

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2006)12-1093-04

重症急性胰腺炎大鼠 DDFA 对肺损伤细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 表达的影响

史学深, 方驰华, 朱明德, 何邹骏, 陈铁军 (南方医科大学珠江医院肝胆外科, 广东 广州 510282)

Effects of DDFA on cell apoptosis and expressions of Bax and Bcl-2 in lung tissue of rats with severe acute pancreatitis

SHI Xue-Shen, FANG Chi-Hua, ZHU Ming-De, HE Zou-Jun, CHEN Tie-Jun

Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

【Abstract】 AIM: To explore the effects of DDFA on cell apoptosis and expressions of Bax and Bcl-2 in lung tissue of rats with severe acute pancreatitis (SAP). **METHODS:** 45 rats weighting 200-250 g were randomized into 3 groups: control group ($n=15$), SAP group ($n=15$) and DDFA group ($n=15$). The models of SAP were established by the injection of 200 g/L arginine solution ip (once a hour for 2 h) into the rats. At the 24, 48 and 72 h after establishment of models, serum amylase, TNF- α and calcium were determined. The left lungs were taken for light and electron microscopic observation. Cell apoptosis in lung tissue was determined by TUNEL method. Expressions of Bax and Bcl-2 were detected by immunohistochemical staining of SABC. **RESULTS:** In the SAP group, serum amylase, TNF- α , apoptotic index, expressions of Bax and Bcl-2 markedly increased. Lung tissue injuries were significant under a light microscope. As compared with SAP group at the same phase, serum amylase, TNF- α , apoptotic index and expressions of Bax in DDFA group decreased significantly. While the expression of Bcl-2 increased significantly. The injury of lung tissue was relieved by DDFA. **CONCLUSION:** The apoptosis and the expressions of Bax and Bcl-2 in lung tissue might be involved in pathogenesis of SAP. DDFA administration in the early stage is helpful for diminishing lung injury induced by SAP.

【Keywords】 critical illness; acute disease; pancreatitis; lung/injuries; apoptosis; DDFA

【摘要】目的: 探讨 DDFA 对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肺组织内细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 基因表达的影响。方法: 大鼠

45 只随机分为对照组(CG), SAP 组和 DDFA 治疗组, 每组 15 只。大鼠 SAP 模型采用分 2 次 ip 200 g/L-精氨酸溶液方法建立。建模后 24, 48 和 72 h 时测定血清 TNF- α , 淀粉酶、血钙及光镜观察肺组织病理变化, 细胞凋亡原位检测(TUNEL)法测定肺组织内细胞凋亡, SABC 免疫组化染色法测定肺组织 Bax, Bcl-2 基因表达。结果: SAP 组血清淀粉酶, TNF- α 和肺组织内细胞凋亡指数, Bax, Bcl-2 基因表达较 CG 组升高, 光镜下见肺组织损害明显。经 DDFA 治疗后, 血清淀粉酶, TNF- α 和肺组织内细胞凋亡指数, Bax 基因表达下降, 而 Bcl-2 基因表达增强, 光镜下见肺组织损害减轻。结论: 肺组织细胞凋亡, Bax, Bcl-2 基因表达参与 SAP 发病机制, 在 SAP 早期给予 DDFA 治疗对减轻肺脏损害是有益的。

【关键词】 危重病, 急性病, 胰腺炎, 肺/损伤, 细胞凋亡, DDFA
【中图分类号】 R576 **【文献标识码】** A

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)常并发多器官功能障碍, 其胰外器官损伤中肺损伤最为常见, 称之为: 急性胰腺炎相关性肺损伤^[1], 其发病机制尚不完全清楚。1997 年方驰华等^[2]应用 DDFA 方案(D: dexamethasone; D: dextran; F: 5-Fluorouracil; A: Apoptinimum)治疗 SAP 取得明显效果。我们利用 SAP 肺脏损害大鼠模型, 探讨细胞凋亡和 Bax, Bcl-2 基因表达在 SAP 肺脏损害发病机制中的作用以及应用 DDFA 治疗后的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠 45 只, 雌雄不限, 体质量 200 ~ 250 g, 由南方医科大学实验动物中心提供; L-精氨酸, 分析纯级(L-arginine)购自上海华美生物工程公司; 血清淀粉酶测定试剂盒购自四川迈克科技有限公司; 血清 TNF- α 检测试剂盒购于北京北方生物技术研究所; 细胞凋亡原位检测(TUNEL)试剂盒购自武汉博士德公司; SABC 免疫组化染色法试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法 随机分成 3 组: 对照组(CG组), SAP 组和 DDFA 治疗组, 每组 15 只。每组再分为 24, 48 和

