

LXA₄ 对 ANP 诱发 SIRS 过程中 NF- κ B、ICAM-1 表达的影响

孙洪伟 汪茂名 张 涛 陈必成 施红旗 周蒙滔 张启瑜

摘 要 **目的** 探讨脂氧素 A₄ 抑制急性坏死性胰腺炎诱发 SIRS 的机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 72 只随机分为假手术组、ANP 组和脂氧素 A₄ (LXA₄) 干预组,分别采用等量生理盐水、LXA₄ (0.1 mg/kg) 间隔 8h 经阴茎背静脉注射,并分别于 4、12、24h 每组活杀 8 只大鼠,测定胰腺组织 Schmidt 病理评分、NF- κ B、ICAM-1 的表达水平。**结果** (1) 与假手术组比较,胰腺炎组、LXA₄ 干预组的 Schmidt 胰腺病理评分有显著升高 ($P < 0.01$); LXA₄ 干预组 Schmidt 胰腺病理评分在 12、24h 较胰腺炎组低 ($P < 0.05$)。 (2) 假手术组 ICAM-1 表达阴性,胰腺炎组、LXA₄ 干预组随着病变进展,其反映 ICAM-1 表达相对强度的累积光密度值 (IOD) 逐渐上升 ($P < 0.01$); 在 4、12、24h 等 3 个时段, LXA₄ 干预组的 IOD 值较比 SAP 组均有显著下降 ($P < 0.01$)。 (3) 假手术组 NF- κ B P65 蛋白阴性; ANP 组 NF- κ B 胞核阳性表达率为 59.1% (13/22), 显著高于 LXA₄ 干预组的 4.3% (1/23), 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** (1) LXA₄ 在 ANP 诱发 SIRS 过程中确能抑制 ICAM-1 的表达。 (2) LXA₄ 抑制 ANP 诱发 SIRS 可能是通过抑制 NF- κ B 的细胞信号传导途径来实现的。

关键词 胰腺炎 脂氧素 A₄ NF- κ B ICAM-1

Effect of LXA₄ on the Expression of NF- κ B and ICAM-1 in the Process of SIRS Induced by ANP. Sun Hongwei, Wang Maoming, Zhang Tao, Chen Bicheng, Shi Hongqi, Zhou Mengtao, Zhang Qiyu. Department of Hepatobiliary & Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To study the mechanism of LXA₄ to inhibit the SIRS induced by ANP in rats. **Methods** Seventy-two healthy SD rats were randomly divided into three groups: sham group, SAP group and LXA₄ group. Equal amount of physiological saline and LXA₄ (0.1 mg/kg) were injected via the dorsal penis vein separately. Each group was divided into 3 small subgroups according to the time point 4, 12, 24 hours after the operation. Then the level of ICAM-1 and NF- κ B in pancreatic tissues were measured by immunohistochemistry (IHC), pancreas pathologic grade were also determined. **Results** (1) Among the three groups, levels of pathologic score of the SAP group and LXA₄ group showed increase significantly comparing with those of the sham group ($P < 0.01$); On the time points of 12h and 24h, levels of pathologic score in LXA₄ group decreased significantly comparing with SAP group ($P < 0.05$). (2) The expression of ICAM-1 in sham group was negative. Along with the progress of pathological changes, the IOD that reflect the relative intensity of ICAM-1 in SAP group and LXA₄ group rise gradually ($P < 0.01$); On the three time points, levels of IOD in LXA₄ group decreased significantly comparing with SAP group ($P < 0.01$). (3) The expression of NF- κ B P65 in sham group was negative. Nuclear positive rate of NF- κ B P65 in SAP group was 59.1% (13/22). It was apparently higher than that in LXA₄ group which was 4.3% (1/23). **Conclusion** (1) LXA₄ can really decrease the levels of ICAM-1 in pancreatic tissues in the process of SIRS induced by ANP. (2) The mechanism of LXA₄ to inhibit the SIRS induced by ANP in rats may be related to NF- κ B.

