

重组葡激酶对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织缺血的影响

沙建平 薛耀明 陈炫 祝彼得 张新胜 陈卫银 冯本华 赵艳

【摘要】 目的 观察大鼠重症急性胰腺炎(SAP)时血中内皮素-1(ET-1)、血管性假血友病因子(vWF)、6-酮-前列腺素- $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$)、血栓素 B₂(TXB₂)、血小板最大聚集率(PAGm)水平及胰腺组织血流量的变化,评价重组葡激酶(r-Sak)对其的干预作用。**方法** 81只SD大鼠被随机分为假手术组、SAP模型组和r-Sak治疗组,每组27只。采用质量分数为5%的牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射方法建立SAP模型。于制模后6、12和18h检测下列指标:用组织血流仪检测胰腺组织的血流量;用放射免疫法检测血中ET-1、TXB₂和6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量;用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定血中vWF含量;用全自动血小板聚集仪检测胶原和花生四烯酸诱导的PAGm。**结果** 术后6、12和18h SAP模型组大鼠胰腺组织血流量呈逐渐下降趋势,各时间点胰腺组织血流量均较假手术组显著下降(P 均 <0.05),且术后各时间点PAGm及血中ET-1、vWF、TXB₂含量均较假手术组显著升高,6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 显著降低(P 均 <0.05);与SAP模型组比较,r-Sak治疗组术后各时间点PAGm、ET-1、vWF、TXB₂含量均显著降低,6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 则显著升高(P 均 <0.05)。**结论** r-Sak可明显改善SAP大鼠胰腺的微循环,增加胰腺组织的血流量,对SAP大鼠具有积极的治疗作用。

【关键词】 胰腺炎,急性,重症; 重组葡激酶; 内皮素-1; 血管性假血友病因子; 血栓素 B₂; 6-酮-前列腺素- $F_{1\alpha}$ 。

Effect of the recombinant staphylokinase on pancreatic ischemia in severe acute pancreatitis of rats SHA Jian-ping*, XUE Yao-ming, CHEN Xuan, ZHU Bi-de, ZHANG Xin-sheng, CHEN Wei-yin, FENG Ben-hua, ZHAO Yan. * Department of Endocrinology, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To investigate the changes in plasma endothelin-1 (ET-1), von Willebrand factor (vWF), serum 6-keto-prostaglandin $_{1\alpha}$ (PGF $_{1\alpha}$), thromboxane B₂ (TXB₂), platelet aggregation rate maximum (PAGm) and pancreatic blood flow after reproduction of severe acute pancreatitis (SAP) in rat, and the effect of recombinant staphylokinase (r-Sak) on SAP. **Methods** Eighty-one SD rats were divided randomly into the sham-operated group ($n=27$), the SAP model group ($n=27$), and the r-Sak treatment group ($n=27$). SAP was produced by administration of 5% sodium taurocholate into the pancreatic duct. The abdomen of rats was opened at 6, 12 and 18 hours after reproduction of SAP for determining the pancreatic blood flow. Blood was obtained at 6, 12 and 18 hours after reproduction of SAP for determining the concentration of plasma vWF with enzyme-labeled immunosorbent assay (ELISA). The concentration of plasma ET-1 and serum 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, and TXB₂ were detected by radioimmunoassay. The PAGm induced by collagen and eicosanoids was assessed. **Results** Pancreatic blood flow in the SAP group appeared to have a decreasing trend at 6, 12 and 18 hours after operation and were significantly decreased at all time points after reproduction of the model, compared with those of the sham-operated group (all $P<0.05$). The PAGm, content of plasma ET-1, vWF, and TXB₂ were significantly increased at all time points after reproduction of the model, while 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ was significantly decreased, compared with those of the sham-operated group (all $P<0.05$). Compared with SAP model group, PAGm, the content of plasma ET-1, vWF, and serum TXB₂ in the r-Sak group were decreased at all time points, however, the content of serum 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ was increased (all $P<0.05$). **Conclusion** The r-Sak can improve pancreatic microcirculation and enhance pancreatic blood flow in rats with SAP, and may be beneficial in the treatment of SAP.

【Key words】 severe acute pancreatitis; recombinant staphylokinase; endothelin-1; von Willebrand factor; thromboxane B₂; 6-keto-prostaglandin $_{1\alpha}$.

