

• 基础研究 •

脂微球前列腺素 E₁ 治疗缺血性结肠炎的研究

杨柳 吴本伊 顾瑛 尤伟缔 王卫华

【摘要】 目的 研究脂微球前列腺素 E₁ (Lipo-PGE₁) 对大鼠缺血性结肠炎 (IC) 治疗作用, 并探讨其治疗机制。方法 用光化学法建立大鼠 IC 模型, 观察不同剂量 Lipo-PGE₁ (0.5, 1, 2 μg/kg, 静滴, 给药 5d) 治疗后结肠黏膜损伤指数 (LI)、过氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、6-酮-前列腺素 F_{1α} (6-keto-PGF_{1α})、血栓素 B₂ (TXB₂) 及 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ (P/T) 的变化, 分析肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) 在结肠组织的表达情况。结果 与生理氯化钠溶液阴性对照组比较, 1 μg/kg 和 2 μg/kg 组 LI 均显著降低, SOD、P/T 显著升高, 而 MDA 和 TXB₂ 含量及 TNF-α 和 ICAM-1 的阳性细胞数均显著降低。结论 Lipo-PGE₁ 对 IC 有较好的治疗效果, 可以减轻结肠损伤。治疗机制可能主要与抑制血栓形成、改善组织微循环、减轻炎症反应及氧自由基的产生有关。

【关键词】 结肠炎, 缺血性, 光化学, 前列地尔

Lipo-PGE₁ in the treatment of ischemic colitis: an experimental study

YANG Liu, WU Benyan, GU Ying, et al

Department of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy and mechanism of lipo-prostaglandin E₁ (Lipo-PGE₁) in the treatment of ischemic colitis (IC). Methods IC model rats were divided into different groups and treated with different doses (0.5, 1, 2 μg/kg) of Lipo-PGE₁. The rats of control group were given physiologic saline. All rats were sacrificed after continuous treatment for 5 d. Then the changes of colonic mucosa lesion index (LI), SOD, MDA, 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ (P/T) and expression of TNF-α and ICAM-1 in control group and treatment groups were measured. Results In comparison with the control group, SOD activity and P/T increased significantly, while LI, MDA, TXB₂, expression of TNF-α and ICAM-1 decreased significantly in 1 and 2 μg/kg groups. Conclusion Lipo-PGE₁ can decrease the IC rats' injury. The therapeutic mechanism may be inhibition of thrombogenesis, improving tissue microcirculation, lessening inflammatory reaction and oxygen free radical generation.

【Key words】 colitis, ischemic; photochemistry; lipo-prostaglandin E₁

缺血性结肠炎 (ischemic colitis, IC) 是指由于肠系膜血管狭窄、闭塞或血压低所致结肠壁供血不足、回流受阻导致结肠壁缺血、坏死, 继发细菌感染而引起的结肠炎。本病由 Boley 提出, 并描述了其可逆性的肠缺血损伤^[1]。1966 年 Marston 等^[2] 报告了 16 例并将其命名为缺血性结肠炎, 根据其严重程

度将本病分为一过型、狭窄型和坏疽型。IC 目前是下消化道出血常见原因之一, 可以发生于各个年龄组, 但 90% 发生于 60 岁以上老年人^[3]。随着我国人口老龄化之趋势, IC 的及时诊断和正确治疗日趋重要^[4]。目前临床实践中对于 IC 的认识仍然不足, 尚缺乏有效的治疗药物及其对治疗机制的深入研究。临床上已有少量使用脂微球前列腺素 E₁ (Lipo-PGE₁) 来治疗 IC 的病例, 显示效果较好, 但尚未见正式文献报道。笔者通过在大鼠 IC 模型上使用 Lipo-PGE₁ 来观察治疗效果并探讨其治疗机制, 为临床应用该药物提供新的参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料 健康雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重

收稿日期: 2006-12-30

作者单位: 100853 北京市, 解放军总医院南楼消化科 (杨柳、吴本伊、尤伟缔、王卫华), 激光科 (顾瑛)

