

• 论著 •

急性胰腺炎肺组织肺表面活性蛋白 A 的表达及功能改变

张雪梅 陈海龙 王朝晖

【摘要】目的 探讨重症急性胰腺炎(SAP)合并急性肺损伤(ALI)时肺组织肺表面活性蛋白 A(SP-A)的表达及功能改变。**方法** 将 20 只 SD 大鼠随机分为假手术(Sham)组($n=10$)、SAP 组($n=10$)。Sham 组仅行剖腹术,翻动胰腺。SAP 组用去氧胆酸钠经胰胆管逆行注射建立 SAP 肺损伤模型。各组动物于术后 24 h 取血测动脉血氧分压(PaO_2)、血清淀粉酶。处死动物后取肺组织计算肺湿/干重(W/D)比值;应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组化法测定肺组织 SP-A 的 mRNA 及蛋白表达,并观察胰腺、肺组织病理变化及肺泡 I 型上皮细胞的电镜下变化。**结果** 与 Sham 组比较,SAP 组 PaO_2 显著降低[(96.78±3.81)mm Hg 比 (79.24±5.84)mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa, $P < 0.05$];血清淀粉酶显著升高[(1 193.41±192.54)U/L 比 (7 144.19±727.91)U/L, $P < 0.05$];肺 W/D 比值显著升高(3.70±0.90 比 8.57±2.45, $P < 0.05$);SP-A 的 mRNA 及蛋白表达显著降低(mRNA:1.21±0.10 比 0.80±0.11;蛋白:7 982.22±3 689.57 比 3 497.99±2 958.21, P 均 < 0.05),且 SAP 组 SP-A 的 mRNA 及蛋白表达与肺损伤的程度均呈明显负相关($r_1 = -0.876$, $P < 0.01$; $r_2 = -0.713$, $P < 0.05$)。**结论** SAP 时肺泡 I 型上皮细胞功能受损、SP-A 表达降低可能是 ALI 的发病机制之一。

【关键词】 胰腺炎,急性,重症; 肺表面活性蛋白 A; 肺损伤,急性

The expression and function of pulmonary surfactant protein A in severe acute pancreatitis in rats ZHANG Xue-mei*, CHEN Hai-long, WANG Zhao-hui. * Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China
Corresponding author: CHEN Hai-long (Email: hailongchen2006@126.com)

【Abstract】Objective To investigate the expression and function of surfactant protein A (SP-A) in lung in rats with acute lung injury (ALI) induced by severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** Twenty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 2 groups: sham operation group (sham, $n=10$) and SAP model group (SAP, $n=10$). SAP model was reproduced in SAP group. In sham group laparotomy only was done. Serum amylase (AMY) levels, partial pressure of oxygen in artery (PaO_2) and lung wet/dry (W/D) ratio were determined. SP-A mRNA expression in lung was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). SP-A protein expression in lung tissues was assessed by immunohistochemistry. The pathologic changes in pancreas and lung were observed 24 hours after reproduction of the model. **Results** Compared with sham group, PaO_2 in SAP group was decreased significantly [(96.78±3.81) mm Hg vs. (79.24±5.84) mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa, $P < 0.05$]. Serum levels of AMY and W/D ratio in SAP group were remarkably higher than that in sham group [(1 193.41±192.54) U/L vs. (7 144.19±727.91) U/L, 3.70±0.90 vs. 8.57±2.45, both $P < 0.05$]. The expression of SP-A mRNA in lung tissues in SAP group was significantly down-regulated compared with that in sham group (1.21±0.10 vs. 0.80±0.11, $P < 0.05$). The expression of SP-A protein in lung in SAP group was significantly decreased than that in sham group (7 982.22±3 689.57 vs. 3 497.99±2 958.21, $P < 0.05$). The pathologic changes in pancreas and lung were marked in SAP group. The expression of SP-A protein and mRNA showed significant negative correlation with the extent of lung injury ($r_1 = -0.876$, $P < 0.01$; $r_2 = -0.713$, $P < 0.05$). **Conclusion** SP-A decreases remarkably in ALI induced by SAP. Type I pneumonocytes might play an important role in ALI induced by SAP.