基金项目:“十五”863生物领域高技术首批重点课题资助项目(N02001AA215161)

作者单位:510515 广东广州,南方医科大学附属南方医院内分泌科(沙建平,薛耀明);610041 四川成都,四川大学华西医院感染科(陈炫);610041 四川成都,成都中医药大学(祝彼得,陈卫银,冯本华,赵艳);610041 四川成都,四川大学华西基础医学与法医学院组织胚胎学与神经生物学教研室(张新胜)

作者简介:沙建平(1969-),男(汉族),广西壮族自治区人,医学博士,副教授,副主任医师(E-mail:shajianping99@sina.com)。

重症急性胰腺炎(SAP)是一种发病机制复杂、治疗困难的急危重症,其确切的发病机制尚不完全清楚。近年研究表明,胰腺微循环的变化在急性胰腺炎(AP)发病中有重要作用,特别是胰腺缺血对炎症的发展是一个重要促进因素,胰腺局部微循环紊乱、微血管血栓形成、血流阻断可以导致 AP^[1];氧自由基的生成增加参与了 ANP 的病理过程,胰腺缺血被认为可能是急性坏死性胰腺炎胰腺组织出血、坏死、自溶的主要决定因素^[2]。因此,我们推测应用特异性溶栓剂可能对 SAP 的治疗具有积极作用。重组葡激酶(r-Sak)是具有纤维蛋白特异性的高效溶栓剂,因其不激活系统性纤溶、不良反应小、溶栓活性强(尤其是富含血小板的动脉血栓),而被认为是最有应用前景的溶栓药物之一。目前,r-Sak 常被用于治疗心肌梗死、脑血栓等血栓性疾病,对其影响冠状动脉(冠脉)、脑动脉血流方面的研究较多,而对胰腺炎的治疗及对胰腺组织血流的影响则均未见报道。本实验中动态观察了 SAP 大鼠血管内皮功能受损标志物、微循环变化及胰腺组织病理损伤情况,并探讨 r-Sak 的干预作用。

1 材料和方法

1.1 材料:81 只雄性 SD 大鼠,体重 250~280 g,由成都中医药大学实验动物中心提供。内皮素-1(ET-1)试剂盒由北方生物技术研究提供;血浆血管性假血友病因子(vWF)试剂盒由上海太阳生物技术公司提供;血栓素 B₂(TXB₂)、6-酮-前列腺素-F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})¹²⁵I 放射免疫试剂盒由苏州医学院血栓与止血研究所提供;牛磺胆酸钠为美国 Sigma 公司产品;r-Sak 标准品由中国药品和生物制品检定所提供。

1.2 动物模型制备及给药方法:将实验大鼠按随机数字表法分为假手术组、SAP 模型组及 r-Sak 治疗组,每组 27 只。实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水,用质量分数为 3%的戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,常规消毒,铺巾,沿腹白线切开入腹,经胰胆管逆行加压注入质量分数为 5%的牛磺胆酸钠溶液 1.5 ml/kg,约 10 min 胰腺出现肿胀及点状出血、坏死,模型即制备成功;假手术组动物仅翻动胰腺。r-Sak 治疗组于制模前 2 d 开始腹腔内注射 r-Sak 1.5 mg/kg,每日 2 次;假手术组和 SAP 模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 2 次。各组于术后 6、12 和 18 h 测定胰腺组织血流量后各处死 9 只动物,采集动脉血及胰腺组织标本待测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 胰腺组织血流量测定:分别于术后 6、12 和 18 h 腹腔内注射 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,消毒,铺巾,开腹,将 LS-Ⅲ 型组织血流仪的电解电极自胰腺脾侧端向右后上方穿入约 1.0 cm,20 min 后开始测量,并间隔 10 min 记录 1 次数据,由计算机自动运算并显示数据。

1.3.2 血浆 ET-1、TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 含量测定:均采用放射免疫方法,操作按试剂盒说明书。

1.3.3 血浆 vWF 测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)。在 ELX800 型酶标仪波长 492 nm 处测定各孔的吸光度(A)值,与 vWF 标准血浆含量之比(%)表示结果,用 EXCEL 软件绘制标准曲线,待测标本 vWF 含量由标准曲线计算得出。

1.3.4 血小板最大聚集率(PAGm)检测:用 CBY-NJ2 全自动血小板聚集仪检测,由胶原(2 μmol/L)和花生四烯酸(500 μmol/L)诱导,血小板聚集反应时间为 5 min,取其最大反应值作为最终测值。

1.3.5 组织病理学检查:按常规方法制备胰腺组织标本,苏木素-伊红(HE)染色,在光镜下观察胰腺组织的病理学改变。

1.4 统计学处理:应用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析,所有检测结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺组织血流量(表 1):SAP 后 6 h 大鼠胰腺组织血流量即呈逐渐下降趋势;SAP 模型组术后 6、12 和 18 h 胰腺组织血流量均较假手术组显著下降(P 均 < 0.05),r-Sak 治疗组各时间点胰腺组织血流量均较 SAP 模型组显著增高(P 均 < 0.05)。

