DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.05.010

急性出血坏死性胰腺炎大鼠血浆和胰腺组织内皮素的变化及其意义

任晓葆* 何振平 冯华芳** 段恒春 杨衡文*** (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心)重庆,400038

提 要 目的:测定急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)大鼠血浆及胰腺组织内皮素(ET)含量变化,探讨其在发病机理中的作用。方法:5%牛磺胆酸钠溶液胆胰管注入,诱发大鼠AHNP。动态测定血浆及胰腺组织内皮素(ET)、胰腺血流量(PBF)、肌醇三磷酸(IP_3)和胰腺细胞$[Ca^{2+}]i$的变化,胰腺组织病理评分(PM)定量分析。结果:AHNP大鼠血浆及胰组织ET含量早期显著增加,血浆ET初始升高滞后于胰组织ET,两者间及两者与PBF、IP_3、$[Ca^{2+}]i$、PM呈显著相关性,但胰组织ET相关更密切。结论:胰组织ET可能介导了胰腺早期缺血,血浆ET进一步加重AHNP大鼠的病理生理改变。

关键词 急性胰腺炎;内皮素;血液循环;钙超载

中图法分类号 R576

内皮素(Endothlin, ET)是强有力的血管收缩因子,它可直接调节器官血流动态,对心、脑、消化及内分泌系统等都有重要作用[1]。最近Takaori[2]发现ET能使正常狗胰腺血流量下降45.3%~73.9%。外源性ET在急性胰腺炎中的作用存在不同的观点[3,4]。急性出血坏死性胰腺炎(Acute haemorrhagic necrotizing pancreatitis, AHNP)内生性ET的变化及其在发病机理中的作用如何?尚未见报道。本实验检测了大鼠AHNP不同时间血浆及胰腺组织ET变化,探讨ET变化与病程的关系。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar大鼠48只,体重180~250 g,雌雄皆有,四川省中药研究所提供,随机分为正常对照组(n=8只)和实验组(n=40只)。

1.2 模型制备

大鼠术前禁食12 h,2.5%戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉(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,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 $ml \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$(Sodium taurocholate, Na-Tc, Sigma)于胰管内,去掉动脉夹后,双层缝合腹壁,术毕于背部皮下注射生理盐水4 ml。于术后0.5、1、6、12、24 h,分别在麻醉下测胰腺血流量,下腔静脉入膈处抽静脉血,活杀动物取胰腺组织备检。对照组不做手术。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 血浆及胰腺组织内皮素含量测定 各时相点下腔静脉采血2 ml,置于10% EDTA-2Na 30 ml和400 IU(40 μl)抑肽酶的试管中,混匀,4℃ 3000 r/min离心10 min,分离血浆,-20℃保存待测。取100 mg胰腺组织,加入预冷4℃的10 mol/L醋酸(NAC) 1 ml,略行碾磨,煮沸10 min,匀浆,10000× g 4℃离心15 min后取上清-20℃保存。内皮素测定方法按301医院东亚免疫技术研究所提供的放免药盒说明书进行。

1.3.2 胰腺组织血流量测定 采用氢气清除法,用组织末梢血流测定仪(PHG-300,日本松下通信株式会社)进行测定。分别测胰腺头、体、尾部取均值。

1.3.3 胰腺组织细胞$[Ca^{2+}]i$测定 按文献[5]方法。

1.3.4 胰腺肌醇三磷酸含量测定 按文献[5]方法。

1.3.5 胰腺组织病理改变及评分 取胰腺组织于10%福尔马林液中,石蜡包埋、制片后HE染色,按文献[6]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。

2 结果

2.1 大鼠血浆及胰腺组织ET变化,见表1

AHNP血浆ET水平1 h明显升高($P<0.01$),6 h达峰值,24 h虽有所下降,但仍显著高于对照组。胰腺组织,ET水平0.5 h明显升高($P<0.01$),6 h达峰值,24 h虽有所下降,但仍显著高于对照组。

* 任晓葆,男,32岁,主治医师,硕士研究生,现在急诊科

** 内分泌实验室

*** 附属大坪医院野战外科研究所第三研究室 重庆,400042

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

表 1 大鼠血浆及胰组织 ET含量变化 (n= 8) ($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The changes of concentrations of ET in plasma and pancreas tissue of rats(n= 8) ($\bar{x}\pm s$)

