

还原型谷胱甘肽对重症急性胰腺炎大鼠脑损伤的作用及其机制探讨

袁伟燕^{1,2}, 黄中伟³, 陈卫昌^{1*}, 包玉华³

(¹苏州大学附属第一医院消化内科, 江苏 苏州 215006; ²南通大学附属医院消化科, ³急诊内科, 江苏 南通 226001)

[摘要] 目的: 观察还原型谷胱甘肽(reduced glutathione hormone, GSH)对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大鼠海马神经元的保护作用。方法: 72 只 SD 大鼠分为 3 组: 生理盐水组(NS 组)、SAP 组和 GSH 组, 每组又分为 3、6、12 h 3 个亚组。SAP 组以 5% 牛磺胆酸钠逆行注入大鼠胰胆管建立 SAP 模型, NS 组仅向胰胆管注射与 SAP 组等量的无菌生理盐水, GSH 组在造模后按每 100 g 体重腹腔内注射 25 mg GSH。分别采用尼氏染色检测大鼠脑组织海马区神经元损伤情况, TUNEL 法检测海马神经元凋亡情况, 免疫组化法检测海马组织 NF- κ B p65 的表达。结果: 与 SAP 组比较, GSH 组在 GSH 治疗后 3、6 h, 胰腺病理评分明显改善(P 均 < 0.05), 海马神经元凋亡指数明显下降(P 均 < 0.05)。海马 NF- κ B p65 表达受抑, 尤以 GSH 组 GSH 治疗 6 h 后明显。结论: GSH 在 SAP 脑损伤的早、中期可以通过抑制大鼠海马组织 NF- κ B p65 蛋白的表达来减轻神经元凋亡。

[关键词] 还原型谷胱甘肽; 重症急性胰腺炎; 脑损伤

[中图分类号] R576

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)03-298-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160309

Protective effect of reduced glutathione on severe acute pancreatitis-associated brain injury in rats

Yuan Weiyan^{1,2}, Huang Zhongwei³, Chen Weichang^{1*}, Bao Yuhua³

(¹Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006; ²Department of Digestion, ³Department of Emergency, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of reduced glutathione (GSH) on the hippocampal neuron of rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** Seventy-two SD rats were equally assigned into 3 groups: the normal saline (NS) group, the SAP group and the GSH group. Each group included 3 subgroups: the 3, 6 and 12 h groups. SAP models were established by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the bile-pancreatic duct. Rats in the NS group were injected with normal saline instead of sodium taurocholate. Rats in the GSH group were peritoneally injected with GSH at the dosage of 25 mg/100 g body weight. Nissle stain was performed to evaluate the severity of brain injury. Hippocampal neuronal apoptosis was detected by TUNEL, and NF- κ B p65 expression was detected by immunohistochemistry. **Results:** Pathological scores of pancreatic injury were significantly lower in the groups of GSH(3 h) and GSH(6 h) than those in the groups of SAP(3 h) and SAP(6 h) ($P < 0.05$). Hippocampal neuronal apoptosis indexes were significantly decreased ($P < 0.05$). The expression of NF- κ B p65 was depressed mainly in the GSH(6 h) group. **Conclusion:** The hippocampal neuronal apoptosis in SAP rats with brain injury is reduced by GSH through an inhibition of NF- κ B p65 expression in the hippocampus.

[Key words] reduced glutathione; severe acute pancreatitis; brain injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03): 298-301]

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)可累及胰腺、胰腺周围组织以及肝、肾、肺、脑等全

身胰外器官,引起急性炎症反应综合征甚至多器官功能衰竭,病死率高达 30%~40%^[1]。其中,胰性脑病是 SAP 常见并发症之一,在 SAP 患者中的发病率为 9%~20%,病情凶险,病死率高达 67%~100%^[2],至今尚无有效的诊疗方法,对其发生机制亦未能完全了解。本研究拟通过观察还原型谷胱甘肽(reduced

