

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.05.001

## · 基础研究 ·

## 白介素-17A 在小鼠慢性胰腺炎中的作用研究 \*

倪建波 胡国勇 万 荣 王兴鹏<sup>△</sup>

(上海交通大学附属第一人民医院消化内科 上海市胰腺疾病重点实验室 上海 200080)

**摘要 目的:**研究白细胞介素-17A 在小鼠慢性胰腺炎模型中的表达及其对小鼠星状细胞的影响。**方法:**建立雨蛙肽诱导的小鼠实验性慢性胰腺炎动物模型,利用实时荧光定量 PCR、ELISA、免疫组化和 Western-blot 等手段检测白介素-17A 在雨蛙肽诱导的小鼠慢性胰腺炎模型中的表达变化及免疫活性。用重组白介素-17A 作用于小鼠胰腺星状细胞,检测其对星状细胞活化的作用,并进一步探究其对促胰腺纤维化炎症因子白介素-6、白介素-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$  在 mRNA 水平的表达变化。**结果:**慢性胰腺炎胰腺组织中白介素-17A 受体 IL-17RA 及 IL-17RC mRNA 水平的表达较正常胰腺明显升高,慢性胰腺炎小鼠胰腺组织中 IL-17A 蛋白水平较正常小鼠明显升高,CP 小鼠血清中 IL-17A 蛋白水平( $56.40 \pm 10.50$  pg/L)较 NC 组( $27.88 \pm 5.74$  pg/L)亦明显升高,IL-17A 在正常胰腺组织中鲜有表达( $8.9 \pm 2.72\%$ ),而在 CP 组织中呈强阳性表达( $55.84 \pm 5.71\%$ ),其免疫活性主要定位于间质炎性细胞及导管样复合体中;重组白介素-17A 可促进小鼠星状细胞活化,并直接诱导星状细胞表达白介素-6、白介素-1 $\beta$  以及 TGF- $\beta$  等促纤维化细胞因子。**结论:**白介素-17A 在雨蛙肽诱导的小鼠慢性胰腺炎模型中表达上调,并可能通过诱导小鼠星状细胞表达促炎细胞因子白介素-6、白介素-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ ,促进胰腺星状细胞活化以及胰腺纤维化。

**关键词:**白介素-17A;慢性胰腺炎;胰腺星状细胞;胰腺纤维化

**中图分类号:**R-33;R576;R364.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)05-801-05

## Involvement of Interleukin-17A in Caerulein-induced Chronic Pancreatitis in Mice\*

NI Jian-bo, HU Guo-yong, WAN Rong, WANG Xing-peng<sup>△</sup>

(Department of Gastroenterology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine,  
Shanghai Key Laboratory of Pancreatic Diseases, Shanghai, 200080, China)

**ABSTRACT Objective:** Interleukin (IL)-17A plays a vital role in various inflammatory diseases such as chronic inflammation and autoimmune diseases including autoimmune pancreatitis, but the role of IL-17A in chronic pancreatitis has not been clarified. This study aimed to study the role of IL-17A in experimental chronic pancreatitis (CP) induced by caerulein in mice. **Methods:** We firstly examined the expression levels of IL-17A during caerulein-induced CP in vivo in mice by qRT-PCR, Western blotting, ELISA, and immunoreactivity by immunohistochemistry. The effects of IL-17A on pancreatic stellate cells (PSCs) were further investigated in vitro using recombinant IL-17A (rIL-17A). **Results:** Expression of IL-17RA and IL-17RC mRNAs were remarkably upregulated during CP, IL-17A protein level in pancreatic tissues was increased after stimulation with caerulein, the serum concentration of IL-17A was also significantly elevated in CP mice ( $56.40 \pm 10.50$  pg/L) compared with NC group ( $27.88 \pm 5.74$  pg/L). Immunoreactivity of IL-17A was rarely examined in normal pancreatic tissue ( $8.9 \pm 2.72\%$ ), but the positive cells were remarkably increased in CP mice ( $55.84 \pm 5.71\%$ ), which were mainly localized in interstitial inflammatory cells and tubular complexes. Furthermore, rIL-17A promoted activation of pancreatic stellate cell in vitro, and directly stimulated expression of several profibrotic genes, including IL-6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  in PSCs. **Conclusion:** IL-17A plays a role in activating PSCs by inducing the expression of Chronic pancreatitis mediators, and probably promote pancreatic fibrosis during experimental chronic pancreatitis.