【Key words】 severe acute pancreatitis; surfactant protein A; acute lung injury

临床发现,重症急性胰腺炎(SAP)患者中有 15%~20%合并急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[1],

其病死率高达 50%^[2]。有研究证实,肺泡 I 型上皮细胞功能改变在急性肺损伤(ALI)中起重要作用^[3],是肺泡表面一类重要的细胞群体,主要功能是合成、分泌肺表面活性物质(PS),肺表面活性蛋白 A(SP-A)是 PS 的主要成分之一,对维持肺泡的结构、功能具有重要作用。本实验通过 SAP 合并 ALI 大鼠模型,探讨 SP-A 在肺组织中表达的变化及功能改变,报告如下。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90709005)

作者单位:116011 大连医科大学附属第一医院普外科(张雪梅,陈海龙);116027 大连医科大学附属二院消化科(王朝晖)

通讯作者:陈海龙,Email:hailongchen2006@126.com

作者简介:张雪梅(1971-),女(汉族),山东省人,博士研究生,主治医师,Email:zhangxuemeidl@163.com.

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂:健康成年雄性 SD 大鼠 20 只,清洁级,体重 180~220 g,由大连医科大学实验动物中心提供,适应性饲养 1 周。去氧胆酸钠(美国 Sigma 公司);TRIzol(美国 Invitrogen 公司);引物由大连宝生物合成,SP-A 引物序列:上游 5'-GGAAGCCCTGGGATCCCTGG-3',下游 5'-T AATGGTATCAAAGTTGACTG-3';三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)序列:上游 5'-CCATGGAGA AGGCTGGGG-3',下游 5'-CAAAGTTGTCAT GGATGACC-3'。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(大连宝生物公司)。兔抗大鼠 SP-A 抗体、生物素标记羊抗兔抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 动物分组及模型制备:按随机数字表法将动物分为假手术(Sham)组和 SAP 组,每组 10 只。采用胰胆管逆行注入体积分数为 1.5%的去氧胆酸钠建立大鼠 SAP 时 ALI 模型。用体积分数为 10%的水合氯醛(3 ml/kg)腹腔内注射麻醉,开腹,以无损伤小动脉夹暂时阻断胆管出肝门端,在胰胆管十二指肠乳头开口处对侧肠壁上插入 1 ml 注射器,针头经胰胆管十二指肠乳头开口入胰胆管,固定,以匀速注入去氧胆酸钠 1 ml/kg(0.1 ml/min)后拔管,5 min 后去除小动脉夹缝合腹壁。Sham 组于开腹后仅翻动胰腺数次,关腹。

1.3 标本采集、检测指标及方法:各组动物分别于制模成功后 24 h 留取标本。

1.3.1 血气及血清淀粉酶(AMY)检测:颈动脉采血做动脉血气分析;经下腔静脉采血,用全自动生化分析仪检测血清 AMY。

1.3.2 肺湿/干重(W/D)比值测定:动物放血致死 后取右肺称湿重,置 60℃烤箱连续烘烤 24 h;去除水分至衡重,称肺干重,计算肺 W/D 比值。

1.3.3 病理检查:左肺中叶用体积分数为 10%的中性甲醛水溶液固定,石蜡包埋切片 5 μm,苏木素-伊红(HE)染色后显微镜下观察并照相。病理医师单盲读片,肺病理改变采用 Derks 等^[4]描述的评分标准评分。10%甲醛水溶液固定部分胰腺组织,切片后行 HE 染色,显微镜下观察并照相。

1.3.4 肺组织中 SP-A mRNA 的表达检测:采用 RT-PCR 技术。TRIzol 试剂一步法抽提肺组织中总 RNA,经紫外光检测 260 nm 和 280 nm 处吸光度(A)值, A_{260}/A_{280} 为 1.6~2.2,计算总 RNA 的浓度。逆转录后行 PCR 扩增。反应条件:99℃ 5 min 预变性,然后 94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,共进行

30 个循环,最后 72℃ 7 min 产物链延伸。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶图像分析系统进行电泳条带密度分析,以 SP-A 与 GAPDH 的比值代表靶基因 mRNA 的表达水平。

1.3.5 免疫组化检测肺组织 SP-A 蛋白表达变化:脱蜡后,依次体积分数为 3%过氧化氢溶液封闭过氧化物酶,微波抗原修复、山羊血清封闭,再逐步加入兔抗大鼠 SP-A 抗体,生物素标记的山羊抗兔 IgG 及辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,最后经 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染后封片。分别以磷酸盐缓冲液(PBS)和正常兔血清替代第一抗体作空白及阴性对照。各组随机取 3 只动物的切片,在显微图像定量分析系统上,物镜放大 20 倍进行图像分析,每张切片随机测定 20 个肺泡区免疫阳性信号的积分 A 值,代表 SP-A 相对含量。

