



腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎大鼠相关肝损伤的保护作用

朱玉乾, 郑传明, 宁长青

引用本文:

朱玉乾,郑传明,宁长青. 腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎大鼠相关肝损伤的保护作用[J]. 蚌埠医学院学报, 2023, 48(10): 1329–1332.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.10.001>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

乌司他丁通过miR-146a调节TLR4/NF- κ B信号通路减轻失血性休克大鼠肾炎性损伤研究

Study on ulinastatin alleviating the nephritis injury in hemorrhagic shock rats by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway via miR-146a

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 286–290,295 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.002>

醋酸钠林格液联合乌司他丁对失血性休克大鼠肝组织NF- κ B p65蛋白表达及其细胞因子的影响

Effect of sodium acetate ringer's solution combined with ulinastatin on the expression of NF- κ B p65 protein and cytokines in liver tissue of hemorrhagic shock rats

蚌埠医学院学报. 2018, 43(10): 1334–1338 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.10.016>

早期超声引导腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎病人肠道细菌移位及细胞因子的影响

Effect of early ultrasound-guided abdominal puncture and drainage on intestinal bacterial translocation and cytokines in patients with severe acute pancreatitis

蚌埠医学院学报. 2021, 46(7): 893–896 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.07.013>

醋酸钠林格液复苏联合乳酸菌对创伤失血性休克大鼠肠黏膜屏障的保护作用

Protective effect of sodium acetate Ringer's solution resuscitation combined with lactic acid bacteria on the intestinal mucosal barrier of rats with traumatic hemorrhagic shock

蚌埠医学院学报. 2021, 46(6): 708–712 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.06.002>

醋酸钠林格液对失血性休克大鼠心肌炎性介质及NF- κ B、MAPK信号通路的影响

Effect of sodium acetate Ringer's solution on inflammatory mediators and NF- κ B, MAPK signaling pathway in myocardial tissue of hemorrhagic shock rats

蚌埠医学院学报. 2020, 45(3): 281–285 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.03.001>

腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎大鼠相关肝损伤的保护作用

朱玉乾¹, 郑传明², 宁长青¹

[摘要] **目的:**探讨腹腔穿刺引流(APD)对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠相关肝损伤的影响。**方法:**将30只SD大鼠随机分为SAP未处理组(SAP组)、SAP APD组(APD组)和假手术组(SHAM组),每组10只。通过应用牛磺胆酸钠诱导重症急性胰腺炎模型,利用ELISA法检测大鼠外周血中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6及IL-10表达量;利用Western blotting法检测肝组织中Toll样受体4(TLR4)、磷酸化NF- κ B抑制蛋白(p-I κ B)、白细胞介素-1受体相关激酶4(IRAK-4)、磷酸化肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)和核转录因子- κ B(NF- κ B) p65的蛋白表达水平;在光镜下对肝组织进行形态学观察。**结果:**肝组织病理学结果显示APD组肝组织损伤程度轻于SAP组而重于SHAM组;在外周血中,与SHAM组比较,APD组TNF- α 、IL-6、IL-10的表达水平明显升高($P < 0.01$);与SAP组比较,APD组TNF- α 、IL-6的表达水平降低($P < 0.01$),IL-10表达水平明显升高($P < 0.01$)。在肝组织中,与SHAM组比较,APD组TLR4、p-I κ B、IRAK-4、TRAF6和NF- κ B p65蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$);与SAP组比较,APD组TLR4蛋白表达水平均明显降低($P < 0.01$)。**结论:**SAP合并肝损伤大鼠早期应用APD治疗可减轻肝细胞损伤,且APD抑制SAP大鼠肝损伤可能通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路表达来实现。

[关键词] 重症急性胰腺炎;肝损伤;腹腔穿刺引流

[中图分类号] R 576 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.10.001

Protective effect of abdominal paracentesis drainage against liver injury in rats with severe acute pancreatitis

ZHU Yu-qian¹, ZHEN Chuan-ming², NING Chang-qing¹

(1. Department of Emergency Surgery, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang Anhui 236000;