	Control	Post-AHNP				
		0.5 h	1 h	6 h	12 h	24 h
Plasma ET (pg/ml)	56.60± 13.02	69.58± 14.60	112.68± 27.74**	236.45± 50.69**	215.40± 48.02**	190.12± 31.85**
Pancreas tissue ET(ng/g)	959.13± 102.05	1248.50± 131.52*	2087.63± 122.78**	3264.75± 240.86**	3068.75± 185.47**	2885.25± 174.91**

** : P < 0.01 *vs* control

2.2 大鼠胰腺血流量变化,见表 2

AHNP胰腺组织血流量 0.5 h明显下降 (P < 0.05), 12 h达最低值, 24 h虽有所升高,但仍显著低于对照组。

2.3 大鼠胰腺组织 IP_3含量及胰腺细胞 $[Ca^{2+}]i$变化,见表 2

AHNP胰腺组织 IP_3含量及胰细胞 $[Ca^{2+}]i$ 0.5 h明显升高 (P < 0.05), 6 h达峰值, 24 h虽有所下降,但仍显著高于对照组。

2.4 胰腺组织光镜变化,见表 2

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可见坏死区波及整个小叶,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。

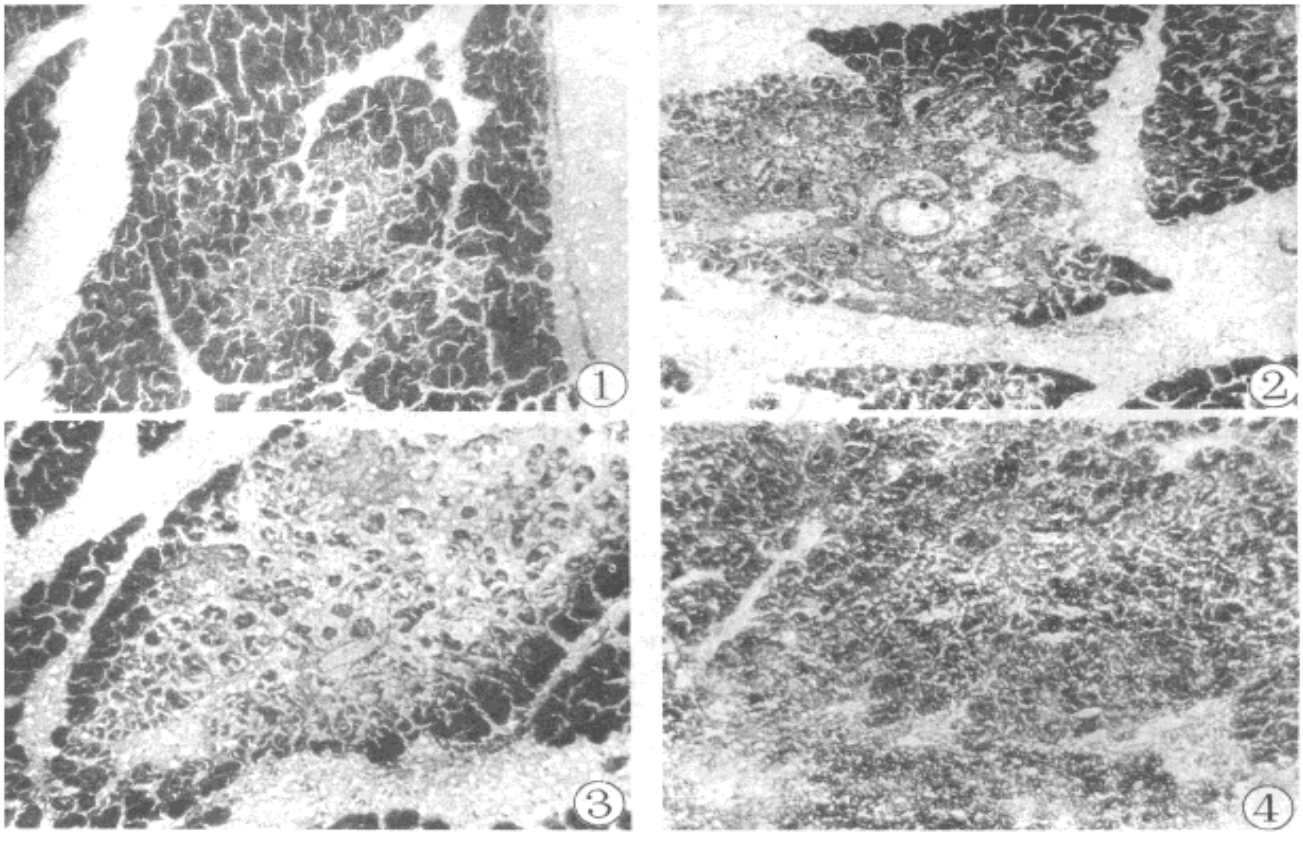


图 1 AHNP 0.5小时,胰腺小叶灶性坏死 (HE× 100)

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

图 2 AHNP 1小时,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小时,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 mass-like leaked erythrocytes, 6h after AHNP (HE× 100)

图 4 AHNP 24小时,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, with severe homorrhage and infiltration of a large number of leukocytes were seen, 24 h after AHNP (HE× 100)

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

表 2　大鼠 PBF、IP_3、$[Ca^{2+}]i$及病理评分变化

