

文章编号:1005-6947(2007)10-0972-04

· 基础研究 ·

氯化钆诱导急性坏死性胰腺炎肺泡巨噬细胞凋亡机制的研究

程石, 闫文貌, 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 探讨氯化钆(GdCl₃)诱导急性坏死性胰腺炎(SAP)肺泡巨噬细胞(AM)凋亡的可能机制。方法 48只成年SD大鼠随机分为正常对照组、SAP组、GdCl₃治疗组,每组16只。逆行性胰胆管注射5%牛磺胆酸钠建立AP大鼠模型。经支气管肺泡灌洗获取AM。检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)含量。肺脏/胰腺组织HE染色检查,透射电镜观察和流式细胞仪Annexin V/FITC及碘化丙啶(PI)双染色法检测AM凋亡情况,并行AM爬片的FasL免疫组化检查。结果 GdCl₃治疗组电镜下可见典型凋亡形态学特征,BALF中TNF- α 和IL-1 β 含量[(7.84 \pm 0.75)pg/mL,(8.57 \pm 5.64)pg/mL]较SAP组明显减低,差异均有显著性($P < 0.05$),而AM凋亡率明显增高(22.48 \pm 1.44)%,与正常对照组、SAP组相比差异也有显著性($P < 0.05$);GdCl₃治疗组免疫组化FasL阳性表达较正常组和AP组明显增多(41.67 \pm 11.69)%,差异均有显著性($P < 0.05$)。AM凋亡率与AM中FasL阳性表达率呈明显的线性正相关($r = 0.835, P < 0.001$)。结论 GdCl₃可能通过激活FasL诱导SAP大鼠AM发生凋亡进而减轻肺损伤。

[中国普通外科杂志,2007,16(10):972-975]

关键词: 胰腺炎,急性坏死性;氯化钆;巨噬细胞,肺泡;FasL;凋亡

中图分类号:R 657.51

文献标识码:A

Mechanism of apoptosis of alveolar macrophages in severe acute pancreatitis induced by gadolinium chloride

CHENG Shi, YAN Wen-mao, SONG Mao-min

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

Abstract: **Objective** To discuss the mechanism of apoptosis of alveolar macrophages (AM) in severe acute pancreatitis (SAP) induced by gadolinium chloride (GdCl₃). **Methods** Forty-eight SD rats were randomized into three groups ($n = 16$ for each group): normal control group, SAP group, and GdCl₃ treatment group. Rat SAP model was induced by retrograde intraductal administration of 5% sodium taurocholate. Alveolar macrophages (AM) were obtained by bronchoalveolar lavage. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 1 β (IL-1 β) of bronchoalveolar lavage fluids (BALF) were evaluated. The lung tissue and pancreas tissue were examined by histology. The apoptosis of AM was checked by transmission electric microscopy and cytometry Annexin V/FITC and propidium iodide (PI) double stained method. The expression of FasL in AM was analyzed by immunohistochemistry. **Results** Transmission electric microscopy showed the typical apoptotic morphologic feature of AM in GdCl₃ treatment group. The levels of TNF α and IL-1 β in GdCl₃ treatment group were (7.84 \pm 0.75) pg/mL, (8.57 \pm 5.64) pg/mL respectively, were significantly less than SAP group ($P < 0.05$). Moreover, the rates of apoptosis of AM and expression of FasL in GdCl₃ treatment group [(22.48 \pm 1.44)%, (41.67 \pm 11.69)% respectively] were obviously increased compared

基金项目:北京市科委科技新星计划资助项目(H020821500190)。

收稿日期:2007-08-20; **修订日期:**2007-10-08。

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

with the other two groups ($P < 0.05$). The apoptosis rate of AM had positive correlation with the positive expression of FasL ($r = 0.835, P < 0.001$). **Conclusions** GdCl₃ could induce the apoptosis of AM by activating expression of FasL, and then can ameliorate the lung injury associated with SAP.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (10): 972 - 975]

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing; Gadolinium Chloride; Macrophages, Alveolar; FasL; Apoptosis

CLC number: R 657.51

Document code: A

本课题前期研究表明, GdCl₃ 可诱导急性坏死性胰腺炎(SAP)大鼠肺泡巨噬细胞(AM)发生凋亡从而减轻SAP所致的肺损伤^[1],但其机制尚不明。本研究通过观察FasL在AM中的表达,探讨GdCl₃诱导AM凋亡的可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

健康成年雄性SD大鼠48只(北京动物实验中心提供),体重250~300g,随机分成3组,每组16只:SAP组,逆行性胰胆管注射5%牛磺胆酸钠制备SAP模型;GdCl₃治疗组,在SAP模型制成后即刻按10mg/kg(体重),经阴茎背动脉注射GdCl₃;对照组,逆行性胰胆管注射生理盐水。

