

论著

文章编号:1000-5404(2012)16-1654-04

## TNF- $\alpha$ 、IL-8 与急性重症胰腺炎肺损伤中 PMNs 凋亡延迟的相关性研究

徐 军,张 东,仵 正,刘学民,马清涌,潘承恩 (710061 西安,西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科)

**[摘要]** **目的** 探讨肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-8 (IL-8)在急性重症胰腺炎(acute severe pancreatitis, ASP)合并急性肺损伤中中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMNs)凋亡延迟的相关性及其机制。**方法** 选取雄性SD大鼠48只,穿刺胆胰管并注入3.5%牛磺胆酸钠制作ASP合并急性肺损伤大鼠模型,分为牛磺胆酸钠注射后3、6、12 h及对照组。病理检测胰腺及肺组织;于预定时间相取支气管灌洗液,密度梯度离心分离PMNs,流式细胞仪测定PMNs凋亡、坏死比例;ELISA检测灌洗液中TNF- $\alpha$ 及IL-8的含量;检测NF- $\kappa$ B在肺组织中的表达。**结果** ALI大鼠肺灌洗液中PMNs凋亡、坏死比例增加,凋亡延迟。支气管-肺泡灌洗液中的TNF- $\alpha$ 及IL-8的含量较对照组显著增加,灌洗液中细胞TNF- $\alpha$ 及IL-8 mRNA表达增加,不同干预时间组间具有显著差异,具有时间依赖效应;肺组织中NF- $\kappa$ B的表达显著增加。**结论** TNF- $\alpha$ 、IL-8在ASP合并急性肺损伤中可能发挥一定的作用。

**[关键词]** 急性重症胰腺炎;肺损伤;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白细胞介素-8

**[中图分类号]** R392.11;R392.3;R576.102 **[文献标志码]** A

## Correlation of TNF- $\alpha$ and IL-8 with delayed apoptosis in polymorphonuclear leukocytes in rats with severe acute pancreatitis-associated acute lung injury

Xu Jun, Zhang Dong, Wu Zheng, Liu Xuemin, Ma Qingyong, Pan Cheng'en (Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710061, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the roles of TNF- $\alpha$  and IL-8 in the delayed apoptosis in polymorphonuclear leukocyte (PMNs) in rats with acute lung injury after acute severe pancreatitis (ASP). **Methods** Twenty-four male SD rats were inflicted with 3.5% taurocholic acid into the biliopancreatic duct to establish ASP rat model complicated with acute lung injury. After injection, these rats were divided into 3, 6, 12 h groups with 8 rats in each group, and another 24 health rats served as control. At scheduled time, bronchoalveolar lavage fluid from the model and control group was drawn and then PMNs were obtained by gradient density gradient centrifugation. Through flow cytometry, the ratio of apoptosis and necrosis of PMNs was assayed. The expression of NF- $\kappa$ B p65 was detected by immunohistochemical assay. The levels of TNF- $\alpha$  and IL-8 in the bronchoalveolar lavage fluid were determined by ELISA. **Results** The levels of TNF- $\alpha$  and IL-8 in the bronchoalveolar lavage fluid were significantly increased compared with the control and remained higher for a relatively long period ( $P < 0.05$ ). The ratio of survival PMNs was increased ( $P < 0.05$ ), indicating that apoptosis was delayed. The expression of NF- $\kappa$ B p65 in lung tissue in the model rats were significantly higher than control ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TNF- $\alpha$  and IL-8 might play important roles in acute lung injury after acute severe pancreatitis.

**[Key words]** acute severe pancreatitis; lung injury; TNF- $\alpha$ ; IL-8

Corresponding author: Zhang Dong, E-mail: pavilion1021@hotmail.com

急性重症胰腺炎(acute severe pancreatitis, ASP)时大量中性粒细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMNs)聚集于肺组织,并在其后发生的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。PMNs可分泌大量的炎性介质导致急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)发生。目前对于ASP并发急性肺损伤时细胞因子的作用可见相关研

究<sup>[3-5]</sup>,在炎症介质与中性粒细胞凋亡关系方面研究较少。本实验通过制备大鼠ASP合并ALI模型,动态观察肺灌洗液PMNs凋亡的发生规律,以期揭示炎性因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-8(IL-8)在ALI中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

