

文章编号: 1005-6947(2013)09-1163-05

· 基础研究 ·

重症急性胰腺炎模型大鼠肺组织血红素加氧酶-1的表达及意义

张全, 曹丽叶, 程树杰, 滑志娟, 徐丽君, 潘瑞芹

(河北大学附属医院 普通外科, 河北 保定 071000)

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)肺组织血红素加氧酶-1(HO-1)活性的变化和意义以及乌司他丁的干预作用。

方法: 将大鼠随机分为正常对照组, SAP模型组, HO-1诱导剂组和乌司他丁组, 后3组大鼠用5%牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射制法诱导SAP模型, 其中HO-1诱导剂组和乌司他丁组于造模后5 min分别静脉注射牛血晶素和乌司他丁, 而SAP模型组给予等体积生理盐水。于术后不同时间点观察各组的肺组织病理变化, 检测肺组织湿/干重比、髓过氧化物酶(MPO)活性及HO-1的表达量。

结果: 除正常对照组外, 各组均出现明显的肺损伤, 但2个治疗组的肺损伤情况明显好于SAP模型组。与正常对照组比较, 各组术后肺组织湿/干重比、肺组织MPO活性及HO-1的表达量均明显升高(均 $P<0.05$), 且基本呈随时间延长的增加趋势; 与SAP模型组比较, 2个治疗组肺组织湿/干重比、MPO活性降低, HO-1的表达量升高(均 $P<0.05$); 2个治疗组间比较, 以上指标的差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。相关分析显示, SAP大鼠肺组织HO-1活性与肺组织MPO活性和湿/干重比均呈明显负相关($r=-0.79, -0.77$, 均 $P<0.05$)。

结论: SAP大鼠肺组织HO-1活性增高, 应用HO-1诱导剂增加肺组HO-1活性能减轻SAP急性肺损伤, 乌司他丁对SAP急性肺损伤保护作用也可能部分与升高HO-1活性有关。

关键词

胰腺炎, 急性坏死性; 急性肺损伤; 血红素加氧酶-1; 过氧化物酶

中图分类号: R657.5 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.012
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3630.shtml>

Heme oxygenase 1 expression in lung tissues in rats with severe acute pancreatitis and its significance

ZHANG Quan, CAO Liye, CHENG Shujie, HUA Zhijuan, XU Lijun, PAN Ruiqin

(Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

Corresponding author: CAO Liye, Email: zztmm0321@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the alteration in heme oxygenase 1 (HO-1) activity in lung tissues from rats with severe acute pancreatitis (SAP) and its significance, as well as the influence of ulinastatin intervention.

收稿日期: 2012-11-29; 修订日期: 2013-04-15。

作者简介: 张全, 河北大学附属医院副主任医师, 主要从事重症急性胰腺炎方面的研究。

通信作者: 曹丽叶, Email: zztmm0321@163.com

Methods: Rats were randomly divided into normal control group, SAP model group, HO-1 inducer treatment group and ulinastatin treatment group. Rats in the latter 3 group underwent retrograde cholangiopancreatic duct injection of 5% sodium taurocholate to elicit SAP model, and then rats in HO-1 inducer treatment group and ulinastatin treatment group were intravenously injected with bovine hemin or ulinastatin at 5 min after SAP model induction respectively, while those in SAP model group were injected with normal saline instead. On different time points after operation, in each group of rats, the pathological changes in the lung tissues were assessed, and the wet-to-dry lung weight ratio as well as the myeloperoxidase (MPO) activity and HO-1 expression in the lung tissues were determined.

Results: Except in the normal control group, rats in all other groups exhibited obvious lung injury, which in the two treatment groups was obviously milder than that in SAP model group. Compared with normal control group, the wet-to-dry lung weight ratio, and pulmonary MPO activity and HO-1 expression in all the remaining groups were significantly elevated (all $P < 0.05$), with a basically time increasing trend. Compared with SAP model group, the wet-to-dry lung weight ratios and pulmonary MPO activities were significantly decreased, while lung HO-1 expressions were significantly increased in the two treatment groups (all $P < 0.05$). No statistical difference was noted in any of the parameters between the two treatment groups (all $P > 0.05$). The correlation analysis revealed that there was a significant relationship between HO-1 expression in the lung tissue and pulmonary MPO activity or wet-to-dry lung weight ratio in SAP rats ($r = -0.79$ and -0.77 , both $P < 0.05$).

