

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00286

· 论 著 ·

组胺和类胰蛋白酶在大鼠慢性胰腺炎疼痛中的作用

虞大为[△], 邱海波[△], 俞卫锋*, 陆智杰*

第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

[摘要] **目的** 探讨组胺和类胰蛋白酶在慢性胰腺炎(CP)疼痛发生与维持中的作用。**方法** 制备 CP 模型大鼠,检测模型组和对照组大鼠胰腺标本中的组胺和类胰蛋白酶含量并进行比较;然后将模型组和对照组大鼠胰腺标本孵育上清分别注射于正常大鼠足底,观察注射后 0.5、1、3、5、7 h 大鼠痛觉阈值变化;以模型组大鼠胰腺标本孵育上清注射正常大鼠足底,并给予 H₁ 受体阻断剂和蛋白酶抑制剂,观察其对痛敏的治疗作用。**结果** CP 模型大鼠的胰腺局部组胺及类胰蛋白酶分泌量较对照组增高($P < 0.05$),其标本孵育上清在注射后 5 h 内有明显的痛觉致敏作用,且该作用可被 H₁ 受体阻断剂和蛋白酶抑制剂所逆转。**结论** 组胺和类胰蛋白酶是 CP 顽固性疼痛发生维持中的重要介质。

[关键词] 慢性胰腺炎;组胺;类胰蛋白酶类;肥大细胞;疼痛;痛觉过敏

[中图分类号] R 576.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)03-0286-05

Roles of histamine and tryptase in chronic pancreatitis pain in rats

YU Da-wei[△], QIU Hai-bo[△], YU Wei-feng*, LU Zhi-jie*

Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To explore the roles of histamine and tryptase in chronic pancreatitis pain development and maintenance. **Methods** Rat models of chronic pancreatitis were prepared, and the histamine and tryptase contents were examined in the pancreatic specimens of both model group and the control group. The pancreas incubation supernatants of both groups were injected into the plantar surface of the rat hindpaw, and then the pain thresholds were observed at 0.5, 1, 3, 5, and 7 h after injection. Rats injected with the supernatant of chronic pancreatitis model were also given H₁ receptor blocker or protease inhibitor to observe their treatment for hyperalgesia. **Results** The histamine and tryptase contents in the pancreas specimens were increased in chronic pancreatitis model rats. Injection of supernatant from the chronic pancreatitis specimens had a profound hyperalgesia effect within 5 h after injection, and the effect could be partially reduced by H₁ receptor blockers and protease inhibitors. **Conclusion** Our findings suggest that histamine and tryptase are important mediators in the development and maintenance of the chronic pancreatitis pain.

[Key words] chronic pancreatitis; histamine; tryptases; mast cells; pain; hyperalgesia

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3):286-290]

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是由多种病因引起的胰腺组织和功能不可逆的慢性炎症性疾病,以胰腺腺泡萎缩、破坏、间质纤维化为主要病理特征。我国最近一次流行病学调查显示,1994年至2004年间 CP 患病率约为 13/10 万,且有逐年增多的趋势^[1]。疼痛是 CP 最常见、治疗最困难的症

状^[2]。CP 疼痛发生的机制主要包括胰腺组织内或胰管高压、炎症既发的局部酸中毒、胰腺局部的介质分泌改变所致微环境变化及其继发性神经性改变、遗传性因素或个体因素等,目前认为,中枢或周围神经系统的变化在 CP 疼痛的发生与维持中起重要作用,多种神经肽或神经生长因子、细胞因子共同参与

[收稿日期] 2012-12-09 **[接受日期]** 2013-01-25

[基金项目] 国家自然科学基金(31171013),上海市科委基金(114119a4000),贝朗麻醉科学研究基金(BBF2011-007)。Supported by National Natural Science Foundation of China (31171013), Fund from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (114119a4000) and B. Braun Fund for Anesthesia Scientific Research (BBF2011-007).