牛磺胆酸钠、牛磺酸(Sigma公司),HRP抗兔二抗(Gen-

**[通信作者]** 张 东, E-mail: pavilion1021@hotmail.com

Script 公司),NF- $\kappa$ B p65 (Santa Cruz 公司),蛋白标准(Fermenta 公司),TNF- $\alpha$  和 IL-8 ELISA 检测试剂盒(BioSource International 公司)。

### 1.2 实验动物及分组

7~8 周龄雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 260~300 g,由西安交通大学医学院实验动物中心提供。按随机数字表法分为实验组和对照组,各组 24 只大鼠。实验前 12 h 禁食,自由饮水,实验组:经胆胰管穿刺注射 3.5% 牛磺胆酸钠 1 ml/kg 制作 ASP 合并急性肺损伤模型;对照组:仅翻动十二指肠。大鼠均于术后 3、6、12 h 剖杀,每个时间点 8 只,胰腺及肺组织行病理学观察。

### 1.3 收集肺泡灌洗液

解剖分离肺,由主气管插入塑料管,注入 10 ml PBS 液,反复灌洗 3 次,回收液体,回收率约 80%。灌洗液经离心后,分别留取上清及细胞沉淀。

### 1.4 肺泡灌洗液 PMNs 分离及凋亡早期和凋亡晚期/坏死细胞定量

将细胞沉淀用 PBS 液重新悬浮,用密度梯度离心 Percoll 液(密度分别为 1.085 和 1.095)行密度梯度离心,离心条件:700  $\times$  g 4  $^{\circ}$ C 30 min,吸取 PMNs 富集层并进一步洗脱纯化,将所获 PMNs 稀释至 1 ml 备用。取上述 PMNs 悬浮液,采用膜联蛋白-V-FLUOS(Annexin V)和碘化丙啶(PI)双标法,用流式细胞仪双通道检测 5 000 个细胞,激发波长 488 nm,发射波长 515、610 nm。膜联蛋白-V 阳性为凋亡早期细胞,碘化丙啶阳性为坏死细胞,膜联蛋白-V、碘化丙啶双阳性为凋亡晚期/坏死细胞。

### 1.5 肺泡灌洗液 TNF- $\alpha$ 及 IL-8 的检测

分别取肺灌洗液 0.5 ml,采用 ELISA 法测定 TNF- $\alpha$  及 IL-8,按试剂盒说明书操作。

### 1.6 免疫组织化学法检测肺组织中 NF- $\kappa$ B 的表达

应用抗 p65 单克隆抗体,该抗体与 NF- $\kappa$ B 的亚单位 p65 区域结合,在正常情况下,此区域被抑制蛋白 I $\kappa$ B 所覆盖,当 I $\kappa$ B

降解后,抗 p65 单克隆抗体可与 p65 结合,因此该抗体能够在原位识别活化的 NF- $\kappa$ B。常规脱蜡、水化、抗原修复后,利用 0.3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇消除内源性过氧化物酶,冲洗后血清封闭;之后常规加入一抗过夜、加入羊抗鼠二抗孵育,加入生物素化过氧化物酶复合物后苏木精复染,DAB 显色,脱水后封闭。结果判定:细胞染色呈棕黄色为阳性,主要定位于细胞质及细胞核。阳性率计算方法:数 3 个不含支气管的高倍视野,分别计算阳性细胞和总细胞数。阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数  $\times$  100%。

