DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.01.034
第23卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 1
2001年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2001

文章编号:1000-5404(2001)01-0075-03

论著

急性出血坏死性胰腺炎大鼠循环内皮细胞的变化及意义

任晓葆[1],何振平[2],段恒春[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]急救部;[2]肝胆外科中心、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 测定急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)大鼠血循内皮细胞(CEC)、白介素-6(IL-6)、一氧化氮(NO)、内皮素(ET)含量变化,探讨其在发病机制中的作用。方法 5%牛磺胆酸钠溶液胆胰管注入,诱发大鼠AHNP。动态测定CEC、IL-6、NO、ET,胰腺组织病理评分(PM)定量分析。结果 AHNP大鼠血CEC早期显著增加,CEC与NO、ET、PW、IL-6、PM呈显著相关性。结论 血管内皮细胞损伤参与了AHNP大鼠的发生、发展的病理生理过程。

关键词:急性胰腺炎;循环内皮细胞;一氧化氮;炎症介质;大鼠
中图法分类号:R322.12;R576.02 文献标识码:A

Changes of circulating endothelial cells in rats with acute hemorrhagic necrotic pancreatitis and their significance

REN Xiao-bao, HE Zheng-ping, DUAN Heng-chun (Department of Emergency Service, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To determine the contents of circulating endothelial cells (CEC), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO), endothelin (ET) in rats with acute hemorrhagic necrotic pancreatitis (AHNP) and explore the role of CEC in the pathogenesis of AHNP. **Methods** After the model of AHNP was established with the injection of 5% sodium taurocholate into the biliary-pancreatic duct in rats, the changes of CEC, IL-6, NO, ET in blood were dynamically observed. Meanwhile, the pathological changes of the pancreatic tissue (PCPT) were also quantitatively analyzed. The water content in pancreatic tissue (PW) was measured. **Results** The level of CEC in blood was significantly increased in the early stage. Significant correlation was found among CEC with NO, ET, IL-6 and pathological changes and PW respectively. **Conclusion** Vascular endothelial cells (VEC) injury involves in the onset and development of AHNP in rats.

Key words: acute pancreatitis; circulating endothelial cells; nitric oxide; inflammatory mediator; rats

血管内皮细胞(Vascular endothelial cells, VEC)损伤正成为许多疾病发生发展的基本病理过程[1]。急性胰腺炎(AP)VEC损伤及其在发病机制中的作用,目前尚未见报道。本实验通过观察急性出血坏死性胰腺炎(Acute hemorrhagic necrotining pancreatitis, AHNP)血循环内皮细胞(Circulating endothelial cells, CEC)变化及其与一氧化氮、炎症介质间内在联系,探讨VEC的损伤在AHNP发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组

成年健康Wastar大鼠48只,体重180~250 g,随机分组,正常对照组(n=8只),模型组40只(分5个时点组,每组8只)。

1.2 模型制备

参照Aho等[2]人的方法稍加改进。大鼠术前禁食12 h,2.5%戊巴比妥钠溶液腹空内注射麻醉(0.1 ml/100 g),腹壁正中切口入腹,5号头皮针经肠壁从十二指肠乳头插入胆胰管约1 cm深,用无损伤血管钳钳夹固定针头进入十二指肠乳头处,近肝门处用动脉夹阻断胆总管,注入5%牛磺胆酸钠溶液0.01 ml·g^{-1}·min^{-1}(Sodium taurocholate, Na-Tc, Sigma),去掉血管钳及动脉夹,双层缝合腹壁,术毕于背部皮下注射生理盐水4 ml,以补充术中丢失的液体。于0.5、1、6、12、24 h,下腔静脉入膈处抽静脉血,活杀动物取胰腺组织备检。对照组仅做开腹手术。

1.3 观察指标和方法

1.3.1 CEC计数 用Percoll密度梯度一步分离法[3]检测,以细胞数/0.9 μl表示。

1.3.2 血IL-6测定 接美国T&B公司提供的试剂盒说明书进行。

1.3.3 血浆ET测定 各时相点下腔静脉采血2 ml,置于10%EDTA二钠30 ml和400 IU(40 μl)抑肽酶的试管中,混匀,4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,分离血浆,-20 ℃保存待测。测定方法按301医院东亚免疫技术研究所提供的放免药盒说明书进行。

1.3.4 血浆NO测定 血浆备同上,测定时取血浆0.5 ml加入4 mol/L过氯酸0.1 ml,混匀后离心2 000 r/min,15 min,取全部上清加0.1% Rivanol 200 μl及12 mol盐酸400 μl,加双蒸水致总体积2 ml,520 nm测定吸光度,根据标准曲线计算样本NO含(μg/ml)。

