

吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠急性坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同

■背景资料

重症急性胰腺炎除了胰腺本身病变外, 心、肝、肺、脑等重要脏器功能常常发生损伤。NF- κ B的异常活化引起炎症细胞过度活化以及炎症细胞因子失控释放, 是导致胰腺持续坏死以及胰外损伤的重要机制。

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同, 东南大学附属中大医院胆胰外科 江苏省南京市 210009
周家华, 副主任医师, 副教授, 主要从事肝胆胰外科的研究。
江苏省东南大学科技基金资助项目, No. 9247341180
通讯作者: 周家华, 210009, 江苏省南京市, 东南大学附属中大医院胆胰外科, zhoujiahua@hotmail.com
电话: 025-83272195
收稿日期: 2007-03-16 修回日期: 2007-08-10

Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate on liver injury in rats with severe acute pancreatitis

Jia-Hua Zhou, Hai-Tao Zhu, Feng-Chen Wang, De-Tong Yang

Jia-Hua Zhou, Hai-Tao Zhu, Feng-Chen Wang, De-Tong Yang, Department of Bile-pancreatic Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

Supported by: Southeast University Science Foundation, No. 9247341180

Correspondence to: Jia-Hua Zhou, Department of Bile-pancreatic Surgery, Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China. zhoujiahua@hotmail.com

Received: 2007-03-16 Revised: 2007-08-10

Abstract

AIM: To investigate the relationship between nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and liver injury in rats with acute pancreatitis, and to assess the effectiveness of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), an inhibitor of NF- κ B, on experimental acute necrotizing pancreatitis.

METHODS: Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: normal (Z), pancreatitis (Y), pre-intervention with intraperitoneal PDTC 1 h before modeling (A); post-intervention 1 hour after modeling (B); and PDTC 6 hours after modeling (C). Each group was randomly sub-divided into 6-, 12- and 24- hour groups, respectively. An acute pancreatitis rat model was produced by injecting taurocholate into the biliopancreatic duct. Sub-groups were sacrificed at 6, 12 or 24 hours after modeling. NF- κ B activ-

ity in the pancreas and liver was examined by gel electrophoretic mobility shift assay. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and amylase (AMY) were detected and pathological changes in liver and pancreas were observed.

RESULTS: NF- κ B binding activity was not detected in the Z group. At 6, 12, 24 hour, NF- κ B activities of the pancreas and liver in the Y group were significantly higher than that in the Z group ($P < 0.001$). One hour before and 1 hour after PDTC, PDTC could effectively inhibit NF- κ B activity in the pancreas and liver (18.14 ± 3.30 , 23.79 ± 3.62 vs 24.82 ± 4.57 ; 10.68 ± 2.51 , 13.83 ± 2.70 vs 16.38 ± 2.50 ; $P < 0.05$). NF- κ B binding activity in the A group was more inhibited than that in groups Y or B. ALT and AMY were distinctly elevated in group Y. However there were no meaningful changes observed among groups A, B, C and Y. Phlogistic changes in the liver and pancreas could be observed in the Y group. After intervention with PDTC, pathological changes were significantly alleviated in group A.

CONCLUSION: There are clear relationships between NF- κ B and liver injury in severe necrotizing pancreatitis. Early blockade of NF- κ B activity may be effective for avoiding liver injury in acute necrotizing pancreatitis.

Key Words: Pyrrolidine dithiocarbamate; Severe acute pancreatitis; Nuclear factor-kappa B; Electrophoretic mobility shift assay

Zhou JH, Zhu HT, Wang FC, Yang DT. Protective effects of pyrrolidine dithiocarbamate on liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(24): 2602-2606

摘要

目的: 探讨核因子 κ B(NF- κ B)抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)对大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)的预防治疗作用。