### 1.7 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

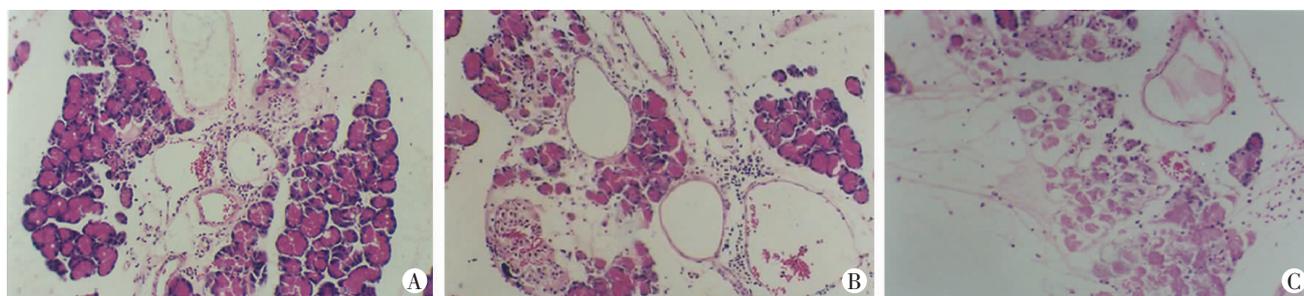
### 2.1 胰腺及肺组织病理观察

对照组胰腺组织结构清晰,未见炎性细胞浸润及出血坏死;实验组可见腺泡、间质水肿,胰腺组织结构破坏,大量炎性细胞浸润伴出血坏死灶(图 1)。

对照组肺组织结构清晰,肺泡壁薄,肺泡腔内偶见巨噬细胞,未见中性粒细胞浸润(图 2A)。实验组可见较多的肺泡萎陷及邻近肺泡隔断裂形成肺大泡,毛细血管扩张、充血,肺间质水肿,肺组织大量中性粒细胞浸润,以肺间质为主,肺泡中也有中性粒细胞浸润,大部分血管腔内可见大量中性粒细胞浸润。制模后 3 h 可见部分肺泡萎陷间质水肿,毛细血管腔内可见中性粒细胞和红细胞聚集,内皮细胞肿胀,细胞质连接间隙增宽,并有大量空泡形成,线粒体空化,内质网扩张,细胞质不连续,有窗孔形成,细胞连接间隙增宽,血管基底膜肿胀,肺泡腔内可见絮状渗出物。制模后 6、12 h 上述病变渐重(图 2)。

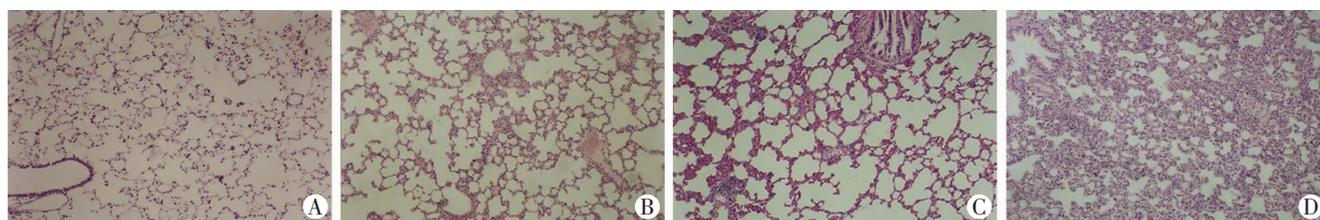
### 2.2 肺泡灌洗液中 PMNs 凋亡检测

对照组大鼠肺泡灌洗液中 PMNs 的凋亡处于相对较高水平,实验组大鼠各时间点肺泡灌洗液中 PMNs 的凋亡明显减少,与



A: 对照组; B: 实验组胰腺组织灶状坏死; C: 实验组胰腺组织大片坏死

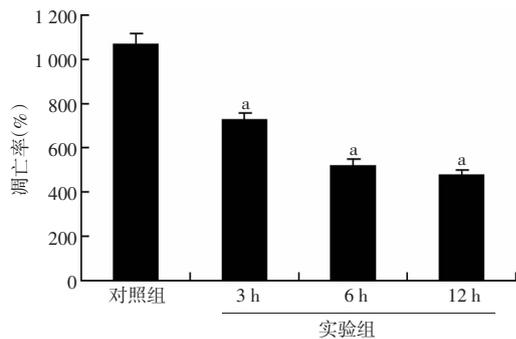
图 1 大鼠重症胰腺炎模型胰腺组织病理变化(HE  $\times$  400)



A: 对照组; B: 实验组 3 h; C: 实验组 6 h; D: 实验组 12 h

图 2 大鼠胰腺炎模型肺组织病理变化(HE  $\times$  100)

对照组存在显著差异( $P < 0.05$ ,图3)。



a:  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图3 各组 PMNs 细胞凋亡检测结果

### 2.3 肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 及 IL-8 检测结果

对照组大鼠肺泡灌洗液中可检测到少量的 TNF- $\alpha$  及 IL-8, ASP 制模后各时段肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  及 IL-8 显著增加, 与对照组有显著性差异( $P < 0.05$ )。并且 TNF- $\alpha$  及 IL-8 在不同干预时间组间具有显著差异, 具有时间依赖效应( $P < 0.05$ , 表1)。