2.2 各组 ET-1、vWF、TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 含量及 PAGm 的变化(表 1):SAP 模型组术后各时间点血中 ET-1、vWF、TXB₂ 及 PAGm 水平均较假手术组显著升高;而 6-keto-PGF_{1α} 水平则均显著降低(P 均 < 0.05)。r-Sak 治疗组各时间点血中 vWF、TXB₂ 及 PAGm 水平均显著低于 SAP 模型组,ET-1 在 6 h 时稍有增高,随治疗时间延长,12 h 和 18 h 较 SAP 模型组显著降低,6-keto-PGF_{1α} 则显著高于 SAP 模型组(P 均 < 0.05)。

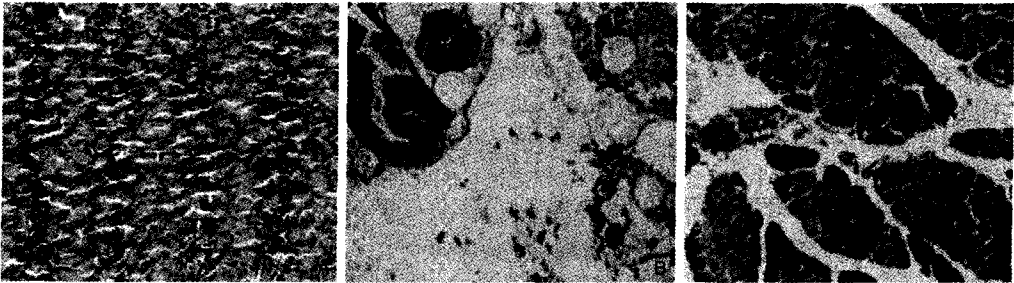
2.3 胰腺病理学改变:假手术组大鼠胰腺未见明显病理改变(图 1A)。SAP 模型组大鼠胰腺叶间隔及小叶间隔弥漫性扩张,伴局灶性至弥漫性腺泡间隙增宽,大量炎性细胞浸润,胰间隔充满大量红细胞,大片出血、坏死,细胞崩解,细胞核碎裂,大量坏死灶(图 1B)。r-Sak 治疗组大鼠胰腺充血水肿,叶间隔

表 1 各组胰腺组织血流量,血中 ET-1、vWF、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}和 PAGm 水平的变化($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Changes of blood levels of ET-1, vWF, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α}, PAGm and pancreatic blood flow in pancreatic tissue in each group($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	时间	胰腺组织血流量 (ml · 100 g ⁻¹ · min ⁻¹)	ET-1 (ng/L)	vWF (%)	TXB ₂ (ng/L)	6-keto-PGF _{1α} (ng/L)	PAGm(%)	
							胶原	花生四烯酸
假手术组	6 h	156.13±48.40	383.5±35.5	6.6±5.2	109.56±37.75	85.83±25.88	49.7±5.8	58.5±5.1
	12 h	155.50±47.90	385.0±36.3	6.8±5.8	108.02±46.13	98.52±14.87	50.8±6.1	60.5±4.9
	18 h	154.56±50.13	386.1±37.7	6.7±5.5	110.41±42.15	97.30±32.85	51.7±5.9	61.9±5.6
SAP 模型组	6 h	72.50±42.88 [#]	680.2±78.2 [#]	12.8±5.2 [#]	354.50±220.28 [#]	60.50±21.70 [#]	72.6±6.8 [#]	62.3±5.3 [#]
	12 h	56.70±18.13 [#]	1 128.0±221.8 [#]	40.8±4.6 [#]	847.60±151.88 [#]	52.45±18.50 [#]	81.3±5.2 [#]	73.2±6.1 [#]
	18 h	30.20±8.96 [#]	1 205.0±291.5 [#]	91.6±7.8 [#]	268.50±141.86 [#]	53.36±19.82 [#]	91.5±8.1 [#]	82.3±8.3 [#]
r-Sak 治疗组	6 h	122.52±18.53 ^{*#}	689.3±79.8 [#]	10.5±3.4 ^{*#}	250.13±122.21 ^{*#}	82.26±14.51 ^{*#}	61.5±4.6 ^{*#}	60.3±3.5 ^{*#}
	12 h	102.31±13.80 ^{*#}	880.0±210.5 ^{*#}	10.2±5.9 ^{*#}	528.20±132.58 ^{*#}	85.78±13.01 ^{*#}	63.4±4.3 ^{*#}	69.6±3.2 ^{*#}
	18 h	99.23±15.39 ^{*#}	1 100.0±200.3 ^{*#}	12.8±5.3 ^{*#}	170.38±125.35 ^{*#}	89.20±20.58 ^{*#}	66.2±5.3 ^{*#}	61.5±3.8 ^{*#}

