

· 论 著 ·

SP-A 在急性坏死性胰腺炎肺损伤大鼠的表达和意义

陈 瑜, 黄中伟[△], 沈雁波

(南通大学附属医院急诊内科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨肺表面活性物质相关蛋白 A(SP-A)在急性坏死性胰腺炎(ANP)并发急性肺损伤(ALI)发病中的意义及其可能的机制。方法 将健康 SD 大鼠 100 只随机分成两组:假手术组(SO 组)和模型组(ANP 组)。成功制模后,各组分别在 6、12、24、36、48 h 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清及肺泡灌洗液(BALF)中 SP-A 的浓度。同时进行肺湿/干质量比值(W/D)测定,观察胰腺和肺组织病理形态学的改变。结果 ANP 组血清 SP-A 浓度从 6 h 开始明显上升,36 h 达到高峰,48 h 仍强烈表达,数值仍高于 SO 组($P < 0.01$)。ANP 组 BALF 中 SP-A 浓度较 SO 组相同时间点明显下降($P < 0.01$)。随着胰腺损伤的逐渐加重,肺损伤程度也逐渐加重。结论 血清 SP-A 浓度的增高及 BALF 中 SP-A 浓度减少程度与病情严重程度呈正相关。

关键词:胰腺炎,急性坏死性;呼吸窘迫综合征,成人;肺表面活性物质相关蛋白质 A;支气管肺泡灌洗液

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.25.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)25-2497-02

The expression and significance of SP-A in rats with acute necrotizing pancreatitis-associated lung injury

Chen Yu, Huang Zhongwei[△], Shen Yanbo

(Emergency Medical Department, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

Abstract: Objective To investigate the role and the possible mechanism of pulmonary surfactant-associated protein A(SP-A) in acute necrotizing pancreatitis-associated lung injury in rats. Methods One hundred Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: sham operation group(SO group) and acute necrotizing pancreatitis group(ANP group). Animals in each group were sacrificed at 6, 12, 24, 36, 48 h after operations respectively. The concentrations of SP-A in serum and the concentration of SP-A in broncho-Alveolar lavage fluid(BALF) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Moreover, pancreatic and pulmonary pathomorphology were compared between the two groups. Results In ANP group, SP-A in serum was increased markedly at 6 h, and culminated at 36 h, and remained at a high level at 48 h. There was significant difference in serum SP-A concentrations between the two groups($P < 0.01$). In ANP group, the levels of SP-A in BALF were significantly lower than those in SO group($P < 0.01$). The severity of lung injury was parallel with the severity of pancreas injury. Conclusion The extent of serum SP-A increase and BALF SP-A decrease are positively correlated with the severity of ALI.

Key words: pancreatitis, acute necrotizing; respiratory distress syndrome, adult; pulmonary surfactant-associated protein A; bronchoalveolar lavage fluid

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)是一种病情进展迅速,易累及肺、肝、肾、心脏等全身多个脏器,导致全身多脏器功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MOF)的预后凶险性疾病^[1]。而急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是 ANP 早期最常见的并发症^[2],以及最主要的死亡原因之一。肺表面活性物质相关蛋白 A(pulmonary surfactant associated protein A, SP-A)是反映 ALI 的早期指标,本研究通过构建 ANP 并发 ALI 的动物模型,观察 SP-A 等相关指标的变化,探讨 SP-A 在 ANP 并发 ALI 发病中的意义及其可能的机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 选取健康成年大鼠(sprague-dawley, SD)100 只(体质量 220~250 kg, 两月龄左右,雌雄不拘,由南通大学实验动物中心提供),随机分成假手术组(SO 组)和模型组(ANP 组),各组又分别随机分为 6、12、24、36、48 h 组,每组 10 只。

1.2 模型制备 参照 Lankish 和 Ibse^[3]的方法,SD 术前禁食 12 h,不禁水,腹腔注射 10%水合氯醛(中国医药集团上海化学试剂公司)300 mg/kg 麻醉 SD 后,固定于手术台,腹部皮肤常规消毒,正中切口入腹,于十二指肠内侧可见片状分布的胰腺,找到胰胆管,胰胆管十二指肠开口处用无损伤金属夹夹闭,41/2号输液针头向十二指肠开口方向插入胰胆管,以 0.1 mL/

min 速度向胰胆管内注入 4%牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司),剂量为 1 mL/kg,注射完毕后保持 3 min,至胰腺组织出现肉眼可见的水肿、出血变化后,解除胰胆管上下阻断,拔出穿刺针,分层关腹,即制成 ANP 并发 ALI SD 模型,麻醉苏醒后,自由饮水,禁食,保持室温 23~26 °C,SO 组步骤同 ANP 组,推注 0.9%生理盐水,剂量为 1 mL/kg。

