论著

文章编号:1000-5404(2008)18-1714-04

急性梗阻性化脓性胆管炎时大鼠肝组织清道夫受体-A的表达及意义

杨 慷,刘作金,赵 蕾,龚建平 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

摘 要:目的 观测急性梗阻性化脓性胆管炎(acute obstructive suppurative cholangitis, AOSC)时大鼠肝组织中清道夫受体-A(scavenger receptor A, SR-A)的表达及其与炎症介质的产生和肝组织损害的关系。**方法** 结扎大鼠胆总管,于胆总管内注入大肠杆菌O111:B4(菌落浓度5×10^9 cfu/ml),建立急性胆管炎动物模型。测定血浆中内毒素,观测不同时相点肝组织中SR-A mRNA及蛋白质的表达及肝组织病理形态学变化,同时测定TNF-α含量变化,并与结扎胆总管注射生理盐水组、假手术组比较。**结果** 在急性胆管炎组中,随着梗阻感染时间的延长和血浆内毒素浓度的升高,血浆中TNF-α含量明显增加,肝组织中SR-A的mRNA和蛋白质的表达明显下降,与对照组比较有统计学差异($P<0.01$)。同时可见随着处理时间延长而逐渐加重的肝组织损伤的病理改变。**结论** AOSC时,随着肝组织中SR-A表达的下调,枯否细胞(Kupffer cells, KCs)清除、灭活内毒素的能力下降,同时KCs激活释放的细胞因子增多,诱发并加重肝组织的损害。

关键词: AOSC;内毒素血症;SR-A;KCs;细胞因子
中图法分类号: R322.47;R392.3;R575.702 **文献标识码:** A

Significance of scavenger receptor A in rat liver tissues during acute obstructive suppurative cholangitis

YANG Kang, LIU Zuo-jin, ZHAO Lei, GONG Jian-ping (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of scavenger receptor A (SR-A) in rat liver tissues during acute obstructive suppurative cholangitis (AOSC) and its relations with inflammatory mediators and hepatic injury. **Methods** Wistar rat models of AOSC were reproduced by ligating choledochus and inside injecting *Escherichia coli* O111: B4. The plasma endotoxin concentrations, TNF-α levels and expressions of SR-A protein and mRNA in liver tissues were assayed by limulus test, ELISA, immunohistochemistry and RT-PCR, respectively. Pathological changes of liver tissues were observed under light microscope. **Results** With the time prolonged, the plasma endotoxin concentrations and the TNF-α levels gradually increased, but the SR-A protein and mRNA expressions decreased in the rats of experimental group, significantly different with those in sham operation group and normal saline group ($P<0.05$). Meanwhile, the hepatic injury was gradually aggravated. **Conclusion** With the decreased expression of SR-A in liver tissues during AOSC, the Kupffer cells' abilities of clearing and inactivating endotoxin are down-regulated, and simultaneously Kupffer cells produce and release more cytokines that may initiate and aggravate liver injury.

Key words: AOSC; endoxemia; SR-A; KCs; cytokine

AOSC是肝胆外科常见疾病,易导致脓毒症、感染性休克,病死率高达20.0%~87.5%[1]。其治疗以尽早手术引流胆道为主,然而术后仍有较高的死亡率,这与脓毒症继续发展以及并发多器官功能衰竭综合征(MODS)有关。目前认为,由细菌内毒素(主要成分为脂多糖)激活单核巨噬细胞特别是肝KCs产生和释放多种炎性介质,引发炎症反应失控是造成脓毒症和MODS的主要原因。近年来人们对内毒素血症时单核巨噬细胞SR-A进行了大量的研究,在SR-A参与机体防御方面取得了一定进展。目前对肝组织枯否细胞SR-A在严重感染特别是急性梗阻性化脓性胆管炎(acute obstructive suppurative cholangitis, AOSC)时表达的变化以及它与炎症介质的产生和器官损害的相互关系的研究还有待深入。本研究从组织、分子、基因水平揭示AOSC时肝组织中SR-A的表达及意义。