Tab 2　The changes of PBF, IP_3, $[Ca^{2+}]i$ and PM in rats

Groups	PBF (ml/100g)	IP_3(%)	$[Ca^{2+}]i$ (nmol/L)	PM
Control	94.20± 12.77	0.18± 0.04	109.97± 16.06	——
Time after AHNP (h)				
0.5	81.53± 9.90	0.23± 0.05	140.97± 20.42**	11.42± 1.20
1	61.68± 7.70**	0.38± 0.03**	232.00± 27.77**	15.60± 0.86
6	49.74± 8.61**	0.50± 0.05**	305.61± 37.47**	21.50± 0.91
12	42.33± 5.21**	0.47± 0.05**	287.82± 38.88**	22.81± 0.93
24	51.83± 11.90**	0.41± 0.04**	250.48± 30.94**	25.40± 1.82

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* control

2.5　相关性分析,见表 3

表 3　血浆 ET与胰腺组织 ET及两者与 PBF、IP_3、$[Ca^{2+}]i$、PM间相关性

Tab 3　Correlation of ET in plasma and pancreas tissue with PBF, IP_3, $[Ca^{2+}]i$, PM

		PBF	IP_3	$[Ca^{2+}]i$	PM	Plasma ET
Plasam	ET	−0.93**	0.96**	0.96**	0.89*	——
Pancreas	ET	−0.97**	0.98**	0.98**	0.92**	0.99**

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$

血浆 ET与胰腺组织 ET呈非常显著正相关($r = 0.99$, $P < 0.01$);血浆 ET及胰腺组织 ET与 PBF呈非常显著负相关($r = -0.93, -0.97$, $P < 0.01$);血浆 ET及胰腺组织 ET与 IP_3、$[Ca^{2+}]i$呈非常显著正相关($r = 0.96, 0.98$, $P < 0.01$);血浆 ET与 PM呈显著正相关($r = 0.89$, $P < 0.05$),胰腺组织 ET与 PM呈非常显著正相关($r = 0.92$, $P < 0.01$),胰腺组织 ET与 PBF、IP_3、$[Ca^{2+}]i$、PM间 r的绝对值较血浆 ET与 PBF、IP_3、$[Ca^{2+}]i$、PM间 r的绝对值更接近 1

