

胆汁内、外引流对梗阻性黄疸大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡的影响

蒋永军 张培建 骆小江 张佳凤

【摘要】 目的 探究胆汁内、外引流对梗阻性黄疸(OJ)大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡的不同影响。**方法** 80只SD大鼠随机分为四组:假手术组(A组)、梗阻性黄疸组(B组)、胆汁内引流组(C组)和胆汁外引流组(D组),每组20只。造模一周后测定血清内毒素水平;取末端回肠黏膜组织,光镜下观察黏膜形态改变;采用IHC法检测肠黏膜细胞增殖细胞核抗原(PCNA)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达。**结果** C组大鼠血清内毒素水平较B组显著下降($P < 0.01$),与A组无明显差别($P > 0.05$);D组较B组无明显差别($P > 0.05$),显著高于A组($P < 0.01$);C组显著低于D组($P < 0.01$)。C组大鼠肠黏膜细胞PCNA的表达较B组显著上升($P < 0.01$),仍低于A组($P < 0.01$);D组较B组显著上升($P < 0.01$),低于A组($P < 0.01$)。C组显著高于D组($P < 0.01$)。C组大鼠肠黏膜细胞Caspase-3的表达较B组显著降低($P < 0.01$),仍高于A组($P < 0.01$);D组较B组显著下降($P < 0.01$),高于A组($P < 0.01$)。C组显著低于D组($P < 0.01$)。C组大鼠肠黏膜形态较D组有明显的不同。**结论** 胆汁在保护OJ大鼠肠黏膜细胞中起重要作用;胆汁内引流保护OJ大鼠肠黏膜细胞作用优于胆汁外引流。

【关键词】 黄疸,阻塞性; 胆汁; 增生; 凋亡; 增殖细胞核抗原; 半胱氨酸内肽酶类; 胆汁内引流; 胆汁外引流

Effect of internal or external biliary drainages on hyperplasia and apoptosis of intestinal epithelial cell with obstructive jaundice in rats JIANG Yong-jun, ZHANG Pei-jian, LUO Xiao-jiang, ZHANG Jia-feng. Second Affiliated Hospital, Yangzhou University Institute of General Surgical Research, Yangzhou 225001, China
Corresponding author: ZHANG Pei-jian, Email: yzu.edu.pjz@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the difference effect of internal or external biliary drainages on hyperplasia and apoptosis of intestinal epithelial cell with OJ in rats. **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group (A group) ($n = 20$), OJ group (B group) ($n = 20$), internal biliary drainages group (C group) ($n = 20$) and external biliary drainage group (D group) ($n = 20$). One week after operation, the serum endotoxin level was determined, the terminal ileum mucosae was obtained to be morphologically transformation by light microscope, and IHC were used to examine the expressions of PCNA and Caspase-3 in the mucosae. **Results** Compared with the rats in B group, those in C group's serum endotoxin level were significantly lower ($P < 0.01$), and had no significant difference with those in A group ($P > 0.05$). Compared with the rats in A group, those in D group's serum endotoxin level were significantly higher ($P < 0.01$), and had no significant difference with those in B group ($P > 0.05$). The rats in C group's serum endotoxin level were significantly lower than those in D group ($P < 0.01$). Compared with the rats in B group, those in C group's expressions of PCNA of intestinal epithelial cell were significantly higher ($P < 0.01$), and lower with those in A group ($P < 0.01$). Compared with the rats in B group, those in D group's expressions of PCNA of intestinal epithelial cell were significantly higher ($P < 0.01$), and lower with those in A group ($P < 0.01$). Those in C group were significantly higher than those in D group ($P < 0.01$). Compared with the rats in B group, those in C group's expressions of Caspase-3 of intestinal epithelial cell were significantly lower ($P < 0.01$), and higher with those in A group ($P < 0.01$). Compared with the rats in B group, those in D group's expressions of PCNA of intestinal epithelial cell were significantly lower ($P < 0.01$), and higher with those in A group ($P < 0.01$). Those in C group were significantly lower than those in D group ($P < 0.01$). There were obvious difference of intestinal epithelia between the rats in C and D group. **Conclusions** Bile

plays an important role in the maintenance of intestinal epithelial cell with OJ in rats. At maintenance of intestinal epithelial cell with OJ in rats, internal biliary drainages is superior to external biliary drainages.