基金项目: 国家自然科学基金(30500473)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500473)
作者简介: 杨 慷,男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事内毒素血症的感染机制方面的研究。E-mail:Johnniu00@163.com
通信作者: 龚建平,E-mail:gongjianping11@hotmail.com
收稿日期: 2007-11-13;**修回日期:** 2008-02-28

1　材料与方法

1.1　AOSC 动物模型的建立

参照龚建平等[2]介绍的方法建立 AOSC 动物模型。主要方法为:选择健康的 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体质量 180 ~ 220 g,禁食 12 h;以 1% 的戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉,双重结扎大鼠胆总管,于胆总管内注入大肠杆菌 O111∶B4 0.2 ml(菌落浓度 5×10^9 cfu/ml),建立 AOSC 动物模型。

1.2　实验动物分组及时相点的设计

Wistar 大鼠 90 只,用随机数表法完全随机分为 3 组(每组 30 只),第 1 组(急性胆道感染组,AOC 组)结扎大鼠胆总管,于胆总管内注入大肠杆菌 O111∶B4 0.2 ml;第 2 组(胆总管结扎组,BDL 组)结扎胆总管并注射等量生理盐水;第 3 组(假手术组,SO 组)既不注入细菌,也不结扎胆总管,仅行开关腹手术。分别于术后 0、3、6、12、24 h 时相点各活杀 6 只取材。

1.3　检测指标及方法

1.3.1　血浆内毒素含量　　采用鲎试剂基质偶氮显色法测定血浆内毒素含量,鲎试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司。

1.3.2　血浆细胞因子 TNF-α 含量　　采用酶联免疫吸附测定试验(ELISA)测定血浆细胞因子 TNF-α 含量,ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3.3　肝组织 SR-A mRNA 相对表达量　　用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肝组织 SR-A mRNA 相对表达量,SR-A 基因引物参照文献[3]设计,并用 β-actin 作为内参对照,由上海英骏生物技术有限公司合成。

SR-A 的序列:上游:5′-ATGACAAAGAGATGACAGAGAAT-3′,下游:5′-TTATGAAGTACAAGTGACCCC-3′,序列长度为 495 bp;β-actin 的序列:上游:5′-ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3′,下游:5′-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3′,序列长度为 281 bp。

RT-PCR 试剂盒等购自 TaKaRa 大连宝生物工程有限公司,小量组织/细胞总 RNA 抽提纯化试剂盒购自 Promega 北京生物技术有限公司。PCR 产物量以目标条带光密度(ROD)×面积(A)进行半定量得到 IOD,而 SR-A mRNA 相对表达量 = SR-A 条带 IOD/β-actin 条带 IOD。

1.3.4　肝组织 SR-A 蛋白表达　　采用免疫组化的 S-P 法检测肝组织 SR-A 蛋白表达的相对值,SR-A 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。在 400 倍显微镜下每一张切片随机选取 5 个视野进行计数,以每视野阳性细胞个数的平均数进行统计。

1.3.5　肝组织病理变化　　常规 HE 染色,在光学显微镜下观察肝组织的病理改变。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.5 统计软件,AOC 组分别与 BDL、SO 组进行比较,行独立小样本 t 检验分析。

2　结果

2.1　血浆内毒素含量

AOC 组在术后 3 h 血浆内毒素含量就已明显升高,与 BDL 组和 SO 组比较,有非常显著性差异($P < 0.01$)。并随梗阻感染时间延长其含量逐渐增加,在 24 h 时仍呈上升趋势,与 BDL、SO 组比较,有非常显著性差异($P < 0.01$)。BDL 组在 24 h 时血浆内毒素水平轻度升高,而 SO 组各时相点内毒素含量无明显变化(表 1)。

