

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.027

白细胞介素-6在急性胰腺炎中的作用及其机制研究*

浦清^{1,2} 华玮¹ 居培红¹ 戴晓勇¹ 周季兰¹ 李铮¹

(1 上海市杨浦区中心医院内科急诊 上海 200090; 2 同济大学附属杨浦医院内科急诊 上海 200090)

摘要 目的:明确白细胞介素-6(IL-6)在小鼠急性胰腺炎中的作用及其机制研究。**方法:**通过胰胆管结扎的方法诱导小鼠急性胰腺炎;分离小鼠胰腺腺泡细胞。采用ELISA方法检测胰腺组织或腺泡细胞裂解物中的细胞因子;通过western blot分析检测组织或细胞中IL-6或ERK表达。**结果:**IL-6浓度在胰腺组织和腺泡细胞中显著增加($P<0.05$)。在离体原代小鼠腺泡细胞,TNF- α 刺激增加IL-6释放($P<0.05$);与此同时,IL-6刺激可增加其它促炎性细胞因子的释放,两者都涉及ERK MAP激酶通路。黄酮类化合物木犀草素抑制IL-6刺激引起白细胞介素-6(IL-6)和人巨嗜细胞激活蛋白-1(CCL2/MCP-1)释放。最后进一步证实,IL-6激活人胰腺组织中的ERK。**结论:**IL-6在急性胰腺炎中增加,激活炎症通路并加重急性胰腺炎。

关键词:白细胞介素-6;急性胰腺炎;细胞外调节细胞激酶

中图分类号:R657.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)02-308-05

The Interleukin-6 is Involved in Acute Pancreatic in Mice and Its Mechanisms*

PU Qing^{1,2}, HUA Wei¹, JU Pei-hong¹, DAI Xiao-yong¹, ZHOU Ji-lan¹, LI Zheng¹

(1 Department of Emergency, the Central Hospital of Yangpu District of Shanghai, Shanghai, 200090, China;

2 Yangpu Hospital of Tongji University, Shanghai, 200090, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether interleukin-6 (IL-6) exacerbates acute pancreatic inflammation in mice and its mechanisms. **Methods:** The pancreatic acinar cells were isolated from mice with duct ligation-induced acute pancreatitis. ELISA was used to measure cytokines in pancreas tissue or acinar cells lysates, and western blot analysis was applied to detect the expression of IL-6 or ERK. **Results:** IL-6 concentration was increased in the pancreas and acinar cell ($P<0.05$). In isolated mouse pancreatic acinar cells, TNF- α stimulation increased IL-6 release while IL-6 stimulation increased release of proinflammatory cytokine, and both involved the ERK MAP kinase pathway. The flavonoid luteolin inhibited the release of IL-6-stimulated IL-6 and CCL2/MCP-1. Also, IL-6 activated ERK in human pancreatic tissue. **Conclusion:** IL-6 is induced in acute pancreatitis, activates acinar cell proinflammatory pathways and exacerbates acute pancreatic inflammation.

Key words: Interleukin-6; Acute pancreatic; ERK

Chinese Library Classification(CLC): R657.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-308-05

前言

急性胰腺炎(acute pancreatic, PD)起病急、进展快,常常并发多种器官功能障碍综合症而造成患者死亡^[1]。然而,PD的发病机制目前还不清楚。白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)是白介素家庭成员之一,在特定的情况下产生,比如:慢性炎症、细胞死亡和自身免疫失调^[2]。IL-6的表达是通过调节有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)、胞外调节蛋白激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、核转录因子核因子 κ B(NF- κ B)和激活蛋白-1(AP-1)^[4]。IL-6已经被证实在肺和肠炎炎症性疾病中发挥作用^[5,6]。越来越多的证据表明,IL-6加重溃疡结肠炎^[7,8]。近期研究表明,IL-6在慢性胰腺炎纤维化中发挥作用^[9];然而,IL-6在PD诱导的炎症中作用仍未阐明,胰腺腺泡细胞对IL-6刺激反应

