维普资讯 http://www.cqvip.com

实验性急性胰腺炎性胰腺组织一氧化氮合酶基因表达的研究

临床学院消化内科 冯 莉* 王丕龙 胥 飚 刘新才

提 要 探讨急性胰腺炎(AP)发病机制与一氧化氮(NO)的关系,用十二指肠闭袢法诱导大鼠实验性AP模型,并对AP形成后检测不同时相的胰腺组织一氧化氮合酶(NOS)mRNA,以了解AP病程中NOS基因表达水平的动态变化。48只大鼠随机分四组,一组为对照组,三组为实验组,实验组分别于术后24、36、48h处死检测血清淀粉酶,取胰腺组织进行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),检测NOScDNA含量。结果:术后24h已形成出血坏死型AP,血清淀粉酶比对照组显著增高($P<0.01$),而NOSmRNA水平与对照组相比无明显改变。至36h时NOSmRNA水平显著增高至对照组的1.2或1.5倍($P<0.01$),其后又开始下降。结论:大鼠实验性AP胰腺组织NOS基因表达在术后36h达高峰,48h时下降,NO在AP发病过程中有一定作用,其确切机理有待进一步探讨。

关键词 胰腺炎;一氧化氮合酶;基因表达;聚合酶链反应
中图分类号 R576

急性胰腺炎(AP)的发病机制至今仍未明确,因此缺乏有效地治疗措施。1990年Bult发现一氧化氮(NO)是消化道中一种非肾上腺能非胆碱能(NANC)神经递质,从而引起了人们对NO与消化系统疾病关系的研究[1]。NO在消化系统中具有调节组织血流量、抑制血小板和白细胞在血管内皮上的粘附、调节腺体分泌等;同时NO也是一种自由基和细胞毒性物质,可引起组织损伤。一氧化氮合酶(NOS)是合成NO的关键酶,存在于几种动物的血管内皮和胰腺神经中[2]。推测NO与AP有一定关系,但报道较少。本文采用十二指肠闭袢法诱导大鼠实验性AP,并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)定量检测AP形成后不同时相胰腺组织的NOSmRNA水平,研究实验性AP胰腺组织NOS基因表达的动态变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康Wistar大白鼠48只,雌雄不拘,体重180~250g(由重庆医科大学实验动物中心提供)。

1.1.2 试剂 戊巴比妥钠(批号84-06-12,上海化学试剂厂提供)以蒸馏水配成20mg/ml浓度备用。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 实验动物48只随机分成四组,一组为正常对照(下称对照组),断尾取血,测定血清淀粉酶,取胰腺组织200mg测一氧化氮合酶;其余三组AP(称实验组),分别于术后24、36、48小时处死,同时检测NOS(其中淀粉酶仅测24h值),并取胰腺组织作病理检查。

1.3 大鼠AP模型建立

1.3.1 模型制备 术前实验组动物禁食12h,自由饮水。2%戊巴比妥钠25mg/kg腹腔内注射麻醉,无菌条件下剖腹,暴露胆胰管及十二指肠,确定胆总管在十二指肠的开口处,置入长3.0cm,内径2.5mm之硅胶管,其中点置于胆总管开口处,在两端分别以0~5号丝线结扎,顺序缝合关腹。

1.3.2 淀粉酶测定 各组动物断尾取血1ml,测定血清淀粉酶。

1.3.3 病理检查 动物处死后,观察胰腺有无水肿、出血和坏死,取胰组织于10%福尔马林固定,采用单盲法由病理专家光镜下评定病变程度。

1.4 一氧化氮合酶(NOS)mRNA测定

1.4.1 试剂 逆转录酶AMV(由Promega公司提供);dNTPS(dATP、dGTP、dTTP、dCTP)、TaqDNA聚合酶(由华美生物工程公司提供);异硫氰酸胍和十二烷基肌酸钠(为Sigma产品)。

1.4.2 仪器 UV-240型紫外分光光度计(日本岛津株式会社产品)、PE-9600型基因扩增仪(美国PE公司产品)。

1.4.3 引物 北京赛百盛(美国)生物工程公司合成并纯化。

选择引物 NOS1,ACGTTAAGTATGCCACCAAC,
2,ATCTCTAGCAGCATGTTAGA;
内参照引物 β-actin1,GGACCTGACAGACTACCTCAT,
2,ACTCATCGTACTCCTGCTTGCCTGATCC。

* 女,1972-05出生,硕士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.3.4 大鼠胰腺组织总RNA模板制备

