

## • 研究报告 •

核转录因子- $\kappa$ B 在大鼠重症急性胰腺炎中的表达

薛育政 刘宗良 黄中伟 黄介飞 沈雁波 肖明兵 陆静贤

【关键词】 胰腺炎, 急性, 重症; 核转录因子- $\kappa$ B; 半定量逆转录-聚合酶链反应; 全身炎症反应综合征

重症急性胰腺炎(SAP)病死率较高,目前尚无特异性治疗措施。近年来研究认为,包括肿瘤坏死因子、白细胞介素、血小板活化因子、磷脂酶 A<sub>2</sub>、花生四烯酸代谢产物、内皮素等细胞因子、趋化因子、黏附分子和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)在内的炎症介质上调,参与了SAP的发病及病情进展过程,是导致SAP高病死率的原因之一<sup>[1-5]</sup>。已证实核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在细胞内调控多种炎症介质转录过程中发挥了关键作用,并参与了SAP炎症介质作用的调控<sup>[6]</sup>。NF- $\kappa$ B通常以由NF- $\kappa$ B/Rel家族组成的同源或异源复合物形式存在,其中最常见的是p65/p50异二聚体,也是其活性的主要形式<sup>[7]</sup>。因此,本实验拟通过研究NF- $\kappa$ B p65在SAP大鼠胰腺组织中的表达,探讨NF- $\kappa$ B在SAP中所起的作用及其可能机制。

## 1 材料与与方法

1.1 实验分组和动物模型制备:雄性清洁级SD大鼠48只,体重250~280g,按随机数字表法分为生理盐水对照组(NS组)和SAP组,各组又分为3、6和12h3个亚组,每个亚组8只大鼠。参照Lankisch等<sup>[8]</sup>介绍的方法,向胆胰管内注入质量分数为3.5%的牛磺胆酸钠1ml/kg制备SAP模型。NS组仅向胆胰管注射与牛磺胆酸钠等量的无菌生理盐水。分别于制模后3、6和12h用乙醚麻醉大鼠后,先以心脏穿刺取血3~5ml,

基金项目:江苏省社会发展科技计划项目(BS2005623);南通市社会发展计划项目(S30055)

作者单位:214041 江苏,无锡市第三人民医院消化内科(薛育政,刘宗良);南通大学附属医院急诊科(黄中伟),消化内科(黄介飞,沈雁波,肖明兵,陆静贤)

通讯作者:黄中伟,硕士生导师,副教授,副主任医师,主要从事急性胰腺炎发病机制及治疗研究(Email:drhuangzw@163.com)

作者简介:薛育政(1974-),男(汉族),江苏省人,医学硕士,主治医师(Email:xueyz001@163.com)。

4℃下3000×g离心15min,取血清于-70℃下保存;然后处死大鼠,取胰腺组织,进行相关指标检测。

## 1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清淀粉酶活性测定:采用酶法,在全自动生化分析仪上测定。

1.2.2 组织病理学检查:胰腺组织用体积分数为4%的中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,按Rongione等<sup>[9]</sup>标准进行组织学评分。

1.2.3 胰腺组织NF- $\kappa$ B p65的表达:免疫组化应用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(streptavidin peroxidase, SP)检测,操作步骤按说明书进行。所有切片均由两位病理科医师独立阅片后综合评定,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。NF- $\kappa$ B p65定位于细胞浆内,阳性染色为棕黄色或棕褐色。

1.2.4 胰腺组织NF- $\kappa$ B p65 mRNA检测:采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测。用一步法总RNA提取试剂(Trizol)提取胰腺组织中的总RNA,取每个标本的总RNA 2 μg进行逆转录并合成cDNA,采用PCR扩增NF- $\kappa$ B p65,同时扩增三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照物,每个标本至少重复3遍。NF- $\kappa$ B p65引物序列:5'-GACCTGGAGCAAGCCATTAG-3'(正义链);5'-ATCAGAAGGCCGCCG AAGC-3'(反义链),扩增产物长度为459 bp;GAPDH引物序列:5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'(正义链);5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGCCAT-3'(反义链),扩增产物长度为240 bp。PCR条件:94℃预变性3 min;94℃40 s,58℃30 s,72℃45 s,共30个循环;最后72℃延伸10 min。扩增产物在质量分数为1.5%的琼脂糖凝胶上电泳分离,并在凝胶成像系统中计算每个标本扩增产物与GAPDH的积分光密度比值。

