

文章编号:1005-6947(2006)10-0761-05

· 基础研究 ·

甘遂对重症急性胰腺炎大鼠核因子- κ B活化的影响

张翼^{1,2}, 吕新生¹, 孙维佳¹, 李小荣², 陈道瑾²

(中南大学 1. 湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠胰腺核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的活性变化及甘遂对其的影响,以探讨甘遂治疗SAP的作用机制。方法 将SD大鼠随机分为假手术组(S组)、重症急性胰腺炎组(SAP组)、甘遂治疗组(K组),每组40只。分别在手术后2, 6, 12, 24h处死大鼠后检测血清淀粉酶水平、胰腺组织核内NF- κ B/p65蛋白表达、胰腺组织光镜检查、各组术后72h死亡率。结果 (1)血清淀粉酶:与S组比较,SAP组2, 6, 12, 24h均显著升高($P < 0.01$);K组与SAP组比较,除2h外,其余各时间点均有显著降低($P < 0.01$),但仍高于对照组($P < 0.01$);(2)核内NF- κ B/p65蛋白表达:S组表达量极弱;SAP组2, 6, 12h表达均显著高于S组($P < 0.01$),K组6, 12h表达量显著低于SAP组($P < 0.01$);(3)光镜观察:S组胰腺组织结构正常,SAP组胰腺组织有出血坏死及炎性细胞浸润,K组胰腺组织损害较SAP组减轻。(4)72h死亡率:S组死亡率为0%;K组为12.5%,两者均明显低于SAP组(62.5%)($P < 0.05$)。结论 甘遂能有效治疗SAP,其机制可能是通过减轻胰腺组织中NF- κ B活化而发挥治疗作用。

关键词:胰腺炎/药物疗法;甘遂/治疗应用;核因子- κ B

中图分类号:R576 文献标识码:A

Effect of kansui root on activity of nuclear factor-kappaB in pancreas of rats with severe acute pancreatitis

ZHANG Yi^{1,2}, LU Xin-sheng¹, SUN Wei-jia¹, LI Xiao-rong², CHEN Dao-jin²

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008 China; 2. Department of General Surgery, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013 China)

Abstract: Objective To observe the effect of kansui root on the change of nuclear factor- κ B activity in pancreas in rats with severe acute pancreatitis(SAP), and to explore the mechanism of kansui root in treating SAP. **Methods** SD rats were randomly divided into 3 groups: sham group(S group), severe acute pancreatitis group(SAP group) and kansui root therapy group(K group). 40 rats were in each group. The blood samples and tissue samples of each group were obtained at 2h, 6h, 12h and 24h after the operation respectively for the following tests: serum amylase, expression of NF- κ B/p65 protein in pancreatic tissue nucleus by Western blot, morphological examination of pancreas, and 72h mortality after operation. **Results** (1) serum amylase: the levels in SAP group were obviously higher than those in S group at 2h, 6h, 12h and 24h($P < 0.01$). The levels in K group were significantly lower than those in SAP group($P < 0.01$) at each time point except at 2h, but were significantly higher than those in S group($P < 0.01$). (2) Expression of NF- κ B/p65 protein in nucleus: the expressions were extremely weak in S group; but the expressions in SAP group were obviously stronger than those in S group at 2h, 6h and 12h($P < 0.01$); the expression in K group was significantly lower at 6h, 12h than those in SAP group($P < 0.01$). (3) Microscopy: structures of pancreas were normal in S group; hemorrhage, necrosis and infiltration of inflammatory cells were observed in pancreatic tissue in SAP group; the injury in K group was milder than that

基金项目:湖南省中医药基金资助项目(204180)。

收稿日期:2006-05-09; **修订日期:**2006-09-01。

作者简介:张翼,男,湖南株洲人,中南大学湘雅博士研究生(现在湘雅三医院),主要从事胃肠、胰腺外科的基础和临床方面的研究。

通讯作者:吕新生 电话:0731-4327400; E-mail:jcgxxych@126.com。

in SAP group. (4) 72h mortality: In S group mortality was 0%; in K group was 12.5%, both were significantly lower than that in SAP group (62.5%) ($P < 0.05$). **Conclusions** There was activation of NF- κ B during the development of SAP, and kansui root can inhibit the activity of NF- κ B in pancreas. It might be one of the mechanisms of kansui root in treating SAP.