1.3.6 电镜下观察:每组随机取 3 只动物,肺组织取材后,经体积分数为 2.5%的戊二醛固定 1 h,常规脱水,浸透,包埋,超薄切片,经锇酸染色后,置透射电镜下观察肺泡 II 型上皮细胞。

1.4 统计学方法:使用 SPSS 10.0 统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验,相关性检验用线性回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变(表 2):Sham 组肺组织结构清晰,肺泡壁薄,肺泡腔内偶见巨噬细胞,未见中性粒细胞浸润。SAP 组可见肺间质高度充血、水肿,大部肺泡间隔明显增宽,较多的肺泡萎陷及邻近肺泡隔断裂形成肺大泡,肺间质大量中性粒细胞浸润,毛细血管扩张、充血,灶状肺泡内出血,病理评分显著高于 Sham 组($P < 0.05$)。

2.2 肺内 SP-A 表达与肺损伤病理评分的相关性:SAP 组 SP-A 的 mRNA 及蛋白表达均与肺损伤病理评分呈显著负相关($r_1 = -0.876, P < 0.01; r_2 = -0.713, P < 0.05$)。

2.3 动脉血气、AMY、肺 W/D 比值的水平(表 1):与 Sham 组比较,SAP 组动脉血氧分压(PaO₂)明显下降($P < 0.05$),表明 SAP 组肺功能有明显损伤。SAP 组 AMY、肺 W/D 比值均显著升高(P 均 < 0.05)。

表 1 各组大鼠 PaO₂、AMY、肺 W/D 比值($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	PaO ₂ (mm Hg)	AMY(kU/L)	肺 W/D 比值
Sham 组	10	96.78±3.81	1.193±0.192	3.70±0.90
SAP 组	10	79.24±5.84*	7.144±0.728*	8.57±2.45*

注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$;1 mm Hg=0.133 kPa

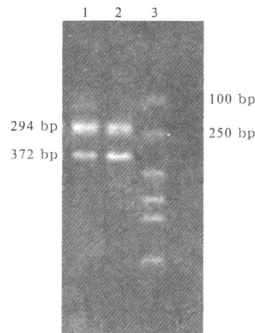
2.4 肺组织 SP-A 的 mRNA 及蛋白表达(表 2):

图 1,彩色插页图 2);SAP 组 SP-A mRNA 表达较 Sham 组明显减少($P < 0.05$)。免疫组化检查可见 Sham 组肺泡 II 型上皮细胞可见棕黄色染色,SP-A 明显表达;SAP 组肺内阳性 II 型上皮细胞数量减少,染色变浅;SAP 组 SP-A 表达较 Sham 组显著降低($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 SP-A 的 mRNA 和蛋白表达以及病理评分结果($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	SP-A mRNA (A 值)	SP-A 蛋白 (积分 A 值)	病理评分 (分)
Sham 组	10	1.21 ± 0.10	7 982.22 ± 3 689.57	0
SAP 组	10	0.80 ± 0.11*	3 497.99 ± 2 958.21*	8.49 ± 0.79*

注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$



1;Sham 组;2;SAP 组;3;Marker
图 1 各组大鼠肺组织 SP-A mRNA 表达

2.5 胰腺病理学检查:Sham 组胰腺结构大致正常;SAP 组可见胰腺弥漫性出血、片状坏死,胰腺间质及腺泡炎性细胞浸润。

2.6 电镜结果(彩色插页图 3):Sham 组肺泡 II 型细胞形状较规则,细胞表面有很多长短不一、粗细不等的微绒毛,胞核明显,胞质内含数量不等、大小不一的特征性板层小体,可见不同的成熟阶段。SAP 组可见肺泡 II 型细胞相对不规则,细胞变性,甚至出现崩解,细胞表面微绒毛减少,胞质内板层小体排空明显增多而致空泡化,并可见脱落的板层小体。