**Key words:** Interleukin-17A; Chronic pancreatitis; Pancreatic stellate cell; Pancreatic fibrosis

**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R576; R364.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)05-801-05

\* 基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81400663);国家自然科学基金面上项目(81400663)

作者简介:倪建波(1987-),博士,主治医师,主要研究方向:急性胰腺炎和慢性胰腺炎的基础及临床研究,

电话:021-63240090, E-mail: nevsnev@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:王兴鹏,主任医师,博士生导师,主要研究方向:胰腺疾病的基础与临床研究,

电话:021-63240090, E-mail: richardwangxp@163.com

(收稿日期:2016-08-27 接受日期:2016-09-15)

## 前言

慢性胰腺炎(CP)是一种胰腺组织进展性炎症性疾病,胰腺纤维化、腺泡和胰岛细胞萎缩是其主要病例特征,可致胰腺腺内、外分泌功能的部分或全部丧失<sup>[1]</sup>。大量实验研究证实,胰腺星状细胞(PSC)的活化在胰腺纤维化进程中扮演了极其重要的作用。PSC 存在于胰腺小叶间以及腺泡周围,正常的 PSC 处于静止状态,当胰腺收到损伤时各种刺激因子可使 PSC 发生激活,PSC 能自身合成自身合成 TGF- $\beta$ 1、IL-1 $\beta$  等炎症因子,形成慢性炎症微环境,并进一步刺激 PSC 合成分泌大量细胞外基质,逐步促进胰腺纤维化的发生<sup>[2-4]</sup>。

白细胞介素 (IL)-17 家族包含 IL-17A-F 共 6 个成员<sup>[5,6]</sup>, IL-17A 是最受关注的标志性 Th17 细胞因子,在慢性炎症性疾病、自身免疫性疾病的病理过程中扮演着关键的作用<sup>[7]</sup>。Th17 已有研究发现,IL-17A 可诱导成纤维细胞、中性粒细胞等表达促炎细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  等<sup>[8,9]</sup>。本课题组前期研究发现,IL-17A 在急性坏死性胰腺炎过程中扮演了重要的角色,可直接诱导胰腺腺泡细胞坏死<sup>[10]</sup>。同时,我们也证实了 IL-23/IL-17A 在急性胰腺炎患者血清中明显表达升高,并与急性胰腺炎严重程度相关<sup>[11]</sup>。Loos 等发现,TH17 细胞与 II 型自身免疫性胰腺炎有着密切的联系,TH17 细胞可能通过 IL-17A 募集中性粒细胞到胰腺腺泡细胞以及导管细胞,参与自身免疫性胰腺炎的病理过程<sup>[12]</sup>。目前尚未有研究报道 IL-17A 在慢性胰腺炎中扮演的角色。有意思的是,我们发现 IL-17A 在牛磺胆酸钠诱导小鼠急性坏死性胰腺炎后第 14 d 仍有持续表达,并于胰腺间质细胞中呈强阳性<sup>[10]</sup>。Shimada 等报道,IL-17A 能通过诱导激活 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 途径,刺激人胰腺成纤维细胞分泌 IL-6<sup>[13]</sup>。因此,我们推测 IL-17A 可能参与了慢性胰腺炎的病理过程。本课题组建立了雨蛙肽诱导的小鼠慢性胰腺炎模型,旨在探讨 IL-17A 在慢性胰腺炎中的表达及对胰腺形状细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雄性 C57/B6 小鼠购自上海 SLAC 实验动物中心。体重 22-25 g 的清洁级小鼠,4-6 w,体重为 22-25 g。大鼠饲养为清洁级,通风环境,26℃的恒温环境。所有关于动物的操作得到上海市科学技术委员许可(ID: SYXK 2007-0006)。雨蛙肽、胶原酶及  $\beta$ -actin 抗体购自 Sigma-Aldric 公司,小鼠 IL-17A、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TGF- $\beta$ 1 抗体购自 Santa cruz 公司。逆转录试剂盒和 SYBR Green PCR Master MIX PCR 试剂盒购自宝生物工程有 限公司。IL-17A Elisa 试剂盒购自 R & D 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 小鼠慢性胰腺炎模型的建立参考本课题组前期方法建立雨蛙肽诱导的小鼠慢性胰腺炎模型<sup>[14]</sup> 实验分为两组,在进行实验前,小鼠禁食不禁水 12 h。实验组小鼠予雨蛙肽(50  $\mu$ g/kg)腹腔注射(每隔 1 h 注射 1 次,共注射 6 次),每周 3 回,连续 4 w。对照组小鼠予注射同等剂量及注射频率的生理盐水。第 4 w,麻醉小鼠,取胰腺组织。

1.2.2 原代胰腺腺泡细胞及星状细胞分离 参照本课题组前期等密度梯度离心法分离原代小鼠胰腺星状细胞<sup>[15]</sup>。新鲜分离的星状细胞培养与含 10%血清及 1%双抗(Gibco)的培养基中,分为静止组(原代分离后 24 h 即终止);5 d 组:星状原代培养 5 d 后终止,每天更换培养液;5 d+rIL-17A 组:自分离后 24 h 起予重组小鼠 IL-17A(Peprotech 公司,200 ng/mL)持续处理 5 d,每天更换培养液。终止培养后,提取星状细胞 mRNA 及蛋白。

1.2.3 胰腺组织学评估 胰腺组织样本固定于 4%多聚甲醛,不同浓度酒精梯度脱水后进行石蜡包埋,将胰腺组织切成 5  $\mu$ m 切片,二甲苯脱蜡后酒精梯度水化,用伊红及苏木素染色。

