

乌司他丁对急性重症胰腺炎大鼠 NF- κ B 活性 NF- κ B mRNA 表达的实验研究*

杨超, 单爱军, 钟源波(广东省深圳市人民医院急诊科 518020)

【摘要】 目的 研究乌司他丁对急性重症胰腺炎(SAP)大鼠 NF- κ B 活性、NF- κ B mRNA 表达的影响。方法 大鼠 64 只作为研究对象,随机分为对照组、SAP 模型组、乌司他丁静脉注射组和乌司他丁腹腔灌注组各 16 只。在给药后 24 h 后处死大鼠,取出胰腺组织标本。对胰腺组织标本进行病理评分;测定胰腺细胞 NF- κ B 活性及胰腺组织中 NF- κ B mRNA 表达。比较 4 组大鼠病理评分;淀粉酶、脂肪酶检测结果;胰腺细胞 NF- κ B 活性、NF- κ B mRNA 表达。通过各项指标判断乌司他丁及其不同给药途径对实验性急性重症胰腺炎大鼠 NF- κ B 活性、NF- κ B mRNA 的影响。结果 对照组与 SAP 模型组比较, NF- κ B 活性与急性胰腺炎呈正相关关系($r=0.572, P<0.05$)。乌司他丁静脉注射组和腹腔灌注组对急性重症胰腺炎状况均有改善,且乌司他丁腹腔灌注组各方面均有优势,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 乌司他丁对急性重症胰腺炎(SAP)大鼠 NF- κ B 活性、NF- κ B mRNA 表达具有明显的抑制作用,且腹腔灌注的给药途径作用更为显著。

【关键词】 急性胰腺炎; 乌司他丁; NF- κ B 活性; NF- κ B mRNA 表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.12.012 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)12-1620-03

An experimental study of the effect of ulinastatin on activity of NF- κ B and expression of NF- κ B mRNA in rats with severe acute pancreatitis YANG Chao, SHAN Ai-jun, ZHONG Yuan-bo (Emergency Department in the People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of Ulinastatin on activity of NF- κ B and expression of NF- κ B mRNA in rats with severe acute pancreatitis(SAP). **Methods** 64 rats as the research object, were randomly divided into the control group, SAP model group, ulinastatin intravenous injection group and ulinastatin peritoneal perfusion group with 16 rats in each group. The rats were killed 24 hours after administration medicines, and the pancreatic tissue specimens were removed. Pathological score was given to record pancreas tissues, the expression of NF- κ B mRNA in pancreatic cell and NF- κ B activity in pancreatic tissue were tested. The pathological score, the detection results of amylase, lipase, expression of pancreatic cell NF- κ B activity, NF- κ B mRNA of four groups of rats were compared to determine the effect of ulinastatin and different routes of administration on rat NF- κ B, NF- κ B activity of mRNA in experimental severe acute pancreatitis. **Results** Through the analysis of the control group and SAP model group, NF- κ B activity and acute pancreatitis were of positive correlation($r=0.572, P<0.05$). The status of severe acute pancreatitis of the ulinastatin intravenous injection group and intraperitoneal perfusion group were improved, and ulinastatin peritoneal perfusion group had advantages($P<0.05$), with statistical significance. **Conclusion** Ulinastatin can significantly inhibit the NF- κ B activity and expression of NF- κ B mRNA of rats with severe acute pancreatitis (SAP), and intraperitoneal route of administration is more effective.

【Key words】 acute pancreatitis; ulinastatin; NF- κ B activity; expression of NF- κ B mRNA

急性重症胰腺炎(SAP)是一种病死率高达 30% 的外科急腹症,具有起病突然、发展迅速的特点,目前在临床医学上尚未得到完全有效的控制^[1]。有关资料显示, SAP 发病与 NF- κ B 及 NF- κ B mRNA 的活性有密切联系^[2-3]。NF- κ B 及 NF- κ B mRNA 在受到刺激的细胞中被释放,通过细胞质转移到细胞核之中并识别特异性结合点,调节基因靶向转录^[4]。NF- κ B 及 NF- κ B mRNA 活性一旦失调,会在极大程度上扩散 SAP 病情。现将 NF- κ B 及 NF- κ B mRNA 活性检测数据作为药物的疗效指标,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 大鼠 64 只作为研究对象,其中雄性 34 只,雌性 30 只,体质量(220.3±13.2)g,购于香港科技大学医学中心(合格证号 0125960)。随机分为对照组、SAP 模型组、乌司他丁静脉注射组和乌司他丁腹腔灌注组各 16 只。4 组大鼠的性别、体质量等方面差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。实验前 12 h 以及术后禁食、禁水。

