

高原环境下重症急性胰腺炎肝损害 与白细胞介素-10的相关性： 大鼠的实验结果

朱海宏 潘慕苏 朱文君 郭亚民

810007 青海西宁,青海省人民医院普外科(朱海宏、朱文君、郭亚民);063000 河北唐山,唐山市工人医院肝胆外科(潘慕苏)

通讯作者:郭亚民,Email:Zhuhaihong1214@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.11.013

【摘要】 目的 动态观察重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肝损害各项指标及炎症抑制因子白细胞介素-10(IL-10)的表达,探讨不同高原海拔下SAP大鼠肝损害相关因子与IL-10的相关性。方法 将280只SPF级5~6月龄雄性Wistar大鼠按随机数字表法分为4组,每组70只,分别置于西安(海拔1027 m)、西宁(海拔2260 m)、兴海(海拔3300 m)和温泉(海拔3950 m)4个地区,再将每个地区大鼠随机分为假手术(Sham)组($n=10$)及SAP 1、6、12、24 h组(均 $n=15$)。采用胰腺背膜下注射牛黄胆酸钠的方法建立SAP大鼠模型;Sham组开腹后仅翻动胰腺数次后关腹。SAP各组分别于制模后相应时间点处死大鼠,Sham组于术后6 h处死大鼠;取腹主动脉血,用全自动生化分析仪检测血清淀粉酶(AMY)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平;取肝脏组织,采用免疫组化法检测IL-10的表达;取胰腺组织,苏木素-伊红(HE)染色后,光镜下观察其病理学改变。各指标间的相关性采用Pearson相关分析。结果 在不同海拔高度下,Sham组胰腺均未见明显异常;SAP各组胰腺均出现明显病理学改变,主要表现为胰腺腺泡肿胀、炎性细胞浸润,血管充血、出血,腺泡细胞变性、溶解,腺小叶结构改变,胰周脂肪坏死,且随时间延长及海拔升高而持续加重。在同一海拔高度下,SAP各组大鼠胰腺病理学评分,血AMY、ALT、AST水平,以及肝脏IL-10表达均较Sham组明显升高,并随时间延长呈持续升高趋势。Sham组大鼠胰腺组织病理学评分、AMY、ALT、AST、IL-10水平在不同海拔地区间比较差异均无统计学意义;在制模后相同时间点,SAP各组大鼠胰腺组织病理学评分、AMY、ALT、AST、IL-10水平随海拔升高亦呈持续升高趋势,在海拔最高的温泉地区SAP 24 h组各项指标与Sham组比较差异均有统计学意义[病理学评分(分): 11.06 ± 0.94 比 0.23 ± 0.15 , AMY(mmol/L): 2706.6 ± 208.3 比 336.5 ± 94.3 , ALT(U/L): 267.00 ± 5.37 比 52.00 ± 4.84 , AST(U/L): 465.88 ± 11.02 比 139.00 ± 11.61 , IL-10(A值): 0.579 ± 0.006 比 0.281 ± 0.006 ,均 $P < 0.05$]。相关性分析结果显示,不同海拔地区SAP大鼠IL-10与胰腺组织病理学评分、AMY、ALT、AST均呈显著正相关,在海拔最高的温泉地区IL-10与上述指标的相关系数(r 值)最大,差异均有统计学意义(r 值分别为0.959、0.928、0.977、0.983,均 $P < 0.01$)。结论 SAP大鼠的病情严重程度与海拔高度呈正相关;IL-10参与了SAP肝损害的病理过程,且其表达水平与海拔及SAP肝损害程度均呈正相关。

【关键词】 高原;重症急性胰腺炎;肝损害;白细胞介素-10

基金项目:青海省科技计划项目(2014-ZJ-745)

Correlation between the liver injury and the expression of interleukin-10 in severe acute pancreatitis at high altitude: a rat experimental result

Zhu Haihong, Pan Musu, Zhu Wenjun, Guo Yamin

Department of General Surgery, People's Hospital of Qinghai Province, Xining 810007, Qinghai, China (Zhu HH, Zhu WJ, Guo YM); Department of Hepatobiliary Surgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China (Pan MS)
Corresponding author: Guo Yamin, Email: Zhuhaihong1214@126.com

