

文章编号:1005-6947(2008)03-0219-05

· 胰腺炎专题研究 ·

# 抗 TNF- $\alpha$ 治疗对重症急性胰腺炎肺损伤 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

程石, 杨彬, 闫文貌, 史敬东, 宋茂民

(首都医科大学附属北京天坛医院 普通外科, 北京 100050)

**摘要:**目的 探讨抗肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 治疗对重症急性胰腺炎 (SAP) 大鼠肺泡巨噬细胞 (AM) 细胞核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的影响。方法 SD 大鼠随机分为对照组、SAP 组、抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗组。每组再分为术后 1, 3, 6, 12 h 4 个时相组, 每时相 6 只。逆行性胰胆管注射 5% 牛磺酸钠建立 SAP 大鼠模型。从支气管肺泡灌洗液 (BALF) 获取 AM, 检测 AM 分泌 TNF- $\alpha$  水平, 并检测 BALF 中蛋白含量、肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 水平。以 RT-PCR 法测定 AM TNF- $\alpha$ mRNA 的表达。行肺组织病理学检查及免疫组化检查 NF- $\kappa$ B 的表达。结果 对照组肺组织较少有 NF- $\kappa$ B 活化的 AM, SAP 各组肺组织均可见 NF- $\kappa$ B 活化, 且随时间进展 NF- $\kappa$ B 由细胞质逐渐进入细胞核。TNF- $\alpha$  抗体治疗组仍有少量 NF- $\kappa$ B 活化。ANP 大鼠肺损伤随病情进展而加重。肺组织 MPO 及 BALF 蛋白含量随时间延长而升高, 12 h 达最高值, 分别为  $(10.78 \pm 0.58) \text{ U/g}$  和  $(2011.0 \pm 105.5) \mu\text{g/mL}$ 。AM 分泌 TNF- $\alpha$  水平也随升高, 至 6h 达高峰  $[(1624.2 \pm 149.2) \text{ pg/mL}]$ , 12 h 回落。TNF- $\alpha$ mRNA 的表达与 TNF- $\alpha$  的变化趋势相似。SAP 大鼠上述各组指标与正常对照组相比均有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。TNF- $\alpha$  抗体治疗组各指标仍显著高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ), 但低于 SAP 组 ( $P < 0.05$ )。AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性与 MPO 及 BALF 蛋白含量呈正相关 ( $r = 0.65, 0.76, P < 0.01$ )。结论 抗 TNF- $\alpha$  治疗可抑制 SAP 大鼠的 TNF- $\alpha$  对 AM NF- $\kappa$ B 活化的反馈激活作用, 并可直接减少 TNF- $\alpha$ , 进而减轻肺损伤。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(3): 219-223]

**关键词:** 胰腺炎; 巨噬细胞, 肺泡; 肿瘤坏死因子; 核因子  $\kappa$ B; 肺损伤

中图分类号: R 657.51

文献标识码: A

## The effect of anti tumor necrosis factor $\alpha$ treatment on NF- $\kappa$ B signaling in lung injury in severe acute pancreatitis in rats

CHENG Shi, YANG Bin, YAN Wenmao, SHI Jingdong, SONG Maomin

(Department of General Surgery, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**Abstract:** **Objective** To discuss the effect of anti tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) treatment on NF- $\kappa$ B signaling in lung injury in severe acute pancreatitis (SAP) in rats. **Methods** SD rats were randomized into three groups: Control group, SAP group and anti TNF- $\alpha$  antibody treatment group. Each group was divided into 1, 3, 6 and 12 h postoperation subgroups (each,  $n = 6$ ). SAP rat model was induced by intraductal administration of 5% sodium taurocholate. Alveolar macrophages (AM) were obtained by bronchoalveolar lavage. The protein content of bronchoalveolar lavage fluids (BALF), the myeloperoxidase (MPO) of lung tissue and generation of TNF- $\alpha$  by AM were detected. The expression of TNF- $\alpha$ mRNA was measured by RT-PCR technique. The histology of lung was also checked as well as the expression of NF-kappa B was