Conclusion: HO-1 activity is increased in rat lung tissue during SAP, and its enhancement through using HO-1 inducer can alleviate the SAP-induced acute lung injury. The protective effect of ulinastatin against SAP-induced acute lung injury may be partially associated with promotion of HO-1 activity.

KEY WORDS

Pancreatitis, Acute Necrotizing; Acute Lung Injury; Heme Oxygenase-1; Peroxidase

CLC number: R657.5 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.012

重症急性胰腺炎 (SAP) 时除胰腺本身缺血、坏死外, 更多地表现为急性胰腺炎伴多脏器功能紊乱及多脏器衰竭的全身性反应, 其中以急性肺损伤 (ALI) 和急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 最常见, 约 60% 的患者死亡是由肺部并发症引起^[1-3]。血红素加氧酶 (HO) 是血红素分解代谢的限速酶^[4], 其中血红素加氧酶-1 (HO-1) 的主要功能是代谢血红素形成胆绿素 (迅速转化为胆红素)、CO 及亚铁离子 (诱导和参与体内铁蛋白的合成), 这些产物可产生抗氧化、抗炎症、抗凋亡等一系列生物学效应, 参与机体的多种病理生理过程, 在调控多种参与 ALI 的炎症介质的基因表达上起重要作用^[5-6]。本研究检测了 SAP 大鼠肺组织 HO-1 的活性改变, 并观察乌司他丁对 SAP 所致的 ALI 肺组织内 HO-1 活性的影响, 现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂 牛磺胆酸钠 (Sigma 公司)、牛血晶素 (HO-1 诱导剂) (B&D 公司)、髓过氧化物酶 (MPO) 检测试剂盒购自南京建成试剂公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自江苏碧云天公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 实验动物与分组 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 128 只, 体质量 250~320 g, 随机分为正常对照组, SAP 模型组, HO-1 诱导剂组, 乌司他丁组, 每组 32 只。

1.2 实验方法

1.2.1 SAP 模型制作 SAP 组、HO-1 诱导剂组、乌司他丁组先制备大鼠 SAP 模型。实验前 24 h 内禁食, 自由饮水。用 3% 戊巴比妥钠注射麻醉后, 于大鼠上腹正中作切口逐层入腹, 确认肝门部肝总管及胰胆管。先用血管夹夹闭胆胰管入肝

门段及十二指肠处,用0.5 mL的微量注射器逆行胆胰管内注射5%牛磺胆酸钠(0.1 mL/100 g),注射速度0.2 mL/min,10 min后当观察到大鼠脾、胃、十二指肠间弥散存在的胰腺组织出现弥漫性出血点时,拔出针头,去除血管夹,关腹。HO-1诱导剂组于造模后5 min向肠系膜静脉注射牛血晶素75 μg/kg,乌司他丁组注射 4×10^4 U/kg乌司他丁,SAP模型组注射等量生理盐水。

1.2.2 检测指标及其方法 于术后3,6,12,24 h各组分别处死8只大鼠,观察大体形态后,取右肺上叶,10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片及苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织形态学变化。立即取右肺下叶按试剂盒要求行MPO活性检测;取左肺上叶用电子天平称湿重后,置烤箱(80℃,20 h)中烤至恒重,计算湿/干重比;取左肺下叶组织制成微粒体悬液,用考马斯亮兰法测定HO-1活性^[7]。

1.3 统计学处理

应用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,

计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析(one-way ANOVA)和Spearman相关性分析,有统计学差异者用SNK *q*检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织的形态学变化

正常组大鼠肺组织大体与镜下结构未见异常(图1A)。SAP组6 h点肺组织开始出现水肿、充血及弥漫性出血点,并随时间延长而逐渐加重,出血点增多,部分大鼠胸水由淡黄色变为混浊胸水,并可见部分肺组织局部出现萎陷,24 h时最严重。镜下以肺间质病变为主,可见不同程度的弥漫性肺水肿,肺组织毛细血管明显扩张、充血,白细胞附壁,肺泡隔增宽,大量白细胞渗出、聚集,部分肺泡腔中可见渗出液、出血、萎陷不张(图1B)。HO-1诱导剂组(图1C)、乌司他丁组(图1D)病变均轻于SAP模型组。

