

文章编号:1005-6947(2007)10-0976-03

· 基础研究 ·

wortmannin 对重症急性胰腺炎大鼠胰肝损伤的保护作用

李丙所, 蔡文科, 任彦顺, 党军强, 周红兵, 窦科峰, 赵青川

(第四军医大学西京医院 肝胆外科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 探讨 wortmannin 预处理对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肝损伤的保护作用及其可能机制。方法 健康成年SD大鼠54只,随机分为对照组(C组)、SAP组(P组)和SAP + wortmannin组(PW组),每组18只。除C组以生理盐水代牛磺胆酸钠外,另两组逆行胆胰管注射50g/L牛磺胆酸钠制备SAP模型。各组分别于术后3,6,12h检测血清中TNF- α , ALT, AST水平及肝组织中NF- κ B活性,观察肝组织及胰腺组织的病理变化。结果 P组血清中TNF- α , ALT, AST水平及肝组织中NF- κ B活性(积分灰度)均显著高于C组($P < 0.01$);胰腺、肝组织病理损伤随病情进展而逐渐加重。PW组较C组各项指标均升高,但较P组明显降低($P < 0.01$);且胰腺、肝组织病理损伤亦较P组减轻。结论 wortmannin 预处理对SAP大鼠胰肝损伤有一定的保护作用,其机制可能与其抑制了NF- κ B的活化、减少TNF- α 等多种炎症因子的释放有关。 [中国普通外科杂志,2007,16(10):976-978]

关键词: 胰腺炎,急性坏死性/病理学; wortmannin; NF- κ B; 肝损伤

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

Protective effect of wortmannin against pancreas and liver injuries induced by severe acute pancreatitis in rats

LI Bing-suo, CAI Wen-ke, REN Yan-shun, DANG Jun-qiang, ZHOU Hong-bing, DOU Ke-feng, ZHAO Qing-chuan

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To observe the protective effect of pretreatment with wortmannin against pancreas and liver injuries induced by severe acute pancreatitis (SAP) in rats and investigate its mechanism.

Methods Fifty-four SD rats were randomly divided into 3 groups: control group (C group), SAP group (P group) and SAP + wortmannin group (PW group) ($n = 18$ per group). SAP model was induced by retrograde infusion of 50g/L sodium taurocholate into the biliopancreatic duct of rats, except C group in which sodium taurocholate was replaced by normal saline. Serum level of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) in liver were detected. Histopathology of liver and pancreas was studied. **Results** In P group, serum levels of TNF- α , ALT, AST and NF- κ B in liver were significantly elevated ($P < 0.01$); the liver and pancreas injuries were gradually aggravated with disease progression. All the indicators of PW group were also elevated compared with C group, but still significantly decreased as compared with P group ($P < 0.01$).

Conclusions Pretreatment with wortmannin could decrease pancreas and liver injury in pancreatitis rats. The mechanism may be related to the inhibition on the activation of NF- κ B and on the release of TNF- α and other inflammatory factors. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(10): 976-978]

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; wortmannin; NF- κ B; liver injuries

CLC number: R 657.51

Document code: A

基础项目:国家自然科学基金资助项目(30271281)(30170923)

收稿日期:2007-08-21; 修订日期:2007-10-08。

作者简介:李丙所,男,山东烟台人,第四军医大学西京医院硕士研究生,主要从事肝肿瘤与腹外伤方面的研究。

通讯作者:窦科峰 E-mail:gdwk@fmmu.edu.cn; 赵青川 E-mail:zhaocq@fmmu.edu.cn

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP),除发生胰腺病变外,常伴有多器官损伤。由于胰腺腺泡细胞受损后血管内皮细胞、淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等活化,释放出大量化学因子和细胞因子,除加重胰腺体本身损伤外,还可造成SAP时肝脏损伤^[1]。核因子(NF)- κ B在缺血再灌注(I/R)损伤的发展中,对某些促炎症因子基因的表达起着重要的调节作用^[2]。wortmannin是PI3K信号转导通路的抑制剂,它是否能够通过抑制NF- κ B的活化而减少炎症因子的释放,减轻SAP过程中的胰腺肝脏损伤?对此目前研究报道甚少。笔者通过wortmannin对大鼠的预处理,观察其对SAP时胰腺肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

Wortmannin(Sigma公司),牛磺胆酸钠(Sigma公司)溶于生理盐水中终浓度50g/L。肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒为晶美生物工程公司产品。成年雌性SD大鼠54只,体重220~270g,由第四军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组

将54只大鼠随机分为3组:对照组(C组),SAP组(P组)和SAP+wortmannin预处理组(PW组),每组18只。各组又分为术后3,6,12h组,每组6只。大鼠术前12h禁食,自由饮水。

1.3 试验方法

1.3.1 动物模型的建立 1%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠。取上腹部正中切口,显露胰腺,确认胆胰管后,以动脉夹夹闭其远端(靠近十二指肠)和近端(左右肝管汇合处),然后对各组进行以下处理:P组及PW组用1mL注射器针穿刺贴近胆胰管十二指肠开口处之胆管,以0.2mL/s的速度匀速逆行注入5%牛磺胆酸钠(0.8mL/kg);注射毕以动脉夹继续夹闭胆胰管3~4min,使牛磺胆酸钠充分进入胰腺,关腹。C组以同法给予等量生理盐水注入。PW组于建模前给予wortmannin 1.4mg/kg腹腔注射^[3],C组和P组给予等量对应溶剂。