1.3 指标检测 分别于制模后 6、12、24、36、48 h 将 SD 麻醉剖腹,心脏穿刺抽取 2~3 mL 血液注入试管,室温下 3 000 r/min 离心 20 min 后留取血清,置于-80 °C 冰箱中保存待检;放血处死后,取 SD 的左肺,用生理盐水 2 mL 行支气管肺泡灌洗 2 次,取回收的肺泡灌洗液(BALF)2 mL 注入试管,室温下 2 500 r/min 离心 10 min 后留取上清液,置于-80 °C 冰箱中保存待检,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清 SP-A 浓度和 BALF 中 SP-A 浓度(SP-A 试剂由上海亚培生物科技有限公司提供)。取 SD 的右肺中叶组织,滤纸吸干表面水分,用电子分析天平称湿质量(W),然后在 80 °C 电热干燥箱内烘烤 24 h,质量恒定后称干质量(D),计算肺湿/干质量比值(W/D)。同时快速切取胰腺、肺组织,置于 4%多聚甲醛(南京大唐化工有限责任公司)中固定,用石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色。

1.4 统计学处理 应用 SPSS15.0 软件进行统计学数据分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SD 一般情况 ANP 组,6 h 组 SD 少动,腹腔积液较少;12 h 组 SD 出现呼吸急促,活动减少,开始有血性腹腔积液;24~48 h 内可见 SD 喘息明显,血性腹腔积液增多。发绀进行性加重,24~36 h 内 1 只死亡(表 1)。随着时间推移,SD 呈现严重呼吸窘迫表现,36~48 h 内 1 只死亡。SO 组 SD 无明显呼吸困难,3 h 活动灵敏;6~48 h 摄入食、水无明显异常,无死亡发生。两组术后不同时间肺组织 W/D、血清 SP-A 浓度、BALF 中 SP-A 浓度测定见表 1。

表 1 两组术后不同时间肺组织 W/D、血清 SP-A 浓度、BALF 中 SP-A 浓度测定值比较($\bar{x} \pm s$)

| 时间(h) | 检测指标 | n | SO 组 | n | ANP 组 |
|-------|------------------|----|------------|----------------|------------|
| 6 | W/D | 10 | 2.57±0.15* | 10 | 4.44±0.19 |
| | 血清 SP-A(ng/mL) | 10 | 0.02±0.01* | 10 | 0.22±0.02 |
| | BALF SP-A(ng/mL) | 10 | 2.63±0.38* | 10 | 1.52±0.13 |
| 12 | W/D | 10 | 2.45±0.12* | 10 | 4.66±0.11 |
| | 血清 SP-A(ng/mL) | 10 | 0.03±0.01* | 10 | 0.24±0.01 |
| | BALF SP-A(ng/mL) | 10 | 2.49±0.05* | 10 | 1.63±0.14 |
| 24 | W/D | 10 | 2.54±0.13* | 10 | 4.83±0.10 |
| | 血清 SP-A(ng/mL) | 10 | 0.03±0.01* | 10 | 0.27±0.03 |
| | BALF SP-A(ng/mL) | 10 | 2.51±0.00 | 10 | 1.43±0.06 |
| 36 | W/D | 10 | 2.47±0.20* | 9 ^a | 4.96±0.11 |
| | 血清 SP-A(ng/mL) | 10 | 0.03±0.01* | 9 ^a | 0.292±0.02 |
| | BALF SP-A(n/mL) | 10 | 2.53±0.16* | 9 ^a | 1.14±0.07 |
| 48 | W/D | 10 | 2.54±0.10* | 8 ^a | 5.07±0.14 |
| | 血清 SP-A(ng/mL) | 10 | 0.02±0.01* | 8 ^a | 0.260±0.02 |
| | BALF SP-A(ng/mL) | 10 | 2.44±0.13* | 8 ^a | 0.93±0.06 |