【Key words】 Jaundice, obstructive; Bile; Hyperplasia; Apoptosis; Proliferating cell nuclear antigen; Cysteine endopeptidases; Internal biliary drainages; External biliary drainages

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是一种常见的临床综合征,目前治疗 OJ 的主要方法仍为外科手术和内镜治疗,解除梗阻的方法从胆汁的去向来看可分为胆汁内引流术和胆汁外引流术。肠黏膜细胞层是构成肠黏膜屏障的重要组成部分。OJ 可通过胆汁缺乏、肝脏 kupffer 细胞功能下降、内毒素血症、释放细胞因子和造成氧化应激等多种机制导致肠黏膜细胞增生程度减低,凋亡速度增快而使其损伤,降低肠道防御能力,导致肠道细菌移位和内毒素血症。肠黏膜细胞的动态平衡和完整性与其的增生与凋亡关系密切,因而本实验建立 OJ 大鼠模型,分别对其施行胆汁内引流术和胆汁外引流术,通过比较大鼠血清内毒素水平、肠黏膜的光镜下表现和肠黏膜细胞 PCNA、Caspase-3 的表达,探究胆汁内、外引流对 OJ 大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡的影响。

材料与方 法

一、实验动物与分组

健康纯系 SD 大鼠 80 只,雌雄不限,鼠龄 12 ~ 14 周,体重 270 ~ 320 g,由扬州大学动物实验中心提供。严格遵守实验动物的管理与使用规定,清洁环境喂养,饲料标准,自由饮用清洁水;使用前适应性喂养 1 周,温度保持在 18 ~ 25 °C,相对湿度保持在 40% ~ 70%,12 h 明暗交替采光。随机均分为四组,每组 20 只。A 组:假手术组;B 组:OJ 组;C 组:胆汁内引流组;D 组:胆汁外引流组。

二、模型制作方法

实验大鼠术前 8 h 禁食,自由饮水。各组均予 1% 戊巴比妥钠(3.5 mg/100 g)腹腔注射麻醉,固定,腹部皮肤准备,严格皮肤消毒后铺巾,取上腹正中切口进腹,游离出胆总管。A 组不予结扎胆总管并关腹。B、C、D 组于距十二指肠入口约 1.0 cm 处以 4-0 号丝线双重结扎胆总管后关腹。1 周后 A、B 组做开腹游离胆总管后关腹处理;C 组开腹,予硬膜外导管跨过结扎处连接胆总管膨大段与正常段,使之再通,远近端均以 4-0 号丝线双重结扎固定;D 组开腹,在胆总管结扎近端膨大段插入聚乙烯外引流管,以 4-0 号丝线双重结扎固定后沿腹壁皮下由颈背部双侧肩胛间引出并缝合固定。动物若有死亡,均用同批 SD 大鼠予以补充。

三、取材方法与指标检测

1. 内毒素:二次手术 1 周后,无菌条件下于各组大鼠腔静脉取血 2 ml,沉淀后 4 °C 离心,取 0.1 ml 以上血清 - 70 °C 冰箱保存待测。以内毒素 ELISA 试剂盒(FA01908B,上海沪峰化工有限公司)采取内毒素酶联免疫分析法(ELISA 法)测定大鼠血清内毒素水平,具体方法按说明书操作。

2. 肠黏膜光镜表现:二次手术 1 周后,无菌条件下取各组大鼠距回盲部约 5 cm 处回肠组织,于冰浴下沿纵轴剪开肠管,清洗肠内容物,滤纸吸干水后 40 g/L 甲醛溶液固定,切片后行 HE 染色,实体显微镜下观察肠黏膜形态变化。

3. PCNA:二次手术 1 周后,无菌条件下于距各组大鼠屈氏韧带远端 1 cm 处取空肠 2 cm,用等渗盐水将肠腔内容物冲洗干净后置于 40 g/L 甲醛溶液中固定,制成 3 μm 的切片待测。免疫组化染色所用的一抗为鼠抗 PCNA 单克隆抗体(即用型,南京凯基生物科技有限公司),二抗为多聚化合物(葡聚糖)酶复合物标记的兔抗鼠血清(南京凯基生物科技有限公司)。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对免疫组化标本进行测量,结果以图片中阳性细胞数占总细胞数的比例表示。

