

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.002

尼古丁对重度急性胰腺炎保护作用的研究*

崔广宾^{1,2}, 李晓武², 苗建军², 王金², 王桂岭¹, 尚培中^{△2}

(1. 河北北方学院研究生院, 河北张家口 075000; 2. 中国人民解放军第 251 医院普通外科, 河北张家口 075000)

[摘要] **目的** 探讨不同浓度尼古丁对重度急性胰腺炎(SAP)的影响。**方法** 按照随机分配原则将动物分为对照组、SAP组、尼古丁干预组(0.1、0.2、0.3 mg/kg),观察各组小鼠血清中细胞因子水平改变和脾脏中各树突状细胞(DCs)亚群的分化比例改变及对 SAP 小鼠病死率的影响。**结果** 与对照组相比,0.3 mg/kg 尼古丁可显著降低 SAP 病死率($P < 0.05$)。另外,尼古丁可增加小鼠脾脏中调节性 DCs 的比例($P < 0.05$),还可以降低 SAP 体内炎症反应。**结论** 尼古丁可以降低 SAP 体内的炎症反应以及病死率,对 SAP 具有一定的保护作用。

[关键词] 急性胰腺炎;尼古丁;树突状细胞;细胞因子类

[中图分类号] R576

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3460-03

The study of the protection of nicotine against severe acute pancreatitis*

Cui Guangbin^{1,2}, Li Xiaowu², Miao Jianjun², Wang Jin², Wang Guiling¹, Shang Peizhong^{△2}

(1. Department of Graduate, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

2. Department of General Surgery, 251th Hospital of PLA, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of different levels of nicotine on severe acute pancreatitis(SAP). **Methods** The BalB/c mice were separated into five groups as follows: control group, SAP group, SAP with nicotine (0.1, 0.2, 0.3 mg/kg) treatment groups. CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs were isolated by magnetic microbeads from mice. The phenotypes of cells were analyzed by flow cytometry, and the cytokine levels were measured by ELISA. Another sixty mice were employed to evaluate the effect of nicotine on the mortality rate following SAP respectively. **Results** Nicotine significantly protected mice from SAP in a dose-dependent fashion by inhibiting proinflammatory cytokines production($P < 0.05$). Compared with SAP, nicotine could increase the number and suppressive capacity of CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs obviously ($P < 0.05$). Beyond that, nicotine could significantly improve the survival rate in SAP model. **Conclusion** The nicotine may become a useful way to improve the prognosis of SAP.

[Key words] acute pancreatitis; nicotine; dendritic cells; cytokines

编者按:尼古丁不仅仅存在于烟叶之中,也存在于多种茄科植物的果实之中,随着科学的不断进步,人们认识到尼古丁并不是香烟致癌的罪魁祸首,微量的尼古丁并不直接对人体造成危害。目前已有临床研究证明,尼古丁有望成为治疗老年痴呆症、帕金森症、抑郁症的有效药物。

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是指多种病因引起的胰酶激活,继以胰腺局部炎症反应为主要特征,伴或不伴有其他器官功能改变的疾病^[1]。轻度急性胰腺炎(MAP)大多数患者的病程呈自限性,而重度急性胰腺炎(SAP)起病急、病势凶险,短期内即可引起组织器官氧化损伤、级联瀑布式炎症反应,最终导致多器官功能障碍综合征(MODS),病死率高达36%~50%^[2]。近年的研究表明,炎症细胞、细胞因子和炎症介质在 SAP 的发生、发展中起着重要作用^[3]。最近的一项研究表明,树突状细胞(DCs)是 AP 中胰腺存活必不可少的细胞,可以保护器官免受细胞应激的影响^[4]。DCs 是体内功能最强的抗原提呈细胞(APC),作为适应性免疫应答的启动者,在机体抗炎反应中发挥重要作用。DCs 的成熟状态对其发挥免疫效应起到了至关重要的作用。尼古丁又名烟碱,是烟草中含氮生物碱的主要成分。在一项关于尼古丁减轻急性肺损伤的研究中,实验人员证实了尼古丁的抗炎作用^[5]。本研究通过建立 SAP 模型,观察经过尼古丁的处理后,SAP 小鼠脾脏中 DCs

