

文章编号:1005-6947(2005)05-0331-03

· 急性胰腺炎专题研究 ·

外源性溶血卵磷脂对急性胰腺炎大鼠血脑屏障通透性的影响

刘小丰, 钱祝银, 苗毅

(南京医科大学第一附属医院 普通外科, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 探讨溶血卵磷脂(LPC)对胰腺炎(AP)大鼠血脑屏障(BBB)通透性的影响。方法 SD大鼠制成急性胰腺炎模型后随机分为:(1)实验组,从大鼠的尾静脉注入LPC;(2)对照I组,从尾静脉注入生理盐水;(3)对照II组(假手术组),不制备AP模型,仅从尾静脉注入LPC。7~10d后应用辣根过氧化物酶-二氨基联苯氨显色法(HRP-DAB法)检测3组大鼠BBB的通透性。结果 实验组HRP有局部血管外渗出,显示BBB通透性明显升高,对照I,II组BBB升高不明显,两者具有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 LPC能增加胰腺炎大鼠BBB的通透性,可能与AP的胰性脑病发生有关。

关键词: 胰腺炎/病理生理学; 血脑屏障; 溶血磷脂酶

中图分类号: R576; R556.1 **文献标识码:** A

Effect of ectogenic lysolethcin choline on blood-brain barrier permeability in rats with acute pancreatitis

LIU Xiao-Feng, QIAN Zhu-Yin, Miao Yi

(Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of NanJing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of lysolecithin choline (LPC) on blood-brain barrier (BBB) permeability in rats with acute pancreatitis. **Methods** Acute pancreatitis rat model was produced and rats were randomly divided into: (1) Test group-AP, rats received LPC by tail vein injection; (2) control group I, AP rats were given normal saline by tail vein injection; (3) control group II, sham operation without AP, but LPC was given by tail vein injection. Horseradish peroxidase (HRP) was used as a tracer to determine BBB permeability 7~10 days later. **Results** The test group showed local extravascular effusion of HRP, indicating that BBB permeability was markedly increased, while both control groups showed no apparent increase of BBB permeability, which were statistically significant ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusions** LPC can increase BBB permeability of rats with acute pancreatitis, and this may be related to the development of pancreatic encephalopathy.

Key words: Pancreatitis/physiopathol; Blood-Brain Barrier; Lysorhospholipase

CLC number: R576; R556.1 **Document code:** A

胰腺炎患者中有部分病例可发生胰性脑病 (pa-

ncreatic encephalopathy, PE), 表现为胰腺炎时特有的精神、神经系统的改变。该并发症凶险, 病死率高。但发病机制不明。对 PE 发病机制目前普遍的理解是胰酶进入血液循环后, 进而通过血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB), 引起脑损害。其中磷脂酶 A2 (PLA2) 和溶血卵磷脂 (lysolecithin choline, LPC) 的作用引人注目。PLA2 活化后可将胆汁内卵磷脂转化成 LPC, 后者有破坏细胞膜磷脂层的特性。本实

基金资助:江苏省教育厅自然科学基金资助项目(00KJB320002); 南京医科大学创新基金资助项目(460NC0308)。

收稿日期:2004-05-15; **修订日期:**2004-12-15。

作者简介:刘小丰(1972-),男,江苏泗洪人,南京医科大学第一附属医院主治医师,硕士,主要从事胰腺疾病方面的研究。

通讯作者:苗毅 电话:025-83718836-6508; E-mail:miaoyi@njmu.edu.cn。

验在胰腺炎大鼠模型上注射 LPC,以揭示 LPC 对胰腺炎大鼠的 BBB 通透性的影响,旨在探讨 PE 的发病机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,体重 230 ~ 270g,由南京医科大学动物实验中心提供。牛磺胆酸钠(sodium taurocholate, STC)和 LPC 购自美国 Sigma 公司。辣根过氧化物酶(HRP, RZ > 2.5)及二氨基联苯氨(DAB)购自南京生兴生物公司。