1.2.4 胰腺胶原纤维面积测定 采用 MASSON 染色:(1)石蜡切片二甲苯脱蜡;(2)不同浓度酒精梯度脱水;(3)苏木素染液 5 min;(4)流水洗;(5)1%盐酸酒精分化,流水冲洗、蓝化;(6)用丽春红染液 5 min;(7)0.2%冰醋酸溶液短洗;(8)1%磷钼酸水溶液 3 min;(9)0.2%冰醋酸溶液短洗;(10)甲苯胺蓝染液染色 3 min;(11)0.2%冰醋酸溶液短洗;(12)用无水乙醇脱水,二甲苯透明,封片。显微镜下观察。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used for qPCR analysis

| Genes        | Primers                           | Size (bp) | Annealing Temperature, $^{\circ}$ C |
|--------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| IL-17A       | F: 5'-TTTAACCTCCCTTGCGCAAAA-3'    | 165       | 60                                  |
|              | R: 5'-CTTTCCCTCCGCATTGACAC-3'     |           |                                     |
| IL-17RA      | F: 5'-CGGAGAATTAGTCCCTGTGTTG-3'   | 224       | 60                                  |
|              | R: 5'-GAACAGTCACTTCATACTCCTGG-3'  |           |                                     |
| IL-17RC      | F: 5'- TTCTGCGGTATTTGACTGTTTCG-3' | 136       | 60                                  |
|              | R: 5'- GTCCCGGACTTCAAGACCC-3'     |           |                                     |
| IL-1 $\beta$ | F: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG -3'  | 116       | 60                                  |
|              | R: 5'-TGGATGCTCTCATCAGGACAG -3'   |           |                                     |
| IL-6         | F: 5'- CCAAGAGGTGAGTGCTTCCC-3'    | 154       | 60                                  |
|              | R: 5'- CTGTTGTTCACTCTCTCCCT-3'    |           |                                     |
| TGF- $\beta$ | F: 5'- TCTGCATTGCACTTATGCTGA -3'  | 100       | 60                                  |
|              | R: 5'- AAAGGCGGATCTAGTGATGGA -3   |           |                                     |
| GAPDH        | F: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3'     | 123       | 60                                  |
|              | R: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA -3' |           |                                     |

**1.2.5 实时荧光定量 PCR** 利用盐酸胍/苯酚/氯仿方法抽提胰腺组织以及细胞总 RNA。利用 SuperScript II 试剂盒 (Fermentas) 把 RNA 逆转录成 cDNA, 引物序列见表 1。实时荧光定量 PCR 用 ABI Prism 7900HT 系统检测 (Applied Biosystems)。GAPDH 作为内参。利用  $\Delta\Delta CT$  值计算基因表达水平变化的倍数。

**1.2.6 蛋白质免疫印迹 (Western-blot)** 液氮或  $-80^{\circ}\text{C}$  保存的小鼠胰腺组织迅速用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂及 PMSF) 在液氮中研磨后超声裂解, 然后于  $4^{\circ}\text{C}$   $10000\times g$  离心 15 min 后, 保留上清, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度 (Pierce) 后加 1/5 体积  $5\times$  蛋白上样缓冲液后,  $100^{\circ}\text{C}$  水浴煮沸 5-10 min。按  $60\mu\text{g}$  蛋白上样, 浓缩胶电压 80V, 分离胶电压 120V 进行 SDS-PAGE 分析 (Bio-Rad)。用 PVDF 膜 ( $0.22\mu\text{m}$ ) 200 mA 恒流湿转 40 min 后, 常温下用 5% 牛奶封闭 1 h。兔抗 IL-17A 多克隆抗体 (Santa Cruz, 1:500 稀释) 或小鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (Sigma, 1:2000 稀释) 于  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。TBS-T 洗膜  $5\text{ min}\times 4$  次后, 用羊抗兔或羊抗鼠 IgG-HRP 二抗 (Santa Cruz, 1:2000 稀释), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜  $5\text{ min}\times 4$  次后, 用 ECL 检测系统 (Santa Cruz) 于暗室显影、定影, 观察实验结果。Western blot 结果用 Quantity One 软件进行灰度值相对定量分析。

**1.2.7 酶联免疫吸附 (ELISA)** 小鼠血清中的 IL-17A 含量用 ELISA 试剂盒检测 (R & D)。

**1.2.8 免疫组化** 石蜡包埋的胰腺组织切成  $5\mu\text{m}$  厚度切片,

用二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 用 EDTA ( $1\text{ mM}$ ; pH 8.0) 微波修复 15 min。3% 过氧化氢室温孵育 20 min, 以去除过氧化物酶活性。5% BSA 封闭 30 min, IL-17A 一抗于  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBS 洗涤  $5\text{ min}\times 3$  次, 用 DAB 试剂盒检测抗体结合。苏木素复染。阴性对照组用 PBS 替代一抗。显微镜观察 IL-17A 染色情况 (CTR 6000; Leica)。使用 Image J 软件对免疫组化阳性细胞进行量化统计。

**1.2.9 统计学处理** 实验数据首先进行方差齐性检验。方差齐性的数据用 one-way ANOVA 方法处理, 并用 SNK 方法进行两两比较。方差不齐的数据用非参数检验 Kruskal-Wallis 方法处理。P 值  $<0.05$  被认为差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IL-17A 及其受体在小鼠慢性胰腺炎模型中的表达

