

文章编号:1005-6947(2007)05-0422-04

· 胰腺炎专题研究 ·

急性胰腺炎大鼠早期生长反应基因-1 与肝损害的关系

邹树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄

(成都军区总医院 全军普通外科中心, 四川 成都 610083)

摘要:目的 研究早期生长反应基因-1与急性胰腺炎(AP)肝脏损害的关系。方法 先将24只雄性Wistar大鼠随机均分为A,B,C,D 4组,分别于胆总管内逆行注入生理盐水或不同浓度牛磺胆酸钠溶液,3h后处死动物,留取血清和肝脏组织。另将30只雄性Wistar大鼠随机均分为E,F,G,H,I等5组,胆管内逆行注射5%牛磺胆酸钠溶液,分别于注射后1,3,6,12,24h处死动物同法留取标本。检测血清AST,LDH,TNF- α ,IL-1 β 水平,并对肝组织进行EGR-1免疫组化染色。结果 (1)A,B,C,D组动物TNF- α ,IL-1 β ,AST及LDH水平均随着牛磺胆酸钠浓度的升高而上升;(2)免疫组化染色显示,在不同注药剂量的AP组,肝组织EGR-1表达量随AP病情的加重而升高,并与肝实质酶、炎性细胞因子水平均呈显著正相关,且表达部位也有所不同。EGR-1在AP造模后不同时间肝组织的表达,具有极明显的细胞种类与部位的差异。结论 EGR-1可能与AP时伴发的肝脏损害有关,其机制可能与其介导炎性细胞因子生成有关。 [中国普通外科杂志,2007,16(5):422-425]

关键词: 胰腺炎/病理学; 早期生长反应基因; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素1 β

中图分类号:R657.51

文献标识码:A

The role of early growth response factor-1 in liver injury of acute pancreatitis in rats

ZOU Shu, TIAN Fu-zhou, TANG Li-jun, LI Dong-xuan

(The General Surgery Center of PLA, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the possible role of early growth response factor -1 (EGR-1) in liver injury acute pancreatitis in rats. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: Group A, B, C and D. Normal saline was injected into common bile duct (CBD) of group A, and different concentrations of taurocholate sodium solutions were injected into CBD of group B, C and D. Three hours after injection, all animals were sacrificed and blood and liver were harvested. Other 30 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups: Group E, F, G, H and I, These rats were sacrificed 1h, 3h, 6h, 12h and 24h after injection respectively. Serum levels of AST, LDH, TNF- α and IL-1 β were measured, and immunohistochemistry staining of EGR-1 on liver was observed and assayed. **Results** (1) Accompanying the stepwise rising concentrations of taurocholate sodium, the levels of AST, LDH, TNF- α and IL-1 β were progressively increased. (2) Positive staining of EGR-1 in liver was more intense with increased severity of acute pancreatitis models, and EGR-1 staining sites were different among models of acute pancreatitis of different severity. The positive staining cells and intracellular sites of EGR-1 displayed notable differences in livers harvested at different times after pancreatitis induction. **Conclusions** EGR-1 may play an important role in liver injury during acute pancreatitis, and the possible mechanism may be related to its mediated production of inflammatory cytokines.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 422-425]

收稿日期:2006-11-22; 修订日期:2007-05-14。

作者简介:邹树,男,湖南隆回人,成都军区总医院主治医师,主要从事胰腺疾病方面的研究。

通讯作者:田伏洲 E-mail:zoudashu@yahoo.com.cn

Key words: Pancreatitis/pathol; Early Growth Response Factor; Tumor Necrosis Factor α ; Interleukin 1β

CLC number: R657.51

Document code: A

目前认为急性胰腺炎(AP)多器官功能障碍综合征发生的机制可能与单核巨噬细胞系统异常激活并产生过多的炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)等有关^[1-2]。由于胰腺血流在回流心脏前流经肝脏,且库普弗细胞占整个机体固定巨噬细胞群的80%~90%,是产生炎性细胞因子的主要效应细胞之一。因此肝脏是AP最常累及的胰外器官之一。肝损害对AP的病情及预后有着重要影响。本研究观察核转录因子早期生长反应基因-1(early growth response factor 1, EGR-1)在不同程度的AP及AP发病后不同时间肝组织的表达情况。现将结果报告如下。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雄性SPF级Wistar大鼠54只,体重230~250g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 牛磺胆酸钠购自Sigma公司。兔抗大鼠EGR-1多克隆抗体购自Santa Cruz公司。大鼠TNF- α 及IL- 1β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自晶美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 AP诱导及动物分组 先将24只大鼠,随机均分为A(对照),B,C,D4组,剖腹按分组的顺序分别向胆管内逆行注射生理盐水,1%,3%,5%牛磺胆酸钠溶液[0.75mL/kg,(体重)],行AP制模。3h后处死动物。将另30只大鼠,随机均分为E,F,G,H,I等5组,同上法注射5%牛磺胆酸钠溶液(0.75mL/kg),分别在注射后1,3,6,12,24h处死动物。

