DOI:10.16016/j.1000-5404.201501236

论著

钠钙交换体 NCX1 在急性胰腺炎发生、发展中的作用

余森源[1,2],谢 睿[2],陈昱杨[2],杨仕明[2],朱 斌[1] (230031 合肥,安徽医科大学解放军临床学院消化内科[1];400037 重庆,第三军医大学新桥医院消化内科[2])

[摘要] **目的** 研究钠钙交换体 NCX1 在急性胰腺炎发生、发展中的作用。**方法** 分离 SD 大鼠胰腺腺泡细胞,用雨蛙素诱导体外 AP 模型,采用 qRT-PCR、Western blot 检测 NCX1、TNF-α、IL-6 mRNA 及蛋白的表达变化;再加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 预处理腺泡细胞,检测 NCX1、TNF-α、IL-6 的表达变化。构建 SD 大鼠 AP 模型,分为阴性对照组,雨蛙素组及雨蛙素 + NCX1 抑制剂组,qRT-PCR 检测比较各组大鼠胰腺组织中 NCX1、TNF-α、IL-6 mRNA 的表达变化,采用生化分析仪检测各组血清淀粉酶浓度的变化;各组大鼠胰腺组织经 HE 染色后观察组织病理学改变。**结果** 从细胞水平证实在急性胰腺炎中 NCX1 及炎症因子 TNF-α、IL-6 的 mRNA 及蛋白表达量较阴性对照组均明显升高($P<0.01$),而加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 预处理后能明显抑制雨蛙素诱导的炎症反应,NCX1、TNF-α、IL-6 的 mRNA 及蛋白表达量较雨蛙素组均明显下降($P<0.01$)。从动物水平证实在 AP 大鼠中 NCX1 及炎症因子 TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达量较阴性对照组明显升高($P<0.01$),其血清淀粉酶浓度较阴性对照组也明显升高($P<0.001$);但加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 后,NCX1、TNF-α、IL-6 的 mRNA 表达量和血清淀粉酶水平较雨蛙素组均有所下降($P<0.01$),同时急性胰腺炎的病理改变程度较雨蛙素组亦明显减轻。**结论** 钠钙交换体 NCX1 介导了急性胰腺炎的发生、发展;提示 NCX1 可以作为急性胰腺炎治疗的靶标。

[关键词] 钠钙交换体 NCX1;急性胰腺炎;钙超载;炎症因子
[中图法分类号] R363.21; R329.11; R576 [文献标志码] A

Role of sodium-calcium exchanger-1 in development of rat acute pancreatitis

Yu Senyuan[1,2], Xie Rui[2], Chen Yuyang[2], Yang Shiming[2], Zhu Bin[1] ([1]Department of Gastroenterology, PLA Clinical College of Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province, 230031; [2]Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the role of sodium-calcium exchanger-1 (NCX1) in the pathogenesis and development of acute pancreatitis (AP). **Methods** Pancreatic acinar cells were isolated and cultured from SD rats, and the obtained pancreatic acini were then treated with caerulein (10^{-7} mol/L) for 60 min to induce AP. Quantitative RT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of NCX1, TNF-α and IL-6 at mRNA and protein levels respectively. After the addition of the specific inhibitor of NCX1, KB-R7943 in the culture medium, the expression levels of above 3 molecules were measured again. SD rats were randomly divided into negative control, caerulein group (AP model group), and caerulein and KB-R7943 treatment group. After the establishment of AP model, quantitative RT-PCR was used to detect the mRNA levels of NCX1, TNF-α and IL-6 in the splenic tissues of every group. The biochemical analyzer was employed to test the content of serum amylase. Histological changes of the pancreas were observed after HE staining. **Results** The *in vitro* study indicated that the mRNA and protein levels of NCX1, TNF-α and IL-6 were significantly

[基金项目] 国家自然科学基金(81400667)
[通信作者] 朱 斌,E-mail: 13955172189@139.com
杨仕明,E-mail: shimingyang@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150617.0848.009.html(2015-06-17)

higher in the AP model group than the negative control ($P<0.01$). While, the specific inhibitors of NCX1, KB-R7943 resulted in significantly suppressed inflammatory responses, and obviously inhibited expression of NCX1, TNF-α and IL-6 at mRNA and protein levels ($P<0.05$). What's more, the in vivo study also indicated the AP rats had significantly higher mRNA levels of the above 3 molecules ($P<0.01$) and higher serum amylase content ($P<0.01$) when compared with control rats. However, the treatment of the NCX1 inhibitor effectively reversed the above phenomena ($P<0.01$). Morphological observation displayed that the treatment of NCX1 inhibitor obviously attenuated the inflammatory changes induced by caerulein. **Conclusion** NCX1 is involved in the pathogenesis and development of AP, indicating that it might be regarded as the treatment target of AP.