Key words Pancreatitis; Lipoxins A₄ (LXA₄); Nuclear factor- κ B (NF- κ B); Interceller adhesion molecular-1 (ICAM-1)

脂氧素 (lipoxin, LX) 是继前列腺素和白三烯后被证实的又一重要花生四烯酸代谢产物,能促进炎症反应的及时消退,并被誉为炎症反应的“刹车信号”

或“停止信号”^[1]。我们的体外试验曾证实脂氧素 A₄ 能抑制中性粒细胞的激活以及促炎细胞因子的释放; 动物实验亦证实能抑制急性坏死性胰腺炎 (acute necrotizing pancreatitis, ANP) 大鼠促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 的产生,抑制全身炎症反应综合征 (SIRS),并对 ANP 具有治疗作用。为进一步探讨 LX 抑制 ANP 诱发 SIRS 的机制而做此研究,现将 NF- κ B、ICAM-1 在抑制 ANP 诱发 SIRS 的研究结果报告

基金项目:国家自然科学基金面上项目 (81070372); 浙江省自然科学基金资助项目 (Z2100853), 温州市科技局课题 (H20090078, Y20100228)

作者单位: 325000 温州医学院附属第一医院肝胆胰外科

通讯作者: 周蒙滔, 电子信箱: zmt0417@hotmail.com

如下。

材料与方法

1. 实验对象及主要材料:健康雄性清洁级 SD 大鼠 72 只, 体重 $190 \pm 20\text{g}$, 由温州医学院实验动物中心提供;牛磺胆酸钠 (Sigma 公司);LXA₄ (美国 Cayman 公司);NF- κ B P65 蛋白一抗 (碧云天生物技术研究);ICAM-1 一抗 (Santa Cruz 公司);二步法免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。

2. 实验分组:72 只清洁级 SD 大鼠随机分成 3 组, 每组 24 只:①LXA₄ 干预组:ANP 模型建立后 10min, 经阴茎背静脉注射 LXA₄, 量按 0.1mg/kg 计, 此后间隔 8h 注射 1 次;②ANP 组:ANP 模型建立后 10min, 经阴茎背静脉注射等量生理盐水, 余同①;③假手术组:仅于剖腹后将针头插入胰管, 但不注射牛磺胆酸钠溶液, 余同②。

3. ANP 模型建立方法:按 Aho 法^[2]建立 ANP 大鼠模型, 牛磺胆酸钠量按 $0.1\text{ml}/100\text{g}$ 体重计, 由恒速泵以 $0.1\text{ml}/\text{min}$ 的速度进行胰管逆行注射, 实验的全过程均在 SPF 级实验室内完成。

4. 标本收集及指标检测:每组分别于术后 4、12、24h 三个时点各随机活杀 8 只大鼠, 收集胰腺组织标本。检测如下指标:①胰腺组织病理学检查及 Schmidt 胰腺病理评分:大鼠死后取出胰腺组织, 常规 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, $5\mu\text{m}$ 连续切片, HE 染色后观察。根据 Schmidt 胰腺病理评分标准^[3]进行病理学评分;②NF- κ B 测定:免疫组织化学染色了解胰腺组织 NF- κ B P65 蛋白的表达, 染色后显色 (棕色) 深于背景色为阳性。并计算 NF- κ B 染色阳性率及胞核染色阳性率;③炎性细胞黏附分子 (ICAM-1) 测定:免疫组织化学染色了解胰腺组织 ICAM-1 的表达, 结果用 SPOT 及 IPP 图像采集分析系统处理, 40×10 视野下观察采集图像, Image-Pro Plus6.0 版专业图像分析软件处理结果, 以累积光密度值 (IOD) 表示 ICAM-1 表达的相对强度。

5. 统计学方法:实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS 11.5 软件分析, 计量资料采用多组比较方差齐时采用方差分析, 方差不齐时采用秩和检验;各组之间两两比较, 方差齐时采用 SNK- q 检验, 方差不齐时采用 Nemenyi 检验;计数资料采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

结 果

本实验 72 只实验大鼠死亡 3 只, 死亡原因考虑为过度炎症反应和多器官功能障碍。

1. 病理学检查结果:①假手术组:肉眼见胰腺淡粉红色, 颜色均匀一致、光度好, 无水肿, 腹腔无腹腔积液;光镜下胰腺结构正常, 偶见炎性细胞浸润;②胰腺炎组:肉眼见腹腔内粘连, 血性腹腔积液, 胰腺灰暗, 散在斑片状坏死, 网膜组织见皂化斑;光镜下腺泡空泡变, 腺泡间、小叶间组织水肿, 炎性细胞浸润, 胰腺组织出血、坏死。随着时间推移, Schmidt 胰腺病理