作者简介: 杨柳, 男, 1978 年 3 月生, 湖北省武汉市人, 医学硕士, 主治医师, 现工作于解放军杭州疗养院空勤区

通讯作者: 吴本伊, Tel: 010-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

(200±10)g,由解放军总医院实验动物中心提供。癌光啉(PSD-007)由解放军总医院激光科实验室提供,批号20050311;Lipo-PGE₁(商品名:凯时,Lipo-PGE₁,北京泰德公司出品,规格10mg/L,批号2065S);肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF- α)、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)单克隆抗体(博士德公司);PV-6001二抗试剂盒(北京中山公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(北京邦定泰克公司);6-酮-前列腺素_{1 α} (6-keto-PGF_{1 α})、血栓素B₂(TXB₂)放免检测试剂盒(解放军总医院东亚放免所研制);连续倍频半导体激光输出器(清华大学光电工程系研制,波长532nm);IX70型倒置显微镜(日本Olympus公司产品);Image-Pro Plus图象分析仪(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 光化学法建立模型^[5] Wistar大鼠用10%水合氯醛按0.3ml/100g剂量腹腔麻醉,开腹找到结肠,按1mg/100g剂量由股静脉注射PSD-007,3min后用激光照射近端结肠系膜对侧的浆膜面,光斑直径为0.5cm,激光输出功率25mW,照射5min后腹腔注入40kU硫酸庆大霉素,关闭腹腔,待麻醉清醒后送入洁净室正常喂养。

1.3 动物分组及给药方法 将32只模型大鼠随机平均分为4组,按照Lipo-PGE₁给药剂量不同分为对照组、小剂量组(0.5 μ g/kg)、中剂量组(1 μ g/kg)及大剂量组(2 μ g/kg)。不同组别根据大鼠体重计算给药量,在注射光敏剂之前5min由股静脉注射,对照组则予以相同容量的生理盐水,建模后每天通过尾静脉给药1次,连续用药5d。全部大鼠均在末次给药后2h处死,取结肠照射后损伤最重部位放入液氮中保存备用。

1.4 检测指标及方法 (1)按表1标准计算结肠黏膜损伤指数(lesion index, LI)^[6]。(2)按试剂盒方法测定肠组织SOD、MDA及静脉血液6-keto-PGF_{1 α} 、TXB₂含量。免疫组织化学法检测结肠黏膜组织中TNF- α 、ICAM-1的表达,以结肠黏膜上皮细

表1 大体形态急性程度的评分标准

评分	急性程度	大体形态
0	正常	黏膜无水肿、充血及溃疡,肠壁无粘连及增生肥厚
1	轻度	轻度的黏膜水肿、充血,无溃疡
2	轻至中度	黏膜充血、水肿、糜烂,无溃疡
3	中度	黏膜充血、水肿、糜烂,单个溃疡
4	重度	黏膜充血、水肿、糜烂,多个溃疡

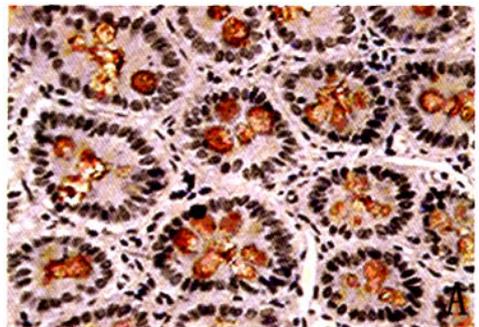
胞浆内出现棕黄色颗粒或细胞膜上着棕黄色为阳性表达,在40 \times 物镜下使用Image-Pro Plus图像分析仪进行阳性细胞的数值化处理。