以及血清中 IL-6、IL-10、TNF- α 水平的变化程度以及对 SAP 小鼠病死率的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性清洁级 BALB/c 小鼠 100 只,体质量(20 \pm 1)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,常规喂养,实验前 12 h 禁食,自由饮水;尼古丁、L-精氨酸购自美国 Sigma 公司。实验时用 0.9% 的生理盐水将尼古丁配成不同剂量(0.1、0.2、0.3 mg/kg) 的溶液;胶原酶 D(美国 Sigma 公司),小鼠淋巴细胞分离液(北京昊成天翔商贸有限公司),RPMI 1640 培养液与热灭活胎牛血清(北京思塞因科技有限公司),DC 阴选试剂盒(美国 BD 公司),小鼠抗 DC(CD11c 微磁珠),DC 表面单克隆荧光抗体 Fc 阻断剂——纯化大鼠抗小鼠 CD16/CD32(Fcy III/II-R) 抗体、抗 CD11c 单克隆抗体-别藻蓝蛋白(CD11c-APC)、抗 CD45RB 单克隆抗体-藻红蛋白(CD45RB-PE)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗小鼠 CD40、CD80、CD86、I-a/e(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立及实验分组 参照文献[6]方法建立小鼠 SAP 模型,分 2 次腹腔注射 8% L-精氨酸(40 mg/kg),间隔 1 h,对照组按同样方法注射 0.5 mL 生理盐水。按照随机分配原则将动物分为对照组、SAP 组、尼古丁干预组(0.1、0.2、0.3

* 基金项目:中国人民解放军第 251 医院院内课题(KT2014003)。

作者简介:崔广宾(1989—),硕士,主要从事胰腺炎机制研究。 △

mg/kg), 各组再随机分成 0、12、24、48、96 h 等 5 个亚组, 每个亚组 4 只小鼠。

1.2.2 标本采集与处理 分别在每个时间点摘除眼球取血 0.5~1.0 mL, 离心后留血清 -20 °C 下保存待测。之后, 固定小鼠于仰卧位, 沿腹中线依次切开皮肤、腹壁各层进入腹腔, 暴露脾脏, 钝性取被膜脾脏, 置入盛有 PBS 液的平皿中用于提取 DCs。因 L-精氨酸引起的胰腺炎模型, 胰腺组织改变是均一性的, 因此随机选取胰腺组织浸泡于 4% 多聚甲醛用于病理检测。

1.2.3 小鼠脾细胞的分离及单个核细胞的制备 留取脾脏, 剪碎组织, 用研磨棒于 220 目金属网上研磨。将细胞悬液贴 15.0 mL 离心管壁小心加入到小鼠淋巴细胞分离液上, 20 °C、1 500 r/min 离心 15 min, 吸取中层絮状物, 置于离心管中, 加 4 倍 D-PBS 缓冲液重悬, 4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 去除多余的淋巴细胞分离液, 所得细胞即为小鼠脾脏单个核细胞。

1.2.4 磁珠孵育和磁性分选脾脏 CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs 使用 DCs 阴选试剂盒分选获得 DCs, 具体操作严格按说明书进行。富集的小鼠脾脏 DCs 不含抗体及磁珠, 细胞计数后用于后续实验。CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs 的纯化通过抗 CD11c 磁珠选出。

1.2.5 荧光抗体染色 将 1.2.4 中的 CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs 孵育 24 h, 连同孵育液一并加入流式管, 离心, 吸取上清, -70 °C 保存。加入 100 μL PBS 重悬离心后沉淀的细胞, 调整细胞密度为 2×10⁵ 个/mL, 加入 Fc 阻断剂 1 μL, 4 °C 孵育 15 min; 分别加入 5 μL CD11c-APC、CD45RB-PE、CD40-FITC、CD80-FITC、CD86-FITC、I-a/e-FITC, 避光孵育 15 min; 加入 2 mL PBS 洗涤 1 次, 离心后去上清, 加入 0.4 mL PBS, 采用流式细胞仪检测相关标记物。

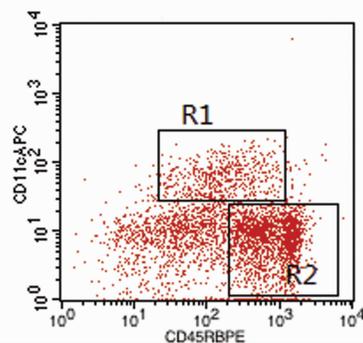
1.2.6 血清中细胞因子水平的检测 所有全血立即 37 °C 恒温孵育 15 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-10、IL-6 及 TNF-α 的表达水平, 每组设 3 个复孔。

1.2.7 观察尼古丁对 SAP 小鼠病死率的影响 取 60 只小鼠, 分成 5 组, 每组 12 只, 按照 1.2.1 中分组方法, 分别观察在 0、12、24、48、96 h 小鼠死亡数量, 最长持续到第 8 天。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠脾脏 DCs 分离与亚群鉴定 用标染的 CD11c-APC 和 CD45RB-PE 对分选所得的 DCs 同时进行染色, 染色满意后采用流式细胞仪进行分析, 结果显示所得 DCs 分为 3 群, 即 CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs、CD11c^{high} CD45RB^{low} DCs 和 CD11c^{low} CD45RB^{low} DCs。采用磁珠分选技术获取 CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs, 流式细胞术检测存活率大于 90%。见图 1。



