

白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用

吴彦彦, 许兰涛

■背景资料

有学者提出SAP时炎症反应的消退依赖于PMN的凋亡, 而PMN的延迟凋亡是SAP患者发生SIRS并进展为MODS的重要环节。IL-18是一种新发现的促炎细胞因子, 近来发现其与PMN凋亡存在关系。

吴彦彦, 苏州大学研究生部 江苏省苏州市 215021
许兰涛, 上海交通大学附属第六人民医院奉贤分院消化科 上海市 201400

上海市卫生局基金资助项目, No. 2009226

作者贡献分布: 此课题由吴彦彦与许兰涛设计; 研究过程由吴彦彦完成; 研究所用试剂由许兰涛提供; 论文数据分析由吴彦彦完成; 论文写作由吴彦彦与许兰涛完成。

通讯作者: 许兰涛, 主任医师, 201400, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院奉贤分院消化科。sccdlx@sohu.com
电话: 021-57420713

收稿日期: 2011-11-10 修回日期: 2011-12-01

接受日期: 2011-12-23 在线出版日期: 2012-01-18

Role of IL-18 in peripheral neutrophil apoptosis in rats with sever acute pancreatitis

Yan-Yan Wu, Lan-Tao Xu

Yan-Yan Wu, Graduate School, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu Province, China

Lan-Tao Xu, Fengxian Branch of the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201400, China

Supported by: the Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau, No. 2009226

Correspondence to: Lan-Tao Xu, Chief Physician, Fengxian Branch of the Sixth Affiliated Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201400, China. sccdlx@sohu.com

Received: 2011-11-10 Revised: 2011-12-01

Accepted: 2011-12-23 Published online: 2012-01-18

Abstract

AIM: To examine the role of interleukin-18 (IL-18) in apoptosis of peripheral blood neutrophils (PMNs) in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: Sixty SD rats were randomly divided into two groups: SAP group and sham operation (SO) group. At 3, 6 and 12 h after SAP induction, blood samples were collected from the inferior vena cava to measure serum amylase and IL 18; PMNs were separated to detect their apoptosis; and pancreatic specimens were taken for pathological examination.

RESULTS: PMN apoptosis rate decreased remarkably in the SAP group than in the SO group, and the decrease became more obvious

over time ($P < 0.01$). Serum levels of IL-18 in the SAP group increased significantly compared with those in the SO group ($P < 0.01$). There was a negative correlation between the apoptosis rate of PMNs and serum levels of IL-18 in SAP rats ($r = -0.742$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Compared to control rats, PMN apoptosis was obviously delayed and serum levels of IL-18 remarkably increased in SAP rats, indicating that IL-18 may play an important role in peripheral neutrophil apoptosis in SAP.

Key Words: Interleukin-18; Severe acute pancreatitis; Neutrophils; Apoptosis

Wu YY, Xu LT. Role of IL-18 in peripheral neutrophil apoptosis in rats with sever acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(2): 140-144

摘要

目的: 探讨白介素-18(IL-18)在重症急性胰腺炎(SAP)时外周血中性粒细胞(PMN)凋亡中的作用。

方法: SD大鼠60只, 随机分为2组, 每组30只, 分别建立大鼠急性坏死性胰腺炎组(ANP)及假手术组(SO)模型, 在制模后3、6、12 h分期分批处死大鼠, 抽取下腔静脉血测定血清淀粉酶含量及血清中IL-18的含量, 作中性粒细胞分离并检测外周血中性粒细胞凋亡率; 同时对大鼠胰腺组织行病理切片HE染色, 并对胰腺组织进行病理评分。

结果: ANP组中性粒细胞(PMN)凋亡率较SO组明显降低, 并随着时间的延长逐渐明显($P < 0.01$), 至术后12 h降至 $2.15\% \pm 0.45\%$; ANP组血清中IL-18的含量较SO组明显升高, 而且随着时间的延长更明显($P < 0.01$), 在12 h达到 4705.70 ± 296.30 ; ANP组PMN的凋亡率与血清中IL-18的水平呈负相关($r = -0.78$, $P < 0.01$)。

