

文章编号:1005-6947(2008)03-0210-04

· 胰腺炎专题研究 ·

# 他克莫司对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的治疗作用

刘建华, 赵青川, 窦科峰, 蔡文科, 李丙所, 党军强, 王江, 张福琴

(第四军医大学西京医院 肝胆外科, 陕西 西安 710032)

**摘要:**目的 观察他克莫司(Tacrolimus, FK506)对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肺损伤的潜在治疗作用并探究其机制。方法 健康雌性SD大鼠54只,随机分为对照组(C组)、SAP组(S组)、SAP+Tacrolimus治疗组(ST组)。检测3组大鼠术后3,6,12h血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及基质金属蛋白酶9(MMP-9)水平、支气管肺泡灌洗液(BALF)蛋白含量、肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性,并计算存活率,观察肺组织及胰腺组织的病理变化。结果 S组血清TNF- $\alpha$ 及MMP-9水平和BALF蛋白含量及肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性均较对照组显著升高( $P < 0.01$ );与S组比较,ST组12h后上述指标均明显降低[TNF- $\alpha$ : (171.31  $\pm$  19.58) vs (243.17  $\pm$  26.19); MMP-9: (1 658.32  $\pm$  27.49) vs (2 987.34  $\pm$  34.53); MPO: (2.75  $\pm$  0.22) vs (11.27  $\pm$  0.49); BALF: (631.58  $\pm$  57.25) vs (1 987.39  $\pm$  158.34)](均 $P < 0.01$ ),ST组存活率高于S组( $P < 0.01$ )。组织病理切片提示S组胰腺、肺组织损伤随病情进展而逐渐加重;ST组较S组减轻。结论 Tacrolimus可有效降低SAP大鼠肺损伤的严重程度,能提高其存活率,对SAP有一定的治疗作用。其机制可能与减少肺脏的毛细血管通透性、抑制中性粒细胞(PMN)释放MPO和MMP-9及抑制TNF- $\alpha$ 等炎症介质的释放有关。

[中国普通外科杂志,2008,17(3):210-213]

**关键词:** 胰腺炎/病理学; 他克莫司/治疗应用; 中性粒细胞; 肺损伤

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

## The therapeutic effect of tacrolimus against the lung injuries induced by severe acute pancreatitis in rats

LIU Jianhua, ZHAO Qingchuan, DOU Kefeng, CAI Wenke, LI Bingsuo, DANG Junqiang, WANG jiang, ZHANG Fuqin

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**Abstract: Objective** To observe the potential therapeutic effect of tacrolimus against lung injuries induced by severe acute pancreatitis (SAP) in rats and investigate its mechanism. **Methods** Fifty-four female SD rats were randomly divided into 3 groups: Control group (group C), SAP group (group S) and SAP + tacrolimus treatment group (group ST) ( $n = 18$  each group). Serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), myeloperoxidase (MPO) activity of lung tissue and the protein content of bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were evaluated 3, 6, and 12h after operation. The survival rates of 3 groups were also evaluated, and histopathologic changes of lung and pancreas were observed.

**Results** In group S, serum level of TNF- $\alpha$  and MMP-9, MPO activity of lung tissue, and the protein content of BALF were significantly increased than those in group C (all  $P < 0.01$ ). All the indicators of group ST were significantly decreased 12h after operation as compared with group S [TNF- $\alpha$ : (171.31  $\pm$  19.58) vs (243.17  $\pm$  26.19); MMP-9: (1 658.32  $\pm$  27.49) vs (2 987.34  $\pm$  34.53); MPO: (2.75  $\pm$

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30271281)。

**收稿日期:**2007-10-29; **修订日期:**2008-02-13。

**作者简介:**刘建华,男,第四军医大学西京医院硕士研究生,主要从事肝脏移植基础和临床方面的研究。

**通讯作者:**窦科峰 E-mail:gdwk@fmmu.edu.cn

0.22) vs (11.27 ± 0.49); BALF: (631.58 ± 57.25) vs (1987.39 ± 158.34)] ( $P < 0.01$ ). Histopathology showed that the lung and pancreas injuries in group S were gradually aggravated with disease progression, and alleviated obviously with tacrolimus treatment. **Conclusions** Tacrolimus can relieve the severity of lung injuries of pancreatitis rats, increase survival rate, and provide a certain therapeutic effect for SAP rats. The mechanism of tacrolimus effect may be related to the reduction of lung blood capillary permeability, and the inhibition of serum level of TNF- $\alpha$  and MMP-9, lung MPO, and other inflammatory factors.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 210-213 ]

