

# 大麻素受体 2 在重症急性胰腺炎肺损伤中的保护作用

李 鑫 张 鵬 柴 琛 王 旭 锋 徐 松 鲁 彦 曹 农

**摘要 目的** 探讨大麻素受体 2 在重症急性胰腺炎(SAP)导致的肺损伤中的作用。**方法** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 96 只按数字表法随机分成 4 组。对照组:开腹翻动胰腺组织后关腹;SAP 组:4% 牛磺胆酸钠建立 SAP 模型;HU - 308 组:腹腔注射 HU - 308 2.5mg/kg,1h 后建立 SAP 模型;AM - 630 组:腹腔注射 AM - 630 2.5mg/kg,1h 后建立 SAP 模型。分别在 3、6、12h 检测各组血清中 TNF -  $\alpha$  和 IL - 6 水平。取左肺下叶肺组织匀浆后检测髓过氧化物酶水平,右肺下叶组织制作成 HE 病理切片并进行病理学评分。其余肺组织称重后烘干处理,测量湿干重之比。**结果** 各时间点 SAP 组、AM - 630 组、HU - 308 组中 TNF -  $\alpha$ 、IL - 6、MPO、肺组织湿干重比值和病理学评分均高于对照组( $P < 0.05$ ),HU - 308 组水平低于 SAP 组水平( $P < 0.05$ )。AM - 630 组中 TNF -  $\alpha$ 、IL - 6、MPO 水平均大于 SAP 组( $P < 0.05$ )。AM - 630 组中肺组织湿干重比值和病理学评分与 SAP 组比较,在 3h 无统计学差异( $P > 0.05$ ),在 6、12h 大于 SAP 组水平( $P < 0.05$ )。**结论** 激活 CB2 受体能够抑制 SAP 导致的肺损伤的形成和发展,抑制 CB2 受体加重 SAP 导致的肺损伤。

**关键词** 大麻素受体 2 重症急性胰腺炎 肺损伤

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

**Protective Effect of Cannabinoid Receptor 2 in Severe Acute Pancreatitis Induced Lung Injury.** Li Xin, Zhang Peng, Chai Chen, et al.

*Department of General Surgery, The First Hospital of Lanzhou University, Gansu 730000, China*

**Abstract Objective** To explore the effect of cannabinoid receptor 2 in the lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats.

**Methods** Ninety - six SD rats(SPF) were divided into four groups randomly. SAP group: 4% sodium taurocholate was injected into pancreaticobiliary duct to establish SAP model. HU - 308 group: 1h later after the SAP model established, HU - 308 was injected into peritoneal cavity by 2.5mg/kg. AM - 630 group: 1h later after the SAP model established, AM - 630 was injected into peritoneal cavity by 2.5mg/kg. Sham group: The pancreatic tissue of rats was flipped after laparotomy and then closed the peritoneal cavity. At 3, 6, 12h, the TNF -  $\alpha$  and IL - 6 of blood sample of each rat was detected. The MPO in the left lower lobe of lung tissue was determined. At the same time, the right lower lobe of lung tissue was made to pathological sections and scored. The last lung tissue weighted, then baked in the oven for 72h, the dry tissue was weighted. **Results** At each time point, the level of TNF -  $\alpha$ , IL - 6, MPO, pathological score and wet to dry ratio in HU - 308 group, AM - 630 group and SAP group were significantly higher than those in Sham group( $P < 0.05$ ). It indicated that all indexes (the level of TNF -  $\alpha$ , IL - 6, MPO, pathological score and wet to dry ratio) in HU - 308 group were significantly lower than those in SAP group's ( $P < 0.05$ ). It showed that the level of TNF -  $\alpha$ , IL - 6 and MPO in AM - 630 group were significantly higher compared with SAP group ( $P < 0.05$ ). However, we found that, although the level of pathological score and wet to dry ratio in AM - 630 group were not significant at the 3h ( $P > 0.05$ ), they were increased significantly at 6h, 12h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The activated CB2 receptors are involved into the pathophysiology of lung injury induced by severe acute pancreatitis.

