

# 促炎因子在实验性重症急性胰腺炎早期 对 JAK2/STAT3 信号通路的影响

李敏利,许小兵,王彬,金鑫鑫,郭美霞,张晓华

**摘要** 目的 探讨重症急性胰腺炎(SAP)早期炎症因子的分泌与 JAK2/STAT3 信号通路之间的关系。方法 以 4% 牛磺胆酸钠胰胆管逆行注射诱导大鼠 SAP 模型。32 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组和 SAP 造模组(6、12、18 h), 每组 8 只。动态测定各组血清淀粉酶(AMY)和胰脂肪酶(LPS)、血钙( $Ca^{2+}$ )水平;光镜下观察胰腺病理变化;ELISA 法检测血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及白介素-18(IL-18)表达情况;RT-PCR 和 Western blot 法分别检测胰腺组织中 JAK2 和 STAT3 在胰腺中的表达水平变化。结果 各 SAP 造模组血清学指标水平、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 均明显高于对照组;病理学显示胰腺组织随病情进展逐步加重;SAP 造模组胰腺 JAK2 和 STAT3 基因和蛋白的表达均明显增高,且 JAK2 和 STAT3 表达变化与胰腺组织的严重程度相一致。结论 SAP 早期促炎因子过度表达是病情进展的损伤因子,可能通过诱导 JAK2/STAT3 信号通路的活化,加重 SAP 早期器官损伤程度。

**关键词** 重症急性胰腺炎;促炎因子;JAK2/STAT3 通路;胰腺损伤

中图分类号 R 576

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1392-04

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床常见急腹症之一,其发病的病理生理机制十分复杂。近年来,多项研究<sup>[1-2]</sup>表明,各种因素刺激引起胰腺消化酶过度分泌和释放,导致胰腺腺体及胰外器官炎症、免疫相关信号通路的活化,进而导致胰腺局部损伤以及胰外多器官功能损伤。目前认为,炎症通路过度活化与 SAP 时多器官功能损伤关系尤为密切。早期研究<sup>[3-5]</sup>显示,白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-18(interleukin-18, IL-18)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,

TNF- $\alpha$ )在 SAP 早期表达明显增加,且表达量的增加与病情严重程度和预后密切相关。研究<sup>[6]</sup>显示,SAP 早期 JAK/STAT 信号通路在早期炎症反应过程中起重要调节作用,该信号通路的过度活化,可能加重胰腺损伤。然而该信号通路在 SAP 早期调节作用尚不明确,因此,该研究旨在进一步明确 SAP 早期 IL-1 $\beta$ 、IL-18 及 TNF- $\alpha$  动态变化与 JAK2/STAT3 信号通路活化的关系,从分子、病理学角度探讨其与 SAP 病情严重性的关系,为 SAP 防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 清洁级 SD 雄性大鼠 32 只,体重 200 ~ 250 g,由南京军区南京总医院实验动物中心提供。牛磺胆酸钠购自美国 Sigma 公司;TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 试剂盒购自美国 ADL 公司;JAK2 及 STAT3 大鼠单克隆抗体购自美国 Cell Signal 公司;兔抗大鼠  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德公司。PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;JAK2 及 STAT3 引物由南京金斯瑞公司合成。酶标仪、PAGE 凝胶电泳仪、垂直电泳槽、电泳凝胶图像分析系统均由美国 Bio-Rad 公司提供。

## 1.2 方 法

**1.2.1 动物分组及模型制备** SD 大鼠随机分为对照组和 SAP 造模组;后组再分为 6、12、18 h 3 个时间点,每组各 8 只大鼠,术前禁食 12 h,禁水 6 h。氯胺酮(100 mg/kg)经腹腔内注射麻醉;由正中切口进腹,对照组开腹后翻动胰腺数次;SAP 造模组用显微动脉夹夹闭肝门胆管及十二指肠乳头对系膜肠壁,用 4% 牛磺胆酸钠(1 ml/1 kg) 0.2 ml/min 匀速逆行注入胰胆管,胰腺出现充血水肿表现,造模结束后过 5 min 取出动脉夹,SAP 模型制作成功后,将各脏器回纳至正常解剖位置。各组大鼠分别在各时间点分批处死,于右心房取血,在室温下 3 000 r/min 离心 20 min,取血清 -20  $^{\circ}$ C 冻存。取胰腺 2 份,1 份放入 10% 中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋、切片。

