

低分子肝素对高脂血症性胰腺炎大鼠 VEGF 表达的影响

陈伟¹, 姜琦¹, 李健¹, 周国雄^{2*}

(1.南通大学附属东台医院,江苏盐城 224200;2.南通大学附属医院,江苏南通 226001)

〔摘要〕 **目的** 研究低分子肝素对大鼠高脂血症性胰腺炎胰腺微循环的作用机制。**方法** 将72只健康SD大鼠随机分成假手术组、模型组和治疗组各24只,每组再随机分成四个亚组。先采用高脂饮食建立高脂血症模型,模型组和治疗组制作大鼠急性胰腺炎模型,制模成功后治疗组分别于0、6、12、18 h开始使用低分子肝素皮下注射,各亚组均间隔6 h重复皮下注射一次,每亚组均干预4次;模型组和假手术组同时时间点皮下注射等量生理盐水对照。**结果** 大鼠胰腺血流速度模型组低于假手术组,治疗组高于模型组($P<0.05$);胰腺组织病理学评分模型组高于假手术组,治疗组低于模型组($P<0.05$);模型组各亚组胰腺血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达、VEGF mRNA表达水平均高于假手术组,而治疗组均低于模型组($P<0.05$)。**结论** 大鼠高脂血症性胰腺炎,VEGF与微循环障碍密切相关;低分子肝素可能通过下调胰腺组织VEGF水平来改善胰腺微循环障碍,减轻胰腺组织进一步损害,且早期干预价值更大。

〔关键词〕 高脂血症性胰腺炎;低分子肝素;血管内皮细胞生长因子;微循环障碍;大鼠

〔中图分类号〕R587 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.006

Effect of Low Molecular Weight Heparin on the Expression of VEGF in Rats with Hyperlipidemic Pancreatitis

CHEN Wei¹, JIANG Qi¹, LI Jian¹, ZHOU Guoxiong^{2*}

(1. Affiliated Dongtai Hospital of Nantong Medical University, Yancheng, Jiangsu 224200, China;

2. Affiliated Hospital of Nantong Medical University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

〔Abstract〕 Objective To study the action mechanism of low molecular weight heparin on pancreatic microcirculation of rats with hyperlipidemic pancreatitis. **Methods** 72 healthy SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and treatment group with 24 rats in each group. Then each group was randomly divided into four subgroups. The rats were first used the high fat diet to establish hyperlipidemia model, the model group and treatment group was to make acute pancreatitis rat models, after the model success, the treatment group were given low molecular heparin subcutaneous injection at 0, 6, 12 and 18 h, the subgroups were repeated the rejection per 6 hours for four times per; model group and sham operation group were injected with equivalent saline at the same time. **Results** The pancreatic blood flow velocity in model group was lower than that in the sham operation group, the treatment group was higher than that in the model group ($P<0.05$). The pathological score in the model group was higher than that in sham operation group, the treatment group was lower than that in model group ($P<0.05$). The expression of VEGF protein and mRNA VEGF expression in the model group were significantly higher than those in the sham operation group, the treatment group was lower than that in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** VEGF is closely related to the disturbance of microcirculation in rats with hyperlipidemia. The low molecular weight heparin may down regulate the VEGF level of pancreatic tissue to improve the pancreatic microcirculation disturbance, and reduce the damage of pancreatic tissue, and the value of early intervention is greater.

〔Keywords〕 hyperlipidemia pancreatitis; low molecular weight heparin; vascular endothelial growth factor; microcirculation disturbance; rats

