

髓过氧化物酶在重症急性胰腺炎相关性腹腔积液致急性肺损伤中的表达及意义

赫 曼 刘永永 曹 农 柴 琛 王斌生 俞永江

摘 要 **目的** 探讨髓过氧化物酶在重症急性胰腺炎相关性腹腔积液致急性肺损伤中的表达及意义。**方法** 成年 wistar 大鼠 45 只,随机分为 3 组:①阴性对照组(C 组):开腹后仅翻动胰腺组织;②重症急性胰腺炎组(S 组):3.5% 牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射制造重症急性胰腺炎模型;③腹腔注射组(E 组):取 S 组大鼠胰腺匀浆及腹腔积液,于正常大鼠腹腔内注射。于造模后 3h、6h、12h 分批处死大鼠,采下腔静脉血 2ml 行淀粉酶测定;取左肺下叶组织行 MPO 检测;胰腺及肺组织进行病理评分。**结果** S 组及 E 组肺泡间质水肿、出血,并有中性粒细胞、巨噬细胞浸润。在不同时相,S 组和 E 组血清胰淀粉酶、肺髓过氧化物酶均高于 C 组($P < 0.01$),E 组升高的程度小于 S 组。**结论** 重症急性胰腺炎相关性腹腔积液可以导致急性肺损伤,肺组织中髓过氧化物酶表达升高,提示其参与了急性肺损伤的发生过程,其原因可能与相关性腹腔积液激活了粒细胞有关。

关键词 髓过氧化物酶 重症急性胰腺炎相关性腹腔积液 急性肺损伤

The Expression and Significance of Myeloperoxidase in Acute Lungs Injury of Severe Acute Pancreatitis Associated Ascetic Fluid. He Man, Liu Yongyong, Cao Nong, Chai Chen, Wang Binsheng, Yu Yongjiang. The Department of Anesthesiology, Gansu People's Hospital, Gansu 730000, China

Abstract **Objective** To investigate the expression and significance of myeloperoxidase (MPO) in acute lungs injury of severe acute pancreatitis associated ascetic fluid. **Methods** Forty – five adult wistar rats were randomly assigned into the group of negative control (group C, $n = 15$), the group of severe acute pancreatitis (group S, $n = 15$) and the group of peritoneal injection (group E, $n = 15$). The group C was cut peritoneum and flipped pancreases softly. In group S, 3.5% sodium taurocholate was injected retrograde in pancreatic and bile duct to establish the model of severe acute pancreatitis, and the pancreatic homogenate and ascites of the group S was injected into abdominal cavity of group E rats. After animal model established, rats were killed at 3h, 6h and 12h point. The blood of inferior vena cava was sucked for determination of amylase. The inferior lobe of left lung was cut for myeloperoxidase detection. And pathology was regularly done about pancreas and lungs. **Results** Interstitial edema, hemorrhage and infiltration of neutrophilic granulocyte and macrophage were observed in group S and E. At different time point, the amylase levels of blood and myeloperoxidase of lungs in group S and E were significantly higher than those of group C, and the increasing degree of group E was smaller than group S. **Conclusion** Acute lung injury can be induced by the severe acute pancreatitis associated ascetic fluid. The expression of myeloperoxidase of lungs was increased to induce acute lungs injury. The reason may be concerned with activation of granulocyte by severe acute pancreatitis associated ascetic fluid.

Key words Myeloperoxidase; Severe acute pancreatitis associated ascetic fluid; Acute lungs injury

急性肺损伤是重症急性胰腺炎(SAP)时胰外最常见的并发症,常常进展为呼吸窘迫综合征(ARDS),是急性胰腺炎患者早期死亡的主要原因。目前该损伤的分子生物学机制仍不清楚。髓过氧化物酶(MPO)是中性粒细胞的功能标志和激活标志,

其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞的功能和活性状态^[1],而肺泡粒细胞活化可能是急性胰腺炎肺损伤的重要原因^[2]。

材料与方法

1. 实验动物分组:成年 wistar 大鼠 45 只,体重 250 ~ 300g,清洁级,将其随机分为阴性对照组、重症急性胰腺炎组、腹腔注射组,每组 15 只,雌雄不限。

2. 主要实验试剂与仪器:牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司),髓过氧化物酶试剂盒(南京建成生物工程公司),Bio – Rod Model 550 酶标仪(美国伯乐公司)。