[作者简介] 虞大为, 硕士, 主治医师. E-mail: irwyb312@gmail.com; 邱海波, 住院医师. E-mail: roverqiu1978@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81875231, E-mail: ywf808@sohu.com; Tel: 021-81875231, E-mail: ljwxyz@163.com

CP疼痛的发生与维持^[3],但引起这种变化的具体原因仍不明了。

Hoogerwer等^[4]在CP患者的尸检中发现,胰腺组织中肥大细胞数目增多,并与患者生前的疼痛有相关性。肥大细胞是一种表达高亲和力IgE受体的多功能免疫细胞,可释放组胺、5-羟色胺、白三烯及类胰蛋白酶等大量炎症介质^[5-6]。肥大细胞胞内含有的预形成的组胺与神经生长因子(NGF),可被趋化因子MCP-1和MIP-1 α 等激活释放^[7]。此外在实验性自身免疫性前列腺炎模型中发现,NGF的高表达可提高神经元的兴奋性,并能增加周围组织中神经元的密度^[8],且肥大细胞是该模型所致慢性盆腔痛发生的重要介质之一^[9]。以上这些研究提示,肥大细胞的激活释放产物组胺、类胰蛋白酶等可能参与了CP的顽固性疼痛,并由NGF调节。本研究观察了CP模型大鼠胰腺中肥大细胞特异性产物组胺及类胰蛋白酶的释放变化,并探讨了组胺和类胰蛋白酶在CP疼痛发生与维持中的作用。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂 健康清洁级雄性SD大鼠,体重200~250 g(第二军医大学实验动物中心)、三硝基苯磺酸(TNBS;Sigma公司,批号P2297)、Hank's液(Gibco公司,批号14185)、ELISA试剂盒(上海市博蕴生物科技有限公司)、H₁受体阻断剂pyrilamine(Sigma公司,批号P5514)、丝氨酸蛋白酶抑制剂FUT175(Sigma公司,批号N0289)。

1.2 CP模型与标本处理 雄性SD大鼠18只,按随机分组法分为对照组和CP组,各9只。采用逆行胰胆管注射(2%TNBS、10%乙醇、PBS 0.5 mL)的方法制备CP模型,对照组逆行胰胆管注射PBS 0.5 mL。造模4周后处死大鼠,取胰腺标本放入-80℃冻存备用。其中每例模型所取标本分为2份,一份做组胺、类胰蛋白酶与NGF释放测定,一份孵育上清用于大鼠足底注射观察其周围神经激活作用。

1.3 CP胰腺标本组胺、类胰蛋白酶与NGF释放浓度测定 采用ELISA法测定CP胰腺标本的组胺、类胰蛋白酶和NGF的自发性释放。标本取出后,迅速浸入含2 mL Hank's液(37℃)的离心管中,匀浆处理后去上清,加入1 mL Hank's液后放入95% O₂/5%CO₂培养箱中孵育25 min。其中检测组胺的样本迅速加热至95℃以防其被组织中的组胺酶降解而变性。所有样本经200×g离心10 min后,取孵

育上清150 μ L于-80℃冻存待测。上清取完后,将剩余组织吸干称量。应用ELISA试剂盒分别测定组胺和类胰蛋白酶在孵育上清中的含量,并将结果按标本质量标准化进行单位组织释放定量。

1.4 胰腺孵育上清的致痛作用测定 取18只雄性SD大鼠,随机分为3组,每组6只,将100 μ L生理盐水或等量上述正常对照组上清和CP组上清分别注射至左侧足底。造模前行基线测定,给药后分别测时间点0.5、1、3、5和7 h的机械性痛敏。大鼠机械性痛敏的测定方法同文献^[10]所述,将大鼠置于一组20 cm×20 cm×30 cm的深色有机玻璃盒中,盒底为0.5 cm×0.5 cm的铁丝网。大鼠于安静状态适应30 min后,用不同克数的von Frey细丝垂直作用于大鼠左后足底中部,接触时间2~3 s,观察其缩足时的克数值,间隔5 min重复测定,取4次缩足反应的平均克数记为缩足阈值,作为反映机械痛敏感性的指标。

1.5 药物对CP胰腺孵育上清致痛作用的影响 取24只雄性SD大鼠,随机分为4组,首先行基线测定后行CP胰腺孵育上清足底注射,继而按组别同侧足底皮下分别注射H₁受体阻断剂pyrilamine(40 μ g/mL,100 μ L;Sigma公司)、丝氨酸蛋白酶抑制剂FUT175(50 μ g/mL,100 μ L,Sigma公司)、二者合用(100 μ L)或等量生理盐水,观察注射后1 h药物对炎性机械痛敏的影响。