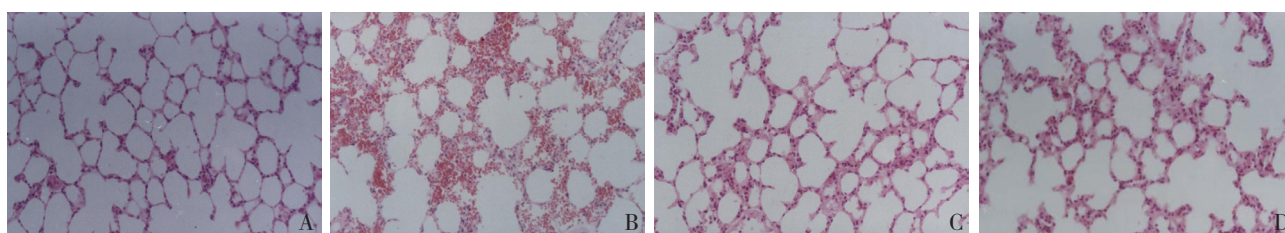


图1 各组术后24 h肺组织病理图片(HE×200) A: 正常对照组; B: SAP模型组; C: HO-1诱导剂组; D: 乌司他丁组

Figure 1 The pathological findings in the lung tissues from each group of rat 24 h after operation (HE×200) A: Normal control group; B: SAP model group; C: HO-1 inducer treatment group; D: Ulinastatin treatment group

2.2 各组肺湿/干重比值

正常组肺湿/干重比维持在相对稳定水平,无明显变化;其余各组肺湿/干重比值于3 h开始升高,24 h达高峰,与正常对照组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与SAP模型组比较,

乌司他丁组和HO-1诱导剂组3,6 h差异无明显差异(均 $P > 0.05$),但12,24 h均明显降低(均 $P < 0.05$);乌司他丁组和HO-1诱导剂组各时点比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)(表1)。

表1 各组不同时点肺组织湿/干重比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The wet-to-dry lung weight ratios at different time points in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(h)			
	3	6	12	24
正常对照组	4.33 ± 0.057	4.30 ± 0.094	4.32 ± 0.088	4.29 ± 0.087
SAP模型组	4.68 ± 0.059 ¹⁾	4.78 ± 0.101 ¹⁾	4.91 ± 0.113 ¹⁾	4.95 ± 0.097 ¹⁾
HO-1诱导剂组	4.64 ± 0.096	4.75 ± 0.063 ¹⁾	4.83 ± 0.047 ^{1),2)}	4.84 ± 0.066 ^{1),2)}
乌司他丁组	4.65 ± 0.064	4.70 ± 0.064 ¹⁾	4.81 ± 0.062 ^{1),2)}	4.85 ± 0.038 ^{1),2)}

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与SAP模型组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. normal control group; 2) $P < 0.05$ vs. SAP model group

2.3 各组肺组织 MPO 活性

正常组肺组织内 MPO 活性各时点处于低水平, 与其余各组比较, 各时点均有统计学差异 (均 $P < 0.05$); SAP 模型组于 3 h 开始上升, 12 h 达高峰。HO-1 诱导剂组与 SAP 组相比, 3 h 已开始

升高, 峰值出现在 12 h, 24 h 仍处于较高水平; 乌司他丁组与 HO-1 诱导剂组比较, 各时间点均无统计学差异; 乌司他丁组和 HO-1 诱导剂组分别与 SAP 模型组比较, 6, 12, 24 h 均有统计学差异 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组不同时间点肺组织 MPO 活性 ($\bar{x} \pm s$, U/g)

Table 2 The pulmonary MPO activities at different time points in each group ($\bar{x} \pm s$, U/g)

组别	术后时间 (h)			
	3	6	12	24
正常对照组	0.7434 ± 0.0765	0.7598 ± 0.0633	0.7576 ± 0.0666	0.7336 ± 0.0945
SAP 模型组	1.1710 ± 0.0597 ¹⁾	1.7054 ± 0.0669 ¹⁾	2.4934 ± 0.0263 ¹⁾	2.4318 ± 0.0580 ¹⁾
HO-1 诱导剂组	1.0426 ± 0.0751 ¹⁾	1.3578 ± 0.1040 ^{1), 2)}	1.7946 ± 0.0904 ^{1), 2)}	1.5778 ± 0.0671 ^{1), 2)}
乌司他丁组	1.2056 ± 0.0609 ¹⁾	1.4408 ± 0.455 ^{1), 2)}	1.8924 ± 0.0523 ^{1), 2)}	1.6444 ± 0.1007 ^{1), 2)}