**2.1.1 雨蛙肽诱导小鼠慢性胰腺炎模型的建立** 在反复雨蛙肽 4 周注射后, 与正常组 (图 1A) 相比, 雨蛙肽组胰腺组织则出现明显的腺泡细胞损伤、间质纤维增生以及导管复合体的形成, 同时可见大量炎症细胞浸润 (图 1B)。Masson 染色显示: 长期注射雨蛙肽可以导致小鼠胰腺纤维化。在生理盐水对照组中, 胶原蛋白主要分布在胰腺导管周围和血管壁上 (图 1C), 而在造模组胰腺中可以看到胶原蛋白还分布于胰腺小叶间和腺泡周围 (图 1D)。上述结果提示雨蛙肽诱导的小鼠实验性慢性胰腺炎模型成功建立。

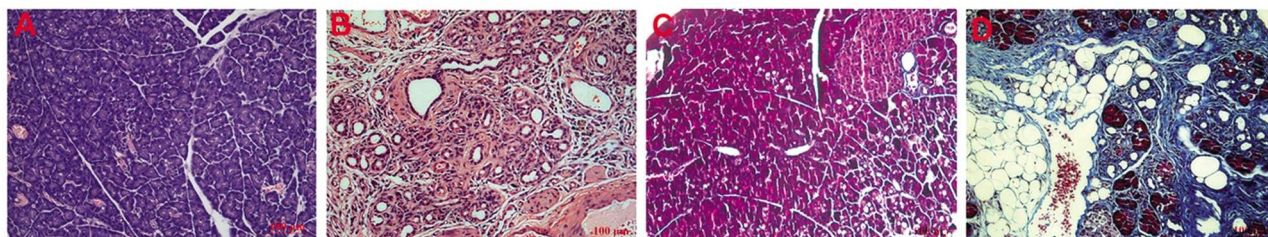


图 1 雨蛙肽诱导小鼠慢性胰腺炎模型的建立 (放大倍数  $\times 200$  倍)

Fig.1 Establishment of chronic pancreatitis model in mice (magnification  $\times 200$ )

A HE 染色: 正常胰腺 B HE 染色: 慢性胰腺炎

C Masson 染色: 正常胰腺 D Masson 染色慢性胰腺炎

Representative H&E sections of pancreas of control group (A) AND CP group (B)

Masson trichrome staining of pancreas of control group (C) AND CP group (D)

**2.1.2 IL-17A 及其受体在 CP 中的表达** 首先, 我们采取 real-time PCR 的方法验证了 IL-17A 及其受体在体内及体外的表达。如图 2A 所示, 通过 ELISA 方法检测发现 IL-17A 在正常小鼠血清中的浓度为  $27.88\pm 5.74\text{ pg/L}$ , 而在雨蛙肽连续刺激四周后, 小鼠血清中 IL-17A 的浓度上升为  $56.40\pm 10.50\text{ pg/L}$ , 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。Western Blot 检测进一步验证了 IL-17A 蛋白在 CP 胰腺组织中较对照组胰腺组织明显上调 (图 2C、D)。此外, IL-17RA 及 IL-17RC mRNA 水平也在 CP 小鼠中显著升高, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (图 2B)。同时, 我们证实 IL-6、IL-1 $\beta$  及 TGF- $\beta$ 1 等促纤维化细胞因子的表达水平在 CP 中也发生了明显升高 (图 2C、D)。

如图 4F, 在正常胰腺组织中几乎未检测到 IL-17A 的免疫活性 (阳性细胞比率  $8.9\pm 2.72\%$ ), 而在雨蛙肽诱导的小鼠慢性胰腺炎模型中, IL-17A 阳性细胞比率显著增加 ( $55.84\pm$

$5.71\%$ )。此外, IL-17A 主要在间质炎性细胞以及导管样复合体中呈强阳性表达 (图 4E)。

### 2.2 rIL-17A 促进胰腺星状细胞体外活化

为了进一步研究 IL-17A 在慢性胰腺炎中扮演的角色, 我们采用重组 IL-17A (rIL-17A) 细胞因子反复刺激小鼠原代胰腺星状细胞。本课题组前期研究一证实, 星状细胞原代分离培养后约 5 d 发生活化。静止以及活化的星状细胞均可表达 Desmin, 而仅活化的星状细胞可表达  $\alpha$ -SMA。图 3 所示, 体外培养后 5 d, 星状细胞表达  $\alpha$ -SMA mRNA 水平及蛋白水平较对照组均发生明显上调, 差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ ); 而 Desmin 表达水平无明显变化 ( $P>0.05$ )。这提示体外培养的星状细胞发生了活化。而 rIL-17A 持续刺激后, 与未加 rIL-17A 组相比,  $\alpha$ -SMA 的 mRNA 水平进一步升高, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (图 3A)。Western Blot 检测证实  $\alpha$ -SMA 蛋白水平变化