1.6 统计学处理 实验数据用SPSS 17.0软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,ELISA测定采用Mann-Whitney U检验,行为学测试时间均数比较采用 t 检验。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 CP模型大鼠胰腺局部组胺及类胰蛋白酶释放增加 我们用ELISA试剂盒检测了肥大细胞相关释放及脱颗粒产物的含量变化,结果发现,在对照组和CP组中,组胺含量分别为(115.9 \pm 22.0) ng/(mL·mg)和(270.6 \pm 44.2) ng/(mL·mg),差异有统计学意义($P=0.0106$,图1A);类胰蛋白酶含量分别为(191.9 \pm 21.6) pg/(min·mg)和(320.5 \pm 32.2) pg/(min·mg),差异有统计学意义($P=0.004$,图1B);NGF含量分别为(17.43 \pm 1.41) pg/(min·mg)和(14.83 \pm 1.70) pg/(min·mg),差异无统计学意义($P=0.3401$,图1C)。

2.2 CP胰腺孵育上清对大鼠有直接的痛觉致敏作

用 在给药前及给药后 0.5、1、3、5、7 h 对大鼠足底进行机械痛阈值测定,结果发现生理盐水注射组和正常胰腺上清注射组的机械痛阈值在注射后早期较注射前有所降低但很快恢复(图 2A、2B);CP 胰腺孵

育上清注射组机械痛阈值在注射后较注射前明显降低并持续到注射后 5 h(图 2C),说明 CP 胰腺孵育上清中的炎症介质能直接导致痛觉的发生并维持较长时间。

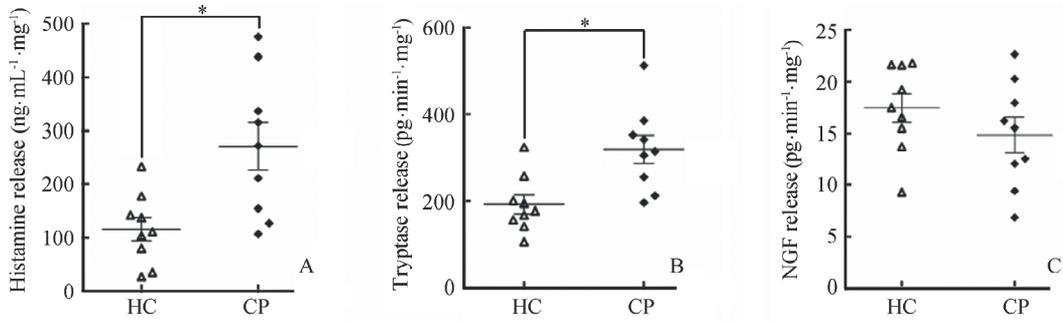


图 1 CP 大鼠胰腺内组胺(A)、类胰蛋白酶(B)和 NGF(C)的 ELISA 测定

Fig 1 ELISA assay of histamine (A), tryptase (B) and NGF (C) in the pancreas of CP rats

HC: Healthy control; CP: Chronic pancreatitis; NGF: Nerve growth factor. * $P < 0.05$; $n = 9$, $\bar{x} \pm s$

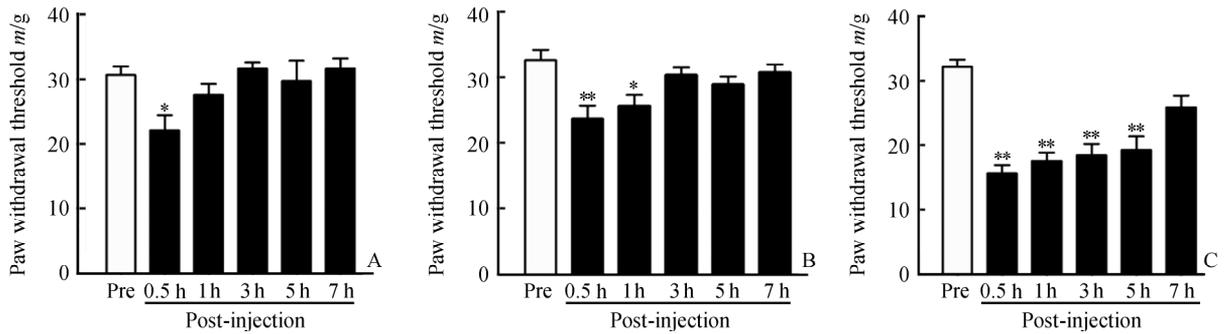


图 2 生理盐水(A)、正常胰腺上清(B)和 CP 上清(C)足底注射后痛阈值变化

Fig 2 Paw withdrawal threshold changes after injection of normal saline (A), HC (B) and CP (C) supernatant into rat hindpaw