4. Caspase-3:切片制作及测量方法同 PCNA,一抗为鼠抗 caspase-3 单克隆抗体(即用型,南京凯基生物科技有限公司),二抗为多聚化合物(葡聚糖)酶复合物标记的兔抗鼠血清(南京凯基生物科技有限公司)。

四、统计学分析

检测数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各指标分组间比较,方差齐者用方差分析及两两比较的 *t* 检验;方差不齐者,采用秩和检验。所有数据均采用 SPSS 15.0 统计软件包进行分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般形态观察:结扎大鼠胆总管后 1 周,造成 OJ,大鼠食欲变差,活动减少,全身皮毛发黄,尿液变黄,近心端胆管膨大,肝脏弥漫性肿大,呈淡黄色,质地稍硬,甚至出现砂粒感。予胆汁外引流术后,可见大量胆汁通过引流管排出体外,大鼠食欲未见明显好转,活动较少,体重多有减轻,死亡率较高;而胆汁内引流术后,大鼠食欲转好,活动增多,体重明显增加,肝脏色泽渐恢复,质地变软,死亡率较低。

2. 内毒素(表1):2周后B组大鼠血清内毒素水平 $[(41.360 \pm 2.404) \text{ pg/ml}]$ 明显高于A组 $[(20.638 \pm 2.111) \text{ pg/ml}]$ ($P < 0.01$),形成严重的内毒素血症。经胆汁内引流后,C组大鼠血清内毒素水平 $[(21.113 \pm 1.874) \text{ pg/ml}]$ 较B组显著下降,有统计学意义($P < 0.01$),与A组无明显差别($P > 0.05$),胆汁内引流显著减轻OJ大鼠血清内毒素水平,与假手术组大鼠基本无异;经胆汁外引流后,D组大鼠血清内毒素水平 $[(38.772 \pm 2.139) \text{ pg/ml}]$ 较B组无明显差别($P > 0.05$),显著高于A组,有统计学意义($P < 0.01$),胆汁外引流在减轻OJ大鼠血清内毒素水平上收效甚微。C组大鼠血清内毒素水平显著低于D组,有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠血清内毒素水平及肠黏膜PCNA、Caspase-3的表达检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	内毒素(pg/ml)	PCNA 阳性(%)	Caspase-3 阳性(%)
A组	20	20.638 ± 2.111	0.620 ± 0.012	0.322 ± 0.012
B组	20	41.360 ± 2.404	0.100 ± 0.011	0.761 ± 0.012
C组	20	21.113 ± 1.874	0.439 ± 0.013	0.570 ± 0.011
D组	20	38.772 ± 2.139	0.321 ± 0.012	0.652 ± 0.130

3. 肠黏膜的光镜表现(图1):A组大鼠肠黏膜上皮结构完整,无明显充血及炎性细胞异常浸润。B组大鼠肠黏膜上皮结构杂乱,部分上皮细胞脱落,并可见大量急性炎性细胞浸润,肠黏膜淋巴滤泡增生、数目增多,部分区域出现纤维化。C组大鼠肠黏膜上皮结构完整,可见少量炎性细胞浸润,肠黏膜淋巴滤泡正常,未见出现纤维化。D组大鼠肠黏膜上皮结构有失完整,可见中等量炎性细胞浸润,肠黏膜淋巴滤泡数目稍增多,未见出现纤维化。

4. PCNA(表1,图2A~2D):2周后B组大鼠肠黏膜细胞PCNA的表达 $[(0.100 \pm 0.011) \text{ \%}]$ 明显低于A组 $[(0.620 \pm 0.012) \text{ \%}]$ ($P < 0.01$),肠黏膜细胞的增生受到显著抑制。经胆汁内引流后,C组大鼠PCNA的表达 $[(0.439 \pm 0.013) \text{ \%}]$ 较B组显著上升,有统计学意义($P < 0.01$),仍低于A组($P < 0.01$),胆汁内引流能大幅度提高OJ大鼠肠黏膜细胞增生水平,但尚不能恢复至假手术组水平;经胆汁外引流后,D组大鼠PCNA的表达 $[(0.321 \pm 0.012) \text{ \%}]$ 较B组亦显著上升,有统计学意义($P < 0.01$),亦低于A组($P < 0.01$),同样的,胆汁外引流亦可提高OJ大鼠肠黏膜细胞增生水平,较假手术组为低。C组大鼠PCNA的表达显著高于D组,有统计学意义($P < 0.01$)。