【Abstract】 Objective To observe the indexes of liver injury and the expression of inflammation-related factor interleukin-10 (IL-10) in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to discuss the correlation between the expression of IL-10 and the related factors of liver injury in SAP rats at different altitudes. **Methods** 280 male Wistar rats with SPF grade aged 5 to 6 months were divided into four groups according to random number table with 70 rats in each group, and the rats were placed in different altitudes such as Xi'an (at an altitude of 1027 m), Xining (at an altitude of 2260 m), Xinghai (at an altitude of 3300 m) and Wenquan (at an altitude of 3950 m). The rats in each altitude were randomly divided into sham operation group (Sham group, $n = 10$) and SAP 1, 6, 12, 24 hours groups (all $n = 15$). SAP rat model was reproduced by injecting sodium cholate into the posterior membrane of pancreas, and the rats of Sham group were only turned pancreas over several times after opening the abdomen and then closed the abdomen. The rats were sacrificed at the corresponding time points after model reproduction in SAP groups, and rats in Sham group were sacrificed at 6 hours after sham operation. At the same time, the abdominal aorta blood was harvested, and the contents of serum amylase (AMY), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)

were determined by automatic biochemical analyzer. Liver tissues were harvested, and the expression level of IL-10 was determined by immunohistochemistry. Pancreatic tissues were harvested, and hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe the pathological changes under light microscopy. The correlations among the indicators were analyzed by Pearson correlation. **Results** At different altitudes, no significant abnormality was found in the pancreas of Sham group, but significant pathological changes were found in the pancreas of all SAP groups, mainly manifested as pancreatic acinar swelling, inflammatory cell infiltration, vascular congestion and hemorrhage, acinar cell degeneration and dissolution, changes in glandular lobule structure, peri-pancreatic fat necrosis, and continuous aggravation with the increasing of time and altitude. At the same altitude, the pancreatic pathology score, the serum AMY, ALT and AST levels, and the hepatic IL-10 expression were all significantly increased in all the SAP groups as compared with those in Sham group, and they were continuously increased with time. In Sham group, there was no statistically significant difference in pancreatic pathology score, AMY, ALT, AST, or IL-10 level among different altitudes. At the corresponding time point after model reproduction, the pancreatic pathology score, AMY, ALT, AST and IL-10 levels in the SAP groups were also shown a continuous rising tendency with altitude increase, and the differences in above parameters of SAP 24 hours group in Wenquan area were statistically significant as compared with those of Sham group [pathology score: 11.06 ± 0.94 vs. 0.23 ± 0.15 , AMY (mmol/L): 2706.6 ± 208.3 vs. 336.5 ± 94.3 , ALT (U/L): 267.00 ± 5.37 vs. 52.00 ± 4.84 , AST (U/L): 465.88 ± 11.02 vs. 139.00 ± 11.61 , IL-10 (A value): 0.579 ± 0.006 vs. 0.281 ± 0.006 , all $P < 0.05$]. It was shown by correlation analysis that IL-10 of SAP rats at different altitudes was positively correlated with pancreatic pathology score, AMY, ALT and AST, the correlation coefficient (r value) between IL-10 and the above indicators in the Wenquan area with the highest altitude was 0.959, 0.928, 0.977, 0.983, respectively (all $P < 0.01$). **Conclusions** The severity of SAP rats was positively correlated with altitude. IL-10 was involved in the pathological expression process of SAP liver damage, and its expression level was positively correlated with altitude and the degree of SAP liver damage.

【Key words】 High altitude; Severe acute pancreatitis; Live injury; Interleukin-10

Fund program: Qinghai Provincial Science and Technology Department Application Project (2014-ZJ-745)

急性胰腺炎(AP)是胰腺的急性炎症反应,具有发病率高、进展快、病情复杂等特点,大多为轻度急性胰腺炎(MAP)和中重症急性胰腺炎(MSAP),具有自限性,预后良好;约15%~30%发展为重症急性胰腺炎(SAP),病死率极高^[1]。SAP短期内可出现肝、肾、呼吸功能衰竭,若不及时纠正,则可引起多器官功能障碍综合征(MODS)^[2]。SAP早期可通过激活免疫系统产生相关炎症因子和细胞因子,这些因子通过再次刺激机体免疫系统而产生连锁反应,从而导致全身炎症反应综合征(SIRS)^[3]。AP最常引起的并发症为肝损害,肝功能异常约占AP患者的40.0%~56.6%,而SAP患者肝损害发生率高达88.9%^[4],其解剖学基础为胰腺血流经过门静脉回流至肝脏,SAP时产生的多种细胞因子及毒性产物需通过肝脏进行代谢灭活,因此,肝损害是SAP最常见的并发症之一^[5]。高原地区受缺氧、低气压等综合暴露因素影响,增加了SAP肝损害的许多不确定因素。研究表明,在高原环境下特别是随着海拔的升高,全身各系统炎症反应明显加重,高海拔环境中空气氧含量下降,使肝脏处于相对缺氧状态,肝脏细胞脂肪变性不可避免^[6],势必加重SAP肝损害的进程,为高原地区SAP患者带来沉重的负担。白细胞介素-10(IL-10)是辅助性T细胞2(Th2)型细胞产生的主要细胞因子,具有抑制免疫应答、阻止炎症级联反应的功能,正常时血液中无法检出^[7],当机体出现炎症时可被大量表达,从而抑制炎症反应。

