ·

# 大鼠急性胰腺炎反应中脾脏对肠屏障功能的影响

鲁正<sup>1</sup>, 朱言亮<sup>2</sup>, 何长林<sup>3</sup>, 刘金新<sup>3</sup>

(1. 上海第二医科大学附属瑞金医院 普通外科, 上海 200025; 2. 华中科技大学同济医学院同济医院 肝脏外科中心, 湖北 武汉 430030; 3. 蚌埠医学院附属医院 普通外科, 安徽 蚌埠 233004)

**摘要:** **目的** 探讨脾脏在大鼠急性胰腺炎(AP)病程中对肠屏障功能的影响。**方法** 随机将大鼠分成4组:假手术组, AP组, 脾切除组, 脾切除+AP组。手术后24h检测各组血清TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6及IL-10水平, 术后2d测肠细菌移位率, 并取末段回肠行光镜及透射电镜观察肠黏膜受损情况。**结果** 脾切除+AP组TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6及IL-10值分别为 $3.06 \pm 3.61$ ,  $16.46 \pm 5.52$ ,  $19.90 \pm 6.89$ ,  $6.94 \pm 3.93$ ; AP组的测得值分别为 $19.93 \pm 2.38$ ,  $42.79 \pm 4.31$ ,  $20.19 \pm 3.35$ ,  $39.28 \pm 12.69$ 。脾切除+AP组TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 及IL-10的值显著低于AP组( $P < 0.05$ ), 脾切除+AP组细菌移位率为40%显著低于AP组93.3%( $P < 0.05$ )。脾切除+AP组肠黏膜上皮仅轻微水肿, 肠黏膜基本完整, 而AP组肠黏膜上皮水肿明显, 绒毛坏死, 上皮细胞变性, 炎性细胞浸润及细菌移位。**结论** 脾脏在急性炎症反应中, 可明显促进炎性介质的产生和释放, 加重炎症反应。脾脏切除后可减少促炎因子的产生和释放, 肠黏膜受损减轻, 细菌移位率下降。

**关键词:** 胰腺炎/病理生理学; 脾/病理生理学; 肠屏障功能; 疾病模型, 动物

中图分类号: R576; R322.21

文献标识码: A

## Effect of the spleen on intestinal barrier function in rats with acute pancreatitis

LU Zheng<sup>1</sup>, ZHU Yan-Liang<sup>2</sup>, HE Chang-Lin<sup>3</sup>, LIU Jin-Xin<sup>3</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Rui-jin Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China; 2. Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233004, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of the spleen on the function of intestinal barrier during the course of acute pancreatitis in rats. **Methods** Rats were randomly divided into four groups: sham operation group; acute pancreatitis group; splenectomy group; splenectomy plus acute pancreatitis group. The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-10 in each group were examined 24 hours after operation. Two days after operation, the rate of bacterial translocation (BT) was determined and the terminal ileum was excised and examined by transmission electron microscopy to detect the injury of intestinal mucosa. **Results** The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 in splenectomy plus acute pancreatitis group were  $3.06 \pm 3.61$ ,  $16.46 \pm 5.52$ ,  $19.90 \pm 6.89$ ,  $6.94 \pm 3.93$ , and in acute pancreatitis group were  $19.93 \pm 2.38$ ,  $42.79 \pm 4.31$ ,  $20.19 \pm 3.35$ ,  $39.28 \pm 12.69$  respectively. The values of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 were significantly lower in splenectomy plus acute pancreatitis group than those in acute pancreatitis group ( $P < 0.05$ ). The rate of bacterial translocation was 40 percent in splenectomy plus acute pancreatitis group, but 93.3 percent in acute pancreatitis group, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Histologic examination revealed mild edema of intestinal mucosal epithelium and normally appearing intact mucosa in splenectomy plus acute pancreatitis group, whereas in acute pancreatitis group revealed severe

**基金项目:**安徽省教育厅资助项目(99j10148)。

**收稿日期:**2004-06-08; **修订日期:**2005-02-28。

**作者简介:**鲁正(1972-),男,安徽亳州人,上海第二医科大学附属瑞金医院博士研究生,主要从事肝胆外科和肝移植方面的研究。

**通讯作者:**鲁正 E-mail:luquanui@yahoo.com.cn。

injuries of intestinal mucosa, including apparent edema, necrosis of intestinal villi, degeneration of epithelial cells, infiltration of neutrophils and bacterial translocation. **Conclusions** The spleen can exacerbate the inflammatory response of acute pancreatitis by markedly promoting the production and release of inflammatory mediators. Splenectomy can reduce the production and release of inflammatory mediators, and thus decrease the damage of intestinal mucosa and the rate of BT.

