DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.05.025


# 急性出血坏死性胰腺炎时大鼠肺脏细胞间粘附分子-1的表达及 TNF-α 单抗对其影响

罗昆仑* 何振平 李 昆 段恒春 马宽生 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,400038

提 要 目的: 探讨急性出血坏死性胰腺炎(ANP)时肺脏细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达与中性粒细胞(PMN)肺脏聚集的关系以及肿瘤坏死因子α单克隆抗体(TNF-αMCAb)预处理对其的影响。方法: 采用免疫组化技术和计算机图像分析系统检测 ANP时大鼠 ICAM-1的表达,以及应用 TNF-α MCAb对肺脏 ICAM-1表达及 PMN肺脏聚集的影响。结果: ANP时 ICAM-1在肺组织中表达逐渐增强,12 h达高峰,与 PMN肺脏聚集呈显著正相关。应用 TNF-α MCAb预处理后在肺脏 ICAM-1表达明显减弱的同时,也减少了 PMN在肺脏的聚集。结论: ANP时 PMN在肺脏的大量聚集是建立在肺实质细胞 ICAM-1高表达的基础之上,TNF-α MCAb通过抑制 ICAM-1在肺脏的表达,进而减少 PMN在肺组织中的聚集,对 ANP时肺组织起保护作用。

关键词 急性胰腺炎;中性粒细胞;细胞间粘附分子-1;肺脏
中图法分类号 R657.51

近年来,急性出血坏死性胰腺炎(ANP)时急性肺损伤的发生与肺脏中性粒细胞(PMN)的大量聚集的关系已引起人们极大关注。有实验表明,PMN大量聚集于肺脏是导致 ANP时肺实质细胞损伤、肺水肿形成的关键[1]。但 PMN如何聚集于肺脏的机制尚不清楚。本实验利用大鼠 ANP并发急性肺损伤(ALI)模型,通过观察 ANP时 PMN在肺脏的聚集和粘附分子在肺实质细胞的表达改变,以及应用 TNF-α MCAb预处理对其的影响,探讨 ANP时肺脏细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的表达与 PMN肺脏聚集的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和分组

Wistar大鼠(四川中药研究所提供)110只,体重(200±20) g,雌雄不拘,随机分为3组: 假手术组(Ⅰ,30只); ANP组(Ⅱ,40只)和 TNF-α MCAb预处理组(Ⅲ,40只),各组动物随机均分入1、3、6、12、24 h 5个时相点,即时活杀取材,检测有关指标。

### 1.2 动物模型建立

参照 Milani等[2]报道的模型稍加改进制作 ANP并 ALI大鼠模型。TNF-α MCAb预处理组(Ⅲ): 在模型制作前 15 min经鼠尾静脉注入 TNF-α MCAb(5mg/kg),第四军医大学免疫教研室赠送),余同 ANP组(Ⅱ);假手术组(Ⅰ): 除胆管内不注入5%牛磺胆酸钠外,余同 ANP组。

### 1.3 肺组织 ICAM-1表达检测

采用 ABC法[3],结果由 CMIAS 007型真彩色医学图像系统处理,40×10视野下每一切片观察5个视野(待测组织须充满整个视野),以积分光密度表示 ICAM-1表达的相对强度,取其均值作为结果。

### 1.4 肺组织中髓过氧化酶(MPO)活性测定

各组动物活杀后,取肺组织0.1 g,按罗武生等[4]建立的方法测定。

### 1.5 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用华西医大 PEMS医用统计程序包进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 肺组织中 ICAM-1的表达及分布

假手术组 ICAM-1仅少量表达于肺血管内皮细胞(VEC)及肺泡Ⅰ型上皮细胞(PⅠ),肺泡Ⅱ型上皮细胞(PⅡ)及平滑肌细胞则不表达。ANP组1 h,除肺血管内皮细胞及肺泡Ⅰ型上皮细胞表达增强外,在肺泡Ⅱ型上皮细胞及平滑肌也有较强表达; 12 h不仅肺血管内皮细胞、肺泡Ⅰ型上皮细胞广泛表达,肺泡Ⅱ型上皮细胞及平滑肌细胞也大量表达,至24 h仍保持此高表达状态。TNF-α MCAb预处理组肺组织 ICAM-1的表达部位同 ANP组,但表达强度较 ANP组相应时间点明显减弱,结果见表1,图1~2。

