

文章编号:1005-6947(2006)11-0836-04

· 基础研究 ·

# 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

程石, 宋茂民, 史敬东

(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 探讨氯化钆(GdCl<sub>3</sub>)对急性坏死性胰腺炎(ANP)肺泡巨噬细胞(AM)分泌炎症介质的影响。方法 90只成年SD大鼠随机分为正常对照组(C组)、ANP组、GdCl<sub>3</sub>处理正常对照组(C+GdCl<sub>3</sub>组)、ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组、ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组。每组18只。各组大鼠均经支气管肺泡灌洗获取肺泡巨噬细胞,行支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量、肺组织髓过氧化物酶(MPO)水平、AM分泌肿瘤坏死因子α(TNF-α)和一氧化氮(NO)水平分析;行血气分析,检测肺湿/干重比值,并行肺组织病理学检查。结果 C+GdCl<sub>3</sub>组各指标与正常对照组相比差异无显著性(P>0.05)。ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组和ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组除动脉血氧分压外各项指标显著高于正常对照组,差异有显著性(P<0.05),但与ANP组相比有降低,差异有显著性(P<0.05)。结论 氯化钆可抑制ANP大鼠AM分泌炎症介质,并减轻ANP所致的肺损伤。

**关键词:**氯化钆;胰腺炎/病理学;巨噬细胞,肺泡;炎症介质

中图分类号:R576;R977.7 文献标识码:A

## The effect of gadolinium chloride on inflammatory mediators secreted by alveolar macrophages in acute necrotizing pancreatitis rats

CHENG Shi, SONG Mao-min, SHI Jing-dong

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

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of gadolinium chloride(GdCl<sub>3</sub>) on inflammatory mediators secreted by alveolar macrophages(AMs) in acute necrotizing pancreatitis(ANP) rats. **Methods** Ninety SD rats were randomly into five groups(n=18 in each group): normal control(C) group, ANP group, C+GdCl<sub>3</sub> treatment(C+A) group, ANPGdCl<sub>3</sub> pretreatment(AP) group, ANPGdCl<sub>3</sub> treatment(AT) group. AMs were obtained by bronchoalveolar lavage. The blood gas the weight ratio of wet/dry lung tissue, the protein content of bronchoalveolar lavage fluids(BALF), the myeloperoxidase(MPO) of lung tissue and secretion of TNFα and NO by AMs were evaluated; histologic examination of lung tissue was performed. **Results** The parameters mentioned above in C+A group compared with C group showed no statistical significance(P>0.05). Except the blood gas, the indicators mentioned above in AP group and AT treatment group were significantly elevated compared with normal control group(P<0.05); but lower significantly compared to the ANP group(P<0.05). **Conclusions** GdCl<sub>3</sub> can inhibit the secretion of inflammatory mediators of AMs and ameliorate lung injury of ANP.

**Key words:** Gadolinium Chloride; Pancreatitis/pathol; Macrophages, Alveolar; Inflammatory Mediators

**CLC number:** R576; R977.7 **Document code:** A

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

**收稿日期:**2006-05-23; **修订日期:**2006-09-19。

**作者简介:**程石,男,辽宁沈阳人,首都医科大学附属北京天坛医院副主任医师,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。

实验研究表明急性坏死性胰腺炎(ANP)时肺泡巨噬细胞(AM)可活化并引起肺损伤<sup>[1-2]</sup>。若抑制其活化,可能减少其分泌炎症介质,阻止炎症的发生、发展,从而减轻肺损伤。钆是一种稀有金属,可抑制AM介导的免疫和炎症反应<sup>[3]</sup>。本实验采用氯化钆(GdCl<sub>3</sub>)处理ANP大鼠模型,通过研究AM分泌炎症介质的变化,以明确氯化钆能否减轻ANP所致肺损伤。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器及试剂

牛磺酸钠、氯化钆(Sigma公司),肿瘤坏死因子 $\alpha$ 检测试剂盒(Biosource公司),蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程公司),RPMI1640培养液,胎牛血清(Gibco公司),其他试剂为进口或国产分析纯。

