



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.015
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3990.shtml

· 基础研究 ·

fractalkine/CX3CR1 在肝肺综合征发病机制中的作用

谷化剑¹, 孙诚谊¹, 潘耀振¹, 冯贤松², 辛小燕²

(1. 贵阳医学院附属医院 肝胆外科, 贵州 贵阳 550002; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 肝胆外科, 湖北 武汉 430022)

摘要

目的: 探讨趋化因子 fractalkine 及其受体 CX3CR1 在大鼠肝肺综合征 (HPS) 发病机制中的作用。
方法: 将 40 只大鼠行胆总管结扎后随机均分为模型组与治疗组, 5 只大鼠仅游离胆总管不结扎, 作为假手术组; 治疗组大鼠于术后 15~28 d 腹腔内注射 CX3CR1 中和抗体, 模型组与假手术组大鼠给予等容量生理盐水代替。术后 29 d 检测大鼠肝功能、动脉血气, 肺组织病理学、肺血管内巨噬细胞 (PIM)、微血管密度 (MVD) 及 CX3CR1 的表达。
结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL) 水平均明显升高, 动脉血氧分压 (PaO₂) 下降、肺泡 - 动脉血氧分压差 (A-aDO₂) 升高, 肺组织出现明显的病理改变、PIM (CD68 表达量)、MVD 增加 (CD34 表达量)、CX3CR1 表达水平升高; 治疗组大鼠肝功能也出现明显损伤, 但好于模型组 (均 P<0.05), 肺组织未见明显病理改变, 血气指标、PIM、MVD、CX3CR1 表达水平均无明显变化 (均 P>0.05)。
结论: fractalkine/CX3CR1 在肺组织中表达增加并结合是 HPS 肺组织巨噬细胞聚积及微血管增生的关键信号通路, 阻断该信号通路可抑制 HPS 的发生与发展。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1087-1092]

关键词

黄疸, 阻塞性; 肝肺综合征; 趋化因子, CX3C
中图分类号: R657.4

Effects of fractalkine/CX3CR1 on pathogenesis of hepatopulmonary syndrome

GU Huajian¹, SUN Chengyi¹, PAN Yaozhen¹, FENG Xiansong², XIN Xiaoyan²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550002, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Corresponding author: SUN Chengyi, Email: guhuajian_wh@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the action of the chemotactic factor fractalkine and its receptor CX3CR1 in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome (HPS) in rats.

Methods: Forty rats undergoing common bile duct ligation were equally randomized into model group and therapeutic group, and 5 rats subjected to isolation of the common bile duct only were served as sham operation group. Rats in therapeutic group received intraperitoneal injection with CX3CR1-neutralizing polyclonal antibody on postoperative day (POD) 15 to 28, while rats in model group and sham operation group were given

收稿日期: 2014-03-18; 修订日期: 2014-06-25。

作者简介: 谷化剑, 贵阳医学院附属医院副主任医师, 主要从事肝移植, 肝硬化门静脉高压症方面的研究。

通信作者: 孙诚谊, Email: guhuajian_wh@163.com

normal saline of the same volume instead. On POD 29, rats were sacrificed, their liver function and arterial blood gas were determined, and the pathological changes, accumulation of pulmonary intravascular macrophages (PIM), microvessel density (MVD) and CX3CR1 expression in the lung tissues of rats were examined.

Results: Compared with sham operation group, rats in model group showed significantly increased serum levels of alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin (TRIL), decreased arterial partial pressure of oxygen (PaO_2), increased alveolar-arterial oxygen gradient (A-aDO_2), clear pathological changes, and increased levels of PIM (CD86 expression), MVD (CD34 expression) and CX3CR1 expression in the lung tissues (all $P < 0.05$); rats in therapeutic group showed liver function impairments as well, which however were milder than those in model group (all $P < 0.05$), while there were no significant pathological changes in the lung tissues, and no obvious changes in arterial blood gas indexes and lung PIM, MVD and CX3CR1 expression (all $P > 0.05$).