1.5 统计学分析 所有实验数据均采用均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用STATA8.0统计学软件包对结果进行方差分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组间检测指标比较 与阴性对照组比较,小剂量组各指标没有显著性差异,中、大剂量组的SOD、6-keto-PGF_{1 α} /TXB₂(P/T)均明显增高,而LI、TXB₂、TNF- α 和ICAM-1阳性细胞数则均有明显下降(表2)。

2.2 免疫组织化学观察 与阴性对照组比较,大剂量组结肠黏膜组织中TNF- α 和ICAM-1的表达呈阳性染色的细胞数量明显减少,且染色强度亦明显下降(图1)。

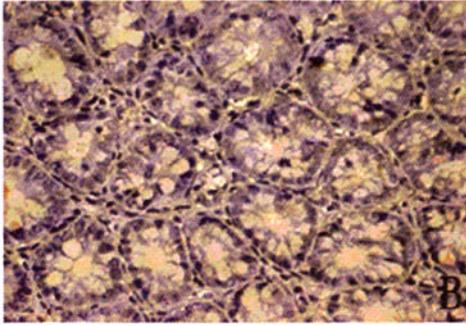
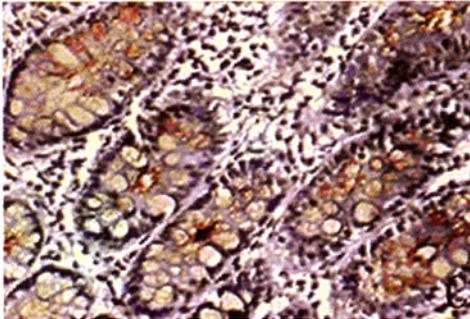
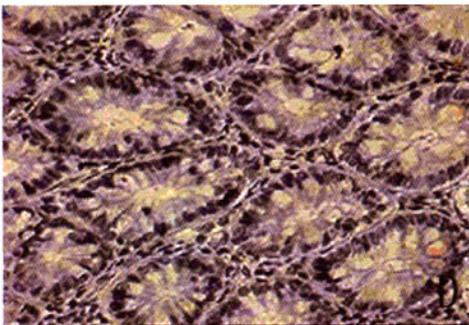


A: 阴性对照组结肠黏膜 TNF- α (+) $\times 400$

表2 各组间检测指标的比较($\bar{x}\pm s$; n=8)

组别	LI	SOD (kU/g prot)	MDA (μ mol/g prot)	6-keto-PGF _{1α} (ng/L)	TXB ₂ (ng/L)	P/T	TNF- α (/mm ²)	ICAM-1 (/mm ²)
对照组	3.63±0.52	19.92±3.35	11.81±2.71	1129±559.29	772±116.95	1.46±0.68	35±3.78	37±7.04
小剂量组	3.25±0.71	22.71±2.66	9.74±1.63	1265±734.15	663±62.88	1.87±0.92	30±6.55	29±6.78
中剂量组	2.63±0.52*	30.09±2.99*	7.2±1.38*	1788±470.8	526±87.44*	3.65±1.05*	15±5.35*	19±5.18*
大剂量组	1.63±0.51* Δ	38.26±2.02* Δ	4.27±1.29* Δ	1303±430.6	243±61.41* Δ	5.44±1.5* Δ	6±5.01* Δ	5±4.02* Δ

注:与对照组比较,* $P<0.05$,[#] $P<0.01$;与中剂量组比较, Δ $P<0.05$, \blacktriangle $P<0.01$

B:大剂量组结肠黏膜 TNF- α (-) $\times 400$ C:阴性对照组结肠黏膜 ICAM-1(+) $\times 400$ D:大剂量组结肠黏膜 ICAM-1(-) $\times 400$ 图1 TNF- α 、ICAM-1 免疫组化染色