1.2.2 采集标本及检测指标 在各相应时点,以3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉动物后剪开胸腔,自主动脉先后灌注生理盐水及10%中性福尔马林后取肝组织。灌注前穿刺右心耳取血分离血清,以自动生化分析仪检测天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH),每一血清标本均检测3次取平均值。ELISA法检测TNF- α 及IL- 1β 。肝组织常规石蜡切片,按试剂说明书以Envision二步法检测Egr-1蛋白,以图像分析软件image pro plus 4.5进行半定量分析。

1.3 统计学处理

统计数据以($\bar{x} \pm s$)表示,样本的均数比较及相关分析分别采用SPSS 12.0独立样本 t 检验与双变量相关分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 AP发病后不同时间肝实质酶及炎性细胞因子水平的变化

B,C,D组肝实质酶AST,LDH及炎性细胞因子TNF- α ,IL- 1β 均比A组显著增高,且C,D组的IL- 1β 高于B组,D组的TNF- α 高于C组(表1)。表明注射不同剂量牛磺胆酸钠所致AP的严重程度不同。

AP造模后不同时间检测结果显示,各组AST,LDH,TNF- α ,IL- 1β 均随时间延长而逐渐升高,表明AP在制模后24h病情随病程延长而有加重的趋势(表2)。

表1 不同程度AP组AST,LDH及TNF- α ,IL- 1β 的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	AST(U/L)	LDH(U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL- 1β (pg/mL)
A组	166.67 \pm 32.85	186.33 \pm 43.59	26.78 \pm 10.95	25.40 \pm 6.68
B组	210.33 \pm 67.48 ¹⁾	264.67 \pm 60.48 ¹⁾	55.48 \pm 18.73 ¹⁾	87.68 \pm 25.06 ¹⁾
C组	296.17 \pm 71.31 ¹⁾	363.33 \pm 85.85 ¹⁾	88.90 \pm 31.85 ¹⁾	182.82 \pm 49.26 ²⁾
D组	507.33 \pm 101.68 ²⁾	505.17 \pm 117.19 ²⁾	137.92 \pm 48.61 ²⁾	248.20 \pm 54.75 ²⁾

注:1)与A组相比 $P < 0.05$;2)与A组相比 $P < 0.01$

表2 AP造模后不同时间AST,LDH,TNF- α ,IL- 1β 的变化

组别	AST(U/L)	LDH(U/L)	TNF- α (pg/mL)	IL- 1β (pg/mL)
E组	234.68 \pm 61.25	216.67 \pm 47.20	64.58 \pm 22.31	103.63 \pm 77.04
F组	507.33 \pm 101.68 [†]	505.17 \pm 117.19 [†]	137.92 \pm 48.61 [†]	248.20 \pm 54.75 [†]
G组	791.50 \pm 121.60 [†]	652.35 \pm 122.21 [†]	193.42 \pm 62.79 [†]	329.24 \pm 88.53 [†]
H组	965.33 \pm 220.43 [†]	874.83 \pm 120.96 [†]	274.46 \pm 97.23 [†]	447.29 \pm 132.54 [†]
I组	1074.52 \pm 449.28 [†]	1138.37 \pm 387.51 [†]	317.45 \pm 88.64 [†]	526.42 \pm 108.73 [†]

注:†与E组相比 $P < 0.01$

2.2 不同程度AP的不同时间肝组织EGR-1表达情况及图像分析结果

肝组织免疫组化染色显示:EGR-1仅在对照组(A组)肝细胞胞浆中有极少量表达,而B,C,D组肝细胞胞浆中表达明显增多,小部分肝细胞核内也有表达;此外在小部分肝窦内皮细胞中也有

表达(图1)。图像半定量分析显示:随着牛磺胆酸钠浓度的升高,EGR-1的表达量不断增多,B,C,D组EGR-1表达均较A组显著增高;A,B,C,D4组依次为35.58,56.17,71.00及135.52。将EGR-1半定量结果与胰腺炎病情指标AST,LDH,TNF- α ,IL-1 β 分别进行相关分析,结果均呈显著正相关(r 分别为0.71,0.73,0.67,0.62,均 $P<0.05$)。

观察EGR-1在AP造模后不同时间肝组织的表达,发现在胰腺炎造模后1h(E组),EGR-1开始在肝组织内表达,主要以核内为主,大量肝窦内皮细胞表达阳性(胞核和胞浆均有)。此外,还可见库普弗细胞内EGR-1表达。AP造模后3h(F组),总的表达强度有所增加,但核内表达较前减弱。6h后(G组)肝细胞胞浆和胞核表达进一步