1.2 实验方法

1.2.1 支气管肺泡灌洗及细胞培养 制模后6h处死各组动物,然后取材。每组16只动物中,8只用于流式细胞仪检测,2只用于电镜检查,6只用于免疫组织化学(免疫组化)检测FasL表达;所有标本均重复检查2次。在动物处死后行支气管肺泡灌洗,收集灌洗液,留取少量灌洗液,以酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)。将灌洗液离心获取细胞,于37℃5%CO₂培养箱中培养1h;用温培养液冲洗2次后收集细胞,调整细胞浓度;再以2000r/min离心10min,细胞沉淀备用。右肺下叶用于组织学检查。

1.2.2 透射电子显微镜检查 将前述获得的细胞团按常规制备电镜超薄切片,透射电镜观察。

1.2.3 流式细胞仪检测 AM 将前述获得的AM以Annexin V/FITC和碘化丙啶(PI)双染色法于流式细胞仪(美国FACScan)上样,观察散点图。

1.2.4 肺组织病理学检查 将各组大鼠肺组织置10%甲醛溶液浸泡,石蜡包埋切片,行HE染色,光学显微镜下观察。

1.2.5 肺泡灌洗液TNF- α 和IL-1 β 测定 按BioSource公司的TNF- α 和IL-1 β ELISA试剂盒说

明书操作。

1.2.6 FasL表达的检测 采用免疫组化法,将获得的AM行细胞爬片,按北京中杉金桥生物技术有限公司的免疫组化试剂盒说明书操作。胞浆呈棕黄色反应者为阳性细胞。400倍高倍视野下计算1000个细胞中阳性细胞数,并以百分数表示,作FasL阳性计数值。

1.3 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。数据作正态性检验、方差齐性检验,采用单因素方差分析及线性相关分析。所有数据均经SPSS11.5软件处理。

2 结 果

2.1 肺组织学改变

SAP组肺间隔弥漫增厚,肺间质明显充血、水肿,大量中性粒细胞浸润;GdCl₃治疗组肺组织改变与SAP组相比有所减轻,但仍有中性粒细胞浸润,肺呈轻度水肿改变。表明治疗组动物肺损伤有一定程度的减轻(图1)。

2.2 BALF中TNF- α 和IL-1 β 含量的改变

对照组BALF中TNF- α 和IL-1 β 含量较低,治疗组与对照组相比,差异无显著意义($P > 0.05$);SAP组两指标均高于对照组、治疗组(均 $P < 0.01$)。

表1 BALF中TNF α 和IL-1 β 含量($n = 8$)

分组	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照	7.85 \pm 0.52	4.52 \pm 4.06
SAP	9.01 \pm 1.13 ¹⁾	34.16 \pm 11.57 ¹⁾
GdCl ₃ 治疗	7.84 \pm 0.75 ^{1),2)}	8.57 \pm 5.64 ^{1),2)}