3 讨论

Bergstrom 等^[7]首先分离和提纯了 PGE₁, 并因此获得 1982 年的诺贝尔生理学奖。Nakai 等^[8]报道使用 PGE₁ 可以明显增加 IC 模型的结肠组织血流量, 减轻损伤, 提示了其用于治疗 IC 的可能性。PGE₁ 在体内半衰期极短, 通常采用大剂量持续静脉给药的方法, 因此带来的血管疼痛等副作用使患者难以忍受。Lipo-PGE₁ 是将 PGE₁ 封入脂微球中的一种新型制剂, 与传统 PGE₁ 制剂相比, 脂微球能黏附于病变血管内皮细胞上, 同时还可以明显减少通过肺循环时的灭活, 从而减少药物剂量并延长作用时间。笔者实验中使用 Lipo-PGE₁ 治疗 IC 大

鼠, 发现中、大剂量组的 LI 均比对照组有明显下降, 且大剂量组比中剂量组更低。提示 Lipo-PGE₁ 对 IC 有较好的治疗作用, 在适度的范围内加大剂量可以取得更好的效果。

Felds 等^[9]报道使用 Lipo-PGE₁ 可以抑制凝血并扩张血管, 其作用机制可能是通过减少 TXA₂ 来实现的^[10,11]。另外有研究证实 PGE₁ 不但可以抑制血小板的活化, 还能使已凝集的血小板分开^[12]。血栓素 A₂(TXA₂) 具有促进血小板凝集、血管收缩等作用; 前列环素(PGI₂) 则是内源性血小板聚集强抑制剂, 同时又可以扩张血管, PGI₂ 与 TXA₂ 的平衡决定血管舒缩状态和血小板聚集能力^[13]。IC 时血管内膜受损导致血小板聚集活化^[14]及血浆 TXA₂ 含量升高, 同时内皮细胞合成的 PGI₂ 明显减少^[15], PGI₂ 与 TXA₂ 的比例失衡而出现血管收缩及血小板聚集形成血栓, 导致微循环障碍。PGI₂ 与 TXA₂ 皆不稳定, 迅速转化为相对稳定的无活性的 6-keto-PGF_{1 α} 及 TXB₂, 测定后两者即可反映前两者水平。从笔者的实验结果来看, 与对照组相比, 中、大剂量组的 TXB₂ 含量均明显降低, P/T 则均明显增高, 而各组间的血液 6-keto-PGF_{1 α} 数值没有显著性差异。提示 PGE₁ 主要是通过减少 TXA₂ 的生成, 改变其与 PGI₂ 的比例发挥作用, 对 PGI₂ 没有明显的影响。

IC 的发病过程中产生大量的炎性因子促使炎症细胞与内皮细胞黏附并游离出血管, 造成内皮细胞与组织损伤。已有多个实验证实 PGE₁ 可以通过抑制炎症细胞从而有效减少组织的损伤^[16,17]。TNF- α 对促进炎症发展起到了关键性的作用, 不仅直接促进白细胞向损伤区的聚集, 而且还可以上调 ICAM-1 的表达, 而 ICAM-1 正是介导白细胞与血管内皮表面黏附的关键分子。在笔者的实验中, 发现使用 Lipo-PGE₁ 后, 中、大剂量组结肠黏膜的 TNF- α 、ICAM-1 阳性细胞数比对照组明显降低, 提示其可以通过减少 TNF- α 、ICAM-1 等的表达来抑制炎症反应, 从而有效地减轻组织损伤。

IC 时由于微循环障碍导致组织发生缺血缺氧, 从而产生的大量氧自由基。氧自由基作用于细胞膜上的不饱和脂肪酸, 产生的脂质过氧化反应导致细胞膜损伤。PGE₁ 具有还原性, 可以减少氧自由基产生, 阻止脂质过氧化反应来保护细胞, 防止组织损伤^[18]。在活体中直接测量氧自由基很困难, MDA 是细胞膜脂质过氧化反应的代谢终产物, 其含量越

高代表细胞膜损伤也越严重^[19]。SOD 在机体内催化超氧阴离子歧化,其活力的高低间接反映了机体清除氧自由基的能力^[20]。笔者实验结果显示中、大剂量组的结肠黏膜组织 SOD 活性比对照组高,而 MDA 含量则比对照组低。这也提示 PGE₁ 可以通过上调 SOD 活性来提高清除氧自由基的能力,使 MDA 明显降低。