2. Department of Emergency Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of abdominal paracentesis drainage (APD) against liver injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** Thirty SD rats were randomly divided into SAP untreated group (SAP group), SAP APD group (APD group) and sham operation group (SHAM group), with 10 rats in each group. Sodium taurocholate was used to induce SAP model, ELISA method was used to detect the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and IL-10 in rat peripheral blood; Western blotting was used to detect protein expression levels of TLR4, p-I κ B, IRAK-4, TRAF6 and NF- κ B p65 in liver tissue; morphology of liver tissue under microscope was observed. **Results:** The liver histopathological results showed that the degree of liver tissue damage in the APD group was lighter than that of the SAP group and heavier than that of the SHAM group. In peripheral blood, compared with SHAM group, the expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-10 in APD group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with SAP group, the expression levels of TNF- α and IL-6 in APD group decreased ($P < 0.01$), and the expression level of IL-10 increased significantly ($P < 0.01$). In liver tissue, compared with SHAM group, the expression levels of TLR4, p-I κ B, IRAK-4, TRAF6 and NF- κ B p65 protein in APD group increased significantly ($P < 0.01$); compared with SAP group, the expressions level of TLR4, p-I κ B, IRAK-4, TRAF6 and NF- κ B p65 protein in APD group decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions:** Early application of APD in rats with SAP combined with liver injury can reduce liver cell damage, and APD inhibits liver damage in SAP rats may be achieved by inhibiting the expression of TLR4/NF- κ B signaling pathway.

[Key words] severe acute pancreatitis; liver injury; abdominal paracentesis drainage

重症急性胰腺炎(SAP)继发引起全身炎症反应

综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)常导致严重的并发症,如急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndromes, MODS),造成较高的死亡率^[1-2]。在SAP中,炎性介质和细胞因子的释放及肠道肠黏膜的破坏,可导致失调的病原体和内毒素从肠道转移到区域淋巴结、门静脉和外周血系统,造成全身性感

[收稿日期] 2021-11-02 [修回日期] 2022-09-09

[基金项目] 安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2019A0385)

[作者单位] 1. 安徽医科大学附属阜阳人民医院 急诊外科,安徽 阜阳 236000; 2. 蚌埠医学院第一附属医院 急诊外科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 朱玉乾(1988-),男,主治医师。

[通信作者] 宁长青,硕士研究生导师,主任医师。E-mail: 576788618@qq.com

染^[3]。胰腺炎性介质可通过门静脉直接损伤肝细胞,也可刺激库普弗细胞表达肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6等细胞因子参与SAP相关的局部和全身炎症反应的发展^[4]。在SAP的早期阶段,肝脏会刺激TNF- α 的产生,随着病情的发展,过多的TNF- α 被释放到血液循环中,会导致远处器官的损伤,这表明肝损伤在SAP继发MODS的发生发展中起着核心作用^[5]。因此,改善肝损伤的治疗方法对减轻SAP的严重程度非常重要。胰腺炎相关腹水(pancreatitis-associated ascitic fluid, PAAF)在SAP的发展过程中起着重要的作用,它包含大量有害物质包括TNF- α 、IL和内毒素,可诱导胰腺组织坏死和加重炎症反应^[6]。研究^[7-8]表明,早期腹腔穿刺引流(abdominal paracentesis drainage, APD)通过引流PAAF已被证实可降低循环炎症因子水平、减缓多器官衰竭、降低死亡率且不会增加感染率,可以减少局部并发症发生和缩短住院时间。以上表明APD是治疗SAP一种安全有效的措施。所以早期研究APD对SAP合并肝损伤具有重要意义,且目前此方面机制研究较少。故本研究对SAP合并肝损伤大鼠早期应用APD,旨在探讨其保护SAP大鼠相关肝损伤的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 SD大鼠(雌雄不拘)体质量300~320 g,取自安徽医科大学实验动物中心。在整个实验过程中,所有大鼠均在无病原体的设施中饲养和喂养,昼夜周期为12 h。牛磺胆酸钠(PIONEER3434)购于陕西帕尼尔生物科技有限公司,Toll样受体4(TLR4)、MyD88、I κ B- α 、核转录因子- κ B(NF- κ B) p65(Lys310)、白细胞介素-1受体相关激酶(IRAK4)及磷酸化肿瘤坏死因子受体相关因子6(TRAF6)、p-p65购于MDL公司。动物实验按照安徽医科大学动物伦理委员会的指导方针进行。

1.2 动物实验及分组 30只大鼠根据随机数字表分为SAP未处理组(SAP组)、SAP腹腔穿刺引流组(APD组)和假手术组(SHAM组),每组10只。在SAP组和APD组中,使用微量注射泵通过胰管逆行注射5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g)诱发胰腺炎。APD组在诱发胰腺炎后立即将带真空球的引流管置入右下腹。假手术组大鼠除开腹外不做任何手术处理。实验中采用异氟醚(PPSJ-010070,美国)用麻醉机进行麻醉。模型建立24 h后处死大鼠。收集