结论: ANP组外周血PMN的凋亡明显延迟, 血清中IL-18的含量明显增高, IL-18可能在急性胰腺炎外周血的PMN凋亡中发挥作用。

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

关键词: 白介素-18; 急性胰腺炎; 中性粒细胞; 凋亡

吴彦彦, 许兰涛. 白介素-18在急性胰腺炎大鼠中性粒细胞凋亡中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20(2): 140-144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/140.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是一个死亡率极高的疾病, 其发病机制复杂. 白介素-18(interleukin-18, IL-18)是一个新发现的促炎症细胞因子, 属于IL-1细胞因子超家族. 近年来, 有学者研究发现, IL-18可以延迟酒精中毒和烧伤患者中外周血中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)的凋亡^[1]. Ueda等^[2]研究发现, IL-18在重症急性胰腺炎患者血清中明显增加, 并且与患者的严重程度呈明显的相关性. 虽然现有学者研究了IL-18在SAP中的相关作用, 但是, IL-18在延迟PMN凋亡方面的研究少有报道, 本研究建立SAP大鼠模型, 动态监测IL-18在血清的中表达, 并测定PMN凋亡情况, 探讨IL-18与SAP时PMN凋亡的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂健康SD大鼠60只, 清洁级, 体重250-300 g, 由上海交通大学附属第六人民医院实验动物中心提供; 牛黄胆酸钠(Sigma公司, 美国); 大鼠中性粒细胞分离液(LZS1091)(天津灏洋生物制品科技有限公司, 中国); 凋亡试剂盒(BD公司, 美国); 流式分析仪BD FACSCalibur(美国); 大鼠IL-18 ELISA试剂盒(RND公司, 美国).

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 健康SD大鼠60只随机分为2组: 急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)组和假手术组(SO组). ANP组30只, 假手术SO组30只, 每组在术后3 h、6 h、12 h下腔静脉抽血(各组各时间点10只), 随即处死大鼠, 取胰腺组织, 用100 g/L甲醛溶液固定. ANP组模型的制作参照Banerjee^[3]方法加以改进制作大鼠重症胰腺炎模型: 各组动物术前12 h禁食, 可以自由饮水, 采用30 g/L戊巴比妥钠(1 mL/kg体重)腹腔内注射麻醉; 麻醉成功后仰卧, 正中切口进入腹腔, 提起十二指肠, 在胰胆管开口十二指肠系膜缘对侧肠壁上, 用穿刺针(套管针内芯)穿入胰胆管约0.4 cm, 用无损伤的动脉夹临时阻断胰胆管的上下端后加压注射50 g/L牛黄胆酸钠(1 mL/kg体重), 注射速度为0.2 mL/min, 注射

完毕后5 min拔针, 检查无出血, 关腹; SO组仅开腹, 翻动胰腺, 再关腹. 每组大鼠麻醉苏醒后, 自由饮水、禁食.

1.2.2 血清淀粉酶的检测: 血清淀粉酶采用全自动生化分析仪(VITROS.950)检测.

1.2.3 中性粒细胞的分离: 采血后, 立即用梯度离心法进行PMN的分离, 加入PBS液悬浮细胞, 计数板计数, 调整细胞浓度至 1×10^6 /mL.

1.2.4 PMN活力检测: 取2滴细胞悬液加滴4%台盼蓝染色, 活细胞不着色, 死细胞染成蓝色, 计数200个细胞, 计算活细胞百分率, 拒染细胞数应>95%. PMN活力 = 拒染细胞数/200 \times 100%.

1.2.5 中性粒细胞凋亡检测: 用4 ℃的PBS洗涤分离的中性粒细胞2次, 加Binding Buffer 60 μ L, 加入Annexin V-FITC 5 μ L, 摇匀后于室温避光孵育15 min, 上机前5 min在反应管中加入Propidium Iodide 5 μ L, 然后再补加Binding Buffer 150 μ L, 流式细胞仪检测中性粒细胞凋亡指数. Annexin V阳性为凋亡细胞, PI阳性为坏死细胞, Annexin V及PI双阴性为存活细胞.

1.2.6 血清中IL-18水平的测定: 采用酶联免疫吸附法, 试剂盒购自RND公司, 操作方法严格按照试剂盒说明书进行.

1.2.7 光镜下胰腺组织病理学改变: 常规石蜡包埋、切片、HE染色, 制作病理HE切片. 有资深病理医师盲法对胰腺病理切片进行观察并按照Schmids法^[4]的标准进行组织病理评分, 观察各组胰腺组织病变程度.

统计学处理 所有数据用mean \pm SD表示, 采用SPSS17.0统计软件分析处理; 组间计量资料采用配对t检验, 组内计量资料采用单因素方差分析; 两变量间关系采用直线相关分析; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 各组血清淀粉酶含量变化 ANP组血中的淀粉酶水平在模型建立成后逐渐升高, 并在12 h达峰值(9888.0 ± 1498.06), 各时间点均较SO组高($P < 0.05$), 而SO组血清淀粉酶的含量较低(表1).