减弱,且已不见肝窦内皮细胞的表达。12h(H组)和24h后(I组)已不见肝细胞核内表达,且胞浆表达水平也随时间的延长而明显下降(图2)。经图像半定量分析,以AP造模后3h表达最为强烈,而在24h后,肝组织EGR-1表达程度与对照组(A)已基本接近(表3)。

表3 AP造模后不同时间肝组织EGR-1半定量结果

组别	EGR-1
E组	76.80 \pm 11.53
F组	135.52 \pm 56.22
G组	67.25 \pm 13.86
H组	56.90 \pm 18.68
I组	39.87 \pm 11.34

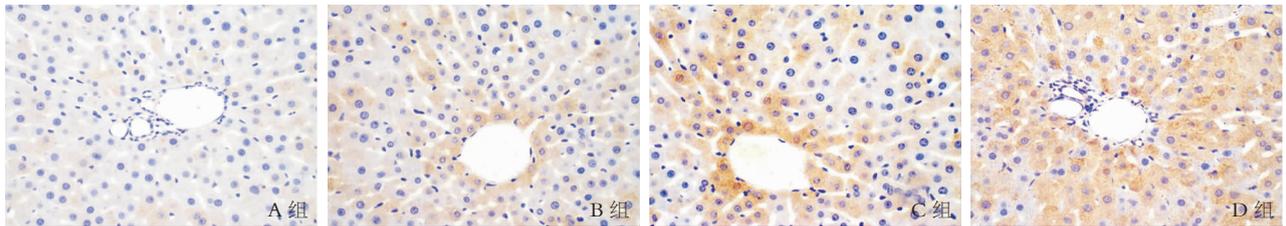


图1 不同程度AP组肝组织中EGR-1的表达(Envision 二步法 $\times 400$)

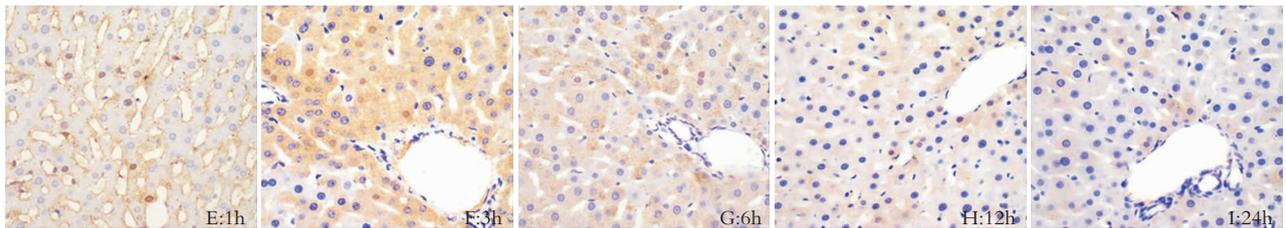


图2 AP造模后不同时间肝组织中EGR-1的表达(Envision 二步法 $\times 400$)

3 讨论

EGR-1是立早基因家族中最重要的一员,是一种核转录因子,与细胞增生、分化、凋亡及炎症反应密切相关^[3]。许多核转录因子包括AP-1,NF-KB,EGR-1等在不同类型细胞中可以介导不同刺激因子调控TNF α 、转化生长因子 β 1(TGF β 1)、血小板源性生长因子(PDGF)等的表达。因此,EGR-1的活化成为许多炎症相关疾病发生发展的重要环节。重症急性胰腺炎(SAP)由“局部炎症”发展成为“全身炎症”是其显著病理特征之一^[4]。“全身炎症”的表现之一是全身炎

症反应综合征(SIRS)。EGR-1作为一种立早基因在SAP从最初的局部炎症转变为严重威胁生命的全身病变中是否有作用,如何起作用,目前国内研究极少。Ji等^[5]发现EGR-1基因缺失小鼠以雨蛙素诱导AP后,其单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、组织因子(TF)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等基因表达水平均较以同样方法诱导AP的正常小鼠显著降低,并且肺脏病变程度也有所减轻。陈学清等^[6]发现大鼠在注射雨蛙素2h后,绝大部分胰腺腺泡出现EGR-1高表达,且胞核和胞浆均有表达。