1.3 统计学处理:所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用Stata 7.0统计软件,以*t*检验和单因素方差分析对各组

均数进行显著性检验,相关分析采用Spearman相关分析。*P*<0.05为差异有统计学意义。

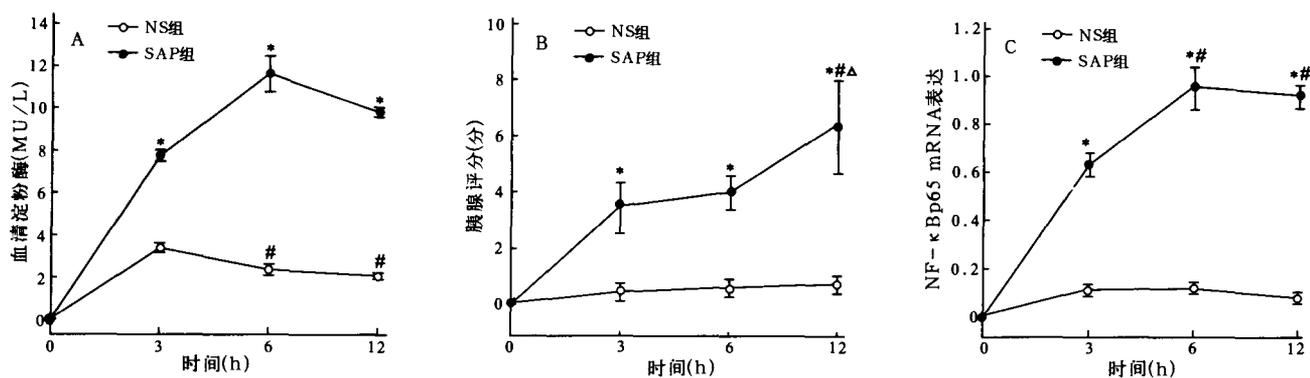
## 2 结果

2.1 血清淀粉酶测定结果(图1A):SAP组3h血清淀粉酶水平较NS组明显升高,6h达到高峰,12h稍有下降;NS组血清淀粉酶于3h达到高峰,6h开始下降,12h已降至正常水平。SAP组与NS组组间同时间点比较差异均有显著性(*P*均<0.05);同时NS组及SAP组内各时间点比较差异也均有显著性(*P*均<0.05)。

2.2 大鼠胰腺组织病理学变化(图1B,彩色插页图2):NS组早期胰腺组织可见部分间质水肿,有少量炎性细胞浸润,偶见点状出血,极少量腺泡细胞坏死,随时间延长,胰腺组织损害明显减轻。SAP组胰腺组织于制模后3h可见明显的小叶间质水肿,片状出血,炎性细胞浸润,部分腺泡细胞变性坏死;6h和12h可见大量炎性细胞浸润,片状出血,胰腺小叶结构破坏,大量腺泡细胞坏死。两组组内各时间点胰腺组织学评分比较差异均有显著性(*P*均<0.05),SAP组与NS组组间相同时间点比较差异也均有显著性(*P*均<0.05)。

2.3 胰腺组织免疫组化染色结果(彩色插页图3):NS组各时间点可见胰腺组织内NF- $\kappa$ B p65少量表达;SAP组3h可见胰腺腺泡细胞NF- $\kappa$ B p65明显活化,细胞浆及核呈棕黄色或棕褐色,6h表达达高峰,12h有所回落。SAP组各时间点NF- $\kappa$ B p65表达均较NS组高。