[基金项目] 南通市社会发展指导性计划(S11950)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: weichangchen@126.com

glutathione hormone,GSH)对SAP大鼠海马组织核因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达以及神经元凋亡的影响,探讨GSH对SAP大鼠脑损伤的作用及可能机制,为防治SAP大鼠脑损伤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性清洁级SD大鼠72只,体重250~300g,由南通大学医学院实验动物中心提供。牛磺胆酸钠(Sigma公司,美国),NF- κ B p65一抗(SC8008,Santa Cruz公司,美国),TUNEL试剂盒(MERCK公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及模型制备

按随机原则分为生理盐水组(NS组)、SAP组及GSH组,每组又分为3、6、12h 3个亚组,每个亚组8只大鼠。NS组向胆胰管内注入等量无菌生理盐水。SAP组及GSH组参照Lankisch等^[3]的方法,术前禁食12h,不禁水,用10%的水合氯醛(300mg/kg体重)腹腔注射麻醉大鼠,以0.1mL/min速度向胆胰管内注入5%牛磺胆酸钠,剂量为每100g体重0.1mL;GSH组在造模后立即按每100g体重25mg的剂量腹腔内注射GSH。根据实验需要分别取材(血液、胰腺及海马组织)。

1.2.2 胰腺组织病理学检查及评分

切取胰头组织,立即用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,HE染色阅片。参考Rongione等^[4]的评分标准进行胰腺病理评分。

1.2.3 海马尼氏染色

常规石蜡切片分别经过脱蜡、染色、分色、脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。显微镜观察神经元细胞核呈淡蓝色,尼氏小体呈深蓝色。

1.2.4 海马NF- κ B p65免疫组化及结果判断

用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(streptavidin peroxidase,SP)检测。一抗的工作浓度1:100,以磷酸盐缓冲液(PBS)作为阴性对照。结果判定:以出现淡黄色至棕褐色颗粒且染色强度高于背景非特异性着色者为阳性细胞。半定量结果参考文献^[5],综合考虑阳性细胞数和染色强度。根据阳性细胞计数评分:1个视野内着色细胞>75%为4分;51%~75%为3分;11%~50%为2分;≤10%为1分;阴性0分。根据染色强度评分:棕褐色为3分;棕黄色为2分;淡黄色为1分;没有着色为0分。两项得分相乘:0~2分为阴性表达“-”;3分“+”;4分“++”;5分

以上“+++”;“+~+++”为阳性表达。

1.2.5 TUNEL法检测海马神经元凋亡

实验步骤按说明书进行,用荧光显微镜暗视野观察有亮绿色荧光为凋亡细胞,用Image Pro Plus 5.1图像分析软件进行分析,凋亡指数(AI)=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.3 统计学方法

用SPSS18.0统计软件,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间计量资料比较采用单因素方差分析,等级资料比较采用KW检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

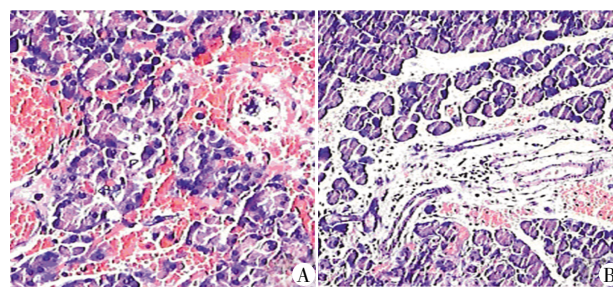
2 结果

2.1 胰腺组织学改变及病理评分

NS组早期可见部分间质水肿,少量中性粒细胞浸润,偶见点状出血,随时间延长,损害明显减轻。SAP组于造模后3h可见明显小叶间水肿,片状出血,炎性细胞浸润,未见明显细胞变性坏死,造模后6、12h可见大量炎性细胞浸润,小叶结构破坏,大量腺泡细胞坏死。GSH组注射GSH后3、6h较SAP组相同时间点胰腺损伤明显减轻,在造模后12h差别不明显(图1,表1)。

2.2 海马组织尼氏染色

NS组海马组织无明显损伤,CA1区锥体细胞核大而圆,锥体细胞3~4层,排列整齐致密,形态完整,尼氏小体丰富。SAP组造模后3h海马部分锥体细胞缺失,部分细胞胞核固缩,核仁欠清晰,