3. 方法:(1)模型复制:①阴性对照组(C 组):开腹后仅翻动胰腺组织;②重症急性胰腺炎组(S 组):3.5% 牛磺胆酸钠

基金项目:甘肃省科技攻关计划(0709TCYA057)

作者单位:730000 兰州,甘肃省人民医院麻醉科(赫曼);兰州大学第二医院普外科(刘永永);兰州大学第一医院普外科(曹农、柴琛、王斌生、俞永江)

通讯作者:柴琛,电子信箱:chasechai@gmail.com

胰胆管逆行注射制造 SAP 模型;③腹腔注射组(E组):取 SAP 模型大鼠胰腺组织匀浆及腹腔积液,于正常大鼠腹腔内注射。(2)标本采集:于造模后 3h、6h、12h 分批处死大鼠,取左肺下叶组织放置于 -80°C 冰箱保存,待做 MPO 检测。胰腺及肺组织行病理检查。采下腔静脉血 2ml 行淀粉酶测定。(3)血清淀粉酶的测定:所取下腔静脉血用全自动生化分析仪检测淀粉酶含量。(4)肺组织髓过氧化物酶(MPO)测定:肺组织在玻璃匀浆器中匀浆,MPO 活性测定按试剂盒说明进行。标本混匀后, 60°C 水浴 10min,在 460nm 处采用全自动酶标仪测定各管 OD 值。

4. 统计学处理:计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 15.0 统计包进行统计学分析,采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结 果

1. 各组动物病死率和造模成功率:C 组大鼠无死亡;S 组死亡 1 例(6.7%),按 Schmidt 评分标准^[3],SAP13 例(86.7%),符合肺损伤评分标准 12 例^[4](80.0%);E 组大鼠无死亡,SAP 5 例(33.3%),肺损伤 11 例(73.3%)。S 组大鼠胰腺在镜下表现为灶性出血、坏死,E 组表现为充血、水肿,罕见出血;S 组及 E 组肺泡间质水肿、出血,并有中性粒细胞、巨噬细胞浸润(封三彩图 4、彩图 5)。

2. 血清淀粉酶的变化:在不同的时间点,S 组和 E 组血清淀粉酶均高于 C 组(表 1)。

表 1 各组血清淀粉酶变化(U/L)

组别	3h	6h	12h
C 组	1550.2 $\pm$ 145.5	1625.5 $\pm$ 135.2	1520.4 $\pm$ 160.5
S 组	9962.7 $\pm$ 856.3 *	13658.8 $\pm$ 756.5 *	20564.6 $\pm$ 842.6 *
E 组	4231.3 $\pm$ 329.3 **	5537.7 $\pm$ 124.8 **	5879.3 $\pm$ 284.6 **

* S 组与 C 组比较, $P < 0.01$; ** E 组与 C 组比较, $P < 0.01$

3. 肺组织 MPO 表达水平:在不同时间点,S 组及 E 组大鼠肺组织 MPO 活性较 C 组相比均有明显升高(表 2)。

表 2 肺组织 MPO 表达水平变化(U/g)

组别	3h	6h	12h
C 组	1.2 $\pm$ 0.42	1.6 $\pm$ 0.21	1.3 $\pm$ 0.41
S 组	4.32 $\pm$ 0.43 *	8.6 $\pm$ 0.54 *	14.5 $\pm$ 1.22 *
E 组	5.8 $\pm$ 0.56 **	8.3 $\pm$ 0.75 **	13.1 $\pm$ 0.55 **