**Key words** Cannabinoid receptor 2;Severe acute pancreatitis;Lung injury

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)  
往往引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700266);陕西省卫生厅基金资助项目(06E05);中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(lzujbky - 2013 - 158);兰州大学中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(lzujbky - 2010 - 146)

作者单位:730000 兰州大学第一医院(李鑫、张鹏、柴琛、王旭锋、徐松、曹农);730030 兰州,中国人民解放军第一医院(鲁彦)

通讯作者:曹农,电子信箱:lu73free@aliyun.com;鲁彦,电子信箱:lu73free@gmail.com

response syndrome, SIRS),继而造成多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)甚至多器官衰竭(multiple organ failure, MOF)。目前认为,SIRS 发展早期,因胰酶大量释放导致单核 - 吞噬细胞和中性粒细胞过度激活,释放大量炎性介质,造成多器官损害。在器官损害中,与免疫细胞在肺组织内过度激活和大量促炎性细胞因子(如 TNF -  $\alpha$ 、IL - 6、IL - 1 等)的产生及释放有密切关系的肺脏组织损伤出现较早较为突出<sup>[1,2]</sup>。在动物 SAP 模型

中研究提示,减少血清中 TNF- $\alpha$  的水平,能够明显减轻肺脏损伤的程度<sup>[3]</sup>。因此减少免疫细胞在肺组织的浸润及促炎因子的水平,成为治疗 SAP 导致的肺损伤的一个重要而有效的方法。

大麻已具有 2000 多年药用历史,1964 年确定大麻的有效成分为大麻素<sup>[4,5]</sup>。众多研究已证明内源性大麻素及其受体在体内广泛存在<sup>[6,7]</sup>。体内主要存在 CB1 和 CB2 两种大麻素受体。CB1 受体研究比较多,该受体主要存在于脑组织中,称为中枢型大麻素受体。相对 CB1 受体,CB2 受体的研究相对不足,很多机制尚不明确<sup>[8]</sup>。CB2 受体为 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体。主要在 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞等免疫细胞上表达,是巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞上主要的大麻素受体<sup>[9-11]</sup>。CB2 受体可以激活多种细胞内信号转导通路发挥作用,虽然这些信号通路尚不明确,但在大量的实验研究中发现,CB2 受体激活后整体表现出抗炎和免疫抑制作用<sup>[11,12]</sup>。SAP 导致的 SIRS 是 MODS 发生、发展的主要因素,控制炎症发展是预防及治疗 MODS 的重要措施。目前的研究表明,CB2 受体在一些炎性疾病中表现出一定的免疫抑制作用,但在 SAP 中起到的作用的报道极少<sup>[12]</sup>。因此本研究就 CB2 受体对 SAP 导致的肺损伤进行探讨。

### 材料与方法

1. 材料:选用体重 180~200g 的雄性 SD 大鼠(SPF 级),购于甘肃省中医院动物实验中心;牛磺胆酸钠购于美国 Sigma 公司;CB2 受体激动剂 HU-308 和 CB2 受体抑制剂 AM-630 购于美国 Cayman 公司;IL-6 和 TNF- $\alpha$ ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司;髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)试剂盒购于南京建成生物公司。

2. 方法:(1) SAP 模型的建立方法:大鼠禁食 12h,禁水 6h。腹腔注射 2% 的戊巴比妥(35mg/kg)麻醉大鼠后,仰卧位固定手术台上,常规备皮、消毒、铺巾,沿剑突下腹正中切口 1.5cm,在肝门和十二指肠之间找到胰胆管,用动脉夹夹闭肝门端胰胆管。用与微量注射泵连接的 4.5 号针头经十二指肠壁外侧壁穿刺,在十二指肠乳头胰管开口处逆行刺入胰管约 0.5cm,用动脉夹固定针头。微量注射泵以 0.2ml/min 速度注射注入 4% 牛磺胆酸钠 1.0ml/kg,注射完毕 10min 后胰腺组织出现明显的水肿伴出血坏死灶,提示动物模型已初步建立,退针去夹,复位肠管,逐层缝合腹壁。(2) 分组:将 96 只雄性 SD 大鼠按数字表法随机分为 4 组:对照组( $n=24$ )、SAP 组( $n=24$ )、HU-308 组( $n=24$ )、AM-630 组( $n=24$ )。每组根据时间点分为 3 个亚组;3h 组、6h 组、12h 组,每亚组中 8 只大鼠。对照组:开腹后仅翻动胰腺组织后关腹;SAP 组:4% 牛磺胆酸钠建立 SAP 模型;HU-308 组:腹腔注射 HU-308 2.5mg/kg,