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与 SAP 模型组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. normal control group; 2) $P < 0.05$ vs. SAP model group

2.4 各组肺组织中 HO-1 活性

SAP 组肺组织中 HO-1 活性明显升高, 各时间点均明显高于正常对照组 (均 $P < 0.05$); HO-1 诱导剂组和乌司他丁组肺组织中各时间点 HO-1

活性均高于 SAP 模型组 (均 $P < 0.05$), 但 HO-1 诱导剂组与乌司他丁组间各时间点差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$) (表 3)。

表 3 各组肺组织中 HO-1 活性变化 ($\bar{x} \pm s$, nmol/mg 蛋白 · h)

Table 3 The pulmonary HO-1 activities at different time points in each group ($\bar{x} \pm s$, nmol/mg protein · h)

组别	术后时间 (h)			
	3	6	12	24
正常对照组	157.48 ± 34.92	159.12 ± 29.14	160.43 ± 30.64	157.67 ± 30.56
SAP 模型组	162.43 ± 37.31 ¹⁾	554.28 ± 52.76 ¹⁾	561.85 ± 48.69 ¹⁾	596.12 ± 46.68 ¹⁾
HO-1 诱导剂组	158.92 ± 33.82 ^{1), 2)}	869.71 ± 52.76 ^{1), 2)}	966.79 ± 64.72 ^{1), 2)}	1001.35 ± 68.90 ^{1), 2)}
乌司他丁组	155.93 ± 22.47 ^{1), 2)}	782.45 ± 33.41 ^{1), 2)}	878.18 ± 62.44 ^{1), 2)}	865.98 ± 60.22 ^{1), 2)}

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与 SAP 模型组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. normal control group; 2) $P < 0.05$ vs. SAP model group

2.5 SAP 肺组织中 HO-1, MPO 活性和湿 / 干重间的相关性分析

相关分析显示, SAP 大鼠肺组织内 HO-1 活性分别与肺组织 MPO 活性和湿 / 干重比均呈明显负相关 ($r = -0.79, -0.77$, 均 $P < 0.05$), 肺组织 MPO 活性与湿 / 干重比呈明显正相关 ($r = 0.81$, $P < 0.05$)。

3 讨论

SAP 在病理上表现为急性坏死性胰腺炎 (ANP), 大部分 SAP 死亡病例是由 ANP 合并 ALI 和 ARDS 所引起^[8]。SAP 时肺内毛细血管通透性增加, 中性粒细胞在肺内黏附、聚集、释放^[9]。ALI 的本质是一种肺内过度性、失控性的炎症反

应, 其基本病理特征为中性粒细胞于肺内大量聚集、释放及延迟凋亡^[10], 限制中性粒细胞在肺内黏附、聚集、释放, 纠正促炎—抗炎反应失衡是防治 ALI 的关键^[11]。对 SAP 合并 ALI 目前尚无特异、有效的治疗方法。应用牛黄胆酸钠逆行注射是经典的 SAP 合并 ALI 动物疾病模型制作方法^[12]。每个中性粒细胞内都存在一定量的 MPO, 约占细胞干重的 5%。MPO 具有使 H_2O_2 还原的能力, 利用这一特点可以分析酶的活力, 以及定量测定肺组织中中性粒细胞的数目。本研究中 SAP 合并 ALI 大鼠肺组织内 MPO 活性明显升高, 并且与肺组织湿 / 干重比呈正相关。表明中性粒细胞在肺内聚集程度与肺损伤严重程度相一致 ($r = 0.81$, $P < 0.05$)。SAP 过程中, 肺组织内 HO-1 活性有不同程度的升高, 且 HO-1 活性与