方法: 大鼠80只随机分为正常对照组(Z)、胰腺炎组(Y)和干预组。干预组又分为建模前1 h

PDTC干预组(A)、建模后1 h PDTC干预组(B)和建模后6 h干预组(C)。干预组按不同时间ip PDTC。建模后6, 12, 24 h分批处死, 临床全自动生化仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)和淀粉酶(AMY), 用凝胶迁移率改变分析法(EMSA)测定胰腺和肝脏中NF- κ B的活性。同时观察胰腺和肝脏的病理改变。

结果: 正常大鼠组织中几乎测不到NF- κ B的活性, 与Z组比较, Y组胰腺和肝脏组织中6, 12, 24 h NF- κ B活性分别明显增加($P<0.001$)。建模前1 h, 1 h后使用PDTC, 胰腺和肝脏组织中NF- κ B活性均受到抑制(18.14 ± 3.30 , 23.79 ± 3.62 vs 24.82 ± 4.57 ; 10.68 ± 2.51 , 13.83 ± 2.70 vs 16.38 ± 2.50 ; $P<0.05$), Y组血清ALT, AMY均高于对照组。病理学检查可以见到Y组和A, B, C组的胰腺和肝脏均有炎性改变, 但A组较Y组明显为轻。

结论: NF- κ B的异常活化与SAP以及肝损伤有明显关系; PDTC对SAP时肝损伤的发生有一定的预防作用。

关键词: 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐; 重症急性胰腺炎; 核因子 κ B; 凝胶迁移率改变分析法

周家华, 朱海涛, 王凤臣, 杨德同. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠急性坏死性胰腺炎肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(24):2602-2606

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2602.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床上常见的急症之一, 有相当一部分患者病情凶险, 除了胰腺本身的炎性肿胀、渗出、坏死外, 心、肝、肺、脑等重要脏器功能常常发生损伤。NF- κ B的异常活化引起炎性细胞过度活化以及炎性细胞因子失控释放, 在急性重症胰腺炎(SAP)的病程中是关键因素, 是导致胰腺持续坏死以及胰外损伤的重要机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley(SD)大鼠80只, δ , 体重200-250 g, 由东南大学医学院实验动物中心提供。术前12 h开始禁食, 自由饮水。戊巴比妥钠50 mg/kg ip麻醉。用50 g/L牛黄胆酸钠1 mL/kg作胰管穿加压注射, 0.2 mL/min, 术毕生理盐水5 mL sc, 自由饮水。二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)干预组分别在模型建立前1 h, 模型建立后1, 6 h PDTC 100 mg/kg ip。将大鼠随机分为正

常对照组(Z组, $n=8$)、SAP(Y组, $n=24$, 于建模后6, 12, 24 h分批处死, 每次8只)和干预组($n=48$)。干预组再分为建模1 h前PDTC干预组(A组, $n=16$, 于建模后6, 12 h分批处死, 每次8只)、建模1 h后PDTC干预组(B组, $n=16$, 于建模后6, 12 h分批处死, 每次8只)及建模6 h后PDTC干预组(C组, $n=16$ 于建模后12, 24 h分批处死, 每次8只)。建立ANP模型6, 12, 24 h后分别以切断右侧股动脉放血方法处死动物, 收集血清, 70℃保存, 分别摘取胰腺、肝脏, 无菌纱布拭去血液, 切一部分组织, 用液氮冷冻5 min后, -70℃保存, 以备提取组织NF- κ B蛋白。其余组织用40 g/L甲醛固定, 以备病理学检查。