1h 后建立 SAP 模型;AM-630 组:腹腔注射 AM-630 2.5mg/kg,1h 后建立 SAP 模型。大鼠术后禁食,自由饮水。(3) 取材及检测:所有组大鼠在模型建立后,分别在 3、6、12h 经颈动脉插管采血静置 30min 后 3000r/min 离心 15min,分离血清,血清置 -80℃ 冰箱中低温保存,采用 ELISA 试剂盒检测血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平。取新鲜全肺组织,左肺下叶置于 -80℃ 冰箱保存,匀浆后使用 MPO 试剂盒和酶标仪在 460nm 处进行 OD 值测定。右肺下叶组织浸于 10% 中性甲醛液中固定保存制作 HE 病理切片,参考 Hofbaue 等<sup>[13]</sup>的评分标准进行组织病理学评分。其余肺组织用滤纸吸干表面水分后称重,置于 70℃ 烘箱烘烤 72h,测量湿干重之比。

3. 统计学方法:计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,使用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 血清 TNF- $\alpha$  的水平:在各个时间点,HU-308 组、SAP 组和 AM-630 组中 TNF- $\alpha$  水平均显著高于对照组水平( $P < 0.05$ ),并具有时间依赖性。HU-308 组中 TNF- $\alpha$  水平在 3 个时间点均低于 SAP 组( $P < 0.05$ ),AM-630 组与 SAP 组的比较中,在各个时间点 AM-630 组中 TNF- $\alpha$  的水平高于 SAP 组( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1 血清 TNF- $\alpha$  水平(ng/ml)

组别	<i>n</i>	3h	6h	12h
对照组	24	54.14 ± 4.60	62.34 ± 7.07	55.58 ± 5.19
SAP 组	24	78.70 ± 4.77 *	88.76 ± 4.79 *	102.87 ± 5.37 *
HU-308 组	24	67.26 ± 2.73 **	73.23 ± 3.57 **	93.18 ± 3.44 **
AM-630 组	24	88.37 ± 3.92 **	97.70 ± 3.38 **	125.81 ± 9.21 **

与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 SAP 组比较, \*\*  $P < 0.05$

2. 血清 IL-6 的水平:各时间点 HU-308 组、SAP 组和 AM-630 组中 IL-6 水平均高于对照组( $P < 0.05$ )。HU-308 组中的 IL-6 水平均低于 SAP 组( $P < 0.05$ ),AM-630 组中的 IL-6 水平均高于 SAP 组( $P < 0.05$ ,表 2)。

表 2 血清 IL-6 水平(pg/ml)

组别	<i>n</i>	3h	6h	12h
对照组	24	548.50 ± 49.72	573.16 ± 18.30	556.91 ± 52.13
SAP 组	24	737.15 ± 37.21 *	832.17 ± 41.67 *	949.36 ± 25.00 *
HU-308 组	24	663.71 ± 36.43 **	750.71 ± 39.96 **	829.16 ± 11.64 **
AM-630 组	24	805.58 ± 30.03 **	892.00 ± 45.51 **	1157.06 ± 121.53 **