CO<sub>2</sub>培养箱(SHELDON,USA),IL1303型血气分析仪和酶标分光光度计(美国BIO-RAD),ZK82A型电热真空干燥箱(上海实验仪器总厂),低温高速离心机(GRX-220,TOMY SEIKO)。

### 1.2 实验动物及分组

健康成年SD大鼠90只(北京市实验动物中心提供),雌雄不拘,体重250~300g,随机分为5组,每组18只。(1)正常对照组:正常大鼠,自胆胰管内逆行注入生理盐水自胆胰管内逆行注入生理盐水;(2)ANP组:ANP模型制备采用逆行性胰胆管注射5%牛磺酸钠制模,制模成功后不作处理。(3)GdCl<sub>3</sub>处理正常对照组:正常大鼠以10mg/kg(体重)尾静脉注射GdCl<sub>3</sub>。(4)ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组:在ANP模型制成前30min以10mg/kg(体重)尾静脉注射GdCl<sub>3</sub>。(5)ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组:在制成ANP模型后,立刻以10mg/kg(体重)尾静脉注射GdCl<sub>3</sub>。各组在ANP制成后按以下时段再分为1,3,6h 3个亚组。

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 支气管肺泡灌洗及细胞培养 各组动物手术后,分别在不同时点被处死,然后取材。所有标本均重复检查2次。在动物处死前留取腹主动脉血样进行血气分析。然后行支气管肺泡灌洗,收集灌洗液(BALF),留取少量灌洗液,以考马斯亮蓝法测定蛋白含量;将灌洗液离心获取细胞,于37℃,5%CO<sub>2</sub>中培养24h,上清用于检测肿瘤坏死

因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),一氧化氮(NO)。TNF- $\alpha$ 检测应用酶联免疫吸附法,NO检测应用Griess反应法。大鼠右肺下叶用于组织学检查、测定MPO及湿/干重比值测定。MPO测定方法见参考文献<sup>[2]</sup>。

1.3.2 肺组织湿/干重比值测定 取部分肺组织用分析天平称重,代表肺组织湿重,然后将其置入90℃电热干燥箱内过夜,次日测定肺组织重量,代表肺组织干重。两者比值即为肺湿/干重比值。

1.3.3 肺组织病理学检查 将各组大鼠的肺组织置10%福尔马林液中浸泡,石蜡包埋,行HE染色。

### 1.4 统计学处理

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,统计采用SPSS10.0软件分析。

## 2 结 果

### 2.1 肺组织MPO活性及BALF蛋白含量的变化结果

正常对照组大鼠肺组织MPO活性和BALF的蛋白含量均较低。GdCl<sub>3</sub>处理正常对照组各时相与对照组相比无明显差异( $P > 0.05$ )。ANP 1h组与正常对照组相比差异无显著性意义( $F = -0.32$ ,  $P > 0.05$ ),ANP 3h组明显升高,与正常对照组相比差异有显著性意义( $F = -2.52$ ,  $P < 0.05$ ),并随时间进展逐渐升高。ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组和ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组MPO活性及BALF的蛋白含量与ANP组变化趋势相近,与正常对照组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组和ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组MPO活性和BALF的蛋白含量与ANP组相比除1h组外,其余两时相差异有显著性( $P < 0.05$ );而ANP GdCl<sub>3</sub>预处理组和ANP GdCl<sub>3</sub>治疗组两组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )(表1-2)。