1.2 实验方法及动物分组

参照 Aho 法^[1]制成胰腺炎模型:大鼠禁食不禁水 12h,以 0.2% 氯氨酮 0.4mL/100g 腹腔内注射麻醉,于上腹部正中作一长约 2.5cm 之切口,胰管近肝门处以动脉夹夹闭,接着自十二指肠对系膜缘用 5 号钝针逆行插入胰管,近肠侧以 0 号线临时结扎。专人以手动持续压力将 60 μ L/100g 大鼠体重的 3.5% STC 注入胰管。注射时间 60 μ L/30s。胰腺发生轻度充血,水肿型胰腺炎制备成功。成模后大鼠随机分为实验组($n = 10$)及对照 I 组($n = 10$),另设对照 II 组(假手术组, $n = 10$),开腹后找到胰管即关腹。制模次日起,实验组及对照 II 组每天大鼠自尾静脉注入 0.1% LPC 0.4mL/100g 大鼠体重,连用 5d;对照 I 组在相同时点以同样方法从尾静脉注入等量生理盐水。

1.3 血脑屏障通透性的检测

采用 HRP-DAB 法检测:在连续应用 LPC 5d 后的第 8 天,以上述方法麻醉,作颈部正中切口解剖出颈动脉。分离附着其上的迷走神经及筋膜组织,以 1% 普鲁卡因扩张血管后挑起血管,预置 0 号线 2 根于血管之后,近心侧夹闭,远心侧以动脉夹夹闭。用眼科剪斜行剪开颈总动脉 2/3 周径,向头侧插入 7 号静脉留置针至颈内动脉,将远心侧颈内动脉紧扎于颈内动脉,5min 内持续手动恒压注入 0.4% HRP0.2mL/100g 体重。10min 后取脑,置于液氮罐中备用。取颞叶皮质深约 2mm,脑组织行冷冻切片厚约 6 ~ 10 μ m,先与 30% 过氧化氢作用 5min 形成较稳定的(H_2O_2 -HRP)复合物,继以 0.04% DAB 进行显色约 5 ~ 10min。结果显示生成棕黄色物,以其分布于毛洗血管血管内外判断 BBB 的通透性。

结果判断:以 1 个神经元细胞的平均大小作为 1 个细胞单位,比较渗出范围,无渗出的定为(-),渗出范围在 1 个、2 ~ 3 个、> 3 个细胞单位的分别定为(+),(+ +),(+ + +)。

1.4 统计学方法

以等级资料分析的 Wilcoxon 法进行统计分析。

2 结 果

实验组大鼠棕黄色的生成物分布于脑组织毛细血管以外较远的范围(附图),提示 HRP 明显渗出,对照 I 组有 2 只(20.0%) HRP 渗出至脑组织毛细血管外,对照 II 组有 2 只(20.0%)出现 HRP 渗出 BBB 外。对照 I, II 组出现 HRP 渗出时,其外渗范围远较实验组为小(附表)。

HRP 明显渗出至 BBB 外。HRP-DAB 的棕黄色产物,在毛细血管一侧渗出较多,示 BBB 通透性增加($\times 400$)

附图 HRP 明显渗出

附表 各组 BBB 处 HRP 外渗情况统计

| 组别 | BBB 处外渗程度 | | | | 总阳性数(%) |
|---------|-----------|-----|-------|---------|----------------------|
| | (-) | (+) | (+ +) | (+ + +) | |
| 实验组 | 1 | 4 | 3 | 2 | 9(90.0) |
| 对照 I 组 | 8 | 2 | 0 | 0 | 2(20.0) [†] |
| 对照 II 组 | 8 | 1 | 1 | 0 | 2(20.0) [†] |

注:† 与实验组比较, $P < 0.05$

3 讨 论

BBB 形态学基础包括血液与神经元之间的一系列解剖结构:脑内毛细血管的内皮细胞及内皮细胞之间的紧密连接、基膜以及星型胶质细胞突起。紧密连接由毛细血管腔面附近的带状闭锁小带(belt-like zonula occludens)复合体组成。该闭锁

小带的膜内微粒的排列较其他部位的毛细血管更为紧密,这些紧密连接限制了亲水性物质从细胞旁通路通过内皮细胞。毛细血管内皮细胞上存在直径约 0.7 ~ 0.9 nm 的小孔。任何半径小于 0.9 nm 的分子应当能通过内皮细胞膜,如水、尿素的分子直径分别是 0.3 nm 和 0.36 nm^[2]。HRP 的分子量是 44000,分子直径是 3 nm, BBB 正常时难以通过内皮细胞的微孔。血管注射 HRP 后,就在内皮细胞的紧密连接处被挡住,不能进入脑组织^[3,4]。当 BBB 被破坏时, DAB 可显示 HRP 溢出血管外^[5]。