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

2.3 透射电子显微镜检测结果

对照组、SAP组均无典型细胞凋亡形态出现;GdCl₃治疗组AM可见典型凋亡形态学特征(图2)。

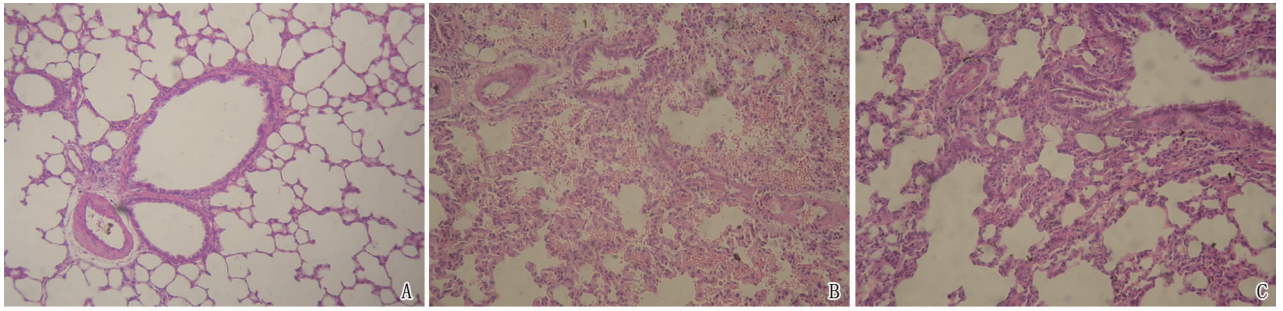


图1 各组大鼠肺组织 HE 染色病理图片(×400) A:对照组; B:SAP组; C:GdCl₃ 治疗组

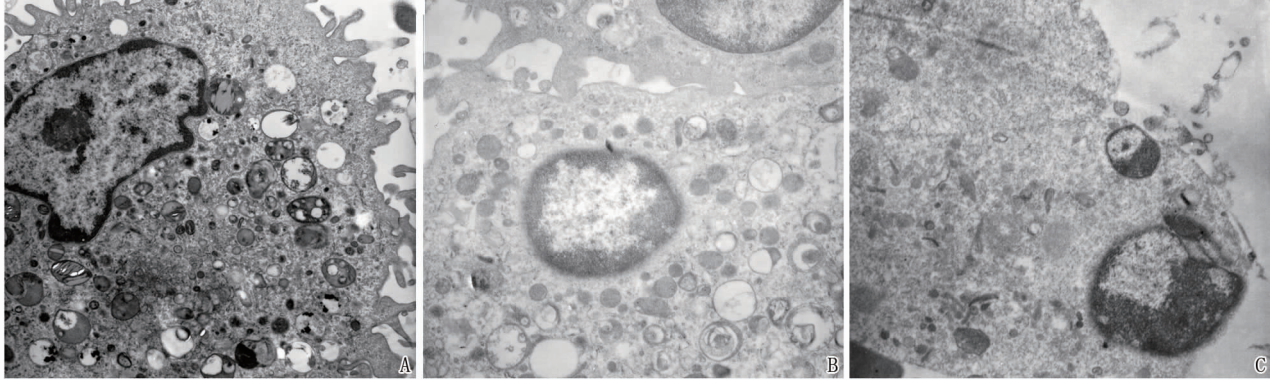


图2 大鼠 AM 电镜照片 A:正常 AM; B:早期凋亡 AM; C:中期凋亡 AM

2.4 流式细胞仪检测结果和免疫组化结果

对照组大鼠 AM 凋亡率高于 SAP 组而低于 GdCl₃ 治疗组,差异均有显著意义($P < 0.01$);治疗组凋亡率显著高于其余两组(均为 $P < 0.01$)(图3)。治疗组 AM 胞浆中 FasL 表达率明显高于

SAP 组和对对照组(均 $P < 0.01$);SAP 组与对照组相比,差异无显著意义($P > 0.05$),但 AP 组较正常对照组略低(图4)。AM 凋亡率与 AM 中 FasL 阳性表达率呈明显的线性正相关($r = 0.835$, $P < 0.001$)。