2.2 胰腺组织变化 肉眼观察: SO组胰腺无明显变化, 腹腔内未见异常; ANP组大鼠腹腔内可见血性腹水, 胰腺有坏死灶, 腹腔脏器粘连, 肠系膜、大网膜上有大量皂化斑. 光镜下: SO组大鼠的胰腺组织无明显变化; SAP组的大鼠胰腺组织可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 中性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润以及出血坏死病

■ 研究前沿

当前研究认为IL-18与PMN的凋亡有关, 相关分子机制的研究中还有不少问题需要进一步阐明: 如IL-18在PMN凋亡延迟中涉及的信号转导通路及作用环节; IL-18在凋亡中所涉及的凋亡调控蛋白, 其与促、抗凋亡蛋白的关系等.

■应用要点

本研究为进一步阐明PMN延迟凋亡在SAP发病过程中的作用,探讨IL-18延迟PMN凋亡的具体作用机制以及研究SAP新的治疗靶点方面提供了科学的实验依据。

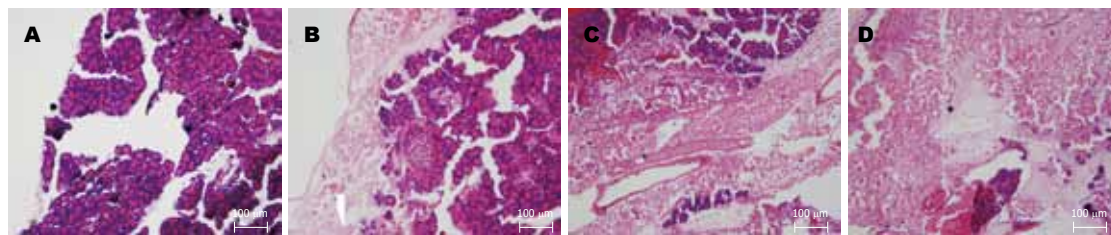


图1 各时间点胰腺组织HE染色病理情况($\times 100$)。A: SO组3 h; B: ANP组3 h; C: ANP组6 h; D: ANP组12 h。

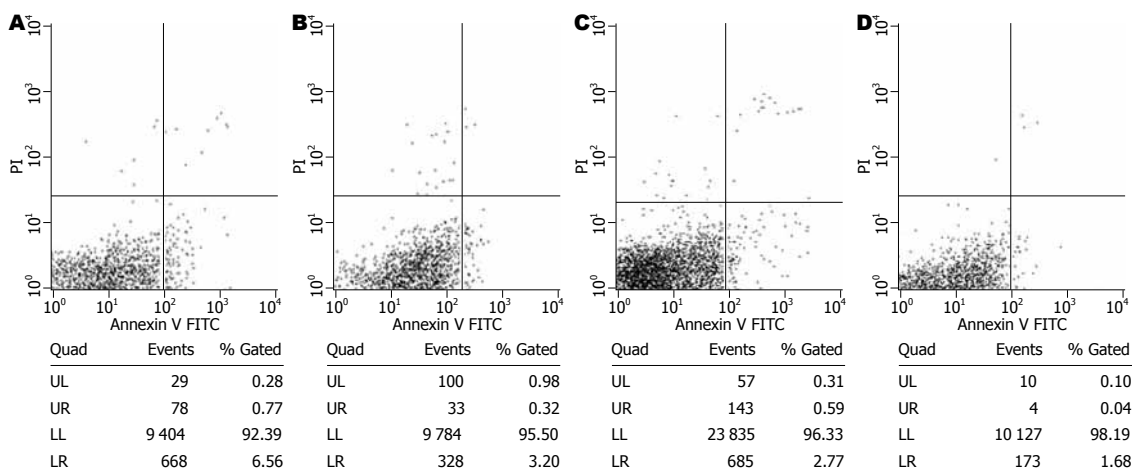


图2 各组大鼠外周血PMN凋亡率的变化。A: SO组3 h; B: ANP组3 h; C: ANP组6 h; D: ANP组12 h。

表1 各组血淀粉酶、胰腺组织病理评分变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	时间(h)	血淀粉酶(U/L)	胰腺组织病理评分
ANP组	3	2 577.00 \pm 890.22 ^{ac}	6.4 \pm 1.35 ^{ac}
	6	5 521.30 \pm 1 177.08 ^{ac}	8.3 \pm 1.34 ^{ac}
	12	9 888.0 \pm 1 498.06 ^{ac}	10.7 \pm 1.95 ^{ac}
SO组	3	770.60 \pm 161.25	0.1 \pm 0.32
	6	788.10 \pm 192.01	0.2 \pm 0.42
	12	713.80 \pm 199.97	0.1 \pm 0.32