据文献的方法加以改进[9]，200mg组织加入200μl提取缓冲液(含4.2mol/L异硫氰酸胍，0.5%十二烷基肌酸钠和0.75mM枸橼酸钠)，快速匀浆，再加入200μl提取缓冲液，颠倒混匀，12000r/min离心15min，取水相于另一洁净试管，加入等体积氯仿：异戊醇，混匀，12000r/min离心10min，取水相于另一洁净试管，加入1/10体积醋酸钠(3.0M，pH5.0)和等体积异丙醇，混匀，于－20℃沉淀过夜，取出，12000r/min离心20min，弃上清，用预冷的75%乙醇洗涤沉淀一次，用电磁吸引器小心吸弃上清，将RNA沉淀溶于10μl双蒸水中，即为制备好的总RNA。

1.3.5 逆转录与NOScDNA的PCR扩增

用UV－240紫外分光光度计测定总RNA浓度，重复测定3次，OD280与OD280比值在1.8～2.0之间，样品总RNA用量调整在5.0μg，并以此作为逆转录模板。将RNA模板于70℃保温5min，立即置于冰浴中冷却后，加入10μl在反应体系中。所含主要试剂为：20pmololigo(dT)18引物，dNTPs终浓度各为500μM，逆转录酶AMV4.0μ，42℃ 反应1h，95℃5min以灭活AMV。然后取逆转录产物(cDNA模板)进行PCR扩增，在50μl PCR反应体系中·Mg2－浓度为1.5mM，dNTPs终浓度各为200μM，TaqDNA聚合酶1.5μ，NOS1和NOS2引物各为20pmol，内参照β－actinF和R引物各为20pmol。根据β－actin的PCR产物平衡cDNA模板用量。扩增反应程序为：94℃1min，55℃1min，72℃1.5min，循环40次，最后72℃延伸5分钟，取10μl产物进行2%琼脂糖凝胶电泳，EB染色，紫外灯观察结果并拍照。

1.3.6 PCR产物回收及定量

利用透析袋电洗脱法，在相同条件下对NOScDNA及内参照β－actincDNA进行加收，然后用有机溶剂抽提法纯化，最后将DNA沉淀溶解在5μl TE(pH＝7.6)中。其定量方法仍为紫外分光光度法测定DNA含量，每个样品重复测定3次。 半定量所得值为NOScDNA(μg/ml) 与β－actincDNA(μg/ml)的比值。

1.4 **统计分析** 结果均用平均值(标准差)表示，淀粉酶用非配对t检验，SOD和NOS用多重比较的方差分析(q检验)。

2 结果

2.1 **血清淀粉酶** 对照组(n＝12)血清淀粉酶为929.55(309.92)单位，而24h实验组(n＝12)为1935.21(613.55)单位，为对照组的2.1倍，两者差异非常显著(P<0.01)。24h组中有3例同时检测3腹水淀粉酶水平，均＞3200单位。

2.2 **胰腺病理形象**

2.2.1 大体观察 实验大鼠见胰腺肿大，呈暗红色，胰头点状出血，胰腺及周围组织等处散在黄白色点状小块状脂肪坏死等。

2.2.2 光镜观察 可见下列改变

胰腺坏死～腺泡结构不清，轮廓尚清楚。腺腔扩张。腺泡细胞核膜破裂，染色质不均匀或淡染，部分细胞核溶解，消失，胞浆呈不均匀深伊红色，可见中性白细胞浸润。48h组为例均发生坏死。胰岛坏死镜下显示胰岛细胞结构不清但轮廓仍存在，少量中性白细胞浸润。此改变仅出现于24h组(构成比33.33%)及48h组(构成比62.50%)。 炎症反应—坏死局部及间质内可见大量中性白细胞及单核细胞浸润，同时出现水肿及血管充血。此项改变出现于所有实验组。还可见明显的胰周脂肪坏死和钙盐沉积。

2.3 NOSmRNA测定结果

2.3.1 定量结果 与对照组相比，NOSmRNA水平在术后24h增加不明显(P＞0.05)，至36h时显著增加至照组的1.5倍(P<0.01)，其后又开始下降，48h时已以降至对照组水平以下(P＞0.05)。

表1 对照组和实验组NOSmRNA水平的比较X(S)