1.2 仪器与试剂 RT-PCR 试剂盒(BD Biosciences);乌司他丁(河北智同生物制药有限公司);淀粉酶、脂肪酶(OBR,

* 基金项目:广东省深圳市科技计划项目(201303011)。

作者简介:杨超,女,硕士,副主任医师,主要从事普通外科研究。

USA);2%戊巴比妥拉钠,5%牛磺胆酸钠(湖北华中制药厂)。NF-κB、β-肌动蛋白引物(北京化工厂)。

1.3 动物模型制备方法 (1) 对照组:大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥拉钠(0.3 mL/100 g)麻醉,起效后切开腹腔,翻动胰腺后关腹。(2) SAP 模型组:大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥拉钠(0.3 mL/100 g)麻醉,起效后切开腹腔,逆行十二指肠乳头穿刺胰腺注射 5%牛磺胆酸钠 0.1 mL/100 g,肉眼观察胰腺有坏死、出血症状后关腹观察。(3) 乌司他丁静脉注射组:同 SAP 模型组麻醉后,颈内静脉插管,同模型组制备模型后,立即通过插管注射乌司他丁(5 U/Kg)。(4) 乌司他丁腹腔灌注组:同 SAP 模型组麻醉后,在胰腺外放置灌注管和引流管,同模型组制备模型后,立即通过灌注管灌注乌司他丁至腹腔(5 U/Kg)后关腹。

1.4 检测方法

1.4.1 病理、淀粉酶、脂肪酶检测 4 组在术后 24 h 分别采血、取出腹水并进行离心处理,将分离出的上清液贮存于 -20 ℃ 冰箱(美的)备检;用 10% 甲醛固定胰腺组织,24 h 后病理、淀粉酶、脂肪酶进行检测。

1.4.2 NF-κB 活性检测:石蜡切片法制备胰腺切片 4 μm,脱蜡处理后脱水,使用双氧水对抗原修复,10% 甲醛固定胰腺组织 24 h,DAB 染色处理完全后,将切片封存,用 PBS 作为阴性对照进行观察并计算阳性率,阳性率=阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

1.4.3 NF-κB mRNA 表达检测:利用 RT-PCR 方法,按步骤引入 NF-κB p65 序列,使产物的长度扩张为 398 bp;引入 β-肌动蛋白的序列,使产物的长度扩张为 190 bp。分别在 50 ℃ 水浴环境中进行 40 min 逆转录后置于 PCR 仪器中,按照仪器操作步骤进行操作处理,得到的产物置于 15 mL/L 浓度的琼脂糖凝胶上进行电泳处理,系统计算吸光度的比值,从而得到 NF-κB mRNA 表达。

1.5 统计学处理 对本本进行切片及染色处理后,根据 Schmidt 法评分处理。所得数据进行统计学处理,采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *F* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 组病理检测结果 病理评分分别为对照组(5.32 ± 0.49)分、SAP 模型组(16.52 ± 0.84)分、乌司他丁静脉注射组(14.30 ± 0.65)分和乌司他丁腹腔灌注组(12.11 ± 0.43)分。SAP 模型组胰腺有坏死、出血症状,腹水含血、细胞充血,炎性细胞大量扩散,乌司他丁静脉注射组及乌司他丁腹腔灌注组相对于 SAP 模型组均有较大程度上改善,且灌注组改善优于注射组,差异有统计学意义(*F* = 9.372, *P* < 0.05)。

2.2 淀粉酶、脂肪酶检测结果 4 组淀粉酶、脂肪酶在手术后均有变化,乌司他丁静脉注射组及乌司他丁腹腔灌注组均优于 SAP 模型组,且灌注组改善程度优于注射组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 2。

2.3 NF-κB 活性及 NF-κB mRNA 的表达变化结果 通过统计数据显示,NF-κB 活性与 SAP 病理情况呈正相关关系(*r* = 0.572, *P* < 0.05)。乌司他丁静脉注射组和乌司他丁腹腔灌注组 NF-κB 活性及 NF-κB mRNA 的表达均优于 SAP 模型组,灌