表1 肺组织MPO活性变化(U/g,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	1h	3h	6h
正常对照	1.03 $\pm$ 0.09	1.06 $\pm$ 0.11	1.08 $\pm$ 0.07
ANP	1.35 $\pm$ 0.10	3.54 $\pm$ 0.29 <sup>1)</sup>	8.58 $\pm$ 0.54 <sup>1)</sup>
GdCl <sub>3</sub> 处理正常对照	1.04 $\pm$ 0.06	1.05 $\pm$ 0.11	1.03 $\pm$ 0.08
ANP GdCl <sub>3</sub> 预处理	1.32 $\pm$ 0.09	2.52 $\pm$ 0.22 <sup>1),2)</sup>	4.38 $\pm$ 0.58 <sup>1),2)</sup>
ANP GdCl <sub>3</sub> 治疗	1.29 $\pm$ 0.10	2.59 $\pm$ 0.21 <sup>1),2)</sup>	4.89 $\pm$ 0.64 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较, $P < 0.05$ ;2)与ANP组各对应时相比较, $P < 0.05$

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

组别	1h	3h	6h
正常对照	275.9 $\pm$ 10.2	283.5 $\pm$ 13.8	264.4 $\pm$ 17.6
ANP	351.2 $\pm$ 31.8	1020.6 $\pm$ 78.5 <sup>1)</sup>	1825.3 $\pm$ 217.3 <sup>1)</sup>
Gdcl <sub>3</sub> 处理	253.8 $\pm$ 13.5	267.5 $\pm$ 17.4	283.9 $\pm$ 19.9
ANP Gdcl <sub>3</sub> 预处理	345.5 $\pm$ 35.6	877.3 $\pm$ 47.3 <sup>1),2)</sup>	1168.8 $\pm$ 89.4 <sup>1),2)</sup>
ANP Gdcl <sub>3</sub> 治疗	342.7 $\pm$ 28.8	881.3 $\pm$ 34.7 <sup>1),2)</sup>	1215.2 $\pm$ 76.1 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较,  $P < 0.05$  2)与 ANP 组各对应时相比较,  $P < 0.05$

## 2.2 各组大鼠肺组织湿/干重值和血气分析结果

正常对照组肺组织湿/干重值较低, ANP 1h 组开始升高, 与正常对照组相比差异有显著性 ( $F = 4.13, P < 0.05$ ), 并随时间的延长而逐渐升高。Gdcl<sub>3</sub> 处理正常对照组各时相与正常对照组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组肺组织湿/干重值与 ANP 组变化趋势相近, 显著高于正常对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 但后两组与 ANP 组相比, 除 1h 外, 其余两时相均显著低于 ANP 组 ( $P < 0.05$ )。ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (表 3)。各组大鼠动脉血氧分压变化情况与肺组织湿/干重比值呈相反变化, 即肺组织湿/干重比高者血氧分压低, 比重低者血氧分压高 (表 4)。

**表3** 各组大鼠肺组织湿/干重值

组别	1h	3h	6h
正常对照	5.11 $\pm$ 0.29	5.23 $\pm$ 0.31	5.17 $\pm$ 0.34
ANP	5.57 $\pm$ 0.331)	6.33 $\pm$ 0.53 <sup>1)</sup>	8.78 $\pm$ 0.81 <sup>1)</sup>
Gdcl <sub>3</sub> 处理正常对照	5.22 $\pm$ 0.23	5.18 $\pm$ 0.36	5.25 $\pm$ 0.39
ANP Gdcl <sub>3</sub> 预处理	5.58 $\pm$ 0.37 <sup>1)</sup>	5.65 $\pm$ 0.39 <sup>1),2)</sup>	6.67 $\pm$ 0.69 <sup>1),2)</sup>
ANP Gdcl <sub>3</sub> 治疗	5.49 $\pm$ 0.351)	5.77 $\pm$ 0.44 <sup>1),2)</sup>	6.91 $\pm$ 0.55 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较,  $P < 0.05$  2)与 ANP 组各对应时相比较,  $P < 0.05$