以及IL-6是否加剧PD进展目前仍然不清楚。因而,本研究利用一种新颖的小鼠胰胆管结扎诱导的PD进行相关的研究,拟探讨IL-6在小鼠PD中的作用及其机制^[2]。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的人胰腺腺组织来自一位42岁男性患者,因慢性胰腺炎急性发作而行胰腺远端切除术(签署知情同意)。术前CT显示只有萎缩但无钙化,囊性病变或导管扩张。取出后迅速将新鲜的胰腺在培养基中快速切成小片段,并在平衡液中孵育2 h,然后100 ng/mL IL-6刺激6 h,进行Western blot检测。

动物雄性C57BL/6小鼠购自上海南方模式生物科技发展有限公司,许可证号:SCXK(沪)2014-0058,体重30~50 g,自由

* 基金项目:上海市自然科学基金项目(13ZR1318932)

作者简介:浦清(1972-),女,主治医师,主要研究方向:内科急诊,电话:021-55827155, E-mail: liuljshzh@163.com

(收稿日期:2016-06-20 接受日期:2016-07-10)

饮水和进食。

试剂细胞培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);反转录试剂盒(美国 thermo 公司);TaqMan 探针由上海基英生物技术有限公司合成;IL-6、ERK、p-ERK 和 β -actin 抗体(美国 Santa cruz 公司);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pierce 公司);ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);戊巴比妥钠(上海哈灵生物试剂检测中心);腺病毒载体由上海沃森生物科技有限公司构建。

1.2 方法

1.2.1 导管结扎诱导急性胰腺炎 动物模型术前禁食 12 h 以上,C57BL/6 小鼠使用戊巴比妥钠麻醉后(40 mg/kg),于腹部正中开口,在十二指肠附近结扎胰胆管远端诱导 PD^[10]。Sham 组小鼠剖腹探查,但不结扎胰胆管。

1.2.2 分离小鼠胰腺腺泡细胞 取清洁级 C57BL/6 小鼠,戊巴比妥钠麻醉后,剖腹取胰腺组织,浸入含胎牛血清的组织培养液中,洗去血液和脂肪等。移入细胞分离液中制备细胞悬浮液,后离心,加入含胎牛血清的组织培养液,移入培养瓶中,放入 95%CO₂、5%O₂ 培养箱中。腺泡细胞用腺病毒转染 Ad.DN.ERK2(ERK 抑制剂)、Ad.EV(空载体)、Ad.GFP(绿色荧光蛋白)。

1.2.3 细胞因子检测 ELISA 方法检测 IL-6、IL-1、TNF- α 、CCL2/MCP-1 等。组织在 HEPES 裂解液中匀浆,通过 BCA 法测量蛋白浓度。按照 ELISA 试剂盒上的程序进行相关检测。

1.2.4 Western blot 分析 提取胰腺或腺泡细胞总蛋白,参照

试剂盒操作步骤严格进行操作。洗膜后用化学发光扫描系统检测并摄片,以 β -actin 为内参,应用图像分析软件 Quantity one 进行吸光度积分值分析。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 提取 Sham 组或胰胆管结扎小鼠 3、5、24h 后胰腺的总 RNA,以其中的 mRNA 作为模板,反转录生成 cDNA,TaqMan 探针针对小鼠特异性 IL-6 进行扩增;18S rRNA 作为对照,以 $\Delta\Delta Ct$ 方法定量 IL-6 表达。

1.2.6 免疫组化 小鼠麻醉,4%多聚甲醛灌注,然后将胰腺取出,30%蔗糖在 4℃ 脱水。把脱水后的胰腺放在预冷的铁片上,OCT 包埋。冷冻。冰冻切片,厚度为 10 μ m,贴片。免疫组化染色用亲和素-生物素技术进行。第一抗体为多克隆兔抗人 IL-6 IgG,二抗是生物素标记的山羊抗兔 IgG。正常兔 IgG 作为阴性对照。