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 SAP 组比较, \*\*  $P < 0.05$

3. 肺组织湿干重之比:在各个时间点,HU-308

组、SAP 组、AM - 630 组肺组织湿干重之比均高于对照组( $P < 0.05$ )。HU - 308 组、SAP 组、AM - 630 组中比值的变化均随时间的改变而增加( $P < 0.05$ )。在各个时间点,HU - 308 组低于 SAP 组( $P < 0.05$ )。在 3h, AM - 630 组比值高于 SAP 组,但无统计学差异( $P > 0.05$ ),在 6、12h, AM - 630 组比值均高于 SAP 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 3)。

表 3 肺组织的湿干重之比

组别	n	3h	6h	12h
对照组	24	3.93 ± 0.13	4.18 ± 0.16	4.05 ± 0.14
SAP 组	24	4.60 ± 0.14 *	4.81 ± 0.24 *	5.78 ± 0.27 *
HU - 308 组	24	4.27 ± 0.28 *#	4.55 ± 0.23 *#	5.25 ± 0.18 *#
AM - 630 组	24	4.83 ± 0.33 *	5.16 ± 0.28 *#	5.82 ± 0.22 *#

与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与 SAP 组比较,\*#  $P < 0.05$

4. 肺组织髓过氧化物酶(MPO)水平的变化:HU - 308 组、SAP 组和 AM - 630 组中 MPO 水平随时间的变化而增加,与对照组比较有统计学差异( $P < 0.05$ )。HU - 308 组、SAP 组和 AM - 630 组中 MPO 水平均高于对照组水平( $P < 0.05$ )。在每个时间点,HU - 308 组中的 IL - 6 水平均低于 SAP 组水平( $P < 0.05$ ),AM - 630 组中的 MPO 水平均高于 SAP 组( $P < 0.05$ ,表 4)。

表 4 肺组织 MPO 水平的变化(U/g)

组别	n	3h	6h	12h
对照组	24	1.61 ± 0.18	1.53 ± 0.16	1.48 ± 0.21
SAP 组	24	5.33 ± 0.16 *	8.67 ± 0.19 *	13.98 ± 0.27 *
HU - 308 组	24	3.06 ± 0.23 *#	7.44 ± 0.23 *#	11.85 ± 0.16 *#
AM - 630 组	24	7.56 ± 0.19 *#	10.15 ± 0.28 *#	17.32 ± 0.21 *#

与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与 SAP 组比较,\*#  $P < 0.05$

5. 肺组织病理学评分:在光镜下观察,对照组肺组织结构基本正常,未见肺组织间质的水肿及坏死出血,肺泡间隔正常,肺泡内无中性粒细胞的浸润。在 3h 时间点,SAP 组肺组织间质出现水肿,肺泡的间隔明显增宽,伴有大量中性粒细胞浸润,有出血点和小部分的实变,结构出现破坏,HU - 308 组较 SAP 组病理改变稍轻,而 AM - 630 组较 SAP 组病理改变基本相似。在 6、12h,HU - 308 组、AM - 630 组、SAP 组的病理损害程度逐渐增加,SAP 组肺组织结构损害更加突出,AM - 630 组病理损害较 SAP 组严重,出现坏死和出血,HU - 308 组的病理表现虽然也有严重的改变,但较 SAP 组表现轻(表 5,图 1)。

表 5 肺组织病理学评分

组别	n	3h	6h	12h
对照组	24	0.43 ± 0.17	0.55 ± 0.20	0.59 ± 0.14
SAP 组	24	0.91 ± 0.23 *	1.35 ± 0.11 *	2.78 ± 0.27 *
HU - 308 组	24	0.69 ± 0.13 *#	0.93 ± 0.23 *#	1.15 ± 0.16 *#
AM - 630 组	24	0.97 ± 0.31 *	1.95 ± 0.28 *#	3.32 ± 0.36 *#