[**Key words**] sodium-calcium exchanger-1; acute pancreatitis; calcium overload; inflammation factors

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81400667). Corresponding author: Zhu Bin, E-mail: 13955172189@139.com; Yang Shiming, E-mail: shimingyang@yahoo.com

急性胰腺炎(acute Pancreatitis AP)是多种病因导致胰酶在胰腺内被激活后引起胰腺组织自身消化、水肿、出血甚至坏死的炎症反应,起病急,预后差,重者多伴有休克、多器官功能衰竭等严重并发症,临床病死率近30%,因此急性胰腺炎的发病机制一直是人们研究的热点。急性胰腺炎的发病机制复杂,目前公认的发病机制包括:胰酶异常激活学说、炎症因子学说、胰腺微循环障碍、肠道菌群易位学说以及钙超载学说[1]。钙超载是指细胞质内空间性的钙释放,近年众多报道都已证实胆汁酸、酒精代谢产物等刺激腺泡细胞后,可以导致细胞内 Ca^{2+} 的异常积聚,而胞内的钙负载又促进了胰蛋白酶原的过度活化,引起胰腺自身消化性损伤[2-3]。文献[4]报道细胞内 Ca^{2+} 的上升幅度与胰腺的病理变化呈正相关。因此,曾有国外学者提出钙超载是急性胰腺炎发生的"扳机点"(trigger point)[5]。

钙超载的发生主要有两个重要机制:细胞内过多的钙集聚以及降钙机制的破坏,其中前一机制起主要作用,细胞内的钙集聚通常由内质网 Ca^{2+} 释放(PLC-IP3通路)以及细胞膜上钙通道介导的细胞外 Ca^{2+} 跨膜内流造成[6]。目前如CRAC钙通道、TRPV1通道、TRPC3钙通道等均有文献报道和AP钙超载相关,而钠钙交换体作为调控钙离子重要的双向通道,是否也和AP钙超载有关,至今尚少见报道。

钠钙交换体首见报道于枪乌贼巨大神经轴突及豚鼠心脏上[7],作为细胞膜上一种重要的双向转运蛋白已被证实在胰腺、心肌、神经元等多种组织中均有表达,NCX有3个亚型:NCX1、NCX2、NCX3,近年来NCX1因在人类生理及疾病的研究中具有重要作用而颇受关注。钠钙交换体NCX1具备钙外排及钙内流的双向调控模式(当其被激活时会将3个钠离子转运至细胞内/外,同时将一个钙离子移出/入细胞),生理状态下NCX1是钙外排的主要途径,例如在生理性的胰岛素分泌时NCX1的作用是泵出胞浆内多余钙离子以维持生理功能的平衡[8-9]。而在一些病理状态下NCX1的离子转运方向发生抑转[10]。以往文献报道在脑缺血损伤、肝癌增殖等病理过程中细胞内钙离子均明显增高,而NCX1在上述病理过程中的作用就是将外钙泵入,导致细胞内钙离子浓度增加,从而引起下游一系列生物学效应[11-12]。

那么钠钙交换体NCX1作为胞膜上重要的钙离子调节通道,是否介导了急性胰腺炎钙超载的发生,并进一步通过上调其表达水平共同促进急性胰腺炎的发展。因此,本研究拟在大鼠胰腺腺泡细胞中及大鼠AP模型内验证钠钙交换体NCX1在急性胰腺炎发生、发展中的相关作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

原代大鼠胰腺腺泡细胞为本实验室自己分离,SD雄性大鼠购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 试剂与仪器

1640细胞培养液及胎牛血清(美国HyClone公司),雨蛙素、Ⅰ型胶原酶及大豆胰蛋白酶原抑制剂(美国Sigma-Aldrich公司),NCX1、IL-6、TNF-α抗体(Abcam公司),反转录试剂盒(日本TaKaRa公司),生化分析仪(美国Beckman公司)。

1.3 细胞分离及培养

1.3.1 5~6周龄雄性SD大鼠,体质量180~220 g,禁食不禁水12 h,腹腔注射无菌麻药致死后迅速摘取胰腺组织放入盛有HEPES缓冲液的平皿中(缓冲液:130 mmol/L NaCl,5 mmol/L KCl,10mmol/L HEPES,11 mmol/L 葡萄糖,9 mmol/L 丙酮酸钠,1 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,1 mmol/L $CaCl_2$,0.01% 胰蛋白酶原抑制剂,4 μmol/L NaOH调整pH值为7.4)。