2014-05-18 接收

基金项目:南京军区总医院科研基金(编号:2012064)

作者单位:南京军区南京总医院老年病研究中心、干部消化内科,南京 210002

作者简介:李敏利,女,硕士,主治医师;

张晓华,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: jszhxh@sina.com

另1份置于液氮中保存备用。

**1.2.2 血清淀粉酶 (serum amylase, AMY) 和胰脂肪酶 (lipase, LPS)、血钙 (calcium, Ca<sup>2+</sup>) 测定** Olympus Au-2700型自动生化分析仪测定。

**1.2.3 胰腺病理学观察** 胰腺标本常规制作病理HE石蜡切片,均由我院病理科医师在光镜下观察胰腺组织学变化。胰腺组织按 KUSSKE 分级标准进行病理评分。

**1.2.4 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 含量测定** ELISA 法检测,具体步骤严格按试剂盒使用说明书进行操作,通过绘制标准曲线得出样品中相应细胞因子含量。该检测方法的灵敏度为 1 pg/ml。

**1.2.5 RT-PCR 检测** 取 50 mg 胰腺组织分别加 1 ml 苯酚 (TRIzol) 充分匀浆提取总 RNA,比色法测定 RNA 浓度,各取 0.5  $\mu$ g RNA 加入 20  $\mu$ l RT 反应体系进行逆转录,反应得 cDNA 4  $^{\circ}$ C 保存。各取上游 cDNA 样品稀释 10 倍后加入 qPCR 反应体系,每管体积 20  $\mu$ l,放入安捷伦 Mx4000p 实时定量 PCR 仪。引物序列(查自 Pubmed)如下:JAK2 上游引物:5'-TGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGCAT-3',下游引物:5'-TCCTACAGTGTTCAGTTTCAA-3',扩增片段 222 bp。STAT3 上游引物:5'-GATGCTGGAG-GAGAGAATCG-3',下游引物:5'-TATGT TTGTGC-CCAGAATGT-3',扩增片段 265 bp。反应条件:预变性 95  $^{\circ}$ C 30 s;扩增 95  $^{\circ}$ C 5 s 60  $^{\circ}$ C 20 s 循环 40 次;溶解曲线条件:95  $^{\circ}$ C 60 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 30 s。每个样本重复 5 次,记录观察扩增曲线及溶解曲线,在 GeneGenius 成像系统下观察结果。

**1.2.6 Western blot 检测胰腺组织中 JAK2 及 STAT3 蛋白表达** 取胰腺组织称重,液氮、研钵粉碎组织块, RIPA 细胞裂解液裂解后冰浴下超声匀浆,提取总蛋白,采用 Bradford 法行总蛋白定量。各取蛋白样品加等体积的电泳缓冲液,经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜。封闭后加入兔抗大鼠 JAK2 和 STAT3 单克隆抗体(1:500 稀释);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1000 稀释)。结果以 ECL 化学发光检测杂交信号,以  $\beta$ -actin 作为内参照,用 Image-Pro 软件分析仪测定条带灰度值,以显色条带的吸光度值作为蛋白表达计量指标分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,两组均数间比较采用 LSD-*t* 检验进行