与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ;与 SAP 组比较,\*#  $P < 0.05$

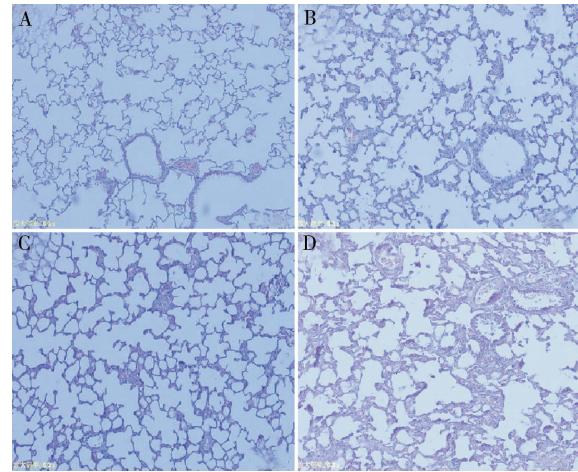


图 1 各组模型建立后 12h 病理切片图(HE, ×100)

A. 对照组;B. SAP 组;C. HU - 308 组;D. AM - 630 组

## 讨 论

本实验结果表明,CB2 受体介导 SAP 肺组织损伤病理生理过程。激活 CB2 受体能够抑制肺损伤的形成和发展,抑制 CB2 受体加重 SAP 导致的肺损伤。

CB2 受体主要在 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞等免疫细胞上表达<sup>[9]</sup>。CB2 受体可以激活多种细胞内信号转导通路表现出抗炎和免疫抑制作用<sup>[12, 14]</sup>。SAP 导致的 SIRS 是 MODS 发生、发展的主要因素,控制炎症发展是预防及治疗 MODS 的重要措施。目前的研究表明 CB2 受体激活后能抑制结肠炎、脓毒症等炎性疾病发展<sup>[15, 16]</sup>。但 CB2 受体在 SAP 中产生的作用目前未见文献报道,本课题主要目的是探讨 CB2 受体在 SAP 导致的肺损伤中产生的作用。

本研究表明,CB2 受体激动剂 HU - 308 显著降低血清 TNF -  $\alpha$  和 IL - 6 水平,相反,CB2 受体抑制剂 AM - 630 则显著升高血清中 TNF -  $\alpha$  和 IL - 6 的水平,这提示 CB2 受体激活能显著抑制早期 SAP 病理生理过程。TNF -  $\alpha$  和 IL - 6 是 SAP 早期胰酶及坏死物质刺激免疫细胞分泌的促炎因子,在肺损伤中 TNF -  $\alpha$  和 IL - 6 主要起到了损伤内皮细胞、聚集

中性粒细胞并激活释放氧自由基的作用<sup>[2]</sup>。减少血清中 TNF - α 和 IL - 6 的水平在肺损伤的治疗中有着非常重要的意义。在脓毒症和免疫细胞的研究中提示,激活 CB2 受体能下调免疫细胞中 NF - κB 的 mRNA 表达和破坏免疫细胞的抗原递呈过程<sup>[17]</sup>。在 SAP 的发展过程中,坏死物质和胰酶的抗原递呈是 SAP 激活免疫系统的始动环节,免疫细胞中 NF - κB 的 mRNA 同样会过度表达,NF - κB 可以启动 TNF - α 和 IL - 6 的 mRNA 表达<sup>[18]</sup>。被激活的 CB2 受体可能从 SAP 的始动环节破坏了免疫细胞的抗原递呈过程,在基因表达方面可能下调了免疫细胞中 NF - κB 的 mRNA 表达,最终使 SAP 早期免疫应答减弱和促炎因子减少。

本研究结果还表明,CB2 受体激动剂 HU - 308 显著降低 SAP 模型中肺组织内的 MPO 水平,相反,CB2 受体抑制剂 AM - 630 则升高了 MPO 水平,提示 CB2 受体激动减少中性粒细胞在肺组织内的聚集和 MPO 的释放。同时,本研究结果还提示,肺组织内 MPO 水平的变化与血清中 TNF - α 和 IL - 6 的水平变化呈正相关。HU - 308 组的血清中 TNF - α 和 IL - 6 水平的降低,使中性粒细胞在肺内聚集减少、激活减弱及释放 MPO 的能力降低,从而减轻肺脏损伤。而 AM - 630 组的血清中 TNF - α 和 IL - 6 的水平增高则会使中性粒细胞在肺内聚集增加、激活增强及释放 MPO 的能力升高,从而加重肺损伤。除此之外,由于 CB2 受体主要分布于中性粒细胞上,CB2 受体是否直接作用于中性粒细胞,作用方式及其作用机制也未明确。在 CB2 受体对免疫系统的作用研究中,CB2 受体在免疫细胞上的作用方式及机制将是一个非常重要的研究部分。