PE: 前向角; APC: 侧向角; R1: CD11c^{high} CD45RB^{low} DCs; R2: CD11c^{low} CD45RB^{high} DCs。

图 1 细胞亚群流式细胞图

2.2 尼古丁刺激后小鼠脾脏中 DCs 亚群分化的比例变化与 SAP 组比较, 12 h 时尼古丁干预组 R1 数量变化不显著, R2 数量显著增加, 而在 24、96 h, 尼古丁干预组的 R1 数量较 SAP 组降低, 在 24、48、96 h 时, R2 数量显著增加。见表 1。

表 1 尼古丁刺激后小鼠脾脏中 DCs 亚群分化的比例 ($\bar{x} \pm s, \%$)

区域	12 h		24 h		48 h		96 h	
	SAP 组	0.3 mg/kg 尼古丁组						
R1	36±2	36±3	40±4	34±2 ^a	33±2	30±3	30±2	28±3
R2	14±4	18±1 ^a	12±3	20±2 ^a	15±4	25±2 ^a	17±2	34±3 ^a

^a: $P < 0.05$, 与 SAP 组比较。

表 2 各组血清中 IL-10 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
对照组	4±2	5±2	4±3	7±1	6±3
SAP 组	159±28 ^a	108±21 ^a	99±27 ^a	175±19 ^a	121±23 ^a
尼古丁组					
0.1 mg/kg	151±24 ^b	111±19	119±24 ^b	196±28 ^b	132±19 ^b
0.2 mg/kg	139±31 ^b	129±29 ^{bc}	136±21 ^{bc}	239±34 ^{bc}	120±24 ^c
0.3 mg/kg	161±31 ^c	135±17 ^{bc}	155±25 ^{b#}	269±21 ^{bc}	195±19 ^{bc}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAP 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 0.1 mg/kg 组比较。

2.3 尼古丁刺激后 SAP 小鼠血清中细胞因子的变化 SAP 小鼠血清中 L-10、TNF-α 与 IL-6 水平较对照组小鼠明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 经尼古丁刺激后, 血清中 TNF-α 与 IL-6 水平较 SAP 组小鼠明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); IL-10 水平明显升高, 并且呈现剂量依赖效应 ($P <$

0.05)。见表 2~4。

表 3 各组血清中 TNF-α 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
对照组	9±4	8±3	10±5	9±2	8±5
SAP 组	25±2 ^a	408±21 ^a	399±27 ^a	175±19 ^a	121±23 ^a
尼古丁组					
0.1 mg/kg	29±4	374±28 ^b	371±12 ^b	207±10 ^b	99±24 ^b
0.2 mg/kg	27±5	415±17	327±19 ^{bc}	161±19 ^{bc}	109±31 ^b
0.3 mg/kg	24±3	289±17 ^{bc}	295±25 ^{bc}	109±21 ^{bc}	55±19 ^{bc}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAP 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 0.1 mg/kg 比较。

2.4 尼古丁降低 SAP 小鼠病死率 为了验证尼古丁可以改善 SAP 小鼠的病死率, 本研究观察了尼古丁干预后 SAP 小鼠

病死率的变化。如图 2 所示,与未注射尼古丁的小鼠相比,0.1 mg/kg 尼古丁干预模型小鼠的病死率略有下降。而 0.3 mg/kg 尼古丁干预显著降低 SAP 小鼠病死率($P < 0.05$),而 0.1 mg/kg 和 0.2 mg/kg 尼古丁的保护作用表现却不明显($P > 0.05$)。

表 4 各组血清中 IL-6 水平的变化($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h	96 h
对照组	26±4	31±3	27±3	25±2	31±4
SAP 组	29±3	108±21 ^a	199±27 ^a	175±19 ^a	121±23 ^a
尼古丁组					
0.1 mg/kg	26±6	94±17 ^b	160±20 ^b	160±23 ^b	111±16 ^b
0.2 mg/kg	31±5	101±22 ^b	139±27 ^{bc}	151±18 ^{bc}	109±23 ^{bc}
0.3 mg/kg	27±3	89±17 ^{bc}	145±25 ^{bc}	109±21 ^{bc}	95±19 ^{bc}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 SAP 组比较; ^c: $P < 0.05$, 与 0.1 mg/kg 比较。