本研究旨在研究AP大鼠肝组织中IL-10表达在不同海拔的差异性及相关性,为临床研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器:IL-10免疫组化试剂盒、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色剂(武汉博士德生物工程有限公司),苏木素-伊红(HE)染色试剂、22%乌拉坦、磷酸盐缓冲液(PBS)、3% H₂O₂、10%中性甲醛溶液等(青海省人民医院病理科提供),牛黄胆酸钠(Na-Tc,美国Sigma公司);电热恒温水浴箱、4℃和-20℃低温冰箱、恒温培养箱、组织包埋机、轮转切片机(德国LEICA公司),显微成像系统(中国尼康影像仪器公司),液氮罐、光学显微镜、自动组织脱水机(美国Thermo Scientific公司),60℃和80℃烤箱、恒温孵育箱、全自动生化分析仪(日本Sysmex株式会社)。

1.2 实验动物及分组:280只SPF级5~6月龄雄性Wistar大鼠,体重(300±20)g,由西安交通大学医学部动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(陕)2012-003,编号:61001700000524。将大鼠按随机数字表法分为4组,每组70只,分别置于西安(海拔1027m)、西宁(海拔2260m)、兴海(海拔3300m)和温泉(海拔3950m)4个地区,再将每个地区大鼠随机分为假手术(Sham)组($n=10$)及SAP1、6、12、24h组(均 $n=15$)。所有大鼠在各自海拔习服20d,调整环境湿度、温度一致,自由摄食水。

1.3 动物模型制备及处理:各组实验大鼠术前禁食

12 h, 自由饮水。腹腔注射 22% 乌拉坦 4 mL/kg 麻醉大鼠后仰卧位固定于手术台上, 乙醇消毒手术域。SAP 各组开腹后找到胰腺, 分别在胰头、胰体以及胰尾部多点缓慢注射 5% Na-Tc, 总量按 1 mL/kg 计算; Sham 组开腹后仅翻动胰腺数次后关腹。各组大鼠清醒后自由饮水, 注意保持环境温度, 尤其是夜间将大鼠放置在火炉附近以保温。

1.4 伦理学: 本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并通过医院伦理学委员会审批(审批号: 2014-2-2)。

1.5 标本采集及病理组织提取: SAP 各组分别于制模后相应时间点处死大鼠; Sham 组于术后 6 h 处死大鼠。取腹主动脉血 3 mL, 置于含 0.109 mol/L 枸橼酸钠抗凝液的硅化玻璃管中, 离心 10 min 取上清液, 液氮罐中保存, 以备胰腺和肝脏酶学指标测定。取部分胰腺和肝脏组织于 10% 中性甲醛溶液中浸泡, 以备胰腺组织病理学评分和肝脏 IL-10 表达测定。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 胰腺组织病理学观察: 将浸泡在 10% 中性甲醛溶液中的胰腺组织取出, 石蜡包埋, 然后切成 4 μ m 厚的切片, 附于玻片后, 进行 HE 染色。采用双盲法由 2 位病理科医师于光镜下观察胰腺组织病理学改变, 采用改良 Grewal 评分标准随机取 4 个视野, 从水肿、坏死、炎症、出血 4 个方面对大鼠胰腺组织进行病理学评分。

1.6.2 胰腺和肝脏酶学指标检测: 取 3 mL 腹主动脉血上清液注入密封促凝采血管中静置 1 h, 低温离心 10 min 分离血清, 应用全自动生化分析仪检测淀粉酶(AMY)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平。

1.6.3 肝脏 IL-10 表达测定: 采用免疫组化法检测肝脏中 IL-10 的表达, 具体步骤参照试剂盒说明书进行。取肝脏石蜡切片脱蜡至水化, 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, 蒸馏水冲洗后用 PBS 浸泡 5 min, 重复 1 次, 微波热抗原修复, 室温下自然冷却。加入

5% ~ 10% 正常山羊血清封闭, 室温孵育 10 min; 滴加 1:100 羊抗兔 IL-10 抗体, 恒温 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBS 冲洗 5 min, 重复 3 次; 滴加适量生物素标记二抗工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 冲洗 5 min, 重复 3 次; 滴加适量的链霉素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; PBS 冲洗 5 min, 重复 3 次; 加入 DAB 显色剂显色, 充分冲洗后苏木素复染 5 min, 脱水、透明、封片后, 光镜下观察胞质呈棕黄色染色为阳性表达, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析 IL-10 表达的吸光度(A)值。