HC: Healthy control; CP: Chronic pancreatitis; Pre: Pre-injection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pre; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

2.3 H₁受体阻断剂和蛋白酶抑制剂可部分逆转 CP 胰腺孵育上清的致痛敏作用 对 SD 大鼠行 CP 孵育上清足底注射诱发痛敏后,继而同侧足底皮下分别注射 H₁受体阻断剂 pyrilamine 和(或)丝氨酸蛋白酶抑制剂 FUT175,结果显示:单独应用 H₁受体阻断剂有减轻疼痛的趋势,但与应用生理盐水相比差异无统计学意义[(16.87±1.18) g vs (21.08±0.75) g, $P > 0.05$],单独应用蛋白酶抑制剂有显著抑制痛敏作用 [(16.87±1.18) g vs (26.95±1.19) g, $P < 0.05$],联合应用 H₁受体阻断剂和蛋白酶抑制剂时则能更大程度地抑制痛敏[(16.87±1.18) g vs (29.23±1.44) g, $P < 0.01$,图 3)。提示相对于 H₁受体阻断剂,蛋白酶抑制剂在逆转 CP 胰腺孵育上清的致痛敏作用中发挥更大的作用。

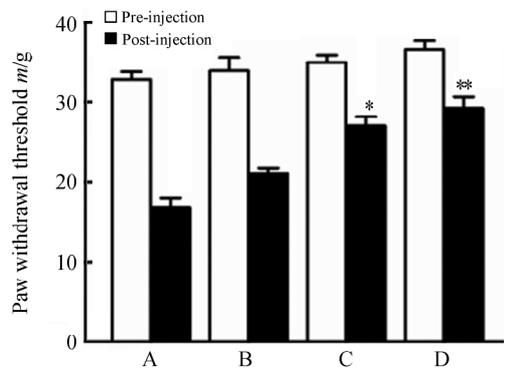


图 3 不同药物处理后对痛敏的抑制作用

Fig 3 Inhibition of paw withdrawal threshold changes by different drug therapies

A: Vehicle; B: Pyrilamine; C: FUT175; D: Pyrilamine + FUT175. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

CP的慢性炎症改变是不可逆的,其病理变化主要包括胰腺腺泡萎缩、破坏和间质纤维化,临床以反复发作的上腹部疼痛和(或)胰腺内外分泌功能不全为主要表现,可伴有实质钙化,胰管扩张、结石及假性囊肿形成等。绝大部分CP患者伴有特殊类型的上腹深部重度疼痛,部分伴有严重的腰背部放射痛。近年来,关于胰腺顽固性疼痛机制的研究越来越集中到胰腺局部微环境的变化上。相继有研究发现人类CP中的神经周围变化,并证明组织局部酸环境、神经激肽受体1、生长相关蛋白43、酪氨酸受体激酶A(TrkA)、脑源性神经营养因子(BDNF)等与CP疼痛的强度或频率相关^[11-14]。有报道了50例CP患者的病理检查结果,并在临床收集了其疼痛严重程度,发现胰腺多伴有不同比例的嗜酸性粒细胞神经周围炎症浸润,并与疼痛的严重程度相关,同时还伴有神经直径的增大^[15]。

CP的疼痛属于慢性内脏痛的一种,近年的很多关于内脏痛的研究发现,局部炎症或肿瘤引起的肥大细胞聚集浸润都和疼痛有关,如Theoharides等^[16]在无细菌性膀胱炎患者中发现,疾病和疼痛都与肥大细胞及其介质相关;在对CP患者的尸检中发现,生前疼痛不明显的患者肥大细胞数目与正常胰腺相近,而疼痛明显的患者则发现肥大细胞的数目显著增多^[4];在肥大细胞缺陷的Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}小鼠CP模型中,胰腺炎引起的疼痛行为学变化明显降低^[4]。肥大细胞常与神经有明显的毗邻关系,肥大细胞释放的介质可能是通过NGF与神经细胞发生持续的信号联系^[17]。此外,还有研究证明,肠易激综合征(IBS)患者中的结肠组织活检标本的组胺和类胰蛋白酶释放水平与患者的疼痛有关^[18]。IBS是临床中最常见的内脏疼痛之一,该结果表明,组胺和类胰蛋白酶可能是外周神经敏化机制中的重要介质。