显著性检验。

## 2 结果

**2.1 血清 AMY、LPS、Ca<sup>2+</sup> 指标变化** 对照组血清 AMY、LPS、Ca<sup>2+</sup> 水平均较低;SAP 造模组 AMY、LPS 水平均显著增加 ( $F = 10.724, P < 0.01$ ),随着作用时间延长逐渐升高,18 h 升至最高值,Ca<sup>2+</sup> 随着作用时间延长逐渐降低 ( $F = 9.978$ ),SAP-6 h 和 SAP-12 h 组与对照组比较差异无统计学意义 ( $F = 2.239, P > 0.05$ ),SAP-18 h 组与对照组比较差异有统计学意义 ( $F = 6.811, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血清学指标结果比较 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	AMY (U/L)	LPS (U/L)	Ca <sup>2+</sup> (mg/dL)
对照	574.9 $\pm$ 28.3	43.7 $\pm$ 2.3	8.57 $\pm$ 0.23
SAP-6 h	2152.2 $\pm$ 186.6**	186.5 $\pm$ 9.2**	5.72 $\pm$ 0.62**
SAP-12 h	3451.7 $\pm$ 206.5**	398.3 $\pm$ 15.8**	4.37 $\pm$ 0.54**
SAP-18 h	4163.1 $\pm$ 379.6**	622.8 $\pm$ 21.4**	1.58 $\pm$ 0.07**

与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

**2.2 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 含量** 对照组血清中有少量 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 表达;SAP 造模组血清 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TNF- $\alpha$  表达与对照组比较均显著增加,随着作用时间延长逐渐升高,18 h 升至最高值,与对照组比较差异有统计学意义 ( $F = 33.505, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-18 含量比较 (pg/ml,  $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-18
对照	69.12 $\pm$ 3.84	8.64 $\pm$ 0.39	25.36 $\pm$ 4.82
SAP-6 h	176.02 $\pm$ 14.38**	47.21 $\pm$ 3.56**	186.24 $\pm$ 15.95**
SAP-12 h	259.77 $\pm$ 10.61**	92.43 $\pm$ 8.04**	376.27 $\pm$ 20.27**
SAP-18 h	340.36 $\pm$ 13.57**	146.67 $\pm$ 10.33**	426.34 $\pm$ 16.83**

与对照组比较:\*\* $P < 0.01$

## 2.3 组织病理学检查

**2.3.1 胰腺组织病理学检查** 对照组胰腺结构正常,腺泡细胞排列紧密,胞质着色均匀,胰岛中无出血及炎症细胞浸润(图 1A)。SAP-6 h 组胰腺小叶正常结构已破坏,间质充血水肿,局部可见紫红色坏死灶,坏死区大量炎症细胞浸润(图 1B);SAP-12 h 组胰腺大片坏死,间质血管破裂,仅残留胰腺腺叶轮廓,炎症细胞浸润更明显(图 1C);SAP-18 h 坏死程度进一步加重,腺叶正常结构完全消失,胰腺实质广泛出血坏死及炎症细胞浸润(图 1D)。

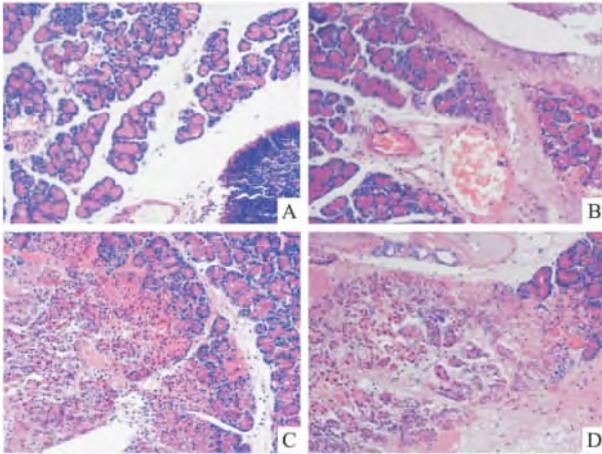


图1 胰腺组织病理学表现 HE × 200

A: 对照组; B: SAP-6 h; C: SAP-12 h; D: SAP-18 h

### 2.4.1 胰腺组织 JAK2 和 STAT3 mRNA 的表达

JAK2 扩增片段为 364 bp, STAT3 扩增片段为 715 bp。对照组胰腺组织可见 JAK2 和 STAT3 mRNA 少量表达,各 SAP 造模组的表达明显增加,随时间延长逐渐升高,18 h 升至最高值,与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