〔收稿日期〕2015-10-20

〔基金项目〕江苏省盐城市医学科技发展项目(YK20130106)。

〔作者简介〕陈伟,男,主治医师,硕士研究生,研究方向:消化内科疾病的防治。

〔通讯作者〕*周国雄,男,教授,博士研究生导师,E-mail:zhou.guoxiong@aliyun.com。

近年来高脂血症性胰腺炎 (hyperlipidemic acute pancreatitis, HLAP) 的发病率逐年升高^[1]。新近研究表明微循环障碍是重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 的启动因子和持续损伤因子^[2], 目前研究发现低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 除了抗凝、抗血小板聚集作用外, 还有抗炎、调节细胞凋亡、调节脂代谢等作用^[3]。王湘英等^[4]研究发现 LMWH 可能通过抑制 PAF、ET-1/NO 浓度发挥抗血栓作用, 从而改善胰腺微循环, 降低胰腺病理损害, 且早期干预较晚期干预效果更好。也有研究发现, 肝素可通过降低 SAP 血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平从而减轻胰腺损害^[5]。本研究通过制作大鼠 HLAP 模型, 观察胰腺病理学、胰腺血流速度及血清 VEGF、胰腺 VEGF 变化, LMWH 对其的影响, 旨在探讨 LMWH 对改善 HLAP 大鼠胰腺微循环障碍的可能其他机制。

1 材料

1.1 动物

健康 SD 大鼠 72 只, 雄性, 清洁级, 体质量 (250±20) g, 由南通大学 (医学院) 动物实验中心提供。实验动物生产许可证号: SCXK(苏)2008-0010。

1.2 饲养条件

动物饲养在 SPF 级屏障环境内, 昼夜明暗交替时间: 12 h/12 h。高脂饲料喂养, 饮水为自来水瓶装后高压灭菌。动物自由采食和饮水; 每周换两次经高压灭菌的松木刨花垫料。饲养室内每周用 0.5% 新洁尔灭水溶液喷雾消毒一次。实验动物使用许可证号: SYXK(苏)2012-0031。

1.3 主要仪器

(1) 全自动生化分析仪 (日立 7600); (2) J417R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); (3) Eppendorf AG 22331 Hamburg PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司); (4) 电子天平 (ML204/02, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司); (5) Step One Real-Time PCR System (美国 ABI 公司); (6) Preflux 4001 双通道激光多普勒血流仪 (瑞典 Perimed 公司)。

1.4 主要试剂

(1) 牛磺胆酸钠 (Sigma 公司); (2) 水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司); (3) 低分子肝素钠 (希弗全, 意大利阿尔法韦士曼制药公司); (4) 大鼠 VEGF

ELISA 试剂 (上海依科赛生物制品有限公司); (5) VEGF 免疫组化试剂盒 (ABCAM 公司)。

2 方法

2.1 造模方法

按随机数字表法分为 3 组: 治疗组、模型组、假手术组, 每组各 24 只。每组再按开始干预时间点 (0、6、12、18 h) 随机分成 4 个亚组, 每亚组 6 只。3 组大鼠以高脂饲料 (88% 的基础饲料+10% 猪油+2% 胆固醇) 喂养 4 周, 大鼠在高脂饲料喂养前后均抽血化验甘油三酯浓度, 以喂养后血清甘油三酯浓度超过喂养前三倍以上说明高脂血症大鼠模型造模成功。治疗组和模型组采用 5% 牛磺胆酸钠 (购自 Sigma 公司) 逆行胰胆管注射方法制备 AP 模型。假手术组仅在手术中轻轻翻动十二指肠。模型制作成功后, 治疗组大鼠按事先分好的亚组在右侧腹壁皮下注射 LMWH 0.2 ml/100 g/次 (100 IU/kg/次), 每 6 h 重复皮下注射一次, 每个亚组共干预 4 次, 在最后一次干预后 6 h 再次麻醉开腹取标本。模型组和假手术组均以等量的生理盐水同样方法、同样时间点做对照干预。成模后各组大鼠均禁食、禁饮, 常规补充生理盐水 (背部皮下注射生理盐水一次 2 ml/100 g, 每 6 h 重复补液一次, 直到各组大鼠试验结束)。