1.7 统计学处理: 所有数据均使用 SPSS 22.0 软件进行处理分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 并采用 SNK 法进行两两比较; 各指标间的相关性采用 Pearson 相关分析。检验水准取 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺病理学改变及评分: 在不同海拔高度下, Sham 组胰腺均未见明显异常。SAP 1 h 组胰腺腺泡肿胀, 小叶间隙增宽; 6 h 组胰腺小叶、腺泡、细胞等间隙均增宽, 血管内充血, 血管周围有炎性细胞渗出; 12 h 组胰腺腺泡细胞空泡样变性, 腺小叶结构破坏, 大片出血, 胰腺实质内可见散在的点片状坏死, 腺泡间大量炎性细胞浸润; 24 h 组胰腺组织呈大片状坏死, 甚至整个小叶坏死, 坏死区域腺泡结构消失, 细胞玻璃样变、核溶解消失, 胰周脂肪坏死。随海拔升高, 大鼠胰腺病理学改变逐渐加重(图 1)。

定量分析结果显示(表 1), 在同一海拔高度下, SAP 各组大鼠胰腺病理学评分均明显高于 Sham 组, 且随制模后时间延长呈持续升高趋势, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。Sham 组大鼠胰腺组织病理学评分在不同海拔地区间比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 在制模后相同时间点, SAP 各组大鼠胰腺组织病理学评分随海拔升高亦呈持续升高趋势, 差异亦有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

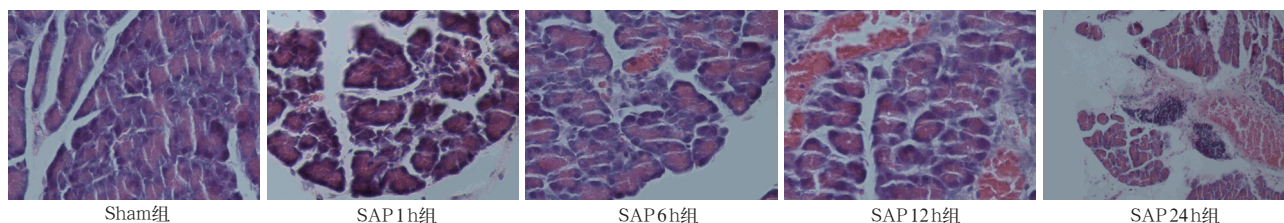


图 1 光镜下观察温泉地区(海拔 3950 m)各组大鼠胰腺组织病理学改变 假手术(Sham)组胰腺未见明显异常。重症急性胰腺炎(SAP) 1 h 组胰腺腺泡轻度肿胀, 小叶间隙增宽, 炎性细胞浸润; 6 h 组胰腺组织间出血, 脂肪坏死; 12 h 组腺小叶结构破坏, 腺泡失去正常组织结构; 24 h 组胰腺组织呈大片状坏死, 坏死区域腺泡结构消失 HE 染色 高倍放大

2.2 血清 AMY 水平(表 2):在同一海拔高度下, SAP 各组大鼠血清 AMY 水平均明显高于 Sham 组, 且随制模后时间延长呈持续升高趋势, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。Sham 组大鼠血清 AMY 水平在不同海拔地区间差异无统计学意义($P > 0.05$); 在制模后相同时间点, SAP 各组大鼠血清 AMY 水平随海拔升高亦呈持续升高趋势, 差异亦有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.3 血清 ALT、AST 水平(表 2):在同一海拔高度下, SAP 各组大鼠血清 ALT、AST 水平均明显高于 Sham 组, 且随制模后时间延长呈持续升高趋势, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。Sham 组大鼠血清 ALT、AST 水平在不同海拔地区间比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$); 在制模后相同时间点, SAP 各组大鼠血清 ALT、AST 水平随海拔升高亦呈持续升高趋势, 差异亦有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠胰腺组织病理学评分在不同海拔地区的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	病理学评分(分)				F 值	P 值
	西安	西宁	兴海	温泉		
Sham 组	0.18 ± 0.12 (10)	0.24 ± 0.16 (10)	0.17 ± 0.11 (10)	0.23 ± 0.15 (10)	0.726	0.540
SAP 1 h 组	3.12 ± 0.78 (13) ^a	3.35 ± 0.52 (13) ^{ae}	3.54 ± 0.56 (13) ^{ae}	3.75 ± 0.54 (12) ^{ae}	2.898	0.047
SAP 6 h 组	4.45 ± 1.01 (12) ^{ab}	5.13 ± 0.71 (12) ^{abe}	5.93 ± 0.75 (14) ^{abef}	6.25 ± 0.97 (12) ^{abef}	12.271	0.000
SAP 12 h 组	7.66 ± 0.98 (12) ^{abc}	8.13 ± 0.77 (12) ^{abce}	8.45 ± 0.99 (11) ^{abcef}	8.95 ± 0.64 (10) ^{abcef}	4.276	0.012
SAP 24 h 组	9.00 ± 0.94 (14) ^{abcd}	9.50 ± 0.67 (11) ^{abcde}	10.55 ± 0.96 (10) ^{abcdef}	11.06 ± 0.94 (8) ^{abcdef}	12.001	0.000
F 值	4.319	208.832	162.218	200.707		
P 值	0.010	0.000	0.000	0.000		