与 mRNA 水平变化一致(图 3B、C)。上述结果提示 IL-17A 增强了小鼠胰腺原代细胞的体外活化。

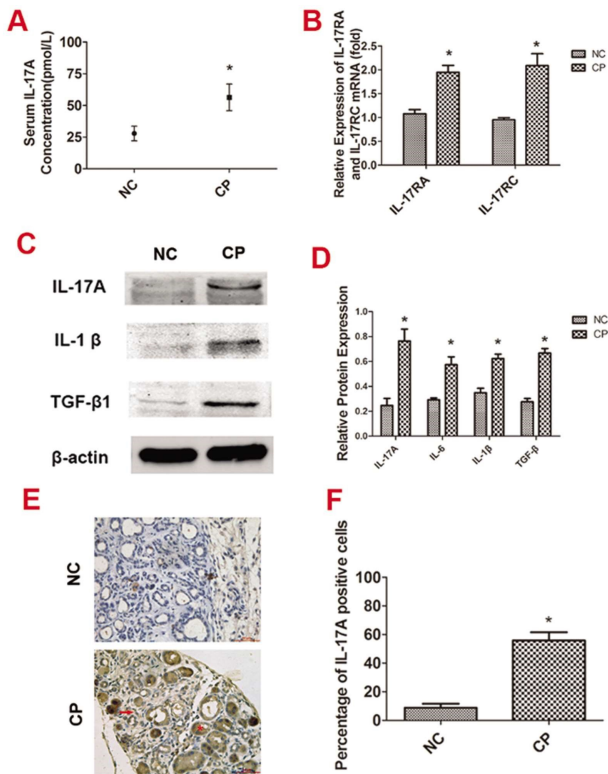


图 2 IL-17A 及其受体在慢性胰腺炎中的表达

Fig. 2 Expression of IL-17A and its receptors during CP

A 血清 IL-17A 浓度在 CP 中的表达变化 B IL-17RA 及 IL-17RC 在 CP 中的表达变化 C 炎症因子 IL-17A、IL-6、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1 蛋白在 CP 中的表达变化 D IL-17A、IL-6、IL-1 $\beta$  和 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达的相对定量分析 E IL-17A 在 CP 胰腺组织中的免疫组化染色(放大倍数  $\times$  400 倍;  $\rightarrow$ : 胰腺间质炎症细胞; \* : 导管复合体) F IL-17A 表达阳性细胞比例

A Concentrations of serum IL-17A after induction of pancreatitis compared with control group B mRNA levels of IL-17RA and IL-17RC during CP C Protein levels of IL-17A, IL-6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 during CP D Relative expression levels of IL-17A, IL-6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 proteins in 2 groups of pancreatic tissues E Immunostaining of IL-17A on mice pancreas during ceerulein-induced CP (magnification  $\times$  400;  $\rightarrow$ : interstitial cells of pancreas; \* : tubular complex) F Quantification of the positive cells of IL-17A by Image Pro Plus

Note: Data were expressed as  $\text{min} \pm \text{SEM}$ ,  $n=10$ . \* $P<0.05$ , compared with NC group.

### 2.3 rIL-17A 诱导星状细胞表达促炎细胞因子

由图 4 所见,胰腺星状细胞体外培养 5 d 后,IL-6 及 IL-1 $\beta$  的表达水平发生了上调( $P<0.05$ )。rIL-17A 持续刺激可直接导致 IL-17RA 及 IL-17RC 表达增加( $P<0.01$ ),提示 IL-17A 信号途径被激活。此外,我们进一步检测了 IL-17A 对星状细胞表达促胰腺纤维化细胞因子的影响。在 rIL-17A 的刺激下,小鼠胰腺星状细胞合成炎症细胞因子如 TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 的 mRNA 水平较非 rIL-17A 干预组发生明显上调( $P<0.01$ )。上述结果提示 IL-17A 可通过诱导星状细胞表达促纤维化炎症因子,促进星状细胞活化,进而参与胰腺组织纤维化的发生。

## 3 讨论

Th17 是一个新型的不同于 Th1、Th2 的细胞亚群,目前已经发现其在自身免疫病、感染等疾病、慢性炎症性疾病中发挥着重要的作用<sup>[16]</sup>。Th17 属于 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞亚群,可分泌 IL-17 家族细胞因子(IL-17A~F),其表达异常可导致强烈的炎症反应。其中,IL-17A 是 Th17 家族最重要的炎症因子<sup>[17]</sup>。目前已经证实,IL-17A 在急性胰腺炎过程中扮演了重要作用<sup>[10]</sup>,并与急性胰腺炎的严重程度相关<sup>[11,18]</sup>。此外,TH17 细胞与自身免疫性胰腺炎也有着密切联系<sup>[12,19]</sup>。

本课题组前期研究发现,IL-17A 在大鼠重症急性胰腺炎动物模型中扮演了重要角色,参与了牛磺胆酸诱导的大鼠胰腺损伤及急性炎症反应过程<sup>[10]</sup>。但 IL-17A 在慢性胰腺炎中的作用尚不清楚。有趣的是,我们在诱导急性重症胰腺炎的后期,胰腺组织开始发生纤维化修复,IL-17A 的表达水平虽然较早期明显回落,但其在胰腺组织及动物血清中的表达仍持续高于对照组<sup>[10]</sup>。因此,我们推测 IL-17A 可能参与了胰腺组织纤维化过程。