**表4** 各组大鼠动脉血氧分压( $\text{mmHg}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ) (1 mmHg = 0.133 kPa)

组别	1h	3h	6h
正常对照	98.4 $\pm$ 3.7	97.4 $\pm$ 5.6	98.1 $\pm$ 4.8
ANP	92.6 $\pm$ 5.4 <sup>1)</sup>	84.6 $\pm$ 6.91)	80.3 $\pm$ 7.1 <sup>1)</sup>
Gdcl <sub>3</sub> 处理正常对照	95.2 $\pm$ 4.4	96.7 $\pm$ 5.3	96.4 $\pm$ 2.7
ANP Gdcl <sub>3</sub> 预处理	93.9 $\pm$ 5.2 <sup>1)</sup>	88.9 $\pm$ 3.7 <sup>1),2)</sup>	86.8 $\pm$ 6.4 <sup>1),2)</sup>
ANP Gdcl <sub>3</sub> 治疗	91.9 $\pm$ 6.01)	88.3 $\pm$ 4.2 <sup>1),2)</sup>	85.9 $\pm$ 5.3 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较,  $P < 0.05$  2)与 ANP 组各对应时相比较,  $P < 0.05$

## 2.3 AM 分泌 TNF- $\alpha$ 和 NO 活性变化

正常对照组 TNF- $\alpha$  活性及 NO 活性均较低, Gdcl<sub>3</sub> 处理正常对照组各时相与对照组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。ANP 1h 组 TNF- $\alpha$  及 NO 活性比正常对照组已有上升, 但差异无显著意义 ( $F = -112.52, P > 0.05$ ); 3h 开始升高明显, 显著高于正常对照组 ( $F = -804.12, P < 0.05$ )。ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组 TNF- $\alpha$  及 NO 活性, 各时相均明显高于正常对照组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ ); 但与 ANP 组相比除 1h 组外, 3, 6h 时相均明显低于 ANP 组 ( $P < 0.05$ ); ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ ) (表 5 - 6)。

**表5** 各组大鼠 AM 分泌 TNF- $\alpha$  活性( $\text{pg/mL}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	1h	3h	6h
正常对照	157.1 $\pm$ 29.1	166.5 $\pm$ 32.3	151.8 $\pm$ 21.6
ANP	265.7 $\pm$ 43.4	957.3 $\pm$ 145.9 <sup>1)</sup>	1624.2 $\pm$ 149.2 <sup>1)</sup>
Gdcl <sub>3</sub> 处理正常对照	148.6 $\pm$ 24.2	130.2 $\pm$ 19.6	175.7 $\pm$ 22.7
ANP Gdcl <sub>3</sub> 预处理	271.4 $\pm$ 18.6	680.5 $\pm$ 82.7 <sup>1),2)</sup>	947.6 $\pm$ 105.5 <sup>1),2)</sup>
ANP Gdcl <sub>3</sub> 治疗	245.2 $\pm$ 43.6	702.2 $\pm$ 69.1 <sup>1),2)</sup>	905.9 $\pm$ 113.6 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较,  $P < 0.05$  2)与 ANP 组各对应时相比较,  $P < 0.05$

**表6** 各组大鼠 AM 分泌 NO 活性( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	1h	3h	6h
正常对照	20.3 $\pm$ 1.3	19.5 $\pm$ 1.5	22.2 $\pm$ 1.1
ANP	25.3 $\pm$ 1.6	45.2 $\pm$ 2.6 <sup>1)</sup>	88.8 $\pm$ 6.5 <sup>1)</sup>
Gdcl <sub>3</sub> 处理正常对照	21.3 $\pm$ 1.5	20.9 $\pm$ 1.5	26.8 $\pm$ 1.1
ANP Gdcl <sub>3</sub> 预处理	24.3 $\pm$ 2.0	30.5 $\pm$ 2.2 <sup>1),2)</sup>	43.5 $\pm$ 5.5 <sup>1),2)</sup>
ANP Gdcl <sub>3</sub> 治疗	26.2 $\pm$ 1.9	31.1 $\pm$ 2.2 <sup>1),2)</sup>	41.1 $\pm$ 4.6 <sup>1),2)</sup>