### 2.2 肺组织 MPO活性变化

ANP组1 h肺组织中 MPO活性明显升高,6~12 h达高峰,24 h有所下降,但仍显著高于假手术组($P<0.01$)。TNF-α MCAb预处理组在模型制作后6 h明显增高,12 h达高峰,尔后减少,24 h仍高于假手术组,但其 MPO活性升高幅度较 ANP组相应时间点显著降低,结果见表2。

* 罗昆仑,男,31岁,主治医师,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　肺组织 ICAM-1免疫组化积分光密度变化

Tab 1　Changes of integrating optical density of lung tissue ICAM-1

| Group | Time after ANP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| Ⅰ | 526.6± 182.8 | 571.0± 165.8 | 621.7± 191.4 | 578.5± 202.9 | 539.7± 189.3 |
| Ⅱ | 873.4± 149.0* | 1710.6± 418.9** | 2275.8± 578.4** | 4336.2± 719.9** | 4587.7± 795.5** |
| Ⅲ | 582.5± 175.8△ | 784.7± 178.4△△ | 923.4± 367.5*△△ | 1901.2± 561.9**△△ | 2182.3± 566.5**△△ |

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* Ⅰ ;△: $P < 0.05$,△△: $P < 0.01$ *vs* Ⅱ

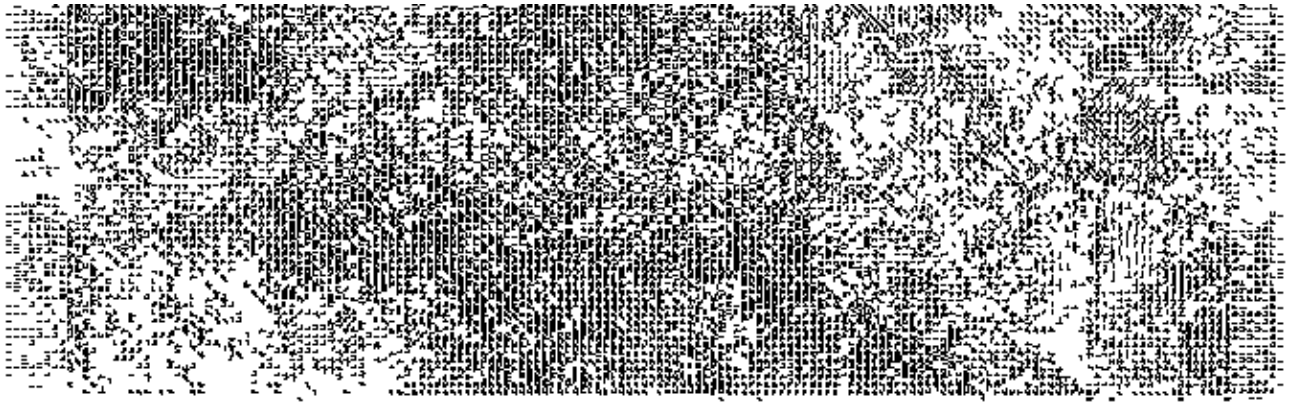


图 1　ANP组 12 h,肺血管内皮细胞、肺泡Ⅰ、Ⅱ型上皮细胞、血管平滑细胞 ICAM-1表达强阳性　(ABC× 200)

**Fig 1　Intense staining for ICAM-1 was found on VEC, PⅠ, PⅡ and smooth muscle cells 12 h after ANP**　(ABC× 200)

图 2　TNF-α McAb预处理组 12 h,肺小静脉壁及肺泡上皮细胞 ICAM-1表达阳性　(ABC× 400)

**Fig 2　In animals pretreated with TNF-α McAb up-regulation of ICAM-1 was blocked, note the positive staining in venules and alveolar epithelial cells**　(ABC× 400)

表 2　肺组织 MPO活性的变化 (U)

Tab 2　Changes of lung tissue MPO (U)

| Group | Time after ANP | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
| Ⅰ | 1.42± 0.62 | 1.31± 0.58 | 1.22± 0.71 | 1.68± 0.80 | 1.47± 0.57 |
| Ⅱ | 2.05± 0.79* | 2.14± 0.60** | 4.22± 0.80** | 7.71± 0.73** | 7.62± 1.05** |
| Ⅲ | 1.13± 0.62△ | 1.18± 1.63△ | 2.98± 1.04**△ | 3.43± 1.13**△△ | 3.31± 1.26**△△ |