**Key words:** Pancreatitis/physiopathol; Spleen/physiopathol; Intestinal Barrier Function; Disease Models, Animal

**CLC number:** R576; R322.21

**Document code:** A

脾脏是人体重要的免疫器官。关于脾脏在抗细菌感染及其对肿瘤的生长、门静脉高压症中巨脾等的作用已有深入研究,但脾脏在急性全身炎症反应中的作用如何还知之甚少。笔者在脾切除术后的大鼠上制作 AP 模型,以探讨脾脏在 AP 中对肠屏障功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

牛磺胆酸钠购自华美生物工程有限公司,胰蛋白酶购自上海生工公司,肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ),白细胞介素 6 (IL-6) 及白细胞介素 10 (IL-10) 细胞因子 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

### 1.2 实验动物及分组

SD 大鼠 36 只(蚌埠医学院动物科提供),雌雄分笼饲养,体重 250 ~ 350g。随机分为 4 组:(1)假手术组(8 只);(2)切脾组(8 只);(3)AP 组(10 只);(4)切脾 + AP 组(10 只)。

### 1.3 动物模型的制作<sup>[1]</sup>

大鼠 AP 模型制作如下:实验动物采用腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉,手术按无菌操作。进腹后找到胰胆管,予一丝线结扎胰胆管入十二指肠端;胰胆管肝门端用小动脉夹阻断,以  $4\frac{1}{2}$  针头从胰胆管远端逆行胰胆管穿刺,注入 3% 牛磺胆酸钠(0.7mL/kg)及胰蛋白酶(3 000U/kg);注毕,去除结扎丝线及小动脉夹,逐层缝合腹壁。切脾 + AP 组则在制作 AP 模型 1 周前先行脾切除

手术。假手术组仅行简单剖腹术,进腹后用手翻动胃,脾及胰腺后复置于原位即关腹。

### 1.4 检测指标

1.4.1 实验室指标 上述各组动物均于术后 24h 从尾静脉取血检测血清淀粉酶(采用碘-淀粉法);TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6 和 IL-10 均采用酶标双抗体夹心 ELISA 法测定。

1.4.2 肠菌移位 2d 后将所有动物处死,无菌剪取肝、胰、肾及肠系膜淋巴结,匀浆后置于营养肉汤内增菌,增菌 24h 后各取 10  $\mu$ L 分别接种至 SS 琼脂平板,MAC 平板及血平板,37 $^{\circ}$ C 培养 24h,根据细菌生长的特点、菌落和生化反应鉴定各种细菌。

1.4.3 组织形态学 各组动物均取胰腺和末段回肠组织行光学显微镜和透射电子显微镜检查。

### 1.5 统计学处理

细胞因子计量用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析;细菌移位率采用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

### 2.1 血清淀粉酶, TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6 及 IL-10 水平

AP 组及切脾 + AP 组血清淀粉酶较假手术组及切脾组血清淀粉酶显著增高 ( $P < 0.05$ )。AP 组与假手术组及切脾组相比,4 种细胞因子水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ),AP 组与脾切除 + AP 组相比,4 种细胞因子均增高,其中 TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-10 两组间差异有显著意义 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 4 组血清淀粉酶, TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , IL-6 和 IL-10 值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	淀粉酶(U/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL- $1\beta$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)
假手术	8	1683.15 $\pm$ 121.4 <sup>1)</sup>	0 <sup>1)</sup>	15.57 $\pm$ 6.21 <sup>1)</sup>	10.09 $\pm$ 1.48 <sup>1)</sup>	1.44 $\pm$ 0.52 <sup>1)</sup>
切脾	8	1626.50 $\pm$ 168.6 <sup>1)</sup>	0.13 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>	18.62 $\pm$ 6.53 <sup>1)</sup>	11.01 $\pm$ 2.58 <sup>1)</sup>	0.67 $\pm$ 0.52 <sup>1)</sup>
AP	10	10058.10 $\pm$ 1824.8	19.93 $\pm$ 2.38	42.79 $\pm$ 4.31	20.19 $\pm$ 3.35	39.28 $\pm$ 12.69
切脾 + AP	10	3397.70 $\pm$ 991.7	3.06 $\pm$ 3.61 <sup>2)</sup>	16.46 $\pm$ 5.52 <sup>2)</sup>	19.90 $\pm$ 6.89	6.94 $\pm$ 3.93 <sup>2)</sup>

注:与 AP 组相比 1)  $P < 0.01$ , 2)  $P < 0.05$

## 2.2 各组大鼠细菌移位率

AP 组的肠菌移位率明显高于假手术组。各组大鼠外周血及脏器所培养出的细菌菌种包括大肠埃希氏菌、液化沙雷氏菌、克雷白杆菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、腐败假单孢菌及聚团肠杆菌等,以大肠埃希氏菌、液化沙雷氏菌及表皮葡萄球菌为主(表2)。

表2 各组细菌移位发生率

组别	例数	细菌移位率	
		肠系膜淋巴结	远隔部位
假手术	8	50.0 <sup>†</sup> (4/8)	12.5
切脾	8	62.5(5/8)	25.0
切脾+AP	10	80.0(8/10)	50.0 <sup>†</sup>
AP组	10	100.0(10/10)	100.0