表 1　各组不同时相点血浆内毒素浓度变化(Eu/ml,$n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
AOC	0.058 ± 0.009	0.166 ± 0.023^{ab}	0.387 ± 0.046^{ab}	0.561 ± 0.053^{ab}	0.784 ± 0.097^{ab}
BDL	0.060 ± 0.011	0.064 ± 0.008	0.061 ± 0.007	0.062 ± 0.010	0.078 ± 0.012
SO	0.063 ± 0.009	0.054 ± 0.007	0.059 ± 0.011	0.067 ± 0.008	0.065 ± 0.004

a:$P < 0.01$,与 BDL 组和 SO 组比较;b:$P < 0.01$,与同组前一时相点比较

2.2　血浆细胞因子含量的变化

AOC 组血浆 TNF-α 在术后 3 h 升高明显,与 BDL 组和 SO 组比较,有非常显著性差异($P < 0.01$),并随梗阻感染时间延长其含量继续增加,而且组间差异进一步加大,在 24 h 时仍未达到高峰。与 BDL 组、SO 组比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。BDL 组在 12 h 时 TNF-α 轻度升高、24 h 时升高明显。SO 组各时相点 TNF-α 含量无明显变化($P > 0.05$, 表 2)。

表 2　各组不同时相点血浆 TNF-α 水平变化(pg/ml,$n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
AOC	47.1 ± 7.6	135.5 ± 18.9^{ab}	244.2 ± 33.7^{ac}	478.7 ± 67.3^{ad}	579.2 ± 81.1^{ae}
BDL	50.1 ± 7.6	56.3 ± 7.9^{a}	57.4 ± 8.2^{a}	69.3 ± 9.1^{a}	86.8 ± 10.9^{a}
SO	48.8 ± 6.7	50.4 ± 6.9^{a}	49.6 ± 7.1^{a}	51.3 ± 7.5^{a}	47.7 ± 6.8^{a}

a:$P < 0.01$,与 AOC 组比较;b:$P < 0.01$,与 AOC 组 0 h 比较;c:$P < 0.01$,与 AOC 组 3 h 比较;d:$P < 0.01$,与 AOC 组 6 h 比较;e:$P < 0.01$,与 AOC 组 12 h 比较

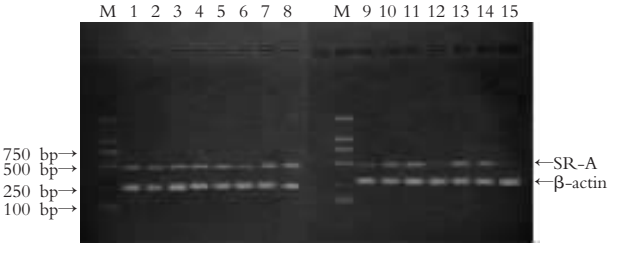
2.3　肝组织 SR-A mRNA 表达

RT-PCR 显示 AOC 组在术后 3 h,SR-A mRNA 的表达已开始下降,与 BDL 组和 SO 组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。随着梗阻感染时间延长,SR-A mRNA 的表达逐渐下降,至 24 h 时与 BDL、SO 组比较有非常显著性差异($P < 0.01$),且组间差异进一步加大;BDL、SO 组无明显的 SR-A mRNA 表达的改变($P > 0.05$,表 3,图 1)。

表 3　各组不同时相肝组织 SR-A mRNA 表达(IODSR-A/IOD β-actin, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