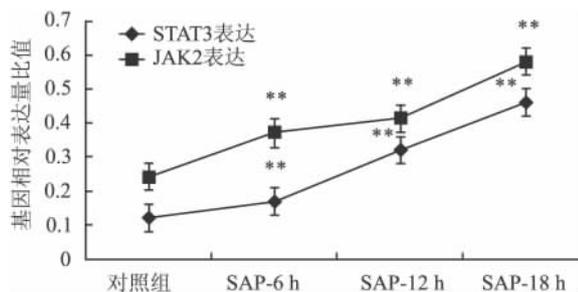


图2 各 SAP 造模组大鼠胰腺 JAK2 和 STAT3 mRNA 表达情况与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

2.4.2 胰腺组织 JAK2 和 STAT3 蛋白表达情况 对照组胰腺组织中可见少量 JAK2 和 STAT3 表达;SAP 造模组血清 JAK2 和 STAT3 水平均显著增加 ( $P < 0.01$ ) 随时间延长逐渐升高,18 h 升至最高值,与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

### 3 讨论

目前认为 SAP 早期炎症反应过程中,同时存在免疫系统改变,诱导抑炎和促炎信号通路的活化,同时参与调节作用,而 JAK/STAT 通路作为重要的炎症因子信号转导的共同通路之一,其中 JAK2 和 STAT3 在胰腺腺泡细胞中均发现有特异性抗体<sup>[8]</sup>,

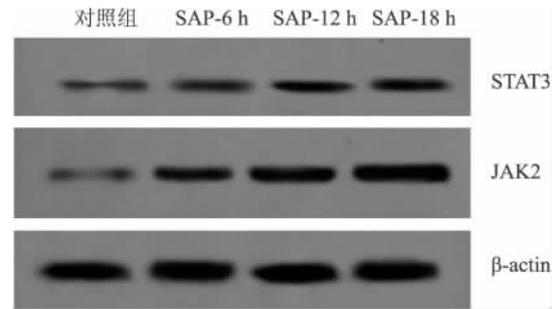


图3 各组大鼠胰腺中 JAK2 和 STAT3 蛋白表达

炎症因子可能刺激 JAK/STAT3 通路活化,将细胞膜上感受的信号传导至腺泡细胞核内,最终完成信号转导全过程,在 SAP 早期发挥着重要作用<sup>[9-10]</sup>。前期研究<sup>[11]</sup>显示,SAP 并发肺损伤时,IL-6 及 IL-18 的表达与 JAK2 和 STAT3 蛋白表达成正比,提示 SAP 时炎症因子的高表达与 JAK2/STAT3 信号通路明显正相关。因此推测 JAK2/STAT3 信号通路可能参与了 SAP 早期胰腺局部炎症反应和远处器官损伤过程。

本研究显示,在造模 6 h 后血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-18 含量增加,造模 12 h 后,其表达水平较 6 h 组均明显升高,造模 18 h 后炎症因子表达呈最高水平,这与 AMY、LPS 变化呈显著正相关性,而与 Ca<sup>2+</sup> 指标呈负相关,同时结合病理结果显示,随胰腺病理损伤程度加重,且胰腺组织中炎症细胞浸润明显,考虑可能为 SAP 时炎症细胞过度浸润,诱导炎症细胞大量释放所致,与胰腺炎严重程度密切相关,这与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致。由此可见,SAP 早期炎症因子的高表达水平与胰腺损伤严重程度呈正相关性。本研究进一步显示对照组大鼠胰腺 JAK2 和 STAT3 均呈低水平表达,各 SAP 造模组 JAK2 和 STAT3 表达均明显增加,其表达量与各炎症因子变化水平在时间上保持一致,考虑可能在 SAP 时,炎症因子的过度表达导致胰腺腺泡细胞内 JAK2 和 STAT3 的活化,使其与相应位点结合,进而诱导了 JAK2/STAT3 通路进一步活化。另外,结合生物学指标和胰腺病理损伤程度提示该信号通路的过度活化可能进一步刺激炎症因子的表达,导致炎症反应加重,进而损伤胰腺组织以及胰外器官。

### 参考文献

[1] Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via inflammatory mediators [J]. J Surg Res, 2000, 90(2): 95-101.