综上所述,Lipo-PGE₁ 对减轻 IC 大鼠的结肠黏膜损伤有较明显的效果,其主要机制可能与抑制血栓形成、改善组织微循环、减轻炎症反应及氧自由基的产生有关。以上发现为临床上使用该药物提供了一定的理论依据,并为进一步的研究提供参考。

参 考 文 献

[1] Boley S J, Schwartz S, Lash J, et al. Reversible vascular occlusion of the colon. *Surg Gynecol Obstet*, 1963, 116: 53-60.

[2] Marston A, Pheils MT, Thomas ML, et al. Ischemic colitis. *Gut*, 1966, 7: 1-10.

[3] 王孟薇, 吴本俨, 万军, 主编. 消化疾病鉴别诊断学. 北京: 人民军医出版社, 2004. 354-355.

[4] 杨柳, 吴本俨. 缺血性结肠炎的诊治研究进展. *人民军医杂志*, 2006, 9: 33-35.

[5] 杨柳, 吴本俨, 顾瑛. 光化学法诱导缺血性结肠炎大鼠模型的研究. *中国激光医学杂志*, 2007, 16: 219-222.

[6] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-811.

[7] Bergstrom S, Sjovall J. The isolation of prostaglandin E₁ from sheep prostate glands. *Acta Chem Scand*, 1960, 14: 1771-1772.

[8] Nakai M, Uchida H, Hanaoka T, et al. Beneficial effects of prostaglandin E₁ on ischemic colitis following surgery on the abdominal aorta. *Surg Today*, 1998, 28: 1146-1153.

[9] Felds S, Li G, Amirian J, et al. Enhanced thrombolysis, reduced coronary reocclusion and limitation in infarct size with liposomal prostaglandin E₁ in a canine thrombolysis model. *J Am Coll Cardiol*, 1994, 24: 1382-1390.

[10] Brockmann DC, Steven JH, Ohanley P, et al. The effort of prostaglandin E₁ on adult respiratory distress syndrome in septic primates. *Am Rev Respir Dis*, 1986, 134: 885-890.

[11] Holocoft JW, Vassar MJ, Weber CJ. Prostaglandin E₁ and survival in patients with adult respiratory distress syndrome. A prospective trial. *Am J Surg*, 1986, 203: 271-278.

[12] Reiter R, Resch U, Sinzinger H. Do human platelets express COX-2? Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2001, 64: 299-305.

[13] Dempsey RJ, Roy MW, Meyer K, et al. Development of cyclooxygenase and lipoxygenase metabolites of arachidonic acid after transient cerebral ischemia. *J Neurosurg*, 1996, 64: 118-121.

[14] Vaughan DE. Angiotensin and vascular fibrinolytic balance. *Am J Hypertens*, 2002, 15: 3S-8S.

[15] Langford EJ, Brown AS, Wainurig RJ, et al. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*, 1994, 344: 1458.

[16] Yamanka K, Saluja AK, Brown GE, et al. Protective effects of prostaglandin E₁ on acute lung injury of caerulein-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol*, 1997, 272: 23.

[17] 孙春亮, 季兵, 黎介寿, 等. 前列腺素 E₁ 治疗大鼠胰腺炎肺损伤的作用机制. *肝胆胰外科杂志*, 2001, 13: 64-66.

[18] Hecker G, Ney P, Schror K. Cytotoxic enzyme release and oxygen centered radical formation in human neutrophils are selectively inhibited by E-type prostaglandins but not PGI₂. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1990, 341: 308-315.

[19] Kim H, Seo JY, Roh KH, et al. Suppression of NF2kappaB activation and cytokine production by N2acetylcysteine in pancreatic acinar cells. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 674-683.

[20] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284: G15-G26.