

文章编号:1005-6947(2006)06-0442-03

· 基础研究 ·

高压氧对大鼠急性坏死性胰腺炎血内毒素、sCD14及血浆灭活内毒素能力的影响

唐大年¹, 李永国², 朱明炜¹, 吴蓓², 贺修文¹, 韦军民¹

(1. 卫生部北京医院 普通外科, 北京 100730; 2. 中南大学湘雅二医院 普通外科, 湖南 长沙 410011)

摘要:目的 探讨高压氧(HBO)实验性治疗对大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)血内毒素、sCD14及血浆灭活内毒素能力(EIC)的影响及其相关机制。方法 将SD大鼠随机分为对照组、假手术组、ANP组和ANP+HBO(治疗)组。ANP模型建立30min后,治疗组给予HBO治疗2h。测定各组建模3,6,10h后的血内毒素水平,sCD14,EIC, TXB₂和6-K-PGF_{1a}水平。结果 建模3h和6h后,治疗组的内毒素水平、sCD14和TXB₂水平明显低于ANP组($P < 0.05$),而EIC明显高于ANP组($P < 0.05$)。结论 高压氧对大鼠ANP的治疗可能系通过改善胰腺微循环,增强EIC,降低血内毒素和sCD14水平而实现。

关键词: 胰腺炎/治疗; 高压氧,内毒素/血液; sCD14/血液

中图分类号: R576; R459.6

文献标识码: A

The effect of hyperbaric oxygen treatment on plasma endotoxin, sCD14 and plasma endotoxin inactivation capacity in acute necrotizing pancreatitis in rats

TANG Da-nian, LI Yong-guo, ZHU Ming-wei, WEI Jun-ming, WU Bei, HE Xiu-wen

(Department of General Surgery, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of hyperbaric oxygen (HBO) treatment on plasma endotoxin, sCD14 and plasma endotoxin inactivation capacity (EIC) in acute necrotizing pancreatitis (ANP) in rats and its possible mechanism. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, sham operation group, ANP group and ANP + HBO group. Rat ANP models were made by retrograde injection of 3.5% sodium taurocholate (2.5 mL/kg) into the pancreatic duct. Thirty minutes after models had been made, ANP + HBO group was treated by hyperbaric oxygen for 2 h. At 3 h, 6 h, and 10 h after establishment of rat models, the plasma endotoxin, sCD14, EIC, TXB₂ and 6-K-PGF_{1a} levels were determined in each group. **Results** At 3 h and 6 h after rat models were established, the levels of endotoxin, sCD14, and TXB₂ in ANP + HBO group were significantly lower than those in ANP group ($P < 0.05$); EIC level in ANP + HBO group was significantly higher than that in ANP group ($P < 0.05$). **Conclusions** Through improvement of microcirculation, HBO could increase the level of EIC and decrease the level of endotoxin and sCD14 in ANP rats.

Key words: Pancreatitis/ther; Hyperbaric Oxygen; Endotoxin/blood; sCD14/blood

CLC number: R576; R459.6

Document code: A

当临床发现 ANP 的早期就多已造成多器官功能障碍综合征,并迅速发展为休克和多器官衰竭。众多学者认为其原因可能是由于胰腺的血液微循环障碍、肠道细菌移位,以及机体血浆灭活内毒素

的能力下降,导致血内毒素水平和机体对内毒素敏感性水平的升高,因此内毒素被认为是急性胰腺炎全身炎症反应的重要触发剂。可溶性 CD14 (sCD14)是介导内毒素反应应答的功能性受体,内毒素与 sCD14 结合后,可明显提高多种细胞对内毒素的敏感性,使内毒素的活性增高数倍。这种增敏效应使炎症反应呈瀑布样连锁放大,并形成恶性循环,最终导致感染性休克和多器官衰竭^[1]。而且 sCD14 的这种增敏效应的强弱与其基因表达的量有

