

大鼠急性胰腺炎肺损伤中巨噬细胞炎症蛋白-2的改变

李军成, 熊玉宝, 吴浩荣, 田斌, 金涛, 陈季云, 冯萍, 朱雪明

■背景资料

急性肺损伤是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)最常见和最突出的胰外脏器损伤,其发病机制近未阐明。CXC趋化细胞因子对中性粒细胞具有选择性趋化和活化活性,现有研究认为其可能藉由趋化中性粒细胞在肺部的浸润和活化介入了AP肺损伤的发生和发展。

李军成, 熊玉宝, 吴浩荣, 田斌, 金涛, 陈季云, 冯萍, 朱雪明, 苏州大学附属第二医院 江苏省苏州市 215004
通讯作者: 李军成, 215004, 江苏省苏州市三香路1055号, 苏州大学附属第二医院普外科. Jchenglee@sina.com.cn
电话: 0512-67783976
收稿日期: 2006-05-13 接受日期: 2006-05-22

Relationship between macrophage inflammatory peptide-2 and acute pancreatitis-associated lung injury

Jun-Cheng Li, Yu-Bao Xiong, Hao-Rong Wu, Bin Tian, Tao Jin, Ji-Yun Chen, Ping Feng, Xue-Ming Zhu

Jun-Cheng Li, Yu-Bao Xiong, Hao-Rong Wu, Bin Tian, Tao Jin, Ji-Yun Chen, Ping Feng, Xue-Ming Zhu, the Second Affiliated Hospital, Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Jun-Cheng Li, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004, Jiangsu Province, China. Jchenglee@sina.com.cn
Received: 2006-05-13 Accepted: 2006-05-22

Abstract

AIM: To investigate the changes of macrophage inflammatory peptide-2 (MIP-2) in lung injury induced by acute pancreatitis (AP).

METHODS: SD rats were randomized into AP group ($n = 12$) and control group ($n = 6$). Rat model of AP was induced by retrograde injection of 50 g/L sodium deoxycholate (DCA) into the pancreatic and biliary duct. Half of the rats were killed in both groups at 3 h, and the rest were killed at 6 h. The lung injury was evaluated by myeloperoxidase (MPO) activity and histopathological scoring, and the content of MIP-2 was detected in serum, pancreas, and lung by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: Histopathological scores for the lung tissues were higher in AP group than those in control group (3 h: $t = 2.14$, $P = 0.035$; 6 h: $t = 3.12$, $P = 0.009$), and the activity of lung MPO was also significantly higher (6 h: $t = 2.72$, $P = 0.015$). The levels of serum MIP-2 were markedly increased

in AP group than those in the controls (3 h: $t = 3.76$, $P = 0.007$; 6 h: $t = 2.42$, $P = 0.023$), and the levels of serum MIP-2 were positively correlated with the histopathological scores for the pancreatic and lung tissues, respectively ($r = 0.42$, $P = 0.014$; $r = 0.35$, $P = 0.036$). MIP-2 levels in the lung tissues were positively correlated with the histological scores for the pancreatic tissues and serum amylase level ($r = 0.38$, $P = 0.023$; $r = 0.42$, $P = 0.016$).

CONCLUSION: MIP-2 is highly correlated with lung injury induced by AP, and probably plays an important role in pathogenesis of lung injury.

Key Words: Pancreatitis; Lung injury; Macrophage inflammatory peptide-2

Li JC, Xiong YB, Wu HR, Tian B, Jin T, Chen JY, Feng P, Zhu XM. Relationship between macrophage inflammatory peptide-2 and acute pancreatitis-associated lung injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(20):2018-2021

摘要

目的: 研究大鼠急性胰腺炎(AP)肺损伤与巨噬细胞炎症蛋白-2 (MIP-2)的关系。

方法: 成年♂SD大鼠随机分为AP 3 h组、AP 6 h组, 每组6只; 对照3 h组、对照6 h组, 每组3只。胰胆管逆行注射50 g/L脱氧胆酸钠(DCA)诱导大鼠AP模型。肺组织镜下病理评分及髓过氧化物酶(MPO)活性评估肺损伤。ELISA法检测血清、胰腺及肺组织MIP-2含量。

结果: 肺镜下病理评分在AP 3 h组明显高于对照3 h组($t = 2.14$, $P = 0.035$), AP 6 h组进一步升高, 与对照6 h组比较差异具有非常显著性的意义($t = 3.12$, $P = 0.009$)。肺组织MPO活性升高, 与对照6 h组相比差异具有显著性的意义($t = 2.72$, $P = 0.015$)。血清MIP-2在对照3 h组中不能检出, 在对照6 h组含量很低; 在AP 3 h组明显升高, 与对照3 h组相比差异具有非常显著性的意义($t = 3.76$, $P = 0.007$); 在AP 6 h组进一步升高, 与对照6 h组及AP 3 h组比较差异具有显著性的意义($t = 2.42$, $P = 0.023$; $t = 3.17$, $P = 0.024$)。血清MIP-2浓度与胰腺镜下病理评

分和肺镜下病理评分呈正相关($r = 0.42, P = 0.014; r = 0.35, P = 0.036$); 肺组织MIP-2含量与胰腺镜下病理评分和血清淀粉酶(AMY)呈正相关($r = 0.38, P = 0.023; r = 0.42, P = 0.016$).