**基金项目:**北京市科委科技新星计划资助课题(H020821500190)。

**收稿日期:**2007-12-25; **修订日期:**2008-02-13。

**作者简介:**程石,男,首都医科大学附属北京天坛医院副教授,主要从事急性胰腺炎方面的研究。

**通讯作者:**程石 E-mail:sh\_cheng@hotmail.com

detected by immunohistochemistry. **Results** The activation of NF-kappa B was seldom seen in AM of control group lung tissue, while it could be observed in SAP groups, and NF-kappa B moved from cytoplasm into nuclei with time prolongation. A slight amount of NF-kappa B activation was still observed in anti TNF- $\alpha$  antibody treatment group. The lung injury was increasingly aggravated with disease progression. The level of myeloperoxidase of lung tissue and protein content of BALF were also increased with time prolongation, and the maximum level occurred at 12h [ (10.78  $\pm$  0.58) U/g for MPO and (2 011.0  $\pm$  105.5)  $\mu$ g/mL for protein respectively]. The generation of TNF- $\alpha$  by AM was gradually elevated and peaked at 6 h [ (1 624.2  $\pm$  149.2) pg/mL ], but decreased at 12h. The change of expression of TNF- $\alpha$ mRNA was similar to TNF- $\alpha$ . All the indicators of SAP group compared with control group had the statistical significance ( $P < 0.05$ ). All indicators in anti TNF- $\alpha$  antibody treatment group were significantly increased compared with the control group ( $P < 0.05$ ), however, they were decreased compared with the SAP group ( $P < 0.05$ ). The generation of TNF- $\alpha$  by AM had close relation to the level of MPO of lung tissue and protein content of BALF ( $r = 0.65, 0.76$  respectively,  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Anti TNF- $\alpha$  antibody treatment could inhibit the feedback effect of TNF- $\alpha$  on the activation of NF- $\kappa$ B of AM, and directly decrease the secretion of TNF- $\alpha$ , which can ameliorate the lung injury in SAP in rats.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(3): 219 - 223 ]

**Key words:** Pancreatitis; Macrophages, Alveolar; Tumor Necrosis Factor; Nuclear Factor Kappa B; Lung Injury

**CLC number:** R 657.51

**Document code:** A

NF- $\kappa$ B 是一种普遍存在的转录因子,其活化后可导致大量炎症介质释放引起肺损伤<sup>[1]</sup>。研究表明以 TNF- $\alpha$  为中心环节的炎症介质复合网络的失控在重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤发生中扮演重要角色<sup>[2-4]</sup>。本研究通过观察抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体治疗后 SAP 肺泡巨噬细胞(AM) NF- $\kappa$ B 活性的变化,以探讨其对 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验分组

健康成年 SD 大鼠 72 只,雌雄不拘,体重 250 ~ 300 g。随机分组:(1) 对照组,自胰胆管内逆行注入生理盐水。(2) SAP 组,自胰胆管内逆行注入 5% 牛磺酸钠 [0.1 mL/100 g(体重)]。(3) TNF- $\alpha$  抗体治疗组,在 SAP 制模后即刻给予 TNF- $\alpha$  抗体(美国 PBH 公司) [10 mg/kg(体重)],尾静脉注射。每组又根据 SAP 制成后不同时点,再分为 1, 3, 6, 12 h 组,每组 6 只动物。

### 1.2 支气管肺泡灌洗

各组大鼠手术后,分别在不同时点处死取大鼠,取右肺下叶用于组织学检查、测定 MPO 及免疫组织化学法(免疫组化)检测 NF- $\kappa$ B 的表达。MPO 测定方法见参考文献<sup>[5]</sup>。然后行支气管肺泡灌洗,收集灌洗液(BALF),以考马斯亮蓝法测定蛋白含量。将 BALF 离心获取细胞,于 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 中培养 24 h,取上清液,用于检测 TNF- $\alpha$ 。

