

# 中性粒细胞趋化因子在重症急性胰腺炎中的表达及临床意义

石建群, 周国雄, 黄介飞, 徐岷, 张弘, 魏群

石建群, 周国雄, 黄介飞, 徐岷, 张弘, 魏群, 南通大学附属医院消化科  
江苏省南通市 226001

南通市社会发展基金资助项目, No.S5054

通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化科. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net

电话: 0513-5052078

收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-17

## Clinical significance and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in severe acute pancreatitis

Jian-Qun Shi, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Min Xu, Hong Zhang, Qun Wei

Jian-Qun Shi, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Min Xu, Hong Zhang, Qun Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China  
Supported by Social Development Foundation of Nantong City, No. S5054

Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Road, Nantong 226001, China. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net

Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-17

## Abstract

**AIM:** To investigate the role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in the pathogenesis of severe acute pancreatitis (SAP).

**METHODS:** The acute pancreatitis model was induced by retrograde injection of 50 g/L sodium taurocholate into the bili-pancreatic duct in SD rats. Forty-eight masculinity SD rats were randomly divided into 2 groups: the sodium taurocholate group and the operational control group. The serum amylase level and the histological pathologic changes of pancreas were measured at different time point in each group. The expression of pancreatic CINC protein and mRNA were determined by immunohistochemistry and semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), respectively.

**RESULTS:** The level of serum amylase in sodium taurocholate group was significantly higher than that in the control group, and its histological pathologic changes were more significant. The expression of CINC protein in the pancreatic acinar cells and the expression of

CINC mRNA in the pancreatic tissues in the sodium taurocholate group were higher, and the expression of CINC mRNA in the pancreatic acinar cells in the sodium taurocholate group were significantly higher ( $0.37 \pm 0.10$  vs  $0.29 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ) than that in the controls 1 h after operation. The expression of CINC and CINC mRNA were gradually up-regulated as the time increased. Immunohistochemistry showed the expression of CINC protein was higher than that of the operational control group.

**CONCLUSION:** CINC may play an important role in the pathogenesis of SAP.

**Key Words:** Severe acute pancreatitis; Cytokine-induced neutrophil chemoattractant; Pathogenesis

Shi JQ, Zhou GX, Huang JF, Xu M, Zhang H, Wei Q. Clinical significance and expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant in severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(22):2704-2707

## 摘要

**目的:** 探讨中性粒细胞趋化因子(CINC)在重症急性胰腺炎(SAP)发病机制中的作用。

**方法:** 采用向胆胰管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠建立大鼠SAP模型, 48只♂SD大鼠随机分为手术对照组和SAP组, 分别检测各组不同时间点血清淀粉酶和胰腺组织病理学改变, 用免疫组织化学法和半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测胰腺组织中CINC蛋白和CINC mRNA表达的变化情况。

**结果:** 牛磺胆酸钠组与手术对照组相比, 大鼠的血清淀粉酶明显增高、胰腺组织学改变明显; 术后1 h胰腺腺泡细胞CINC蛋白和胰腺组织中CINC mRNA的表达高于手术对照组, 随着时间的延长表达逐渐增强, 牛磺胆酸钠组术后1 h胰腺腺泡细胞CINC mRNA表达较手术对照组明显增高分别为( $0.37 \pm 0.10$  vs  $0.29 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ), 并且随着时间的延长差别更加明显; 免疫组化显示CINC蛋白表达也高于手术对照组。

**结论:** CINC可能在SAP发病过程中起了重要的作用。

**关键词:** 重症急性胰腺炎; 中性粒细胞趋化因子; 发病

石建群, 周国雄, 黄介飞, 张弘, 魏群. 中性粒细胞趋化因子在重症急性胰腺炎中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(22):2704-2707  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2704.asp>

## 0 引言

由于急性胰腺炎(AP)的发病因素较复杂,目前确切的发病机制尚未完全阐明,近年来细胞因子尤其是趋化因子在AP的发病过程中所起的作用受到人们的重视,但对中性粒细胞趋化因子(CINC)在AP中究竟起何种作用的研究尚不多.我们通过建立重症AP模型,检测其CINC的表达变化情况,初步探讨CINC在重症急性胰腺炎(SAP)发病过程中所起的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂SD大鼠48只,清洁级,体质量 $250 \pm 30$  g,由南通大学医学院动物实验中心提供.牛磺胆酸钠为美国Sigma公司产品,兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体为美国Assay Designs公司产品,ABC免疫试剂盒为武汉博士德公司产品,RT-PCR一步法试剂盒为芬兰Finnzymes公司产品.