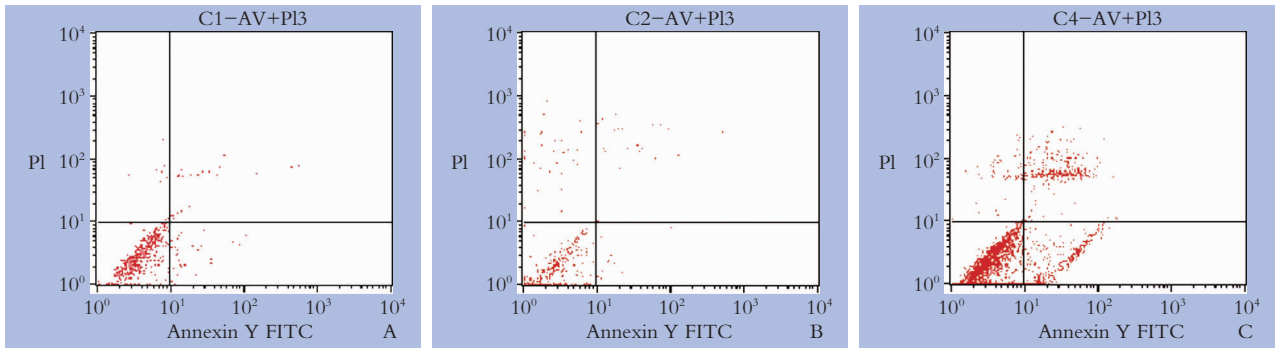


图3 各组大鼠 AM 流式细胞仪散点图 A:对照组; B:SAP组; C:GdCl₃ 治疗组

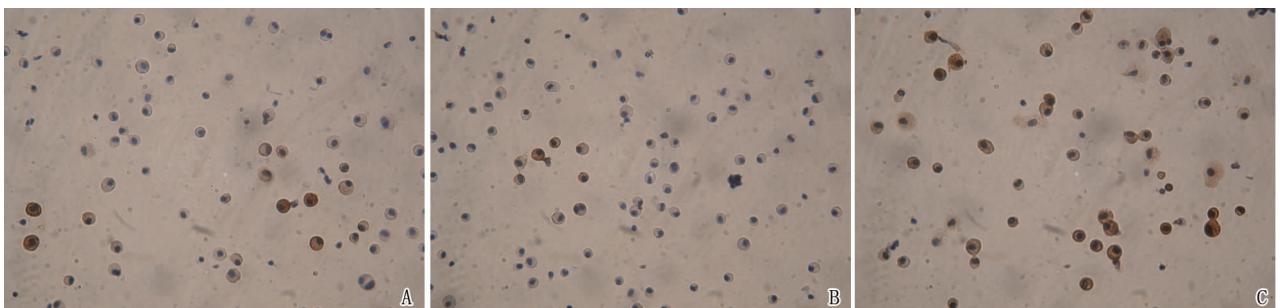


图4 各组大鼠 AM FasL 表达免疫组化照片(×200) A:正常对照组; B:AP组; C:GdCl₃ 治疗组

表2 肺泡巨噬细胞凋亡率和肺泡巨噬细胞 FasL 阳性表达率($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	AM 凋亡率 ($n=8$)	AM FasL 阳性表达率 ($n=6$)
对照	11.28 ± 1.01	7.50 ± 2.10
SAP	6.86 ± 1.35 ¹⁾	5.67 ± 2.34
GdCl ₃ 治疗	22.48 ± 1.44 ^{1),2)}	41.67 ± 11.69 ^{1),2)}

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

3 讨论

急性肺损伤是 SAP 早期胰外最常见的并发症。本课题前期研究表明, SAP 发生后, AM 可活化而导致肺损伤^[2]。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 SAP 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。为此笔者曾应用巨噬细胞的良性抑制剂氯化钆来处理 AM,发现 GdCl₃ 能诱导急性胰腺炎大鼠 AM 发生凋亡,减少其分泌炎症介质,进而减轻肺损伤^[1]。但 GdCl₃ 如何诱导 AM 发生凋亡仍不清楚。

近年来有研究表明 Fas/FasL 系统活化可能参与了巨噬细胞的凋亡^[3-6]。Kitsmura 等^[4]在内毒素诱导的小鼠急性肺损伤中发现,伤后 Fas 抗原在 AM 的表达明显上调, FasL 的表达在伤后 1 d 就明显增强,并且 Fas, FasL 表达的增强与 AM 凋亡的增加呈平行关系。提示 Fas/FasL 系统活化可能参与 AM 凋亡的机制。Peng 和 Gallagher 的研究表明 Fas/FasL 系统的激活可诱导 AP 肝脏 Kupffer 细胞发生凋亡,进而导致肝损伤^[5-6]。

本实验结果发现, SAP 时 AM 胞浆中 FasL 表达较低, AM 凋亡明显减少,而用氯化钆干预治疗后, AM 胞浆中 FasL 表达明显增高, AM 凋亡明显

增多且两者之间存在明显的正相关。这表明氯化钆可能通过 FasL 激活而启动凋亡信号通路,促使 AM 凋亡。检测 BALF 中炎性细胞介质 TNF- α 和 IL-1 β 含量,发现 SAP 时明显增加,而 GdCl₃ 治疗后则明显减低。说明氯化钆可能通过激活 FasL 而诱导 AM 凋亡,从而减少炎症介质的分泌,并进而减轻了肺损伤。组织学检查结果进一步证实上述结论。

FasL 激活后如何启动凋亡程序? 推测可能是激活核因子- κ B 进而经过一系列的蛋白酶级联反应最终活化凋亡执行者 caspase-3, 启动核酸内切酶剪切 DNA 引发凋亡。但其具体机制仍有待深入研究。

参考文献:

- [1] 程石,宋茂民,李志宏,等. 氯化钆对急性坏死性胰腺炎肺损伤的防护作用[J]. 中华外科杂志, 2004, 42(15): 936-937.
- [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] 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.
- [4] Kitsmura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt 1): 762-769.
- [5] Peng Y, Gallagher SF, Haines K, et al. Nuclear factor- κ B mediates Kupffer cell apoptosis through transcriptional activation of Fas/FasL[J]. J Surg Res, 2006, 130(1): 58-65.
- [6] Gallagher SF, Peng Y, Haines K, et al. Fas/FasL play a central role in pancreatitis-induced hepatocyte apoptosis[J]. J Gastrointest Surg, 2005, 9(4): 467-474.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于征求论文获奖证书的启事

刊出论文获奖情况是检验期刊质量的一项重要指标,也是对作者及编者工作的肯定。《中国普通外科杂志》在广大作者、读者的支持下,近年来得到了长足的发展和进步,据有关权威机构统计分析其影响因子已居同类期刊前列。为了进一步提高办刊质量,收集各方面反馈信息,编辑部敬请在本刊已发表论文并获得各种奖励者将获奖证书及相关资料复印件寄本刊编辑部。凡寄回获奖证明者可优先发表论文,谢谢合作。

中国普通外科杂志编辑部