1.3 统计学分析

计量数据以(均数 $\pm$ 标准差)($\bar{x}\pm s$)表示,多个实验组之间的比较采用单因素方差分析,组间差异性比较采用 Tukey-Kramer 分析,两组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆管结扎诱导急性胰腺炎

与 Sham 组相比,形态学研究证实胰胆管结扎 48 h 导致小鼠急性胰腺炎,在腺泡细胞间有大量中性粒细胞和巨嗜细胞浸润(图 1)。

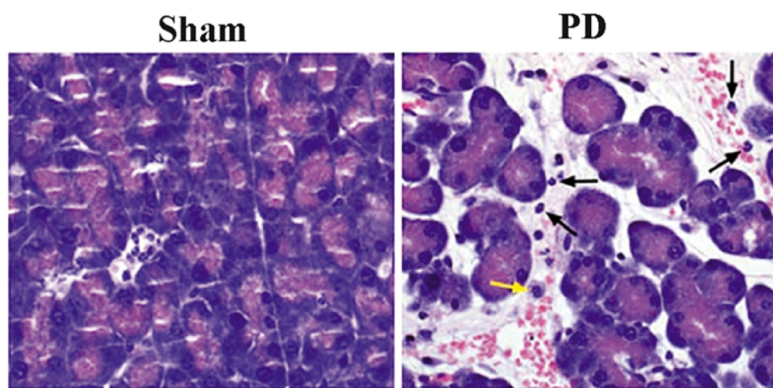


图 1 十二指肠远端胆管结扎导致急性胰腺炎性改变(黑色箭头:中性粒细胞,黄色箭头:巨嗜细胞)($\times 40$)

Fig.1 Distal bile-pancreatic duct ligation in the mouse results in acute inflammatory changes in the pancreas (black arrows: neutrophils, yellow arrow: macrophage($\times 40$)).

2.2 导管结扎增加胰腺 IL-6 表达

采用 ELISA 方法检测小鼠胰胆管结扎后胰腺 IL-6 蛋白浓度,结果显示 PD24、48、72 h。IL-6 蛋白浓度显著增加,特别是 PD 48 h($P<0.05$)(图 2A)。采用 RT-PCR 方法,IL-6 mRNA 水平在 PD 24 h 时胰腺中明显的高于 PD 3、5 h($P<0.05$);而 PD 3、5hIL-6 mRNA 水平无统计学差异(图 2B)。Western blot 结果也进一步证实 IL-6 蛋白水平在 PD 24 h 胰腺中显著提高($P<0.05$)(图 2C)。

2.3 导管结扎增加胰腺浸润细胞中 IL-6

免疫组化结果显示,小鼠 PD 48 h 时胰腺浸润细胞中 IL-6 蛋白表达增加(图 3)。这些为 IL-6 染色的浸润细胞最有可能是

肥大细胞,也有可能是中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

2.4 TNF- α 刺激胰腺腺泡细胞 IL-6 释放增加

TNF- α (10 ng/mL)刺激分离小鼠腺泡细胞 6 h。ELISA 结果显示,与未刺激对照组相比,TNF- α 显著增加腺泡细胞 IL-6 释放($P<0.05$)(图 4A)。然后评估特异性抑制 ERK 对 TNF- α 刺激引起 IL-6 释放的影响。结果证实,预先孵育 5MOI Ad.DN.ERK2(ERK 抑制剂)48h,抑制 TNF- α 刺激引起 IL-6 释放;对未刺激对照组中,ERK 抑制剂对 IL-6 释放无影响。这些结果表明,TNF- α 通过 ERK MAP 激酶途径刺激小鼠胰腺腺泡细胞释放 IL-6。