**Key words:** Pancreatitis/pathol; Tacrolimus/ther use; Polymorphonuclear Neutrophils; Lung Injuries

**CLC number:** R 657.51

**Document code:** A

本课题前期研究表明,他克莫司(Tacrolimus, FK506)对急性重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)所致肺损伤具有明显的保护作用<sup>[1]</sup>,但其机制不明。本研究通过给SAP大鼠腹腔注射tacrolimus(1.0 mg/kg),观察其对SAP并发肺损伤可能的治疗作用,并初步探讨其内在机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Tacrolimus注射剂(购自日本腾泽公司,5 mg/mL),牛磺胆酸钠(购自美国Sigma公司),大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )放射免疫试剂盒(购自解放军总医院),大鼠基质金属蛋白酶9(MMP-9)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(购自美国RapidBio实验室),UV-7504型紫外可见分光光度计(上海精密仪器表有限公司)。健康雌性SD大鼠54只,体重180~220 g,由第四军医大学实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 将大鼠随机分为对照组(C组),SAP组(S组),SAP+Tacrolimus组(ST组),每组18只,每组又随机平均分为术后3,6,12 h时相组。每时相组6只。

1.2.2 模型建立 采用5%牛磺胆酸钠(40 mg/kg)沿胰胆管逆行注射构建SAP大鼠模型<sup>[2]</sup>。ST组在SAP模型建立后立即腹腔注射Tacrolimus(1.0 mg/kg)。C组注射等量生理盐水。

1.2.3 标本收集 3组分别于术后3,6,12 h处死6只大鼠,心脏取血,留取胰腺和肺组织待用。夹闭左肺支气管,行右肺支气管肺泡灌洗术,共3次,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)混匀后离心(1500 r/min, 10 min),取上清-70℃冻存并测定BALF蛋白含量<sup>[3]</sup>。取小块左肺组织,迅速-80℃冻存,待测髓过氧化物酶(MPO)活性。

1.2.4 血清TNF- $\alpha$ 和MMP-9水平测定 心脏取血,置室温下1 h后离心取上清液(2500 r/min, 5 min),按照TNF- $\alpha$ 放射免疫试剂盒和MMP-9

ELISA试剂盒说明书测定各组大鼠3,6,12 h血清TNF- $\alpha$ 和MMP-9含量。

1.2.5 肺组织MPO活性检测 取肺组织约100 mg,加5 g/L溴化十六烷基三甲胺(HTAB)1 mL制备匀浆,反复冻融3次并超声粉碎(10 s × 3次),4℃离心(3000 r/min, 30 min)取上清液0.1 mL加入邻联二茴香胺缓冲液2.9 mL,保持25℃,立即在分光光度计460 nm波长下扫描2 min,记录30 s和90 s时的吸光度差值,以此1 min内吸光度的变化代表酶活力的改变,MPO活力单位(U/g) = ( $\Delta A_{460}/\text{min}$ )/11.3 × [g(所加组织量)/L(反应液)]。

1.2.6 病理形态学观察 胰腺和肺组织用4%多聚甲醛固定,常规HE染色后于光镜下观察病理改变。

### 1.3 统计学处理

使用SPSS11.0统计软件进行数据分析。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行t检验分析组间差异。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血清TNF- $\alpha$ 水平的变化

S组和ST组TNF- $\alpha$ 水平在各时相均高于C组( $P < 0.01$ );ST组较S组明显降低( $P < 0.05$ ),呈时间依赖性(表1)。

表1 各组大鼠血清TNF- $\alpha$ 的变化(ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 h	6 h	12 h
C组	6	43.93 ± 10.49	43.67 ± 11.06	44.58 ± 10.32
S组	6	593.62 ± 46.13 <sup>1)</sup>	375.48 ± 37.38 <sup>1)</sup>	243.17 ± 26.19 <sup>1)</sup>
ST组	6	469.86 ± 31.34 <sup>1),2)</sup>	306.65 ± 28.12 <sup>1),2)</sup>	171.31 ± 19.58 <sup>1),2)</sup>

注:1)与C组比较 $P < 0.01$ ;2)与S组比较 $P < 0.05$

### 2.2 各组大鼠血清MMP-9的变化

S组和ST组MMP-9水平在各时相均高于C组( $P < 0.01$ );ST组较S组明显降低( $P < 0.05$ ),呈时间依赖性(表2)。

表2 各组大鼠血清MMP-9的变化( $\text{ng/mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 h	6 h	12 h
C组	6	26.31 ± 21.80	27.52 ± 20.69	26.80 ± 22.86
S组	6	1147.68 ± 22.19 <sup>1)</sup>	2943.61 ± 32.14 <sup>1)</sup>	2987.34 ± 34.53 <sup>1)</sup>
ST组	6	887.62 ± 25.61 <sup>1),2)</sup>	1467.58 ± 22.37 <sup>1),2)</sup>	1658.32 ± 27.49 <sup>1),2)</sup>