*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$ *vs* Ⅰ ;△: $P < 0.05$,△△: $P < 0.01$ *vs* Ⅱ

### 2.3　肺组织 ICAM-1表达与 MPO活性变化的相关性分析

实验组肺组织 MPO活性变化与肺组织 ICAM-1表达量均呈显著正相关 (ANP预处理组: $r = 0.9465$, $P < 0.01$; TNF-α McAb组: $r = 0.8287$, $P < 0.05$)。

## 3　讨论

形态学观察发现, ANP并发 ALI时,肺脏总有大量的 PMN聚集[5]。聚集的 PMN,一方面机械性堵塞毛细血管致微循环障碍,另一方面释放大量的毒性介质,是导致急性肺损伤发生的关键[1,5]。组织中 MPO活性可以反映 PMN在组织的滞留数量[4,6]。本实验结果显示: ANP组模型制作后,肺组织中 MPO活性较假手术组显著增高,且与肺损伤程度变化呈一致趋势。应用 TNF-α McAb预处理后,肺中 PMN聚集明显减少,肺损伤程度也明显减轻,结果进一步证实, ANP时肺脏大量聚集的 PMN在急性肺损伤的发生中起十分重要的作用。

PMN浸润组织,必需先与血管内皮细胞相粘附,继而迁移至组织中,其机制在于 PMN与血管内皮细胞表面表达的粘附分子的相互作用[6]。ICAM-1是粘附分子免疫球蛋白超家族成员,近年来引起人们关注的原因是:① 通过在血管内皮细胞上的表达,具有较强趋化白细胞的作用,在组织中过度表达导致 PMN在组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

织中的大量聚集,从而加重组织损伤[7];② ICAM-1在肺泡上皮细胞的表达有助于 PMN和巨噬细胞与肺泡上皮细胞的粘附,并保留于肺泡腔内,而白细胞与肺泡上皮细胞的粘附有利于白细胞对肺泡上皮细胞产生损伤作用[8];③ 用抗 ICAM-1单抗可阻止白细胞与靶细胞的结合,减轻过度激活的白细胞对组织的损伤作用[9]。本实验结果显示: 假手术组大鼠 ICAM-1仅少量表达于肺血管内皮细胞及肺泡I 型上皮细胞, ANP组 ICAM-1不仅在血管内皮细胞、肺泡I 型上皮细胞上广泛表达,且在肺泡II 型上皮细胞和血管平滑肌细胞上也大量表达,肺组织中 ICAM-1高表达与 PMN的聚集程度呈显著正相关。上述表明, PMN在肺脏的大量聚集是建立在肺实质细胞 ICAM-1高表达的基础上。ICAM-1在肺组织中的表达增强,一方面通过与其配体即表达于 PMN表面的 $CD_{11}$ /$CD_{18}$相结合有助于 PMN与血管内皮细胞相粘附,促使 PMN移行于血管外;另一方面 PMN与靶细胞粘附结合后,形成了 PMN与靶细胞之间的一个较紧密且相对稳定的微环境,此微环境有利于 PMN释放的毒性介质在局部保持较高浓度,从而对靶细胞发挥有效的毒性作用[9]。

急性肺损伤时,诱导 ICAM-1表达的因素很多,其中 TNF-α 对于 ICAM-1表达的调节具有至关重要的意义[10]。本实验在动物模型制作前预先应用 TNF-α MCAb后发现,肺内 ICAM-1的表达及 PMN肺脏聚集较 ANP组均大量减少,且肺损伤程度亦明显减轻。表明: TNF-α MCAb具有抑制 ICAM-1表达的作用,从而减少 PMN在肺中的聚集,对肺组织起保护作用。有鉴于此,我们认为,应用粘附分子单抗直接阻断 PMN与血管内皮细胞相粘附及 PMN在肺脏的聚集,可能会更有效地防治 ANP时急性肺损伤的发生。

## 参考文献


1 Banerjee A K, Haggie S J, Jones R B, *et al*. Respiratory failure in acute pancreatitis. Postgrad Med J, 1995, 82(1): 6