1.2 方法^[1-2] 取动物组织100 mg, 用Dounce匀浆器匀浆, 加入缓冲液A 1 mL, 100 g/L NP-40 60 μ L后继续匀浆至液态, 以4℃, 266 g离心30 s, 上清为游离细胞和细胞核团, 将上清液冰浴30 min, 间断搅拌, 4℃, 13 054 g离心1 min, 弃上清, 沉淀为细胞核团。在细胞核团中加入缓冲液C 100 μ L, 冰浴30 min, 间断搅拌, 4℃, 13 054 g离心15 min。上清液即为核蛋白溶液, -70℃保存。并用Bradford方法检测样本的蛋白浓度。将1.75 μ mol/L NF- κ B寡核苷酸单链(A, B链)2.0 μ L, 10 \times 缓冲液1.0 μ L, 去离子无酶水3.5 μ L, γ -³²P ATP 5000 Ci/mmol 2.5 μ L, T4多核酶1.0 μ L分别加入A管和B管37℃孵育20 min, 而后加入0.5 mmol/L EDTA 1 μ L终止反应, 再将A, B管混合, 37℃孵育60 min。加入TE缓冲液78 μ L, -40℃保存。核蛋白15.0 μ g, 5 \times 结合缓冲液3.0 μ L, ³²P-标记的NF- κ B DNA 1.0 μ g, 加入缓冲液, 反应总体积15.0 μ L。37℃孵育30 min, 加入loading Buffer 2 μ L, 在50 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr/Bis 30/0.8), 在缓冲液为1 \times TBE, pH8.0, 50 V电压条件下预电泳30 min; 在缓冲液为1 \times TBE, pH8.0, 恒压110.0 V, 恒温4℃下电泳。Storm仪同位素扫描磷屏成像, 采用计算机凝胶图像分析测定图像中结合条带的灰度值, 用灰度值表示NF- κ B的活性。

统计学处理 数据以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 两组间比较采用 t 检验, 成组设计的多个样本均数比较采用单因素方差分析, 处理采用Prism3.0软件进行, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织学结果 所有大鼠均成功建立了急

■研究前沿

SAP时NF- κ B的过度活化可以促进单核/巨噬细胞释放大量炎症因子诱发SIRS及MODS, 特别是肝、肺损伤; PDTC对NF- κ B的活化有明显的抑制作用从而有效控制细胞因子的表达水平, 将处于高平衡状态的细胞因子降低到较低水平的平衡状态, 减少胰外脏器的损伤特别是肝损伤, 但需解决PDTC的临床应用。

■相关报道

国外研究提示失控释放的炎性介质除直接导致胰腺损伤外,还通过循环而播散到远处脏器,以内分泌的方式作用于全身,最终引起胰外脏器的损伤,特别是肝、肺损伤。

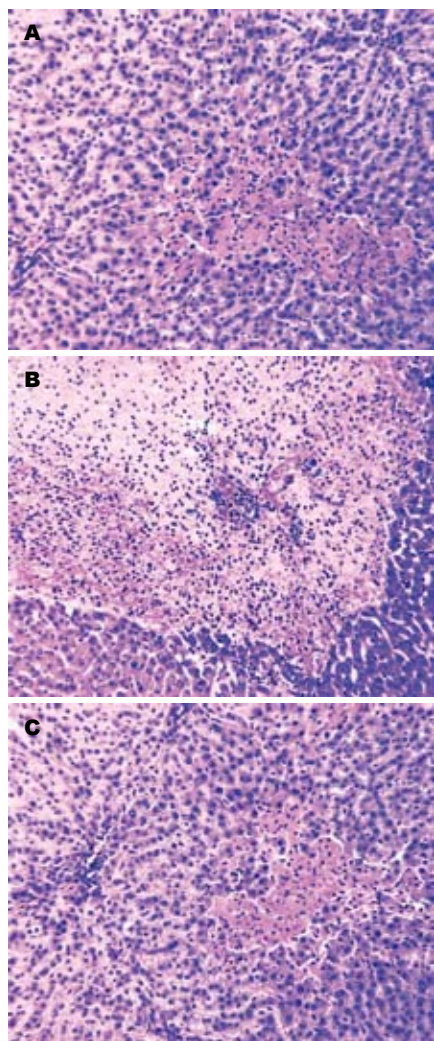


图1 大鼠肝脏病理变化(H&E × 200). A: Y 6 h; B: Y 24 h; C: A 6 h.