注: Sham 为假手术, SAP 为重症急性胰腺炎; 西安海拔 1 027 m, 西宁海拔 2 260 m, 兴海海拔 3 300 m, 温泉海拔 3 950 m; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 SAP 1 h 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 SAP 6 h 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 SAP 12 h 组比较, ^d $P < 0.05$; 与本组西安地区比较, ^e $P < 0.05$; 与本组西宁地区比较, ^f $P < 0.05$; 与本组兴海地区比较, ^g $P < 0.05$; 括号内为动物数

表 2 各组大鼠胰腺和肝脏酶学指标在不同海拔地区的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	AMY (mmol/L)				F 值	P 值
	西安	西宁	兴海	温泉		
Sham 组	327.5 ± 95.1 (10)	333.3 ± 97.7 (10)	330.0 ± 104.6 (10)	336.5 ± 94.3 (10)	0.019	1.000
SAP 1 h 组	613.3 ± 147.1 (13) ^a	656.1 ± 143.8 (13) ^{af}	801.7 ± 126.9 (13) ^{afg}	892.8 ± 138.0 (12) ^{afgh}	1 084.002	0.000
SAP 6 h 组	1 110.0 ± 193.9 (12) ^{ab}	1 217.3 ± 146.7 (12) ^{abf}	1 437.2 ± 139.1 (14) ^{abfg}	1 641.4 ± 135.4 (12) ^{abfgh}	28.383	0.000
SAP 12 h 组	1 384.2 ± 196.7 (12) ^{abc}	1 647.6 ± 159.0 (12) ^{abcf}	1 791.8 ± 123.6 (11) ^{abcfg}	2 089.1 ± 190.8 (10) ^{abcfgh}	32.676	0.000
SAP 24 h 组	1 706.6 ± 151.0 (14) ^{abce}	1 854.5 ± 222.5 (11) ^{abcef}	2 320.6 ± 222.0 (10) ^{abcefg}	2 706.6 ± 208.3 (8) ^{abcefg}	45.366	0.000
F 值	143.170	180.741	302.422	285.567		
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000		

组别	ALT (U/L)				F 值	P 值
	西安	西宁	兴海	温泉		
Sham 组	47.90 ± 5.88 (10)	49.00 ± 5.12 (10)	49.90 ± 6.04 (10)	52.00 ± 4.84 (10)	1.217	0.317
SAP 1 h 组	61.92 ± 4.80 (13) ^a	82.85 ± 6.34 (13) ^{af}	103.92 ± 6.75 (13) ^{afg}	173.02 ± 6.31 (12) ^{afgi}	772.443	0.000
SAP 6 h 组	73.50 ± 6.36 (12) ^{ab}	95.92 ± 5.70 (12) ^{abf}	128.12 ± 7.73 (14) ^{abfg}	188.50 ± 6.50 (12) ^{abfghi}	670.108	0.000
SAP 12 h 组	91.83 ± 5.97 (12) ^{abd}	112.00 ± 6.08 (12) ^{abdf}	142.00 ± 7.14 (11) ^{abdfg}	243.00 ± 5.29 (10) ^{abdfgi}	1 252.687	0.000
SAP 24 h 组	115.00 ± 5.05 (14) ^{abde}	131.91 ± 5.32 (11) ^{abdef}	163.00 ± 6.27 (10) ^{abdefg}	267.00 ± 5.37 (8) ^{abdefgi}	1 440.497	0.000
F 值	269.807	312.131	404.013	1 988.876		
P 值	0.001	0.000	0.000	0.000		

组别	AST (U/L)				F 值	P 值
	西安	西宁	兴海	温泉		
Sham 组	134.00 ± 10.17 (10)	135.30 ± 9.96 (10)	137.80 ± 10.48 (10)	139.00 ± 11.61 (10)	0.466	0.701
SAP 1 h 组	200.85 ± 11.91 (13) ^a	277.00 ± 9.31 (13) ^{af}	298.31 ± 11.46 (13) ^{afg}	329.00 ± 11.80 (12) ^{afgi}	304.170	0.000
SAP 6 h 组	256.00 ± 11.45 (12) ^{ab}	303.00 ± 10.42 (12) ^{abf}	329.73 ± 10.69 (14) ^{abfg}	374.92 ± 12.51 (12) ^{abfghi}	235.519	0.000
SAP 12 h 组	288.00 ± 12.28 (12) ^{abd}	322.00 ± 11.58 (12) ^{abdf}	340.00 ± 10.65 (11) ^{abdfg}	390.10 ± 10.98 (10) ^{abdfgi}	150.334	0.000
SAP 24 h 组	322.02 ± 9.82 (14) ^{abde}	353.36 ± 10.60 (11) ^{abdef}	423.05 ± 12.06 (10) ^{abdefg}	465.88 ± 11.02 (8) ^{abdefgi}	379.286	0.000
F 值	511.388	685.353	902.345	1 048.316		
P 值	0.000	0.000	0.004	0.000		