已有研究发现,多种炎症细胞包括 CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T 细胞、 $\gamma\delta$  T 细胞、巨噬细胞、树突样细胞、NK 细胞、单核细胞、成纤维细胞及中性粒细胞均可产生 IL-17A 细胞因子<sup>[8]</sup>。IL-17RA 是最早被发现的 IL-17A 受体,IL-17A 可刺激成纤维细胞等合成多种细胞因子,如 IL-6、IL-1 $\beta$  以及 TGF- $\beta$  等, MCP-1 和 G-CSF 等,诱导炎症反应<sup>[15,20]</sup>。IL-17A 也通过与 IL-17RC 结合成异二聚体,激活 IL-17A 信号途径<sup>[21]</sup>。本研究中,我们通过建立小鼠雨蛙肽慢性胰腺炎模型,发现 IL-17A 基因在慢性胰腺炎小鼠胰腺组织中表达较对照组明显升高,且 IL-17RA 及 IL-17RC 在 mRNA 表达水平也明显上调。此外,rIL-17A 作用于 PSCs,可刺激 IL-17RA 及 IL-17RC 表达明显升高。上述结果提示 IL-17A 信号通路可能参与了实验性慢性胰腺炎的病理生理过程。

胰腺星状细胞(pancreatic stellate cells, PSC)在慢性胰腺炎纤维化发生与发展的中心环节之一。星状细胞发生活化后可合成大量的基质聚积,从而促进胰腺纤维化<sup>[3]</sup>。转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 信号途径在 PSC 活化过程中扮演着重要角色,淋巴细胞、单核细胞包括胰腺腺泡细胞及形状细胞本身均可分泌该细胞因子,并可刺激胰腺星状细胞分泌大量细胞外基质,而抑制 TGF- $\beta$  信号通路可减轻胰腺纤维化<sup>[22,23]</sup>。胰腺腺泡细胞以及炎症细胞均可合成并分泌 IL-1 $\beta$  细胞因子<sup>[24]</sup>,IL-1 $\beta$  可诱导 PSC 表达  $\alpha$ -SMA,促进胰腺纤维化的发展;而动物实验证明,通过对小鼠胰腺组织过表达 IL-1 $\beta$ ,可诱导小鼠自发产生慢性胰腺炎<sup>[25]</sup>。IL-6 可诱导 PSC 分泌多种炎症因子。同时,IL-6 是 IL-17A 的关键靶基因之一,并通过 ROR $\gamma$ t 依赖信号通路正反馈促进 Th17 细胞的分化<sup>[26]</sup>。IL-6/STAT3 信号途径被认为在慢性胰腺炎以及胰腺癌的 crosstalk 中扮演重要的角色<sup>[27,28]</sup>。本研究中,我们再次证实慢性胰腺炎小鼠胰腺组织中,TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  以及 IL-6 等强促炎因子表达上调。我们通过免疫组化发现,IL-17A 免疫活性主要定位于胰腺间质炎症细胞以及导管样复合体中,提示 IL-17A 在慢性胰腺炎中的主要来源为炎症细胞,并可能进一步作用于胰腺星状细胞以及其他炎症细胞,参与胰腺纤维化。我们通过 rIL-17A 持续作用于 PSCs,发现明显上调了 PSC 表达 TGF- $\beta$ 、

IL-1 $\beta$  以及 IL-6 mRNA 水平,同时也增加了  $\alpha$ -SMA 在 PSCs 中的表达,提示 IL-17A 可能通过诱导炎症反应,促进 PSC 的激活。Loncle 等新近发现,IL-17RA 在胰腺导管腺癌中亦发生高表达,并可招募炎性细胞向胰腺间质迁移,募集的炎性细胞合

成分分泌大量 IL-17A 形成复杂的炎症微环境,进而通过 REG3 $\beta$ -JAK2-STAT3 信号通路介导慢性胰腺炎向胰腺癌发生 " 炎癌转化 " [29]。

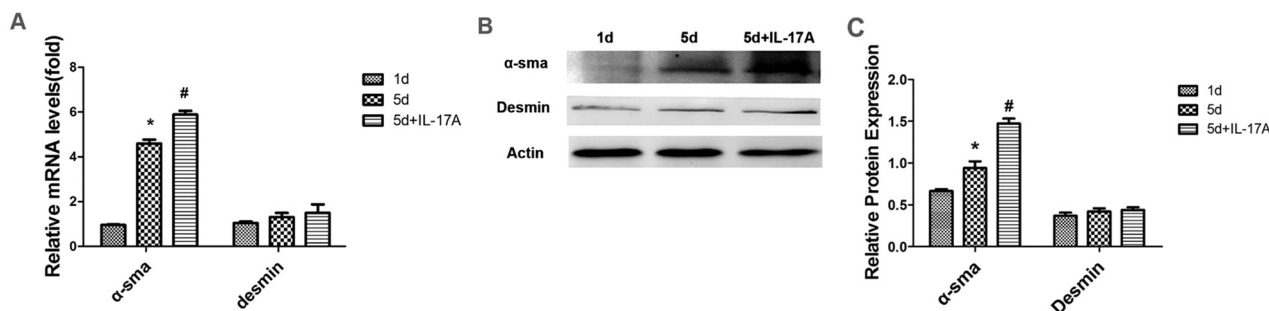


图 3 rIL-17A 促进小鼠胰腺星状细胞活化

Fig. 3 rIL-17A promoted activation of mouse pancreatic stellate cells

rIL-17A 作用于胰腺星状细胞 5 d 前后  $\alpha$ -SMA 及 Desmin 在 mRNA 水平(A)、蛋白水平(B、C)的变化

Changes of mRNA levels (A) and protein levels (B) in pancreatic stellate cells after stimulation of rIL-17A for 5 days (C) Relative Expression of  $\alpha$ -sma and Desmin proteins in 3 groups of pancreatic tissues

