

· 论 著 ·

JAM-C 单抗对实验性急性胰腺炎肾损伤的治疗作用*

胡端敏, 杨 勇, 唐 文[△]
(苏州大学第二附属医院消化科, 江苏苏州 215004)

摘 要:**目的** 观察连接黏附分子-C(JAM-C)单克隆抗体对小鼠急性坏死性胰腺炎肾损伤的保护作用。**方法** 采用雨蛙素和内毒素(LPS)联合腹部注射的方法建立小鼠重症急性胰腺炎(ANP)模型。(1)生理盐水对照组(NS组):小鼠给予腹部注射无菌生理盐水(10 mL/kg)6次,每次间隔1 h。(2)坏死性胰腺炎(ANP)模型组(ANP组):小鼠给予腹部注射雨蛙素(50 μg/kg)6次,每次间隔1 h,末次注射后立即给予腹部注射内毒素10 mg/kg。(3)抗小鼠JAM-C单抗(anti-JAM-C mAb)处理组(anti-JAM-C mAb组):小鼠给予腹部注射雨蛙素(50 μg/kg)6次,每次间隔1 h,在首次注射30 min时予每只小鼠腹部注射anti-JAM-C mAb 0.3 mL(300 μg),末次雨蛙素注射后予腹部注射内毒素10 mg/kg。在末次注射3 h后,收集血液检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、淀粉酶(AMY)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平,收集肾和胰腺组织进行病理评分。**结果** anti-JAM-C mAb组胰腺和肾脏病理评分显示,BUN、Cr、AMY和TNF-α水平均明显低于ANP组。**结论** anti-JAM-C mAb能有效缓解小鼠ANP模型的肾损伤。

关键词:胰腺炎;肾损伤;连接黏附分子-C
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.02.001 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2012)02-0105-02

The therapeutic effect of anti-JAM-C mAb on renal injury in experimental acute pancreatitis*
Hu Duanmin, Yang Yong, Tang Wen[△]
(Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of
Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215004, China)

Abstract:**Objective** To investigate the protective effect of anti-JAM-C mAb on acute necrotizing pancreatitis associated renal injury in mice. **Methods** The cerulein and LPS were injected intraperitoneally to establish the model of acute necrotizing pancreatitis(ANP) in mice. (1)The NS group was given 6 hourly injections of saline solution 10 mL/kg. (2) The ANP group was given 6 hourly injections of a supramaximal dose of cerulein 50 μg/kg, after the final cerulein injection, LPS was injected intraperitoneally at the dose of 10 mg/kg. (3) The anti-JAM-C mAb group was given 6 hourly injections of a supramaximal dose of cerulein 50 μg/kg, anti-JAM-C mAb was administered intraperitoneally (0.3 mL) with a dose of 300 μg at the 30 min after the first cerulein injection, LPS was injected intraperitoneally at the dose of 10 mg/kg after the final cerulein injection, Three hours after the final injection, all the mice were sacrificed. The blood was taken to determine the levels of blood urea nitrogen(BUN), creatinine(Cr), amylase(AMY) and TNF-α. The pancreas and kidney were removed for histological scoring. **Results** Compared with ANP group, the anti-JAM-C mAb group had significant lower value in the inflammatory scoring of pancreas and kidney and the serum levels of BUN, Cr, AMY and TNF-α. **Conclusion** Administration of anti-JAM-C mAb ameliorates effectively renal injury of the mice with acute necrotizing pancreatitis.

Key words: pancreatitis; renal injury; junctional adhesion molecule-C

急性胰腺炎(AP)往往伴有多器官的功能损伤,肾脏损害多见且对AP预后十分重要。目前,研究认为重症AP导致的炎症细胞过度激活是肾损伤的重要机制^[1]。其中细胞黏附分子主要作用于炎症细胞的黏附过程,对白细胞过度激活以及AP时脏器损伤的发生、发展有重要意义。连接黏附分子C(junctional adhesion molecule-C, JAM-C)是近年新发现的在血管内皮细胞上分布的细胞黏附分子,它介导了中性粒细胞向炎症部位和组织损伤处的浸润和聚集^[2]。作者的前期研究发现, JAM-C在小鼠坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)肾脏上的表达明显增高,这一结果提示JAM-C在重症AP肾损伤的发病过程中起到重要的作用^[3]。本研究通过小鼠JAM-C单克隆抗体干预治疗ANP模型,旨在观察抑制JAM-C介导的黏附作用对ANP小鼠肾损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级昆明小鼠18只,雌雄不分,体质量(20±2)g,购自苏州大学动物实验中心。雨蛙素(cerulein)、内毒素(LPS, Ecoli O127:B8)购自美国Sigma公司;AF1213羊抗小鼠JAM-C单抗(anti-JAM-C mAb)购自美国RnD公司。小鼠肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA Kit试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备 将动物随机分成3组,每组6只。(1)生理盐水对照组(NS组):小鼠给予腹部注射无菌生理盐水(10 mL/kg)6次,每次间隔1 h。(2)ANP模型组(ANP组):小鼠给予腹部注射雨蛙素(50 μg/kg)6次,每次间隔1 h,末次注射后立即给予腹部注射LPS 10 mg/kg。(3)anti-JAM-C处