血液样本、肝脏组织立即保存于-80℃冰箱备用。

1.3 肝脏组织病理学分析 肝脏组织样本用4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋后切片用苏木精-伊红(HE)染色,然后使用光学显微镜观察切片。

1.4 外周血中细胞因子TNF- α 、IL-6及IL-10检测 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海纪宁生物有限公司,中国)检测血清TNF- α 、IL-6及IL-10水平并根据制造商手册执行。

1.5 肝组织中TLR4、p-I κ B、IRAK4、TRAF6和NF- κ B p65蛋白检测 采用蛋白质提取试剂盒(上海纪宁生物有限公司)从大鼠肝脏组织中提取蛋白质。蛋白浓度使用BCA蛋白检测试剂盒(上海纪宁生物有限公司)测定。使用SDS-PAGE在凝胶电泳中对每个蛋白质样品进行等效分离后将它们转移至PVDF膜上。然后用小牛血清封闭1 h,在4℃下孵育过夜。加入二抗,室温孵育1 h后,再用TBST洗涤膜3次。通过增强的化学发光法(ECL)进行曝光、显影及定影,并用FluorChem灰度分析软件进行分析,计算各蛋白吸光度值的比值。

1.6 统计学方法 采用单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 肝脏组织病理学分析 光镜下观察:SHAM组肝细胞混浊肿胀不明显,较少炎性细胞浸润,肝窦及肝细胞间质淤血不明显;APD组肝细胞轻度混浊肿胀,少量炎性细胞浸润;SAP组肝细胞混浊肿胀明显,较多炎性细胞浸润,肝窦及肝细胞见明显淤血表现(见图1)。

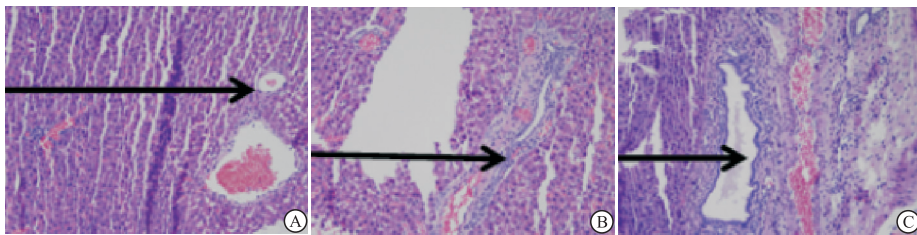
2.2 外周血血清中TNF- α 、IL-6、及IL-10的表达水平 与SHAM组比较,APD组TNF- α 、IL-6、IL-10的表达水平均明显升高($P < 0.01$);与SAP组比较,APD组TNF- α 、IL-6的表达水平均明显降低($P < 0.01$),IL-10表达水平明显升高($P < 0.01$)(见表1)。

2.3 肝组织TLR4、p-I κ B、IRAK4、TRAF6和NF- κ B p65蛋白表达水平 与SHAM组比较,APD组TLR4、p-I κ B、IRAK4、TRAF6和NF- κ B p65蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$);与SAP组比较,APD组TLR4、p-I κ B、IRAK4、TRAF6和NF- κ B p65蛋白表达水平均明显降低($P < 0.01$)(见表2)。

3 讨论

SAP是一种潜在具有致命性的急性炎症性疾病,发病率和死亡率均较高^[9]。肝脏作为SAP病人

胰腺外易受累器官之一,其受损可以促进 SAP 的进展,临床上肝损伤是 SAP 严重程度的重要指标,对 SAP 的预后具有重要的预测价值^[10]。本研究中,我们发现 SAP 大鼠表现出严重的肝脏组织结构的损伤改变。PAAF 因包含大量有毒物质及炎性介质,因此,任何去除 PAAF 的策略或方法都可能有效治疗 SAP 及其相关并发症。本研究表明,早期 APD 可以有效缓解和控制 SAP 的严重程度及减轻肝组织损伤。这是微创在治疗胰腺炎进程中重要的发展和补充,具有重要的临床意义。在探究 APD 对 SAP 继发肝损伤组织病理学研究的同时,我们更致力于进一步探究 APD 对 SAP 相关肝损伤的潜在治疗机制。