结论: 大鼠MIP-2与DCA诱导的大鼠AP肺损伤关系密切, 在大鼠AP肺损伤的病理过程中可能发挥了重要作用.

关键词: 胰腺炎; 肺损伤; 巨噬细胞炎症蛋白-2

李军成, 熊玉宝, 吴浩荣, 田斌, 金涛, 陈季云, 冯萍, 朱雪明. 大鼠急性胰腺炎肺损伤中巨噬细胞炎症蛋白-2的改变. 世界华人消化杂志 2006;14(20):2018-2021
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2018.asp>

0 引言

急性肺损伤是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)最常见和最突出的胰外脏器损伤之一, 也是AP病程早期最主要的死亡原因之一, 其发病机制远未阐明. 研究已经证实, 中性粒细胞在肺部的浸润和活化是AP肺损伤发生和发展的关键所在, 但中性粒细胞在肺部浸润和活化的机制尚未阐明. 近年来, AP肺损伤时趋化细胞因子对白细胞的选择性趋化和激活作用, 愈来愈受到关注, 现有研究认为其可能介入了中性粒细胞在肺部浸润和活化. 大鼠巨噬细胞炎症蛋白-2 (macrophage inflammatory peptide-2, MIP-2)是大鼠ELR⁺(含谷-亮-精氨酸功能基序)CXC趋化细胞因子家族的代表性成员, 大鼠中性粒细胞的主要趋化细胞因子. 为此, 我们采用脱氧胆酸钠逆行胰胆管注射建立大鼠AP模型, 观察和分析大鼠急性胰腺炎病程早期血清、胰腺和肺组织中MIP-2与AP肺损伤的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂SD大鼠18只, 体质量250-300 g, 清洁级, 苏州大学实验动物中心提供, 适应性饲养1 wk. 脱氧胆酸钠为AMSCO公司产品; rMIP-2/GRO- β ELISA试剂盒为Biosource公司产品; MPO试剂盒为南京建成生物工程研究所产品. Triturus ELISA全自动检测仪, Dako公司; Biofuge 22R高速低温离心机, Heraeus公司; DY89-1电动玻璃匀浆机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Libror AEU-210精密电子秤(敏感度0.1 mg), 日本.

1.2 方法 完全随机化设计, 分为AP 3 h组、AP 6 h组, 每组6只; 对照3 h组、对照6 h组, 每

组3只. 制模参照Aho *et al*^[1]方法胰胆管逆行注射50 g/L脱氧胆酸钠, 剂量1 mL/kg, 匀速注射1 min, 保留5 min. 对照组除不注射脱氧胆酸钠外, 同AP组. 相应时段心脏抽血处死大鼠, 留取胰腺和肺标本, 分离血清. 血清淀粉酶(AMY)检测采用全自动生化分析仪测定. 肺组织MPO活性检测按MPO试剂盒说明书操作. 胰腺和肺组织用10倍体积的预冷匀浆介质(含20 mmol/L pH 7.4 PBS, 1 mmol/L PMSF和 β 巯基乙醇及EDTA, 5 g/L Triton X-100)制成匀浆, 4℃, 14 000 g离心5 min, 取上清液分成2份, 一份与血清一起用ELISA法检测MIP-2浓度, 采用ELISA全自动检测仪按rMIP-2/GRO- β ELISA试剂盒供应商提供的说明书设定反应步骤, 一份用全自动生化分析仪测定蛋白总量. 血清MIP-2浓度直接用ng/L表示. 胰腺和肺组织的MIP-2含量用ng/g蛋白表示. 胰腺和肺组织标本常规固定、包埋、HE染色, 病理医师单盲读片. 胰腺组织镜下病理评分采用Schmidt评分法^[2], 以总分计. 肺脏组织镜下病理评分采用Pastor评分法^[3].

统计学处理 采用SPSS软件进行统计分析. 数据以mean \pm SD表示, 两组间比较采用 t 检验, 相关性检验采用线性回归分析.