1.3.2 标本收集 3组分别于建模后3,6,12h每组处死6只大鼠,门静脉取血,观察胰腺大体病理改变;并留取胰腺组织,以4%多聚甲醛固定。解剖腹腔暴露肝脏,观察其大体病理改变,取2块0.5cm³肝中叶组织,一块以4%多聚甲醛液固定,另一块迅速置入冻存管-80℃冻存,备用。

1.3.3 血清TNF- α 、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)含量测定 将门静脉所取血置室温下1h,待样本完全凝固后以2500r/min速度离心15min,吸取上清液,严格按照ELISA试剂盒说明测定3,6,12h血清TNF- α 含量;以TRACE半自动生化分析仪测定3,6,12h血清ALT和AST含量。

1.3.4 肝组织NF- κ B活性测定 参照文献的方法对肝组织进行核蛋白提取,并用考马斯亮蓝测定蛋白浓度后置于-70℃保存。以 γ -³²P在T4激酶的作用下标记NF- κ B探针。探针序列为5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3'。将标记的探针与肝组织核蛋白结合后,置于非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳并进行放射自显影;用凝胶扫描分析仪对显影结果进行分析^[4];以积分灰度值表示NF- κ B的活性变化。

1.3.5 病理形态学观察 对胰腺组织、肝组织常规石蜡包埋、切片、HE染色后于光学显微镜下观察病理改变。

1.4 统计学处理

使用SPSS统计软件进行数据分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组血清TNF- α ,ALT,AST含量及NF- κ B活性比较作 t 检验。

2 结果

2.1 wortmannin预处理对SAP大鼠血清TNF- α 的影响

SAP大鼠模型诱导成功后,P组各时间点血清TNF- α 浓度较C组明显升高($P < 0.01$),以3h浓度最高,尔后逐渐降低;PW组血清TNF- α 浓度较之P组比较明显下降($P < 0.05$),但仍较前C组明显增高($P < 0.05$)(表1)。

表1 wortmannin预处理对术后SAP大鼠血清TNF- α 的影响 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	3h	6h	12h
C	6	40.32 \pm 10.27	43.67 \pm 11.36	44.18 \pm 9.78
P	6	587.62 \pm 45.13 ¹⁾	364.48 \pm 39.26 ¹⁾	235.17 \pm 26.87 ¹⁾
PW	6	426.14 \pm 32.31 ^{1),2)}	292.28 \pm 27.37 ^{1),2)}	172.65 \pm 20.52 ^{1),2)}

注:1)与C组比较 $P < 0.01$;2)与P组比较 $P < 0.05$

2.2 wortmannin预处理对SAP大鼠血清ALT和AST的影响

P组和PW组血清ALT和AST含量在3~12h内持续升高,显著高于C组。而PW组血清ALT和AST浓度较P组显著降低($P < 0.01$),但仍高于C组($P < 0.01$)(表2)。

表2 wortmanin 预处理对 SAP 术后大鼠血清 ALT 和 AST 含量的影响($n=6, \mu\text{kat/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	3h		6h		12h	
	ALT	AST	ALT	AST	ALT	AST
C	0.82 ± 0.09	1.23 ± 0.10	0.85 ± 0.12	1.26 ± 0.10	0.87 ± 0.09	1.28 ± 0.11
P	2.62 ± 0.15 ¹⁾	3.45 ± 0.12 ¹⁾	3.46 ± 0.13 ¹⁾	3.96 ± 0.14 ¹⁾	4.43 ± 0.13 ¹⁾	4.92 ± 0.14 ¹⁾
PW	2.03 ± 0.13 ^{1),2)}	2.56 ± 0.14 ^{1),2)}	2.65 ± 0.11 ^{1),2)}	3.04 ± 0.13 ^{1),2)}	3.42 ± 0.12 ^{1),2)}	3.95 ± 0.13 ^{1),2)}

注:1)与C组比较 $P < 0.01$;2)与P组比较 $P < 0.01$

2.3 wortmanin 预处理对 SAP 大鼠肝组织 NF- κ B 活性的影响

除C组外,其余2组在术后3h肝组织中NF- κ B存在显著活化,6h后活化程度下降,但仍显著高于C组($P < 0.05$);术后12hNF- κ B活化程度下降至接近C组水平,与C组差异无显著($P > 0.05$);P组NF- κ B活化程度在3~6h均显著高于PW组(表3)。

表3 各组大鼠术后肝组织NF- κ B活性积分灰度($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	3h	6h	12h
C	0.71 ± 0.10	0.73 ± 0.11	0.73 ± 0.11
P	3.23 ± 0.48 ¹⁾	1.98 ± 0.32 ¹⁾	0.82 ± 0.13
PW	2.06 ± 0.43 ^{1),2)}	1.36 ± 0.21 ^{1),2)}	0.78 ± 0.12