5. Caspase-3(表1,图2E~2H):2周后B组大鼠肠黏膜细胞Caspase-3的表达 $[(0.761 \pm 0.012) \text{ \%}]$ 明

显高于A组 $[(0.322 \pm 0.012) \text{ \%}]$ ($P < 0.01$),肠黏膜细胞的凋亡程度明显增加。经胆汁内引流后,C组大鼠Caspase-3的表达 $[(0.570 \pm 0.011) \text{ \%}]$ 较B组显著下降,有统计学意义($P < 0.01$),仍高于A组($P < 0.01$),胆汁内引流能大幅度降低OJ大鼠肠黏膜细胞凋亡水平,但尚不能恢复至假手术组水平;经胆汁外引流后,D组大鼠Caspase-3的表达 $[(0.652 \pm 0.130) \text{ \%}]$ 较B组亦显著下降,有统计学意义($P < 0.01$),亦高于A组($P < 0.01$)同样的,胆汁外引流亦可降低OJ大鼠肠黏膜细胞凋亡水平,较假手术组为高。C组大鼠Caspase-3的表达显著低于D组 (0.652 ± 0.130) ,有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

OJ可导致机体一系列的病理生理变化,其中包括肠黏膜屏障受损以及肠道细菌移位^[1-2],严重影响患者的预后。肠黏膜屏障主要由机械屏障、免疫屏障、生物屏障和化学屏障构成。肠黏膜细胞中的上皮细胞和以紧密连接、黏附连接和桥粒等为主要方式的相邻细胞间的连接构成了其中的机械屏障。肠黏膜上皮由吸收细胞和杯状细胞构成。吸收细胞呈柱状,具有吸收功能,起机械屏障作用;杯状细胞可分泌黏液素,在肠黏膜表面形成疏水的黏液凝胶层,可阻止水溶性毒素入侵,避免消化道中的消化酶和有害物质对上皮细胞的损害。以往的研究表明OJ患者小肠黏膜上皮细胞增生程度低,凋亡速度快。Gencay等^[3]通过动物实验观察到OJ时回肠黏膜绒毛的数量减少、密度下降、厚度变薄;亦有学者观察到动物肠黏膜隐窝内有丝分裂细胞减少,上皮细胞凋亡增加。另外Assimakopoulos等^[4]还观察到小肠黏膜上皮出现水肿,黏膜固有层出现中度慢性炎性细胞浸润,损伤肠黏膜上皮细胞。概括说来,OJ对肠黏膜上皮细胞的损伤主要体现在抑制其增生和促进其凋亡。

PCNA又称周期蛋白,是一种与细胞周期有关的核内蛋白,为细胞增生时所需的DNA聚合酶辅助蛋白,其表达与细胞增殖状况密切相关,通常用来作为细胞增生的标志物,是判断细胞增殖状况最好的分子学指标之一^[5-6]。Caspase-3蛋白是其家族中的效应子,为一种酶蛋白分子,被认为是凋亡的执行人,能真正导致哺乳动物细胞凋亡^[7],因此常被用来作为研究细胞凋亡的指标。所以本实验选择PCNA、Caspase-3作为研究指标,探究两种不同的胆汁引流方式对OJ大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡的影响。

我们建立了OJ大鼠模型,通过对预实验结果、实验动物的死亡率和以往文献的综合分析,选取了1周

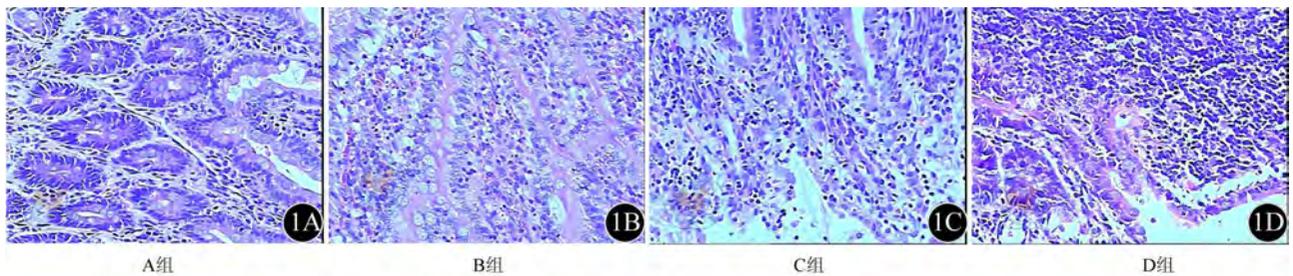


图1 各组大鼠肠黏膜的光镜表现 (HE × 200)