1.3.5 胰腺含水量(PW)测定 取胰腺组织准确称重,80 ℃烘干72 h致重量不再改变,称干重,计算每克组织含水量。

$$PW=\frac{\text{胰湿重}-\text{胰干重}}{\text{胰干重}}$$

1.3.6 胰腺组织病理改变及评分 取胰腺组织固定于10%福尔马林液中,石蜡包埋、制片后HE染色,按文献[4]方法定量评分(Pathological marking, PM)。

1.4 统计处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间数据比较采用两样本均数t检验,有关数据作相关分析。

作者简介:任晓葆(1965-),男,重庆市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事危重症方面的研究,发表论文18篇。电话:(023)68754000-73048
收稿日期:2000-09-17;修回日期:2000-10-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

血CEC计数，见表1，AHNP大鼠CEC早期明显升高，0.5 h达非常显著性变化（$P<0.01$），并呈持续升高，24 h达最高值。其变化与PM呈显著正相关（$r=0.98$，$P<0.01$）。

血浆ET、NO变化，见表1，AHNP大鼠血浆ET、NO早期明显升高，6 h达最高值，24 h虽有所下降但仍显著高于对照组。其变化与CEC呈显著正相关（$r=0.96$，0.93，$P<0.01$）。

IL-6变化，见表1，AHNP大鼠血IL-6水平早期明显升高，1 h时时呈非常显著升高（$P<0.01$），并呈持续升高，24 h达最高值。其变化与CEC呈显著正相关（$r=0.96$，$P<0.01$）。

胰腺含水量变化，见表2，AHNP大鼠胰腺含水量逐渐增加，1 h达显著水平（$P<0.05$），24 h达最高值。其变化与CEC呈显著正相关（$r=0.97$，$P<0.01$）。

胰腺组织光镜变化及病理评分，见表2。

表1 大鼠血CEC、ET、NO、IL-6的变化

Tab 1 Changes of CEC, ET, NO and IL-6 in rats

	Control	Post-AHNP(h)				
		0.5	1	6	12	24
ET(ng/L)	56.60±13.02	69.58±14.60	112.68±27.74**	236.45±50.89**	215.40±48.02**	190.12±31.85**
NO(ng·10⁵/L)	1.96±0.52	2.54±0.55*	2.77±0.58*	5.01±0.96**	3.92±0.63**	3.27±0.60**
CEC(cells/0.9 μl)	8.70±1.41	11.88±1.28**	17.69±2.13**	21.12±2.17**	23.71±2.21**	25.65±2.76**
IL-6(ng/L)	37.16±12.70	60.22±15.23	114.71±24.76**	170.12±27.8**	198.24±30.86**	225.48±41.02**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

表2 大鼠PM和PW变化

Tab 2 Changes of PM、PW in rats

	Control	Post-AHNP(h)				
		0.5	1	6	12	24
PW(ml/g)	3.14±0.31	3.31±0.37	3.58±0.49*	3.91±0.45**	4.05±0.52**	4.12±0.47**
PM		11.42±1.2	15.6±0.86	21.50±0.91	22.81±0.93	25.40±1.82

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control

AHNP大鼠，0.5 h可见胰腺小叶部分坏死及少量红细胞渗出，见图1，1 h可见坏区波及整个小叶，红细胞渗出呈小片状，少量白细胞浸润，见图2，6 h可见多数小叶大片坏死，血管溶解红细胞渗出呈片状，大量白细胞浸润，见图3，12 h见大片胰腺小叶溶解性坏死，红细胞渗出呈大片状，大量白细胞浸润，但胰腺小叶轮廓清晰。24 h见大片小叶溶解性坏死伴严重出血，间质中有大片脂肪坏死及脂肪酸钙形成，大量白细胞浸润，小叶轮廓不清，见图4，病理评分值逐渐增高。