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及动物模型的建立** 牛磺胆酸钠组和手术对照组各24只大鼠,大鼠术前禁食12 h,禁水6 h,用20 g/L戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔内注射麻醉,腹部皮肤消毒,正中切口进腹,胆胰管近端用无损伤金属夹夹闭,向十二指肠开口方向插入注射器针头,以0.1 mL/min的速度向胆胰管内注射50 g/L牛磺胆酸钠,剂量为1 mL/kg,5 min后拔除注射针,松开金属夹,缝合关腹.手术对照组仅向胆胰管注射与牛磺胆酸钠组等量的无菌生理盐水.分别随机选取6只大鼠在术后1, 3, 6, 12 h予安乐死,心脏穿刺抽取血液3-5 mL,4℃ 3 000 r/min离心15 min,离心后取血清,在-70℃中保存;取胰头的胰腺组织用40 g/L中性甲醛固定24-48 h,石蜡包埋.

**1.2.2 血清淀粉酶测定** 采用酶法,由美国Vitros-250型全自动生化分析仪测定.

**1.2.3 胰腺组织病理评分** 胰腺组织经HE染色后,由两位专业的病理医师双盲阅片,每张切片随机选取10个高倍镜视野,以水肿、感染、出血和坏死评价胰腺组织损伤的程度.具体参考Rongione *et al*<sup>[1]</sup>的评分标准进行病理评分,各项最低分为0分,最高分为4分,取各项积分总和为最终得分.

**1.2.4 免疫组织化学检测** 石蜡包埋的组织标本4 μm连续切片,常规脱蜡,30 mL/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶,微波抗原修复,三羟甲基氨基甲烷缓冲液(TBS)漂洗后,

与兔抗大鼠GRO/CINC-1抗体(工作浓度为1:50)孵育,用PBS代替一抗作为空白对照,再次TBS液漂洗,用生物素化羊抗兔IgG二抗孵育,再以TBS液漂洗,并以5 mL/L DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>显色,最后苏木素复染及封片.

**1.2.5 RT-PCR检测** 采用Trizol试剂提取胰腺组织总RNA,根据GenBank中基因序列自行设计引物,CINC引物(310 bp):上游:5'-ATCGATGGTCGTTCAATTCC-3';下游:5'-GGCATTGTGCCCTACAAACT-3';GAPDH引物(484 bp):上游:5'-ATGGGAAGCTGGTCATCAAC-3';下游:5'-TTCAGCTCTGGGATGACCTT-3',由上海生工生物工程公司合成.PCR循环条件:55℃ RT反应45 min;92℃ 预变性2 min;92℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min;循环40次;72℃延伸5 min,反应体系为50 μL.PCR产物在17 g/L琼脂糖凝胶上作电泳观察结果,用凝胶图像扫描仪测定光密度值,以GAPDH为内参照,半定量测定CINC mRNA的表达情况.

**统计学处理** 实验数据均用mean±SD表示,用STATA 7.0统计软件,t检验对两组均数进行显著性检验, $P<0.05$ 具有显著性差异.

## 2 结果

**2.1 血清淀粉酶** 牛磺胆酸钠组术后1 h淀粉酶比手术对照组明显升高,术后6 h达到高峰,术后12 h稍有下降.相同时间点牛磺胆酸钠组血清淀粉酶均高于手术对照组,有显著性差异( $P<0.01$ )(表1).

**2.2 胰腺组织学改变和病理评分** 牛磺胆酸钠组术后1, 3 h穿刺点附近可见明显的出血,肿胀,腹腔有血性腹水,量逐渐增多;术后6, 12 h除了见大量血性腹水外,胰腺质地变硬,见大片的黄色和白色的坏死灶.手术对照组术后1 h穿刺点附近可见轻度水肿、极少量散在的出血点,其他时间点胰腺外观正常.

牛磺胆酸钠组术后1, 3 h可见明显小叶间水肿,片状出血,炎性细胞浸润,腺泡细胞变性坏死;6, 12 h可见大量炎性细胞浸润,胰腺小叶结构破坏,大量腺泡细胞坏死.手术对照组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.相同时间点的牛磺胆酸钠组病理评分明显高于手术对照组,有显著性差异( $P<0.01$ )(表1).

表1 牛磺胆酸钠组和手术对照组大鼠血清淀粉酶、胰腺病理积分和胰腺CINC mRNA ( $n = 6$ , mean ± SD)

	术后1 h		术后3 h		术后6 h		术后12 h	
	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠	手术对照	牛磺胆酸钠
血清淀粉酶(nkat/L)	158.13 ± 7.02	249.19 ± 37.37 <sup>b</sup>	207.26 ± 25.01	562.69 ± 61.91 <sup>b</sup>	156.57 ± 12.30	744.99 ± 114.88 <sup>b</sup>	121.59 ± 10.02	595.50 ± 56.75 <sup>b</sup>
胰腺病理积分	1.25 ± 0.46	6.25 ± 0.71 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.52	9.13 ± 0.83 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.52	10.50 ± 1.07 <sup>b</sup>	0.25 ± 0.46	11.75 ± 1.04 <sup>b</sup>
CINC mRNA	0.29 ± 0.10	0.37 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.07	0.47 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.02	0.82 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.04	0.86 ± 0.09 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 手术对照组.