A: SHAM组; B: APD组; C: SAP组

图1 各组大鼠肝组织光镜下表现(黑色箭头示病理变化典型区域或部位)

表2 3组大鼠肝组织 TLR4、p-IκB、IRAK-4、TRAF6 和 NF-κB p65 蛋白表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	n	TLR4	p-IκB	IRAK-4	TRAF6	NF-κB p65
SHAM 组	10	0.41 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.42 ± 0.03	0.31 ± 0.01
SAP 组	10	1.34 ± 0.21 **	1.05 ± 0.34 **	0.87 ± 0.13 **	0.91 ± 0.13 **	0.93 ± 0.10 **
APD 组	10	0.75 ± 0.14 **△△	0.71 ± 0.12 **△△	0.52 ± 0.09 **△△	0.61 ± 0.06 **△△	0.52 ± 0.05 **△△
F	—	102.80	17.19	88.62	85.56	236.70
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	0.022	0.043	0.001	0.007	0.004

q 检验:与 SHAM 组比较 * $P < 0.01$; 与 SAP 组比较 △△ $P < 0.01$

在 SAP 的早期阶段,胰腺中受损和死亡的腺泡细胞会释放内源性危险刺激物作为损伤相关分子模式(DAMPs),通过影响巨噬细胞来激活和加剧炎症反应^[11]。炎症细胞因子的调节在不同的炎症性疾病中都有多种信号通路表达,如 TLR4/NF-κB 轴信号、Janus 激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)轴信号和转化生长因子-β/SMAD 相关蛋白激酶(TGF-β/SMAD)轴信号转导,参与促炎细胞因子基因的调控^[12-13]。在本研究中,我们建立了 SAP 继发肝损伤大鼠模型,以确定 APD 是否可以通过调节 TLR4/NF-κB 信号通路减轻与 SAP 相关的全身炎症反应和肝损伤。研究结果表明,APD 改善了 SAP 大鼠的炎症细胞因子和肝损伤,这可能与 TLR4/NF-κB 信号通路的抑制密切相关。

在包括胰腺炎在内的许多炎症性疾病中,脂多

表1 3组大鼠外周血血清中 TNF-α、IL-6、IL-10 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$; pg/mL)

分组	n	TNF-α	IL-6	IL-10
SHAM 组	10	15.54 ± 1.25	43.21 ± 4.12	52.12 ± 6.78
SAP 组	10	35.06 ± 3.23 **	120.34 ± 15.33 **	47.32 ± 1.09 *
APD 组	10	22.64 ± 4.07 **△△	85.15 ± 9.46 **△△	82.13 ± 2.88 **△△
F	—	102.50	131.90	192.50
P	—	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	9.520	113.800	18.480

q 检验:与 SHAM 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 SAP 组比较 △△ $P < 0.01$

糖(LPS)刺激的 TLR4 经历寡聚化并招募其下游,包括依赖髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)途径和非依赖 MyD88 途径,MyD88 进一步激活 IRAK-4,这是 IRAK1 激活和降解所必需的,活化的 IRAK1 TRAF6 使 UEV1A(泛素偶联酶 E2 变异 1 亚型 a)和 UBC13(泛素偶联酶 13)形成复合物并启动激酶级联反应,包括转化生长因子-β 激活激酶 1(TAK1)和 IκB(IKKs),IKKs 磷酸化 IκB 并导致其降解,从而消除 IκB 对 NF-κB 亚基的抑制作用,释放的 NF-κB 亚基从细胞质转移到细胞核,进而诱导促炎细胞因子基因的表达,如 TNF-α、IL-6 等^[14-15]。NF-κB 是由 p50 和 p65 亚基以及 IκB-α 组成的无活性复合体,其中以 p65 最具有转录活性,现已被证实是机体介导炎症反应的枢纽,在急性肝损伤中起关键作用^[16]。本实验中,我

们观察到 TLR4、p-I κ B、IRAK-4、TRAF6 和 NF- κ B p65 在 APD 组的肝组织中蛋白表达水平较 SAP 组明显降低,提示 APD 可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻 SAP 大鼠肝组织损伤。