性胰腺炎模型. 剖腹后发现腹腔内均有不等量血性腹水, 脏层腹膜明显充血, 胰腺有散在的出血点、皂化斑, 局部呈现暗紫红色. 镜下Y 6 h组胰腺病理可见胰腺组织明显水肿, 大量腺细胞坏死, 伴中性粒细胞浸润, Y 24 h组更为明显, 腺体广泛坏死; 使用PDTC干预后的A 6 h组胰腺坏死与Y 6 h比较有所减轻. 肝脏在肉眼没有明显改变. 镜下Y 6 h肝脏组织可见小片坏死, 伴粒细胞浸润, Y 24 h组坏死区域明显扩大, 中性细胞浸润显著, PDTC干预的A 6组肝脏坏死病变区较Y 6 h有所减轻, 建模后6 h使用PDTC不能显著减轻SAP的病理损伤(图1).

2.2 血清酶的变化 SAP大鼠发病后血清AMY明显升高, SAP大鼠发病6 h后血清AMY浓度较正常组明显上升($P<0.05$), 6 h后Y各组间AMY值没有统计学差异($P>0.05$). Y组各个时间点与Z组比较AMY值的差异均有统计学意义($P<0.05$). A, B,

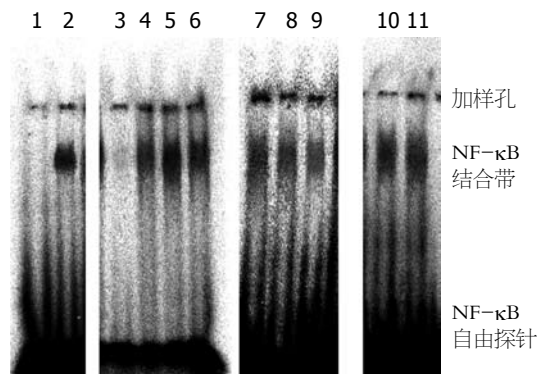


图2 大鼠胰腺NF-κB的EMSA电泳图. 1: 空白阴性对照组; 2: NF-κB标准品与探针; 3: 正常; 4-6: SAP 6, 12, 24 h; 7-9: Y 6 h, B 6 h, A 6 h; 10-11: Y 12 h, C 12 h.

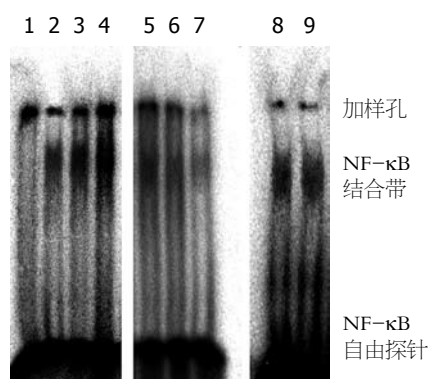


图3 大鼠肝脏NF-κB的EMSA电泳图. 1: 正常; 2-4: SAP 6, 12, 24 h; 5-7: Y 6 h, B 6 h, A 6 h; 8-9: Y 12 h, C 12 h.

Y×3组间AMY比较差异没有统计学意义. AMY值SAP在发病6 h后随着急性胰腺炎病程的进展没有表现进一步的升高. SAP发病后ALT, AST, LDH明显升高, 但Y各组间没有差异, 治疗组与非治疗组之间没有差异(表1).