2.2 指标检测

在实验结束后, 再次麻醉开腹, 用多普勒血流仪测定胰腺血管血流速度, 首先在胰头和胰尾处, 然后在胰体部选取和胰头、尾等距的两点测定, 测定时避开大血管或血肿, 最后取平均值作为结果; 门静脉取血, 采用全自动生化分析仪检测血清甘油三酯 (Triglyceride, TG) 浓度及淀粉酶; 取大鼠胰腺组织放入中性甲醛固定液中, 用于病理观察, 参照改良 Schmidt 评分标准^[6]对胰腺组织损伤进行定量评分; 应用免疫组化方法检测胰腺组织 VEGF, 其阳性判断采用光镜高倍 (×400) 下观察, 每视野选取 100 细胞, 连续观察 5 个视野, 根据胞浆或胞核染色深浅分为 4 个等级 (0~3), 求 5 个视野的平均值, 作为一张切片的染色得分; RT-PCR 检测胰腺组织 VEGF mRNA 表达。

2.3 统计学方法

实验计量数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件包进行处理, 计量数据用 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血清 TG 及淀粉酶的变化

喂养前三组大鼠 TG 水平比较无统计学差异 ($P>0.05$); 各组喂养后 TG 水平均较喂养前高三倍以上,提示高脂血症模型制备成功。模型组血清淀粉酶与治疗组比较无统计学差异 ($P>0.05$),而模型组、治疗组均高于假手术组三倍以上,提示急性胰腺炎大鼠模型制备成功(表 1)。

表 1 各组大鼠血清 TG、淀粉酶变化 ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	TG(mmol/L)		淀粉酶(u/dL)
		喂养前	喂养后	
假手术组	24	0.680±0.057	2.487±0.272 [#]	1730.6±301.9
模型组	24	0.660±0.102	2.338±0.399 [#]	6213.8±451.8 [△]
治疗组	24	0.648±0.087	2.346±0.353 [#]	5339.8±421.4 [△]

注:与假手术组喂养前比较, $\Delta P<0.01$; 与各组喂养前比较, $\#P<0.01$ 。

3.2 胰腺微循环血流速度变化

模型组与假手术组各对应亚组比较胰腺血管血流速度明显下降 ($P<0.01$); 治疗组与假手术组各对应亚组比较胰腺血管血流速度明显上升 ($P<0.01$) (表 2)。

表 2 胰腺血管血流速度比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	0 h	6 h	12 h	18 h
假手术组	100.2±7.8	98.4±8.5	101.7±8.4	99.7±9.2
模型组	90.2±5.3*	88.4±4.7*	84.7±5.5*	86.4±4.9*
治疗组	149.2±6.9 [△]	133.1±8.0 [△]	117.6±8.1 [△]	106.2±6.5 [△]

注:与同时段假手术组比较, $*P<0.01$; 与同时段模型组比较 $\Delta P<0.01$ 。

3.3 胰腺组织病理学改变

假手术组胰腺组织无明显改变。模型组胰腺腺泡小叶水肿,可见大量炎症细胞浸润,点状出血坏死,胰腺血管内可见大量血栓形成,可见较少正常血管管腔。治疗组胰腺腺泡小叶水肿,可见大量炎症细胞浸润,点状出血坏死,胰腺血管内可见少量血栓形成,可见较多正常血管管腔,较模型组病理损伤明显减轻,病理评分明显降低(表 3)。

3.4 胰腺组织 VEGF 蛋白表达的变化

假手术组胰腺组织中 VEGF 蛋白较少表达,胰腺炎成模后胰腺组织中 VEGF 蛋白明显表达,经 LMWH 干预后治疗组胰腺组织 VEGF 蛋白表达评分低于模型组,且随着开始干预时间点推移两者差异逐渐变小(表 4,图 1~4)。

表 3 各组胰腺 HE 染色评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

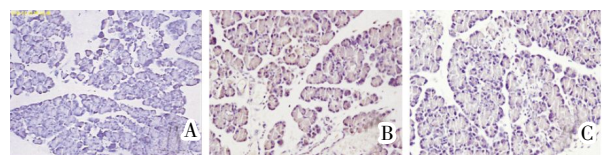
组别	0 h	6 h	12 h	18 h
假手术组	0.45±0.51	0.49±0.52	0.50±0.48	0.53±0.51
模型组	10.88±0.69*	12.31±0.75*	12.75±0.73*	12.50±0.64*
治疗组	5.26±0.61* [△]	5.91±0.58* [△]	8.42±0.59* [△]	8.72±0.55* [△]