肺内 MPO 活性、肺组织湿/干重比呈负相关 ($r = -0.79, -0.77$, 均 $P < 0.05$)。表明肺组织内 HO-1 表达上调对 SAP 合并 ALI 具有一定的保护作用,这可能是机体抵御炎症性损伤的一种自我保护机制。Mumby 和 Li 等^[13-14]研究 HO-1 表达上调,可以缓解 ALI。笔者前期研究也显示出 HO-1 诱导剂可以引起 SAP 大鼠组各时段 NF- κ B 活性及 12, 24 h 细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) mRNA 的表达明显下降。其可能通过阻断 NF- κ B 激活的信号转导通路,下调 ICAM-1 表达,从而可以改善 SAP 合并肺损伤的严重程度^[15]。目前药物诱导 HO-1 表达上调的方法均因安全性和不良反应等问题未能达到理想的效果^[16-17]。因此寻找安全、高效的 HO-1 诱导剂具有重要的临床意义。乌司他丁作为一种炎症介质抑制剂,在 SAP 等疾病治疗中被广泛应用,但其具体机制尚未完全明了。Li 等^[18]最近研究乌司他丁可以抑制趋化因子的表达而保护 SAP 时的肺损伤。金丽艳等^[19]研究证实乌司他丁可以增加肺组织中 HO-1 的表达而缓解油酸所导致的 ALI。本研究结果证实,SAP 大鼠注射乌司他丁后,光镜下肺组织病理形态学改变明显减轻,肺组织内 HO-1 活性显著增强,MPO 活性及肺组织湿/干重明显下降。表明上调 HO-1 的表达可能是乌司他丁抗炎的重要机制之一。本文结果为临床上乌司他丁治疗重症急性胰腺炎合并肺损伤提供理论依据。

参考文献

- [1] Shields CJ, Winter DC, Redmond HP. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms, prevention, and therapy[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, 8(2):158-163.
- [2] Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights[J]. *Chest*, 2003, 124(6):2341-2351.
- [3] 黄荣柏, 胡锡琼. 重症急性胰腺炎手术时机选择的发展与演变[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(6):460-463.
- [4] Motterlini R. Heme oxygenase-1: a key step in counteracting cellular dysfunction[J]. *Cell Mol Biol(Noisy-le-grand)*, 2005, 51(4):343-346.
- [5] Soares MP, Marguti I, Cunha A, et al. Immunoregulatory effects of HO-1: how does it work?[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(4):482-489.
- [6] Dennery PA, Visner G, Weng Yi, et al. Resistance to hyperoxia with heme oxygenase-1 disruption: role of iron[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(1):124-133.
- [7] Zhou JL, Ling YL, Jin GH, et al. Endogenous carbon monoxide attenuates lung injury following ischemia-reperfusion in the hind limbs of rats[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2002, 54(3):229-233.
- [8] Rau BM, Bothe A, Kron M, et al. Role of early multisystem organ failure as major risk factor for pancreatic infections and death in severe acute pancreatitis[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4(8):1053-1061.
- [9] Tahamont MV, Barie PS, Blumenstock FA, et al. Increased lung vascular permeability after pancreatitis and trypsin infusion[J]. *Am J Pathol*, 1982, 109(1):15-26.
- [10] Gu J, Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome[J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(4):1136-1147.
- [11] Johnson ER, Matthay MA. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment[J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010, 23(4):243-252.
- [12] Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, et al. Localized pancreatic NF-kappa B activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(6):G1197-1208.
- [13] Mumby S, Upton RL, Chen Y, et al. Lung heme oxygenase-1 is elevated in acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(5):1130-1135.
- [14] Li J, Li D, Liu X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce systemic inflammation and attenuate LPS-induced acute lung injury in rats[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2012, 9(1):33.
- [15] 王志威, 彭奕冰, 费健, 等. 血红素加氧酶-1 对重症急性胰腺炎小鼠模型保护作用的实验研究[J]. *外科理论与实践*, 2010, 15(2):19-22.
- [16] Song AM, Bhagat L, Singh VP, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(5):G1166-1174.
- [17] Bansal S, Chhibber S. Curcumin alone and in combination with augmentin protects against pulmonary inflammation and acute lung injury generated during *Klebsiella pneumoniae* B5055 -induced lung infection in BALB/c mice[J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 4):429-437.
- [18] Li F, Zhang H, Xu KY, et al. Role of the chemokine fractalkine in a rat model of acute necrotizing pancreatitis and the interventional effect of ulinastatin[J]. *Arch Iran Med*, 2013, 16(2): 83-87.
- [19] 金丽艳, 徐军美, 贺志敏. 乌司他丁对油酸致急性肺损伤大鼠肺组织血红素氧化酶-1 的影响[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(4):675-678.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 张全, 曹丽叶, 程树杰, 等. 重症急性胰腺炎模型大鼠肺组织血红素加氧酶-1 的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(9):1163-1167. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.012
 Cite this article as: ZHANG Q, CAO LY, CHENG SJ, et al. Heme oxygenase 1 expression in lung tissues in rats with severe acute pancreatitis and its significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(9):1163-1167. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.012