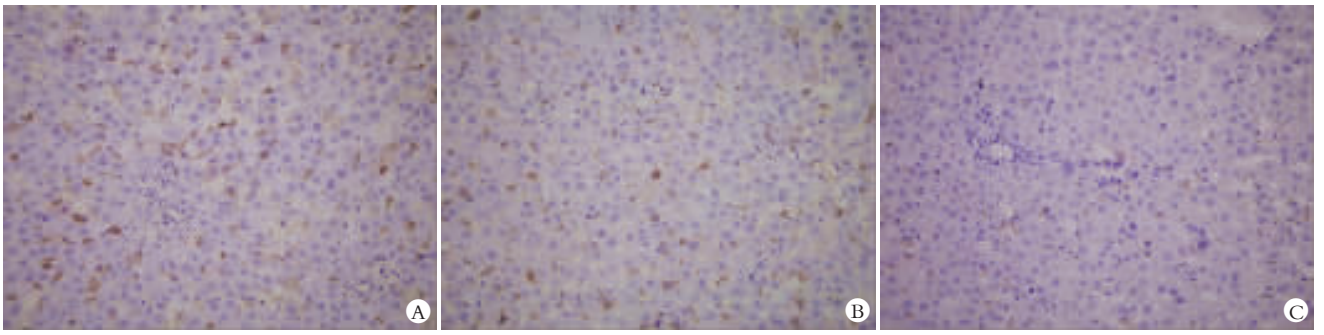
组别	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
AOC	0.60 ± 0.06	0.50 ± 0.05^{c}	0.42 ± 0.05^{d}	0.33 ± 0.04^{e}	0.14 ± 0.02^{f}
BDL	0.59 ± 0.06	0.62 ± 0.08^{a}	0.62 ± 0.07^{b}	0.62 ± 0.08^{b}	0.61 ± 0.08^{b}
SO	0.60 ± 0.07	0.60 ± 0.06^{a}	0.57 ± 0.06^{b}	0.58 ± 0.07^{b}	0.59 ± 0.08^{b}

a:$P < 0.05$, b:$P < 0.05$,与 AOC 组比较; c:$P < 0.05$, d:$P < 0.01$,与 AOC 组 3 h 比较; e:$P < 0.01$,与 AOC 组 6 h 比较; f:$P < 0.01$,与 AOC 组 12 h 比较



M:标准;1、4、7、10、13:分别为 SO 组 0、3、6、12、24 h 时相点;2、5、8、11、14:分别为 BDL 组 0、3、6、12、24 h 时相点;3、6、9、12、15:分别为 AOC 组 0、3、6、12、24 h 时相点

图 1　RT-PCR 检测不同时相 SR-A mRNA 的相对表达



A、B、C 分别表示 0、3、24 h 时相点

图 2 AOC 组不同时相点 SR-A 的表达 （S-P×400）

2.4 肝组织 SR-A 蛋白表达

光镜下见肝窦内有棕黄色细胞质及细胞膜着色细胞，此即为 KCs。AOC 组 0 时相点和 BDL、SO 组的各时相点肝组织 SR-A 的表达呈弥漫性分布；而 AOC 组在术后 3 h，阳性细胞数目开始减少，即 SR-A 的表达开始下降，与 BDL 组和 SO 组比较，有显著性差异（$P<0.05$）。随着梗阻感染时间延长，肝内 SR-A 表达的阳性细胞数目减少更为明显，棕黄色物质逐渐减少，组间差异也进一步增大，在 24 h 时非常明显（表 4，图 2），与 BDL、SO 组比较有非常显著性差异（$P<0.01$）。

表 4 各组不同时相点 SR-A 表达变化（阳性细胞数/HP，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	3 h	6 h	12 h	24 h
AOC	128 ± 16	102 ± 14[c]	73 ± 9[d]	36 ± 5[e]	18 ± 2[f]
BDL	125 ± 15	123 ± 17[a]	133 ± 19[b]	127 ± 18[b]	131 ± 16[b]
SO	130 ± 18	127 ± 15[a]	132 ± 18[b]	129 ± 17[b]	128 ± 19[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.05$，与 AOC 组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 AOC 组 3 h 比较；e：$P<0.01$，与 AOC 组 6 h 比较；f：$P<0.01$，与 AOC 组 12 h 比较

2.5 病理形态学变化

光镜下观察，AOC 组可见随着处理时间延长而逐渐加重的肝组织损伤。3 h 后可见汇管区有较多的以中性粒细胞为主的炎症浸润。12 h 及 24 h 后，汇管区大量以中性粒细胞为主的混合性炎症细胞浸润，肝细胞出现大面积的变性坏死。BDL 组仅见汇管区有少量炎症细胞浸润，肝细胞形态大小正常。SO 组各时相以及 AOC、BDL 组 0 时相未见明显病理改变。