TNF- $\alpha$  检测用酶联免疫吸附法,试剂盒购自 Biosource 公司。所有标本重复检查 2 次。

### 1.3 逆转录 - 多聚酶链反应 (RT-PCR) 检测 AM TNF- $\alpha$ mRNA

具体方法见参考文献<sup>[5]</sup>。

### 1.4 肺组织 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的检测

采用 ABC 法进行免疫组化染色检测肺组织中 NF- $\kappa$ B 亚单位 p65 蛋白的表达。试剂盒购自武汉博士德公司。结果判定:细胞染色呈棕黄色为阳性,定位于细胞浆和细胞核。阳性率计算方法:数 5 个不含支气管的高倍视野,分别计算阳性细胞数和总细胞数。阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数  $\times 100\%$ 。

### 1.5 组织学检查

将各组大鼠肺组织按常规置 10% 福尔马林液中浸泡,石蜡包埋,行 HE 染色。

### 1.6 统计学处理

所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。差异显著性采用方差分析并行等级相关分析,统计采用 SPSS10.0 软件分析。

## 2 结果

### 2.1 肺组织 MPO 及 BALF 蛋白含量的变化

对照组大鼠肺组织 MPO 活性较低。SAP 1 h 组与对照组之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ ), 3 h 组明显高于对照组并随着时间的延长逐渐升高

( $P < 0.05$ )。抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗除 1 h 组外其余 3 个时相组均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 与 SAP 组相比除 1 h 组外,其余 3 个时相均显著低于

SAP 组 (均  $P < 0.05$ )。各组大鼠 BALF 蛋白含量变化情况与 MPO 活性变化趋势相近 (表 1-2)。

表 1 肺组织 MPO 含量变化 (U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	制模后 1h	制模后 3h	制模后 6h	制模后 12h
对照	1.03 $\pm$ 0.09	1.06 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.07	1.05 $\pm$ 0.08
SAP	1.35 $\pm$ 0.10	3.54 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>	8.58 $\pm$ 0.54 <sup>1)</sup>	10.78 $\pm$ 0.58 <sup>1)</sup>
抗 TNF 抗体治疗	1.17 $\pm$ 0.07	2.23 $\pm$ 0.11 <sup>1),2)</sup>	4.25 $\pm$ 0.31 <sup>1),2)</sup>	3.09 $\pm$ 0.47 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ ; 2)与 SAP 组比较, $P < 0.05$

表 2 BALF 蛋白含量的变化 ( $\mu$ g/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	制模后 1h	制模后 3h	制模后 6h	制模后 12h
对照	275.9 $\pm$ 10.2	283.5 $\pm$ 13.8	264.4 $\pm$ 17.6	289.4 $\pm$ 15.3
SAP	351.2 $\pm$ 31.8 <sup>1)</sup>	1020.6 $\pm$ 78.5 <sup>1)</sup>	1825.3 $\pm$ 217.3 <sup>1)</sup>	2011.0 $\pm$ 105.5 <sup>1)</sup>
抗 TNF 抗体治疗	381.8 $\pm$ 25.8 <sup>1)</sup>	398.1 $\pm$ 30.3 <sup>1),2)</sup>	410.7 $\pm$ 32.6 <sup>1),2)</sup>	396.2 $\pm$ 16.4 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ ; 2)与 SAP 组比较, $P < 0.05$

## 2.2 AM 分泌 TNF- $\alpha$ 活性

对照组 TNF- $\alpha$  活性水平低。SAP 组各时相 TNF- $\alpha$  活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗各时相组 TNF- $\alpha$  活性明显高于

对照组,差异均有显著性 ( $P < 0.05$ );但除 1 h 组外,其余 3 个时相均明显低于 SAP 组 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

表 3 各组大鼠肺泡巨噬细胞分泌 TNF- $\alpha$  活性 ( $\mu$ g/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	制模后 1h	制模后 3h	制模后 6h	制模后 12h
对照	157.1 $\pm$ 29.1	163.5 $\pm$ 32.3	151.8 $\pm$ 21.6	160.3 $\pm$ 20.3
SAP	265.7 $\pm$ 43.4 <sup>1)</sup>	957.3 $\pm$ 145.9 <sup>1)</sup>	1624.2 $\pm$ 149.2 <sup>1)</sup>	716.7 $\pm$ 53.6 <sup>1)</sup>
抗 TNF 抗体治疗	252.9 $\pm$ 25.4 <sup>1)</sup>	276.3 $\pm$ 28.1 <sup>1),2)</sup>	294.9 $\pm$ 28.2 <sup>1),2)</sup>	272.6 $\pm$ 22.8 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ ; 2)与 SAP 组比较, $P < 0.05$