收稿日期:2005-12-23; 修订日期:2006-05-27。

作者简介:唐大年,男,湖南长沙人,卫生部北京医院副教授,主要从事肝胆胰方面的研究。

通讯作者:唐大年 E-mail:tangdn@126.com。

关^[2]。本研究通过建立急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠模型,观察高压氧(HBO)治疗后的实验性ANP大鼠血中内毒素和sCD14的变化及对血浆灭活内毒素能力(EIC)的影响,并探讨其可能机制,为临床开展HBO治疗急性胰腺炎提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物:雄性SD大鼠50只,体重(286±30)g。由中南大学实验动物中心提供。试剂及药品:牛磺胆酸(Sigma公司),内毒素试剂盒(上海医用化学研究所),sCD14试剂盒(ABL公司),TXB₂,6-k-PGF_{1α}放免试剂盒(解放军总医院)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 动物随机分成4组:正常对照组10只,仅开腹;假手术组10只,麻醉开腹后,翻动胰腺组织,不作处理;ANP组20只;ANP+HBO治疗组20只。

1.2.2 ANP大鼠模型的建立 参照Kaplan等^[3]方法,大鼠禁食12h,自由饮水,3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(30mg/kg)。进腹后,分离胆胰管进入十二指肠3~5mm,逆向穿刺胆胰管并注射3.5%牛磺胆酸钠(2.5mL/kg)。在4kPa(1kPa=7.5mmHg)压力下缓慢注射。注射结束时用无损伤血管夹住穿刺处,避免牛磺胆酸外溢,30min后放松血管夹。在确认胰腺出现水肿并见有散在出血灶之后,方进行后续实验。

1.2.3 HBO治疗 模型建立30min后,将动物连同笼子置于有进气和排气阀的气密有机玻璃舱内,暴露于HBO环境中2h(加压30min,稳压1h,减压30min),舱内压力为0.25mPa(2.5ATA),氧浓度>97%。

1.2.4 血标本的制备 动物模型建立后3,6,10h,各组分别从门静脉抽血。收集的标本贮存于-20℃冰箱内待测。

1.2.5 内毒素的检测 采用偶氮显色法试验定量血清中的内毒素。建立的内毒素线性回归方程为:Conc(EU/mL)=0.187Abs+0.0047, $r_2=0.991$ 。重复性误差(CV)=(7.6±2.5)%,回收率=(94±10)%。

1.2.6 血浆灭活内毒素能力(EIC)的测定^[6] EIC测定需和内毒素标本同时进行。其基本原理:定量分析血浆样品(100μL)在加入4EU的内毒素标准品后测定值减去该血浆中的内毒素的基础值,其差值即为血浆EIC。测定中加入的内毒素标准品应和重现内毒素标准曲线的标准品相一致。方法的重复性误差(CV)=(88±13)%,回收率=

(91±7)%。

1.2.7 血栓素2(TXB₂),6-酮-前列腺素1a(6-K-PGF_{1α})的检测 按试剂盒要求操作。

1.3 统计学处理

将所得数据用SYSTAT软件包在IBM-PC微机上以方差分析和卡方检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 各组动物不同时间血内毒素水平的变化

动物建模后3,6,10h后,与正常组和假手术组相比,ANP组的内毒素水平明显升高($P<0.05$);而治疗组仅在10h后内毒素水平才明显升高($P<0.05$)。治疗组的内毒素水平在动物建模后3,6h明显低于ANP组($P<0.05$),但10h后差异无显著性($P>0.05$)(表1)。

表1 HBO治疗对ANP大鼠血内毒素水平的影响

组别	例数	血内毒素水平(EU/mL, $\bar{x} \pm s$)		
		建模后/3h	6h	10h
正常对照	10	0.16±0.04 ¹⁾	0.17±0.03 ¹⁾	0.16±0.07 ^{1),2)}
假手术	10	0.21±0.06 ¹⁾	0.23±0.11 ¹⁾	0.17±0.04 ^{1),2)}
ANP	20	0.46±0.13 ¹⁾	0.62±0.26	0.83±0.17 ^{1),2)}
ANP+HBO治疗	20	0.27±0.09 ³⁾	0.32±0.16 ³⁾	0.71±0.24