2.5 IL-6 刺激小鼠分离腺泡细胞

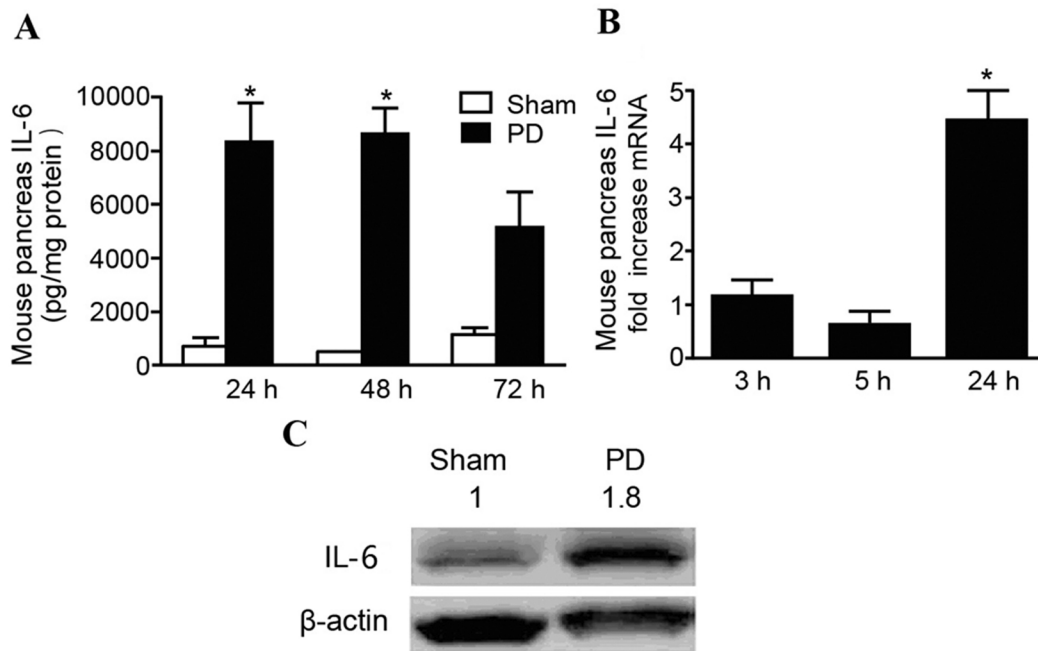


图2 胆管结扎诱导急性胰腺炎后 IL-6 增加。A:ELISA 分析表明胆管结扎后 IL-6 蛋白增加;B:逆转录 - 聚合酶链反应检测 IL-6 mRNA 水平;C: Western blot 表明胆管结扎后 IL-6 蛋白表达增加。*P<0.05。

Fig.2 Increased pancreatic IL-6 following ligation-induced acute pancreatitis. A: ELISA analysis showed increased IL-6 protein concentration following pancreatic duct ligation (PD) in comparison to the sham group in mouse pancreas homogenates at 24, 48 and 72 h. B: Pancreata of mice 3, 5, or 24 h following sham or PD were subjected to real-time PCR analysis. C: Immunoblots of pancreas homogenates showed increased IL-6 protein expression 48 h after PD compared to sham group in mice, *P<0.05.

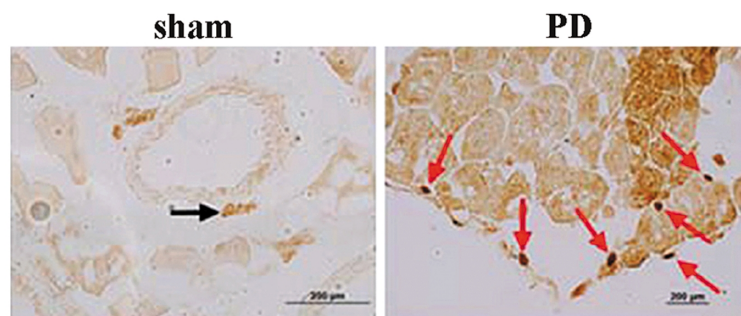


图3 胆管结扎诱导急性胰腺炎后 IL-6 表达增加(黑箭头: sham 组浸润细胞 IL-6 表达;红箭头:胆管结扎后 48 h 浸润细胞 IL-6 表达)(× 40)

Fig. 3 Increased IL-6 in infiltrating cells in the pancreas in ligation-induced acute pancreatitis. (Black arrows show IL-6 stained infiltrating cells in sham controls while red arrows show IL-6 stained infiltrating cells with increased IL-6 staining 48 h after PD)(× 40).