注: Sham 为假手术, SAP 为重症急性胰腺炎, AMY 为淀粉酶, ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶; 西安海拔 1 027 m, 西宁海拔 2 260 m, 兴海海拔 3 300 m, 温泉海拔 3 950 m; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 SAP 1 h 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 SAP 6 h 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 与 SAP 12 h 组比较, ^e $P < 0.01$; 与本组西安地区比较, ^f $P < 0.01$; 与本组西宁地区比较, ^g $P < 0.01$; 与本组兴海地区比较, ^h $P < 0.01$, ⁱ $P < 0.01$; 括号内为动物数

2.4 肝组织内 IL-10 表达: 光镜下观察显示,不同海拔高度下, Sham 组大鼠肝组织 IL-10 无阳性表达或仅见少量表达; SAP 各组肝组织均出现 IL-10 阳性表达,胞质呈棕黄色染色,且阳性细胞数随海拔升高和时间延长呈逐渐增加趋势(图 2)。

定量分析结果显示(表 3),在同一海拔高度下, SAP 各组大鼠肝组织 IL-10 表达均明显高于 Sham 组,且随制模后时间延长呈持续升高趋势,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。Sham 组大鼠肝组织 IL-10 表达在不同海拔地区间比较差异无统计学意义($P > 0.05$);在制模后相同时间点, SAP 各组大鼠

肝组织 IL-10 表达随海拔升高亦呈持续升高趋势,差异亦有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.5 相关性分析(表 4): 不同海拔地区 SAP 大鼠胰腺组织病理学评分、AMY、ALT、AST、IL-10 之间均呈显著正相关(均 $P < 0.01$)。

3 讨论

AP 是一种内外科常见病种,其发生率随着人们生活方式的改变而呈明显升高趋势, SAP 发生率也相应提高^[8]。由于 SAP 的发病机制异常复杂,且目前并不明确,在并发的其他器官损伤中以肝脏受累最为常见^[9],病情发展迅速,病程较短,病死率较高。

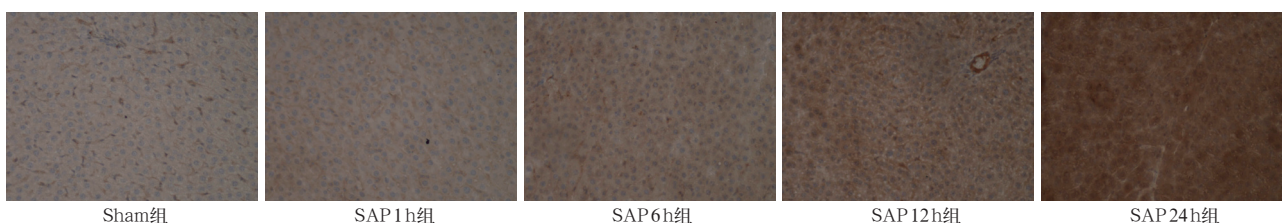


图 2 光镜下观察温泉地区(海拔 3950 m)各组大鼠肝组织白细胞介素-10(IL-10)的阳性表达 假手术(Sham)组大鼠肝组织仅见少量 IL-10 阳性表达;重症急性胰腺炎(SAP)各组肝组织均出现 IL-10 阳性表达,胞质呈棕黄色染色,1 h 为弱阳性,6 h 和 12 h 为中度阳性,24 h 为强阳性 免疫组化染色 高倍放大

表 3 各组大鼠肝组织 IL-10 表达在不同海拔地区的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-10(A 值)				F 值	P 值
	西安	西宁	兴海	温泉		
Sham 组	0.280 ± 0.005 (10)	0.280 ± 0.006 (10)	0.281 ± 0.006 (10)	0.281 ± 0.006 (10)	0.041	0.985
SAP 1 h 组	0.308 ± 0.005 (13) ^a	0.355 ± 0.006 (13) ^{ae}	0.392 ± 0.006 (13) ^{af}	0.442 ± 0.006 (12) ^{afg}	1 069.253	0.000
SAP 6 h 组	0.386 ± 0.006 (12) ^{ab}	0.420 ± 0.006 (12) ^{abe}	0.463 ± 0.006 (14) ^{abef}	0.512 ± 0.006 (12) ^{abefg}	948.425	0.000
SAP 12 h 组	0.456 ± 0.006 (12) ^{abc}	0.502 ± 0.006 (12) ^{abce}	0.521 ± 0.007 (11) ^{abcef}	0.549 ± 0.006 (10) ^{abcefg}	410.120	0.000
SAP 24 h 组	0.484 ± 0.006 (14) ^{abcd}	0.502 ± 0.006 (11) ^{abcde}	0.532 ± 0.006 (10) ^{abcdef}	0.579 ± 0.006 (8) ^{abcdefg}	411.778	0.000
F 值	3 319.593	2 988.269	2 935.495	3 595.646		
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000		