由于CP患者的早期诊断率不高,且临床中采用手术治疗的病例并不多,因此较难获得合适的手术胰腺标本进行研究。我们采用CP模型大鼠,可以获得CP胰腺孵育上清,进一步可测得其中各种炎症介质或细胞因子的释放。本研究主要检测了肥大细胞特异性脱颗粒产物组胺和类胰蛋白酶水平,发现两者在CP模型大鼠胰腺标本中的含量显著升高;进一步应用离体胰腺标本孵育上清对大鼠足底

进行注射,发现CP模型大鼠胰腺标本孵育上清可明显增加大鼠足底的痛觉过敏,因此我们认为组胺和类胰蛋白酶是介导CP疼痛的关键介质。组胺是引起瘙痒反应最有效的药物,但当有明显痛觉刺激或化学刺激存在时,瘙痒的感觉常常被抑制^[19],此时组胺更主要地在局部酸环境的作用下,增加TRPV1通道的敏感性,进而对痛觉过敏产生作用。本研究中,CP的胰腺中类胰蛋白酶含量比正常对照胰腺的增高,说明胰腺中存在肥大细胞浸润,且处于活化状态。虽然本研究样本量较小,但作为肥大细胞持续性活化的标志,类胰蛋白酶或许可作为胰腺疾病潜在的生物学标志之一。

在慢性盆腔疼痛综合征中关于NGF的研究表明,NGF还直接与疼痛严重程度相关^[20]。而在实验性自身免疫前列腺炎模型研究中发现疾病早期有肥大细胞数目增多,与之相反,NGF在30d之后仍处于较低水平,提示NGF释放发生于肥大细胞激活脱颗粒之后^[9]。NGF通过调节伤害性感受神经元的敏感性调节机体疼痛,并在组织损伤和炎症后的痛觉产生与维持中起到重要作用^[21]。治疗性的NGF抑制可以降低大量内脏痛动物模型的疼痛相关行为学变化^[22]。因此,我们还检测了CP模型大鼠胰腺标本孵育上清中NGF的水平,但发现其增加并不明显。可能的原因一是在标本获得时NGF还未到表达增加的高峰,另一种可能则是在胰腺的慢性炎症趋化下,NGF作用发挥表现在其高亲和力受体TrkA表达的变化上^[22]。

组胺的作用受体包括H₁、H₂、H₃及近年新发现的H₄受体,但认为其主要作用仍作用于H₁^[5]。在间质性膀胱炎的神经营养动物模型研究中,针对于组胺受体的治疗具有减轻疼痛的作用^[23]。但在我们的研究中发现,单独应用H₁受体阻断剂仅有减轻疼痛的趋势,单独应用蛋白酶抑制剂作用较为明显。当联合用药时,蛋白酶抑制剂相对于H₁受体阻断剂发挥更优势的作用。可能的原因还包括CP同时伴有胰蛋白酶等其他蛋白酶抑制剂作用产物增加。

本研究通过CP胰腺标本孵育上清行足底注射,观察到CP微环境变化后所产生的炎症介质对周围神经的直接敏化作用,且H₁阻断剂或蛋白酶抑制剂可部分逆转这一作用。这些发现表明,组胺和类胰蛋白酶在CP周围神经敏化的发生和维持中起着重要作用。本研究的局限在于实验中足底注射直接反映躯体疼痛而非上清对内脏神经的作用,且治疗药