Key words: Pancreatitis/drug ther; Kassui/ther use; Nuclear Factor/ κ B

CLC number: R576

Document code: A

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是临床常见急腹症,起病急,病情重,其病死率目前仍高达 20%~40%^[1]。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是一个广泛存在于细胞中的具有多向性转录调节作用的蛋白质因子,它能与多种炎症介质和细胞因子等基因启动子部位的 κ B 位点相结合,调控这些基因的转录和表达,在急性胰腺炎的发生发展中起着重要的作用^[2]。我科 20 世纪 70 年代开始在临床上应用中药甘遂治疗 SAP 并取得满意的临床效果,但其作用机理尚不甚清楚。本研究旨在探讨重症急性胰腺炎大鼠胰腺核因子 κ B (NF- κ B) 的活性变化及甘遂对其的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和药品

牛磺胆酸钠 (sigma 公司);甘遂粉 (中南大学湘雅医院中药房提供,陕西产);p65 兔抗大鼠多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); β -actin 兔抗大鼠多克隆抗体 (sigma 公司);HRP 标记的羊抗兔二抗 (sigma 公司);BCA 蛋白分析试剂盒 (美国 Pierce 公司);ECL 化学发光试剂盒 (Pharmacia 公司)。

1.2 动物模型建立

参照薛建国等^[3]介绍胰腺被膜下注射 5% 牛磺胆酸钠的建模方法。注射后整个胰腺均匀隆起,约 10 min 后胰腺出现肉眼可见的水肿出血,表明制作 SAP 模型成功,背部皮下注射生理盐水 20 mL/kg。术后自由饮食饮水。

1.3 动物分组和处理

健康雄性 SD 大鼠 120 只 (中南大学湘雅医学院实验动物学部提供),体重 (200 \pm 50) g,随机分为 3 组:(1)假手术组 (S 组);(2)重症急性胰腺炎组 (SAP 组);(3)甘遂治疗组 (K 组)。每组 40 只。S 组仅行开腹术,SAP 组和 K 组均制作重症急性胰腺炎模型。在模型制作成功后 K 组立即给予甘遂灌胃 (200 mg/kg,用生理盐水配成 1 mL 混悬液),1

次/8 h,共 2~3 次,S 组和 SAP 组给予同等容积的生理盐水灌胃。

1.4 观测指标及检测方法

术后 2,6,12,24 h 点每组随机各选取 8 只处死后采集血液和组织标本行下列检测。

1.4.1 血清淀粉酶 (AMS) 采用日立 7170A 型全自动生化分析仪测定。

1.4.2 胰腺组织核内 NF- κ B/p65 蛋白表达 采用 Western 印迹法检测。(1)组织核蛋白提取:称取胰腺组织 100 mg 研磨离心重悬于 400 μ L 缓冲液 A (10 mmol/L HEPES,1.5 mmol/L MgCl₂,10 mmol/L KCl,0.5 mmol/L DTT,0.2 mmol/L PMSF) 中,超声粉碎离心弃上清得细胞核后再重悬于 100 μ L 缓冲液 C (20 mmol/L HEPES,25% 蔗糖,0.42 mmol/L NaCl,1.5 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L EDTA,0.5 mmol/L DTT,0.2 mmol/L PMSF) 中,离心后上清即为核蛋白提取液,BCA 蛋白分析试剂盒测定核蛋白浓度,-80 $^{\circ}$ C 冻存。(2)Western blot 检测:取样品 (100 μ g/孔)与 1 \times SDS 加样液混合,电泳分离蛋白并转移至硝酸纤维素膜上,依次加一抗 (p65 兔抗大鼠多克隆抗体, β -actin 兔抗大鼠多克隆抗体,工作浓度均为 1:200),二抗 (HRP 标记的羊抗兔二抗,工作浓度 1:5 000),ECL 发光法检测,放射自显影,并进行半定量 (以 β -actin 为内参照,用 p65/ β -actin 的灰度密度比值表示结果)检测。再重复实验 2 次,结果进行分析。