注:1)与C组比较 $P < 0.01$ ; 2)与S组比较 $P < 0.05$

表4 各组大鼠BALF蛋白含量的变化( $\text{mg/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 h	6 h	12 h
C组	6	265.74 ± 12.73	298.26 ± 17.54	307.59 ± 16.52
S组	6	891.61 ± 55.81 <sup>1)</sup>	1485.67 ± 114.56 <sup>1)</sup>	1987.39 ± 158.34 <sup>1)</sup>
ST组	6	462.17 ± 28.33 <sup>1),2)</sup>	527.94 ± 50.63 <sup>1),2)</sup>	631.58 ± 57.25 <sup>1),2)</sup>

注:1)与C组比较 $P < 0.01$ ; 2)与S组比较 $P < 0.01$

### 2.3 各组大鼠肺组织MPO活性的变化

S组和ST组MPO水平在各时相均高于C组( $P < 0.01$ );ST组较S组明显降低( $P < 0.05$ ),呈时间依赖性(表3)。

表3 各组大鼠肺组织MPO活性的变化( $\text{U/g}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	3 h	6 h	12 h
C组	6	0.98 ± 0.06	1.05 ± 0.07	1.06 ± 0.09
S组	6	3.96 ± 0.27 <sup>1)</sup>	8.37 ± 0.38 <sup>1)</sup>	11.27 ± 0.49 <sup>1)</sup>
ST组	6	1.87 ± 0.08 <sup>1),2)</sup>	2.25 ± 0.16 <sup>1),2)</sup>	2.75 ± 0.22 <sup>1),2)</sup>

注:1)与C组比较 $P < 0.01$ ; 2)与S组比较 $P < 0.01$

### 2.4 各组大鼠BALF蛋白含量的变化

S组各时间点BALF中的白蛋白含量明显高于C组( $P < 0.01$ ),并随着时间的延长而逐渐增加;ST组BALF蛋白含量较S组明显降低( $P < 0.01$ ),呈时间依赖性,说明Tacrolimus减少SAP肺脏的血管渗透(表4)。

### 2.5 大鼠存活率

C组大鼠生存良好。ST组大鼠全部存活;S组大鼠死亡率随时间逐渐增高,3,6,12 h存活率分别为100% (6/6),75% (4/6),50% (3/6);结果表明Tacrolimus治疗明显提高了SAP大鼠的存活率,两组比较差异均有显著性( $P < 0.01$ )。

### 2.6 大鼠胰腺和肺组织的病理变化

2.6.1 肺组织病理变化 S组大鼠12 h后肉眼见全肺充血,斑片状坏死;镜下见肺间质水肿,肺泡结构紊乱,血管扩张瘀血,大量炎细胞浸润,以中性粒细胞为主(图1B)。ST组上述变化明显减轻(图1C)。

2.6.2 胰腺组织病理变化 S组12 h后肉眼可见血性腹水,胰腺水肿坏死,胰周及网膜可见皂化斑。光镜下见胰腺大片坏死,间质出血并炎细胞浸润,小叶轮廓破坏(图2B)。ST组上述变化明显减轻(图2C)。

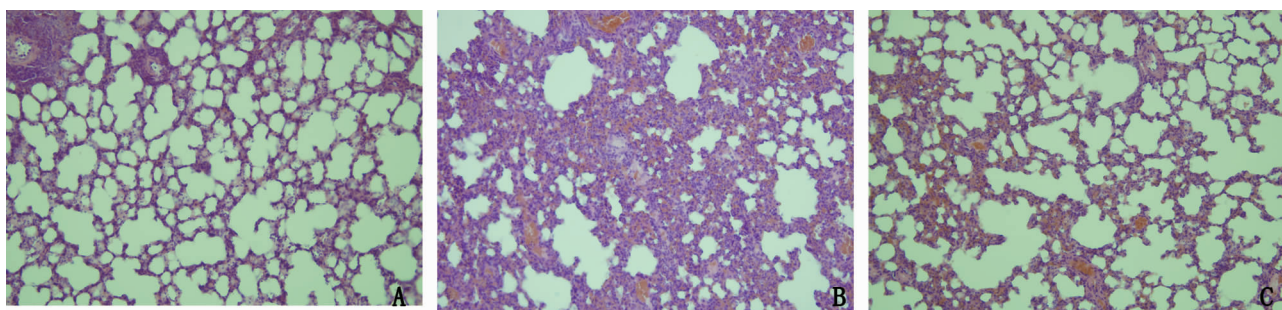


图1 12 h肺组织病理变化(HE × 200) A:对照; B:SAP; C:SAP + Tacrolimus (1.0 mg/kg)