^a $P < 0.05$ vs SO组各时间点; ^c $P < 0.05$ vs ANP组间。

灶形成,且随着时间的延长病变逐渐加重(图1)。ANP组各时间点的胰腺组织病理学评分均较SO组高($P < 0.05$,表1)。

2.3 各组大鼠不同时间外周血中性粒细胞凋亡率的变化 模型制成后,随着时间推移,ANP组大鼠的凋亡率逐步下降,12 h达到最低(2.15 ± 0.45),与SO组各个时间段(3、6、12 h)两两相比差异有统计学意义($P < 0.01$,表2,图2)。

2.4 各组大鼠不同时间血清中IL-18含量的变化 SO组的血清IL-18含量较低,且各时间点无明显差别;而ANP组大鼠的血清IL-18含量明显增高,且随着时间的延长逐渐增加,在12 h最高(4705.70 ± 296.30),各时间点两两相比较差异有

统计学意义($P < 0.01$)。ANP组与SO组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$,表2,图3)。

2.5 相关性 ANP组外周血PMN凋亡率与胰腺病理评分及血清IL-18浓度的变化均呈负相关,相关系数分别为 $r = -0.602$, -0.78 (均 $P < 0.01$)。

3 讨论

中性粒细胞是寿命很短的一种细胞,正常衰老的PMN多以凋亡的方式死亡,之后多被巨噬细胞识别、吞噬、清除;凋亡时不发生细胞膜的破裂,被吞噬细胞吞噬后不释放其毒性细胞内容物,这对促进炎症的消散和局限发挥着重要的作用^[5]。而在一些炎症性疾病如SAP时,PMN

表 2 各组大鼠PMN凋亡率及血清IL-18的变化 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	PMN凋亡率(%)			血清IL-18(μ g/L)		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
ANP组	4.51 \pm 0.69 ^{bd}	3.30 \pm 0.59 ^{bd}	2.15 \pm 0.45 ^{bd}	1 974.80 \pm 374.54 ^{bd}	3 585.10 \pm 466.26 ^{bd}	4 705.70 \pm 296.30 ^{bd}
SO组	6.56 \pm 0.62	6.67 \pm 0.76	6.37 \pm 1.01	804.25 \pm 471.18	845.07 \pm 514.30	756.08 \pm 412.81

^b $P < 0.01$ vs SO组各时间点; ^d $P < 0.01$ vs ANP组间。

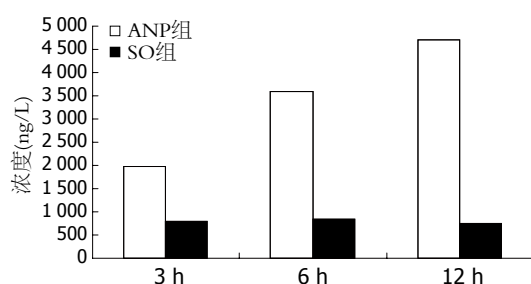


图 3 各组大鼠血清IL-18浓度变化。

的凋亡延迟, 中性粒细胞过度激活, 导致了其除了分泌细胞因子外, 还引起“呼吸爆发”, 释放大量的自由基、蛋白水解酶及炎症介质等有害物质引起组织的损害, 产生级联反应, 诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的发生, 导致炎症性疾病的病情加重, 造成恶性循环, 从而引起SAP等炎症性疾病时SIRS甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome MODS)的发生^[6]。

本实验发现, 在SAP时, 大鼠造模成功后的3 h、6 h、12 h, 外周血的PMN的凋亡率逐渐下降, 至12 h达到最低值(2.15 \pm 0.45), 而SO组大鼠的凋亡率维持在较高的水平, 且各个时间点ANP组均较SO组为低, 两两比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 在ANP组不同的时间点两两比较亦有统计学意义($P < 0.01$)。这与李俊等^[7]的研究相一致, 他们发现, 在ANP组大鼠循环中的PMN凋亡明显降低, 提示PMN的凋亡参与了急性胰腺炎的病理生理过程, 并对急性胰腺炎的严重程度和转归有很大的影响。