评分显著加重 ($P < 0.01$), 符合 ANP 病理改变;③LXA₄ 干预组:4h 组肉眼及镜下与胰腺炎组变化基本一致, 12、24h 点胰腺炎症较胰腺炎组明显好转。4、12、24h 胰腺炎组和 LXA₄ 干预组 Schmidt 胰腺病理评分均较假手术组高 ($P < 0.01$);12、24hLXA₄ 干预组较 SAP 组低 ($P < 0.05$)。3 组不同时点 Schmidt 胰腺病理评分具体情况如表 1 所示。

表 1 3 组不同时点 Schmidt 胰腺病理评分结果比较

组别	4h	12h	24h
假手术组	$0.31 \pm 0.26^{\#}$	$0.38 \pm 0.23^{\#}$	$0.44 \pm 0.18^{\#}$
胰腺炎组	$3.13 \pm 0.64^{*\square}$	$4.56 \pm 0.50^{*\star}$	$6.25 \pm 0.76^{*\star\square}$
LXA ₄ 干预组	$2.63 \pm 0.52^{*}$	$3.06 \pm 0.62^{*}\#\#$	$3.93 \pm 0.53^{*}\#\#\square$

与同一时点假手术组的数值相比, $^{\#}P < 0.01$;与同一时点胰腺炎组的数值相比, $^{\#}P < 0.01$, $^{\#\#}P < 0.05$;与同一实验组 4h 时点的数值比较, $^{\star}P < 0.01$;与同一实验组 12h 时点的数值比较, $\square P < 0.01$, $\square\square P < 0.05$

2. 胰腺组织中 ICAM-1 的表达量:假手术组胰腺血管内皮细胞表面均无染色, ICAM-1 的表达为阴性;SAP 组, 术后 4h 部分胰腺血管内皮细胞表面有淡黄色颗粒, ICAM-1 的表达为弱阳性;术后 12h, 胰腺血管内皮细胞表面有棕黄色或深棕黄色颗粒, ICAM-1 的表达为阳性;至术后 24h, 胰腺血管内皮细胞表面有深棕黄色颗粒, ICAM-1 的表达为强阳性 (图 1)。经方差分析, IOD 值随时间推移逐渐上升 ($P < 0.01$) (表 2)。LXA₄ 干预组, 胰腺组织 ICAM-1 表达的分布与 SAP 组基本一致, IOD 值随时间推移逐渐上升 ($P < 0.01$), 但在不同时点, 其 IOD 值较 SAP 组明显降低 ($P < 0.01$) (图 2、表 2)。

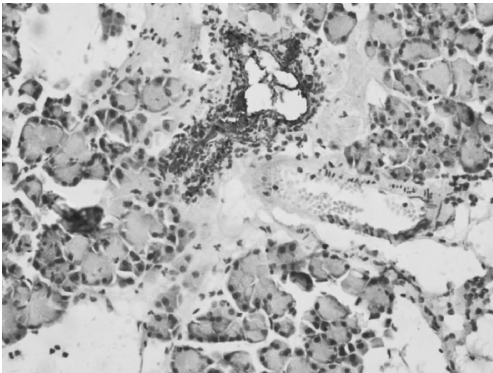


图 1 SAP 组术后 24h 胰腺血管内皮细胞表面 ICAM-1 的强阳性表达 (免疫组化, $\times 400$)

表 2 胰腺组织 ICAM-1 的表达量

组别	4h	12h	24h
假手术组	0 [#]	0 [#]	0 [#]
胰腺炎组	1429 ± 303 * □	1969 ± 451 * ☆	2698 ± 431 * ☆ □
LXA ₄ 干预组	925 ± 268 * # □	1328 ± 354 * # ☆	1721 ± 310 * # ☆ □

与同一时点假手术组的数值相比, * $P < 0.01$; 与同一时点胰腺炎组的数值相比, [#] $P < 0.01$; 与同一实验组 4h 时点的数值比较, ☆ $P < 0.01$; 与同一实验组 12h 时点的数值比较, □ $P < 0.01$

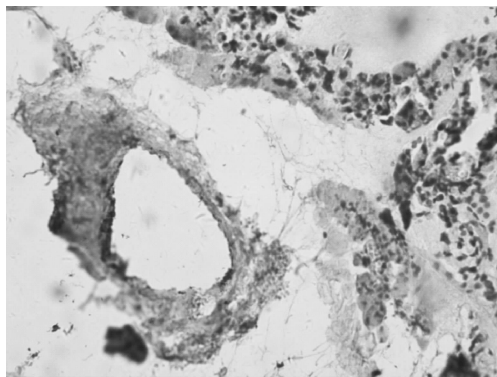


图 2 LXA₄ 干预组 24h 胰腺血管内皮细胞表面 ICAM-1 的表达较 SAP 组弱 (免疫组化, ×400)