注:与同时段假手术组比较, $*P<0.05$; 与同时段模型组比较, $\Delta P<0.01$ 。

表 4 胰腺 VEGF 免疫组化评分比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

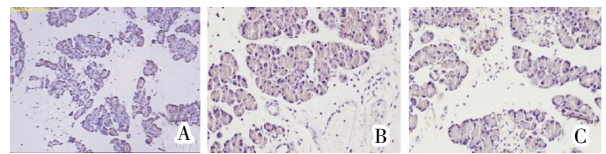
组别	0 h	6 h	12 h	18 h
假手术组	29.7±5.2	30.2±4.5	31.9±4.7	31.1±5.3
模型组	198.4±30.4*	232.1±32.2*	265.1±31.5*	296.5±30.7*
治疗组	136.2±27.6* [△]	162.7±35.6* [△]	252.1±30.1*	284.9±32.8*

注:与同时段假手术组比较, $*P<0.05$; 与同时段模型组比较, $\Delta P<0.05$ 。



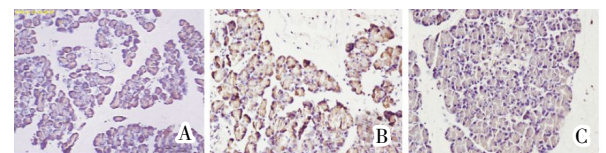
A-治疗组 B-模型组 C-假手术组

图 1 0 h 亚组胰腺 VEGF 免疫组化图片(×400)



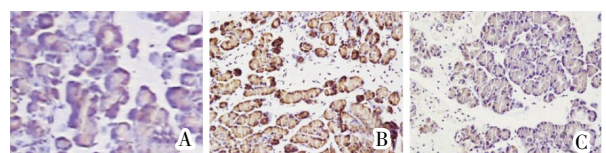
A-治疗组 B-模型组 C-假手术组

图 2 6 h 亚组胰腺 VEGF 免疫组化图片(×400)



A-治疗组 B-模型组 C-假手术组

图 3 12 h 亚组胰腺 VEGF 免疫组化图片(×400)



A-治疗组 B-模型组 C-假手术组

图 4 18 h 亚组胰腺 VEGF 免疫组化图片(×400)

3.5 RT-PCR 检测胰腺组织 VEGF mRNA 表达

治疗组及模型组中的 VEGF mRNA 表达水平均高于假手术组对应亚组 ($P<0.01$) (表 5)。

4 讨论

VEGF 属于一种糖蛋白,其主要作用是促进血管的生长,提高血管通透性,广泛存在于机体的各

表5 VEGF mRNA在胰腺组织中表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	0 h	6 h	12 h	18 h
假手术组	0.96±0.12	1.04±0.08	0.97±0.12	1.02±0.07
模型组	8.67±1.28*	9.32±1.21*	10.41±1.33*	9.29±1.11*
治疗组	4.89±1.77*#	5.77±1.21*##	6.52±1.12*##	8.27±1.35*△

注:与同时段假手术组比较,* $P<0.05$;与同时段模型组比较,## $P<0.01$ 。治疗组相邻各亚组两两比较,△ $P<0.05$ 。

个组织中,是目前认识直接作用于机体内皮细胞最强的细胞生长因子^[7]。在急性胰腺炎情况下,体内VEGF都保持较高水平,在胰腺组织中也出现VEGF高水平表达,且在急性坏死性胰腺炎升高明显,VEGF水平的升高可能预示胰腺炎患者的微循环障碍出现了加重的趋势^[8]。VEGF也能够调控中性粒细胞的附壁和浸润,增加血管内皮的通透性^[9]。