*: $P < 0.01$, 与 ANP 组比较;^a: 24~36 h 和 36~48 h 各 1 只 SD 死亡。

2.2 胰腺组织的显微镜观察 SO 组 SD 早期可见部分间质水肿,极少量的炎性细胞浸润,偶见点状出血,未见腺泡细胞坏死。ANP 组 SD 术后 6 h 可见明显小叶间水肿,片状出血,炎性细胞浸润,部分腺泡细胞变性;术后 12~48 h 可见大量炎性细胞浸润,片状出血,胰腺小叶结构破坏,大量腺泡细胞坏死明显(封 2 图 1)。

2.3 肺组织的显微镜观察 SO 组各时间点 SD 肺组织结构基本正常。ANP 组 6 h 见 SD 肺间质水肿、充血,12 h 后随着时间的延长,肺病理改变逐渐加重呈不同程度的肺泡和间质水肿、出血,肺泡间隔增宽,大量炎症细胞浸润,肺组织结构紊乱等典型的 ALI 病理改变(封 3 图 2)。

3 讨 论

急性胰腺炎相关性肺损伤(acute pancreatitis-associated lung injury, APALI)发生机制仍不很清楚。有研究认为 ALI 主要机制在于肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)发生改变,导致肺微血管通透性增高,使组织间隙中富含蛋白质的液体大量渗入,引起肺水肿^[4-5]。而 SP-A 为 PS 的一种重要组成成分^[6],其分布于肺泡气液界面,起到抑制肺泡 II 型上皮细胞的凋亡、防止肺泡萎陷和肺不张的作用^[7-8]。由于 SP-A 极大部分在肺内合成与分泌,肺外组织极少表达^[9],因而 SP-A 的合成与分泌有一定的肺部特异性。

在本研究中,ANP 组肺 W/D 逐渐增加(表 1),提示肺泡

毛细血管损伤加重^[10],通透性增加,SP-A 可通过受损的毛细血管膜进入血液循环,使血清中 SP-A 浓度增高,而 BALF 中 SP-A 浓度进一步降低^[11],从而在一定时间点 ANP 组血清 SP-A 浓度与 BALF 中 SP-A 浓度呈负相关。本研究结果也进一步证明此理论(表 1)。有研究证明,BALF 中 SP-A 的浓度减少程度与病情严重程度呈正相关^[12]。而与反复多次支气管灌洗测定 SP-A 浓度相比,采用操作简单的 ELISA 法检测血清 SP-A 浓度,其快捷,方便,无创,更易被临床所接受。因此,血清 SP-A 水平可以作为反映肺损伤程度特异性指标之一^[12],适合于临床应用。

综上所述,血清 SP-A 浓度的增高及 BALF 中 SP-A 浓度减少程度与 APALI 病情严重程度呈正相关,从而推测可通过检测血清 SP-A 浓度来早期诊断 APALI。

参考文献:

- [1] 蓝祥海,王元正,万礼仪,等.急性重症胰腺炎的治疗探讨[J].中国现代医学杂志,2004,14(2):87-88.
- [2] 王烜,邓明明,夏国栋,等.己酮可可碱对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的保护作用[J].重庆医学,2009,38(12):3130-3134.
- [3] Lankish PG, Ibse I. Bili-induced acute experimental pancreatitis[J]. Scand J Gastroenterol, 1987, 22(3): 257-260.
- [4] Raymondos K, Leuwer M, Haslam PL, et al. Compositional, structural, and functional alterations in pulmonary surfactant in surgical patients after the early onset of systemic inflammatory response syndrome or sepsis[J]. Crit Care Med, 1999, 27(1): 82-89.
- [5] 王海英,倪松石,许文景,等.急性肺缺血再灌注引起 SP-A 变化实验研究[J].南通医学院学报,2009,29(4):263-265.
- [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] Hague R, Umstead TM, 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.
- [8] Takahashi H, Sano H, Chiba H, et al. Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(5): 589-598.
- [9] 董文,陈美云.肺表面活性蛋白 A 与急性肺损伤[J].中国急救医学,2004,24(11):824-826.
- [10] Chnng-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, et al. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer[J]. Cancer Res, 2001, 61(23): 8578-8585.
- [11] 赵晓巍,刘又宁.肺表面活性物质研究进展[J].医学研究杂志,2008,4(37):4-7.
- [12] 徐道妙,马新华,艾宇航,等.血必净注射液对内毒素诱导肺泡 II 型上皮细胞 SP-A 表达的影响[J].中国危重病急救医学,2009,21(11):690-691.