A:SAP组造模后6h;B:GSH组注射GSH后6h。

图1 胰腺组织HE染色(×125)

Figure 1 The HE staining of pancreatic tissue(×125)

表1 各级胰腺组织病理评分

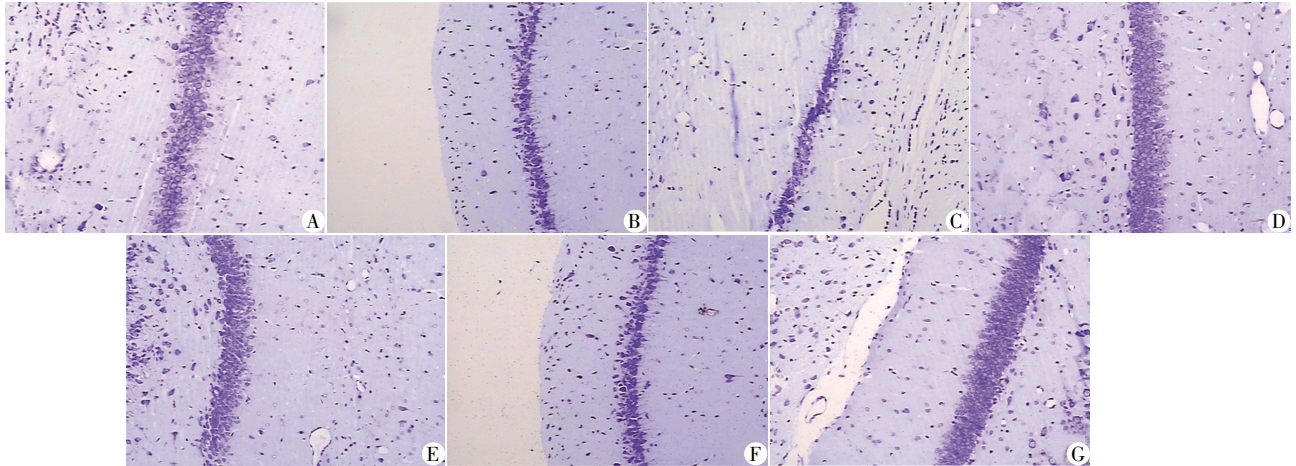
Table 1 Pathological scores of pancreatic tissues in each group ($\bar{x} \pm s$,分)

组别	3 h	6 h	12 h
NS组	0.51 ± 0.31	0.58 ± 0.33	0.68 ± 0.12
SAP组	3.49 ± 0.85*	4.28 ± 0.52*	6.39 ± 1.71*
GSH组	2.38 ± 0.50**	2.78 ± 0.40**	5.90 ± 1.15*

与NS组比较,* $P < 0.05$;与SAP组比较,** $P < 0.05$ 。

尼氏小体减少或消失。SAP 组造模后 6 h 海马组织有明显损伤,主要表现在 CA1 区大量锥体细胞缺失,残留的锥体细胞排列松散不规则,多数细胞胞核固缩,核仁欠清晰,尼氏小体减少或消失。SAP 组造模后 12 h

海马损伤进一步加重。GSH 组 GSH 注射后 3 h 开始,较 SAP 同时间组有所改善,GSH 注射后 6 h 海马组织改善情况尤为明显,但 GSH 注射后 12 h 与 SAP 组造模后 12 h 差异不明显(图 2)。



A: SAP 3 h 组; B: SAP 6 h 组; C: SAP 12 h 组; D: GSH 3 h 组; E: GSH 6 h 组; F: GSH 12 h 组; G: NS 组。

图 2 镜下观察海马神经元(尼氏染色,×100)

Figure 2 The hippocampal neuron under the microscope (Nissle staining, ×100)

2.3 海马 NF-κB p65 免疫组织化学染色结果

NS 组于造模后 6 h 见少量锥体细胞有 NF-κB p65 蛋白的较弱表达,主要位于胞浆内;SAP 组造模后 3 h 即可见较多 NF-κB p65 蛋白阳性表达的锥体细胞,造模后 6、12 h 阳性细胞明显增多,尤以造模后 6 h 时阳性表达最多,且阳性表达以胞核为主,胞浆亦有。GSH 组注射 GSH 后 3 h, NF-κB p65 阳性表达较同时间点 SAP 组有所减弱;GSH 组注射 GSH 后 6 h, NF-κB p65 阳性表达较同时间点 SAP 组明显减少;GSH 组注射 GSH 后 12 h, NF-κB p65 阳性表达较同时间点 SAP 组无明显差别(图 3,表 2)。