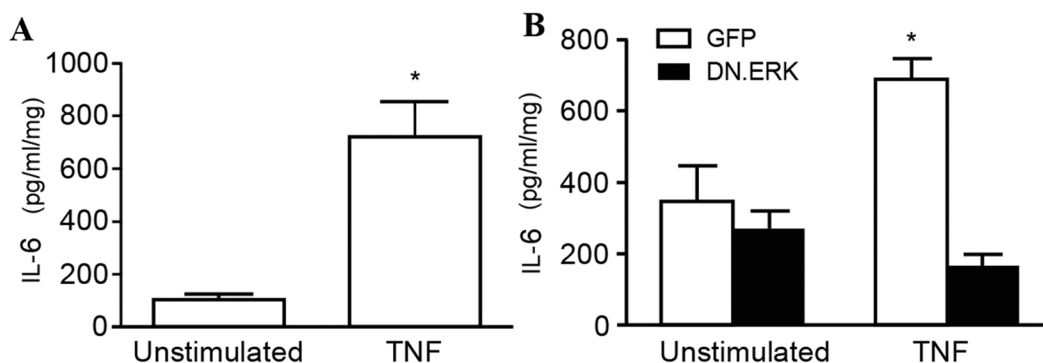


图4 TNF-α 刺激腺泡细胞 IL-6 释放,涉及 ERK MAP 激酶通路。A:TNF-α(10 ng/mL)刺激小鼠分离腺泡细胞 6 h 后 IL-6 释放增加;B:ELISA 分析预先转染 5 MOI EV 或 Ad.DN.ERK2 48 h,然后 IL-6(10 ng/mL)刺激小鼠分离腺泡细胞,P<0.05。

Fig.4 TNF-α stimulates IL-6 release from acinar cells, involving the ERK MAP kinase pathway. A: Isolated mouse acinar cells stimulated with TNF-α (10 ng/mL) for 6 h showed increased IL-6 release into the medium. B: Isolated mouse acinar cells were infected with 5 MOI of Ad.GFP or Ad.DN.ERK for 48 h and then stimulated with TNF-α(10 ng/mL) for 6 h before collecting medium for ELISA analysis, P<0.05.