1.4.3 光镜检查 取小块胰腺组织立即放入 4% 的多聚甲醛中固定,石蜡包埋切片,HE 染色,高倍镜下观察组织结构的改变。

1.4.4 大鼠死亡率观测 术后各组随机选取 8 只观察 72 h 死亡率。

1.5 统计学方法

所有计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 认为有统计学意义,采用 SPSS 10.0 统计软件分析完成。

2.4 72h 死亡率

S 组为 0% ;K 组为 12.5% (1/8), 两组均明显低于 SAP 组 (62.5%) (5/8) (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

重症急性胰腺炎时, 机体释放大量的炎症介质和细胞因子进入血循环, 触发炎症介质瀑布样级联反应, 促成了全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能障碍综合征 (MODS), 这是造成 SAP 死亡的重要原因^[4]。因此, 减少炎症介质的过度产生以减轻炎症反应和组织损伤对于改善 SAP 的病情有着重要意义。

NF- κ B 广泛存在于机体各种细胞胞质中, 是许多炎症介质和细胞因子表达所必须的转录因子。NF- κ B 主要是由 p65 和 p50 两个亚基组成的异源二聚体, 未被激活时位于细胞胞浆并和抑制蛋白 I κ B 结合在一起, 在某些刺激因素作用下 I κ B 与 NF- κ B 解离并被降解, NF- κ B 随即被激活而进入胞核, 与多种炎症蛋白基因启动子部位的 κ B 位点相结合, 调控这些基因的转录和表达^[5]。因此, NF- κ B 的活化能引起一系列炎症介质和细胞因子基因的表达上调, 导致它们的大量产生进而参与机体的炎症反应。近年来随着对 SAP 发病机制认识的不断深入, 有关 NF- κ B 的活化在急性胰腺炎中的作用研究逐渐增多。Dunn 等^[6]在大鼠急性胰腺炎中发现 NF- κ B 活性在诱导后 4h 明显升高, 并持续 24h, 其调控的 TNF α mRNA 也随之升高, 用异戊巴比妥阻断 NF- κ B 活性后, TNF α mRNA 表达也降低, 胰腺炎的严重程度减轻。Bliman 等^[7]在大鼠胰腺炎模型中发现胰腺组织 NF- κ B 的活性显著升高, 同时胰腺组织 IL-6 和 KC (IL-8 类似物) 的 mRNA 表达也明显上调, 给予 NAC (N-乙酰半胱氨酸) 后可抑制 NF- κ B 活化及 IL-6 和 KC 的产生。Chen 等^[8]采用经胰管注射的方法直接将含有目的基因的腺病毒 (Ad p65) 注入胰腺, 发现注入 Ad p65 后, NF- κ B 目的基因在胰腺内表达, 产生大量活化的 NF- κ B, 并伴有严重的炎症反应发生, 在胰腺内可以见到大量中性粒细胞浸润及广泛的组织病理损伤; 而整合了对照基因的腺病毒未见引起胰腺内 NF- κ B 的表达和活化, 亦未见胰腺组织的病理损伤。上述研究表明 NF- κ B 活化在急性胰腺炎的发生发展中起着重要作用。本研究也观察到 SAP 成模后 2h 胰腺组织 NF- κ B 就有明显激活, 6h 活性 (核内 NF- κ B/p65 表达) 达到高峰, 并持续到 24h, 明显高于 S 组, 与此同时血清淀粉酶也逐渐上升, 胰腺损害逐渐加重, 提示 SAP 早期就有 NF- κ B 的活化并参与了 SAP 的炎症反应进而引起 SAP 的生化 and 病理改变。