收稿日期 2006-01-16; 接受日期 2006-03-20

通讯作者: 方驰华, Tel: (020) 84360607 Email: fch58520@sina.com

作者简介: 史学深, 硕士生(导师方驰华), 主治医师, Tel: (020)

31679030 Email: sxs731012@yahoo.com.cn

72 h 3 个时间点,每个时间点分配 5 只大鼠。实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水。SAP 组大鼠分 2 次 ip 200 g/L-精氨酸溶液(2×2.5 mg/g),中间间隔 1 h,CG 组同法注射等量的生理盐水;DDFA 组分别在 SAP 模型诱发后 12、24 和 36 h,经颈静脉注射地塞米松(2 mg/kg)+低分子右旋糖酐(5 mL/kg)+5-氟脲嘧啶(20 mg/kg)+抑肽酶(50 000 U/kg)SAP 组分别在同一时间点注射等量生理盐水。造模后 24、48 和 72 h 等各时间点处死大鼠,心脏穿刺抽血,快速切取肺脏,测定各项指标。血清淀粉酶测定,按照说明书操作,采用放射免疫方法进行血清 TNF- α 检测,由 γ 计数器直接给出有关参数、样品浓度。各组织光镜标本以多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,HE 染色,光镜观察。

1.2.1 肺组织细胞凋亡的测定 采用 DNA 末端 TUNEL 法。切片常规脱蜡入水,经 30 mL/L H₂O₂ 处理、蛋白酶 K 消化后,加入 TdT 和 DIG-UTP 4℃ 过夜,封闭后加生物素化抗地高辛抗体,洗涤,加 SABC, DAB 显色,光镜下计算肺组织内细胞凋亡指数(apoptotic index, AI)。AI 计算方法:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞,数 5 个高倍视野,分别计算凋亡细胞数和总细胞数, AI = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。

1.2.2 肺组织 Bax, Bcl-2 的测定 采用 SABC 免疫组化染色法。染色模式:胞膜或胞质。根据染色强度分为:阳性(棕黄色);弱阳性(浅黄色);阴性(不着色)。各组切片均采用图像分析系统对免疫组化染色阳性反应产物进行定量分析。取切片在光学显微镜下以相同倍数(40×10)于肺组织内随机选取 10 个视野,利用图像分析系统分析阳性面积和阳性区域平均灰度值,并将阳性面积和平均灰度值按文献[3]方法换算成阳性单位(positive unit, PU),以 PU 值大小代表阳性产物表达的多少。

统计学处理:采用 SPSS10.0 统计软件建立数据

库,组间均数比较用完全随机设计资料的方差分析,两两比较用 SNK 法,组间方差不齐时用非参数秩和检验,细胞凋亡与肺损害的相关性用相关分析。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变 CG 组未见异常。SAP 组 24 h 胸腔见少量渗液,肺脏轻度水肿,48 h 胸腔渗液增多,肺脏充血水肿加重,并可见少量出血点,淡红色,72 h 肺组织充血水肿更为明显,可见局灶性坏死,胸腔渗液呈血性。DDFA 组各时间点肺脏变化均较 SAP 组减轻。光镜下 CG 组未见异常。SAP 组大部分肺泡隔明显增厚,肺泡腔部分融合成肺大泡,部分萎缩,偶有炎性渗出;肺间质水肿、出血,大量炎性细胞浸润以中性粒细胞为主。DDFA 组肺泡壁轻度增厚,肺泡内无渗出,肺泡毛细血管充血,间质可见少量红细胞浸出和少量炎性细胞浸润。

2.2 血清淀粉酶和 TNF- α 的改变 检测结果显示,CG 组血清淀粉酶和血清 TNF- α 浓度正常,SAP 时血清淀粉酶明显升高,且随着病程延长而逐渐增高,至 48 h 达峰值;DDFA 组在应用 DDFA 治疗后,血清淀粉酶较 SAP 组明显下降($P < 0.01$,表 1)。SAP 组各时间点血清 TNF- α 浓度明显升高,DDFA 组血清 TNF- α 浓度与 SAP 组比较明显下降($P < 0.01$,表 1)。