S 组与 C 组比较, $P < 0.01$; ** E 组与 C 组比较, $P < 0.01$

讨 论

SAP 时常伴有含大量胰酶和细胞因子的血性腹腔积液,经腹膜吸收后发生一系列反应,导致急性肺

损伤及 ARDS。以往的研究主要集中在胰腺炎时机体综合病变所引起的肺部损害^[5,6],本文旨在探讨 SAP 相关性腹腔积液在肺损伤中的作用机制。

1. 胰腺炎相关性腹腔积液(PAAF)诱导肺损伤模型的建立:PAAF 经腹膜吸收后可以诱发全身多脏器损害^[7]。因此,以 PAAF 腹腔注射诱发肺脏病变,建立由 PAAF 诱导的肺脏损害模型可以为进一步研究重症急性胰腺炎相关性肺损伤或 ARDS 的病理生理和防治对策提供较为理想的实验手段。本实验中,重症急性胰腺炎组胰腺组织存在不同程度的间质水肿、炎性细胞浸润、胰腺组织灶性或片状出血坏死及皂化斑的形成,伴有血性腹腔积液,呈典型的 SAP 病理改变^[8],表明大鼠 SAP 诱导成功。腹腔注射组胰腺病变程度轻微,仅有部分腺体组织水肿,少量炎性细胞浸润;其血清淀粉酶水平低于重症急性胰腺炎组。表明由 PAAF 诱发的胰腺病变程度较轻,这样就部分屏蔽了 SAP 时胰腺本身的坏死性病变经门静脉至肝脏继而对肺脏的影响,突出了腹膜在胰腺炎肺损伤中的作用,从而为研究 PAAF 诱发的肺脏损伤提供了较为单纯的研究背景;也为进一步研究腹腔灌洗治疗 SAP 的作用机制提供了理论基础。本研究发现,大鼠腹腔注射 PAAF 后,肺脏表现为间质充血、肺泡间隔增宽,部分肺泡融合或萎缩,肺间质中大量中性粒细胞浸润,部分小支气管上皮细胞脱落,可见微血栓。其病理改变与相关报道一致,可见重症急性胰腺炎相关性腹腔积液可以诱发肺损伤^[9]。

2. 重症急性胰腺炎相关性肺损伤(APALI)发生机制:(1)胰酶在 APALI 中的作用:胰腺炎触发的炎症反应综合征迅速地表现为全身反应,胰酶和各种炎性介质进入血液和腹腔积液中。本研究发现:大鼠腹腔注射 PAAF 后诱发了胰腺炎和肺损伤,大鼠血清胰淀粉酶升高。因此,含有大量胰淀粉酶的 PAAF 通过腹膜吸收是造成肺损伤的原因之一。有证据表明弹力蛋白酶或胰蛋白酶的升高与肺损伤过程中 NF- κ B 的激活以及随后的 TNF- α 基因的表达有关^[10]。磷脂酶 A₂ 通过诱导花生四烯酸、血栓素、细胞分裂素和血小板激活因子的释放而导致肺损伤^[11]。一些动物实验中^[12,13]通过静脉注射胰蛋白酶和(或)磷脂酶 A₂ 也成功复制出了 APALI 模型。Norman 等^[14]发现将巨噬细胞暴露于胰蛋白酶后,细胞表面的 TNF- α 和 IL-1 β 表达增加;将含胰蛋白酶的腹腔积液注射大鼠体内后,血浆 TNF- α 显著增高,从而推断胰蛋白酶对相应靶器官的损伤作用是通过刺激巨噬细胞

产生细胞因子发挥作用。

Andersson 等^[15]应用磷脂酶 A₂ 的阻滞剂可改善大鼠 APALI, 但胰腺本身的炎症程度未能改善。因此, SAP 时释放的各种胰酶直接或间接地参与了肺损伤的发生过程。(2) 髓过氧化物酶在 APALI 中的作用: 髓过氧化物酶 (MPO) 是一种重要的含铁溶酶体, 存在于髓系细胞 (主要是中性粒细胞和单核细胞) 的嗜苯胺蓝颗粒中, 是髓细胞的特异性标志。MPO 是由中性粒细胞、单核细胞和某些组织的巨噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶, 是血红素过氧化物酶超家族成员之一^[16]。MPO 在骨髓内合成并贮存于嗜天青颗粒内^[17], 外界刺激可导致中性粒细胞聚集释放 MPO。MPO 的相对分子质量为 150×10^3 , 是由 2 个亚单位聚合而成的二聚体, 每个亚单位又由一条重链 (α 链, 相对分子质量约 60×10^3) 和一条轻链 (β 链, 相对分子质量约 15×10^3) 所构成。MPO 以 3 种亚形存在于髓系细胞中, 分别为 MPO I、II、III 3 种亚型在功能上的差异还不明确^[18], 有待进一步研究。

MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志, 其水平及活性变化代表着嗜中性多形核白细胞 (PMN) 的功能和活性状态^[1]。MPO 的主要功能是在吞噬细胞内杀灭微生物, 利用过氧化氢和氯离子产生次氯酸盐, 并形成具有氧化能力的自由基^[19]。但是在特定条件下, MPO 催化反应生成过量的氧化剂超过局部抗氧化剂的防御反应时, 就会导致氧化应激和氧化性组织损伤。MPO 还参与调节炎症反应的许多过程, MPO 缺陷的中性粒细胞因过量的注入炎症部位而发生氧化反应, 大量的超氧化物和氧化物形成, 造成炎症部位组织细胞损伤。