- [2] Kerem M, Bedirli A, Pasaoglu H. Role of ghrelin and leptin in predicting the severity of acute pancreatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(4):950-5.
- [3] Zhang X H, Zhu R M, Xu W A, et al. Therapeutic effects of caspase-1 inhibitors on acute lung injury in experimental severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(4):623-7.
- [4] Li J, Luo Y, Li Z, et al. Effects of erythropoietin pretreatment on pro-and anti-inflammatory balance in rats with severe acute pancreatitis [J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2012, 32(1):93-6.
- [5] Jha R K, Ma Q, Lei Z, et al. Resveratrol ameliorates the deleterious effect of severe acute pancreatitis [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(2):397-402.
- [6] Chen P, Huang L, Zhang Y, et al. The antagonist of the JAK-1/STAT-1 signaling pathway improves the severity of cerulein-stimulated pancreatic injury *via* inhibition of NF-kappaB activity [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(5):731-8.
- [7] 林中,袁园,李小玲等.重症急性胰腺炎大鼠结肠黏膜下神经节-氧化氮合酶阳性神经元及乙酰胆碱转移酶阳性神经元的改变 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(10):1185-9.
- [8] Gallmeier E, Schafer C, Moubarak P, et al. JAK and STAT proteins are expressed and activated by IFN-gamma in rat pancreatic acinar cells [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 203(1):209-16.
- [9] Fridman J S, Scherle P A, Collins R, et al. Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: pre-clinical characterization of INCB028050 [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9):5298-307.
- [10] Jee S H, Chu C Y, Chiu H C, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(6):1169-75.
- [11] 李敏利,朱人敏,张晓华,等. JAK2/STAT3 信号通路在重症急性胰腺炎大鼠肺损伤中的作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(6):611-3.
- [12] Vaccaro M I, Ropolo A, Grasso D, et al. Pancreatic acinar cells submitted to stress activate TNF-alpha gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(2):485-90.

## Correlation of proinflammatory cytokines and JAK/STAT signaling pathway in early severe acute pancreatitis

Li Minli, Xu Xiaobing, Wang Bin, et al

(*Geriatrics Research Center, Dept of Gastroenterology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002*)

**Abstract Objective** To investigate the relationship between proinflammatory cytokines and JAK2/STAT3 signal pathway in early severe acute pancreatitis. **Methods** The rat model of SAP was reproduced by retrograde infusion of 4% sodium taurocholate into the biliopancreatic duct. Thirty-two male SD rats were randomly assigned into 4 groups (8 each): normal control group, SAP 6 h, 12 h and 18 h groups. The levels of serum amylase, lipase and calcium level were measured dynamically, pathological changes in pancreas was evaluated. The concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 were determined by ELISA, and the expressions of JAK2 and STAT3 protein and mRNA in pancreas was also determined by Western blot and RT-PCR. **Results** The SAP module groups serology level, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-18 were significantly higher than those in NC group. The microscopic pancreas injuries were gradually aggravated with disease progression. The expression of JAK2 and STAT3 gene and protein in experimental groups were significantly increased compared with NC group, and reached the peak in 18h group. **Conclusion** Severe acute pancreatitis proinflammatory cytokines overexpression is damage factor progression of disease, which may activate the JAK2/STAT3 signaling pathway, aggravating the organ injury in early stage of severe acute pancreatitis.

**Key words** severe acute pancreatitis; proinflammatory cytokines; JAK2/STAT3 signaling pathway; pancreas injury