表 3 各组胰腺组织 NF-κB 表达结果 (n)

时间点	n	假手术组		胰腺炎组		LXA ₄ 干预组			
		(-)	(+)	(-)	(+)	胞核 (+)	(-)	(+)	胞核 (+)
4h	24	8	0	4	4	2	5	3	0
12h	24	8	0	0	8	5	4	4	0
24h	21	8	0	0	6	6	1	6	1

腺病理评分因综合考虑坏死性胰腺炎的主要病理改变,如胰腺水肿、出血、炎症、坏死、以及胰周脂肪坏死和钙化灶形成情况等因素,一直来被认为是实验性坏死性胰腺炎病变严重度的客观评价指标^[3]。

以往的实验研究已阐明,LXA₄ 治疗 ANP 的机制主要与 LXA₄ 能抑制 SIRS 有关,并能抑制中性粒细胞 (PMN) 的过度激活。而 PMN 的过度激活在 SIRS 的全过程中处于核心地位,活化的 PMN 才能发挥其破坏作用,从而损害脏器功能,导致 MODS^[4]。然而,活化的 PMN 要发挥其破坏作用首先必须完成与血管内皮细胞的黏附^[5]。也就是说,PMN 与血管内皮的黏附是活化的 PMN 发挥破坏作用的前提条件,这一黏附过程又须依赖于炎症部位 PMN 和血管内皮细胞膜表面的黏附分子的表达,而炎性细胞黏附分子 (ICAM-1) 是介导 PMN 与血管内皮黏附的主要途径^[6]。因此,ICAM-1 的表达在 SIRS 的发展过程中起至关重要的作用。本研究结果表明,假手术组 ICAM-1 表达阴性,而 SAP 组、LXA₄ 干预组在 3 个

3. 胰腺组织 NF-κB P65 蛋白的表达情况:①各组胰腺组织 NF-κB 表达结果,如表 3 所示;②NF-κB 阳性表达率:ANP 组 22 个标本,阳性表达 18 个,阳性表达率为 81.8%;LXA₄ 干预组 23 个标本,阳性表达 13 个,阳性表达率为 56.5%,两组之间的差别无统计学意义 ($P > 0.05$)。假手术组 24 个标本无阳性表达,阳性表达率为 0,与其他两组相比,差别有非常显著意义 ($P < 0.01$);③NF-κB 胞核阳性表达率:ANP 组 22 个标本,胞核阳性表达 13 个,胞核阳性表达率为 59.1%;LXA₄ 干预组 23 个标本,胞核阳性表达 1 个,阳性表达率为 4.3%,两组之间的差别有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。假手术组 24 个标本无阳性表达,阳性表达率为 0。

讨 论

正如我们以往的实验研究,本实验研究结果亦表明 LXA₄ 对 ANP 具有改善作用,能减轻 ANP 的病变程度。在 12、24h 两个时点,LXA₄ 干预组的 Schmidt 胰腺病理评分较比胰腺炎组明显降低;而 Schmidt 胰

时点均有阳性表达,但随着时间的推移,反映 ICAM-1 表达相对强度的累积光密度值 (IOD) 逐渐上升 ($P < 0.01$),这与 SIRS 的发展过程相符合,可见 ICAM-1 确在 SIRS 发展过程中起作用。而在 4、12、24h 三个时点,LXA₄ 干预组的 IOD 值较比 SAP 组均有显著下降 (4、12h, $P < 0.05$; 24h, $P < 0.01$),证实 LXA₄ 在 ANP 诱发 SIRS 过程中确能抑制 ICAM-1 的表达。

研究表明,NF-κB 在炎症过程中起重要作用,它可与多种炎症因子基因启动子中的相应序列结合,参与炎症介质 (TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8)、黏附分子 (ICAM-1、VCAM-1、E-选择素) 以及 NO 合酶等基因的转录,而它们正是参与 SIRS、MODS 的重要因子^[7,8]。我们以往的研究表明 LXA₄ 能抑制 ANP 大鼠分泌 TNF-α、IL-1、IL-6 等促炎细胞因子,本研究结果亦表明 LXA₄ 能抑制 ICAM-1 的表达。然而,在 ANP 诱发 SIRS 过程中,LXA₄ 抑制 TNF-α、IL-1、IL-6 分泌以及抑制 ICAM-1 的表达是否是