Conclusion: Increased fractalkine/CX3CR1 expression and binding is an important signaling pathway for pulmonary macrophage aggregation and microvascular proliferation in HPS, and blockage of this pathway may inhibit the occurrence and development of HPS.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(8):1087-1092]

KEYWORDS Jaundice, Obstructive; Hepatopulmonary Syndrome; Chemokines, CX3C

CLC number: R657.4

肝肺综合征 (hepatopulmonary syndrome, HPS) 是指因肝功能不全引起肺血管扩张、肺气弥散与交换障碍导致的低氧血症及其一系列病理生理变化和临床表现, 肝硬化患者中其发生率为 4%~47%^[1]。研究发现巨噬细胞聚积于肺血管内皮及肺血管扩张是 HPS 的病理基础^[2]。fractalkine (CX3CL1) 是趋化因子 CX3C 亚家族惟一成员, 主要来源于内皮细胞与上皮细胞, 兼有趋化因子和黏附分子的特征。本研究拟在实验性 HPS 模型中运用 CX3CL1 特异性受体 (CX3CR1) 的抗体干预, 观察肺组织巨噬细胞聚积、肺微血管再生程度的变化以及肺组织 CX3CR1 表达水平的变化, 以探讨 fractalkine/CX3CR1 介导肺组织巨噬细胞聚积在 HPS 发病机制中的作用及 CX3CR1 抗体对 HPS 大鼠肺组织结构与功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特殊病原体 (SPF) 级 Wistar 雄性大鼠 45 只, 体质量 (160 ± 20) g, 购于湖北省实验动物研究中心 (合格证书编号: N0.42000600000034), 饲养于华中科技大学实验动物中心 SPF 级动物实验室。

1.1.2 主要试剂 多克隆兔抗鼠 CX3CR1 中和抗体、多克隆兔抗大鼠 CX3CL1 抗体、小鼠抗大

鼠 ED1 (CD68) (识别单核巨噬细胞)、兔抗大鼠 CD34 (内皮细胞标记) 单克隆抗体, 均购于 Abcam 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及处理 将 40 只大鼠行胆总管结扎 (CBDL) 后随机均分为模型组与治疗组, 另 5 只大鼠仅游离胆总管不结扎, 作为假手术组。治疗组大鼠于术后 15~28 d 腹腔内注射 CX3CR1 中和抗体 (CX3CR1-Ab) [$80 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$], 模型组与假手术组分别于上述相应时间腹腔内注射等容量生理盐水。各组大鼠于术后 29 d 取动脉血 2 mL, 作血气分析, 取静脉血 5 mL, 低温离心后取血清于 -20°C 冻存, 酶联免疫吸附实验方法检测肝功能。生理盐水肺灌注后取右肺组织置液氮中保存于 -70°C 冰箱内。取部分肝脏与左肺下叶组织, 4% 多聚甲醛溶液固定。

1.2.2 肺组织形态学检测 (1) 肺组织病理学观察: 观察肺组织大体病理学改变; 将肝脏与左肺组织的石蜡切片经 HE 染色后光镜下观察。(2) 肺血管内巨噬细胞 (PIM) 检测: 取厚 $4 \mu\text{m}$ 肺组织切片经脱蜡、水化、孵育、修复抗原, 封闭一抗, 滴加二抗, 光镜下观察测定 CD68 阳性细胞染色的平均光密度值表示抗原表达量。(3) 肺组织微血管密度 (MVD) 检测观察 CD34 光密度值。利用 Image-Pro Plus 6.0 医学图像分析系统测定阳性细胞染色的平均光密度值表示抗原表达量。

1.2.3 Western blot 法测定肺组织 CX3CR1 表达

取约 100 mg 肺组织研制成匀浆, 取上清液经灌胶、电泳、转膜、抗体封闭, 之后进行发光反应。采用 Image J 图像分析软件对结果进行定量分析。

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差齐性分析、最小显著差法 (LSD) 检验与 DunnettT₃ 检验。取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝功能指标

与假手术组比较, 模型组与治疗组大鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆红素 (TBIL) 水平均明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$), 但治疗组的以上指标升高程度均明显小于模型组, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.05$) (表 1)。

表 1 各组肝功能指标的变化

Table 1 Changes in liver function parameters in each group of rats

组别	n	ALT (U/L)	ALP (U/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
假手术组	5	40.65 \pm 4.20	9.72 \pm 0.82	4.72 \pm 0.56
模型组	20	156.82 \pm 23.75 ¹⁾	82.36 \pm 6.37 ¹⁾	31.90 \pm 2.05 ¹⁾
治疗组	20	134.65 \pm 19.90 ^{1,2)}	68.15 \pm 9.28 ^{1,2)}	28.30 \pm 1.40 ^{1,2)}