3　讨论

本研究表明,AHNP大鼠血浆 ET含量早期逐渐递增,1 h呈非常显著升高,6 h达峰值,且持续到 24 h保持在高水平。这一变化与 PBF呈明显负相关,与胰腺病理评分值明显正相关。Liu[3]报道给急性水肿性胰腺炎大鼠输入外源性 ET-1,结果发现胰腺局部血流量呈剂量依赖性升高,明显致大鼠胰腺由水肿型向出血坏死的发展。Takaori[2]发现给正常狗注射不同剂量的 ET后,肝血流及平均动脉压未发生变化,然而 PBF呈剂量依赖性下降,推测认为胰腺组织对 ET有特异的亲和作用。AHNP鼠血 ET含量增加,一方面通其缩血管作用以保障其它脏器的血供,另一方面,使胰腺小动脉收缩、血管痉挛,致胰腺血供不足,胰腺缺血。文献报道[4],给急性水肿性胰腺炎大鼠输入外源性 ET 100 pmol/kg,明显减轻胰腺病理改变。这可能是 ET除缩血管作用外,在一定浓度下刺激产生前列环素类物质、血管松驰因子(NO)增加[7],从而有利于病变胰腺血循环改善。ET主要通过自分泌/旁分泌形式发挥生物学效应。由于 ET在血中半衰期短,因此我们测定了腺胰组织 ET变化。研究表明胰腺组织 ET在 0.5 h呈非常显著升高,6 h达峰值,持续到 24 h仍保持在高水平。其变化与 PBF呈显著负相关,与胰病理评分值呈显著正相关,其相关性较血浆 ET更密切,胰腺组织 ET初期升高较血浆早而且明显。众多实验[8]表明急性胰腺炎早期存在着胰腺组织的血循环紊乱,与我们测定 0.5 h胰腺血流明显下降结果一致。

细胞因子 ET需在靶细胞膜上与 ET受体识别通过胞内信息系统发挥作用。胰腺腺泡存在 ET_A、ET_B 两种受体[9],其与 ET结合后,一方面使 L型 Ca^{2+} 通道开放;另一方面激活胞膜上 PLC,生成 IP_3增多,引起胞内 Ca^{2+} 动员,从而致"钙超载"发生[5],使胰腺组织细胞损伤。本研究表明,AHNP大鼠胰腺 IP_3呈递增,其变化与 ET变化时间上一致,具有显著相关性。我们在实验中采用 Fura-2/AM 测定胰腺细胞内 $[Ca^{2+}]i$,更直接地反映了 AHNP大鼠胰腺细胞内 $[Ca^{2+}]i$变化,结果发现,细胞内 $[Ca^{2+}]i$变化与 ET具有显著相关性,从而表明,AHNP大鼠 ET通过磷酸肌醇代谢途径,参与了"钙超载"发生。

本研究初步显示了 AHNP大鼠内生性 ET变化规律及其在发病中的作用,为进一步拮抗 ET治疗 AHNP提供了实验数据。

参考文献

1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S *et al*. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988, 332: 411

2 Takaori K, Inoue K, Kogire M *et al*. Effects of endothelin on microcirculation of the pancreas. Life Sci, 1992, 51: 615

3 Liu X H, Kimura T, Ishikawa H *et al*. Effects of endothelin-1 on the development of hemorrhagic pancreatitis in rats. Scand J Gastroenterol, 1995, 30: 276

4 Kogire M, Inoue K, Higashide S I *et al*. Protective effects of endothelin-1 on acute pancreatitis in rats. Dig Dis and Sci, 1995, 40(6): 1207

5 Yule D I, Blevins Jr G T, Wagner A C *et al*. Endothelin increases $[Ca^{2+}]i$ in rat pancreatic acinar cells by intracellular release but fails to increase amylase secretion. Biochim Biophs Acta, 1992, 1136: 175

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

6 Spormann H, Sokolowski A, Letko G *et al*. Effect of temporary ischemia upon the development and histological pattern of acute pancreatitis in the rat, Path Res Pract, 1989, 184: 507
7 Dobosz M, Hac S, Wajda Z. Does nitric oxide protect from microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis in rats? Int J Microcirc Clin Exp, 1996, 16(5): 221
8 Kerner T, Vollmar B, Menger M D *et al*. Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. J Surg Res, 1996, 62(2): 165
9 Kakugawa Y, Paraskevas S, Metrakos P *et al*. Alterations in pancreatic microcirculation and expression of endothelin-1 in a model of chronic Pancreatitis. pancreas, 1996, 13(1): 89

(收稿: 1997-05-05;修回: 1997-10-06)
(编辑 王 红)

Changes of endothelin in plasma and pancreas in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis and their significance