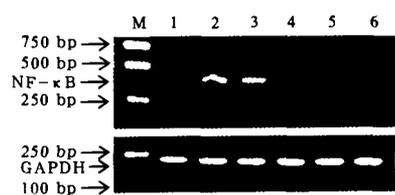
2.4 胰腺组织NF- $\kappa$ B p65 mRNA的表达(图1C,图4):RT-PCR检测显示NF- $\kappa$ B p65在NS组和SAP组中均有表达,但SAP组表达明显强于NS组,两组相同时间点相比差异均有显著性(*P*均<0.05);SAP组6h和12h表达均强于3h(*P*均<0.05),而NS组各时间点间表达强度比较差异均无显著性(*P*均>0.05)。



注:与 NS 组比较: \* $P < 0.05$ ; 与本组 3 h 比较: # $P < 0.05$ ; 与本组 6 h 比较:  $\Delta P < 0.05$

图 1 血清淀粉酶、胰腺组织学评分和 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的积分光密度比值

Figure 1 Amylase, index of pancreatic damage and NF- $\kappa$ B p65 mRNA expression relative GAPDH



M 为 Marker; 1~3 为 SAP 组 3、6 和 12 h; 4~6 为 NS 组 3、6 和 12 h

图 4 胰腺组织 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达  
Figure 4 Expression of NF- $\kappa$ B p65 mRNA in pancreatic tissues

2.5 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达与胰腺组织学评分、血清淀粉酶的相关性分析(表 1): NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达与胰腺组织学评分、NF- $\kappa$ B p65 mRNA 与血清淀粉酶水平、血清淀粉酶水平与胰腺组织学评分间均呈正相关。

表 1 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 与各指标的相关性分析

相关分析指标	r 值	P 值
NF- $\kappa$ B p65 mRNA 与胰腺组织学评分	0.90	0.041
NF- $\kappa$ B p65 mRNA 与血清淀粉酶水平	0.82	0.048
血清淀粉酶水平与胰腺组织学评分	0.91	0.041

### 3 讨论

SAP 发病机制复杂,病情凶险,多数患者可发展成为全身炎症反应综合征(SIRS),最终导致多器官功能衰竭(MOF)甚至死亡<sup>[10,11]</sup>。

NF- $\kappa$ B 是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子,参与多种疾病的病理生理过程,在机体的免疫和炎症反应以及凋亡调控等方面发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。研究证实,SAP 时 NF- $\kappa$ B 在其发病的早期即被激活,可诱导细胞因子、趋化因子、生长因子、氧自由基、iNOS 和 C-反应蛋白(CRP)等表达,促进局部炎

症病变向全身多系统、多器官发展<sup>[12]</sup>,从而导致 SIRS 和多器官功能障碍综合征(MODS)的发生<sup>[10,13]</sup>。

本研究结果表明,诱导 SAP 3 h 后,胰腺组织中 NF- $\kappa$ B p65 表达即开始上调,6 h 达到高峰,12 h 有所下降,但仍显著高于正常水平,与 Gukovsky 等<sup>[14]</sup>研究结果基本相同。有研究表明,急性胰腺炎时引起胰腺和肺损伤,致使血清淀粉酶、细胞因子及胰腺和肺组织 NF- $\kappa$ B 的表达明显增高<sup>[15]</sup>,该结果与本研究结果基本相同。NF- $\kappa$ B 过度表达与胰腺组织及腺泡细胞损伤程度有明显的正相关性。因此,NF- $\kappa$ B 参与了 SAP 发病及病变进展过程,可能是 SIRS 和 MODS 发生的原因之一。抑制 NF- $\kappa$ B 过度表达可能减轻 SAP 胰腺组织损伤的程度,值得进一步研究。

#### 参考文献:

- Norman J. The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis[J]. Am J Surg, 1998, 175(1): 76-83.
- 王白云,潘承恩,刘绍浩. 炎性介质在重症急性胰腺炎发病机制中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(5): 312-313.
- Schmid R M, Adler G. Cytokines in acute pancreatitis — new pathophysiological concepts evolve[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999, 11(2): 125-127.
- 张红,李永渝. 急性胰腺炎的发病机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(2): 121-125.
- Bhatia M, Brady M, Shokui S, et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis[J]. J Pathol, 2000, 190(2): 117-125.
- 裴红红,杨正安,秦兆寅. 核因子- $\kappa$ B 与急性胰腺炎[J]. 中国危重病急救医学,

2001, 13(4): 248-249.