* 基金项目:苏州大学医学发展基金资助项目(EE123715)。 △ 通讯作者, Tel: (0512)67784805; E-mail: louisatangwen@yahoo.com.cn。

表 1 各组胰腺、肾脏组织病理评分,以及血清 BUN、Cr、AMY、TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	胰腺病理评分	肾脏理评分	BUN(mg/L)	Cr(mg/L)	AMY(U/L)	TNF-α(ng/L)
NS 组	0	0	28.0±3.0	7.0±1.1	1 876.0±245	58.0±13.0
ANP 组	9.3±1.3*	9.5±1.6*	90.0±16*	16.0±3.2*	17 985.0±1 064.0*	628.0±48.0*
anti-JAM-C mAb 组	6.2±1.1*#	7.3±1.1*#	55.0±11.0*#	12.0±2.2*#	13 870.0±988.0*#	320.0±23.0*#

: $P<0.05$,与 ANP 组比较;* : $P<0.05$,与 NS 组比较。

理组(anti-JAM-C mAb 组):小鼠给予腹部注射雨蛙素(50 μg/kg)6 次,每次间隔 1 h,在首次注射 30 min 时予每只小鼠腹部注射 anti-JAM-C mAb 0.3 mL(300 μg),末次雨蛙素注射后予腹部注射 LPS 10 mg/kg。

1.2.2 生化指标和 TNF-α 水平测定 在末次注射完毕 3 h 后,用股动脉取血法收集血液,小鼠血清经过稀释后通过 O-LYMPUS 全自动生化仪进行血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)和淀粉酶(AMY)检测,同时用 ELISA 测定血清 TNF-α 水平,操作步骤均严格按试剂盒说明书进行。

1.2.3 取材及光镜检查 取血后用颈椎脱臼法处死小鼠,开腹后取胰腺及肾脏置 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素和伊红(HE)染色,Olympus 光镜下观察,显微摄影。

1.2.4 病理学分析 每只小鼠的胰腺和肾脏组织切片 HE 染色,在光镜下选取 10 个高倍视野,用双盲法按文献[4-5]的标准分别对胰腺和肾组织进行病理学评分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用 Mann-Whitney 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺和肾组织病理变化及评分

2.1.1 胰腺组织 NS 组:胰腺组织正常(封 2 图 1)。ANP 组:胰腺高度水肿,腺泡呈孤岛状,广泛腺细胞坏死,细胞结构模糊不清,胞浆内空泡形成,局部有融合性坏死灶;坏死区有大量中性粒细胞和单核细胞浸润(封 2 图 2);胰周脂肪有大量炎症细胞浸润,血管扩张充血,有脂肪坏死;胰腺间质内动脉痉挛,静脉明显扩张淤血,炎症细胞附边,局部血管壁出血、坏死。anti-JAM-C mAb 组:胰腺间质充血水肿,有中性粒细胞和单核细胞浸润,有少量局灶性腺泡坏死,血管病变不明显,无出血(封 2 图 3)。anti-JAM-C mAb 组胰腺组织病理评分比 ANP 组轻($P<0.05$),见表 1。

2.1.2 肾脏组织 NS 组:组织结构未见明显异常(封 2 图 4)。ANP 组:肾小球淤血明显,肾小球内皮细胞肿胀,间质水肿,炎细胞浸润明显,肾小管上皮细胞变性水肿,细胞刷状缘脱落,偶见上皮变性坏死(封 2 图 5)。anti-JAM-C mAb 组:肾小球内皮细胞肿胀,间质水肿,散在炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞变性水肿,细胞刷状缘脱落(封 2 图 6)。anti-JAM-C mAb 组肾脏组织病理评分比 ANP 组轻($P<0.05$),见表 1。