2 Milani R, Pereira P M, Dolhnikoff M, *et al*. Respiratory mechanics and lung morphometry in severe pancreatitis-associated acute Lung injury in rats. Crit Care Med, 1995, 23(11): 1882

3 蔡文琴,王伯 主编.实用免疫化学与核酸分子杂交技术. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 121~124

4 罗武生,郭兆贵.髓过氧化酶法定量测定心肌组织内的中性粒细胞.中国药理学通报, 1990, 6(4): 264

5 Tanaka N, Murata A, Uda K I, *et al*. Interleukin-1 receptor antagonist modifies the changes in vital organs induced by acute necrotizing pancreatitis in a rat experimental model. Cri Care Med, 1995, 23(5): 901

6 Tang W W, YI S E, Remick G D, *et al*. Intratracheal injection of endotoxin and cytokines. IX, contribution of $CD_{11a}$ /ICAM-1 to neutrophil emigration. Am J Physiol, 1995, 269(5Pt1): L653

7 Muller G A, Makovic J, Muller C A. Intercellular adhesion molecule-1 expression in human kidney with glomerulonephritis. Clinical Nephrology, 1991, 36(4): 203

8 Essani N A, Fisher M A, Farhood A, *et al*. Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messanger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. Hepatology, 1995, 21(6): 1632

9 Barnett C C, Moore E E, Morre F A, *et al*. Intercellular adhesion molecule-1 promotes neutrophil-mediated cytotoxicity. Surgery, 1995, 118(2): 171

10 Hunninghake G W, Kalical A R. Approachs to the treatment of pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Core Med 1995, 151(3): 909


(收稿: 1997-12-03;修回: 1998-06-16)
(编辑 刘 鹏)

# Expression of intercellular adhesion molecule-1 in the lungs during acute hemorrhagic necrotic pancreatitis in rats and the effect of TNF-α MCAb on it

Luo Kunlun, He Zhengping, Li Kun, Duan Hengchun, Ma Kuansheng (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

**Abstract** Objective: To explore the relationship between polymorphonulcear neutrophil (PMN) accumulation and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lungs during acute hemorrhagic necrotic pancreatitis (ANP) and investigate the effects of pretreatment with tumor necrosis factor monoclonal antibody (TNF-α MCAb) on them. Methods: The rats were randomized into two groups: one with pretreatment of TNF-α MCAb and the other without. After the model of ANP was established in rats, immunohistochemistry and computerized image analysis were used. Results: In the rats without pretreatment of TNF-α MCAb, the expression of ICAM-1 in the lungs was gradually enhanced and reached its peak at the 12th

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

h. This expression was significantly correlated with PMN accumulation. In those with pretreatment of TNF-α MCAb, both the expression of ICAM-1 and PMN accumulation in the lungs were depressed. **Conclusion:** PMN infiltration in the lungs is based on increased expression of ICAM-1. TNF-α MCAb decreases the PMN accumulation in the lungs through inhibiting the expression of ICAM-1, which suggests that TNF-α MCAb can protect the lungs during ANP.

**Key words** acute pancreatitis; polymorphonuclear neutrophil; intercellular adhesion molecule-1; rat

(上接 425页)

### 1.2 阿莫西林乙基纤维素缓释微囊的制备[1]

### 1.3 阿莫西林的血药浓度测定

1.3.1 仪器有色谱条件　美国贝克曼高效液相色谱仪,125双流泵,166紫外检测器(ODS柱 5 μ, 4.6 mm× 25 cm)流动相:甲醇:pH6.8 PBS(18∶82),检测波长 229 nm,流速 0.5 ml/min,柱压 1.745 kPa。

1.3.2 血样处理方法　精密吸取血浆 0.5 ml于 1 ml塑料离心管中,加入 0.1 ml阿莫西林(100 μg/ml)和 200 μl甲醇混合后,15 000 r/min离心 3 min,取上清液 20 μl进样。

1.3.3 标准曲线　精密配制 0, 50, 100, 300, 500, 700, 900 μg/ml的系列 Amoxicillin血浆标准液,按上述 1.3.2操作,在 0~ 900 μg/ml浓度范围内,样品峰高与血浆药物浓度回归,线性关系良好回归方程为 H= 0.0145+ 0.0086 c, $r$= 0.9999。