2 结果

胰腺和肺的病理评分和MIP-2含量、肺组织MPO活性及血清淀粉酶和MIP-2浓度结果见表1. 肺镜下病理评分与胰腺镜下病理评分($r = 0.47, P < 0.01$)、肺组织MPO活性($r = 0.46, P < 0.01$)呈正相关; 血清MIP-2浓度与胰腺镜下病理评分及肺镜下病理评分呈正相关(r 分别为0.42、0.35, $P < 0.05$); 肺组织MIP-2含量与胰腺镜下病理评分、血清AMY呈正相关(r 分别为0.38、0.42, $P < 0.05$).

3 讨论

MIP-2由Wolpe *et al*^[4]于1988年首次发现并命名, 属于ELR⁺CXC类趋化细胞因子, 其表达受NF- κ B的调控^[5]. 实验研究表明, MIP-2对大鼠中性粒细胞具有明显的趋化和活化活性^[6]. 大鼠中性粒细胞表面有对MIP-2高度亲和的受体CXCR2, 是MIP-2对中性粒细胞具有选择性趋化和活化活性的结构基础^[7]. CXCR2活化后可引起白细胞内游离钙升高, 引起细胞骨架系统功能变化, 导致白细胞变形、附壁、伪足形成并游出; 可促进白细胞表面黏附分子的表达和活化, 使白细胞

■ 研发前沿

基于中性粒细胞在肺部的浸润和活化是AP肺损伤发生和发展的关键所在, 及趋化细胞因子对白细胞的选择性趋化和活化活性, 研究各种趋化细胞因子在AP肺损伤病理过程中的作用, 现在已成为AP肺损伤发病机制研究的热点.

■ 创新盘点

巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)是大鼠中性粒细胞的主要趋化细胞因子, 在本实验中我们发现血MIP-2在病程早期明显且持续升高, 并与胰腺和肺的病理改变呈正相关.

■应用要点

研究大鼠急性胰腺炎肺损伤中MIP-2的改变,有助于进一步深入研究和阐明AP肺损伤的发病机制,有助于在临床上探索治疗和预防急性胰腺炎肺损伤的新途径。

表 1 胰腺和肺病理评分和MIP-2含量、肺MPO活性、血清AMY和MIP-2浓度 (mean ± SD)

分组	胰腺病理评分	肺病理评分	肺MPO活性 (nkat/g)	血清AMY (nkat/L)	血清MIP-2 (ng/L)	胰腺MIP-2 (ng/g蛋白)	肺脏MIP-2 (ng/g蛋白)
对照3 h	2.0 ± 2.6	0.3 ± 0.6	2.7 ± 0.7	12 575 ± 2135	0.0 ± 0.0	54.9 ± 1.0	63.9 ± 9.6
AP 3 h	14.3 ± 0.8 ^b	1.5 ± 0.8 ^a	3.8 ± 1.5	80 886 ± 72 988 ^a	29.9 ± 19.5 ^b	115.6 ± 81.6	96.5 ± 47.5
对照6 h	1.3 ± 0.6	0.7 ± 0.6	3.0 ± 0.7	11 352 ± 1130	6.6 ± 10.3	68.5 ± 35.2	49.3 ± 9.6
AP 6 h	12.5 ± 4.3 ^b	2.2 ± 0.8 ^b	4.8 ± 1.0 ^a	91 949 ± 79 220 ^a	240.4 ± 161.4 ^{a,c}	72.4 ± 30.3	99.8 ± 48.5

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照; ^c $P < 0.05$ vs AP 3 h.

和血管内皮细胞的黏附更为牢固^[8]。白细胞在炎症局部产生大量的活性氧和脂类代谢产物、脱颗粒和呼吸爆发导致组织损伤^[8]。MIP-2还可动员骨髓中的白细胞释放入血^[9]。趋化细胞因子可以和内皮细胞表面富含硫酸肝素的蛋白多糖大量结合,增加局部有效浓度,同时红细胞表面的DARC (duffy antigen receptor for chemokines)和趋化细胞因子结合,降低其在血液中的有效浓度,形成肺组织微环境中趋化细胞因子的浓度梯度,使白细胞游出并向炎症或损伤局部定向移动^[5,10]。经大鼠气管给MIP-2可导致中性粒细胞在肺组织的明显积聚和组织液渗出^[11-12]。Closa *et al*^[13]用牛黄胆酸钠诱导大鼠AP,肺泡支气管灌洗收集肺泡巨噬细胞培养,培养液中的MIP-2含量升高并可引起正常大鼠肺组织的中性粒细胞聚集。Pastor *et al*^[3]在雨蛙素诱导的小鼠AP肺损伤模型中,发现急性胰腺炎小鼠血清、胰腺和肺组织MIP-2含量明显升高;免疫组化研究显示MIP-2主要表达在胰腺和肺组织的巨噬细胞和血管内皮细胞上;用抗MIP-2抗体分别在制膜前后进行干预,均明显减轻胰腺和肺组织损伤的严重程度,研究结果提示MIP-2通过介导白细胞的趋化和活化在小鼠AP肺损伤模型的病理过程中发挥了关键作用。