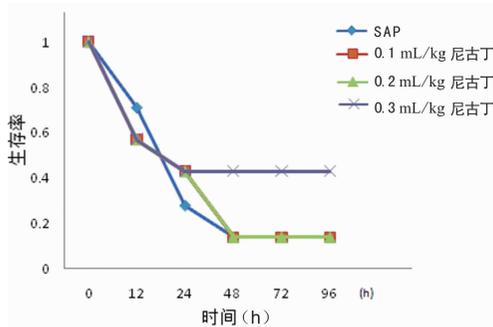


图 2 尼古丁降低 SAP 小鼠病死率

3 讨 论

SAP 是临床一种常见的急危重症,单纯的支持疗法或者手术治疗并未能显著降低器官损害的发生率以及 SAP 病死率。SAP 治疗经历了一些重要变革,包括早期液体复苏、预防性抗菌药物应用、血液滤过等部分治疗手段,但是从总体治疗的效果来看,治疗手段日新月异并没有带来临床结局的显著改善^[6]。胰腺炎是一种炎症性疾病,炎症反应是 SAP 早期重要的病理变化,过度的炎症反应引起的炎症反应综合征的发生是导致器官损伤甚至 SAP 早期死亡的主要原因。因此,有效调节早期超强的炎症反应及控制后期感染和内毒素血症的发生是治疗 SAP 的关键。

CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 是由 Groux 等^[7]于 1999 年从 IL-10 转基因小鼠和正常 BalB/c、C57BL/6 小鼠的脾脏内分离出的一个 DCs 的亚群。该群细胞存在于正常小鼠的脾脏及淋巴结内,特别在 IL-10 转基因的小鼠中。CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 通过分泌 IL-10 抑制机体的炎症反应,本研究也同样发现了这一现象。

近年来的研究证实胆碱能抗炎通路(CAP)是一种神经-免疫调节通路,迷走神经及其递质乙酰胆碱(Ach)与免疫细胞上烟碱型胆碱能受体(nAChR)结合,通过细胞内信号传导途径抑制炎症因子的释放,从而防止炎症过度反应。尼古丁作为 nAChR 的激动剂,具有的抗炎作用引起了作者的重视。本研究发现,经过尼古丁干预后 SAP 小鼠体内的 CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 明显增加,同时,血清中 IL-10 水平显著升高,IL-6 和 TNF- α 的水平明显降低。更为重要的是,经过尼古丁的干预明显增加了 SAP 的存活率,对 SAP 表现出保护作用。

有研究人员在脓毒症模型中也发现了同样的现象,尼古丁可以抑制促炎因子的释放,提高脓毒症大鼠的存活率^[8]。而与 Aicher 等^[9]研究相反,他们发现尼古丁可以通过 $\alpha 7$ nAChR 激活 DCs,并且促进 DCs 成熟,从而活化 T 细胞启动免疫反应,尼古丁的这些作用可能是导致动脉粥样硬化继续进展的主要原因。作者认为产生这种矛盾现象的根本原因是 DCs 的分化状态不同所导致的。在本实验中,经过尼古丁的刺激,小鼠体内的 CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 显著增加,对应的 IL-10 显著升高,抑制了体内炎症反应的继续进展,另一方面,CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 的数量却是降低的,此亚群主要以分泌 IL-12 为主,促进机体发生炎症反应。由此,推测尼古丁可能促进 DCs 向 CD11c^{low}CD45RB^{high} DCs 发展,从而减弱 SAP 的炎症反应,增加 SAP 小鼠的生存率。

总之,本实验结果提示干预胆碱能抗炎通路对 SAP 具有一定的保护作用。但尼古丁对 SAP 的预防和保护作用的机制还有待进一步研究。不过相信随着对胆碱能抗炎通路与 SAP 相互关系的深入研究,困扰人们的问题终将得到解释。而胆碱能抗炎通路也有可能成为治疗 SAP 的有效措施,为 SAP 的治疗开启新的篇章。

参考文献

- [1] 王兴鹏,李兆申,袁耀宗,等. 中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海)[J]. 中国实用内科杂志,2013,33(7):530-535.
- [2] Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus[J]. Gut, 2013,62(1):102-111.
- [3] 胡兰,鄢麟,朱荣涛,等. Kupffer 细胞在急性胰腺炎发病中的作用[J]. 重庆医学,2014,43(20):2666-2668.
- [4] Bedrosian AS, Nguyen AH, Hackman M, et al. Dendritic cells promote pancreatic viability in mice with acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2011,141(5):1915-1926.
- [5] Mabley J, Gordon S, Pacher P. Nicotine exerts an anti-inflammatory effect in a murine model of acute lung injury[J]. Inflammation, 2011,34(4):231-237.
- [6] Wu BU, Banks PA. Clinical management of patients with acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2013,144(6):1272-1281.
- [7] Groux H, Cottrez F, Rouleau M, et al. A transgenic model to analyze the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells[J]. J Immunol, 1999,162(3):1723-1729.
- [8] Pavlov VA, Ochani M, Yang LH, et al. Selective $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis[J]. Crit Care Med, 2007,35(4):1139-1144.
- [9] Aicher A, Heeschen C, Mohaupt M, et al. Nicotine strongly activates dendritic cell-mediated adaptive immunity: potential role for progression of atherosclerotic lesions[J]. Circulation, 2003,107(4):604-611.