2.3 肺组织细胞凋亡情况 CG 组仅见极少量凋亡细胞(图 1A),SAP 组凋亡细胞明显增多,凋亡指数升高,并随着病程延长而逐渐增高,多为淋巴结内淋巴细胞和肺间质中的纤维母细胞等(图 1B),DDFA 组凋亡指数较 SAP 组明显下降($P < 0.01$,表 1,图 1C)。肺组织内细胞凋亡与血清淀粉酶呈正相关($r = 0.537$, $P < 0.05$),与血清 TNF- α 也呈正相关($r = 0.624$, $P < 0.05$)。

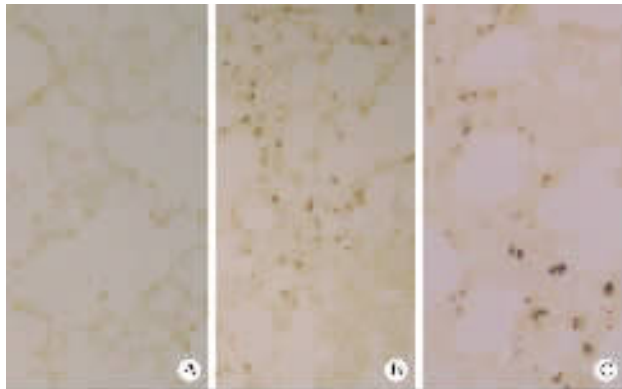
表 1 大鼠血清淀粉酶值, TNF- α 和凋亡指数值

($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	血清淀粉酶值($\mu\text{kat/L}$)			TNF- α ($\mu\text{g/L}$)			凋亡指数值(AI)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CG	25.1 ± 0.9 ^b	21.2 ± 1.1 ^b	23.7 ± 0.7 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	0.1 ± 0.0 ^b	1.5 ± 0.5 ^b	1.4 ± 0.4 ^b	1.3 ± 0.1 ^b
SAP	62.3 ± 3.8	84.8 ± 6.1	23.2 ± 1.0	5.6 ± 0.4	3.7 ± 0.2	2.0 ± 0.3	10.4 ± 1.0	15.3 ± 1.3	16.7 ± 1.7
DDFA	40.6 ± 4.8 ^b	24.5 ± 1.3 ^b	23.8 ± 1.6 ^b	4.5 ± 0.1 ^b	3.4 ± 0.1	1.7 ± 0.2 ^b	3.8 ± 0.6 ^b	5.7 ± 0.9 ^b	7.7 ± 1.4 ^b

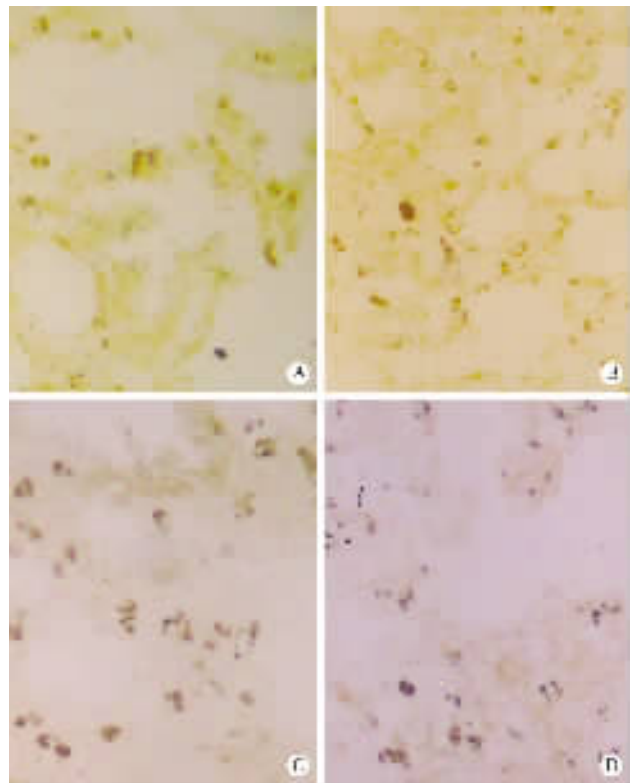
^b $P < 0.01$ vs SAP. CG:对照组;SAP:重症急性胰腺炎组;DDFA:治疗组。

2.4 肺组织细胞 Bax 和 Bcl-2 的表达 CG 组 Bax 和 Bcl-2 基因的表达均很弱,SAP 组两基因的表达均明显增强,Bax 基因在肺细胞的表达随着病程延长而逐渐增高(图 2A),Bcl-2 基因表达值随着病程延长而逐渐下降(图 2B),Bcl-2/Bax 比值较 CG 组下降,该比值也有随着病程延长而逐渐下降的趋势,DDFA 组与 SAP 组比较,Bax 基因表达明显下调(图 2C),Bcl-2 基因表达明显上调(图 2D)而 Bcl-2/Bax 比值上升(表 2)。



A:CG 组 B:SAP 组 C:DDFA 组.