2.3 NF-κB活性及PDTC的作用 SAP时各时间点以及PDTC干预组的胰腺和肝组织中NF-κB都出现了不同程度的活化, 而正常胰腺组织经EMSA测定后没有出现明显的NF-κB结合条带(图2-3, 表2).

3 讨论

肝损伤是SAP严重并发症, 病情凶险. 研究表明, 在SAP时炎性介质失控释放, 是SAP出现全身性炎性病变的基础, 也是最主要的发生机制. 失控释放的炎性介质除直接导致胰腺损伤外, 还通过循环而播散到远处脏器, 以内分泌的方式作用于全身, 最终引起胰外脏器的损伤^[3-4], 特别是肝、肺损伤^[5-8]. 而诸多炎症因子在基因水平上受到NF-κB的调节. NF-κB的过度活化可以促使

表 1 SAP大鼠血清淀粉酶, ALT, AST及LDH的活性U/L(mean \pm SD, $n = 8$)

分组			6 h	12 h	24 h
AMY	正常对照	Z	1269 \pm 311	—	—
	重症胰腺炎 ^a	Y	3373 \pm 1150	3930 \pm 1809	5954 \pm 5003
	1 h前PDTC	A	3293 \pm 882.4	2587 \pm 905	—
	1 h后PDTC	B	4478 \pm 2879	3275 \pm 1224	—
	6 h后PDTC	C	—	3201 \pm 1869	4804 \pm 2170
ALT	正常对照	Z	58.8 \pm 5.9	—	—
	重症胰腺炎 ^a	Y	92.0 \pm 16.6	83.8 \pm 37.3	76.6 \pm 29.1
	1 h前PDTC	A	89.9 \pm 25.6	82.3 \pm 30.3	—
	1 h后PDTC	B	123.1 \pm 115.5	96.4 \pm 69.6	—
	6 h后PDTC	C	—	111.8 \pm 71.7	184.3 \pm 130.1
AST	正常对照	Z	208.0 \pm 29.04	—	—
	重症胰腺炎 ^a	Y	491.1 \pm 138.7	347.5 \pm 122.0	297.0 \pm 80.39
	1 h前PDTC	A	338.0 \pm 97.54	317.8 \pm 71.08	—
	1 h后PDTC	B	399.0 \pm 206.0	431.0 \pm 454.4	—
	6 h后PDTC	C	—	548.0 \pm 438.6	693.1 \pm 356.6
LDH	正常对照	Z	2419 \pm 480.1	—	—
	重症胰腺炎 ^a	Y	2385 \pm 1247	1870 \pm 522.5	1515 \pm 808.3
	1 h前PDTC	A	2852 \pm 1026	1671 \pm 850.4	—
	1 h后PDTC	B	3003 \pm 932.8	2060 \pm 837.9	—
	6 h后PDTC	C	—	2399 \pm 770.8	2564 \pm 2089

^a $P < 0.05$ vs Z组.表 2 胰腺和肝组织中NF- κ B活性(积分灰度值 $\times 10^4$, mean \pm SD, $n = 8$)

分组			6 h	12 h	24 h
胰腺	对照组	Z	0.31 \pm 0.08	—	—
	重症胰腺炎 ^b	Y	24.82 \pm 4.57	27.76 \pm 4.13 ^c	26.76 \pm 3.63 ^d
	1 h前PDTC	A	18.14 \pm 3.30 ^d	—	—
	1 h后PDTC	B	23.79 \pm 3.62 ^e	—	—
	6 h后PDTC	C	—	29.72 \pm 3.21	—
肝	对照组	Z	0.45 \pm 0.13	—	—
	重症胰腺炎 ^b	Y	16.38 \pm 2.50	20.64 \pm 4.20 ^c	23.90 \pm 4.75 ^d
	1 h前PDTC	A	10.68 \pm 2.51 ^d	—	—
	1 h后PDTC	B	13.83 \pm 2.70 ^e	—	—
	6 h后PDTC	C	—	24.77 \pm 5.07	—

^b $P < 0.01$ vs Z组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs Y 6 h; ^e $P < 0.05$ vs A 6 h.