组别	例数	NOSmRNA绝对量(μg/ml)	NOSmRNA水平(μg/ml) β－actin mRNA水平(μg/ml)
对照组	12	7.42(1.91)	0.58(0.05)
实验组			
24h	12	8.63(1.32)	0.53(0.03)
36h	12	13.00(2.57)$^{**+1}$	0.71(0.07)$^{**++}$
48h	12	6.60(1.13)$^{\Delta\Delta}$	0.42(0.07)$^{**++\Delta\Delta}$
F值		22.62	38.86
P		<0.01	<0.01

注：与对照组比较：$*P<0.05$ $**P<0.01$
与24h组比较：$++P<0.01$

2.3.2 半定量结果 与对照组相比NOSmRNA水平在术后24h时无明显改变(P＞0.05)，至36h时显著增加至对照组的1.2倍(P<0.01)，其后又开始下降，48h时已显著降低至对照组的5/7(P<0.01)及24h组的5/6(P<0.01)、36h组的3/5(P<0.01)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨论

3.1 急性胰腺炎动物模型评价

在胆总管两则结扎造成十二指肠实验性梗阻,增加十二指内压,从而促使十二脂肠液反流入胰管。十二指肠内容物含有害成分如细菌、肠激酶、盐酸和胆汁等,胆汁进入胰管能直拔或间接激活胰内消化酶从而损伤组织。这种闭袢技术已用来诱导狗和大鼠的实验性急性胰腺炎[4]。本文采用此方法处理实验组大鼠后24小时血清淀粉酶即显著增加至对照组的2.1倍,各实验组出现AP的典型临床表现,病理结果显示典型的胰腺细胞坏死及出血,表明出血坏死型AP已在24小时内形成。这与Rao等报道基本一致。十二指肠内容物反流也可能是大量AP病例的引发因素,特别是酗酒引起十二指肠激惹和内压增高的病人。

本文采用十二指肠内置管建立胃肠内容物的自由通管,避免了肠梗阻及由此引起的胃潴留形成,说明大鼠闭袢性胰腺损害的发生不依赖于胃的膨胀,胃扩张在AP发病中不起重要作用。

本法诱导的大鼠AP特征为血清淀粉酶升高,胰腺水肿、出血、细胞坏死、炎症反应及腹内脂肪坏死,组织病理学改变与人类AP相符。特别是血性腹水中检出高淀粉酶活性,显示受损腺体中酶的释放。此外本法诱导的AP还可见胰岛坏死往往与腺泡坏死同时存在,二者存在一定的相关性(参见病理评分表)。其机理有待于进一步探讨。

本文介绍了一种较简单的侵入性方法-十二指肠闭袢改良法,是由Chetty在1980年首先提出的[5],其操作简便、模型稳定、重复性好,避免了使用药物引起的非特异性全身反应,且在病因、致病机制及病理改变等方面与临床AP比较相似,可以为本病发病机理的研究提供有效的实验模型。但本模型的病变程度难以控制,易出现迅速大量的腺体破坏(术后24h腺泡坏死程度即达2级、坏死范围达30%以上),故用于AP发展过程的研究及治疗试验尚有一定限制。

3.2 一氧化氮与急性胰腺炎

内源性一氧化氮(NO)是以L-精氨酸(L-Arg)为底物,在一氧化氮合酶(NOS)介导下,由还原型辅酶Ⅱ(NADPH)提供电子,黄素核苷酸(FMN)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAN)、四氢生物喋呤(BH4)及铁原子(Fe)传递电子,与分子氧结合而成。已发现的NOS并构体有三型:内皮型(ecNOS)脑型(bcNOS),分别从内皮细胞和脑中分离出,二者统称为原生酶(cNOS),主要存在于内皮细胞、神经细胞、平滑肌细胞和血小板中。生理情况下cNOS基因就有表达,在内源性血管活性物质刺激下胞浆内钙离子浓度增加,激活cNOS合成少量NO,主要发挥传递介质和调节介质作用。第三型为巨噬细胞型双称诱生酶(iNOS),主要存在于巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞、成纤维细胞、肝细胞、胃肠粘膜细胞和胰岛细胞等细胞中,某些含有原生酶的细胞如内皮细胞、平滑肌细胞和神经细胞等也有该酶存在。生理情况下iNOS基因不表达,只有在内毒素和某些细胞因子如TNF、γ-干扰素、IL-1等刺激下才能进行转录和翻译,催化L-Arg生成大量NO,参与体内非特异性免疫、杀伤肿瘤组织和入侵微生物,且NO释放的同时伴有超氧阴离子产生,后者与NO共同作用可引起组织细胞氧化损伤和坏死。本文病理结果显示,实验性AP时胰腺坏死局部及间质内有大量中性白细胞及单核巨噬细胞等炎症细胞浸润,这些细胞同胰腺内固有的血管平滑肌细胞、成纤维细胞、胰岛细胞等在AP的各种致病因子作用下均有iNOS基因表达,释放大量NO;而胰腺血管内皮细胞,末梢神经细胞、非腺体粘膜中则有cNOS基因表达[6]。本文采用大鼠种特异性cNOS引物,扩增出的目的基因是cNOS—cDNA片段,故反映的是cNOS基因表达情况。 AP的发病机制仍不清楚。据报道NO对AP的作用有两面性,即NO既有保护作用,又有细胞毒性及促炎作用。究竟何种作用占主导地位,取决于NO产生部位、数量及作用持续时间。发挥保护作用的NO大多是由钙离子依赖型cNOS合成释放的,而引起损害作用的NO则主要与非钙离子依赖型iNOS有关[7]。本文12例对照胰腺组织cNOSmRNA绝对量为7.42(1.91)μg/ml,相对值为0.58(0.05),与术后24h的水平相近,说明正常胰腺组织已有cNOS基因表达。 术后36h时cNOSmRNA水平显著增加至对照的1.2(半定量)或1.5