## 2.3 AM TNF- $\alpha$ mRNA 的表达

对照组 AM TNF- $\alpha$ mRNA 的表达极少;SAP 1 h 组有少量表达,6 h 组表达最显著,12 h 组表达又降低。SAP 各组与对照组相比差异均有显著意义

( $P < 0.05$ )。抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗组与对照组相比,各时相仍较高,差异均有显著性 ( $P < 0.05$ );但与 SAP 组各时相比较又明显降低,除 1 h 组外,其余各时相差异均有显著性 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。

表 4 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达

组别	制模后 1h	制模后 3h	制模后 6h	制模后 12h
对照	0.335 $\pm$ 0.015	0.318 $\pm$ 0.011	0.323 $\pm$ 0.017	0.329 $\pm$ 0.013
SAP	0.433 $\pm$ 0.018 <sup>1)</sup>	0.817 $\pm$ 0.013 <sup>1)</sup>	1.127 $\pm$ 0.069 <sup>1)</sup>	0.732 $\pm$ 0.012 <sup>1)</sup>
抗 TNF 抗体治疗	0.435 $\pm$ 0.012 <sup>1)</sup>	0.445 $\pm$ 0.016 <sup>1),2)</sup>	0.450 $\pm$ 0.017 <sup>1),2)</sup>	0.443 $\pm$ 0.017 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ ; 2)与 SAP 组比较, $P < 0.05$

## 2.4 肺组织 NF- $\kappa$ B 活性改变

对照组肺组织中 NF- $\kappa$ B 活化的 AM 较少。SAP 各组肺组织均可见 NF- $\kappa$ B 活化,并随时间而进展,逐渐呈强阳性反应。阳性反应产物不仅分布于细胞质中,并由细胞质更多地进入细胞核(图 1)。抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗组仍可观察到 NF- $\kappa$ B

少量活化,但很少进入细胞核(图 2)。与对照组相比,SAP 和抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗组 NF- $\kappa$ B 活性阳性率均显著性增高 ( $P < 0.05$ );抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗组与 SAP 组相比除 1h 组外,其余 3 个时相差有显著性降低 ( $P < 0.05$ )(表 5)。

表 5 各组大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 活性(100%)

组别	制模后 1 h	制模后 3 h	制模后 6 h	制模后 12 h
对照	4.3 $\pm$ 1.3	4.4 $\pm$ 1.2	4.2 $\pm$ 1.5	4.3 $\pm$ 1.6
SAP	12.3 $\pm$ 1.6 <sup>1)</sup>	24.6 $\pm$ 4.0 <sup>1)</sup>	30.1 $\pm$ 8.5 <sup>1)</sup>	27.3 $\pm$ 5.4 <sup>1)</sup>
抗 TNF 抗体治疗	6.7 $\pm$ 1.9 <sup>1)</sup>	7.9 $\pm$ 2.6 <sup>1),2)</sup>	10.5 $\pm$ 3.7 <sup>1),2)</sup>	7.7 $\pm$ 3.1 <sup>1),2)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$ ; 2)与 SAP 组比较, $P < 0.05$