3 讨论

肺泡 II 型上皮细胞是肺泡表面一类重要的细胞群体,具有合成和分泌 PS 的功能^[5],补充和分化肺泡 I 型上皮细胞,并且在药物和毒物的代谢、解毒等方面均具有重要的功能。SP 是 PS 的有效活性成分,其主要功能是促进肺泡气-液界面的表面活性膜形成和稳定,防止肺泡萎陷。SP-A 为 SP 中含量最多的糖蛋白,其在维护并增强 PS 系统表面活性、促

进 PS 磷脂单分子层在气液界面的吸附、扩展等方面都有非常重要的作用^[6-7]。

近年来人们认识到,肺内 PS 活性成分的减少可能比总量的减少在肺损伤发病中更有意义。研究表明,随着 PS 系统及肺功能损害,肺内 SP-A 可明显减少^[6]。SP-A 的减少可使 PS 活性降低、代谢障碍,使 PS 对氧自由基和脂质过氧化物以及渗出血浆蛋白灭活作用的抵抗能力明显减弱^[8-9]。

本实验发现,SAP 合并 ALI 24 h 后 PaO₂ 显著下降,肺 W/D 比值明显增加,病理检查见弥漫性肺实质损伤和肺水肿,符合 ALI 的病理改变。SP-A mRNA 表达与肺损害程度呈显著负相关,提示肺内 SP-A 含量减少可能发生在转录水平。免疫组化检查见肺 SP-A 表达减少,提示 SAP 并发 ALI 可致大鼠 PS 有效成分 SP-A 含量减少,肺内 SP-A 降低。电镜检查可见 SAP 肺损伤后 II 型肺泡上皮细胞微绒毛减少甚至消失,板层小体空泡变性,II 型肺泡上皮细胞结构的破坏可能是 SP-A 表达减弱的原因之一。本研究结果提示,肺内 SP-A 表达减弱可能在 SAP 肺损伤时起重要作用。

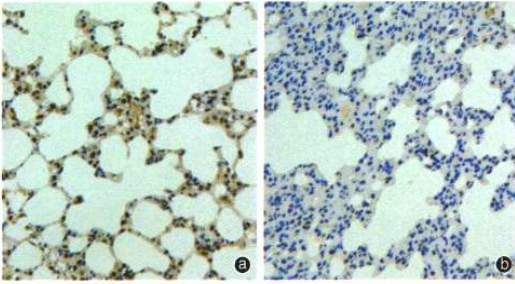
参考文献

- [1] 虞文魁,李维勤,李宁,等.急性胰腺炎并发急性肺损伤的影响因素及临床意义[J].中国危重病急救医学,2004,16(2):100-102.
- [2] Browne G W, Pitchumoni C S. Pathophysiology of pulmonary complications of acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(44):7087-7096.
- [3] Wang X D, Börjesson A, Sun Z W, et al. The association of type II pneumocytes and endothelial permeability with the pulmonary macrophage system in experimental acute pancreatitis[J]. Eur J Clin Invest, 1998,28(9):778-785.
- [4] Derks C M, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid, a systemic morphologic study[J]. Am J Pathol, 1977,87(1):143-158.
- [5] 柳琪林,胡森,盛志勇.肺泡 II 型上皮细胞形态与功能的研究进展[J].中国危重病急救医学,2003;15(7):445-446.
- [6] Heinrich S, Hartl D, Griese M. Surfactant protein A: from genes to human lung diseases[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(27):3239-3252.
- [7] Kishore U, Greenough T J, Waters P, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors[J]. Mol Immunol, 2006, 43(9):1293-1315.
- [8] Haque R, Umstead T M, Ponnuru P, et al. Role of surfactant protein-A (SP-A) in lung injury in response to acute ozone exposure of SP-A deficient mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007,220(1):72-82.
- [9] Mora R, Arold S, Marzan Y, et al. Determinants of surfactant function in acute lung injury and early recovery[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(2):L342-349.