注组两项数据较注射组均有明显优势,差异有统计学意义(均 *P* < 0.05)。见表 3。

表 2 4 组大鼠术后淀粉酶、脂肪酶检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	淀粉酶(U/L)	脂肪酶(U/L)
对照组	16	2 568.9 ± 124.3	256.3 ± 18.3
模型组	16	6 408.2 ± 188.2	830.9 ± 13.2
注射组	16	3 392.1 ± 164.9	503.7 ± 16.8
灌注组	16	4 439.3 ± 192.3	683.9 ± 22.3
<i>F</i> 值		6.37	8.25
<i>P</i> 值		0.021	0.038

表 3 4 组大鼠术后 NF-κB 活性、NF-κB mRNA 的表达变化结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NF-κB 活性	NF-κB mRNA 表达
对照组	16	20.31 ± 3.01	0.58 ± 0.06
模型组	16	38.42 ± 3.33	2.38 ± 0.56
注射组	16	30.10 ± 2.11	1.69 ± 0.12
灌注组	16	22.34 ± 2.52	1.08 ± 0.32
<i>F</i> 值		7.34	9.79
<i>P</i> 值		0.046	0.039

3 讨 论

SAP 的发病机制尚未完全阐明,难以进行有针对性的完全有效地治疗,其又具有恶化迅速、并发症难以控制、病死率高等特点,因此目前一直为研究的焦点。有关资料显示,外科手术治疗的方法不能使病情得到有效控制,难以达到治疗效果^[5-6]。目前研究认为其主要病因是胰腺细胞被刺激后自身破坏,激活多种酶,导致全身性的炎性,恶性循环危及生命^[7]。机体中细胞受到外刺激后使结合 NF-κB 的 IκB 的磷酸化和蛋白降解,从而迅速活化 NF-κB,NF-κB 进入线粒体与靶基因的启动子和增强子上的加结合序列结合,启动多数细胞因子、趋化因子、黏附分子、生长因子和免疫受体的表达,从而调节机体免疫、炎性反应、细胞分化和生长的功能比,因此,NF-κB 的活化是 SAP 发生和发展的关键环节^[8-9]。乌司他丁是一种可以对 SAP 发生、发展等环节产生抑制作用的酸性糖蛋白,稳定胰腺分泌,对于多种胰腺蛋白酶均有抑制作用,避免胰腺组织进行自身破坏和溶解,引导胰液通畅流动,达到保护胰腺细胞的效果。同时能对级联反应的继发性产生抑制作用,从而对血管的内皮细胞进行功能调节,使微循环优化,通过对胰腺微循环组织的局部改变,使胰腺组织释放介质抑制炎性,并对炎性因子消除,达到控制炎症扩散,有效减少了疾病对全身性生理损伤,降低器官衰竭危险性的效果^[10-12]。乌司他丁还具有抑制各种消化酶释放的作用,如糜蛋白酶、胰蛋白酶、粒细胞弹性酶、透明质酸酶等,可稳定线粒体和溶酶体膜,从而减少胃肠吸收内源性毒素,控制病情扩散;此外,乌司他丁通过对心肌抑制因子阻断合成作用,对其产生抑制,有效避免病患发生休克,危及生命。乌司他丁的优势特征,对 SAP 患者愈后的生理状况,起到至关重要的作用。乌司他丁还有价格较为低廉的优势,不

不良反应少,患者易于接受。

本组研究乌司他丁对 SAP 大鼠 NF-κB 活性、NF-κB mRNA 表达的影响。对照组和 SAP 模型组结果提示,NF-κB 活性与急性胰腺炎病理情况呈正相关关系($r=0.572$),说明通过 NF-κB 活性可抑制 SAP 的发展。采用乌司他丁静脉注射和乌司他丁腹腔灌注对 SAP 均有治疗效果,淀粉酶、脂肪酶检测结果表明,胰腺细胞 NF-κB 活性、NF-κB mRNA 表达等方面均优于对照组,与乌司他丁静脉注射组比较,乌司他丁腹腔灌注优势更为明显。

综上所述,乌司他丁对 SAP 大鼠有很好的疗效,可对 NF-κB 活性、NF-κB mRNA 表达进行合理有效控制,且腹腔灌注的给药方式效果更加显著,具有临床实际意义。

参考文献

[1] 王春丽,胡仲秋. 乌司他丁腹腔灌注在重症胰腺炎中的应用[J]. 中国实用医药,2013,19(1):71-73.

[2] 季雯婷,狄文. 乌司他丁联合奥曲肽治疗急性胰腺炎的临床疗效[J]. 国际妇产科学杂志,2013,40(2):138-141.

[3] 周波. 乌司他丁用于急性胰腺炎的效果评价[J]. 世界最新医学信息文摘,2013,13(7):8-10.