IL-18是IL-1细胞因子超家族的成员, 是一种新近发现的促炎症细胞因子, 与IL-1 β 相似, 主要由枯否细胞和活化的巨噬细胞产生, 他由不具有生物活性的母体蛋白合成, 需要被caspase-1裂解为具有活性的成熟蛋白^[8]。近年来, 有学者研究发现, IL-18可以通过调控促凋亡蛋白、抗凋亡蛋白、TNF- α 以及激活NF- κ B等作用机制来抑制PMN的凋亡^[1,9,10]。关于IL-18与急性胰腺

炎的关系, 有学者研究发现血清IL-18的浓度与急性胰腺炎合并胰腺外脏器的损害存在着明显的相关性^[11]。也有学者报道, 在急性胰腺炎患者的血清中, IL-18的水平在病变早期就开始增加, 到病变后期, 患者出现胰腺坏死及全身并发症时都一直维持着较高的水平^[12]。虽然现在有众多学者研究了IL-18在SAP中的相关作用, 但是, 在IL-18在延迟SAP时中性粒细胞凋亡方面的研究少有报道。

本实验发现, 在造模成功后的3 h、6 h、12 h, ANP组大鼠血清中的IL-18的含量在逐渐升高, 在12 h时达到最高值(4705.70 \pm 296.30); 而SO组含量较低, ANP组内相比较差异有统计学意义($P < 0.01$), ANP组与SO组各时间点相比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 且ANP组大鼠外周血的PMN的凋亡率与血清中的IL-18的含量呈明显的负相关($r = -0.78$; $P < 0.01$), 与胰腺病理评分亦呈负相关($r = -0.602$, 均 $P < 0.01$)。说明IL-18可能参与了ANP大鼠外周血PMN的凋亡延迟作用。

根据我们的研究发现, SAP大鼠外周血PMN的凋亡呈现明显延迟, 同时, 血清IL-18的含量逐渐增加, 二者呈明显的负相关($r = -0.78$; $P < 0.05$), 说明IL-18可能参与了PMN的凋亡延迟作用, 但是具体机制仍未完全清楚, 需要进一步的研究。

总之, IL-18在全身炎症包括SAP时是一个有力的抑制中性粒细胞凋亡的介质, 能够成为一个新的治疗靶点, 进而阻止中性粒细胞相关的组织损害以及随后发生的SIRS以及MODS。

4 参考文献

- 1 Akhtar S, Li X, Kovacs EJ, Gamelli RL, Choudhry MA. Interleukin-18 delays neutrophil apoptosis following alcohol intoxication and burn injury. *Mol Med* 2011; 17: 88-94
- 2 Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, Matsumura N, Sawa H, Nakajima T, Ajiki T, Fujino Y, Suzuki Y, Kuroda Y. Significant elevation of serum interleukin-18 levels in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2006; 41: 158-165
- 3 Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Exper-

■同行评价

本研究通过建立SAP大鼠模型, 动态监测IL-18在血清中的表达, 测定PMN凋亡情况, 证明IL-18可能在SAP外周血PMN凋亡中发挥作用。本研究有新意, 可能对SAP的发病机制和治疗有新的认识。

- imental models of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1994; 81: 1096-1103
- 4 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215: 44-56
- 5 Maiani NA, Maiani AN, Kuipers TW, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol* 2004; 111: 56-66
- 6 王晓龙, 周向东. 核转录因子- κ B抑制因子对中性粒细胞凋亡的影响. *中国老年学杂志* 2010; 30: 194-196
- 7 李俊, 刘震, 李晓东, 陈玉祥, 张跃天, 黄卫, 刘友春, 方向, 刘续宝. 外周血中性粒细胞凋亡与急性胰腺炎的关系探讨. *四川医学* 2009; 30: 301-303
- 8 Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 213-224
- 9 Hirata J, Kotani J, Aoyama M, Kashiwamura S, Ueda H, Kuroda Y, Usami M, Okamura H, Marukawa S. A role for IL-18 in human neutrophil apoptosis. *Shock* 2008; 30: 628-633
- 10 史薇, 辜金莲, 曾峥, 黎钟燕, 朱人敏, 张晓华. 白介素-18在实验性重症急性胰腺炎肺损伤中的作用. *现代消化及介入诊疗* 2009; 14: 223-227
- 11 Wereszczynska-Siemiatkowska U, Mroczko B, Siemiatkowski A. Serum profiles of interleukin-18 in different severity forms of human acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1097-1102
- 12 Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Beger HG. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001; 29: 1556-1562

编辑 张姗姗 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32 400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5 500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)