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group

2.2 血气分析结果

与假手术组比较, 模型组与治疗组动脉血 pH 值, 动脉血二氧化碳分压 (PaCO_2) 未见明显改变 (均 $P>0.05$); 模型组大鼠动脉血氧分压 (PaO_2) 下降, 肺泡 - 动脉血氧分压差 (A-aDO_2) 升高, 与假手术组比较差异有统计学意义 (均 $P<0.05$), 治疗组 PaO_2 和 A-aDO_2 与模型组差异有统计学意义 (均 $P<0.05$), 而与假手术组差异无统计学意义 (均 $P>0.05$) (表 2)。

表 2 动脉血气分析结果

Table 2 Results of blood gas analysis in each group of rats

组别	n	pH	PaO_2 (mmHg)	PaCO_2 (mmHg)	A-aPO_2 (mmHg)
假手术组	5	7.38 \pm 0.04	98.60 \pm 4.52	36.08 \pm 2.35	7.20 \pm 0.78
模型组	20	7.22 \pm 0.12	81.36 \pm 3.25 ¹⁾	32.12 \pm 2.62	30.55 \pm 2.73 ¹⁾
治疗组	20	7.36 \pm 0.06	97.62 \pm 3.70 ²⁾	33.67 \pm 3.15	10.31 \pm 1.84 ²⁾

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group

2.3 组织形态学表现

2.3.1 肺组织大体病理学观察 假手术组肺组织

大体形态正常, 模型组肺组织有明显充血肿胀, 而治疗组肺组织形态基本正常 (图 1)。



图 1 各组大鼠肺组织形态学变化 A: 假手术组; B: 模型组; C: 治疗组

Figure 1 Gross Morphologic changes of lung tissues in each group of rats A: Sham operation group; B: Model group; C: Therapeutic group

2.3.2 肺组织 HE 染色 假手术组肺泡壁结构正常; 模型组部分肺泡壁塌陷, 小血管扩张, 明显的炎性细胞浸润, 肺泡间隔增宽, 微小血管增

生; 治疗组肺泡壁结构完整, 部分血管扩张与微血管增生, 肺泡间隔无明显增宽, 少量炎细胞浸润 (图 2)。

2.3.3 肺组织 CD68⁺ 巨噬细胞的表达 CD68 阳性染色为图中棕黄色部分。假手术组肺组织有微量 CD68 阳性表达；模型组见肺组织巨噬细胞成簇聚集，主要集中于血管内皮，CD68 表达量与假手术组差异有统计学意义 ($P<0.05$)；治疗组阳性着色明显减少，CD68 表达量与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)，而与假手术组的差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 2) (表 3)。

2.3.4 肺组织 CD34⁺ 细胞表达 CD34 的表达局限于血管内皮细胞的胞膜。假手术组 CD34 呈少量阳性表达；模型组有明显的 CD34 阳性表达，表达量明显高于假手术组 ($P<0.05$)，治疗组 CD34 少量阳性表达，表达量与模型组差异有统计学意义 ($P<0.05$)，而与假手术组差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 2) (表 3)。