3 讨论

AOSC 是良性胆道疾病死亡的重要原因，其术后较高的病死率与脓毒症未完全控制以及并发 MODS 有关。在诱发 MODS 的感染因素中，细菌内毒素的作用可能比细菌更为重要，但目前针对内毒素的治疗手段仍十分有限。本研究以大鼠 AOSC 为动物模型，研究 SR-A 在肝组织中的表达及与炎症介质的产生和肝损害的相互关系，为临床治疗 AOSC 及 MODS 提供新的实验依据。

肝脏是巨噬细胞的贮存库，在抗原识别和免疫应答中起着核心作用[4]。KCs 是位于肝血窦内的巨噬细胞，是体内固定型巨噬细胞中最大的群体[5]，其表面存在多种脂多糖受体，它在宿主防御及肝脏疾病的发病中都起重要作用[6-9]，它既能通过清除细菌及其内毒素而抗感染，同时也能通过释放各种炎症介质在 MODS 中发挥主导作用。SR-A 即是巨噬细胞表面的这种重要防御性受体，它是一种跨膜糖蛋白，它在个体发育的早期阶段就表达在细胞膜上[10]，在介导巨噬细胞对内毒素清除和灭活等防御反应中起重要作用，LPS 与 SR-A 的结合可能是单核巨噬细胞清除 LPS 的一条重要的非炎性途径。它在内毒素血症中表达的变化必然会影响内毒素血症的转归和预后。

本实验结果显示，在 AOSC 过程中随着梗阻感染时间的延长，血浆内毒素浓度逐渐升高，SR-A mRNA 表达的变化与其蛋白表达的变化趋势一致，呈进行性下调，两者均与血浆内毒素水平呈明显的负相关的量效关系；同时血浆中的细胞因子 TNF-α 含量进行性增加，并持续高表达，与 SR-A 的表达也呈显著负相关。另外，肝组织病理检查显示随着梗阻感染时间延长，肝组织损伤逐渐加重，与肝内 SR-A 表达下调呈显著负相关。本研究结果提示，在 AOSC 过程中，随着血浆内毒素水平的逐渐增加，肝组织 KCs 表面 SR-A 表达的下调，其灭活、清除内毒素的能力也相应降低，内毒素对 KCs 的激活作用也相应增强，KCs 产生和释放细胞因子增多，诱导或加重肝损伤，这可能是脓毒症或内毒素血症过程中，KCs 由防御性细胞转化为效应性细胞的重要机制之一。

通过调控 KCs 的功能，特别是调控 SR-A 表达，有可能为临床提供除外科手术外的另一条治疗 AOSC 及并发的脓毒症的新的辅助治疗方法，从而为进一步防治 MODS 提供新思路，以便实施针对性、特异性的治疗。

参考文献：

[1] 石景森，王炳煌. 胆道外科基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2003：539.

[2] 龚建平, 韩本立, 罗 丁, 等. 急性胆道感染时肝腺泡酸性磷酸酶与细胞色素氧化酶活性的变化[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(1): 5-7.
[3] Duryee M J, Freeman T L, Willis M S, *et al*. Scavenger receptors on sinusoidal liver endothelial cells are involved in the uptake of aldehyde-modified proteins[J]. Mol Pharmacol, 2005, 68(5): 1423-1430.
[4] 乔安意, 钱以德, 杨 星, 等. 内毒素受体Tlr4及CD14基因在脓毒症大鼠肺、肝组织中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(8): 952-953.
[5] Bilzer M, Roggel F, Gerbes A L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease[J]. Liver Int, 2006, 26(10): 1175-1186.
[6] Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(46): 7413-7420.
[7] Roberts R A, Ganey P E, Ju C, *et al*. Role of the Kupffer cell in mediating hepatic toxicity and carcinogenesis[J]. Toxicol Sci, 2007, 96(1): 2-15.
[8] Cubero F J, Nieto N. Kupffer cells and alcoholic liver disease[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2006, 98(6): 460-472.
[9] Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation[J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 339-350.
[10] Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, *et al*. Differentiation and function of Kupffer cells[J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(1): 16-28.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2008)18-1717-01