注:1)与正常对照组比较,  $P < 0.05$  2)与 ANP 组各对应时相比较,  $P < 0.05$

## 2.4 肺组织学检查结果

Gdcl<sub>3</sub> 处理正常对照组的肺组织无明确器质性改变, 与正常对照组相似。ANP 组肺间质明显充血、水肿, 大量中性粒细胞浸润。ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组肺组织改变相似, 与 ANP 组相比均有所减轻, 但仍有中性粒细胞浸润, 肺呈轻度水肿改变。表明 ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和治疗组的肺损伤均获得一定程度的改善。

### 3 讨论

急性肺损伤是 ANP 早期胰外最常见的并发症。笔者的前期研究<sup>[2]</sup>表明 ANP 发生后,AM 可活化而导致肺损伤。如果能抑制巨噬细胞活化或中和其释放的炎性介质将有助于改善 ANP 所致的肺损伤。鉴于后者处理比较复杂,临床实施可行性差,因此有必要寻找一种抑制巨噬细胞活化的物质。氯化钆可使巨噬细胞处于休眠状态,因此被认为是巨噬细胞的良性抑制剂。目前尚无氯化钆对巨噬细胞毒性的报道。

TNF- $\alpha$  和 NO 是在 ANP 肺损伤中起重要作用的炎症介质<sup>[4-5]</sup>。本研究应用氯化钆处理 ANP 大鼠后,同时检测了 AM 分泌的 TNF- $\alpha$  和 NO 活性变化。结果表明,ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组各时相 TNF- $\alpha$  和 NO 活性与 ANP 组相比有降低,差异亦有显著性 ( $P < 0.05$ ),但高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。这表明应用氯化钆后,AM 的活化得到一定程度抑制,致使炎症介质分泌减少,肺损伤在一定程度上得以改善。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。此结果与国内外报道相符<sup>[6-7]</sup>。但上述研究多从氯化钆阻断肝 Kupffer 细胞的角度出发,通过研究 Kupffer 细胞在被阻断前后释放细胞因子的变化来解释肺损伤减轻。本实验从另一个途径解释了氯化钆在肺损伤中的作用,并提示其对肺的作用机制比较复杂,不是单一途径所能阐明的。

本研究同时检测了有关肺损伤的指标<sup>[2,4]</sup>,结果发现用氯化钆处理大鼠后,与正常对照组相比其 AM 无明显改变,表明氯化钆对正常大鼠 AM 无作用。用氯化钆处理 ANP 大鼠后,ANP Gdcl<sub>3</sub> 预处理组和 ANP Gdcl<sub>3</sub> 治疗组除动脉血氧分压外各项指标

均高于正常对照组 ( $P < 0.05$ ),而与 ANP 组相比有降低 ( $P < 0.05$ ),提示应用氯化钆可以减轻 ANP 所致肺损伤,但不能完全预防。

ANP 肺损伤的发病机制目前尚不清楚,但炎症介质网络的失控可能在其中扮演重要角色。本文结果表明,氯化钆可通过使 AM 分泌的炎症介质减少,进而减轻肺损伤。但氯化钆究竟如何抑制 AM 的活化尚不明了,是否与抑制 NF- $\kappa$ B 活化有关等问题仍待深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Closa D, Sabater L, Fernandez-cruz L, *et al.* Activation of alveolar macrophages in lung injury associated with experimental acute pancreatitis is mediated by the liver [J]. *Ann Surg*, 1999, 229(2):230-236.
- [2] 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.
- [3] Limuro Y, Yamamoto M, Kohno H, *et al.* Blockade of liver macrophage by gadolinium chloride reduces lethality in endotoxemic rats-analysis of mechanisms of lethality in endotoxemia [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 55(3):723-728.
- [4] 程石,赵军,何三光,等. 一氧化氮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*, 2003, 41(5):336-339.
- [5] 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.
- [6] Gloor B, Todd KE, Lane JS, *et al.* Hepatic Kupffer cell blockade reduces mortality of acute hemorrhagic pancreatitis in mice [J]. *J Gastrointest Surg*, 1998, 2(5):430-435.
- [7] 刘洪斌,李东华,崔乃强. 氯化钆对大鼠急性出血坏死性胰腺炎肺损伤的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(10):736-740.