临床上应用中药甘遂治疗 SAP 效果良好^[9], 但其作用机理尚不甚清楚。本研究发现用甘遂治疗大鼠 SAP 后胰腺组织的 NF- κ B 活性显著下降, 同时血清淀粉酶也降低, 胰腺病理损害得到改善, 动物死亡率降低。表明甘遂能够通过抑制 SAP 时胰腺组织的 NF- κ B 活性, 对 SAP 的生化 and 病理改变及预后产生有利影响。其作用机制可能为甘遂通过抑制 SAP 胰腺组织的 NF- κ B 活性, 阻止 NF- κ B 从胞浆进入胞核, 从而可能减少炎症介质和细胞因子如 TNF- α 及 IL-6 等的产生和释放, 从而减轻 SAP 的炎症反应。本研究提示甘遂通过抑制 NF- κ B 活化而起到治疗 SAP 的目的, 这可能是其治疗 SAP 的作用机理之一。

甘遂为大戟科植物, 主要由一些二萜类和三萜类化合物等组成。过去研究表明其有泻下、逐饮等功能^[10]。近年来研究发现甘遂有明显的免疫抑制和抗炎等作用。李嗣英等^[11]用甘遂粗制剂腹腔注射后可使小鼠脾细胞在体外由植物血凝素 (PHA) 和刀豆素 A (conA) 诱导的淋巴细胞转化显著抑制, 表明甘遂有明显的免疫抑制作用。Wu 等^[12]发现甘遂的 2 个二萜类有效成分 Kansuiphorine A 和 Kansuiphorine B 的体内代谢物为蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂。Ogata 等^[13]证实 PKC 可导致 NF- κ B 活化, 而应用 PKC 抑制剂灯盏花素治疗后可抑制 NF- κ B 的活化。刘浩等^[14]也发现雷公内酯醇等免疫抑制剂对 NF- κ B 的活化有抑制作用。提示甘遂抑制 NF- κ B 的活性可能与其免疫抑制和抑制 PKC 活性有关。其作用机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory Mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001, 2(4): 496-501.
- [2] Algul H, Tando Y, Schneider G, et al. Acute experimental Pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation [J]. *Pancreatol*, 2002, 2(6): 503-509.
- [3] 薛建国, 王宇, 许元第. 建立大鼠急性出血坏死性胰腺炎模型方法的改进 [J]. *中华实验外科杂志*, 1994, 11(5): 313.
- [4] Halonen KI, Pettila V, Leppaniemi AK, et al. Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(6): 1274-1279.
- [5] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 226-232.
- [6] Dunn JA, Li C, Ha T, et al. Therapeutic modification of nuclear factor kappaB binding activity and tumour necrosis factor-alpha gene expression during acute biliary pancreatitis [J]. *Am Surg*, 1997, 63(12): 1036-1044.
- [7] Blinman TA, Gukovsky I, Gukovskaya AS, et al. Intrapaneatic expression of cytokines IL-6 and KC is increased in cerulein pan-

- creatitis: regulation by NF-kappaB [J]. *Gastroenterology*, 1998, 114, (4 Pt 2): A443, G1802.
- [8] Chen X, Ji B, Han B, *et al.* NF-kappaB activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122 (5): 448 - 457.
- [9] 吕新生, 张翼, 李宜雄, 等. 甘遂治疗重症急性胰腺炎 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13 (6): 401 - 404.
- [10] 湖南医学院附一院外科中西医结合病室. “下法”在腹腔急性炎症性疾病中的应用 (120例临床观察和动物实验报告) [J]. *中西医结合治疗急腹症通讯*, 1975, (2): 9 - 13.
- [11] 李嗣英. 甘遂对小鼠免疫功能的影响 [J]. *中国药理通讯*, 1989, (2): 10.
- [12] Wu TS, Lin YM, Haruna M, *et al.* Antitumor agents, 119. Kansuiphorins A and B, two novel antileukemic diterpene esters from *Euphorbia kansui* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54 (3): 823 - 829.
- [13] Ogata N, Yamamoto H, Kugiyama K, *et al.* Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor-kappa B in human endothelial cells [J]. *Cadiovasc Res*, 2000, 45 (2): 513 - 521.
- [14] 刘浩, 刘志红, 章精, 等. 雷公藤内酯醇降低 T 淋巴细胞核因子- κ B 的活性 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1998, 7 (4): 312 - 315.

