

· 基础研究 ·

急性胰腺炎时胰腺诱生型一氧化氮合酶及瘦素与肠壁通透性的关系及大黄素对其的影响

吴 晖*, 谢红梅, 刘江奎, 罗 俊, 黄泽俊, 李江宁

(华北石油总医院消化科, 任丘 062552)

【摘要】 目的 探讨大黄素在急性胰腺炎(AP)时对胰腺诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和血清瘦素表达,以及对肠壁通透性的影响及作用机制。方法 60只成年SD大鼠随机分为AP组($n=20$),假手术组($n=20$),和大黄素组($n=20$)。检测血清淀粉酶活性、血清瘦素含量、胰腺组织中iNOS及NO含量、肠黏膜通透性(以血液与肠内 ^{125}I -清蛋白累积指数表示),并对胰腺和回肠进行病理学检查。结果 AP组和大黄素组血清淀粉酶活性、瘦素含量、胰腺组织内的NO和iNOS水平及 ^{125}I -清蛋白累积指数均显著高于假手术组($P<0.05$);与AP组比较,大黄素组血清淀粉酶活性、胰腺组织内的NO、iNOS水平及 ^{125}I -清蛋白累积指数均显著下降($P<0.05$),血中瘦素含量明显升高($P<0.05$),同时胰腺及回肠病理损害明显减轻。结论 AP肠壁通透性增加的原因之一可能与AP时胰腺iNOS的过度表达产生过多NO有关,大黄素可降低胰腺iNOS的表达,该作用可能与升高血清瘦素水平有关,大黄素对降低AP时肠壁通透性的增加有一定预防和治疗作用。

【关键词】 急性胰腺炎; 瘦素; 一氧化氮合酶; 肠壁通透性; 大黄素

【中图分类号】 R576

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00033

Relationship of pancreatic inducible nitric oxide synthase expression and serum leptin with intestinal permeability and effect of emodin on it in rats with acute pancreatitis

WU Hui*, XIE Hongmei, LIU Jiangkui, LUO Jun, HUANG Zejun, LI Jiangning

(Department of Gastroenterology, Huabei Petroleum General Hospital, Renqiu 062552, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of emodin on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression of pancreatic tissue, serum leptin and intestinal permeability in rats with acute pancreatitis(AP) and the relative mechanism. **Methods** Sixty adult SD rats were randomly divided into three groups: sham operation group, AP group, and emodin treatment group, with 20 in each group. The expressions of iNOS and NO in pancreatic tissue were measured. Blood amylase(AMY) and serum content of leptin were detected. Intestinal permeability was measured by albumin clearance(AC) of ^{125}I -labeled rat serum albumin. The histopathologic changes of pancreas and ileum were observed. **Results** The blood AMY, plasma content of leptin, cumulative ^{125}I -labeled serum albumin index and the levels of iNOS and NO in pancreatic tissue were significantly higher in AP group and emodin treatment group than in sham operation group($P<0.05$). Compared with AP group, in emodin treatment group, the levels of iNOS and NO in pancreatic tissue, the blood AMY and cumulative ^{125}I -labeled serum albumin index were significantly decreased($P<0.05$); the serum content of leptin was increased; the pathological changes of pancreas and ileum were significantly alleviated($P<0.05$). **Conclusion** The increase of intestinal permeability in rats with AP may be induced by overexpression of NO via action of iNOS. Emodin is effective in the increase of the serum leptin and the decrease of iNOS. Emodin has certain preventive and therapeutic effects on bowel wall permeability decrease in AP rats.

【Key words】 acute pancreatitis; leptin; nitric oxide synthase; intestinal permeability; emodin

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种发生在正常胰腺组织的炎症性疾病,80%的患者为良性进程,死亡率为1%;20%的患者可能发展为更严

重的器官功能不全,即重症急性胰腺炎,发病率和死亡率明显增加。在胰腺炎患者中,内毒素血症,腹部感染和败血症是其主要的并发症,这些感染很可

能来源于胃肠道细菌移位,特别是胰腺炎患者多表现为肠黏膜屏障障碍更证明了这一点。因此,在重症急性胰腺炎期间维护肠黏膜屏障对于延迟疾病的发展,减少死亡率有重要意义^[1]。

肠道是产生炎性介质的一个重要源泉,肠道所产生的炎症因子和其他介质如内毒素能激活胰腺内诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)合成,导致细胞间介质的一氧化氮(nitric oxide, NO)过量表达。经此途径的NO过量表达是急性胰腺炎血流动力学紊乱的一个重要因素^[2]。瘦素是脂肪细胞分泌的一种激素,参与能量代谢调节,研究表明急性胰腺炎时瘦素可以通过调节iNOS而改变NO的含量^[3]。近年来,大黄素用于AP治疗的研究取得了很大的进展,已有动物实验表明,在急性胰腺炎时应用大黄素可以提高血中瘦素的水平^[4]。本研究旨在通过建立大鼠AP模型,观察大黄素干预对AP大鼠血浆内淀粉酶、血清瘦素、胰腺组织中iNOS活性和NO表达及肠黏膜通透性的影响,探讨大黄素对AP时肠黏膜屏障保护的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与处理