图 1 肺组织细胞凋亡 TUNEL $\times 400$



A:SAP 组 Bax B:DDFA 组 Bax C:SAP 组 Bcl-2 D:DDFA Bcl-2.

图 2 大鼠肺组织 Bax ,Bcl-2 表达 SABC $\times 400$

表 2 大鼠肺脏细胞 Bcl-2 ,Bax 基因表达和 Bcl-2/Bax 比值

($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2(PU)			Bax(PU)			Bcl-2/Bax		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
CG	1.6 \pm 0.4 ^b	1.7 \pm 0.2 ^b	1.8 \pm 0.1 ^b	1.3 \pm 0.3 ^b	1.4 \pm 0.2 ^b	1.4 \pm 0.1 ^b	1.3 \pm 0.4 ^b	1.2 \pm 0.1 ^b	1.3 \pm 0.1 ^b
SAP	4.5 \pm 0.6	4.4 \pm 0.5	4.0 \pm 0.4	8.5 \pm 1.2	13.3 \pm 2.1	14.8 \pm 0.6	0.5 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0
DDFA	6.8 \pm 0.6 ^b	5.8 \pm 1.2 ^b	4.7 \pm 0.7 ^b	3.1 \pm 0.7 ^b	5.2 \pm 0.5 ^b	5.5 \pm 0.6 ^b	2.3 \pm 0.5 ^b	1.1 \pm 0.3 ^b	0.8 \pm 0.1 ^b

^b $P < 0.01$ vs SAP. CG:对照组 SAP:重症急性胰腺炎组;DDFA:治疗组.

3 讨论

SAP 患者约 1/3 伴发肺损伤或急性呼吸窘迫综合征 1 wk 内死亡者大约 60% 伴有肺损伤或急性呼吸窘迫综合征^[3]. 因此,探讨肺损伤在 SAP 病情发展中的作用及发生机制,为其治疗提供新思路,具有重要意义. Tani 等^[4]首次报道 ip 过量 L-精氨酸能致大鼠 SAP. 赵秋玲等^[5]报道的 L-精氨酸诱导急性胰腺炎小鼠肺损伤指出该模型肺组织出现了肺间质水肿、炎细胞浸润、肺泡水肿和出血等肺损伤的表现. 我们采用 L-精氨酸诱导急性胰腺炎并发肺损伤大鼠模型同样显示胰腺和肺组织出现了典型的病理改变,表明分 2 次 ip 过量的 L-精氨酸可成功地诱导急性胰腺炎并发肺损伤的大鼠模型. 结果发现,SAP 大鼠肺脏的

细胞凋亡数明显增多,凋亡指数增高,凋亡发生部位与病理改变明显的部位吻合,肺脏细胞凋亡指数与血淀粉酶、TNF- α 的损害程度呈正相关. 我们发现,SAP 时 Bax 基因表达明显上升,并且随病程延长而逐渐增高,Bcl-2 的表达也有所上升,但幅度相对较小,可能是机体代偿所致,且随病程延长而逐渐下降,因而 Bcl-2/Bax 比值是下降的. 而应用 DDFA 治疗后,Bax 基因表达明显下调,而 Bcl-2 基因表达明显上调,Bcl-2/Bax 比值上升. SAP 时随着肺脏凋亡细胞数增多、Bcl-2/Bax 比值下降,肺损伤进一步加重,DDFA 可明显改善肺损伤的程度,并能调节 Bcl-2/Bax 比例,减少肺脏细胞凋亡. 因此我们认为,DDFA 对肺脏功能的保护作用可能部分是通过调节凋亡相关基因 Bax

和 Bcl-2 从而影响细胞凋亡实现的。

【参考文献】

[1] Hartwig W, Werner J, Jimenez RE, et al. Trypsin and activation of circulating trypsinogen contribute to pancreatitis-associated lung injury [J]. Am J Physiol, 1999, 277(5): 1008-1016.

[2] 方驰华, 雷海录, 戴永贵, 等. DDFA 治疗重症急性胰腺炎的临床研究 [J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(4): 213-214.