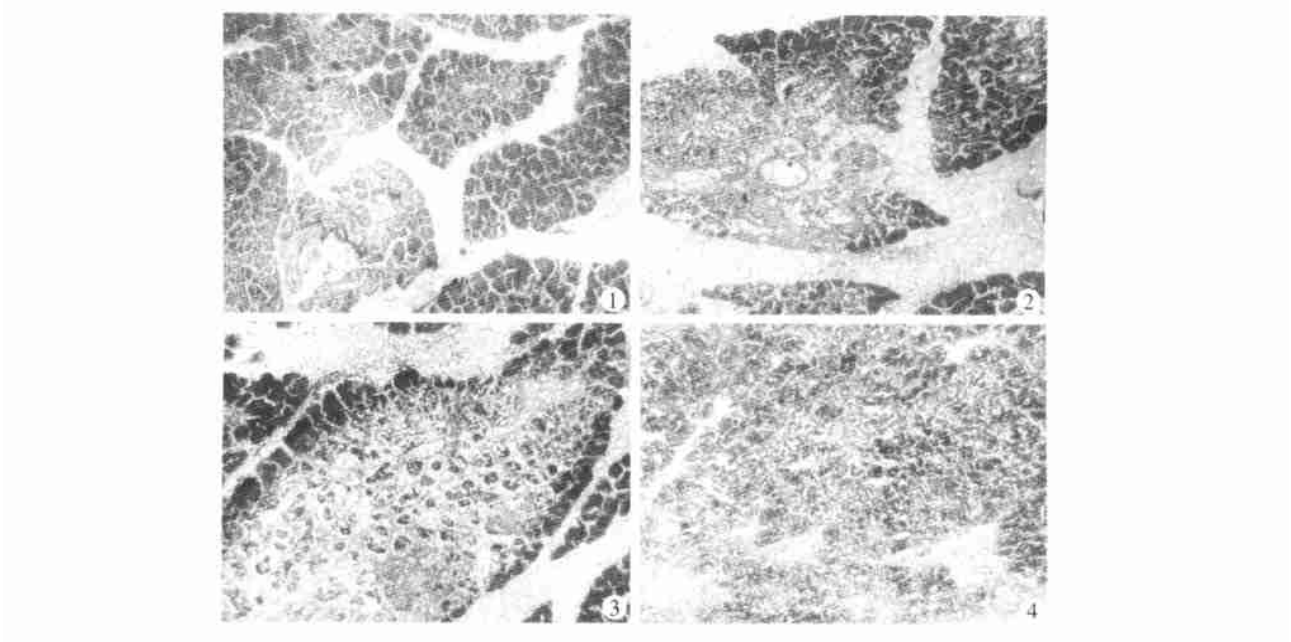


图1 AHNP 0.5 h，胰腺小叶灶性坏死 （HE×100）

Fig 1 Focal necrosis of pancreatic lobule 0.5 h after AHNP （HE×100）

图2 AHNP 1 h，坏死区域波及整个小叶 （HE×100）

Fig 2 Necrosis area extended to the whole lobule 1 h after AHNP （HE×100）

图3 AHNP 6 h，多个小叶大片坏死，红细胞渗出呈片状 （HE×100）

Fig 3 A lot of necrotizing lobules and leaked erythrocytes in patches were found 6 h after AHNP （HE×100）

图4 AHNP 24 h，坏死小叶轮廓破坏伴严重出血，大量白细胞浸润 （HE×100）

Fig 4 Outline of the necrotic lobules were destroyed, severe homorrhage and infiltration of large number of leukocytes were found, 24 h after AHNP （HE×100）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

VEC 具有众多生物学功能, 而 CEC 是目前仅有的可作为 VEC 损伤的特异而又直接的指示物。本实验研究发现, AHNP 大鼠血 CEC 数早期逐渐增高, 0.5 h 呈非常显著升高, 24h 达峰值。这一变化与 PW 及 PM 呈显著正相关。实验性 AP 在活体显微镜下[5], 可观察到早期 FITC(异硫氰酸荧光素)标记的血浆经过胰腺组织微血管渗出到胰腺间质增加。而 kell 等[6] 通过电镜观察, 大鼠 AP 后 0.5 h 胰腺 VEC 窗孔增加, VEC 排列紊乱, 伴有脱落的内皮细胞。结果表明, AHNP 大鼠 VEC 损伤, 一方面导致胰腺组织机械性屏障功能减退, 微血管通透性增高, 血管内物质渗入组织间隙增加, 毛细血管与组织细胞间距离增加, 加重胰组织细胞缺氧; 另一方面内皮细胞裂隙增大, 红细胞移出, 白细胞浸润增加, 胰腺组织局部炎症细胞过度聚集组织, 导致胰腺组织由充血水肿向出血坏死发展的病理改变。

VEC 一方面合成分泌大量细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8 等, 另一方面内皮细胞表面存在多种细胞因子受体。当细胞因子与这些受体结合后刺激内皮细胞分泌更多细胞因子, 导致"炎症放大效应"[7]。Dobosz 等[8] 研究发现水肿型胰腺炎大鼠 5 h 血 IL－6 水平显著升高, 其升高程度与胰腺炎严重程度相关。本实验表明, AHNP 早期即有 IL-6 水平增高, 1 h 呈显著升高, 24 h 达峰值, 且与 CEC 具有非常显著相关性。由此认为 VEC 损伤致细胞因子的力量对比失平衡, 从而加重 AP 损伤程度。