2.2 血清 BUN、Cr、AMY 和 TNF-α 水平测定 与 NS 组相比,ANP、anti-JAM-C mAb 组血清 BUN、Cr、AMY 和 TNF-α 水平均明显升高($P<0.05$),但 anti-JAM-C mAb 组血清 BUN、Cr、AMY 和 TNF-α 水平均明显低于 ANP 组($P<0.05$),见表 1。

3 讨 论

ANP 是预后极其凶险的急腹症,在早期阶段便可出现全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS),其中肾功能损害仅次于肺损伤,且与胰腺炎的预后密切相关。

ANP 时肾脏损伤可能由多种因素导致,但白细胞过度激活和集聚是引起肾损伤进行性发展的中心环节,其中 JAM-C 是位于血管内皮细胞之间的黏附分子,对白细胞过度激活和在肾脏的浸润具有重要意义,在对腹膜炎^[6-7]、肺炎^[8]、皮肤炎症^[9]、关节炎^[10]等动物模型的研究中发现 JAM-C 增加了中性粒细胞在炎症部位和组织损伤处的浸润和聚集。因此,以拮抗 JAM-C 的治疗可能减少炎症细胞的激活和浸润并成为治疗胰腺炎的手段。Chavakis 等^[11]在研究中使用 JAM-C 的可溶形式(sJAM-C)结合中性粒细胞上的整合素 Mac-1 后,发现血管炎症明显减轻,且白细胞渗出也明显减少。Scheiermann 等^[12]发现拮抗 JAM-C 能使缺血再灌注损伤小鼠模型的中性粒细胞血管外渗出明显减少。Vonlaufen 等^[13]发现高表达 JAM-C 的转基因小鼠 ANP 模型的胰腺和肺组织炎症损伤明显重于正常小鼠。本研究发现 anti-JAM-C mAb 处理后的 ANP 小鼠胰腺和肾脏组织的病理评分明显改善,血清 BUN、Cr、AMY 水平均低于未处理组,同时还观察到 anti-JAM-C mAb 使 ANP 小鼠的血清 TNF-α 水平明显下降,因 TNF-α 是 ANP 合并全身炎症反应综合征的主要的炎性细胞因子,与 AP 的临床预后密切相关^[14],故 JAM-C 不仅能减轻 ANP 小鼠胰腺和肾脏组织的炎症损伤,还可能有效缓解全身炎症反应。重症胰腺炎患者多在发病数小时后就诊,故针对全身炎症反应的上游细胞因子的干预很难保证其及时性和有效性,因此,拮抗 JAM-C 这种参与 ANP 后期细胞事件的黏附分子可能成为 ANP 及时有效的治疗方法。所以,针对 JAM-C 这种参与 ANP 后期细胞事件的黏附分子进行干预可能成为 ANP 肾脏损伤的有效治疗方法。

参考文献:

[1] Yang R,Shafl AL,Killeen ME,et al. Ethyl pyruvate ameliorates liver injury secondary to severe acute pancreatitis [J]. Journal of Surgical Research,2009,153(2):302-309.

[2] Ody C,Jungblut-Ruault S,Cossali D,et al. Junctional adhesion molecule C (JAM-C) distinguishes CD27⁺ germinal center B lymphocytes from non-germinal center cells and constitutes a new diagnostic tool for B-cell malignancies[J]. Leukemia,2007,21(6):1285-1287.

[3] 胡端敏,杨勇,唐文. JAM-C 在小鼠急性坏死性胰腺炎模型不同组织中的表达[J]. 世界华人消化杂志,2010,18(1):81-83.

[4] Shimizu T,Shiratori K,Sawada T,et al. Recombinant human interleukin-11 decreases severity of acute necrotizing pancreatitis in mice[J]. Pancreas,2000,21(2):134-140.

[5] Yekebas EF,Strate T,Zolmajd S,et al. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis[J]. Kidney International,2002,26(14):1806-1818. (下转第 109 页)

参酮组的供者进行比较。从采集当天动员到外周血液循环中的 MNC 数,采集所得总的 MNC 数、CD34⁺ 细胞数、采集次数来看,细胞因子(rhG-CSF)联合丹参酮动员效果优势明显。干细胞动员期间有供者出现了发热、髌骨胀痛等不良反应。9 例供者(丹参酮联合 rhG-CSF 组 6 例,单用 rhG-CSF 组 3 例)出现轻度髌骨胀痛不适,为动员期间造血干细胞在骨髓内倍增引起。5 例供者出现发热不适,两组供者均有。rhG-CSF 的药品说明书中不良反应就有发热,也有大量的文献报道 rhG-CSF 在临床运用中出现发热不良反应^[13-15]。而丹参酮注射液的药品说明书中尚未见有关不良反应报道。所以,丹参酮组供者出现发热不良反应是由 rhG-CSF 引起,与丹参酮无关,说明丹参酮具有安全、有效、无不良反应等特点。说明本方案是 PBSC 动员安全、有效、可行的方案,值得临床进一步推广。

参考文献:

[1] Goldman J. Peripheral blood stem cells for allografting [J]. Blood,1995,85(6):1413-1415.