[3] Renner IG, Savage WT, Pantoja JL, et al. Death due to acute pan-

creatitis: A retrospective analysis of 405 autopsy cases [J]. Dig Dis Sci, 1985, 30(10): 1005-1018.

[4] Tani S, Itoh H, Okabayashi Y, et al. A new model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive dose of arginine in rat [J]. Dig Dis Sci, 1990, 35(3): 367.

[5] 赵秋玲, 黄承钰, 黄英, 等. L-精氨酸诱导急性胰腺炎小鼠肺损伤的实验研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2004, 35(6): 839-842.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)12-1096-01

导乐陪伴在分娩过程中的临床观察

任国平

(第四军医大学唐都医院妇产科, 陕西 西安 710038)

【关键词】导乐陪伴 分娩

【中图分类号】R717 【文献标识码】B

0 引言 导乐(Doula)分娩是我国近年来学习国外经验,由单纯技术观点转变为以患者为中心最后发展成以人的健康为中心的整体护理的具体实施,目前仍处于初步探索中。它是由一个有生育经验的妇女在产前、产程中和产后给产妇以持续的生理、心理及情感上的支持,陪伴整个分娩过程^[1]。

1 对象和方法

1.1 对象 选择 2005-09/2006-03 在第四军医大学唐都医院住院分娩的产妇 248 例,随机分成两组,导乐陪伴组 120 例,对照组 128 例,两组产妇均为孕 37~41 wk 单胎,胎位无异常,无妊娠合并症与并发症,年龄为 22~34 岁,文化程度初中以上,健康状况良好。

1.2 方法 观察组:导乐陪伴由我院有生育经验并经过此项培训的助产士承担,自产妇宫口开大 2 cm 后开始进行全程陪伴,为产妇提供持续的心理、生理护理,给与感情上的支持,密切监测产程中母婴情况及产程进展并负责接产,陪伴至产后 2 h,导乐工作结束。对照组则由轮班助产士按常规时监测及处理。

统计学处理:采用 SPSS11.0 统计软件分别进行 χ^2 检验和 *t* 检验。

2 结果 两组分娩方式及新生儿窒息情况有差异(表 1, 2)。导乐组及对照组总产程时间分别为 (7.7 ± 2.5) h, (9.4 ±

4.7) h, 产时、产后 2 h 出血量两组分别为 (236 ± 62) mL, (281 ± 98) mL, *P* 均 < 0.05。

表 1 分娩方式及新生儿窒息情况 [n(%)]

组别	n	顺产	难产(产钳、胎吸、剖宫产)	新生儿窒息
导乐 ^a	120	106(88.3)	14(11.7)	3(2.5)
对照	128	95(74.2)	33(25.8)	11(8.6)

^a*P* < 0.05 vs 对照。

表 2 新生儿 Apgar 评分 [n(%)]

组别	n	<4 分	4~7 分	≥8 分
导乐	120	0(0.0) ^a	3(2.5) ^a	117(97.5)
对照	128	3(2.3)	8(6.2)	117(91.4)

^a*P* < 0.05 vs 对照。

3 讨论 导乐陪伴分娩系由 1 位有生育经验的妇女在产前、产时及产后给产妇持续心理、生理及精神上的安慰鼓励,观察照顾,首先在心理上消除了产妇的紧张情绪,有助于减少难产的发生率。其次,分娩过程中产妇得到的耐心指导、安慰和抚摸可减少或预防孕妇由于心理障碍而导致的宫缩乏力,从而明显缩短了产程,减少了产后出血。同时,产妇生产时心理上的放松,可分散产痛,使母体中儿茶酚胺类缩血管物质含量降低,既有利于分娩镇痛,又有利于减少产妇的过度换气,改善酸碱失衡,保证子宫胎盘的血液供应,减少新生儿窒息的发生^[2]。本观察表明,导乐组难产发生率及产后出血、新生儿窒息等并发症的发生率均明显降低。因此,导乐陪伴分娩作为一种新的以产妇为中心的产时服务模式,能促进和支持自然分娩,降低剖宫产率,保证母婴更加健康、安全。

【参考文献】

[1] 王秀媛. 导乐式分娩 [J]. 青海医学院学报, 2000, 21(2): 29-30.

[2] 邵杏珍. 导乐陪伴分娩的临床研究 [J]. 解放军护理杂志, 2003, 20(8): 24-25.

编辑 井晓梅

收稿日期 2006-04-12; 接受日期 2006-05-10

作者简介:任国平, 本科, 护师. Tel: (029) 84777512 Email: appleren@gmail.cn