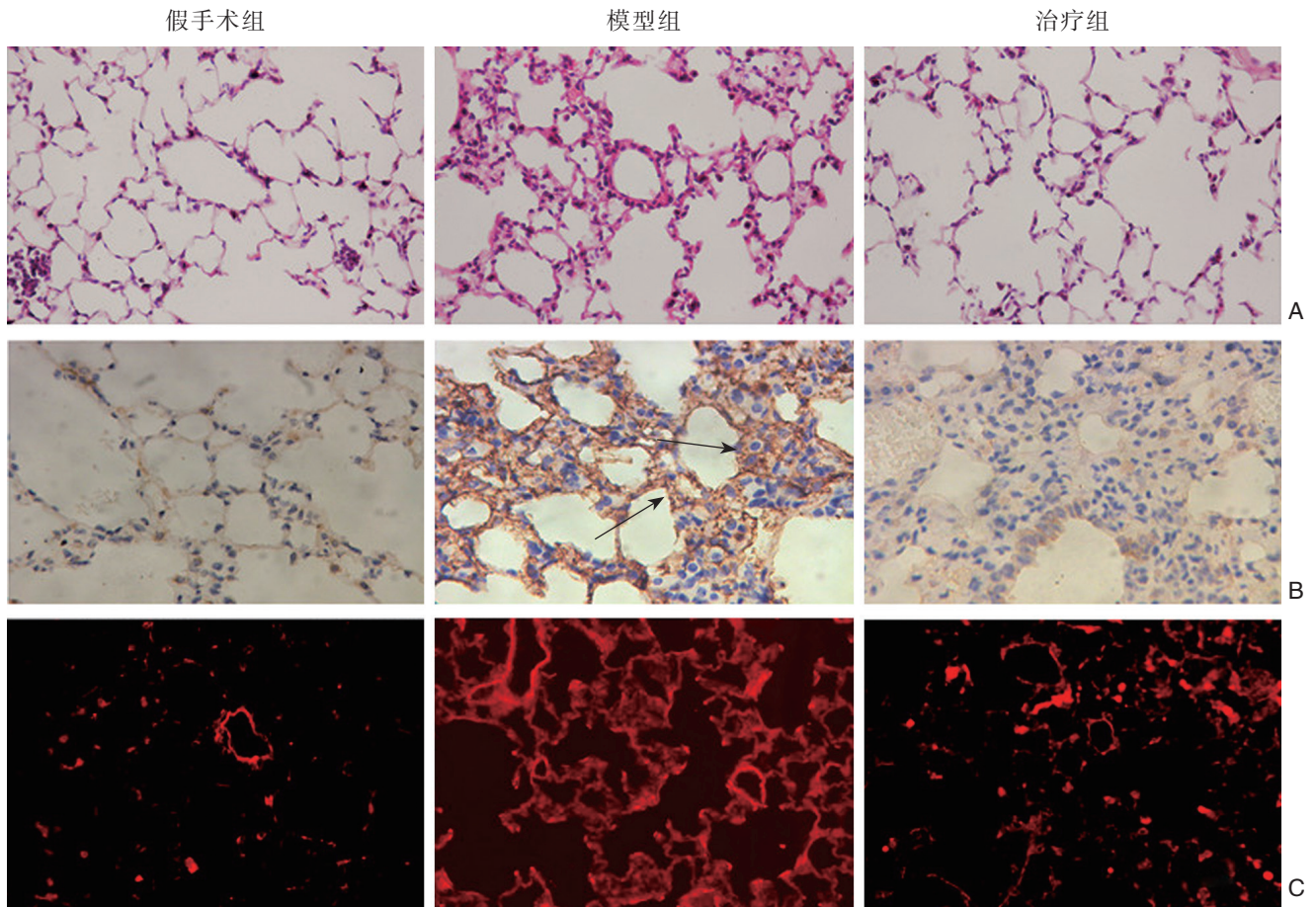


图 2 各组肺组织病理组织学检测 ($\times 400$) A: HE 染色; B: CD86 免疫组化检测; C: CD34 免疫荧光检测

Figure 2 Pathological changes of lung tissues in different groups ($\times 400$) A: HE staining; B: Immunohistochemical staining for CD86; C: Immunofluorescent staining for CD34

表 3 各组大鼠肺组织 PIM 与 MVD 水平

Table 3 PIM and MVD levels in the lung tissues in each group of rats

组别	n	MVD	PIM
假手术组	5	3.15 ± 0.48	1.00 ± 0.71
模型组	20	9.29 ± 0.96 ¹⁾	6.35 ± 1.22 ¹⁾
治疗组	20	4.20 ± 0.62 ²⁾	2.30 ± 0.86 ²⁾

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group

2.4 肺组织 CX3CR1 表达水平

假手术组大鼠肺组织 CX3CR1 微量表达；模型组大鼠肺组织 CX3CR1 表达水平明显升高，与假手术组差异有统计学意义 ($P<0.05$)，治疗组肺组织 CX3CR1 表达水平明显低于模型组 ($P<0.05$)，且与假手术组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 3)。