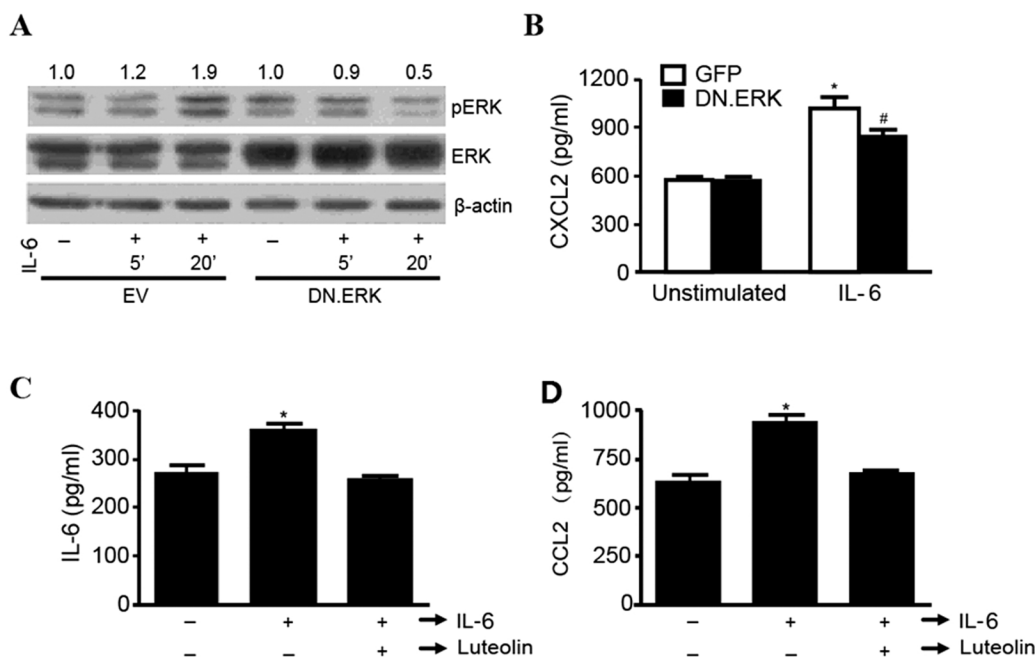


图 5 IL-6 刺激导致腺泡细胞 ERK 激活和细胞因子释放。A: IL-6 刺激导致小鼠分离腺泡细胞 ERK 激活, DN.ERK 抑制激活; B: IL-6 刺激导致小鼠分离腺泡细胞 CXCL2/MIP-2a 释放增加, DN. ERK 抑制增加; C: IL-6 释放; D: CCL2/MCP-1 释放, *P<0.05。

Fig.5 IL-6 stimulates ERK activation and cytokine release from mouse acinar cells. A: ERK is activated in mouse acinar cells following IL-6 stimulation, and this activation is inhibited by DN.ERK expression. B: IL-6 stimulation leads to increased CXCL2/MIP-2a release from mouse acinar cells which is inhibited by DN.ERK expression. C: IL-6 release and D: CCL2/MCP-1 release. *P<0.05.

预先转染 5 MOI EV 或 Ad.DN.ERK2 48h, 然后 IL-6 (100 ng/mL) 刺激小鼠分离腺泡细胞。Western blot 结果表明 IL-6 刺激促进 p-ERK 激活 (图 5A)。预先转染 5MOI Ad.GFP 或 Ad.DN.ERK2 48 h, 然后 IL-6 (100 ng/mL) 刺激小鼠分离腺泡细胞 6 h。ELISA 结果提示, 转染 Ad.GFP 腺泡细胞, IL-6 刺激后重组人生长调节致癌基因 MIP-2 (CXCL2/MIP-2α) 释放增加; 而转

染 Ad.DN.ERK2 抑制 CXCL2/MIP-2a 释放增加 (图 5B)。此外, IL-6 (25 ng/mL) 刺激小鼠分离腺泡细胞 6h, 利用 ELISA 检测白细胞介素 -6 (IL-6) 和人巨嗜细胞激活蛋白 -1 (CCL2/MCP-1) 释放。结果证实, IL-6 刺激增加 IL-6 和 CCL2/MCP-1 释放; 10 μM 木犀草素预先处理抑制 IL-6 和 CCL2/MCP-1 释放 (图 5C、D)。

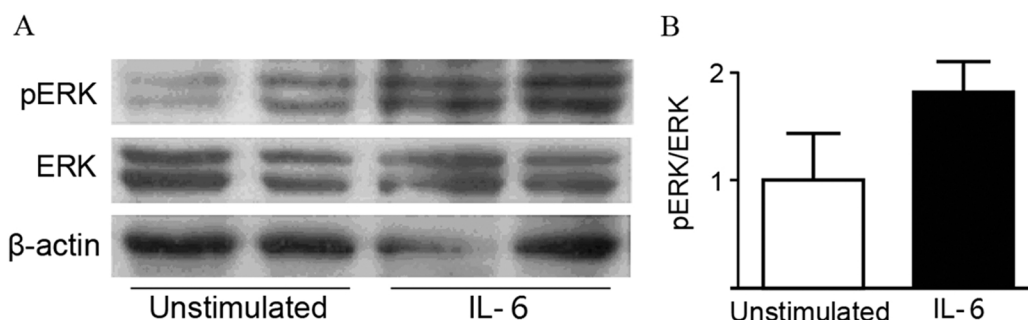


图 6 IL-6 激活人胰腺 ERK。A: western blot 分析人胰腺 p-ERK 表达; B: 定量分析 p-ERK 的变化。

Fig.6 IL-6 activates ERK in the human pancreas. A: Western blot shows ERK phosphorylation in the human pancreas; B: Quantitative analysis shows the change of ERK phosphorylation.