本实验显示, HRP 的血管外渗出的特点是局部渗出,而不是环血管的均匀性渗出。即在血管的某一侧面外渗明显,而在同一血管的其他方向无渗出。这反映了 BBB 通透性的局限性的增高与毛细血管内皮细胞间紧密连接的不均匀分布特点是相适应的;反之,以细胞间的紧密连接被破坏也能很好地解释 HRP 不均匀的管周外渗。此特点也与正常 BBB 时 HRP 就是在内皮细胞的紧密连接处被挡住相吻合。另一方面,其他机制均不足以解释本实验所见 BBB 的开放,受体形成的主动转运和易化的载体运输系统均不能解释 BBB 通透性的局限性的增高。另外, BBB 中内皮细胞缺少胞饮小泡,因此不存在吞饮作用^[5]。当然, LPC 引起胰腺炎大鼠 BBB 通透性增加的作用靶点是否就在紧密连接处尚需进一步实验证实。

对照 I 组出现部分大鼠 BBB 轻度开放,分析其原因并非生理盐水所致,而可能与 SAP 时胰酶进入血液,其中的 PLA2 对脑组织的作用或大鼠在患胰腺炎后出现继发感染,内毒素入血所致, PLA2 和内毒素中的脂多糖可致 BBB 开放^[6]。

对照 II 组也有部分大鼠出现 BBB 的轻度开放,可能与 LPC 具有溶解细胞生物膜的特性,而破坏了细胞间的紧密连接,从而使 BBB 通透性的增加。

BBB 在维护脑的内环境和脑与外周信息及物质传递中有重要作用。急性胰腺炎时, BBB 一旦开放,大量胰酶及代谢毒性产物将乘虚而入脑组织,破坏脑组织,引发 PE。新近的研究显示, BBB

与脑毛细血管的免疫反应有关。BBB 的内皮细胞可呈递抗原,诱导细胞的免疫应答。激活了的 T 淋巴与内皮细胞接触,诱导内皮细胞表达 MHC-II,使淋巴细胞释放细胞因子,破坏脑实质^[7]。BBB 破坏后,细胞因子更易通过 BBB 而进入脑实质。BBB 通透性的改变在中枢神经系统脱髓鞘疾病的发病中起重要作用。BBB 通透性的增加,导致血液中致敏的 T 细胞和部分致炎性细胞因子进入脑实质,使神经髓鞘遭破坏^[8],引起中枢神经系统脱髓鞘病变。脱髓鞘是 PE 的典型病理变化。鉴于在 LPC 在胰腺炎时系由 PLA2 所激活,是胰酶作用的产物。故有理由认为 LPC 在 PE 发病中起重要作用。

参考文献:

- [1] Aho HJ, Suonpaa K, Ahola RA, *et al.* Experimental pancreatitis in the rat. Ductal factors in sodium taurocholate-induced acute pancreatitis [J]. *Exp Pathol*, 1984, 25(2): 73 - 79.
- [2] 朱长庚. 脑和脊髓的血液供应回流及脑屏障 [A]. 见朱长庚. 神经解剖学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 1033 - 1035.
- [3] Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain [J]. *J Cell Biol*, 1969, 40(3): 648 - 677.
- [4] 蒋文华. 脑屏障 [A]. 见蒋文华. 神经解剖学 [M]. 上海:复旦大学出版社, 2002. 443 - 444.
- [5] Ueno M, Tomimoto H, Akiguchi I. Blood-brain barrier disruption in white matter lesions in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(1): 97 - 104.
- [6] 邝芳, 王百忍, 鞠躬. 静脉注射脂多糖和小剂量肾上腺素后 BBB 的开放 [J]. 第四军医大学学报 2000, 21(2): 83 - 84.
- [7] Homma M, Suzuki H, Kusuha H, *et al.* High affinity efflux transport system for glutathione conjugates on the luminal membrane of a mouse brain capillary endothelial cell line [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 1999, 288(1): 198 - 203.
- [8] 于国平, 朱克, 田东华, 等. 实验性过敏性脑脊髓炎的血脑屏障的改变 [J]. 军医进修学院学报 1998, 19(2): 107 - 109.