本研究结果显示: 随着 SAP 的发生, 肺组织 MPO 活性逐渐升高, 提示中性粒细胞趋附浸润, 肺损伤逐渐加重。中性粒细胞在肺循环内聚集、黏附及激活, 继而产生活化氧及弹力蛋白酶直接损伤肺组织。Yu 等^[20]研究了蛙皮素和脂多糖双重诱导的急性坏死性胰腺炎模型白细胞和细胞因子的动态变化, 发现急性胰腺炎诱发后, 循环内骤增的白细胞和细胞因子进入肺组织造成肺部损伤。Bhatia 等^[21]在蛙皮素诱导急性胰腺炎前后应用趋化因子抗体后发现, 胰腺及肺脏的髓过氧化物酶活性显著下降, 胰腺和肺的微循环也得到了改善, 趋化因子抗体抑制了中性粒细胞趋化作用对 APALI 起保护作用。Werner 等^[22]通过闪烁扫描法测定白细胞上的糖类类似物分解产物, 表明白细胞代谢功能激活导致了 APALI。因此, 循环中激活的中性

粒细胞是引起不同形式肺损伤的中心环节。

综上所述, 重症急性胰腺炎相关性腹腔积液经腹膜吸收后可以导致肺损伤, 髓过氧化物酶表达升高, 提示其参与了急性肺损伤的发生过程, 其原因可能与相关性腹腔积液激活了粒细胞有关。同时我们还发现: 重症急性胰腺炎肺组织髓过氧化物酶活性改变与 TNF- α 、IL-1 β 及 NF- κ B 表达升高呈正相关, 我们将另文报道。

参考文献

- Mori T, Town T, Tan J, *et al.* Modulation of astrocytic activation by arundic acid (ONO22506) mitigates detrimental effect soft heapolipoprotein E4 isoform after permanent focal ischemia in apolipoprotein E knock in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25 (6): 748 - 762
- 程石, 何三光. 肺泡巨噬细胞活化在急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用. *中华外科杂志*, 2002; 40(8): 609 - 612
- Schmidt J, Rattner DW, Lewandowski K, *et al.* A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg*, 1992, 215 (1): 44 - 56
- Derks CM, Jacobovitz - Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol*, 1977, 87 (1): 143 - 158
- Chen YP, Ning JW, Ji F. Establishment of the critical period of severe acute pancreatitis - associated lung injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(5): 535 - 540
- 李顺乐, 陈熹, 吴涛, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG - 132 在大鼠重症急性胰腺炎及其肺损伤中的保护作用. *南方医科大学学报*, 2007, 27(12): 1845 - 1847
- 程若川. 胰腺炎相关性腹水诱导大鼠肺损伤的实验研究. *肝胆胰外科杂志*, 2005, 17(4): 282 - 285
- Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, *et al.* Management of necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(4): 476 - 481
- 闻庆平, 陈海龙, 关凤林, 等. 大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的实验研究. *中华急诊医学杂志*, 2003, 12(10): 673 - 676
- Jaffray C, Yang J, Carter B, *et al.* Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor κ B and inhibitory B, mimicking pancreatitis - associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery*, 2000, 128 (2): 225 - 231
- Closa D, Bardají M, Hotter G, *et al.* Hepatic involvement in pancreatitis - induced lung damage. *Am J Physiol*, 1996, 270 (1): G6 - G13
- Wilson C, Imrie CW. Changing patterns of incidence and mortality from acute pancreatitis in Scotland, 1961 - 1985. *Br J Surg*, 1990, 77 (7): 731 - 734
- Sandler RS, Everhart JE, Donowitz M, *et al.* The burden of selected digestive diseases in the United States. *Gastroenterology*, 2002, 122 (5): 1500 - 1511
- Norman JG, Fink GW, Fran ZMG. Acute pancreatitis induces intrapancreatic tumor necrosis factor gene expression. *Arch Surg*, 1995, 130 (9): 996 - 970