- Ghosh S, May M J, Kopp E B. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses[J]. Annu Rev Immunol, 1998, 16: 225-260.
- Lankisch P G, Ihse I. Bile-induced acute experimental pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 1987, 22(3): 257-260.
- Rongione A J, Kusske A M, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. Gastroenterology, 1997, 112(3): 960-967.
- 杜微,王红,张淑文,等. 全身炎症反应综合征与急性胰腺炎病情严重程度关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(5): 279-281.
- 黄中伟,唐建忠,陈瑜,等. 还原型谷胱甘肽对急性胰腺炎患者多脏器功能的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(11): 673-674.
- Chen X, Ji B, Han B, et al. NF- $\kappa$ B activation in pancreas induces pancreatic and systemic inflammatory response[J]. Gastroenterology, 2002, 122(2): 448-457.
- 刘振桐. 核因子- $\kappa$ B 与全身炎症反应综合征[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 631-632.
- Gukovsky I, Gukovskaya A S, Blinman T A, et al. Early NF- $\kappa$ B activation is associated with hormone-induced pancreatitis[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 1): G1402-1414.
- 刘牧林,刘瑞林,马良龙. 核转录因子- $\kappa$ B 在大鼠急性胰腺炎发病机制中的作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 434-435.

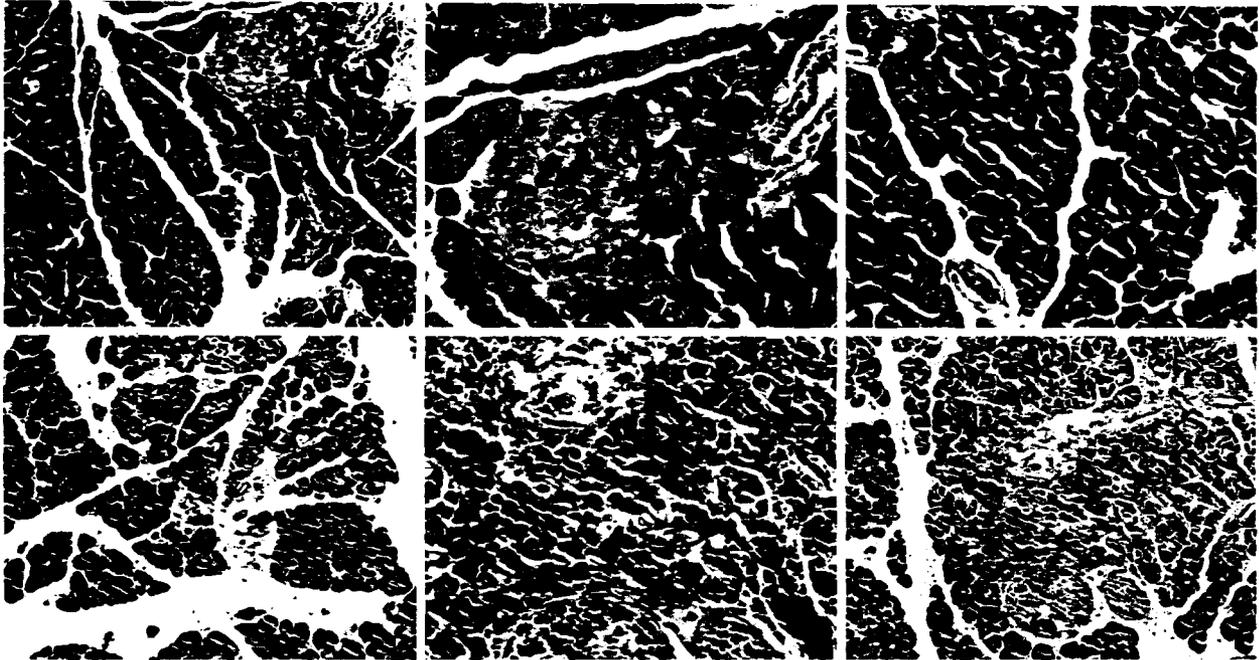
(收稿日期: 2005-11-29)