注:1)与正常及假手术组比较, $P<0.05$;2)与正常及假手术组比较, $P<0.05$;3)与ANP组比较 $P<0.05$

2.2 各组动物不同时间血sCD14水平的变化

与正常组和假手术组相比,动物模型建立3,6,10h后,ANP组的sCD14水平明显升高($P<0.05$);而治疗组的sCD14水平只是在10h后才明显升高($P<0.05$)。治疗组的sCD14水平在动物模型建立3,6h后明显低于ANP组($P<0.05$),但在10h差异无显著性($P>0.05$)(表2)。

表2 HBO治疗对ANP大鼠血sCD14的影响

组别	鼠数	血sCD14水平(μg/mL, $\bar{x} \pm s$)		
		建模后/3h	6h	10h
正常	10	2.4±1.3 ^{1),2)}	2.6±1.5 ^{1),2)}	2.7±1.7 ^{1),2)}
假手术	10	2.6±1.5 ^{1),2)}	3.4±1.1 ^{1),2)}	3.2±1.8 ^{1),2)}
ANP	20	5.4±1.3	6.4±1.2	8.1±1.9
ANP+HBO治疗	20	2.9±1.1 ³⁾	4.1±1.8 ³⁾	6.9±1.7

注:1)与正常及假手术组比较, $P<0.05$;2)与正常及假手术组比较, $P<0.05$;3)与ANP组比较 $P<0.05$

2.3 各组动物不同时间血浆EIC水平的变化

与正常组和假手术组相比,动物建模3h后,ANP组的血浆EIC明显升高($P<0.05$),但10h后ANP组的EIC明显降低($P<0.05$);治疗组的EIC水平在动物建模3,6h后明显升高($P<0.05$),在10h时无明显差异($P>0.05$)。动物建模3,6h后,治疗组EIC水平明显高于ANP组($P<0.05$),在10h后差异无显著性($P>0.05$)(表3)。

表3 HBO治疗对ANP大鼠血浆EIC的影响

组别	鼠数	血浆 EIC(EU/mL, $\bar{x} \pm s$)		
		建模后/3h	6h	10h
正常	10	0.149 ± 0.01 ^(1,2)	0.155 ± 0.03 ⁽²⁾	0.146 ± 0.05 ⁽¹⁾
假手术	10	0.168 ± 0.006 ^(1,2)	0.175 ± 0.01 ⁽²⁾	0.157 ± 0.008 ⁽¹⁾
ANP	20	0.193 ± 0.009	0.163 ± 0.006	0.116 ± 0.01
ANP + HBO 治疗	20	0.266 ± 0.006 ⁽³⁾	0.289 ± 0.007 ⁽³⁾	0.176 ± 0.009

注:1)与正常及假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与正常及假手术组比较, $P < 0.05$; 3)与 ANP 组比较 $P < 0.05$

表4 HBO对ANP大鼠血TXB₂和6-K-PGF_{1a}水平的影响($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	鼠数	建模后 3h		6h		10h	
		TXB ₂	6-K-PGF _{1a}	TXB ₂	6-K-PGF _{1a}	TXB ₂	6-K-PGF _{1a}
正常组	10	182 ± 57 ^(1,2)	279 ± 87 ^(1,2)	193 ± 63 ^(1,2)	291 ± 69 ^(1,2)	189 ± 47 ^(1,2)	285 ± 74 ^(1,2)
假手术组	10	186 ± 87 ^(1,2)	265 ± 79 ^(1,2)	176 ± 66 ^(1,2)	276 ± 59 ^(1,2)	192 ± 37 ^(1,2)	296 ± 97 ^(1,2)
ANP	20	436 ± 137	486 ± 157	576 ± 67	576 ± 126	616 ± 174	636 ± 157
ANP + HBO 治疗	20	256 ± 87 ⁽³⁾	516 ± 159	296 ± 99 ⁽³⁾	649 ± 153	546 ± 86	696 ± 175

注:1)与正常及假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与正常及假手术组比较, $P < 0.05$; 3)与 ANP 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