2.4 海马 TUNEL 检测结果

与 NS 组相比,SAP 组及 GSH 组海马区神经元凋亡明显增加($P < 0.05$)。与 SAP 组比较,经 GSH 治疗 3、6 h 后海马神经元凋亡明显改善($P < 0.05$),

表 2 NF-κB p65 在各组海马组织中的表达强度

Table 2 Expressions of NF-κB p65 in hippocampal tissues in each group (n)

表达强度	NS 组	SAP 组			GSH 组		
		3h*	6h*	12h*	3h**	6h**	12h*
-	7	0	0	0	1	0	1
+	1	1	0	1	6	2	4
++	0	6	1	5	1	5	2
+++	0	1	7	2	0	1	1

与 NS 组比较,* $P < 0.05$;与 SAP 组比较,** $P < 0.05$ 。

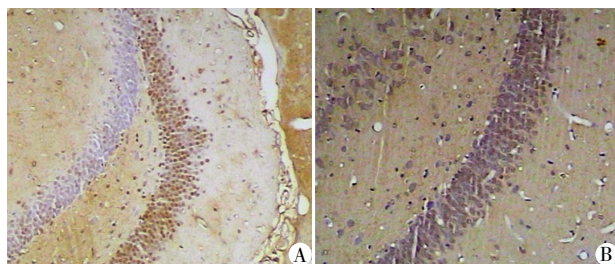
尤其是 6 h 时凋亡显著减少。但 GSH 治疗 12 h 后凋亡指数与相同时间点 SAP 组相比没有明显差别($P > 0.05$,表 3)。

表 3 各组海马组织神经元凋亡指数

Table 3 Apoptosis indexes of hippocampal neurons in each group (%)

组别	3 h	6 h	12 h
NS 组	0.33 ± 0.19	0.71 ± 0.67	0.45 ± 0.33
SAP 组	10.63 ± 0.24*	21.02 ± 0.25*	17.12 ± 0.36*
GSH 组	7.82 ± 0.15**	10.16 ± 0.32**	16.36 ± 0.13*

与 NS 组比较,* $P < 0.05$;与 SAP 组比较,** $P < 0.05$ 。



A: SAP 组造模后 6 h; B: GSH 组注射 GSH 后 6 h。

图 3 NF-κB p65 在海马组织中的表达(免疫组化,×100)

Figure 3 The expression of NF-κB p65 in hippocampal tissue (IHC, ×100)

3 讨论

胰性脑病是 SAP 的并发症之一,病情凶险,病死率高,再发性胰性脑病多数死亡^[6]。目前尚无有效诊疗方法,对其发病机制亦未能完全了解。有研究认

为 SAP 合并脑损伤的发生发展与细胞因子和炎症介质有关^[7-8]。我们以往的研究也发现,SAP 合并脑损伤的发病与 NF- κ B p65、Caspase-3 等有关^[9]。

NF- κ B 常见为 p65/p50 异二聚体。正常情况下与其抑制物 I κ B 结合存在于静止期细胞的胞浆中,当诱导因子刺激时,p65/p50 异二聚体激活进入细胞核,从而激活基因表达。有研究认为,大鼠急性胰腺炎时抵抗素、瘦素等通过激活 NF- κ B,继而刺激肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β) 等细胞因子的释放,从而加重胰腺炎症^[10]。NF- κ B 在脑组织内的活性相对高于其他组织^[11]。NF- κ B 除调控炎症分子表达外,还与细胞存活和凋亡密切相关。NF- κ B 能刺激 IL-1 β 转化酶蛋白、c-myc、TNF- α 、CED 基因的表达,从而引起细胞凋亡^[12]。