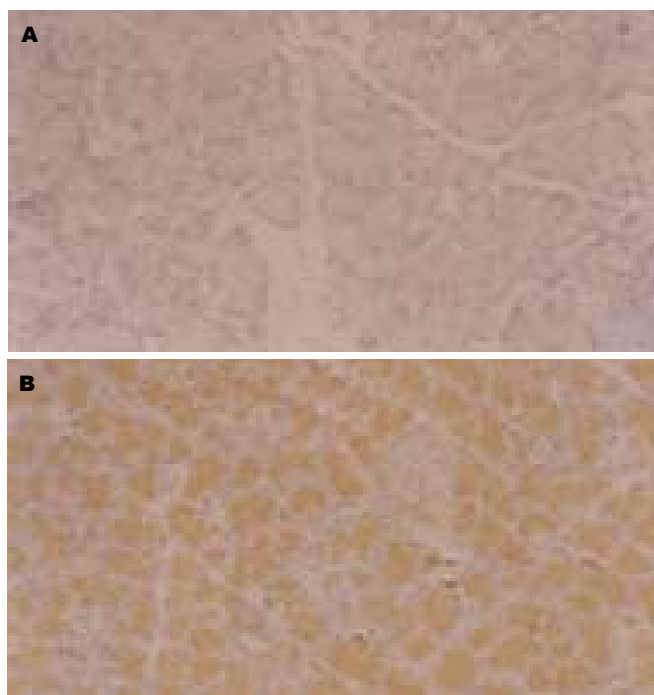


图1 胰腺组织免疫组织化学检测CINC蛋白的表达( $\times 250$ ). A: 手术对照组12 h胰腺组织; B: 牛磺胆酸钠组12 h胰腺组织.

2.3 免疫组织化学染色 手术对照组术后1, 3 h见少量胰腺腺泡细胞有CINC蛋白的阳性表达, 表达较弱; 而术后6, 12 h腺泡细胞则未见阳性表达(图1A). 牛磺胆酸钠组术后1 h至6 h有CINC蛋白阳性表达的腺泡细胞数量逐渐增多, 且细胞着色逐渐加深, 胰岛细胞不着色. 术后12 h表达情况与术后6 h相似(图1B). CINC蛋白表达阳性的细胞以中性粒细胞和腺泡细胞为主.

2.4 RT-PCR 牛磺胆酸钠组术后1 h胰腺组织CINC mRNA表达升高, 随时间表达逐渐升高, 6 h和12 h达到高峰; 手术对照组CINC mRNA表达早期有轻度升高(图2). 相同时间点牛磺胆酸钠组表达高于手术对照组, 有显著差异( $P < 0.05$ )(表1).

### 3 讨论

趋化因子(chemokine)是细胞因子超家族成员中一类由组织细胞或炎症细胞衍生的, 具有白细胞趋化作用的小分子蛋白多肽, 根据其半胱氨酸排列位置的不同分为CXC、CC、C、CX3C四类趋化因子. 大鼠的CINC是一种含ELR的CXC类趋化因子, 与人的生长相关基因蛋白- $\alpha$ (GRO- $\alpha$ )同源, 主要趋化中性粒细胞, 与CXC受体2有高度的亲和力, 该受体高度表达于中性粒细胞, 促使他们黏附上皮细胞、通过血管壁迁移、组织入侵, 产生氧自由基、脱颗粒和增加钙离子内流, 进一步扩大炎症反应.

本实验表明SAP大鼠CINC蛋白及其mRNA表达随着时间变化逐渐增强, 且与胰腺组织的病理损害程度呈正相关, 提示CINC在AP大鼠的发病和炎症反应的发展中起了重要的作用, 与国外的文献[2,3]报道一致. 一些临床研究表明SAP患者血浆中含ELR的CXC类趋化因子

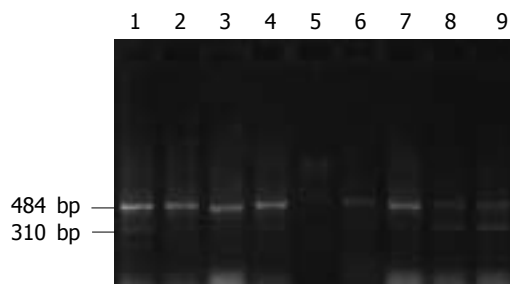


图2 牛磺胆酸钠组和手术对照组胰腺组织CINC mRNA的表达. 1-4: 手术对照组1, 3, 6, 12 h; 5: Marker; 6-9: 牛磺胆酸钠组1, 3, 6, 12 h.