注:†与AP组相比 $P < 0.05$

## 2.3 各组大鼠胰腺及末段回肠病理学改变

2.3.1 大体观察 假手术组及切脾组:无腹水,胰腺及小肠未见明显改变。AP组:大量淡红色血性腹水;胰腺水肿明显,可见片状出血及灶性坏死,胰周及肠系膜大量皂化斑;肠壁增厚、水肿,失去光泽。切脾+AP组:腹腔内中等量淡黄色腹水,约3~4 mL;胰腺水肿,点状出血,坏死少见,散在皂化斑;肠壁轻微水肿。

2.3.2 光镜检查 假手术组及切脾组:胰腺及小肠未见明显病理改变。AP组:胰腺间质明显水肿,炎细胞浸润,片状出血,灶性坏死,小叶轮廓不清(图1a);肠黏膜上皮水肿明显,绒毛排列紊乱,部分脱落、缺失(图1b)。切脾+AP组:胰腺间质水肿,充血,炎细胞浸润,可见点状出血,偶见坏死灶,小叶轮廓存在(图1c);肠黏膜上皮仅轻微水肿,肠黏膜屏障基本完整(图1d)。

a: AP组胰腺

b: AP组末段回肠

c: SP+AP组胰腺

d: SP+AP组末段回肠

图1 光镜下AP组和切脾+AP组胰腺及末段回肠病理改变( $\times 100$ )

2.3.3 电镜检查 AP组:可见肠上皮细胞变性,胞浆线粒体嵴消失及空泡形成,核固缩,核形不规则,上皮可见炎细胞浸润及细菌(图2a~d)。切脾

+AP组:仅肠上皮及间质水肿,胞浆半透明,线粒体肿胀,核大,染色质疏松(图2e,f)。

a, b, c: AP 组末段回肠

d: AP 组末段回肠

e, f: 切脾 + AP 组末段回肠

图2 电镜下 AP 组和切脾 + AP 组肠上皮病理改变 ( $\times 8\ 000$ )

### 3 讨论

本文结果发现, AP 组与切脾 + AP 组大鼠相比, 细菌移位率、促炎因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 有显著差异。在形态学方面, 可见切脾组胰腺炎大鼠比 AP 组肠黏膜屏障损害亦较轻微。说明在急性胰腺炎早期, 异常激活的胰酶在引起胰腺细胞本身损伤的同时, 也导致胰腺局部炎症反应, 释放炎症介质, 这些介质进入血液循环后, 又激活机体其他炎症细胞释放大量炎症介质, 发生“瀑布式反应”, 终导致全身炎症反应综合征 (SIRS)<sup>[2,3]</sup>。此外, 大量炎症介质的释放亦可导致器官微循环障碍, 肠道是最先受累的内脏器官。由于持续的低灌注、缺血、缺氧, 导致肠黏膜屏障功能受损, 通透性增加, 使得细菌和内毒素易于通过黏膜向肠壁的微血管和淋巴管移动, 从而发生细菌移位<sup>[4,5]</sup>。细菌移位既是肠屏障功能障碍的后果, 也是多器官功能障碍综合征发生在肠道的一种前期表现<sup>[6]</sup>。而脾切 + AP 组一方面减少了产生炎症介质和细胞因子的数量, 另一方面, 由于脾脏的切除也失去了这种免疫促进作用, 使得免疫活性细胞对外源性刺激的敏感性下降, 活性的炎症介质产生及释放减少, 炎症反应减轻, 肠黏膜屏障基本保持完整, 细菌移位率降低。

因此认为, 脾脏对免疫活性细胞具有重要的调节作用。在急性炎症反应中, 脾脏可以明显促进炎

性介质的产生和释放, 加重肠黏膜屏障的损害。充分认识脾脏在这一方面的作用, 采取积极的干预手段, 包括抗内毒素血清、抗 TNF 单克隆抗体、TNF 受体抗体和血管内皮黏附分子单克隆抗体等<sup>[7]</sup>, 可能会有效地防止肠屏障功能的损害。

#### 参考文献:

- [1] Liu Q, Djuricin G, Rossi H, *et al.* The effect of lexipatant on bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis in rats [J]. *Am Surg*, 1999, 65(7):611-616.
- [2] Norman JG. New approaches to acute pancreatitis: role of inflammatory mediators [J]. *Digestion*, 1999, 60(Suppl,1):57-60.
- [3] Hirota M, Nozawa F, Okabe A, *et al.* SIRS and CARS: discussion based on the pathologic condition of acute pancreatitis [J]. *Japanese Journal of Clinical Pathology*, 2000, 48(6):527-532.
- [4] Hirota M, Nozawa F, Okabe A, *et al.* Relationship between plasma cytokine concentration and multiple organ failure in patients with acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2000, 21(2):141-146.
- [5] Mayer J, Rau B, Gansauge F, *et al.* Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications [J]. *Gut*, 2000, 47(4):546-552.
- [6] Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, *et al.* Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis [J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7(1):26-35.
- [7] Hughes CB, Gaber LW, Mohey el-Din AB, *et al.* Inhibition of TNF alpha improves survival in an experimental model of acute pancreatitis [J]. *Am Surg*, 1996, 62(1):8-13.