通过抑制 NF- κ B 的途径来实现的呢? 本研究结果表明,假手术组 NF- κ B P65 蛋白阴性,说明 NF- κ B 无阳性表达;而 ANP 组 NF- κ B 的细胞核阳性表达率最高;LXA₄ 干预组 NF- κ B 细胞核有阳性表达,但其阳性表达率比 ANP 组低。这一研究结果表达,NF- κ B 参与 ANP 的炎症过程,其表达规律与 ANP 诱发 SIRS 的规律基本一致;LXA₄ 能抑制 NF- κ B 的阳性表达,其抑制的规律与 LXA₄ 对 TNF- α 、IL-1、IL-6、ICAM-1 的抑制亦基本一致。因此,我们认为,NF- κ B 参与 ANP 诱发 SIRS 的过程,LXA₄ 抑制 TNF- α 、IL-1、IL-6 等促炎细胞因子和 ICAM-1 的表达从而抑制 SIRS 过程,可能是通过抑制 NF- κ B 的细胞信号传导途径来实现的。这一研究结果提示,LXA₄ 可能是一种新的 NF- κ B 的非选择性抑制剂,这以细胞因子为靶点的 SAP 治疗提供了新的契机。且因 LXA₄ 无糖皮质激素、非甾体抗炎药和免疫抑制剂等抗炎药诸多不良反应,可能具有更好的临床应用前景。

参考文献

- 1 Serhan CN. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis; an update and role in anti-inflammation and pro-resolution

- [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002, 8 (68-69): 433-455
- 2 Aho HJ, Koskensalo ML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat; sodium taurocholate induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 1980, 15 (4): 411-416
- 3 Schmidt J, Ratter DW, Lewandowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. Ann Surg, 1992, 215 (1): 44-56
- 4 Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome [J]. Br J Surg, 1997, 84 (7): 920-935
- 5 Lundberg AH, Granger DN, Russell J, et al. Quantitative measurement of P and E-selection adhesion molecules in acute pancreatitis; correlation with distant organ injury [J]. Ann Surg, 2000, 231 (2): 213-222
- 6 Hu G, Vogel SM, Schwartz DE, et al. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability [J]. Circ Res. 2008; 102 (12): e120-131
- 7 Matsuda N, Hattori Y. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy [J]. Pharmacol Sci. 2006; 101 (3): 189-198
- 8 Jiang B, Xu S, Hou X, et al. Temporal control of NF-kappa B, activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression [J]. Biol Chem, 2004, 279 (2): 1323-1329

(收稿: 2011-07-07)

(修回: 2011-07-13)

结直肠癌术前血清 CEA、CA199 表达水平与临床病理关系的研究

刘 传 清水汪 王 宁 王雅杰

摘 要 目的 探讨术前血清中癌胚抗原(CEA)与糖类抗原 199(CA199)水平与结直肠癌分期、分化程度、病理类型和细胞增殖(Ki-67)的关系。**方法** 收集 292 例结直肠癌患者,检测其术前血清 CEA 和 CA199 水平,分析其表达水平在不同肿瘤 TNM 分期、分化程度、病理类型和细胞增殖(Ki-67)的差异。**结果** 血清 CEA 水平升高与肿瘤 TNM 分期、分化程度、病理类型存在明显统计学差异,血清 CA199 水平升高与肿瘤 TNM 分期、分化程度存在明显统计学差异,肿瘤 TNM 分期越晚,血清 CA199 水平越高($P < 0.05$)。血清 CEA、CA199 升高与 Ki67 无明显统计学差异。**结论** 结直肠癌患者术前血清 CEA 和 CA199 水平可作为评估结直肠癌临床病理关系的指标之一。

关键词 结直肠癌 CEA CA199 临床病理关系

Study on the Relationship of Preoperative CEA and CA199 Serum Levels with Clinicopathology of Colorectal Cancer. Liu Chuan, Wang Qingshui, Wang Ning, Wang Yajie. Department of Oncology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

基金项目: 2010 年上海市卫生局科研计划资助项目(2009113); 上海市重点学科建设资助项目(B905)

作者单位: 200433 上海, 第二军医大学附属长海医院肿瘤科

通讯作者: 王雅杰, 主任医师, 教授, 博士生导师, 电子信箱: yajiewa0459@163.com