GRO- $\alpha$ 、ENA-78等水平明显高于轻症患者, 且上升较早, 提示血浆CXC类趋化因子的高水平可能与SAP引起的全身系统炎症反应综合征、多脏器功能衰竭的早期高死亡率有关[4,5].

Brady *et al*<sup>[2]</sup>通过免疫组化发现CINC的表达不仅定位在中性粒细胞上, 而且胰腺腺泡细胞内也有表达, 提示胰腺腺泡细胞和中性粒细胞均为急性胰腺炎CINC的来源之一. 本实验的免疫组织化学检测结果也显示胰腺组织中CINC蛋白表达阳性的细胞以中性粒细胞和胰腺腺泡细胞为主.

至于CINC的高表达是导致瀑布样级联炎症反应的原因, 还是其结果, 通过本实验, 我们认为CINC的高表达趋化了炎症细胞, 从而加重了炎症, 同时由于大量炎症细胞浸润和胰腺腺泡细胞受损进一步增加了CINC的分泌, 形成恶性循环, 最终导致全身系统炎症反应综合征和多脏器功能衰竭.

趋化因子在炎症中主要是吸引炎症细胞浸润于炎症部位参与炎症反应, 使不同的细胞网络之间产生相互作用, 本实验表明CINC可能在AP发病过程及MAP向SAP转变过程中起了重要的作用. Bhatia *et al*<sup>[6]</sup>用绵羊抗CINC抗体干预雨蛙肽诱导的大鼠AP模型, 虽然对胰腺局部的损害没有明显作用, 但减轻了相关的急性肺损害. Yamaguchi *et al*<sup>[7]</sup>用新型抗炎介质IS-741减少了AP模型CINC的合成, 抑制中性粒细胞的黏附和渗出, 对实验性急性胰腺炎具有治疗效果. 因此, 我们可以尝试通过用中和趋化因子或阻断趋化因子受体来抑制急性胰腺炎早期趋化因子的活性减少其有害的免疫应答, 避免炎症反应的进一步加重, 从而达到治疗急性胰腺炎和减少并发症的目的.

### 4 参考文献

- 1 Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 1997; 112: 960-967
- 2 Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 260-269
- 3 Sugita H, Yamaguchi Y, Ikei S, Yamada S, Ogawa M. Enhanced expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) by bronchoalveolar macrophages in cerulein-induced pancreatitis rats. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 154-160
- 4 Shokuchi S, Bhatia M, Christmas S, Sutton R, Neoptolemos JP,

- Slavin J. Levels of the chemokines growth-related oncogene alpha and epithelial neutrophil-activating protein 78 are raised in patients with severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 566-572
- 5 Rau B, Baumgart K, Kruger CM, Schilling M, Beger HG. CC-chemokine activation in acute pancreatitis: enhanced release of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with local and systemic complications. *Intensive Care Med* 2003; 29: 622-629
- 6 Bhatia M, Brady M, Zagorski J, Christmas SE, Campbell F, Neoptolemos JP, Slavin J. Treatment with neutralising antibody against cytokine induced neutrophil chemoattractant (CINC) protects rats against acute pancreatitis associated lung injury. *Gut* 2000; 47: 838-844
- 7 Yamaguchi Y, Okabe K, Liang J. The novel carboxamide derivative IS-741 reduces neutrophil chemoattractant production by bronchoalveolar macrophages in rats with cerulein-induced pancreatitis complicated by sepsis. *Digestion* 1999; 60: 52-56

电编 张敏 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2006 年第 5 届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

**本刊讯** 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会”定于2006-05在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题继续进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

### 1 征文内容

(1)病毒性肝炎发病机制的研究进展;(2)病毒性肝炎的治疗策略;(3)乙型病毒性肝炎的长期治疗;(4)丙型肝炎的抗病毒治疗;(5)肝纤维化发病机制研究进展;(6)肝纤维化的防治;(7)肝硬化的规范化治疗;(8)肝细胞癌的病因学研究进展;(9)肝癌的发病机制研究进展;(10)肝癌的早期诊断;(11)肝癌的手术治疗及方案选择;(12)肝癌的非手术治疗;(13)肝癌的生物治疗;(14)自身免疫性肝病的发病机制;(15)自身免疫性肝病的诊断和治疗;(16)肝移植后肝炎复发的诊断、预防和治疗;(17)生物人工肝的应用及进展;(18)小儿自身免疫性肝病;(19)肝肾综合征;(20)肝功能衰竭;(21)肝干细胞的研究进展及临床应用;(22)脂肪肝及酒精性肝病;(23)非酒精性脂肪性肝病。

### 2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料和方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理。

### 3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址 zhgz@vip.163.com。征文截稿日期:2006-02-28(以邮戳为准)。

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿,参加会议。