维普资讯 http://www.cqvip.com

倍(定量),48h时降低。这可从以下三方面解释:

已知AP时内皮－白细胞－血小板之间的相互作用增强。AP形成初期,NO主要由cNOS产生,起保护作用,表现为维持微循环完整性,抑制血小板、白细胞在内皮细胞表面粘附、积聚,防止血栓形成,从而抑制血管这内凝血和实质炎症细胞浸润[8,9]。近来有报道NO还能抑制中性粒细胞的超氧阴离子产生,说明NO能保护内皮免受自由基损伤[10,11]。本文病理切片见cNOS基因表达水平最低的48h组炎症细胞浸润比另二组严重得多,即是由cNOS的保护作用所致。由于炎症细胞浸润增多,因此胰腺细胞在氧自由基和白细胞释放的蛋白酶作用下损害更为严重(参见病理评分表)。近来研究证实,NO保护作用是通过靶细胞内5－环磷酸鸟苷(5－cGMP)浓度增高[12]及抑制P－选择素(P－selectin)基因表达来实现的。P－selectin是血小板颗粒膜上一种特有的蛋白类细胞粘附分子,与因栓形成和细胞功能损伤有关,并介导血小板和不同类型白细胞与内皮细胞之间的相互作用。AP形成后胞浆内钙离子浓度的变化促使原来储存在细胞中的cNOS开始合成释放NO,并随着时间的推移释放增加,但与此同时胰腺内储存的酶逐渐减少以至耗竭,此时内皮细胞开始代偿性增生以合成新的cNOS,这是机体对损害因子的一种防御反应。但新生细胞合成cNOS的能力较弱,量较低,这就造成了cNOS基因表达水平在达到高峰后有一下降过程。根据我们的实验结果,推测cNOS耗竭发生在术后36h～48h之间。是否如此,有待于将AP术后划分更多的时间段,逐一详细分析cNOS的动态变化过程。

正常胰腺组织仅有cNOS而无iNOS基因表达。而AP形成后cNOS与iNOS基因均有表达,且36h前以cNOS基因表达为主,比对照表达水平增高;而36h后以iNOS基因表达为主,cNOS基因表达降低,故36h时形成cNOS基因表达高峰,这也说明36h前以cNOS作用(保护作用)为主,36h后以iNOS作用(损害作用)为主,大剂量NO释放使组织细胞损伤更为突出,故48h时胰腺病变最重,这与胰组织病理评分结果符合。此推断是否成立,尚有待于检测相应时间的iNOS基因表达以进一步证实。

mRNA的检测是基因诊断的重要方面。它不仅从基因表达水平上提供基因功能是否正常的直接证据,而且在基因诊断上还有如下优点:首先,基因转录生成的mRNA相当于基因模板的扩增过程,mRNA相当于扩增产物,这样检测mRNA的灵敏度比检测DNA更高;其次,由于mRNA不含有内含子序列,对于一些较大的基因,测其mRNA比较容易。尤其是本文采用的PCR方法,可以直接从总RNA经逆转生成cDNA进行扩增,检测比过去容易得多。

mRNA测定方法主要有斑点杂交、Northern印迹等,但步骤繁多,观察细微变化困难,故不易推广。本文实验条件下NOSmRNA与β－actin(内参)相比,前者表达量较低(比值＜1),约为后者的40%～70%。本文半定量的比值在同样实验条件下具有可比性,所以这一非放射性的mRMA相对定量方法在研究基因表达时具有通用意义,且方法简便,检测标本量小,易于推广。