文章编号: 1005-6947(2006)10-0765-01

· 病例报告 ·

儿童直肠冗长症 1 例

周健, 吴学东, 杨利杰, 周晓华

(大理学院附属医院 小儿外科, 云南 大理 671000)

关键词: 直肠/畸形; 儿童; 病例报告

中图分类号: R657.1 **文献标识码:** D

患者 男, 13 岁。因排便时肛门有“肿块”脱出 8 年余入院。8 年前患儿在排便时有肛门异物感, 继之, 排便时均有“肿块”脱出, 排便结束后“肿块”可自行回纳, 无排便疼痛、便血及黏液便, 未作任何诊治。既往体健, 无特殊疾病史。体查: 体重 31.5 kg。消瘦, 营养稍差。心肺(-)。腹部平坦, 全腹无压痛及反跳痛, 未扪及包块。肛门外观无异常, 肛门指检未触及肿块, 指套不染血, 但肛门松弛, 嘱其用力排便时可见约 5.0 cm 环形肿块脱出肛门外, 呈玫瑰花样, 表面黏膜光滑完整, 无糜烂及出血。钡餐肠造影示结肠、直肠肠管通畅, 未见狭窄及受压征象。临床诊断为直肠脱垂。完善肠道准备后, 在连硬外麻下行经肛门乙状结肠切除术, 术中见从齿状线至前腹膜反折的直肠长度为 18.0 cm,

盆底松弛, 在张力下固定乙状结肠于直肠肌鞘 4 针, 以乙状结肠系膜悬吊盆底, 切除乙状结肠共 26.0 cm, 吻合乙状结肠和直肠末端。病理报告: 肠管壁充血水肿, 黏膜层中见散在淋巴细胞浸润。术后 24 h 进食, 1 周复查钡灌肠无异常发现, 治愈出院。随访 1 年, 排便 0~1 次/d, 无复发和肛门狭窄。

讨论 正常儿童的直肠长约 9.6 cm, 成人约 16.0 cm, 而本例患儿从齿状线至前腹膜反折的直肠长达 18.0 cm, 加上上段直肠, 其直肠总长度为 23.0 cm, 是儿童直肠平均长度的 2.5 倍, 参照乙状结肠冗长症的诊断标准, 诊断为直肠冗长症。

在儿童直肠脱垂的发生中, 滑动病学说得到了学者们的普遍接受, 由于直肠黏膜乃至直肠全层滑动, 近端直肠或乙状结肠套入远端直肠甚至脱出肛门外, 因此表现为直肠脱垂, 又称为直肠套叠或直肠疝。营养不良、长期腹泻、便秘是儿童直肠脱垂的常见原因, 通过增加营养、治疗原发病多可以治愈, 而该患儿的直肠脱垂发生过程中直肠滑动可能存在, 由于直肠黏膜与肌层的结构疏松, 排便时随着黏膜

的滑动并牵拉全层向远端滑动, 久而久之, 直肠将有不同程度被拉长, 但难以完全解释该例患儿的直肠冗长, 是由于直肠脱垂导致的直肠增长还是直肠冗长导致脱垂, 两者的因果关系尚难确定。由于直肠冗长, 随着反复的排便和腹压增高, 使冗长的直肠近端套入远端, 继而脱出肛门外表现为直肠脱垂。这也就不难解释为什么本例患儿在没有任何明确病因情况下发生直肠脱垂, 而且随着机体的发育历时 8 年仍不自愈。因此, 对无明确诱因或病因发生直肠脱垂并不随机体发育而愈的患儿应想到有直肠冗长存在之可能。

对于直肠冗长导致的直肠脱垂, 用传统方法如硬化剂注射、肛门环缩或经腹直肠悬吊将难以达到理想的治疗效果, 应切除多余的直肠并作盆底悬吊。经肛门乙状结肠切除是可供选择的手术途径和治疗方法, 而术中切除多余肠管后在张力下吻合, 以达到利用乙状结肠系膜和骶前韧带悬吊盆底的目的。本例患儿的治疗结果表明, 采用该法的治疗效果确切。

收稿日期: 2006-09-07。

作者简介: 周健, 男, 浙江江山人, 大理学院附属医院硕士研究生, 主要从事小儿外科基础与临床方面的研究。

通讯作者: 周健 E-mail: zhj20040202@163.com。