SD雌性大鼠60只,体质量200~250g。由河北医科大学生理实验动物中心提供。随机分为AP组、假手术组和大黄素组,每组20只。所有大鼠常规室温鼠料喂养,术前12h禁食,自由饮水,1%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(30mg/kg)。无菌条件下,取上腹部正中切口入腹腔,提起胃、十二指肠,显露胰腺,确认胆胰管,无创血管夹钳夹胆胰管的上下两端,采用加工的1ml注射器针头距肝门0.3cm潜在穿刺胆胰管,插入胆胰管0.3cm,指压穿刺点,查无漏胆后,AP和大黄素组以0.2ml/min速度推注5%牛磺胆酸钠(Sigma公司)溶液,剂量为1.5ml/kg;注毕压迫穿刺孔5min后去无创血管夹,见胰腺明显水肿后,逐层关腹腔并计时;假手术组按照胰腺炎造模方法,胰胆管内注射生理盐水。大黄素组于关腹前腹腔注射5g/L大黄素溶液(淮安久泰生化公司),给药体积5ml/kg;AP组和假手术组注入等量生理盐水。

1.2 标本采集方法

术后大鼠分笼饲养,自由饮水。术后23h,三组大鼠按上述方法麻醉后行颈动脉插管,由此管缓慢推注1ml¹²⁵I-清蛋白后动脉夹夹闭颈动脉近端;1h后去除动脉夹取血标本,加少许肝素混匀,2500r/min离

心15min,取血浆-20℃保存待测定。24h时放血处死动物后立即剖腹结扎10cm末端回肠;收集并称取肠内容物,取胰腺及回肠组织作标本。其中胰腺组织分成两部分:一部分10%福尔马林固定,用于胰腺组织形态观察;另一部分制成匀浆,-20℃保存,用于测定胰腺组织NO含量和iNOS活性。

1.3 观察项目及检测指标

1.3.1 血清淀粉酶(amyase, AMY)检测 取保存待测样本,用全自动生化分析仪(Cobasmira公司,瑞士)测定。

1.3.2 胰腺组织iNOS活性测定 采用Sigma公司iNOS检测试剂盒,利用同位素标记法测定iNOS活性。iNOS活性以单位时间内每mg蛋白生成L-脯氨酸的pmol数即mol/(mg·min)表示。

1.3.3 胰腺组织中NO含量测定 采用南京建成生物工程研究所提供的NO检测试剂盒,NO硝酸还原酶法测定。

1.3.4 血清瘦素测定 按照瘦素放射免疫分析试剂盒(北方生物技术研究所,北京)说明书操作。

1.3.5 ¹²⁵I-清蛋白测定 术后23h,如前所述麻醉动物后行颈动脉插管,缓慢推注 19.5×10^5 cpm/ml¹²⁵I-清蛋白(福瑞生物工程公司,北京)1ml,1h后剖腹,结扎10cm末端回肠,收集并称取肠内容物,同时采血0.5ml。二者均用Gamby-CRγ-计数器(德普公司,美国)测定放射性。用累积指数表示肠黏膜通透性^[5]。累积指数=肠内容物放射性(cpm/g)×100/血液放射性(cpm/ml)。

1.3.6 病理学检查 取相同部位胰腺及回肠组织,10%福尔马林固定,石蜡包埋切片后HE染色,光学显微镜下观察。胰腺病理评分参考Schmidt评分标准^[6]。

1.4 统计学处理

实验结果以均数±标准差表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物一般情况

AP组动物可观察到精神萎靡、卷曲、活动少、进食饮水差,有呕吐等现象。假手术组动物活动反应敏捷,进食饮水良好。大黄素组一般情况较假手术组差,但较AP组好。

2.2 血清AMY和瘦素水平的变化

AP组和大黄素组的AMY显著高于假手术组($P < 0.05$),大黄素组AMY明显低于AP组($P < 0.05$);AP组和大黄素组瘦素水平明显高于假手术组($P < 0.05$),大黄素组血清瘦素水平明显高于AP组($P < 0.05$;表1)。