肝素作为一种抗凝药物在临床已广泛应用,目前临床应用的肝素制剂有两种:普通肝素和低分子肝素(LMWH)。LMWH与普通肝素相比具有抗血栓形成能力强、出血危险性小、半衰期短等优点^[10];能和血管内皮细胞结合,具有保护血管内皮细胞,维持内皮细胞的完整,促使内皮细胞释放组织纤溶酶原激活物,抑制血栓素的活化,发挥纤溶和抗血栓作用^[11];近年来有研究发现低分子肝素还可能通过抑制NF- κ B的活性,从而诱导胰腺腺泡细胞凋亡,减轻胰腺炎症程度^[12]。低分子肝素还可能通过抑制HIF-1 α ,VEGF和TGF- β 1改善腹膜功能和抑制腹膜纤维化^[13]。

本实验通过对HLAP大鼠采用LMWH进行不同时间点(0、6、12、18 h)皮下注射干预和生理盐水同样的方法皮下注射对照比较。结果说明:(1)LMWH可以改善HLAP大鼠模型的胰腺微循环障碍,减轻胰腺坏死程度及微血管内血栓形成,经过LMWH干预后大鼠血清VEGF、胰腺组织VEGF及VEGF mRNA表达水平与同时间点对照组均有所下调,我们推论LMWH可能通过下调胰腺组织VEGF水平来改善胰腺微循环障碍,减轻胰腺组织进一步损害。(2)LMWH早期应用(6~12 h)对降低

VEGF水平改善胰腺微循环障碍意义更大。

综上所述,大鼠高脂血症性胰腺炎时,VEGF与微循环障碍密切相关;低分子肝素可能通过下调胰腺组织VEGF水平来改善胰腺微循环障碍,减轻胰腺组织进一步损害,且早期干预价值更大。

参考文献:

- [1] Brown WV, Brunzell JD, Eckel RH, et al. Severe hypertriglyceridemia[J]. Clin Lipidol, 2012, 6(5):397-408.
- [2] 卢义展,王湘英.微循环障碍在重症急性胰腺炎发病机制中的地位[J].中华胰腺病杂志, 2010, 10(2):144-146.
- [3] 马艳,杨育红.低分子肝素的药理作用研究进展[J].中国误诊学杂志, 2008, 8(5):1 207-1 208.
- [4] 王湘英,卢义展,张兴文,等.低分子肝素对伴高脂血症急性坏死性胰腺炎大鼠PA F、ET-1/NO的影响[J].世界华人消化杂志, 2012, 20(10):856-860.
- [5] Li S, Chen X, Wu T, et al. Role of heparin on serum VEGF levels and local VEGF contents in reducing the severity of experimental severe acute pancreatitis in rats[J]. Scand J Gastroenterol, 2012, 47(2):237-244.
- [6] Schmidt J, Lewandrowski K, Femander-Del Castillo C, et al. Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 1992, 37:1426.
- [7] 李鑫,刘静,王东.VEGF在大鼠重症急性胰腺炎中的表达及意义[J].重庆医学, 2012, 41(28):2 951-2 953.
- [8] 戴璟瑜,鲍兴,许燕平,等.胰腺微循环障碍加重过程血管内皮生长因子的表达及其意义[J].中华实验外科杂志, 2013, 30(1):33-35.
- [9] 叶进军,戴璟瑜.胰腺炎微循环障碍加重过程中血管内皮生长因子的表达及意义[J].中国现代普通外科进展, 2012, 15(9):679-682.
- [10] 张海淀,叶继辉.低分子量肝素干预治疗重症急性胰腺炎及对TNF- α 的影响[J].中国现代医生, 2011, 49(26):49-50.
- [11] 田时静,周发春.低分子肝素治疗重症急性胰腺炎研究进展[J].重庆医学, 2014, 43(5):625-627.
- [12] 范钦桥,陈书伟,杨根辉,等.低分子量肝素诱导重症胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的实验研究[J].中国医师杂志, 2009, 3(11):342-344.
- [13] Juan L, Zhi YG, Xian HG, et al. Low Molecular Weight Heparin (LMWH) Improves Peritoneal Function and Inhibits Peritoneal Fibrosis Possibly through Suppression of HIF-1 α , VEGF and TGF- β 1. PLoS One. 2015 Feb 27; 10(2):e0118481. doi: 10.1 371.

(本文编辑 李杰)