2.6 IL-6 激活人胰腺 ERK

IL-6 激活炎症通路的能力对人胰腺组织有重要的临床意义。因此, 本研究评价是否 IL-6 激活人胰腺组织 ERK。Western blot 结果显示 IL-6 刺激后 p-ERK 增加近 2 倍 (图 6)。

3 讨论

本研究发现 IL-6 可加重 PD。此外, 研究证实胰腺腺泡细胞受到刺激后 IL-6 释放增加; IL-6 刺激腺泡细胞可释放其它

细胞因子。除了在细胞和动物水平上发现 IL-6 刺激使 ERK 活性增加, 在人胰腺组织也进一步证实 IL-6 通过激活 ERK 发挥相应的作用。

IL-6 是 IL-1 家庭成员, 其在一些炎症中潜在作用引起研究者极大兴趣^[9]。国外研究发现无胆盐乙硫氨酸诱导的急性胰腺炎小鼠血清中 IL-6 浓度增加, 免疫组化染色显示腺泡细胞上 IL-6 表达增加^[10]。研究也证实 IL-6 在胰腺癌和慢性胰腺炎胰腺卫星细胞上表达^[7]。本研究发现 PD 胰腺中 IL-6 表达增加。

调查早期疾病的发病机制,重要的是明确诱导 IL-6 表达增加的诱因。IL-6 主要是由上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、肥大细胞和巨噬细胞表达^[3]。PD 胰腺增加的 IL-6 蛋白表达可能来源于胰腺腺泡细胞,也可能与基质细胞,血管内皮细胞和导管上皮细胞有关^[11]。尽管腺泡细胞持续表达 IL-6 已被证实,但以往的研究没有明确哪些激动剂刺激腺泡细胞释放 IL-6^[11]。本研究证实 TNF- α 刺激分离腺泡细胞增加 IL-6 释放。

TNF- α 是胰腺炎症的关键启动因子^[12],而 IL-6 在多个器官炎症的维持中发挥重要作用^[13,14]。TNF- α 刺激腺泡细胞引起 IL-6 释放增加在病症的发病机制中起重要作用。TNF- α 和 IL-1 β 通过激活 ERK 诱导 IL-6 的表达^[4]。本研究结果表明, TNF- α 通过调节 ERK MAP 激酶通路刺激腺泡细胞释放 IL-6。以往研究证实结扎诱导 PD 小鼠胰腺及肺 ERK 激活^[2]。本研究显示,IL-6 增加小鼠胰腺腺泡细胞 ERK 的激活和 CXCL2、MIP-2A、CCL2/MCP-1 和 IL-6 释放,特异性抑制 ERK 表达抑制 IL-6 诱导细胞因子的产生。总之,IL-6 刺激小鼠胰腺腺泡细胞增加细胞因子的产生,而 ERK MAP 激酶途径参与 IL-6 激活腺泡细胞炎症通路。

在本研究中,结果也证实黄酮类化合物木犀草素抑制 IL-6 诱导小鼠胰腺腺泡细胞释放 IL-6 和 CCL2/MCP-1。黄酮类化合物是常见的植物成分,具有抗炎、抗氧化作用和抗过敏作用^[15,16]。在蛙皮素诱导的 PD 中,类黄酮槲皮素预处理缓解疾病的严重程度^[17,18]。木犀草素被报道在脂多糖诱导的急性肺损伤中具有保护作用^[19,20]。因此,黄酮类化合物可能有潜在治疗 PD 的作用。

总之,本研究发现,IL-6 刺激胰腺腺泡细胞炎症途径,在刺激腺泡细胞和结扎诱导 PD、加重小鼠急性胰腺炎中发挥作用,并且 IL-6 刺激激活胰腺 ERK MAP 激酶。

参考文献(References)