注:与假手术组比较;[#] $P<0.05$;与 SAP 模型组比较;^{*} $P<0.05$



注:A:假手术组;B:SAP 模型组;C:r-Sak 治疗组

图 1 各组胰腺组织病理学改变(HE, ×100)

Figure 1 Pathological changes of pancreatic tissue in each group(HE, ×100)

及小叶间隔弥漫性扩张,少量炎性细胞浸润,腺细胞坏死呈点状(图 1C)。

3 讨论

胰腺微循环血栓形成是 SAP 的主要病因。新近研究发现,血小板激活程度与 SAP 的严重程度密切相关,血小板激活程度越高、血小板聚集率越高、血栓形成的危险性就越大^[3]。用低分子肝素抗凝治疗可以明显改善 AP 患者的血象和动脉氧分压,降低其重症化率和二次手术率^[4]。本研究发现, SAP 大鼠 PAGm 明显升高,提示血小板激活可能参与了 SAP 时的血栓形成;术后 6 h SAP 大鼠胰腺组织血流量下降明显,12 h 和 18 h 时降低更为突出,提示 SAP 大鼠早期就存在严重的胰腺缺血现象。另外,本实验还显示, r-Sak 治疗组胰腺出血和坏死明显减轻,胰腺组织血流量明显增加,由于 r-Sak 只有溶解血栓、改善微循环的功能,对 SAP 的作用是单一的,因此可进一步证明胰腺微血管血栓形成及微循环障碍是 SAP 发生发展的关键因素。

本研究中动态观察了 SAP 制模后大鼠血中 ET-1、vWF 等血管损伤标志物的变化,试图探讨血管损伤在胰腺缺血中的作用。ET-1 是体内惟一

由内皮细胞合成的因子,也是反映内皮功能的有效指标。ET-1 可激活磷脂酶 A₂(PLA₂)生成花生四烯酸,诱导血小板聚集,还可通过蛋白激酶 C 介导 Na⁺/H⁺ 交换体的激活,使细胞内 pH 值升高,促进血小板聚集^[5,6]。vWF 是由血管内皮细胞合成的大分子糖蛋白,主要储存于内皮细胞 Weibel-palade 小体中,是血管内皮细胞损伤的标志物之一,血管内皮细胞损伤可使血浆 vWF 水平升高,并通过其桥梁作用分别黏附于胶原纤维和血小板膜上的糖蛋白受体,促进血小板黏附和聚集。vWF 对判断血栓形成危险及病情轻重程度有重要参考价值^[7,8]。人们主要对 vWF 在心血管发病中的作用进行了研究^[9],而对其在 AP 时作用未见任何报道。本研究发现, SAP 大鼠术后 6 h 即出现了 vWF 及 ET-1 水平显著升高,12 h 和 18 h 时进一步增高,提示 SAP 早期即有血管内皮功能受损。

微循环的变化包括缺血和血管结构及代谢改变,全身炎症反应及多器官功能障碍发生时,前列环素(PGI₂)和 TXA₂ 发生了明显的变化^[10]。由于 AP 时 PLA₂ 释放加速了花生四烯酸释放,在环氧化酶、

前列腺素合成酶和血栓素合成酶作用下可生成大量的 PGI_2 和 TXA_2 ; TXA_2 可致血管强烈收缩和血小板聚集而形成血栓,造成 AP 时胰腺组织的灌注下降,使已有水肿的胰腺转化为坏死性胰腺炎^[11]。另外, TXA_2 也是 AP 并发症如肾功能衰竭、呼吸功能不全和肝功能衰竭的介导者。 TXB_2 是 TXA_2 的稳定无活性代谢产物,可间接反映 TXA_2 合成量; PGI_2 为血管扩张剂,并且可强烈抑制血小板聚集和激活,因此是 TXA_2 的生理拮抗剂。 PGI_2 不但有抑制白细胞激活作用,并且对急性坏死性胰腺炎时的肝、肾、肺中溶酶体有保护作用,可防止溶酶体酶向组织内释放, PGI_2 能减少胰酶的生成和向循环中释放的作用主要归因于 PGI_2 能减少细胞溶酶体酶释放^[12]。 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 是 PGI_2 的稳定代谢产物,可间接反映 PGI_2 的含量。本研究中 $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 、 TXB_2 测定结果证实, SAP 大鼠存在二十碳烯酸类异常代谢,提示二十碳烯酸类异常代谢可能参与了胰腺组织缺血的形成。