表1 3组动物血清AMY、瘦素、胰腺iNOS和NO浓度的变化
Table 1 Change of AMY, leptin, pancreatic iNOS and NO in animals (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	AMY(U/L)	NO ₂ /NO ₃ ⁻ (μmol/L)	iNOS[mol/(mg·min)]	瘦素(μg/L)
假手术组	485.00 ± 87.23	27.78 ± 11.34	0.50 ± 0.11	11.32 ± 4.22
AP组	2437.00 ± 478.18*	98.00 ± 27.15*	29.60 ± 7.31*	20.81 ± 6.28*
大黄素组	1643.00 ± 357.34#	47.32 ± 16.78#	3.40 ± 0.75#	28.13 ± 7.95*#

注: AMY: 淀粉酶; iNOS: 诱生型一氧化氮合酶。与假手术组比较, *P < 0.05; 与AP组比较, #P < 0.05

2.3 胰腺 iNOS 活性与 NO 含量的变化

AP 组胰腺组织中 iNOS 活性和 NO 水平显著高于假手术组 (P < 0.05); 与 AP 组比较, 大黄素组胰腺组织中 NO 含量和 iNOS 活性明显下降 (P < 0.05; 表 1)。

2.4 ¹²⁵I-清蛋白累积指数的变化

AP 组和大黄素组的 ¹²⁵I-清蛋白累积指数明显高于假手术组 (P < 0.05); 大黄素组 ¹²⁵I-清蛋白累积指数显著低于 AP 组 (P < 0.05; 表 2)。

2.5 胰腺及回肠组织病理变化

假手术组胰腺和回肠结构未见异常。AP 组胃肠积液积气明显, 腹水为血性, 腹腔内广泛皂化斑; 胰腺间质有不同程度水肿、充血, 小叶间隙、腺泡间隙及细胞间隙增宽, 出现不同程度的出血、坏死及炎性细胞浸润; 肠黏膜上皮细胞可见变性、坏死, 绒毛排列紊乱及脱落, 毛细血管扩张、充血。大黄素组病理改变较假手术组重, 但较 AP 组轻, 胰腺仅有点状坏死, 回肠黏膜绒毛基本完整无水肿 (图 1, 2)。AP 组的病理评分分值明显高于大黄素和假手术组 (P < 0.05); 而大黄素组分值显著低于 AP 组 (P < 0.05; 表 2)。

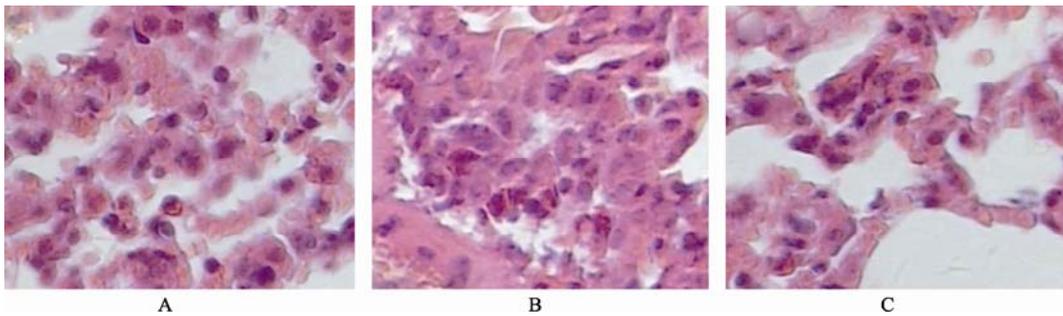


图 1 胰腺组织病理改变
Figure 1 Pathological changes of pancreatic tissue (HE staining ×200)
A: 假手术组; B: AP 组; C: 大黄素组

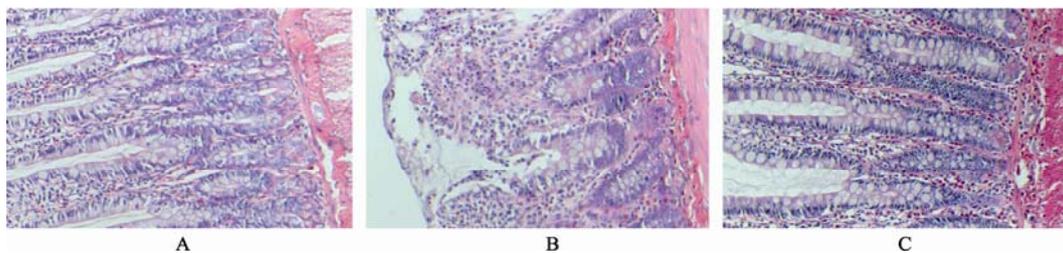


图 2 回肠组织病理改变
Figure 2 Pathological changes of ileal tissue (HE staining ×200)
A: 假手术组; B: AP 组; C: 大黄素组

表2 3组动物¹²⁵I-清蛋白累积指数和胰腺组织病理评分
Table 2 Cumulative ¹²⁵I-labeled serum albumin index and pathological score of pancreas in animals (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	累积指数	评分
假手术组	3.24 ± 0.63	0.6 ± 0.2
AP组	6.32 ± 1.25*	8.9 ± 1.8*
大黄素组	4.32 ± 0.98*#	4.8 ± 1.0#