有研究表明,许多抗氧化剂能抑制 NF- κ B 活化,如 N-乙酰半胱氨酸能够直接清除活性氧簇,还能增加谷胱甘肽前体含量。抗氧化剂 LY341122 具有神经保护作用,可以通过抑制 NF- κ B 活性阻止神经元死亡^[13]。GSH 是机体内最重要的非酶性抗氧化物,具有清除氧自由基、解毒、维持红细胞膜完整性、维持脱氧核糖核酸的生物合成、细胞生长发育及细胞免疫等多种重要生理功能^[14]。已有研究发现,急性胰腺炎过程中存在细胞内 GSH 的耗竭^[15],在小鼠体内补充 GSH 可以缓解急性胰腺炎症状^[16]。也有研究表明,GSH 对缺血再灌注造成的脑损伤具有保护作用^[17]。

本研究观察到 GSH 治疗 SAP 后 6 h 内(尤其是 6 h),胰腺病理明显改善,海马神经元细胞内 NF- κ B p65 表达明显受抑,神经元凋亡也明显减少。验证了 GSH 在治疗 SAP 早中期可以改善胰腺局部炎症及脑损伤,其机制可能是 GSH 可通过抑制 NF- κ B 活化来减少海马神经元凋亡。此外,无论是减轻胰腺炎症还是抑制神经元凋亡,GSH 治疗后 12 h 没有明显保护作用,这可能与 GSH 的用量及其在大鼠体内的药代动力学等因素有关。有关加大 GSH 剂量或应用选择性的 NF- κ B 抑制剂能否进一步提高治疗效果,有待深入研究。

[参考文献]

[1] Lu CW, Liu LC, Hsieh YC, et al. Increased admission serum estradiol level is correlated with high mortality in patients with severe acute pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2013, 48(3): 374-381

[2] Wang XH, Zhuang X, Wei RL, et al. Protective effects of

Acanthopanax vs. Ulinastatin against severe acute pancreatitis-induced brain injury in rats[J]. Int Immunopharmacol, 2015, 24(2): 285-298

[3] Lankisch PG, Ihse I. Bile-induced acute experimental pancreatitis[J]. Scand J Gastroenterol, 1987, 22(3): 257-260

[4] Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. Gastroenterology, 1997, 112(3): 960-967

[5] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4): 229-231

[6] 廖 专, 李兆申. 胰性脑病研究进展[J]. 胰腺病学, 2003, 12(4): 248-250

[7] 王 坚, 王小红. 炎症介质在重症急性胰腺炎大鼠并发脑损伤中的作用[J]. 江苏医药, 2012, 38 (22): 2661-2663

[8] 乌日娜, 赵海平, 胡文秀. 川芎嗪对重症急性胰腺炎大鼠脑损伤保护作用的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19(7): 761-764

[9] 袁伟燕, 肖明兵, 黄 华, 等. 重症急性胰腺炎大鼠海马 NF- κ B 与 Caspase-3 的表达[J]. 江苏医药, 2012, 38(17): 2015-2017, 1980

[10] 薛乐宁, 谭 勇, 林 敏, 等. 大鼠急性胰腺炎中脂肪细胞因子水平的变化及其可能意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2011, 31(11): 1600-1604

[11] O'neill LA, Kaltschmidt C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function[J]. Trends Neurosci, 1997, 20(6): 252-258

[12] 陶陆阳, 丁 梅, 陈溪萍, 等. 大鼠脑挫伤后 NF- κ B 表达的分子生物学研究[J]. 法医学杂志, 2004, 20(2): 73-76

[13] Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, et al. Transcription factor nuclear Factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20 (3): 592-603

[14] Yu H, Klonowski-Stumpe H, Lüthen R. Glutathione might exert an important function in caerulein-stimulated amylase release in isolated rat pancreatic acini[J]. Pancreas, 2002, 24(1): 53-62

[15] Gómez-Cambronero L, Camps B, De La Asunción JG, et al. Pentoxifylline ameliorates cerulein-induced pancreatitis in rats: role of glutathione and nitric oxide[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293(2): 670-676

[16] Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, et al. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice[J]. Pancreas, 2000, 20(2): 161-169

[17] 胡少瑾, 谭 军, 杨廷桐. 还原型谷胱甘肽对鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2011, 28 (5): 426-428