修回日期: 2007-02-28)

(本文编辑: 李银平)

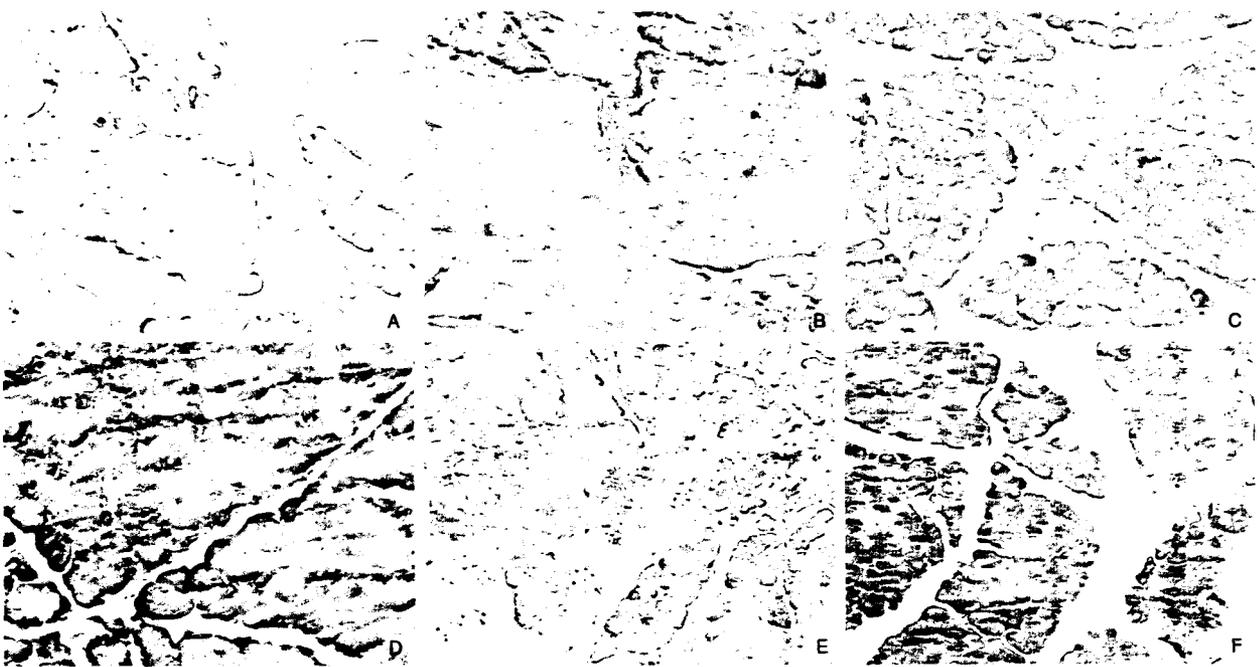
## 核转录因子- $\kappa$ B在大鼠重症急性胰腺炎中的表达

(正文见176页)



A: NS 组 3 h, B: NS 组 6 h, C: NS 组 12 h, D: SAP 组 3 h, E: SAP 组 6 h, F: SAP 组 12 h

图2 胰腺组织病理学变化(HE,  $\times 200$ )  
Figure 2 Pathological change of pancreatic tissues (HE,  $\times 200$ )



A: NS 组 3 h, B: NS 组 6 h, C: NS 组 12 h, D: SAP 组 3 h, E: SAP 组 6 h, F: SAP 组 12 h

图3 NF- $\kappa$ B p65在胰腺组织中的表达(免疫组化,  $\times 200$ )  
Figure 3 Expression of NF- $\kappa$ B p65 in pancreatic tissues (immunohistochemistry,  $\times 200$ )