[2] Couban S, Simpson DR, Barnett MJ, et al. A randomized multicenter comparison of bone marrow and peripheral blood in recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies[J]. Blood,2002,100(5):1525-1531.

[3] 徐岚,胡炯,吴文,等.造血干细胞移植治疗血液恶性肿瘤的生存分析[J].肿瘤,2007,27(4):312-315.

[4] Jansen J, Thompson JM, Dugan MJ, et al. Peripheral blood progenitor cell transplantation[J]. Ther Apher, 2002,6(1):5-14.

[5] To LB, Haylock DN, Simmons PJ, et al. The biology and clinical uses of blood stem cell[J]. Blood,1997,89(7):2233-2258.

(上接第 106 页)

[6] Li H, Qian Z, Liu Z, et al. Risk factors and outcome of acute renal failure in patients with severe acute pancreatitis [J]. J Crit Care,2010,25(2):225-229.

[7] Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, et al. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo[J]. J Biol Chem, 2004,279(53):55602-55608.

[8] Aurrand-Lions M, Lamagna C, Dangerfield JP, et al. Junctional adhesion molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation[J]. J Immunol,2005,174(10):6406-6415.

[9] Ludwig RJ, Zollner TM, Santoso S, et al. Junctional adhesion molecules (JAM)-B and -C contribute to leukocyte extravasation to the skin and mediate cutaneous inflammation[J]. J Invest Dermatol,2005,125(5):969-976.

[10] Almer G, Busso N, Aurrand-Lions M, et al. Expression and function of junctional adhesion molecule-C in human

[6] 唐映,杨万章.丹参诱导干细胞分化的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(8):721-723.

[7] 钟鸣,苏海.心肌损伤时复方丹参滴丸的骨髓干细胞动员作用[J].浙江中西医结合杂志,2008,18(9):529-531.

[8] 魏沙,闫福曼,周乐全,等.丹参酮ⅡA 磺酸钠对骨髓间充质干细胞促增殖作用的研究[J].辽宁中医药大学学报,2010,12(12):56-58.

[9] 陈晓霞,王智明,罗贤生,等.健康供者外周血造血干细胞动员后采集的最佳时机[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(6):1068-1071.

[10] 王平,彭贤贵,陈幸华,等.单倍相合异基因外周血联合骨髓造血干细胞移植的干细胞采集及移植效果评价[J].解放军医学杂志,2010,35(5):584-586.

[11] Reddy RL. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation[J]. Transfus Apher Sci,2005,2(1):63-66.

[12] Mauricio R, Sousa GD, Seghatchian J. What's happening: an overview of potential adverse reactions associated with apheresis technology[J]. Transfus Apher Sci, 2005, 33(3):351-355.

[13] 余喆,葛林阜,黄宁,等.健康供者造血干细胞动员和采集效果的分析[J].中华临床医师杂志,2010,4(9):1662-1664.

[14] 王琳,史克珊,白志明,等. rhG-CSF 动员外周血干细胞对健康供者的影响[J].海南医学,2005,16(6):2-4.

[15] 邓琳,王红祥,丁胜,等.外周血造血干细胞动员采集 138 例临床分析[J].现代预防医学,2010,37(12):2345-2347.

(收稿日期:2011-08-17 修回日期:2011-09-06)

and experimental arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2007,9(2):176-178.

[11] Chavakis T, Keiper T, Matz-Westphal R, et al. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo[J]. J. Biol Chem, 2004,27(9):1780-1783.

[12] Scheiermann C, Colom B, Meda P, et al. Junctional adhesion molecule (JAM)-C mediates leukocyte infiltration in response to ischemia reperfusion injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2009,29(10):1509-1511.

[13] Vonlaufen A, Aurrand-Lions M, Pastor CM, et al. The role of junctional adhesion molecule C (JAM-C) in acute pancreatitis[J]. J Pathol,2006,209(4):540-548.

[14] 李荣洲,任宗海,林讷,等.急性胰腺炎患者血清 ICAM-1、TNF- α 和 P 选择素浓度与病情严重程度的关系[J].胰腺病学,2005,5(3):170-171.

(收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-08-15)