- 15 Andersson R, Deng XM, Wang XD. The role of macrophage overactivation in the development of acute pancreatic injury in rats. *Br J Surg*, 1997, 84 (6) : 775 - 780
- 16 O'Brien PJ. Peroxidases. *Chem Biol Interact*, 2000, 129 (1) : 113 - 139
- 17 Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, *et al.* A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem*, 2002, 277 (41) : 38517 - 38523
- 18 李惠. 髓过氧化物酶及其多态性与冠状动脉疾病的研究进展. *中国心血管病研究杂志*, 2007, 5 (1) : 70 - 72
- 19 Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*, 1991, 10 (3) : 201 - 209
- 20 Yu K, Masahiko H, Akihiro O, *et al.* Dynamic aspects of granulocyte activation in rat severe acute pancreatitis. *Pancreas*, 2003, 27 (2) : 127 - 132
- 21 Bhatia M, Brady M, Zagorski J, *et al.* Treatment with neutralising anti - body against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut*, 2000, 47 (6) : 838 - 844
- 22 Werner H, Edward AC, Ramon EJ, *et al.* Neutrophil metabolic activity but not neutrophil sequestration reflects the development of pancreatitis associated lung injury. *Crit Care Med*, 2002, 30 (9) : 2075 - 2082

(收稿:2010-01-07)

(修回:2010-03-12)

雷公藤甲素对大鼠垂体促肾上腺皮质激素含量的影响

张 武 朱建华 关 伟

摘 要 **目的** 了解较长期使用雷公藤甲素对正常大鼠血浆促肾上腺皮质激素 (ACTH) 含量的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 20 只随机分为 2 组,连续灌胃 7 周,其中空白对照组 10 只;2% 丙二醇 2ml/kg, bid; 雷公藤甲素组 10 只;2% 丙二醇雷公藤甲素混溶液 20 μ g/kg, bid。用放射免疫分析法检测两组大鼠血浆促肾上腺皮质激素 (ACTH) 含量,用免疫细胞化学染色法观察 ACTH 在两组大鼠垂体中的表达。**结果** 雷公藤甲素组血浆 ACTH 含量与空白对照组有显著差异;ACTH 在雷公藤甲素组大鼠垂体中的表达高于空白对照组。**结论** 雷公藤甲素对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴 (HPAA) 可能作用机制之一是兴奋垂体 ACTH 神经细胞,使垂体分泌、释放 ACTH 增加。

关键词 雷公藤甲素 大鼠 血浆促肾上腺皮质激素

Effect of Triptolide on Content of Adreno - Corticotrophic Hormone in Pituitary of Rats. Zhang Wu, Zhu Jianhua, Guan Wei. *Department of Forensic, Wannan Medical College, Anhui 241002, China*

Abstract Objective To Study the effect of long - term triptolide use on the content of the normal rat plasma ACTH. **Methods** 20 male SD rats were divided into 2 groups randomly, and gavaged for 7 weeks. The control group was 10 with 2% propylene glycol 2ml/kg, bid; the group of Triptolide was 10 with 2% the mixture of propylene glycol and Triptolide 20 μ g/kg, bid. We used radioimmunoassay to detect the content of ACTH in rat's plasma and immunocytochemistry to detect the expression of ACTH in pituitary. **Results** The content of ACTH in the group of the Triptolide had significant difference as compared with control group. The expression of ACTH in the group of the Triptolide was higher than that of control group. **Conclusion** These results suggested that one of the possible mechanism of the Triptolide in the HPAA might be exciting pituitary ACTH neurons, thus causing the content of ACTH increasing.

Key words Triptolide; Rat; ACTH

为进一步从单体水平了解雷公藤对下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的影响,本研究采用放射免疫分析法和免疫细胞化学染色法检测较长期使用雷公藤甲素后正常大鼠血浆促肾上腺皮质激素 (ACTH) 含量,从形

态和功能两方面观察雷公藤甲素对正常大鼠垂体的影响,现报告如下。

材料与方法

1. 实验材料:(1)实验动物:清洁级雄性 Sprague - Dawley (SD) 大鼠 20 只,体重 160 ~ 180g,由浙江省实验动物中心提供,许可证号:SCXK (浙) 2003 - 0001。(2)主要试剂及其来源:雷公藤甲素 (雷公藤内酯醇, Triptolide, 纯度 99.3%) ;购自北京美迪克斯生物技术有限公司;促肾上腺皮质激素 (ACTH) 放射免疫检测试剂盒:购自北京北方生物技术研究所;兔抗人

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目 (2006KJ413B)

作者单位:241002 芜湖,皖南医学院法医学专业

通讯作者:张惠云,电子信箱:zhhuiyun@163.com