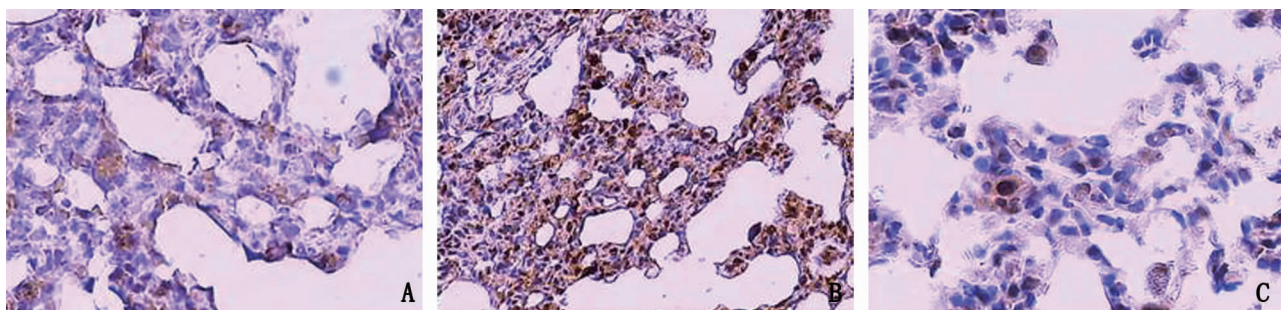


图 1 SAP 各时相组 NF- $\kappa$ B p65 免疫组化染色(ABC 法  $\times 400$ ) A:SAP 3 h 组; B:SAP 6h 组; C:SAP 12 h 组

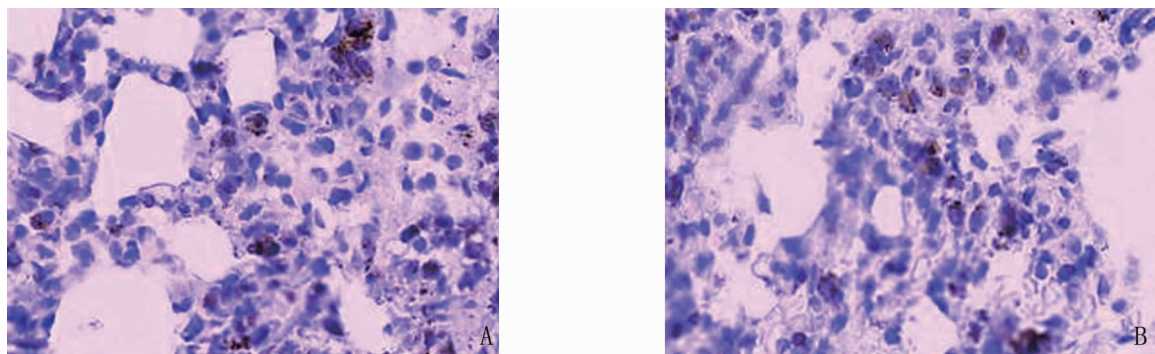


图 2 抗 TNF 抗体治疗组两时相组 NF- $\kappa$ B p65 免疫组化染色(ABC 法  $\times 400$ ) A:抗 TNF 抗体治疗组 6 h 组; B:抗 TNF 抗体治疗组 12 h 组

## 2.5 各组大鼠肺组织学改变

SAP 组 1 h,肉眼见肺轻度水肿;光镜下见肺间质水肿、充血、单核细胞及少量中性粒细胞浸润。3 h,肉眼见肺水肿,少量淡黄色胸水;光镜下见间质明显充血、水肿,大量中性粒细胞浸润。6 h,肺表面散在出血点,少量淡血性胸水;光镜下见间质水肿、炎性细胞浸润,偶见间质内出血。12 h,肺表面弥漫性出血点,肺体积缩小,有血性胸水;光镜下见间质出血,肺泡及气管内出血,肺血管内有中性粒细胞浸润,肺泡塌陷实变。抗

TNF- $\alpha$  抗体治疗组,大体标本可见各时相的表现基本为轻度肺水肿;光镜下见肺间质水肿、充血、单核细胞及少量中性粒细胞浸润。各时相的表现无明显差异。对照组肺组织肉眼及光镜下均正常。

## 2.6 相关性分析

相关性分析发现,AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性与肺 MPO 变化呈正相关 ( $r = 0.65, P < 0.01$ )。AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性与 BALF 蛋白含量变化呈正相关 ( $r = 0.76, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

本课题组的前期研究<sup>[6]</sup>表明, TNF- $\alpha$  与 SAP 致急性肺损伤的发生密切相关, 应用抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体预处理后肺损伤可减轻。但抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体治疗后对 NF- $\kappa$ B 的影响尚少见报道。