在 ANP 的治疗早期, 如何增强机体灭活内毒素的能力和降低内毒素及 sCD14 水平, 是临床亟待解决的难题之一。

HBO 治疗已广泛应用于临床, 该方法能迅速提高血氧含量, 增加血氧弥散, 及时改善心、脑、肾等主要脏器供氧和微循环; 同时它可促进肠蠕动的恢复, 抑制细菌生长, 减轻内毒素血症, 从而减少炎性介质释放的启动因素, 预防多器官衰竭的发生。但用 HBO 治疗急性胰腺炎鲜有报道。本研究基于上述设想, 通过 ANP 大鼠模型的建立, 观察 HBO 实验性治疗对大鼠 ANP 血内毒素、sCD14 的水平及血浆灭活内毒素能力的影响, 并探讨其可能机制。

实验结果显示: 早期 HBO 治疗, 在建模 3h 和 6h 后, 治疗组内毒素水平和 sCD14 水平明显低于 ANP 组 ($P < 0.05$); 而 EIC 水平明显高于 ANP 组 ($P < 0.05$)。但在 10h 后两组之间的内毒素、sCD14 和 EIC 差异无显著性。表明在治疗早期 HBO 能有效地提高机体清除内毒素的能力, 降低内毒素以及相应受体的表达水平。但随着病情的进一步发展, 单一的 HBO 治疗效果不佳。

急性胰腺炎的缺血和血循环障碍与花生四稀酸的代谢产物 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1a} 有关^[5]。TXB₂ 具有血管异常收缩、血小板聚集、微血栓形成, 造成缺血和微循环损害的作用; 而 6-K-PGF_{1a} 有对抗 TXB₂ 的作用, 使血管扩张, 改善微循环。本实验显示: 与正常组和假手术组相比, 动物建模 3, 6, 10h 后, ANP 组和治疗组的血浆 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1a} 均明显升高

2.4 各组动物不同时间血浆 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1a} 的变化

与正常组和假手术组相比, 动物建模 3, 6, 10h 后, ANP 组和治疗组的血浆 TXB₂ 和 6-K-PGF_{1a} 均明显升高 ($P < 0.05$)。但动物建模 3, 6h 后, 治疗组的 TXB₂ 水平明显低于 ANP 组 ($P < 0.05$) (表 4)。

($P < 0.05$), 且 ANP 组 TXB₂ 的升高更为明显。动物建模 3h 和 6h 后, 治疗组的 TXB₂ 水平明显低于 ANP 组 ($P < 0.05$)。推测 HBO 治疗改善胰腺微循环的可能机制是通过明显抑制急性胰腺炎血浆 TXB₂ 水平的升高, 而对 6-K-PGF_{1a} 只有轻微的抑制作用, 相对增加了 6-K-PGF_{1a} 的水平, 使 6-K-PGF_{1a}/TXB₂ 的比值升高, 并趋向 6-K-PGF_{1a} 变化。

HBO 对 ANP 的治疗可能系通过抑制 TXB₂ 水平的升高从而改善胰腺微循环, 提高机体清除内毒素的能力, 降低内毒素和 sCD14 的表达水平, 导致 ANP 的发展受阻, 本实验结果可为 ANP 的早期高压氧治疗提供理论依据。

参考文献:

- [1] Ueda T, Takeyama Y, Toyokawa A, et al. Significant elevation of serum human hepatocyte growth factor level in patients with acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 1996, 12(1): 76-83.
- [2] Moore KJ, Andersson LP, Ingalls RR, et al. Divergent response to LPS and bacteria in CD-deficient murine macrophage [J]. *J Immunol*, 2000, 165(8): 4272-4280.
- [3] Kaplan O, Kaplan D, Casif E, et al. Effects of delayed administration of Octreotide in acute experimental pancreatitis [J]. *J Surg R*, 1996, 62(1): 109-117.
- [4] Berger D, Schleich S, Seidman M, et al. Correlation between endotoxin-neutralizing capacity of human plasma as tested by the limulus-amebocyte-lysate-test and plasma protein level [J]. *FEBS*, 1990, 277(1): 33-36.
- [5] 王昆华, 廖吉勋, 李达科, 等. 急性胰腺炎大鼠不同途径灌注改善微循环药物后血浆血栓素 A2 前列腺素的变化 [J]. *中华实验外科杂志*, 1998, 15(5): 396-398.