肺组织的湿干重之比主要反应了肺毛细血管的通透性。病理图像及评分是对肺损伤程度的直接评价。在本次实验中,肺组织的湿干重之比及病理图像评分也与 TNF - α 、IL - 6 、MPO 水平呈正相关。这也说明了 TNF - α 、IL - 6 及 MPO 水平是导致肺损伤的重要因素。肺毛细血管的通透性增加及病理损害是 SAP 在肺脏损害中最终的结果。从本次实验结果可以得出,CB2 受体的激活降低了肺损伤程度,CB2 受体的抑制则加重了肺损伤程度。

#### 参考文献

- Šurbatović M, Jovanović K, Radaković S, et al. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury [J]. Srpski Arhivza Celokupno Lekarstvo, 2005, 133(1-2): 76-81
- 王彬,张晓华. 细胞因子在重症急性胰腺炎合并急性肺损伤中的作用[J]. 医学研究生学报,2012,25(11): 1208-1212
- 程石,宋茂民,何三光. 肿瘤坏死因子-α 对大鼠坏死性胰腺炎肺损伤的影响[J]. 中华实验外科杂志,2004,20(7): 593-594
- Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, et al. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors [J]. Anesthesiology, 2003, 99(4): 955-960
- Després JP, Golay A, Sjöström L. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia [J]. New England Journal of Medicine, 2005, 353(20): 2121-2134
- Mavromoustakos T, Yang D, Theodoropoulou E, et al. Studies of the conformational properties of the cannabimimetic aminoalkylindole pravadolone using NMR and molecular modeling [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 1995, 30(3): 227-234
- Petrocellis LD, Cascio MG, Marzo VD. The endocannabinoid system: a general view and latest additions [J]. British Journal of Pharmacology, 2004, 141(5): 765-774
- Atwood BK, Straker A, Mackie K. CB2: Therapeutic target - in - waiting [J]. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 2012, 38(1): 16-20
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations [J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 232(1): 54-61
- Carayon P, Marchand J, Dussossoy D, et al. Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation [J]. Blood, 1998, 92(10): 3605-3615
- 李素燕,颜玲娣,宫泽辉. 大麻 CB2 受体在中枢神经系统的分布及其激动剂的药理作用 [J]. 中国药理学通报,2009,25(1): 5-8
- Klein TW. Cannabinoid - based drugs as anti - inflammatory therapeutics [J]. Nature Reviews Immunology, 2005, 5(5): 400-411
- Hofbauer B, Saluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet - activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis [J]. Gastroenterology, 1998, 115(5): 1238-1247
- 李晶,王馨,龙云,等. 大麻 CB2 受体分子生物学信号及信号传导机制 [J]. 中外医疗,2011,30(30): 191-192
- Storr MA, Keenan CM, Zhang H, et al. Activation of the cannabinoid 2 receptor (CB2) protects against experimental colitis [J]. Inflammatory Bowel Diseases, 2009, 15(11): 1678-1685
- Tschip J, Kasten KR, Nogueiras R, et al. The cannabinoid receptor 2 is critical for the host response to sepsis [J]. Journal of Immunology, 2009, 183(1): 499-505
- Csóka B, Németh ZH, Mukhopadhyay P, et al. CB2 cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis [J]. PLoS One, 2009, 4(7): e6409
- 吴鑫,赵国海. 炎性介质与重症急性胰腺炎肺损伤 [J]. 医学综述,2010,16(17): 2607-2611

(收稿日期:2014-03-08)

(修回日期:2014-03-24)