综上所述,本实验结果表明,应用 $r\text{-Sak}$ 治疗后, SAP 大鼠血中 TXB_2 、 ET-1 及 vWF 明显被抑制, $6\text{-keto-PGF}_{1\alpha}$ 水平升高, PAGm 显著降低,表明 $r\text{-Sak}$ 对 SAP 具有积极的治疗作用,提示二十碳烯酸类异常代谢、血管内皮细胞受损;抑制血小板活化既可能是加重 AP 的原因,又可能是其结果。

参考文献:

- 1 Foitzik T, Eibl G, Hotz H G, et al. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability and improved survival rates[J]. surgery, 2000, 128(3): 399 - 407.
- 2 李晓霞, 杨风华, 李淑华, 等. 硝普钠对重症急性胰腺炎家兔血清一氧化氮和超氧化物歧化酶的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(7): 434 - 435.
- 3 Lane J S, Todd K E, Gloor B, et al. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis[J]. J Surg Res, 2001, 99(2): 365 - 370.
- 4 焦华波, 乔治, 谭向龙, 等. 低分子肝素对急性胰腺炎患者预后的改善作用[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(12): 712 - 714.
- 5 Gibbs C R, Blann A D, Watson R D, et al. Abnormalities of hemorheological, endothelial and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm; effects of angiotensin converting enzyme inhibitor and beta - blocker therapy [J]. Circulation, 2001, 103(13): 1746 - 1751.
- 6 Plusczyk T, Bersal B, Menger M D, et al. Differential effects of ET-1 , ET-2 , and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation[J]. Dig Dis Sci, 2001, 46(6): 1343 - 1351.
- 7 Hlubocka Z, Umnerora V, Heller S, et al. Is mild essential hypertension without obvious organ complications and risk factors associated with increased levels of circulating markers of endothelial dysfunction? Effect of ACE inhibitor therapy [J]. Vnitr Let, 2002, 48(8): 718 - 723.
- 8 Conway D S, Pearce L A, Chin B S, et al. Prognostic value of plasma von willebrand factor and soluble P - selection as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation [J]. Circulation, 2003, 107(25): 3141 - 3145.
- 9 Ambarus V, Rezus C, Ghiuru R, et al. The implications of thromboembolism in chronic heart failure[J]. Rev Med Chir Soc Nat Lasi, 2002, 106(1): 107 - 111.
- 10 郭昌星, 杨兴易, 林兆奋, 等. 生脉注射液对全身炎症反应综合征患者血浆血管活性介质影响的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 239 - 241.
- 11 Buchler M W, Binder M, Friess H. Role of somatostatin and its analogues in the treatment of acute and chronic pancreatitis[J]. Gut, 1994, 35(3 Suppl): S15 - 19.
- 12 Yucel K, Alhan E, Kucuktulu U, et al. The effects of prostaglandin E_1 on the microperfusion of the pancreas during acute necrotizing pancreatitis in rats [J]. Hepatogastroenterology, 2002, 49(44): 544 - 548.

(收稿日期: 2007-01-21 修回日期: 2007-06-10)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

烫伤后微血管通透性升高与肌球蛋白轻链激酶有关

以往的研究证明, 肌球蛋白轻链磷酸化致使血管内皮细胞收缩可引起微血管通透性增高。肌球蛋白轻链激酶在肌球蛋白轻链磷酸化过程中起关键作用。最近国外医学人员研究了烫伤后血管内皮细胞屏障受损时肌球蛋白轻链激酶的作用。肌球蛋白轻链激酶-210 (MLCK-210) 主要表达于血管内皮细胞, 科研人员采用敲除 MLCK-210 基因的小鼠造成 25% 总体表面积 (TBSA) Ⅲ 度烫伤模型。用微循环显微镜活体观察肠系膜血流量, 测定渗漏的异硫氰酸荧光素标记白蛋白评估微血管通透性, 测量活体肠系膜的静水压。结果显示, 烫伤后小鼠肠系膜微血管通透性升高, 渗漏的异硫氰酸荧光素标记白蛋白为正常参考值的 2 倍, 肠系膜的静水压为正常参考值的 4 倍, 其 24 h 死亡率明显增加。但与未敲除 MLCK-210 基因对照组比较, 敲除 MLCK-210 基因的小鼠微血管通透性升高程度降低, 漏出的白蛋白和体液减少, 其存活率明显提高。结论: 在烫伤时肌球蛋白轻链激酶引起微血管通透性升高, 抑制其活性可作为治疗烧伤后水肿的靶点。

田易军, 编译自《Shock》, 2007-06-14(电子版); 胡森, 审校