本实验发现,此转录因子在肝组织中的表达

不仅与 AP 病变程度有关,而且在发病后不同时间的表达也各不相同。首先,不同程度的 AP,其肝组织的表达不仅在程度上存在差异,而且在表达部位上也有所不同。对于相对较轻型的胰腺炎,如 1% 牛磺胆酸钠胆胰管注射组(B),在发病后 3h, EGR-1 仅表达于肝细胞胞浆中;而随着牛磺胆酸钠浓度的升高,则开始出现肝细胞核内的表达,且其数量随着胰腺炎程度的加重而增加。其次, EGR-1 在 AP 发病后不同时间肝组织的表达具有各自显著的特点。发病后 1h EGR-1 在肝细胞表达以核内为主。此外,几乎所有肝窦内皮细胞均有表达(胞核和胞浆),还可见到几个库普弗细胞(胞核及胞浆均有)的表达。发病后 3h, EGR-1 已几乎不在内皮细胞表达,但在肝细胞的表达仍然很强烈。6h 后其在肝细胞的表达明显下降,但仍可见少数核内表达。12h 及 24h 后,肝细胞表达数量进一步下降,也几乎见不到核内表达。第三,中心静脉周围的肝细胞阳性表达比例高于其他部位的肝细胞。本研究还显示, EGR-1 在肝组织表达的量与反映 AP 病情严重程度的各指标如肝实质酶、炎性细胞因子均呈显著正相关,表明 EGR-1 可能在 AP 并发的肝损害中起重要作用。这种作用可能是通过介导炎性细胞因子生成来实现的。

目前国内外尚无同类研究。初令等^[7]观察了 EGR-1 在大鼠矽肺不同时间肺组织的表达情况,发现二氧化硅粉尘吸入后 1~7d EGR-1 在肺组织中主要表达于肺泡巨噬细胞,且大部分位于胞核,而在 14~28d,表达部位主要在胞浆。朱斌等^[8]观察了 NF- κ B 在 AP 大鼠肺组织中的表达,也表现出与本研究相似的特点;即在生理盐水胆胰管注射大鼠, NF- κ B 仅在胞浆中有少量表达,而在 3.5% 牛磺胆酸钠胆胰管注射组,其表达部位则主要在胞核。Ji 等^[5]虽然对 EGR-1 在胰腺组织的表达进行了观察,但未说明具体表达部位。陈学清等^[6]观察到 EGR-1 mRNA 和蛋白早在造模后 1h 即可出现,高峰位于造模后 2h,并可持续到 4h。笔者观察到的高峰位于 AP 造模后 3h。因为目前国内外无商品化 EGR-1 磷酸化抗体供应,本研究所用抗体为非磷酸化抗体,与前两篇相关文献^[5-6]所用抗体完全相同。

本实验观察到的 EGR-1 在不同程度的 AP 及 AP 造模后不同时间肝组织表达的差异,可能与其作为核转录因子本身的特点有关。首先, EGR-1 在肝细胞不同部位表达的差别,可能反映了不同程度 AP 的功能状态有差异。在核内表达,意味着 EGR-1 核内易位,反映其作为转录因子发挥对靶基因的转录调控作用。其次, AP 造模后不同时间细胞表达类型不同,可能反映了在肝内不同细胞该基因起作用的时间不同,或为肝内不同类型细胞对应激的敏感性不同。例如,本研究观察到内皮细胞阳性表达仅仅发生于发病后 1h,而 3h 后则几乎消失,可能反映了 EGR-1 在内皮细胞中表达的特点;即其在内皮细胞发挥作用很早但持续时间很短。这正是此类立早基因的作用特点。至于肝脏中心静脉周围的肝细胞阳性表达比例较高,可能与血管周围的肝细胞受到较多外来刺激(如细胞因子、氧自由基等)有关。

参考文献:

- [1] Murr MM, Yang J, Fier A, *et al.* Regulation of Kupffer cell TNF gene expression during experimental acute pancreatitis: the role of p38-MAPK, ERK1/2, SAPK/JNK, and NF- κ B [J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, 7(1): 20-25.
- [2] 王琦. 肝脏在急性胰腺炎病情发展中的作用(文献综述) [J]. *国外医学·外科学分册*, 2001, 28(04): 206-208.
- [3] 初令, 曾庆富. 转录因子 Egr-1 及其在肺病变中的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(02): 268-272.
- [4] Wilson PG, Manji M, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis as a model of sepsis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 41 (Suppl A): 51-63.
- [5] Ji B, Chen XQ, Misek DE, *et al.* Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator [J]. *Physiol Genomics*, 2003, 14(1): 59-72.
- [6] 陈学清, 姜泊, 宋于刚, 等. 早期生长反应因子-1 和组织因子在大鼠胰腺炎组织中的表达 [J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(11): 1245-1247.
- [7] 初令, 彭劲武, 蒋海鹰, 等. 二氧化硅活化巨噬细胞中核转录因子早期生长反应基因-1 的表达 [J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32(06): 558-562.
- [8] 朱斌, 孙家邦, 张淑文, 等. nf- κ b 活化及 iNOS 基因表达在急性胰腺炎肺损伤中的作用 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2004, 10(04): 248-251.