注: Sham 为假手术, SAP 为重症急性胰腺炎, IL-10 为白细胞介素-10; 西安海拔 1 027 m, 西宁海拔 2 260 m, 兴海海拔 3 300 m, 温泉海拔 3 950 m; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 SAP 1 h 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 SAP 6 h 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 SAP 12 h 组比较, ^d $P < 0.01$; 与本组西安地区比较, ^e $P < 0.01$; 与本组西宁地区比较, ^f $P < 0.01$; 与本组兴海地区比较, ^g $P < 0.05$; 括号内为动物数

表 4 不同海拔地区 SAP 24 h 大鼠胰腺病理学评分、AMY、ALT、AST 与 IL-10 之间的相关性

指标	AMY	ALT	AST	病理学评分	IL-10	指标	AMY	ALT	AST	病理学评分	IL-10
西安						兴海					
AMY		0.918 ^a	0.923 ^a	0.896 ^a	0.936 ^a	AMY		0.925 ^a	0.894 ^a	0.948 ^a	0.957 ^a
ALT	0.918 ^a		0.912 ^a	0.931 ^a	0.943 ^a	ALT	0.925 ^a		0.955 ^a	0.945 ^a	0.974 ^a
AST	0.923 ^a	0.912 ^a		0.922 ^a	0.947 ^a	AST	0.894 ^a	0.955 ^a		0.890 ^a	0.944 ^a
病理学评分	0.896 ^a	0.931 ^a	0.922 ^a		0.935 ^a	病理学评分	0.948 ^a	0.945 ^a	0.890 ^a		0.956 ^a
IL-10	0.936 ^a	0.943 ^a	0.947 ^a	0.935 ^a		IL-10	0.957 ^a	0.974 ^a	0.944 ^a	0.956 ^a	
西宁						温泉					
AMY		0.911 ^a	0.839 ^a	0.920 ^a	0.962 ^a	AMY		0.911 ^a	0.889 ^a	0.959 ^a	0.928 ^a
ALT	0.911 ^a		0.924 ^a	0.944 ^a	0.954 ^a	ALT	0.911 ^a		0.971 ^a	0.951 ^a	0.977 ^a
AST	0.839 ^a	0.924 ^a		0.928 ^a	0.896 ^a	AST	0.889 ^a	0.971 ^a		0.926 ^a	0.983 ^a
病理学评分	0.920 ^a	0.944 ^a	0.928 ^a		0.946 ^a	病理学评分	0.959 ^a	0.951 ^a	0.926 ^a		0.959 ^a
IL-10	0.962 ^a	0.954 ^a	0.896 ^a	0.946 ^a		IL-10	0.928 ^a	0.977 ^a	0.983 ^a	0.959 ^a	

注: 西安海拔 1 027 m, 西宁海拔 2 260 m, 兴海海拔 3 300 m, 温泉海拔 3 950 m; SAP 为重症急性胰腺炎, AMY 为淀粉酶, ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶, IL-10 为白细胞介素-10; a 代表 $P < 0.01$; 空白代表无此项

因此, SAP 引起的肝损害是临床上困扰 AP 治疗的常见问题,对 SAP 并发肝损害机制的研究具有十分重要的意义。

SAP 肝损害在临床有以下两方面影响:一方面,由于控制效果欠佳,肝损害进行性加重,可发生急性肝功能衰竭,导致患者短期内死亡;另一方面,由于肝脏受到毒素侵袭,肝细胞水肿,进而发生变性、坏死等情况,肝脏正常功能减弱或丧失,肝脏屏障功能降低或丧失,导致大量毒素入血,损害其他靶器官,导致多器官功能障碍,进而危及生命。

IL-10 主要作用为参与炎症反应,并抑制炎症反应^[10],在 SAP 中发挥重要作用。在 SAP 并发肝损害时,机体内的炎性抑制因子与致炎因子严重失衡,IL-10 可平衡两者,进而减轻胰腺炎的严重程度,减少肝损害,并预防后期肝脏纤维化^[11]。本研究证明,在零干预情况下,随着 SAP 时间的延长,肝损害程度逐渐加重。但 IL-10 存在高峰期,有临床研究报告, SAP 患者 IL-10 在 24 h 达到最高峰,之后逐渐下降^[12-13]。因此,24 h 肝脏中 IL-10 含量可以间接反映 SAP 及肝损害的严重程度。

高原是一种特殊的地理环境,在高原环境下 SAP 的严重程度较平原高,且与海拔高度有关,导致这种现象的原因很多,主要为低氧血症降低了各器官的免疫功能。缺氧可以造成肝组织细胞结构及功能的退行性变,还可导致无氧酵解增加,造成乳酸堆积,发生代谢性酸中毒。本实验中, SAP 大鼠肝脏及胰腺功能的各项指标均随海拔增高而增高,提示 SAP 肝损害严重程度与海拔有关,也证实了缺氧对 AP 的影响。