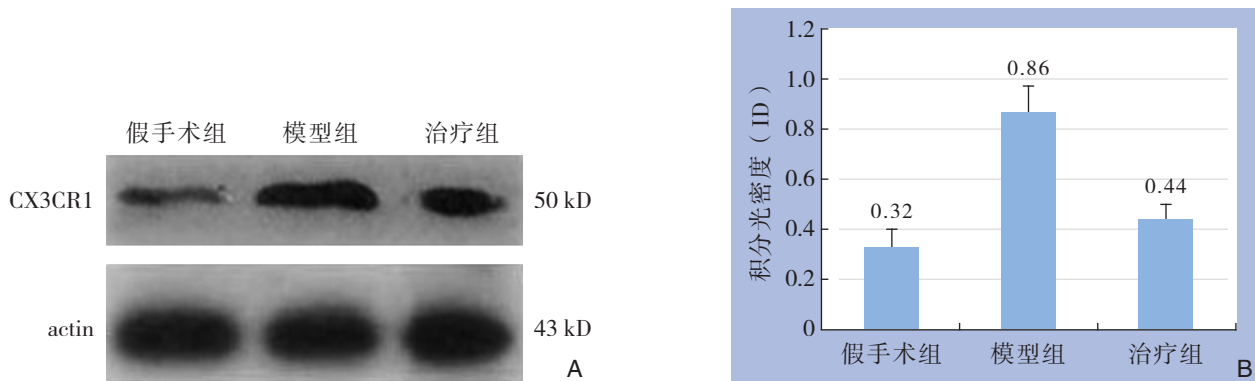


图 3 Western blot 检测各组大鼠肺组织 CX3CR1 表达水平 A: 电泳图; B: 各组 CX3CR1 表达量

Figure 3 Expression of CX3CR1 in rat lung tissues A: Electrophoretogram; B: Comparison of the CX3CR1 expression levels among groups

3 讨论

本研究发现 HPS 模型中 CD68⁺ 巨噬细胞在肺组织血管内皮大量聚积, 微血管异常增生。应用 CX3CR1 中和抗体干预后 PIM 聚积明显减少, MVD 下降, 肺组织充血、坏死等病理变化得以改善, A-aDO₂ 下降, 血气氧合功能障碍明显好转。以往研究^[3]发现, HPS 时 PIM 聚积原因与 CBDL 时细菌易位、内毒素血症及肿瘤坏死因子 (TNF) 增加有关^[4], 阻止细菌易位或应用 TNF- α 拮抗剂对于改善 HPS 有效^[5-6]。肺血管内巨噬细胞聚积后分泌大量内皮型一氧化氮合成酶 (iNOS) 和血红素加氧酶 (HO-1) 等炎性介质和血管活性物质, 产生大量 NO 和 CO, 促使肺内微血管扩张, 是形成 HPS 的重要因素^[7-10]。本研究观察到肺 PIM 聚积后不但能引起肺内微血管扩张, 而且能导致肺微血管病态性增生, 引发 HPS。故认为 PIM 的聚积是 CBDL 后 HPS 发生的重要机制, 其机制考虑为激活的 CD68⁺ 巨噬细胞通过肺组织细胞内外信号调节蛋白促进肺组织内各种生长因子与细胞因子, 尤其是 iNOS、血管内皮生长因子及血小板源性生长因子的分泌, 导致肺微血管异常增生和异常扩张。

本研究发现 HPS 大鼠肺组织 CX3CR1 表达水平显著升高, 给予 CX3CR1 中和抗体干预后 CX3CR1 表达水平接近正常, PIM 聚积程度显著减少。趋化因子 fractalkine 与其受体 CX3CR1 有独特高效的趋化和黏附作用。CX3CR1 是 fractalkine 的专一受体, 主要表达于单核-巨噬细胞^[11-13], CX3CL1 主要表达于内皮细胞与上皮细胞, 通过

CX3CL1/CX3CR1 通路介导 fractalkine 表达细胞对上述细胞的趋化作用^[14-18]。CBDL 大鼠因内毒素血症、炎症因子促使表达于肺血管内皮与肺泡上皮表面的 fractalkine 被释放与激活, 快速俘获血流中 CX3CR1 阳性的单核细胞, 使其黏附聚积于肺血管内皮, 并被激活释放大量细胞因子, 作用于肺微小血管导致 HPS。予 CX3CR1 中和抗体干预后可有效阻断 fractalkine/CX3CR1 信号通路, 减少 PIM 聚积, 明显改善 HPS 后肺组织的结构与功能, 改善肺氧合作用至正常, 纠正低氧血症。

因此认为, PIM 聚积是 CBDL 大鼠 HPS 发生的重要机制, PIM 聚积不但引起肺微小血管异常扩张, 而且导致微血管病态性增生而引发 HPS。CX3CL1/CX3CR1 在肺组织中表达增加并特异性结合是 PIM 聚积的关键信号通路, 抑制该通路可明显改善 HPS 的发生与发展。

参考文献

- [1] Ferreira PP, Camara EJ, Paula RL, et al. Prevalence of hepatopulmonary syndrome in patients with decompensated chronic liver disease and its impact on short-term survival[J]. *Arq Gastroenterol*, 2008, 45(1):34-37.
- [2] 张影, 张福奎, 王宝恩. 肺血管扩张在肝肺综合征发病机制中作用的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(6):612-616.
- [3] Rabiller A, Nunes H, Lebrec D, et al. Prevention of gram-negative translocation reduces the severity of hepatopulmonary syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(4):514-517.
- [4] Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, et al. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(5):752-758.