物的作用仅限于足底局部,全身用药对 CP 疼痛的治疗效果尚不明确。由于组胺和类胰蛋白酶都是肥大细胞特异性的释放产物,因此抗肥大细胞治疗或肥大细胞稳定剂的临床应用是我们进一步的研究方向。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 王洛伟,李兆申,李淑德,陈 浮. 慢性胰腺炎全国多中心流行病学调查[J]. 胰腺病学,2007,7:1-5.
- [2] Lieb J G 2nd, Forsmark C E. Review article: pain and chronic pancreatitis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2009,29:706-719.
- [3] Fasanella K E, Davis B, Lyons J, Chen Z, Lee K K, Slivka A, et al. Pain in chronic pancreatitis and pancreatic cancer [J]. Gastroenterol Clin North Am, 2007,36:335-364, ix.
- [4] Hoogerwerf W A, Gondesens K, Xiao S Y, Winston J H, Willis W D, Pasricha P J. The role of mast cells in the pathogenesis of pain in chronic pancreatitis [J]. BMC Gastroenterol, 2005,5:8.
- [5] Lieberman P. The basics of histamine biology[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 2011,106(2 Suppl):S2-S5.
- [6] Alam R, Forsythe P A, Stafford S, Lett-Brown M A, Grant J A. Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells[J]. J Exp Med, 1992, 176:781-786.
- [7] Donadio A C, Depiante-Depaoli M. Inflammatory cells and MHC class II antigens expression in prostate during time-course experimental autoimmune prostatitis development [J]. Clin Immunol Immunopathol, 1997,85:158-165.
- [8] Rudick C N, Schaeffer A J, Thumbikat P. Experimental autoimmune prostatitis induces chronic pelvic pain[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294: R1268-R1275.
- [9] Done J D, Rudick C N, Quick M L, Schaeffer A J, Thumbikat P. Role of mast cells in male chronic pelvic pain[J]. J Urol, 2012, 187:1473-1482.
- [10] Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson S N. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors[J]. J Neurosci, 2006, 26:1281-1292.
- [11] Shrikhande S V, Friess H, di Mola F F, Tempia-Caliera A, Conejo Garcia J R, Zhu Z, et al. NK-1 receptor gene expression is related to pain in chronic pancreatitis[J]. Pain, 2001, 91:209-217.
- [12] Di Sebastiano P, Fink T, Weihe E, Friess H, Innocenti P, Berger H G, et al. Immune cell infiltration and growth-associated protein 43 expression correlate with pain in chronic pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1997, 112:1648-1655.
- [13] Friess H, Zhu Z W, di Mola F F, Kulli C, Graber H U, Andren-Sandberg A, et al. Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis [J]. Ann Surg, 1999, 230:615-624.
- [14] Zhu Z W, Friess H, Wang L, Zimmermann A, Büchler M W. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is up-regulated and associated with pain in chronic pancreatitis [J]. Dig Dis Sci, 2001, 46:1633-1639.
- [15] Keith R G, Keshavjee S H, Kerenyi N R. Neuropathology of chronic pancreatitis in humans [J]. Can J Surg, 1985, 28:207-211.
- [16] Theoharides T C, Flaris N, Cronin C T, Ucci A, Meares E. Mast cell activation in sterile bladder and prostate inflammation [J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990, 92:281-286.
- [17] Bienenstock J, Tomioka M, Matsuda H, Stead R H, Quinonez G, Simon G T, et al. The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions [J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987, 82(3-4):238-243.
- [18] Barbara G, Wang B, Stanghellini V, de Giorgio R, Cremon C, Di Nardo G, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome [J]. Gastroenterology, 2007, 132:26-37.
- [19] Shim W S, Oh U. Histamine-induced itch and its relationship with pain [J]. Mol Pain, 2008, 4:29.
- [20] Watanabe T, Inoue M, Sasaki K, Araki M, Uehara S, Monden K, et al. Nerve growth factor level in the prostatic fluid of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome is correlated with symptom severity and response to treatment [J]. BJU Int, 2011, 108:248-251.
- [21] Hefti F F, Rosenthal A, Walicke P A, Wyatt S, Vergara G, Shelton D L, et al. Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF [J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27:85-91.
- [22] Jaggar S I, Scott H C, Rice A S. Inflammation of the rat urinary bladder is associated with a referred thermal hyperalgesia which is nerve growth factor dependent [J]. Br J Anaesth, 1999, 83:442-448.
- [23] Rudick C N, Schaeffer A J, Klumpp D J. Pharmacologic attenuation of pelvic pain in a murine model of interstitial cystitis [J]. BMC Urol, 2009, 9:16.