(收稿日期:2007-11-09 修回日期:2008-06-06)
(本文编辑:李银平)

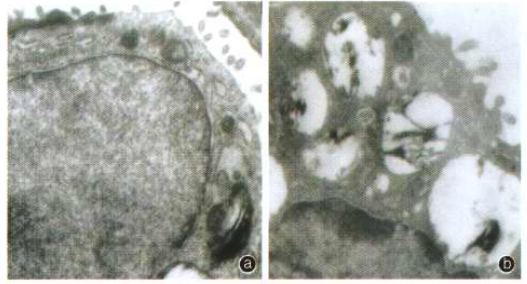
急性胰腺炎肺组织肺表面活性蛋白A的表达及功能改变

(正文见390页)



①:Sham组; ②:SAP组

图2 各组大鼠肺组织SP-A的改变(免疫组化, ×400)

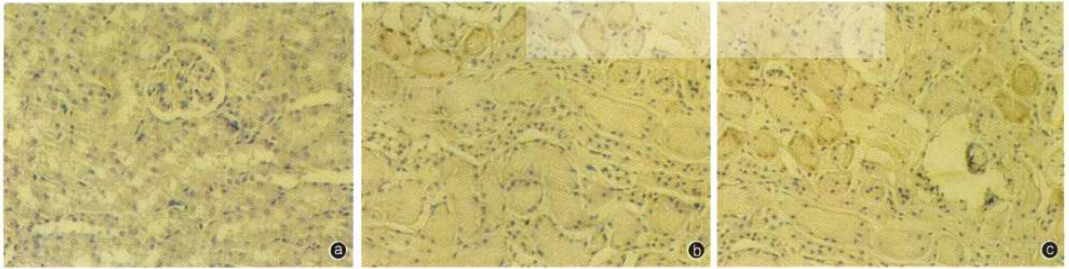


①:Sham组; ②:SAP组

图3 各组大鼠肺泡II型上皮细胞电镜结果(钨酸, ×8 000)

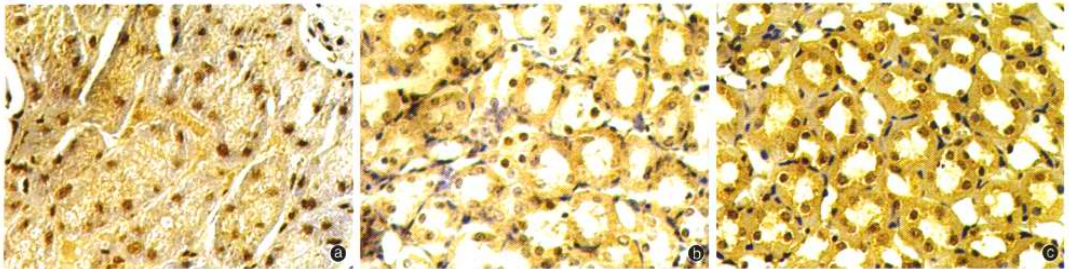
高原不同海拔地区大鼠严重烫伤延迟复苏后 肾组织细胞凋亡及低氧诱导因子-1 α 的表达

(正文见397页)



①:CG组; ②:海拔1517 m DFR组; ③:海拔3848 m DFR组

图1 CG组和DFR组大鼠伤后12 h肾组织细胞凋亡的阳性表达(TUNEL, ×400)

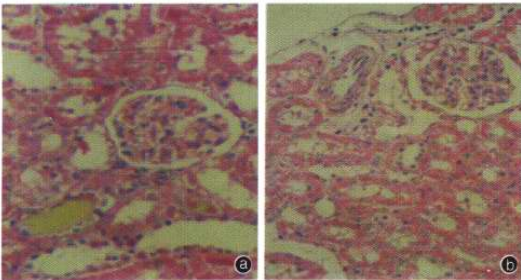


①:海拔3848 m IFR组伤后6 h; ②:海拔1517 m DFR组伤后12 h; ③:海拔3848 m DFR组伤后12 h

图2 IFR组和DFR组大鼠肾组织HIF-1 α 的阳性表达(免疫组化, ×400)

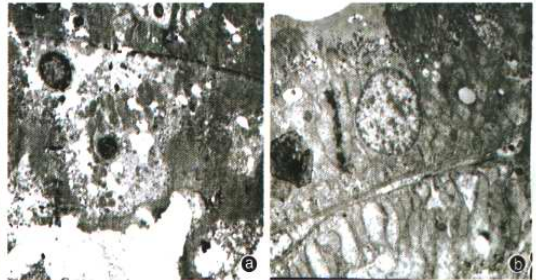
高密度脂蛋白对严重烫伤大鼠肾功能的保护作用

(正文见430页)



①:烫伤组; ②:实验组

图1 光镜下观察两组大鼠伤后48 h肾组织病理学变化(HE, ×100)



①:烫伤组; ②:实验组

图2 电镜下观察两组大鼠伤后48 h肾组织病理学变化(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×13 000)