肺脏中的 TNF- $\alpha$  主要由 AM 分泌。本研究发 现 SAP 1 h AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性即有升高, 6 h 达到高峰。同时 AM TNF- $\alpha$ mRNA 表达检测发现与 TNF- $\alpha$  的活性变化趋势相符合, 表明在 SAP 早期不仅血中 TNF- $\alpha$  的表达升高, 而且肺脏本身的 TNF- $\alpha$  表达也明显升高。应用抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗后, AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性及 TNF- $\alpha$ mRNA 的表达较 SAP 组均有明显降低 ( $P < 0.05$ )。同时本实验在 SAP 发生后的不同时间检测了 BALF 蛋白含量和肺组织 MPO 活性这两个衡量肺损伤程度的重要指标, 结果显示 SAP 发生后, 随着时间推移, 两者均逐渐升高, 提示肺损伤逐渐加重。同时还发现, SAP 组各时相前述两个指标升高与 TNF- $\alpha$  表达升高呈正相关; 表明 TNF- $\alpha$  的释放增加激活了中性粒细胞, 从而诱发炎症反应, 最终造成肺损伤。应用 TNF- $\alpha$  抗体治疗后, 前述两个指标较 SAP 组有明显降低, 表明 TNF- $\alpha$  抗体可减轻肺损伤。组织学检查结果也从形态学上为上述结论提供了直接的证据。

NF- $\kappa$ B 作为一种普遍存在的转录因子, 其活化后可调控多种炎症介质包括 TNF- $\alpha$  的分泌。NF- $\kappa$ B 的活化有经典信号通路和替代通路。前炎症介质, 特别是 TNF- $\alpha$  是经典信号通路的主要刺激因子<sup>[7-8]</sup>。本研究检测的 NF- $\kappa$ B 主要亚单位 p65 的结果显示, 对照组肺组织较少见 NF- $\kappa$ B 活化的 AM, SAP 各组肺组织均可见到 NF- $\kappa$ B 已被活化, 并随时间进展由细胞浆更多地进入细胞核, 提示 SAP 发生后, NF- $\kappa$ B 被快速激活, 并开始发挥调控作用, 其活性变化与 TNF- $\alpha$  活性变化趋

势吻合; 表明 TNF- $\alpha$  的分泌受到活化的 NF- $\kappa$ B 调控。应用抗 TNF- $\alpha$  抗体治疗后, 虽仍可观察到 NF- $\kappa$ B 活化, 但已很少进入细胞核; 表明 NF- $\kappa$ B 活化受到抑制, 但其活性并未明显随时间变化。治疗组 AM 分泌的 TNF- $\alpha$  活性除较 SAP 组明显降低外, 各时相间 TNF- $\alpha$  活性无明显差别; 这与 NF- $\kappa$ B 变化趋势相符合。上述结果表明抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体治疗后除可直接减少 TNF- $\alpha$  的产生外, 更主要是通过抑制 TNF- $\alpha$  对 SAP AM NF- $\kappa$ B 活化的反馈激活作用从而减少 TNF- $\alpha$  的产生, 最终减少过量 TNF- $\alpha$  分泌导致的副作用, 从而减轻肺损伤。

#### 参考文献:

- [1] 程石, 宋茂民, 史敬东. 核因子 kappa B 活化对急性坏死性胰腺炎肺泡巨噬细胞炎症介质表达的影响及意义[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12(11): 764 - 766.
- [2] 程石, 宋茂民, 史敬东. 氯化钆对急性坏死性胰腺炎肺泡巨噬细胞分泌炎症介质的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(11): 836 - 839.
- [3] 付林, 程书榜, 高海斌, 等. IL-10 区域动脉灌注减轻急性胰腺炎大鼠肺损伤的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(8): 619 - 621.
- [4] Browne GW, Pitchumoni CS. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(44): 7087 - 7096.
- [5] 程石, 何三光, 张佳林. 肺泡巨噬细胞活化在急性坏死性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(8): 609 - 612.
- [6] 程石, 宋茂民, 何三光. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  对大鼠坏死性胰腺炎肺损伤的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(7): 593 - 594.
- [7] Syed MM, Phulwani NK, Kielian T. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) regulates Toll-like receptor 2 (TLR2) expression in microglia[J]. J Neurochem, 2007, 103(4): 1461 - 1471.
- [8] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB[J]. Genes Dev, 2004, 18(18): 2195 - 2224.