综上所述, SAP 相关损伤器官中存在着极为复杂的细胞因子连锁反应,而在环境条件恶劣的情况下,比如高海拔地区,炎性抑制因子与致炎因子之间的相互作用更为复杂。所以,对炎性抑制因子及抗炎因子的综合性研究,以及如何将机体炎性抑制因子 IL-10 的特性应用于临床实践,并减少炎性因子的过量表达,是未来研究的重点课题。

参考文献

[1] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组,《中华胰腺病杂志》编辑委员会,《中华消化杂志》编辑委员会,等. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海)[J]. 中华胰腺病杂志, 2013, 13 (2): 73-78. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2013.02.001. Chinese Medical Association Digestive Diseases Branch Pancreatic

Diseases Group, Editorial Board of Chinese Journal of Pancreatic Diseases, Editorial Board of Chinese Journal of Digestion, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of acute pancreatitis in China (2013, Shanghai) [J]. Chin J Pancreatol, 2013, 13 (2): 73-78. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2013.02.001.

[2] Zhang XP, Chen L, Hu QF, et al. Effects of large dose of dexamethasone on inflammatory mediators and pancreatic cell apoptosis of rats with severe acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (41): 5506-5511. DOI: 10.3748/wjv.13. i41.5506.

[3] Regimbeau JM, Kianmanesh R, Farges O, et al. Extent of liver resection influences the outcome in patients with cirrhosis and small hepatocellular carcinoma [J]. Surgery, 2002, 131 (3): 311-317. DOI: 10.1067/msy.2002.121892.

[4] 易文轶,刘正金. 异甘草酸镁对急性胰腺炎 NF- κ B 通路的影响及对肝损伤的保护作用 [J]. 中国临床研究, 2018, 31 (1): 63-65. DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2018.01.016.

Yi WY, Liu ZJ. Impact of magnesium isoglycyrrhizinate on NF- κ B pathway and its protective effect on liver injury in acute pancreatitis [J]. Chin J Clin Res, 2018, 31 (1): 63-65. DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2018.01.016.

[5] 徐彦哲,丁佑铭,汪斌,等. 急性胰腺炎肝损伤的研究进展 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2015, 21 (4): 284-288. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.04.021.

Xu YZ, Ding YM, Wang B, et al. Research progress on liver injury in acute pancreatitis [J]. Chin J Hepatobiliary Surg, 2015, 21 (4): 284-288. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.04.021.

[6] 朱海宏,吴新民,郭亚民,等. 高原低氧环境下急性坏死性胰腺炎大鼠胰腺及肝脏损伤的研究 [J]. 中华胰腺病杂志, 2015, 15 (2): 101-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2015.02.008.

Zhu HH, Wu XM, Guo YM, et al. Pancreas and liver damage of acute necrotizing pancreatitis rats under hypoxia plateau [J]. Chin J Pancreatol, 2015, 15 (2): 101-105. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2015.02.008.

[7] Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome [J]. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002, 1 (4): 343-351. DOI: 10.2174/1568010023344517.

[8] Frodsham AJ, Zhang L, Dumpis U, et al. Class II cytokine receptor gene cluster is a major locus for hepatitis B persistence [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103 (24): 9148-9153. DOI: 10.1073/pnas.0602800103.

[9] Erlank H, Elmann A, Kohen R, et al. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 51 (12): 2319-2327. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.033.

[10] Nourani MR, Yazdani S, Roudkenar MH, et al. HO1 mRNA and protein do not change in parallel in bronchial biopsies of patients after long term exposure to sulfur mustard [J]. Gene Regul Syst Bio, 2009, 4: 83-90. DOI: 10.4137/GRSB.S5871.

[11] Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, et al. Resveratrol protects against experimental stroke: putative neuroprotective role of heme oxygenase 1 [J]. Exp Neurol, 2010, 224 (1): 325-329. DOI: 10.1016/j.expneurol.2010.03.032.

[12] 程振兴,欧希龙. 细胞因子与重症急性胰腺炎并发多器官损伤 [J]. 东南大学学报(医学版), 2013, 32 (3): 370-374. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2013.03.028.

Cheng ZX, Ou XL. Cytokines and severe acute pancreatitis complicated with multiple organ injury [J]. J Southeast Univ (Med Sci Ed), 2013, 32 (3): 370-374. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6264.2013.03.028.

[13] 孙德利. 重症急性胰腺炎早期肠内营养应用时机的临床对照研究 [J]. 中国当代医药, 2011, 18 (15): 20-21. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2011.15.012.

Sun DL. Clinical control study on applied time of early implementation of enteral nutrition with sever acute pancreatitis [J]. China Modern Med, 2011, 18 (15): 20-21. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4721.2011.15.012.