本文结果显示:大鼠实验性AP胰腺组织cNOS基因表达在术后36h时显著增高达高峰,48h时降低。NO在AP的发病过程中具有一定作用,其确切机理有待于进一步探讨。

参 考 文 献

1. Bult H, et al. Natμre 1990; 345(6273):346
2. Shimosegawa T, et al. Gastroenterology 1993; 105
3. Chomczynsk: P, et al. Analytical Biochemistry 1987; 162(1):156
4. Navalainen JJ, et al. Scand J Gastroenterol 1975; 10(5):521
5. Chetty U, et al. Gut 1980; 21(1):15
6. Nussler AK, et al. Biol 1993; 54(2):171
7. Katμsic IS. Gastroenterology 1994; 107(4):1199
8. Moncada S, et al. Pharmacol Rev 1991; 43(2):109
9. Arndt H, et al. Gastroenterology 1993; 105(3):675
10. Clancy RM, et al. J Clin Invest 1992; 90(3):1116
11. Ialenti A, et al. Eur J Pharmacol 1992; 211(2):177
12. Ribbons KA, et al. Gastroentrology 1995; 108(3):705

(收稿日期 1998－05－29)

维普资讯 http://www.cqvip.com

Studies on nitric oxide synthase gene expression in acute experimental pancreatitis in rats

Feng Li, et al
Department of gastroenterology, college of clinical medicine

The study was undertaken for the purpose of investigating the relationship between acute pancreatitis (AP) and nitris oxied(NO). The anirnals of AP were killed at the period of 24, 36, 48 hours after induction of AP. Non-operated onrmal rats(n=12) were served as control.The degree of serum amyase levels and histopathologic alterations were investigated. At the same time the levels of nitric oxide synthase (NOS) mRNA in pancreatic tissues were measured by the method of reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR), in order to reflect NOS gene expression levels. Primers were designed referring to brain NOS CDNA sequence of rats regions which were highly kindred to human endothelial derived NOS CDNA were seleced, β-actin as on inner reference. Restits:Hemorrhagic necrotizing AP was induced by the time of 24h after operation, which was similar to that found in man. As compared with control group, serum amylase level was markedly increased at 24h($P<0.01$), whereas NOS mRNA level was markedly increased to 1.2 or 1.5 times the level of control group ($P<0.01$), forming a peak of NOS gene expression level, then was decreased at 48h. Our preliminary results suggest that NO may have a role in the pathogenesis of AP.

KEY WORDS Gene expression; Nitric oxide synthase; Pancreatitis; Polymerase chain reaction

高血压病患者血浆内皮素-1、一氧化氮水平与血压的关系

第二临床学院内科 邓建川* 罗开良 曾晓华 董 军 薛 宁 钱元菊

提 要 本研究测定了53例中老年高血压病患者和22例正常对照者血浆ET-1、NO的变化,并探讨其与偶测血压和动态血压的关系。高血压病患者血浆ET-1显著高于对照组($P<0.01$),而NO显著低于对照组($P<0.01$);二期患者血浆ET-1明显高于一期患者,而NO显著低于一期患者;中重度患者血浆ET-1与轻度患者无统计学意义,而NO显著低于轻度患者。高血压病患者血浆ET-1与偶测血压无明显相关性,但与动态血压参数呈显著正相关;而NO与偶测血压和动态血压参数呈显著负相关。提示高血压病患者存在内皮功能异常,二者异常与高血压病靶器官损害及高血压程度有密切关系。

关键词 高血压病; 内皮素-1; 一氧化氮; 血压
中图分类号 R544.1

近年来,众多学者从神经、遗传、内分泌、代谢等多方面探讨了高血压病的发病机理,但仍未完全阐明。内皮功能异常为目前高血压病研究的热门话题,一些学者认为高血压病存在内皮功能异常,而内皮功能异常又加重高血压病的发展进程[1,2]。本研究通过测定高血压病患者血浆ET-1、NO和血压的变化,探讨了血浆ET-1、NO

* 男,1970-11出生,主治医师