我们采用胰胆管逆行注射50 g/L脱氧胆酸钠的方法建立大鼠AP模型,观察肺组织病理学改变及肺组织MPO活性变化评估肺损伤的严重程度,结果发现在AP 3 h组大鼠肺组织即有较为明显的组织病理学改变,可见肺呼吸膜增厚、肺间质炎症浸润及肺泡腔炎性分泌物渗出,部分可见肺不张及肺气肿和肺泡间隔断裂。肺组织镜下病理学评分比对照3 h组高,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。在AP 6 h组上述病理改变更为明显,组织病理学评分进一步升高,与对照6 h组相比差异具有非常显著性意义($P < 0.01$),

肺组织MPO活性升高,与对照6 h组相比差异具有显著性意义($P < 0.05$)。相关分析发现,肺镜下病理评分与胰腺镜下病理评分及肺组织MPO活性呈正相关,说明该模型在3 h时段即可出现肺损伤,在6 h时段更趋严重;胰腺的原发损伤是肺损伤的决定性始动环节;并和“中性粒细胞在肺组织中的浸润和活化介导肺损伤”的国内外学者的已有结论相吻合。我们发现在3 h对照组中不能检出,在6 h对照组含量很低,为6.6 ± 10.3 ng/L;在3 h AP组有明显升高,为29.9 ± 19.5 ng/L,与对照3 h组相比差异具有非常显著性意义($P < 0.01$);在6 h AP组进一步上升,为240.4 ± 161.4 ng/L,与6 h对照组和3 h AP组比较差异具有显著性意义($P < 0.05$)。3 h AP组和6 h AP组的肺组织MIP-2含量及3 h AP组的胰腺MIP-2含量均值比对照组高,但统计学检验未检出差异,推测与样本含量少、组织中MIP-2含量的检测影响因素较多导致检测结果误差较大有关。相关分析发现血清MIP-2浓度与胰腺镜下病理评分、肺镜下病理评分呈正相关;肺组织MIP-2含量与胰腺镜下病理评分、血清AMY呈正相关。大鼠ELR⁺CXC类趋化细胞因子MIP-2与脱氧胆酸钠诱导的大鼠AP肺损伤关系密切,在大鼠AP肺损伤的病理过程中发挥了重要作用,这与Pastor *et al*的研究结果部分相符,具体的作用机制尚需进一步深入研究。

4 参考文献

- 1 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 2 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 3 Pastor CM, Rubbia-Brandt L, Hadengue A, Jordan M, Morel P, Frossard JL. Role of macrophage inflammatory peptide-2 in cerulein-induced acute

■名词解释

趋化细胞因子家族由具有趋化功能的细胞因子组成,根据氨基末端半胱氨酸(C)的数目及位置不同,分为C-X-C(α)、CC(β)、C(γ)和CX₃C(δ)亚家族。CXC类趋化细胞因子又根据是否含有ELR(谷氨酸-亮氨酸-精氨酸)序列分为ELR⁺和ELR⁻两类。ERR⁺CXC趋化细胞因子对中性粒细胞具有明显的选择性趋化活性。

pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Lab Invest* 2003; 83: 471-478

4 Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J* 1989; 3: 2565-2573

5 Blackwell TS, Lancaster LH, Blackwell TR, Venkatakrishnan A, Christman JW. Chemotactic gradients predict neutrophilic alveolitis in endotoxin-treated rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1644-1652

6 Shanley TP, Schmal H, Warner RL, Schmid E, Friedl HP, Ward PA. Requirement for C-X-C chemokines (macrophage inflammatory protein-2 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant) in IgG immune complex-induced lung injury. *J Immunol* 1997; 158: 3439-3448

7 Murakami K, Shibata F, al-Mokdad M, Nakagawa H, Ueno A, Kondo T. Identification and characterization of receptor for cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3 on rat neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232: 562-567

8 Lloyd CM, Rankin SM. Chemokines in allergic airway disease. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 443-448

9 Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity* 2003; 19: 583-593

10 Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445

11 Frevert CW, Farone A, Danaee H, Paulauskis JD, Kobzik L. Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2. *Q Á D P P* 1996; 13: 133-142

12 Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu SM, Rose CE Jr. Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 656-663

13 Closa D, Sabater L, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver. *Ann Surg* 1999; 229: 230-236

同行评价
本研究针对急性胰腺炎(AP)并发肺损伤这一常见的临床现象,从分子水平探求其发病机制,选题合理,意义深远,研究方法先进,统计学处理得当,结果结论可信,学术价值较高。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏,及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验.我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿,免费刊登照片.写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献