- [1] Shi-Yun Lu, Xiu-Zhen Pan. Recent progress in understanding the pathogenesis of severe acute pancreatitis[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2011, 23(13): 2421-2425
- [2] Yuan Z, Meyerholz D, Williard D, et al. Systemic Inflammation With Multiorgan Dysfunction is the Cause of Death in Murine Pancreatic Duct Ligation-Induced Acute Pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2011, 140(5): S-1026
- [3] Koksai AR, Boga S, Alkim H, et al. Chemerin: a new biomarker to predict postendoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2016, 28(6): 714-721
- [4] Zhang C, Wang Y, Fu W, et al. A Meta-analysis on the Effect of Ulinastatin on Serum Levels of C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Asian Patients with Acute Pancreatitis[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2016, 20(3): 118-124
- [5] Ma P, Yu K, Yu J, et al. Effects of Nicotine and Vagus Nerve in Severe Acute Pancreatitis-Associated Lung Injury in Rats[J]. Pancreas, 2016, 45(4): 552-560
- [6] Staubli SM, Oertli D, Nebiker CA. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2015, 52(6): 273-283
- [7] Hong SS, Choi JH, Lee SY, et al. A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting the IL-6 Receptor β Subunit, Glycoprotein 130 [J]. J Immunol. 2015, 195(1): 237-245
- [8] Dai SR, Li Z, Zhang JB. Serum interleukin 17 as an early prognostic biomarker of severe acute pancreatitis receiving continuous blood purification[J]. Int J Artif Organs, 2015, 38(4): 192-198
- [9] Gorsky VA, Agapov MA, Khoreva MV, et al. The effect of lornoxicam on TLR2 and TLR4 messenger RNA expression and tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and interleukin-8 secretion in patients with systemic complications of acute pancreatitis. Pancreas, 2015, 44(5): 824-830
- [10] Samuel I, Yuan Z, Meyerholz DK, et al. Rapid Communication: A novel model of severe gallstone pancreatitis- Murine pancreatic duct ligation results in systemic inflammation and substantial mortality[J]. Pancreatology, 2010, 10: 536-544
- [11] Ouziel R, Gustot T, Moreno C, et al. The ST2 pathway is involved in acute pancreatitis: a translational study in humans and mice [J]. American Journal of Pathology, 2012, 180(6): 2330-2339
- [12] Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, et al. Inflammatory mediators in acute pancreatitis[J]. J Pathol, 2000, 190(2): 117-125
- [13] Chi DZ, Chen J, Huang DP. Influence of interleukin-1 β and interleukin-6 gene polymorphisms on the development of acute pancreatitis[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 975-980
- [14] Park J, Chang JH, Park SH, et al. Interleukin-6 is associated with obesity, central fat distribution, and disease severity in patients with acute pancreatitis[J]. Pancreatology, 2015, 15(1): 59-63
- [15] Lopez-Lazaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin[J]. Mini Rev Med Chem, 2009, 9(1): 31-59
- [16] Kang Xiao-long, He Cheng-hui, Xing Jian-guo, et al. Effects of Moldavica Total Flavone on Interleukin-6, 13, 17 and Tumor Necrosis Factor- α Levels in Asthma Rats [J]. The Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2013, 30(8): 839-842
- [17] Carvalho KM, Morais TC, de Melo TS, et al. The natural flavonoid quercetin ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis in mice[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(9): 1534-1539
- [18] Zechner D, Spitzner M, Müller-Graff T, et al. Diabetes increases pancreatitis induced systemic inflammation but has little effect on inflammation and cell death in the lung[J]. Int J Exp Pathol, 2014, 95(6): 411-417
- [19] Jen-pei, LEE, Yi-ching, et al. Protective Effects of Luteolin Against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Involves Inhibition of Mek/Erk And Pi3k/Akt Pathways In Neutrophils [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2010, 31(7): 831-838
- [20] Zhu Ping-ting, Bo Ping, Sun Yun, et al. Effect of TFSB on the Expression of PLTP, IL-6, CPR in ApoE Gene Knockout Mice [J]. Journal of China Medical University, 2011, 40(5): 394-396