个案与短篇

抗异散制剂的质量控制研究

吕经兰,黄明明,王凤琴 (河南省平顶山市妇幼保健院,河南 平顶山 467000)

抗异散是由黄柏、桃仁、牡丹皮、穿山甲(炙)、莪术、红花等十一味药材制成的散剂,为我院制剂,具有清热解毒,去瘀散结之功效,用于治疗子宫内膜异位症。本研究采用TLC法对方中的黄柏和红花进行定性鉴别,采用HPLC法对方中牡丹皮的主要成分丹皮酚进行含量测定,以有效控制该制剂的内在质量。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 日本岛津高效液相色谱系统:SPD-10AVP紫外检测器, LC-10ADVP输液泵,RHEODYNE 7725i手动进样阀20 μl定量环, CS-Light色谱工作站,Precisa 92SM-202A-DR型电子分析天平,SECOMAM UV IKON XL型紫外-可见分光光度计。

1.1.2 试药 黄柏对照药材(批号:121510-200501),红花对照药材(批号:120907-200407),盐酸小檗碱对照品(供鉴别用,批号:713-9003),丹皮酚对照品(供含量测定用,批号:0708-9704),均由中国药品生物制品检定所提供,乙腈为色谱纯(德国默克),其他试剂均为分析纯;抗异散样品由我院制剂室提供(批号:20070505、20070507、20070512)。

1.2 方法

1.2.1 黄柏TLC鉴别[1] 取本品粉末2 g,加甲醇10 ml,加热回流15 min,滤过,滤液作为供试品溶液。另取黄柏对照药材0.1 g,加甲醇5 ml,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。再取盐酸小檗碱对照品,加甲醇制成每1 ml含0.5 mg的溶液,作为对照品溶液。按标准处方比例及工艺制备缺黄柏的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各1 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-乙酸乙酯-甲醇-异丙醇-水(20∶10∶5∶5∶1)为展开剂,置氨蒸气预饱和的展开缸内,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

1.2.2 红花TLC鉴别[1] 取本品粉末5 g,加80%丙酮溶液20 ml,密塞,振摇15 min,静置,吸取上清液,作为供试品溶液。另取红花对照药材0.5 g,加80%丙酮溶液5 ml,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按标准处方比例及工艺制备缺红花的阴性样品,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。吸取上述溶液各5 μl,分别点于同一以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶H薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-水-甲醇(7∶2∶3∶0.4)为展开剂,展开、取出、晾干[1]。

1.2.3 牡丹皮中主要成分丹皮酚的含量测定

1.2.3.1 对照品储备液、供试品溶液、阴性对照溶液的制备及色谱条件 精密称取丹皮酚对照品26 mg置100 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。取本品粉末约1 g,精密称定,置100 ml容量瓶中,加甲醇约70 ml,超声40 min,放冷,加甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按标准处方比例配制缺牡丹皮的阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。色谱条件:色谱柱:Kromasil C18(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(50∶50)[1];检测波长:274 nm;流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃。

1.2.3.2 线性关系考察 精密量取对照品溶液0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 ml置25 ml量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,进样测定。

1.2.3.3 精密度试验 取同一对照品溶液(浓度10.4 μg/ml)连续进样5次。

1.2.3.4 重复性试验 取同一批样品(批号:20070505),5份,按样品测定项下的方法测定,并计算。

1.2.3.5 稳定性试验 取同一批样品溶液,分别在室温放置0、2、4、8、12、24 h后测定丹皮酚的峰面积积分值。

1.2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的供试品(批号:20070505)0.5 g,9份,精密称定,分别加入丹皮酚对照品储备

(下转1725页)

作者简介:吕经兰,女,河南省平顶山市人,副主任药师,主要从事临床药学方面的研究,发表论文12篇。电话:(0375)4941001,E-mail: ljlpolss-bjy@sina.com

收稿日期:2008-07-28;修回日期:2008-08-20