表1 2组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$ 、IL-8 的含量及肺组织中 NF- $\kappa$ B 阳性表达 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	时间点	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-8(ng/ml)	NF- $\kappa$ B(%)
对照组	3 h	44.9 $\pm$ 3.1	0.20 $\pm$ 0.03	2.32 $\pm$ 0.50
	6 h	45.4 $\pm$ 5.8	0.21 $\pm$ 0.02	2.13 $\pm$ 0.42
	12 h	49.9 $\pm$ 3.4	0.23 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.17
实验组	3 h	138.1 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	39.30 $\pm$ 3.50 <sup>a</sup>
	6 h	159.8 $\pm$ 15.4 <sup>a</sup>	1.32 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	30.00 $\pm$ 7.40 <sup>a</sup>
	12 h	163.2 $\pm$ 20.7 <sup>a</sup>	1.86 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	24.56 $\pm$ 4.20 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与对照组对应时间点比较

### 2.4 肺组织 NF- $\kappa$ B 免疫组化结果

正常的胰腺、肺组织很少见 NF- $\kappa$ B 活化的细胞, 活化的 NF- $\kappa$ B 主要表达于急性胰腺炎大鼠肺脏细胞及 PMNs 的细胞质和细胞核中, 以细胞质表达最为显著。实验组肺组织中 NF- $\kappa$ B 表达明显增强, 且实验组 NF- $\kappa$ B 在制模后 3 h 达高峰, 制模后 6 h 开始下降, 12 h 仍维持较高水平, 与对照组有显著性差异( $P < 0.05$ , 表1, 图4)。

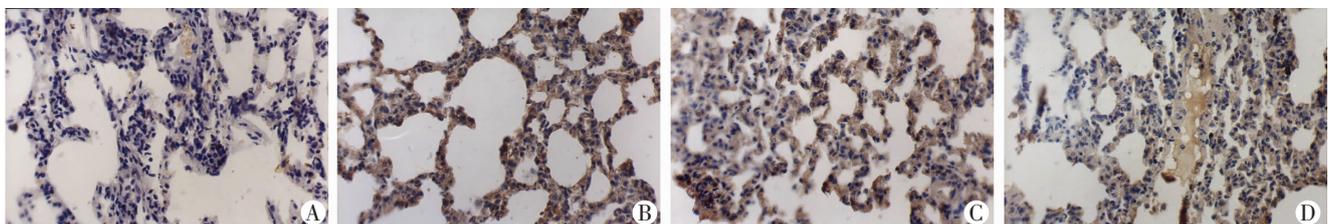
### 3 讨论

本实验采用大鼠 ASP 所致 ALI 模型观察肺组织 NF- $\kappa$ B p65 的激活及时间的依赖性, 证实了 ASP 时肺脏组织 NF- $\kappa$ B 阳性细胞的蛋白表达明显增强, 促使 PMNs 在肺内的浸润及扣押, 并导致 PMNs 在肺内出现凋亡延迟, 与 TNF- $\alpha$  和 IL-8 的表达可能存在相关性。

在 ASP 继发 ALI 时, 内源性细胞因子在 ALI 的发生、发展中起重要作用。其中, TNF- $\alpha$  是急性胰腺炎肺损伤发生的启动因子, 在急性重症胰腺炎合并急性肺损伤的早期出现。TNF- $\alpha$  可通过多种途径引起肺损伤并可诱导巨噬细胞和内皮细胞释放 IL-8, 是中性粒细胞的重要激活因子, 同时也是中型粒细胞的趋化剂。IL-8 通过募集、活化 PMNs, 使其释放大量的细胞毒性物质, 从而增加了肺泡-毛细血管损伤。因此, 支气管肺泡灌洗液中 IL-8 与 ARDS 的预后极为相关<sup>[6-8]</sup>。本研究显示, 大鼠在急性重症胰腺炎继发急性肺损伤时, 肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  和 IL-8 含量均升高; 肺泡灌洗液中 TNF- $\alpha$  在制模后 3 h 即明显升高, 于 6 h 达到高峰, 持续到 12 h。而肺泡灌洗液中 IL-8 含量在制模后 3 h 开始升高, 在 6 h 和 12 h 2 个时间点不断增高。从中可以观察到肺灌洗液中 TNF- $\alpha$  出现高峰表达的时间较 IL-8 出现的要早。