注: 与假手术组比较, *P < 0.05; 与AP组比较, #P < 0.05

3 讨论

AP时由于肠黏膜屏障功能受损, 细菌移位造成

胰周感染, 从而继发全身感染, 导致全身炎症反应综合征及多器官功能衰竭^[6], 是导致急性胰腺炎患者死亡的主要原因。

NOS可分为两种形式: 结构型NOS(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)和iNOS, cNOS存在于脑和 endothelial 细胞, 在正常情况下即可被激活产生NO, 所产生的NO主要作用于位于血管平滑肌中的鸟苷酸循环中的鸟苷酸环化酶, 使cGMP水平增高, 导致血管扩张。iNOS存在于巨噬细胞、血管平滑肌细胞、

激活的中性粒细胞及内皮细胞中,为病理性酶。在正常条件下,细胞内iNOS表达甚少,但在某些特殊情况,如在脂多糖和细胞因子的作用下,iNOS表达增高,且可维持一段时间,其催化产生的过量NO,可能产生组织细胞毒^[7]。

AP时肠壁通透性增高的原因,一方面是由于胰腺病理损害引起有效循环血量不足,肠道处于缺血、缺氧状态,激活肠道局部释放大血小板、肿瘤坏死因子 α 等,导致肠黏膜屏障功能的损伤;另一方面,AP时胰腺组织内iNOS过度表达,导致血中NO明显升高,现已有研究表明NO水平与AP时肠道损伤有密切的关系^[8,9]。

瘦素是由肥胖基因编码的蛋白质,由脂肪细胞和各种其他细胞分泌。有研究表明,急性胰腺炎时,血清瘦素的表达增加,其通过以下途径发挥AP时对胰腺的保护作用:(1)提高胰腺组织的血流量^[10];(2)促进胰腺细胞生成,抑制促炎性因子白介素 1β 的释放^[9];(3)提高eNOS,降低iNOS活性^[11,12]。本实验结果表明,大黄素组血清瘦素水平较AP组明显增高,提示大黄素在AP时对胰腺的保护作用可能与升高血清瘦素水平有关。

大黄在临床上用于治疗AP已写入急性重症胰腺炎治疗指南,本研究表明给予AP大鼠大黄素干预,可抑制胰腺的炎症反应,降低肠壁的通透性,对胰腺具有较好的保护作用,其作用机制可能与升高了血清中的瘦素水平有关。

【参考文献】

- [1] Ederoth P, Sun Z, Nordstrom CH, *et al.* Experimental pancreatitis causes acute perturbation of energy metabolism in the intestinal wall[J]. *Pancreas*, 2002, 25(3): 270-276.
- [2] Al-Mufti RA, Williamson RC, Mathie RT. Increased nitric oxide activity in a rat model of acute pancreatitis[J]. *Gut*, 1998, 43(4): 564-570.
- [3] Gultekin FA, Kerem M, Tatlicioglu E, *et al.* Leptin treatment ameliorates acute lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(21): 2932-2938.
- [4] 王婧, 阴赓宏, 路琴, 等. 大黄素对重症急性胰腺炎大鼠血清瘦素的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2007, 16(11): 1141-1145.
- [5] Sawa H, Ueda T, Takeyama Y, *et al.* Treatment outcome of selective digestive decontamination and enteral nutrition in patients with severe acute pancreatitis[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14(5): 503-508.
- [6] Schmidt J, Lewandrowski K, Fernandez-del Castillo C, *et al.* Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 1992, 37(9): 1426-1433.
- [7] Mashimo H, Goyal RK. Lessons from genetically engineered animal models. IV. Nitric oxide synthase gene knockout mice[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(4 Pt 1): G745-G750.
- [8] 石承先, 李玉祥, 张莹. 急性胰腺炎胰腺iNOS mRNA的表达与肠壁通透性的关系及丹参对其的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(9): 848-851.
- [9] Dossin O. Laboratory tests for diagnosis of gastrointestinal and pancreatic diseases[J]. *Top Companion Anim Med*, 2011, 26(2): 86-97.
- [10] Warzecha Z, Dembiński A, Ceranowicz P, *et al.* Influence of leptin administration on the course of acute ischemic pancreatitis[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2002, 53(4 Pt 2): 775-790.
- [11] 李燕书, 闫军, 孙晓刚, 等. 外源性瘦素在急性胰腺炎时对一氧化氮、一氧化氮合酶表达的影响[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2009, 15(3): 227-228.
- [12] Zhang J, Yuan C, Hua G, *et al.* Early gut barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis: attenuated by continuous blood purification treatment[J]. *Int J Artif Organs*, 2010, 33(10): 706-715.

(编辑: 任开环)