[4] 朱正文,俞斌. 乌司他丁治疗重症胰腺炎的效果分析[J]. 贵州医药,2013,37(6):529-530.

[5] Salim K, Fenton T, Bacha J, et al. Oligomerization of G protein coupled receptors shown by selective co-immuno-

precipitation[J]. JBC,2009,277(18):15482-15485.

[6] 顾立芳,伍少芬,何惠琼. 溃疡性结肠炎模型大鼠 NF-κB 活性、NF-κB mRNA 及 TNF-mRNA 的表达及芪倍合剂的干预作用[J]. 中国实用医刊,2013,40(4):88-89.

[7] 孟晓侠,陈智梅. PARP 抑制剂 5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP NF-κB 活性、NF-κB mRNA 活性的影响[J]. 实用心脑血管病杂志,2013,21(8):90-91.

[8] 周振苇,何志龙,施承松. 两种途径应用乌司他丁治疗重症急性胰腺炎的实验研究[J]. 现代医院,2013,13(8):56-57.

[9] 沈亚萍. 谷氨酰胺联合乌司他丁治疗对急性重症胰腺炎患者炎症因子的影响[J]. 浙江创伤外科,2013,18(2):173-174.

[10] 黄珍花,陆小婵. 不同营养支持对危重病患者 NF-κB 活性的影响及药物经济学分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):221-223.

[11] Martin-Oliva D, Ovalle F, Munoz-Gamez JA, et al. Crosstalk between PARP-1 and NF-κB modulates the promotion of skin neoplasia[J]. Oncogene,2011,23(31):5275-5283.

[12] 徐萍. 乌司他丁治疗急性水肿型胰腺炎 100 例临床分析[J]. 中国药业,2012,21(21):94-95.

(收稿日期:2013-12-31 修回日期:2014-02-25)

(上接第 1619 页)

[3] 李月霞,杨雯,韩芳,等. 剖宫产术后子宫瘢痕处妊娠 28 例分析[J]. 检验医学与临床,2010,3(4):109-111.

[4] 李建华,张磊,陈欣林,等. 超声造影在剖宫产瘢痕部位妊娠诊断中的临床应用价值[J]. 中华医学超声杂志,2009,6(4):684-689.

[5] Piérard-Franchimont C, Piérard GE. How I explore primary cicatricial alopecia[J]. Revue médicale de Liège,2012,67(1):44-50.

[6] 齐成秋,陆琳,孙华,等. 子宫切口妊娠的诊断及治疗[J]. 中国实用医药,2012,7(35):15-17.

[7] 吴闽君. 剖宫产术后子宫切口妊娠 21 例临床分析[J]. 中国综合临床,2008,24(21):72-73.

[8] 丁会莲,谢玉梅,孙凤玲. 剖宫产子宫切口裂伤 60 例的临床分析[J]. 检验医学与临床,2012,24(7):99-101.

[9] 刘玉兰. 子宫切口妊娠发病因素分析以及预防要求[J]. 国际医药卫生导报,2012,18(23):3459-3462.

[10] 李秀英,赵洪涛,王亚菊,等. 剖宫产术后子宫切口妊娠误诊临床分析[J]. 河北医学,2010,16(11):1400-1401.

[11] 谭莉,姜玉新. 子宫剖宫产切口处早期妊娠伴胎盘植入的

超声诊断和介入治疗[J]. 中华超声影像学杂志,2004,13(11):828-830.

[12] 王玲. 米非司酮配伍依沙吡啶在终止瘢痕子宫 14~20 周妊娠中的应用[J]. 检验医学与临床,2011,10(8):59-61.

[13] 谭昌莲. 剖宫产切口愈合不良的相关因素临床分析[J]. 中国实用医药,2008,25(13):44-45.

[14] 曾小连. 201 例剖宫产围手术期抗菌用药分析[J]. 中国医院药学杂志,2008,4(15):28-30.

[15] 王名燕. 剖宫产腹部切口延迟愈合的临床分析[J]. 检验医学与临床,2012,12(4):45-47.

[16] 梁琼,苏美如. 剖宫产患者目标性监测与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,5(15):90-92.

[17] Rajan S. Ectopic pregnancy within a cesarean section scar[J]. J Diagnos Med Sonogra,2006,22(17):395-398.

[18] Wang CJ, Chao AS, Yuen LT, et al. Endoscopic management of cesarean scar pregnancy[J]. Fertility and Sterility,2006,85(2):49-51.

(收稿日期:2013-12-23 修回日期:2014-01-30)