Note: Data were expressed as  $\text{min} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ . \* $P<0.01$ , compared with 1d group; #  $P<0.05$ , compared with 5d group.

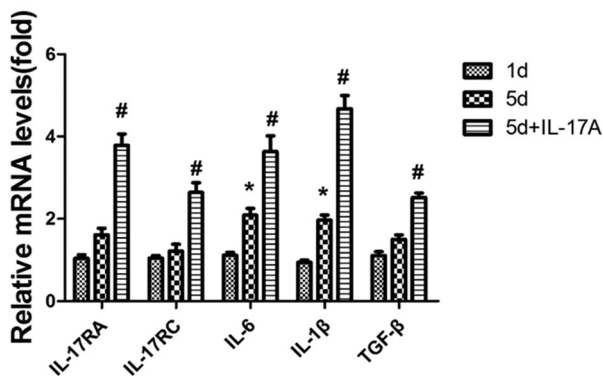


图 4 rIL-17A 诱导小鼠胰腺星状细胞表达促炎因子

Fig. 4 rIL-17A induced expression of proinflammatory cytokines by pancreatic stellate cells

Note: Data were expressed as  $\text{min} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ . \* $P<0.05$ , compared with 1d group; #  $P<0.01$ , compared with 5d group.

综上所述,本研究提示 IL-17A 信号通路可能参与慢性胰腺炎过程中 PSCs 的激活和炎症反应。IL-17A 诱导促纤维化细胞因子 TGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$  等的表达,促进 PSCs 活化,进而表达大量的细胞外基质,促进胰腺纤维化。本研究可能为慢性胰腺炎的治疗提供新的靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Majumder S, Chari ST. Chronic pancreatitis [J]. Lancet, 2016, 387 (10031): 1957-1966
- [2] Apte M, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cell: physiologic role, role in fibrosis and cancer[J]. Current opinion in gastroenterology, 2015, 31(5): 416-423
- [3] Apte M, Pirola R, Wilson J. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells[J]. Antioxidants & redox signaling, 2011, 15(10): 2711-2722
- [4] Karger A, Fitzner B, Brock P, et al. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells [J]. Cellular signalling, 2008, 20(10): 1865-1872
- [5] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. Nature reviews Immunology, 2009, 9(8): 556-567
- [6] Han Q, Das S, Hirano M, et al. Characterization of Lamprey IL-17 Family Members and Their Receptors [J]. Journal of immunology, 2015, 195(11): 5440-5451
- [7] Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing [J]. Nature reviews Immunology, 2014, 14(9): 585-600
- [8] Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling[J]. Cytokine, 2013, 64(2): 4774-4785
- [9] Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions[J]. Cellular & molecular immunology, 2010, 7(3): 164-174
- [10] Ni J, Hu G, Xiong J, et al. Involvement of interleukin-17A in pancreatic damage in rat experimental acute necrotizing pancreatitis [J]. Inflammation, 2013, 36(1): 53-65
- [11] Jia R, Tang M, Qiu L, et al. Increased interleukin-23/17 axis and C-reactive protein are associated with severity of acute pancreatitis in patients[J]. Pancreas, 2015, 44(2): 321-325
- [12] Loos M, Lauffer F, Schlitter AM, et al. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of type 2 autoimmune pancreatitis [J]. Virchows Archiv: an international journal of pathology, 2015, 467(6): 641-648
- [13] Shimada M, Andoh A, Hata K, et al. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators [J]. Journal of immunology, 2002, 168(2): 861-868
- [14] Hu Y, Wan R, Yu G, et al. Imbalance of Wnt/Dkk negative feedback promotes persistent activation of pancreatic stellate cells in chronic pancreatitis[J]. PloS one, 2014, 9(4): e95145
- [15] Shen J, Wan R, Hu G, et al. miR-15b and miR-16 induce the apoptosis of rat activated pancreatic stellate cells by targeting Bcl-2 in vitro [J]. Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology, 2012, 12(2): 91-99
- [16] Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting[J]. Trends in molecular medicine, 2016, 22(3): 230-241

(下转第 809 页)