注:1)与C组比较 $P < 0.01$;2)与P组比较 $P < 0.05$

2.4 胰腺和肝组织的大体及微观病理变化

C组大鼠肝呈鲜红色,表面光滑,无渗出及出血;光学显微镜下未见肝小叶、汇管区有明显变化。胰腺未见明显异常改变。P组12h可见腹腔内大量血性腹水,胰腺水肿、明显坏死,呈深棕色,整个肝脏充血肿胀;镜下见肝小叶汇管区内大量炎性细胞浸润,局部可见肝细胞凝固性坏死(图1)。PW组上述变化较P组明显减轻(图2)。

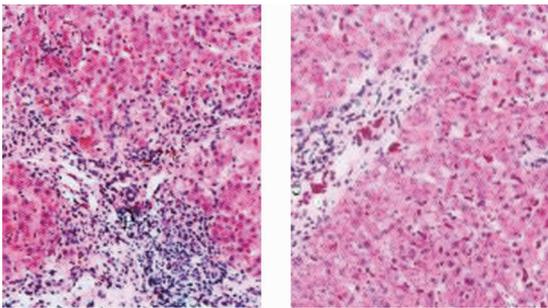


图1 P组术后12h肝病理变化 (HE × 100)

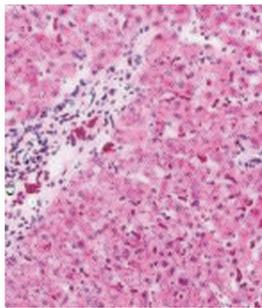


图2 PW组术后12h肝病理变化 (HE × 100)

3 讨论

在急性胰腺炎病例中,10%~25%属于SAP,病死率高达20%~30%^[3]。死亡的主要原因多系合并全身多脏器功能损害,而肝脏是最常受累的器官之一。急性胰腺炎所引起的肝损害不但可以加重胰腺炎病情,肝功能的好坏还直接关系到其他脏器并发症的出现与否。关于SAP出现脏器并发症的机制,目前尚未完全阐明^[5],但认为是由于胰腺腺泡细胞受损后胰酶释放和单核-巨噬细胞的激活,并释放大量炎症介质及细胞

因子,产生级联瀑布效应,从而导致包括肝损伤在内的全身多器官损害^[6]。

在引发SAP时,蛋白激酶B(PKB)磷酸化水平明显升高,大量单核细胞募集到肝脏,肝组织中NF- κ B发生了显著活化,它可促进与炎症有关的多种基因的转录^[7],使血中TNF- α 含量明显增加,活化并释放出氧自由基、各种蛋白酶及炎症因子等,从而参与多种原因引起的组织损伤过程^[8-9]。据此笔者考虑,如果给予PI3K信号转导通路的特异性抑制剂wortmannin抑制单核细胞的募集与活化,或许可以在一定程度上改善SAP时的肝损伤。

本实验结果表明:给予wortmannin预处理血清TNF- α 水平、血清ALT和AST含量显著下降,肝组织中NF- κ B活化显著降低,肝组织、胰腺组织病理改变减轻。说明wortmannin预处理对SAP所致的胰腺及肝损伤具有一定的保护作用。其作用机制可能与其抑制了NF- κ B的活化、减少TNF- α 等多种炎症因子的释放等有关。

参考文献:

- [1] Anne D, Jacques D. New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: the cytokines JOP [J]. *Pancreas*, 2003, 4(1): 49-57.
- [2] 程石,宋茂民,史敬东等.核因子 κ B活化对急性坏死性胰腺炎肺泡巨噬细胞炎症介质表达影响及意义[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2006, 12(11): 764-766.
- [3] Singh VPJ, Saluja AKJ, Bhagat L, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase-dependent activation of trypsinogen modulates the severity of acute of pancreatitis [J]. *Clin Invest*, 2001, 10(8): 1387-1395.
- [4] 王惠珍,解军,徐钧,等.凝胶滞留电泳法测定大鼠肝组织细胞核NF- κ B结合活性[J]. *山西医科大学学报*, 2001, 32(1): 15-17.
- [5] 邹树,田伏洲,汤礼军,等.急性胰腺炎大鼠早起生长反应基因-1与肝损害德关系[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(5): 422-425.
- [6] 徐军,刘学民,马清涌,等.中性粒细胞在大鼠急性重症胰腺炎肺损伤中的作用机制[J]. *第四军医大学学报*, 2005 26(16): 1472-1473.
- [7] Altavilla D, Saitta A, Guarini S, et al. Oxidative stress causes nuclear factor kappaB activation in acute hypovolemic hemorrhagic shock [J]. *Free Radic BioJ Med*, 2001, 30(2): 1055-1066.
- [8] Wang Z, Castresana MR, Detmer K, et al. AnIkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells [J]. *J Surg Res*, 2002, 102(2): 198-206.
- [9] Helin E, Vainionpaa R, Hyypia T, et al. Measles virus activates NF-kappa B and STAT transcription factors and production of IFN-alpha/beta and IL-6 in the human lung epithelial cell line A549 [J]. *Virology*, 2001, 290(1): 1-10.