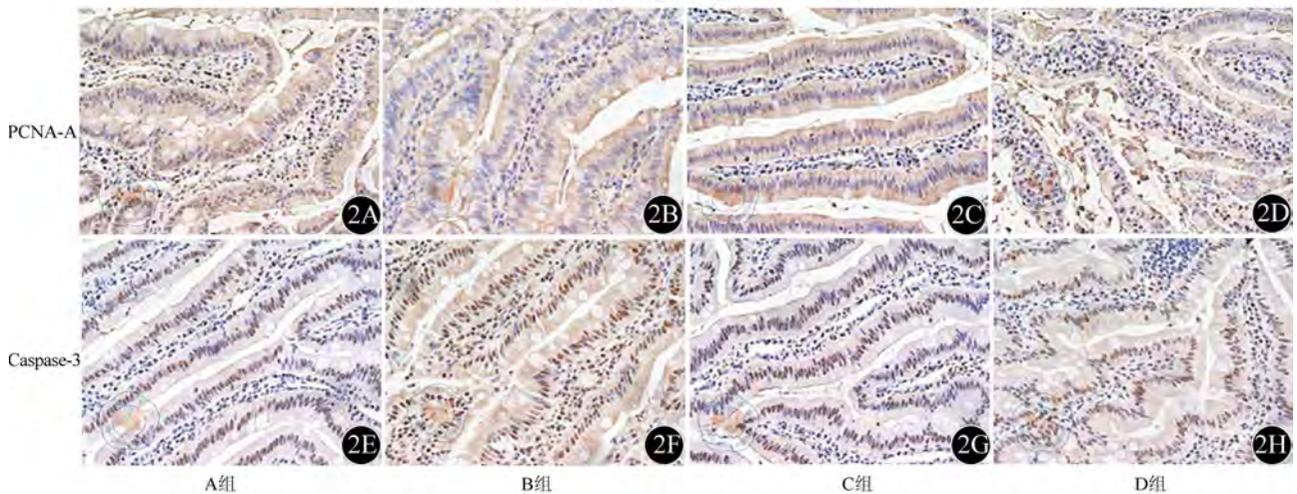


图2 各组大鼠PCNA和Caspase 3的免疫组化检测结果 (免疫组化 × 400)

后行二次手术建立胆汁内、外引流大鼠模型以及在1周后取材检测所需指标。结果显示两周后B组大鼠肠黏膜细胞的PCNA表达明显下降,增生受到抑制;Caspase-3的表达明显上升,促进了其凋亡,并且形成了严重的内毒素血症。在OJ损伤大鼠肠黏膜上皮细胞的几个机制中,我们通过建立胆汁内、外引流的大鼠模型,突出研究胆汁在肠黏膜上皮细胞损伤与修复过程中的作用。C组大鼠1周后胆汁内引流,达到了完全恢复胆汁正常的生理排泄途径,B组大鼠虽一直处梗阻状态,但血液内高浓度的胆红素可弥散入肠腔,肠道内的胆汁成分并未完全缺失,而D组大鼠行胆汁外引流,可以看成肠道内胆汁完全缺失。

肠道内的胆汁具有重要的生理功能,其一,能使某些革兰阴性菌的细胞膜瓦解,防止肠道内条件致病菌的过度繁殖,在维持肠道内环境稳定方面起重要作用;其二,胆汁中的胆汁酸盐(胆盐)能与肠腔内的内毒素结合成不易吸收的去垢剂样复合物,从而减少内毒素从肠道吸收;其三,胆汁内含有sIgA,能增加肠道黏膜的防护能力,能影响小肠内集合淋巴滤泡的数量及大小;最后,胆汁对肠黏膜有营养作用^[8],肠道内的胆汁能促进肠黏膜上皮细胞的增生,并减少其的凋亡^[9-10]。肠道内胆汁缺乏可导致肠黏膜上皮细胞增生减少、凋亡增加,破坏肠黏膜机械屏障,增强细菌与内毒素的移位。细胞增生方面,本实验C组大鼠肠黏膜细胞PCNA