- [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(24): 8501-8511
- [7] Lorenz Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis [J]. Nat Genet, 2006, 3(8): 1248-1250
- [8] Ye L, Mishina Y, Chen D, et al. Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrocyte dysplasia-like phenotype[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 6197-6203
- [9] Mallakin A, Sugiyama T, Taneja P, et al. Mutually exclusive inactivation of DMP1 and ARF/p53 in lung cancer [J]. Cancer Cell, 2007, 12(4): 381-394
- [10] Takayuki Sugiyama, Donna P, Pankaj Taneja, et al. Signal Transduction Involving the Dmp1 Transcription Factor and its Alteration in Human Cancer[J]. Clinical Medicine: Oncology, 2008, 2: 209-219
- [11] 史东沙, 谢明. DMP1 促进汉坦病毒感染的脐静脉内皮细胞通透性增加[C]. 第十届全国免疫学学术大会, 2015  
Shi Dong-sha, Xie Ming. DMP1 promote the increase of umbilical vein endothelial cell permeability by hantavirus infection [C]. The 10th Chinese Society for Immunology, 2015
- [12] Bellahcène A, Castronovo V, Ogbureke KU, et al. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3): 212-226
- [13] Takayuki sugiyama, Donna p, Pankaj taneja, et al. Role of DMP1 and its future lung cancer diagnostics [J]. Expert Reviews, 2008, 8(4): 435-447
- [14] Mallakin A, Sugiyama T, Taneja P, et al. Scientists identify new gene associated with lung cancer[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(11): 1674
- [15] Dejan Maglic, Daniel B Stovall J, Mark Cline, et al. DMP1 $\beta$ , a splice isoform of the tumour suppressor DMP1 locus, induces proliferation and progression of breast cancer [J]. Journal of Pathology, 2015, 236: 90-102
- [16] Y Inagaki, T G Kashima, E S Hookway, et al. Dentin matrix protein 1(DMP1) is a marker of bone formation and mineralization in soft tissue tumours[J]. Virchows Arch, 2015, 466: 445-452
- [17] Mallakin A, Taneja P, Matise LA, et al. Expression of Dmp1 in specific differentiated, nonproliferating cells and its repression by E2Fs [J]. Oncogene, 2006, 25(59): 7703-7713
- [18] Taneja P, Mallakin A, Matise LA, et al. Repression of Dmp1 and Arf transcription by anthracyclins: critical roles of the NF-kB subunit p65 [J]. Oncogene, 2007, 26(53): 7457-7466
- [19] 占柳, 谢淑娟, 潘卫红. 牙本质基质蛋白-1 及其相关蛋白矿化作用的研究进展[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2012, 2(10): 115-118  
Zhan Liu, Xie Shu-juan, Pan Wei-hong. Dentin matrix protein-1 and its related research progress of mineralization [J]. Chinese Journal of Geriatric Dentistry March, 2012, 2(10): 115-118
- (上接第 805 页)
- [17] Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation [J]. Journal of autoimmunity, 2015, 60: 1-11
- [18] Vlachos S, Tsaroucha AK, Konstantoudakis G, et al. Serum profiles of M30, M65 and interleukin-17 compared with C-reactive protein in patients with mild and severe acute pancreatitis [J]. Journal of hepatobiliary-pancreatic sciences, 2014, 21(12): 911-918
- [19] Zhao LN, Han WY, Lu L, et al. Clinical features and expressions of Foxp3 and IL-17 in type 1 autoimmune pancreatitis in China[J]. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 2014, 20: 2720-2728
- [20] Shabgah AG, Fattahi E, Shahneh FZ. Interleukin-17 in human inflammatory diseases [J]. Postepy dermatologii i alergologii, 2014, 31(4): 256-261
- [21] Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation [J]. Nature reviews Drug discovery, 2012, 11(10): 763-776
- [22] Nagashio Y, Ueno H, Imamura M, et al. Inhibition of transforming growth factor beta decreases pancreatic fibrosis and protects the pancreas against chronic injury in mice [J]. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2004, 84(12): 1610-1618
- [23] Tahara H, Sato K, Yamazaki Y, et al. Transforming growth factor- $\alpha$  activates pancreatic stellate cells and may be involved in matrix metalloproteinase-1 upregulation[J]. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2013, 93(6): 720-732
- [24] Charrier A, Chen R, Kemper S, et al. Regulation of pancreatic inflammation by connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)[J]. Immunology, 2014, 141(4): 564-576
- [25] Marrache F, Tu SP, Bhagat G, et al. Overexpression of interleukin-1 $\beta$  in the murine pancreas results in chronic pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2008, 135(4): 1277-1287
- [26] Kimura A, Kishimoto T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance[J]. European journal of immunology, 2010, 40(7): 1830-1835
- [27] Hamada S, Masamune A, Yoshida N, et al. IL-6/STAT3 Plays a Regulatory Role in the Interaction Between Pancreatic Stellate Cells and Cancer Cells [J]. Digestive diseases and sciences, 2016, 61(6): 1561-1571
- [28] Mace TA, Ameen Z, Collins A, et al. Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner [J]. Cancer research, 2013, 73(10): 3007-3018
- [29] Loncle C, Bonjoch L, Folch-Puy E, et al. IL17 Functions through the Novel REG3 $\beta$ -JAK2-STAT3 Inflammatory Pathway to Promote the Transition from Chronic Pancreatitis to Pancreatic Cancer [J]. Cancer research, 2015, 75(22): 4852-4862