细胞凋亡是近年来的研究热点, PMNs 作为机体防御系统的重要组成部分, 其凋亡的研究日渐受到重视。浸润的 PMNs 通过凋亡的方式被巨噬细胞识别及清除, 可能是使炎症局限和消退、避免组织损伤加重的重要机制<sup>[9-10]</sup>。本研究显示, ASP 大鼠支气管肺泡灌洗液中 PMNs 的凋亡明显降低, 且在 3、6、12 h 维持在低水平, 说明肺组织中 PMNs 的细胞凋亡发生障碍、延迟的现象。同时, ASP 大鼠肺内 PMNs 凋亡与肺部损害的进展呈明显的负相关。上述结果均证实肺内聚集的以中性粒细胞为代表的炎症细胞出现延迟凋亡, 导致其功能寿命延长。

NF- $\kappa$ B 是一种具有多向转录调节作用的蛋白质, 活化的 NF- $\kappa$ B 能启动和调节众多参与炎症反应的细胞因子基因转录, 在机体的炎症反应方面发挥重要作用。在急性胰腺炎继发的 ALI 的过程中 NF- $\kappa$ B 起关键作用, 能够调节细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )、趋化因子和黏附分子(ICAM-1、E-选择素)的基因表达, 在肺部炎症损伤中均起重要作用<sup>[11]</sup>。本研究发现, 对照组大鼠肺组织中部分细胞质呈浅染色, 偶见肺巨噬细胞核着色, 实验组大鼠肺组织中细胞质及细胞核内见分布均匀的棕色颗粒, 明显多于正常组, 表明 NF- $\kappa$ B p65 已活化。



A: 对照组; B: 实验组 3 h; C: 实验组 6 h; D: 实验组 12 h

图4 免疫组织化学法检测肺组织中 NF- $\kappa$ B 的活化表达 (S-P  $\times$  400)

在大鼠急性重症胰腺炎模型中肺脏组织 NF-κB p65 阳性细胞的蛋白表达明显增强而且与时间相关,建模后 3 h 肺脏中 NF-κB p65 阳性细胞的蛋白表达升高;在 12 h 肺脏中 NF-κB p65 阳性细胞的蛋白表达达到峰值,NF-κB p65 的激活具有时间的依赖性,证实了急性重症胰腺炎时,其从细胞质转移至细胞核,从而可能激活 TNF-α 和 IL-8 等细胞因子的转录、合成。

本实验证实了肺泡灌洗液中 TNF-α 和 IL-8 水平的变化与 PMNs 发生凋亡延迟的发生在时间上可能存在相关性,TNF-α 和 IL-8 可能在延缓肺内浸润的中性粒细胞凋亡方面起一定作用。我们推测在急性重症胰腺炎时肺内 TNF-α 和 IL-8 过度生成,使中性粒细胞凋亡延迟,这种机制可能是导致肺损伤发生的一个重要环节。因此,肺泡灌洗液中细胞因子 TNF-α 和 IL-8 的水平变化能直接反映肺损伤的严重程度,对急性肺损伤的发展进程及预后预测有重要参考价值。

参考文献:

[1] Tsushima K, King L S, Aggarwal N R, *et al.* Acute lung injury review [J]. *Intern Med*, 2009, 48(9): 621 - 630.

[2] Zhou M T, Chen C S, Chen B C, *et al.* Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(17): 2094 - 2099.

[3] Giakoustidis A, Mudan S S, Giakoustidis D. Dissecting the stress activating signaling pathways in acute pancreatitis[J]. *Hepatogastroenterology*, 2010, 57(99/100): 653 - 656.

[4] Karen M, Yuksel O, Akyurek N, *et al.* Probiotic agent *Saccharomyces boulardii* reduces the incidence of lung injury in acute necrotizing pancreatitis induced rats [J]. *J Surg Res*, 2010, 160(1): 139 - 144.

[5] Pastor C M, Morel D R, Vonlaufen A, *et al.* Delayed production of IL-18 in lungs and pancreas of rats with acute pancreatitis [J]. *Pancreatology*, 2010, 10(6): 752 - 757.