的表达明显高于B组,可以说明胆汁在肠黏膜细胞增生恢复中所起的重要作用;细胞凋亡方面,本实验C组大鼠肠黏膜细胞Caspase-3的表达明显低于B组,同样可以说明胆汁在减少肠黏膜细胞凋亡中作用关键。同时C组大鼠肠黏膜细胞PCNA的表达明显高于D组,Caspase-3的表达明显低于D组,说明了胆汁内引流术在恢复肠黏膜细胞增生以及减少肠黏膜细胞凋亡方面优于胆汁外引流术。除了胆汁对其的直接影响,OJ行胆汁外引流术在保护肠黏膜细胞方面效果差于内引流术,可能还与外引流造成几乎全部的胆汁通过外引流管排出体外,胆盐正常的肠肝循环不能建立,导致大鼠脂肪吸收不良、水电解质紊乱和一些免疫物质的丢失有关^[11-12]。

通过本实验我们还发现,D组大鼠可以看成是肠道内胆汁完全缺乏,肠黏膜细胞增生程度显著高于B组、凋亡程度亦显著低于B组,恰恰也说明了胆汁的缺乏不是引起肠黏膜细胞增生降低、凋亡增加的惟一因素。另外,D组大鼠血清内毒素水平与B组无明显差别,而D组大鼠的肠黏膜细胞保护方面明显优于B组,更说明了OJ可从除损害肠黏膜细胞之外的其他方面损伤肠黏膜屏障,造成内毒素血症。关于胆汁缺乏对梗阻性大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡所造成影响的机制,还有胆汁内、外引流术对肠黏膜细胞增生与凋亡的不同影响,除了胆汁因素以外的其他因素的参与程度

还有待进一步的实验研究。

参 考 文 献

[1] Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, et al. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice. *Ann Surg*, 2005, 241:159-167.

[2] 吴鹏, 陈强谱, 张兴元. 梗阻性黄疸对大鼠肠黏膜上皮结构及内毒素移位的实验研究. *滨州医学院学报*, 2010, 33:170-172.

[3] Gencyay C, Kilicoglu SS, Kismet K, et al. Effect of honey on bacterial translocation and intestinal morphology in obstructive jaundice. *World J Gastroenterol*, 2008, 14:3410-3415.

[4] Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Louvros E, et al. Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41:117-125.

[5] Sheen-Chen SM, Ho HT, Chen WJ, et al. Obstructive jaundice alters proliferating cell nuclear antigen expression in rat small intestine. *World J Surg*, 2003, 27:1161-1164.

[6] Marunis MJ. On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications. *Mol Cell*, 2002, 10:441-442.

[7] 葛鹏磊, 李宁, 贾乾斌. 胰高血糖素样肽-2 对梗阻性黄疸时肠道屏障功能的影响. *四川大学学报:医学版*, 2010, 41:476-479.

[8] Sheen-Chen SM, Chen HS, Ho HT, et al. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha production in obstructive jaundice. *World J Surg*, 2002, 26:448-450.

[9] Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Louvros E, et al. Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients with obstructive jaundice. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41:117-125.

[10] Turner DJ, Alaish SM, Zou T, et al. Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-kappaB-mediated XIAP expression. *Ann Surg*, 2007, 245:415-425.

[11] Sano T, Ajiki T, Takeyama Y, et al. Internal biliary drainage improves decreased number of gut mucosal T lymphocytes and MAd-CAM-1 expression in jaundiced rats. *Surgery*, 2004, 136:693-699.

[12] 侯森林, 乔占英, 康建省, 等. 支架与手术引流对梗阻性黄疸患者免疫功能的影响. *中华消化内镜杂志*, 2005, 22:46-47.

(收稿日期:2012-12-28)

(本文编辑: 马超)

蒋永军, 张培建, 骆小江, 等. 胆汁内、外引流对梗阻性黄疸大鼠肠黏膜细胞增生与凋亡的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(5): 2064-2068.