AP 早期存在胰腺组织血循环障碍, 作者先前研究认为[9], AHNP 早期不仅存在 PGI_2 /TXA_2 失平衡, 而且存在 ET、NO 的分泌异常及 NO /ET 失平衡。本实验发现 AHNP 大鼠 CEC 早期增加与 ET、NO 变化呈显著相关性。从而表明, AHNP 时 VEC 受损, 一方面导致内皮源性血管活性物质释放异常, 血管舒缩功能障碍, 造成严重循环障碍, 胰腺组织细胞缺血、缺氧; 另一方面内皮细胞抗凝活性减弱而促凝活性增强, 造成血细胞聚集, 微循环障碍, 而其中损伤内皮细胞与白细胞粘附性增强, 致大量白细胞迁移到胰腺组织并通过释放大量氧自由基、弹性蛋白酶、蛋白水解酶等造成胰组织细胞严重损害[10]。

总之, AHNP 大鼠存在 VEC 的损伤, VEC 损伤参与了 AHNP 发生、发展过程。由于 VEC 即是炎症反应的主动参与者, 又是炎症反应的主要受损者, 因此, 如何阻断 AHNP 时内皮细胞受损伤机制以及保护内皮细胞正常功能, 是需进一步研究的方向。

参考文献:

[1] Wang J H, Redmond H P, Watson R W, *et al*. The beneficial effect of taurine on the prevention human endothelial cell death[J]. Shock, 1996, 6(1): 33－38.

[2] Aho H J, koskensal S M L, Nevalainen T J, *et al*. Experimantal pancreatitis in the rat, sodium taurocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 1980, 15(2): 411－416.

[3] 杨映波, 王正国, 林水金. 化学和机械损伤对大鼠血管内皮细胞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1993, 6(1): 123－125.

[4] Spormann H, Sokolowski A, Letko G, *et al*. Effect of temporary ischemia upon the development and histological pattern of acute pancreatitis in the rat [J]. Path Res Pract, 1989, 184(4): 507－512.

[5] Eibl G, Hotz H G, Faulhaber J, *et al*. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimntal pancreatitis[J]. Gut, 2000, 46(3): 390－399.

[6] Kelly D M, Mcentee G P, Delaney C, *et al*. Temporal relationship of acinar and microvascular changes in caenllein-induced pancreatitis[J]. Br J Surg, 1993, 80(7): 1 174－1 180.

[7] Denham W, Yang J, Wang H, *et al*. Inhibition of P38 mitogen activate kinase attenuates the severity of pancreatitis-induced adult respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2000, 28(7): 2 567－2 571.

[8] Dobosz M, Wajda Z, Hac S, *et al*. Heparin and nitric oxide treatment in experimental acute parcreatitis in rats[J]. Forum Genova, 1998, 8(3): 303－372.

[9] 任晓葆, 何振平, 段恒春, 等. 急性胰腺炎大鼠血浆 ET/NO 比值变化及其与胰腺血流量的关系[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 344－348.

[10] Jaworek J, Jachimczak B, Bonior J, *et al*. Protective role of endogenous nitric oxide(NO) in lipopolysaccharid induced pancreatic damage (a new experimental model of acute pancreatitis)[J]. J Physiol Pharmacol, 2000, 51(1): 85－91.

(编辑　王　红)

(上接 74 页)

一般冰敷 1 h 左右, 四肢以及夏天冰敷时间适当延长, 一般 2 h 左右, 注意切勿冻伤。冰敷可以迅速降低局部皮温, 降低病人对疼痛的敏感度, 减轻激光对正常组织细胞的热损伤程度, 减少并发症的发生[2]。冰敷后即用 0.5% 洗必泰清洁创面, 涂上氧氟沙星乳剂, 再用消毒纱布包扎、固定, 并嘱病人抬高患处。如有水疱形成, 直径 0.5 cm 以内者不作处理, 待其自行吸收消退; 若大于 0.5 cm 者则用消毒空针抽取积液; 水疱较多或水肿明显, 持续不退者可用 50% 硫酸镁或 1/5000 呋喃西林湿敷。水肿消退后采取暴露疗法, 保持局部清洁, 可涂适量金霉素眼膏保护创面, 大约 1～2 周恢复正常。全麻病人应做好全麻术后护理, 待病人完全清醒后 1 h 方可离院, 禁食 4 h, 并向家属交待其注意事项。

关键词: 鲜红斑痣; VPW 532 nm 激光
中图法分类号: R758.510.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 赵俊英, 徐　薇, 戴　维. 倍频 Nd:YAG 治疗皮肤血管瘤等 100 例分析[J]. 中华皮肤科杂志, 1999, 32(1): 66.

[2] 邓　军. 激光美容与皮肤病治疗学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 107－119.

(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net