单核/巨噬细胞释放大量炎症因子而导致组织的炎性损伤, 最终诱发全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能障碍综合征(MODS)^[9-10]. SAP时, 胰腺及胰外组织中NF- κ B出现了显著活化, 他不仅影响SAP的进程, 而且也参与了SIRS, 多器官功能衰竭(MOF)的发生与发展. 我们发现正常大鼠的肝脏和胰腺组织中几乎测不到NF- κ B活性. 但SAP时, 胰腺组织以及肝脏组织中NF- κ B蛋白的活性明显升高. 且胰腺组织NF- κ B的活性增高

迅速, 但6 h后NF- κ B活性没有出现进一步的升高. 肝脏中NF- κ B的活性12 h后也没有出现进一步的升高. 镜下见肝细胞肿胀变性, 间质也出现粒细胞浸润; 随SAP病程发展, NF- κ B的活化升高, 上述病理变化出现不同程度的加重, 肝脏出现斑片状坏死. 血清ALT, AST以及LDH水平明显升高.

PDTC对NF- κ B的活化有明显的抑制作用, 从而达到抑制炎症的作用, 这一作用还与给药

■创新盘点

本文研究发现PDTC可以抑制NF- κ B的活化, 从而达到抑制炎症的作用, 另外还发现这一抑制作用与给药时间相关.

■同行评价

本文探讨了大鼠急性坏死性胰腺炎中NF- κ B活性的变化以及与其抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)对SAP的预防治疗作用, 研究内容较丰富, 结论比较可信, 有一定的临床意义。

时间有一定的关系。在肝脏, 建模前与建模后1 h内给药对NF- κ B的活化都有一定的抑制作用, 肝脏的损伤程度减轻, 但建模前1 h注射PDTC对NF- κ B的抑制效应高于建模后1 h注射等量的PDTC, 两者之间有统计学差异。在胰腺组织, 建模后1 h给药不能有效抑制NF- κ B的活性。使用PDTC抑制NF- κ B的活性后, 细胞因子的水平发生了下降, 肝脏的损伤程度减轻, 但ALT, AST以及LDH水平没有明显降低, 也没有出现统计学意义上的上升(虽然均值表现为一定的上升趋势), 这同有些研究结果不完全吻合。可能有以下原因: 实验条件的不同、模型炎症的严重程度、动物种类的差异、PDTC使用的剂量、麻醉剂的选择; NF- κ B的活化上调“保护性抗凋亡蛋白”的表达而发挥抗凋亡作用有关; PDTC在影响NF- κ B的同时也必影响其他信号传导途径, 此外由于NF- κ B是普遍存在的核内转录因子, 在抑制其活性的同时也将影响其他生物活性物质的表达。

NF- κ B的抑制可以有效控制细胞因子的表达水平, 也有助于将处于高平衡状态的细胞因子降低到较低水平的平衡状态, 减少胰外脏器的损伤特别是肝损伤。

4 参考文献

- 1 Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic*

- Acids Res* 1991; 19: 2499
- 2 J.萨姆布鲁克, E.F.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯著. 余冬雁, 梨孟枫译. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992: 495-569
- 3 Telek G, Feher J, Jakab F, Claude R. Acute pancreatitis: recent advances in understanding its pathophysiology. *Orv Hetil* 2000; 141: 267-278
- 4 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 195-203
- 5 Zhao YF, Zhai WL, Zhang SJ, Chen XP. Protection effect of triptolide to liver injury in rats with severe acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 604-608
- 6 Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, Blackwell TS, Christman JW, May AK, Parman KS, Stain SC. Endotoxin potentiates lung injury in cerulein-induced pancreatitis. *Am J Surg* 2003; 186: 526-530
- 7 Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 474-480
- 8 Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1166-1174
- 9 Murr MM, Yang J, Fier A, Gallagher SF, Carter G, Gower WR Jr, Norman JG. Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF-kappaB. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 20-25
- 10 Rakonczay Z Jr, Jarmay K, Kaszaki J, Mandi Y, Duda E, Hegyi P, Boros I, Lonovics J, Takacs T. NF-kappaB activation is detrimental in arginine-induced acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 696-709

编辑 程剑侠 电编 张敏

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作。此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种。评估结果如下: 一级(优秀)期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种。(中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)