TNF- α 是参与炎症反应重要因素之一,不仅诱导细胞凋亡和坏死,而且进入血液后诱导 IL-6 等 IL 的表达,从而引起瀑布样炎症反应并导致 SIRS^[17]。IL-10 是一种抗炎细胞因子,可抑制内毒素刺激的促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,也抑制辅助性 T 细胞的活化和 IL-6 的合成,从而抑制炎症介质的级联反应及延缓全身炎症反应的发生^[18]。基于以上研究,表明通过上调 IL-10 基因表达可以减轻急性胰腺炎诱导的炎性损伤。本研究结果表明,APD 可以降低 SAP 大鼠循环血液中 TNF- α 和 IL-6 表达水平,增加 IL-10 表达水平,说明 APD 在 SAP 促炎因子和抑炎因子表达平衡方面发挥重要作用,但其具体机制还需进一步深入研究。

综上所述,本研究结果表明,APD 治疗可减轻 SAP 大鼠肝损伤,且 APD 抑制 SAP 大鼠肝损伤可能通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路表达来实现。本研究可为 APD 治疗 SAP 相关肝损伤提供相关机制研究参考。

[参 考 文 献]

- [1] CHEN S, ZHUI J, SUN LQ, *et al.* LincRNA-EPS alleviates severe acute pancreatitis by suppressing HMGB1-triggered inflammation in pancreatic macrophages[J]. *Immunology*, 2021, 163(2):201.
- [2] ZHOU H, MEI X, HE X, *et al.* Severity stratification and prognostic prediction of patients with acute pancreatitis at early phase: a retrospective study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(16):e15275.
- [3] 张振海, 杜杰, 周硕, 等. 早期超声引导腹腔穿刺引流对重症急性胰腺炎病人肠道细菌移位及细胞因子的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(7):893
- [4] LI M, ZHANG X, WANG B, *et al.* Effect of JAK2/STAT3 signaling pathway on liver injury associated with severe acute pancreatitis in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3):2013.
- [5] WANG Y, LIU W, LIU X, *et al.* Role of liver in modulating the release of inflammatory cytokines involved in lung and multiple organ dysfunction in severe acute pancreatitis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2):765.
- [6] LUO C, HUANG Q, YUAN X, *et al.* Abdominal paracentesis drainage attenuates severe acute pancreatitis by enhancing cell

apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Apoptosis*, 2020, 25(3/4):290.

- [7] 郑传明, 王振杰, 纪忠, 等. 彩超引导下经皮穿刺置管引流术在重症急性胰腺炎合并胰周积液患者中的应用价值[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(10):1275.
- [8] LIU L, YAN H, LIU W, *et al.* Abdominal paracentesis drainage does not increase infection in severe acute pancreatitis: a prospective study[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2015, 49(9):757.
- [9] SU S, LIANG T, ZHOU X, *et al.* Qingyi decoction attenuates severe acute pancreatitis in rats via inhibition of inflammation and protection of the intestinal barrier[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(5):2215.
- [10] OU ZB, MIAO CM, YE MX, *et al.* Investigation for role of tissue factor and blood coagulation system in severe acute pancreatitis and associated liver injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85(1):380.
- [11] CHEN Z, DONG WH, WU Q, *et al.* Two-layer regulation of TRAF6 mediated by both TLR4/NF- κ B signaling and miR-589-5p increases proinflammatory cytokines in the pathology of severe acute pancreatitis[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(6):2379.
- [12] LIU T, ZHANG L, JOO D, SUN SC. NF- κ B signaling in inflammation[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2017, 2(1):17023.
- [13] TURNER MD, NEDJAI B, HURST T, *et al.* Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11):2563.
- [14] VERSTAK B, STACK J, VE T, *et al.* The TLR signaling adaptor TRAM interacts with TRAF6 to mediate activation of the inflammatory response by TLR4 [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96(3):427.
- [15] BALIC JJ, ALBARGY H, LUU K, *et al.* STAT3 serine phosphorylation is required for TLR4 metabolic reprogramming and IL-1 β expression[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):3816.
- [16] NEJAK-BOWEN K, MOGHE A, CORNUET P, *et al.* Role and regulation of p65/ β -catenin association during liver injury and regeneration: a "complex" relationship[J]. *Gene Expr*, 2017, 17(3):219.
- [17] YIN K, ZHAO G, HUANG X, *et al.* Inhibition of RhoA expression by adenovirus-mediated siRNA combined with TNF- α induced apoptosis of hepatocarcinoma cells[J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26(1):S2055.
- [18] KECELI M, KUCUK C, SOZUER E, *et al.* The effect of interleukin-10 on acute pancreatitis induced by cerulein in a rat experimental model[J]. *J Invest Surg*, 2005, 18(1):7.

(本 文 编 辑 周 洋)