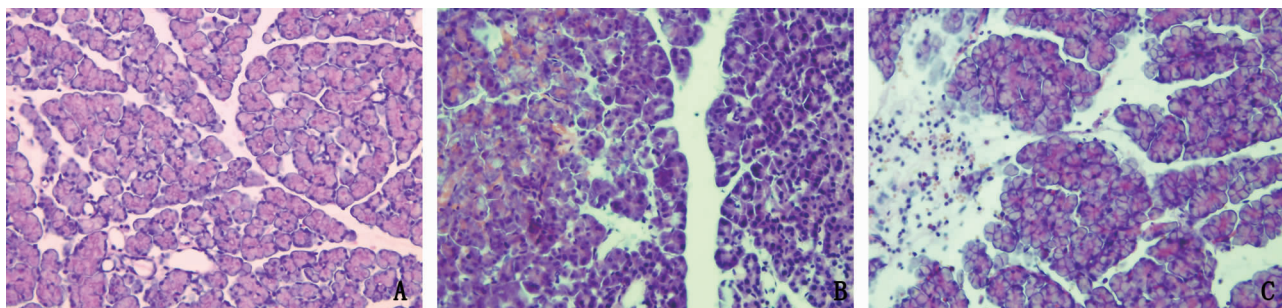


图2 12 h胰腺组织病理变化(HE × 200) A:对照; B:SAP; C:SAP + Tacrolimus (1.0 mg/kg)

### 3 讨论

急性肺损伤是 SAP 患者最常见的并发症,患病率和病死率高。SAP 并发肺损伤机制远未阐明,一般认为是由于消化酶过早激活导致胰腺细胞发生自溶,而后胰酶和单核巨噬细胞释放,过度激活中性粒细胞(PMN),并产生大量炎症介质及细胞因子,从而导致全身多器官损害和致死性衰竭,肺是最早损害的器官<sup>[4-5]</sup>。TNF- $\alpha$  和白介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等在 SAP 级联反应中起始动作用,PMN 分泌的 MPO 和 MMP-9 也起重要作用。MMP-9 使肺毛细血管通透性增加,中性粒细胞和巨噬细胞迁移于肺泡腔内致肺结构的破坏,加重了 SAP 继发性肺损伤,MMP-9 抑制剂及地塞米松可抑制细胞黏附和 MMP-9 的表达从而减轻 SAP<sup>[6-8]</sup>。

Tacrolimus 应用于防治器官移植急性排斥反应和特应性皮炎。研究表明 Tacrolimus 抗炎的可能机制是通过抑制炎症中性粒细胞迁移和抑制活化蛋白 1(AP-1)和核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的转录激活,从而抑制细胞因子 TNF-及 IL-1 $\beta$ ,抑制髓过氧化物酶、腺苷脱氨酶,抑制炎症介质缓激肽、组胺等<sup>[9]</sup>。Tacrolimus 还可通过抑制单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)和杀伤性细胞(killer cell, KC)的活性,阻止 SAP 继发性肺损伤和纤维化<sup>[10]</sup>。本研究表明 Tacrolimus 下调了 SAP 大鼠血清 TNF- $\alpha$  及 MMP-9 的表达水平,降低了胰腺组织 MPO 活性,使 BALF 白蛋白含量下降,使 SAP 大鼠肺组织、胰腺组织病理改变明显减轻,明显提高 SAP 大鼠存活率。本研究结果提示,早期应用 Tacrolimus 对 SAP 继发性的肺损伤具有一定的治疗作用。其机制可能与抑制炎症级联反应,降低肺毛细血管渗透性有关。

### 参考文献:

- [1] 赵青川, 窦春青, 窦科峰, 等. FK506 对急性坏死性胰腺炎大鼠的保护作用[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(8): 502.
- [2] 李丙所, 蔡文科, 任彦顺, 等. wortmannin 对重症急性胰腺炎大鼠胰肝损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(10): 976-978.
- [3] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [4] 徐军, 刘学民, 马清涌, 等. 中性粒细胞在大鼠急性重症胰腺炎肺损伤中的作用机制[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(16): 1472-1474.
- [5] Vatsaba R, Chooklin S. Anticytokines therapy in prophylaxis of pancreatitis-associated lung injury[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 39(1): 44.
- [6] 陈平, 詹乐恒, 王世文, 等. MMP-9 及其抑制剂对实验性重症急性胰腺炎继发肺损伤的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(6): 415-418.
- [7] Keck T, Balcom JH, Fernández-del CC, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat[J]. Gastroenterology, 2002, 122(1): 188-201.
- [8] Keck T, Jargon D, Klünsch A, et al. MMP-9 in serum correlates with the development of pulmonary complications in experimental acute pancreatitis[J]. Pancreatology, 2006, 6(4): 316-322.
- [9] Pereira R, Medeiros YS, Fröde TS. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy[J]. Transpl Immunol, 2006, 16(2): 105-111.
- [10] Tadatsura K, Yoshitaka H, Yoshitaka O, et al. Tacrolimus has protective actions against murine bleomycin-induced acute lung injuries[J]. Eur J Pharmacol, 2005, 515(1-3): 169-178.