[6] Chooklin S. Pathogenic aspects of pulmonary complications in acute pancreatitis patients[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(2): 186 - 192.

[7] Su X, Ao L, Zou N, *et al.* Post-transcriptional regulation of TNF-induced expression of ICAM-1 and IL-8 in human lung microvascular endothelial cells: an obligatory role for the p38 MAPK-MK2 pathway dissociated with HSP27 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(9): 1623 - 1631.

[8] Shibata S, Takahashi G, Shioya N, *et al.* Suppressive effects of sivelestat on interleukin 8 and TNF-α production from LPS-stimulated granulocytes in whole blood culture [J]. *J Anesth*, 2010, 24(6): 901 - 907.

[9] Galani V, Tatsaki E, Bai M, *et al.* The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(3): 145 - 150.

[10] Ma X, Chang W, Zhang C, *et al.* Staphylococcal Pantone-Valentine leukocidin induces pro-inflammatory cytokine production and nuclear factor-kappa B activation in neutrophils [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34970.

[11] Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear IκB proteins in the regulation of host immune responses [J]. *J Infect Chemother*, 2008, 14(4): 265 - 269.

(收稿:2012-05-17;修回:2012-07-09)

(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2012)16-1657-01

个案与短篇

64 层 CT 心脏成像诊断主动脉-左心室隧道 1 例

杨柳青,张磊,张冬 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院放射科)

[关键词] 主动脉-左心室隧道;心脏成像;CTA;成人  
[中图法分类号] R816.2 [文献标志码] B

主动脉-左心室隧道(aorta-left ventricular tunnel, ALVT),是主动脉根部有一跨过主动脉瓣与左心室相通的异常管道<sup>[1]</sup>。本病罕见,临床表现多样,易误诊、漏诊<sup>[2]</sup>。本院采用 64 层 CT 心脏成像成功诊断主动脉-左心室隧道 1 例,现报告如下。

1 临床资料

男性患者,41 岁,因“感冒后出现活动后心悸、气促、咳嗽(可咳粉红色泡沫痰)等症状且加重”于 2012 年 2 月 17 日入本院。既往无高血压、冠心病等病史。入院查体:双肺未闻及干、湿罗音;心浊音界向左下扩大,心率 80 次/min,律齐,无额外心音,主动脉瓣膜听诊区及心尖部可闻及 II ~ III 级收缩期杂音。入院检查:ECG 未见异常;胸片示:心影轻度增大(心胸比约 0.53),双肺未见实质病变;超声示:先天性心脏病(左房、室增大;主动脉-左室隧道;主动脉瓣狭窄);64 层 CT 心脏成像示(图 1、2):左室流出道与主动脉右冠窦见一跨过主动脉瓣、管径粗细不均的弧形异常通道,最窄处约 6.9 mm,主动脉窦部直径约 35.5 mm,左房、室增大。诊断为:主动脉-左心室隧道。

2 月 29 日行右冠瓣瘘口补术和主动脉瓣囊袋摘除术。术中见主动脉右冠窦囊袋形成,右冠瓣区有瘘口约 15 mm × 20 mm,囊袋根部连接于室间隔左室面,剪除囊袋,以自体心包补片修补右冠瓣区瘘口。3 月 16 日痊愈出院。

2 月 29 日行右冠瓣瘘口补术和主动脉瓣囊袋摘除术。术中见主动脉右冠窦囊袋形成,右冠瓣区有瘘口约 15 mm × 20 mm,囊袋根部连接于室间隔左室面,剪除囊袋,以自体心包补片修补右冠瓣区瘘口。3 月 16 日痊愈出院。

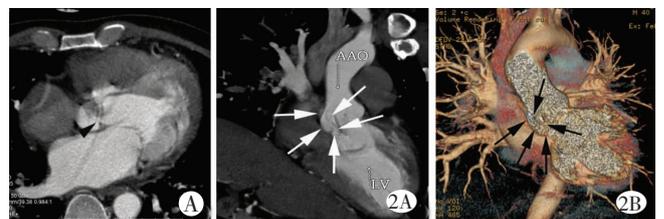


图 1 CT 横断图示左室流出道异常瘘口(箭头示)

图 2 MIP(A)及 VR(B)示右冠窦与升主动脉连接处异常通道(箭头示)

(下转 1662 页)

[通信作者] 张冬, E-mail:hszhangd@163.com