Ren Xiaobao, He Zhengping, Feng Huafang, Duan Hengchun, Yang Hengwen (Department of Hepatobiliary Srugery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To measure the content of endothelin (ET) in the plasma and pancreas in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP) and determine the role of ET in the pathogenesis of AHNP. **Methods**: After the model of AHNP was established with the injection of 5% sodium taurocholate into the bile-pancreatic duct in rats, the changes of pancreatic blood flow (PBF), levels of ET and 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) in pancreatic tissue and the content of $[Ca^{2+}]i$ in pancreatic cells were dynamically observed. Meanwhile, the pathological changes of the pancreatic tissue (PCPT) were also quantitatively analyzed. **Results**: The level of ET in the plasma and pancreatic tissue was significantly increased and its increase in the plasma was slower than that in the pancreatic tissue in the early stage. Significant correlation was found among ET level in the plasma, ET level in the pancreatic tissue, PBF, IP3, $[Ca^{2+}]i$ and PCPT and the first was more closely correlated with the last four than the second. **Conclusion**: ET in the pancreas might mediate pancreatic ischemia in the early stage and that in the plasma aggravate pancreatic injury after AHNP in rats.

Key words acute pancreatitis; endothelin; blood circulation; Ca^{2+}; rat

(上接499页)

(2)反义 TGFβ1调节贮脂细胞 TGFβ1 mRNA的表达及抑制细胞外基质的合成:将高滴度的重组反义 TGFβ1逆转录病毒载体感染 Ito细胞株 LI90,经 G418筛选,获得抗性克隆并命名为 LIAT;用 Southern Blot杂交证实重组病毒已在转染细胞基因组 DNA内稳定整合,通过 RT-PCR和 Northern Blot杂交检测转染细胞内有反义 TGFβ1RNA存在。进一步用原位杂交及 RT-PCR分析发现转染反义 TGFβ1的培养细胞 LIAT表达的 TGFβ、TβRⅠ TIMP2 CoL1A1和 CoL4A1 mRNA明显低于未转染细胞,进一步用 Western Blot、免疫组化、ELISA和 RIA检测培养 LIAT细胞及培养上清内合成分泌的 TGFβ1及Ⅰ Ⅲ Ⅳ前胶原和 FN明显降低。另外,用免疫组化和原位杂交分析发现 LIAT细胞表达的 MT-MMP明显高于 LI90细胞,提示反义 TGFβ1RNA能有效抑制 Ito细胞内源性 TGFβ1的表达、合成分泌以及胶原等 ECM的合成;并能下调金属蛋白酶抑制剂 TIMP的表达和上调 TβRI及 MT-MMP的表达,加速 ECM的降解。

(3)脂质体和逆转录病毒复合物介导反义 TGFβ1RNA肝脏转移及其对肝纤维化的调节:我们通过门静脉将反义 TGFβ1基因与阳离子脂质体混合后再与重组逆转录病毒一起注入 CCl_4诱导的大鼠肝纤维化模型肝脏内,结果用 RT-PCR证实转基因大鼠肝脏有反义 TGFβ1 RNA的转录和表达。同时用原位杂交、Western印迹、免疫组化和 ELISA等方法检测发现,转染反义 TGFβ1的纤维化肝脏内源性 TGFβ1的表达、合成分泌明显低于未转染组。此外,通过免疫组化和原位杂交分析证实转基因组大鼠纤维化肝脏门静脉周围、肝小叶和纤维间隔内的 TβRI TIMP和 FN阳性细胞明显低于未转基因组,但是 MT-MMP MMP2 MMP9 MMP3和 TβR II阳性细胞却高于未转基因组。常规 HE染色和 V-G染色提示转基因组大鼠纤维化肝脏内的胶原纤维间隔较未转基因组减少,进一步通过扫描电镜观察发现转基因大鼠纤维化肝脏贮脂细胞内的微管及致密颗粒明显较未转基因组少。结果显示反义 TGFβ1RNA能通过抑制内源性的 TGFβ、TIMP1和 FN的表达以及刺激金属蛋白酶的产生而降低 ECM在肝脏的堆积。

总之,我们的结果提示反义 TGFβ1RNA能减缓或改善肝脏纤维化进程,对于慢性肝脏纤维化的治疗具有潜在的应用价值。

关键词 肝硬变;转化生长因子β1;反义核酸
中图法分类号 R575.2
(收稿: 1997-10-15;修回: 1997-11-24)
(编辑 冯崇英)

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