1.3.4 回收率和精密度　精密称取阿莫西林标准品适量,加入空白血浆,制成 200、400、800 μg/ml的血浆标准液按 1.3.2处理后进行测定,平均回收率为(100± 1.39)%,一日内重复 5次,得日内精密度,每天测 1次,持续 5 d得日间精密度,日内 RSD分别为 2.06%, 2.14%和 1.88%;日间 RSD分别为 1.45%, 2.04%和 2.18%。

### 1.4 生物利用度与药代动力学参照文献[2]进行

8名健康受试者,男性,体重 50~ 55 kg,年龄 20~ 30岁,受试者经体检证实肝、肾功能、血、尿常规及心电图均正常,近期内未服用其它药物,采用自身对照法:受试者先后服用阿莫西林普通胶囊及自制的微囊,两次给药间隔 1周,受试者避免剧烈运动,禁烟茶,实验当天由实验室提供统一低脂肪饮食,受试者空服口服服阿莫西林普通胶囊或微囊 500 mg,普通胶囊于服药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、10 h,微囊于服药后 1、2、3、4、5、6、7、8、10 h取静脉血 2 ml,肝素抗凝,离心后取血浆 0.5 ml,于 -20℃保存待测,数据处理采用 3P87软件求算药动学参数,用梯形面积法计算药-时曲线下面积(AUC):

$$\text{相对生物利用度} = \frac{\text{AUC微囊}}{\text{AUC胶囊}}$$

## 2 结果

8例健康志愿者口服 Amoxicillin胶囊和微囊 500 mg后,血药浓度经 3P87软件拟合处理,符合一室开放模型,得到的药物动力学参数见表 1。微囊的相对生物利用度为 78.15%± 10.29%,两种剂型的药物动力学参数 Ka, Ke, T1/2, Cmax, Tmax差异均显著($P$ <0.05),微囊与普通胶囊相比血药浓度明显推迟,半衰期延长,但生物利用度不及普通胶囊。

表 1　口服 **Amoxicillin** 普通胶囊和微囊的药代动力学参数($\bar{x}$± $s$)

| No | Ka(/h) | Ke(/h) | T1/2(h) | Cmax(μg/ml) | Tmax(h) | AUC(μg·h/ml) | F(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6.48± 2.67 | 0.48± 0.66 | 1.16± 0.25 | 8.15± 1.79 | 0.89± 0.16 | 1040.2± 14.99 | |
| 2 | 1.06± 0.19 | 0.29± 0.04 | 2.48± 0.54 | 5.78± 1.45 | 2.18± 0.23 | 635.2± 2.1 | 78.15± 10.29 |

## 3 讨论

本研究应用 HPLC外标法测定 Amoxicillin的血药浓度,其灵敏度高,变异系数小,专属性强,血样经分离血浆沉淀蛋白后直接进样,方法简单易行。

HPLC法分析血浆中羟氨苄常和高氯酸,三氯乙酸或乙晴沉淀蛋白,但羟氨苄经高氯酸,三氯乙酸处理后,其内酰胺环破裂分解成没有活性的青霉素酸[2],不能直接检测原型羟氨苄,用甲醇作沉淀剂可直接定量原型羟氨苄的浓度。

单剂量口服 Amoxicillin普通胶囊与微囊后,体内过程符合一室开放模型,Cmax分别为(8.15± 1.79) μg/ml和(5.78± 1.45) μg/ml, AUC分别为(1040.2± 14.99) μg·h/ml和(635.2± 2.1) μg·h/ml,微囊的相对利用度为(78.15± 10.29)%,可能受制剂工艺的限制,所得微囊粒径在 250~ 850 nm之间,颗粒不如普通胶囊粉末精细、均一,导致机体吸收不理想,因此制剂工艺有待进一步提高。

关键词　阿莫西林;微囊;生物利用度;药物动力学
中图法分类号　R969.1

## 参考文献

1 张秀珍,邹立家.氨苄青霉素-乙基纤维素微囊的研制.山东医药工业,1990,9(2): 1
2 谭　力,周继红,罗　楠,等.高效液相色谱法测定人血浆中阿莫西林浓度及药代动力学.药学学报,1997,32(7): 558

(收稿: 1998-02-23;修回: 1998-07-21)
(编辑　汪勤俭)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net