- [5] 刘丽, 赵芝, 刘楠, 等. TNF- α 单克隆抗体治疗大鼠肝肺综合症的机制研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(6):1138-1141.
- [6] Degano B, Mittaine M, Hervé P, et al. Nitric oxide production by the alveolar compartment of the lungs in cirrhotic patients[J]. Eur Respir J, 2009, 34(1):138-144.
- [7] 冯杰雄, 胡廷泽. 一氧化氮在肝肺综合征发病机制中的作用 [J]. 中国普通外科杂志, 2000, 9(1):86-87.
- [8] Debette S, Bevan S, Dartigues JF, et al. Fractalkine receptor/ligand genetic variants and carotid intima-media thickness[J]. Stroke, 2009, 40(6):2212-2214.
- [9] Maganty K, Ghanta R, Bejarano P, et al. Liver transplantation for hepatopulmonary syndrome due to noncirrhotic portal hypertension[J]. Transplant Proc, 2011, 43(7):2814-2816.
- [10] Zhang ZJ, Yang CQ. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2010, 9(4):355-360.
- [11] Lyons A, Lynch AM, Downer EJ, et al. Fractalkine-induced activation of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway attenuates microglial activation in vivo and in vitro[J]. J Neurochem, 2009, 10(5):1547-1556.
- [12] Cipriani R, Villa P, Chece G, et al. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents[J]. J Neurosci, 2011, 31(45):16327-16335.
- [13] Stolla M, Pelisek J, von Brühl ML, et al. Fractalkine is expressed in early and advanced atherosclerotic lesions and supports monocyte recruitment via CX3CR1[J]. PLoS One, 2012, 7(8):e43572.
- [14] Zhang J, Yang W, Luo B, et al. The role of CX₃CL1/CX₃CR1 in pulmonary angiogenesis and intravascular monocyte accumulation in rat experimental hepatopulmonary syndrome[J]. J Hepatol, 2012, 57(4):752-758.
- [15] Noli K, Solomon M, Golding F, et al. Prevalence of hepatopulmonary syndrome in children[J]. Pediatrics, 2008, 121(3):e522-527.
- [16] El Makarem MA, Elakad A, Ali A, et al. Hepatopulmonary syndrome: prevalence and predictors in egyptian cirrhotic patients[J]. Trop Gastroenterol, 2011, 32(1):25-30.
- [17] Zhang J, Ling Y, Tang L, et al. Attenuation of experimental hepatopulmonary syndrome in endothelin B receptor-deficient rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 296(4):G704-708.
- [18] Van Landeghem L, Laleman W, Vander Elst I, et al. Carbon monoxide produced by intrasinusoidally located haem-oxygenase-1 regulates the vascular tone in cirrhotic rat liver[J]. Liver Int, 2009, 29(5):650-660.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 谷化剑, 孙诚谊, 潘耀振, 等. fractalkine/CX3CR1 在肝肺综合征发病机制中的作用 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(8):1087-1092. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.015
 Cite this article as: GU HJ, SUN CY, PAN YZ, et al. Effects of fractalkine/CX3CR1 on pathogenesis of hepatopulmonary syndrome [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(8):1087-1092. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.015

我刊姊妹刊《Gland Surgery》被 PubMed 收录

近日收到 PubMed Central (PMC) 通知, 我刊姊妹刊《Gland Surgery》杂志已正式被该数据库全文收录, 收录工作将在一个月内完成, 届时《Gland Surgery》全部文章 (包括往刊) 将可以在 PubMed 中获取。

《Gland Surgery》(Gland Surg; pISSN 2227-684X; eISSN 2227-8575) 于 2012 年 5 月由《中国普通外科杂志》与 AME 公司合作创刊, 是一本同行评审、开放获取的英文期刊, 主要刊登腺体疾病预防、诊断、治疗、预后等方面的文章。由我刊主编吕新生教授与北京 301 医院普通外科李席如教授共同担任主编; 湘雅医院普通外科的李新营, 泰国 Mahidol University 的 Visnu Lohsiriwat, 澳大利亚 University of Melbourne 的 Warren M Rozen, 以及美国 Virginia Commonwealth University 的 Kazuaki Takabe 等教授共同担任副主编。《Gland Surgery》拥有一支国际化的编委团队, 编委分别来自中国、美国、英国、日本、台湾、泰国、澳大利亚、意大利、加拿大、西班牙、希腊等世界各国。

欢迎业内人士登录《Gland Surgery》网站: <http://www.glandsurgery.org>。

中国普通外科杂志编辑部