1.3.2 尽量摘除胰腺组织中的血管、淋巴及筋膜组织,用缓冲液清洗干净,用5 mL缓冲液配制混合消化

液(含2 mg/mL Ⅰ型胶原酶和1mg/mL胰蛋白酶原抑制剂)。用配制成的消化液在胰腺被膜下多点注射,使成发泡状。

1.3.3 在平皿内将胰腺组织剪成0.5 mm^3左右大小碎片,移入25 mL三角烧瓶中,37 ℃振荡水浴,20 min后改用新的混合消化液5 mL处理,过程中用滴管轻轻吹打,约10 min。

1.3.4 直至显微镜下见大量由数个胰腺腺泡细胞围成的腺泡团,150目不锈钢网筛过滤,用含4%的牛血清白蛋白的缓冲液终止消化,将分离的胰腺腺泡细胞重悬于含20%小牛血清的1640培养基,放入37 ℃、5% CO_2孵箱平衡30 min恢复其活力。

1.3.5 用4%的台盼蓝染色,活力大于90%后证实细胞分离成功,进行下一步实验[13-14]。

1.4 实验分组及胰腺炎模型的诱导

1.4.1 细胞实验分组及方法 实验分阴性对照组、雨蛙素组、雨蛙素+NCX1抑制剂组共3组,雨蛙素组在胰腺腺泡细胞中按照每孔(约1.5×10^6个细胞)加入10^{-7} mol/L雨蛙素作用1 h[13];阴性对照组加入等量PBS;雨蛙素+NCX1抑制剂组提前30 min按10^{-6}mol/L加入NCX1特异性抑制剂KB-R7943[15]。在雨蛙素刺激1 h后收集细胞检测各组NCX1及炎症因子TNF-α、IL-6的表达。

1.4.2 动物实验分组及方法 实验同样分为阴性对照组、雨蛙素组、雨蛙素+NCX1抑制剂组,每组3只大鼠。雨蛙素组:在SD大鼠称质量后按照50 μg/(kg·h)剂量腹腔注射雨蛙素[16],共6次;阴性对照组注射相应剂量无菌生理盐水;雨蛙素+NCX1抑制剂组在每次雨蛙素注射前30 min按3×10^{-6} mol/(kg·h)腹腔注入NCX1特异性抑制剂KB-R7943,共6次。诱导结束后6 h同时麻醉处死大鼠[16]。

1.5 qRT-PCR检测

使用TRIzol提取总RNA,将总RNA逆转录为cDNA,采用SYBR Green两步法进行PCR扩增反应:95 ℃预变性30 s;95 ℃变性5 s;60 ℃退火30 s,扩增40个循环。GAPDH作为内参,每个标本设置3个复孔。

1.6 Western blot检测

SDS裂解液提取总蛋白,沸水浴5 min使蛋白变性,使用RCDC法测定蛋白浓度,每孔上样量80 μg进行SDS-PAGE电泳。常规湿转法转膜,5%脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜(NCX1浓度稀释比例1∶3 000;TNF-α浓度稀释比例1∶1 000;IL-6浓度稀释比例1∶1 000;β-actin浓度稀释比例1∶500),二抗室温孵育1 h(兔抗1∶10 000;鼠抗1∶5 000)。ECL化学发光法显影。

1.7 胰腺组织苏木精-伊红染色

取胰腺组织置于4%中性甲醛缓冲液固定,常规脱水、包埋、切片、HE染色,内镜下观察组织学改变情况。

1.8 血清淀粉酶测定

采用第三军医大学新桥医院检验科Beckman生化分析仪测定AP模型大鼠血清淀粉酶浓度。在建模6 h后麻醉各组大鼠,抽取左心室血液3 mL,4 000 r/min离心5 min后收取血液上清。

1.9 统计学处理

应该SPSS 13.0统计软件分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用t检验或非参数秩和检验,多组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 胰腺腺泡细胞的分离

使用Ⅰ型胶原酶消化大鼠胰腺组织分离胰腺腺泡细胞,将分离的胰腺腺泡细胞重悬于含20%小牛血清的1640培养基,使用倒置显微镜观察,可见大量悬浮的呈球形的胰腺腺泡细胞,结果见图1。

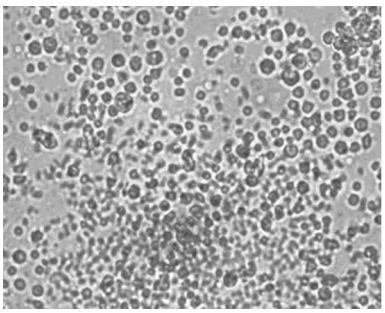


图1 倒置显微镜观察使用Ⅰ型胶原酶分离大鼠的胰腺腺泡细胞变化 (×100)

2.2 雨蛙素刺激胰腺腺泡细胞后不同时间点NCX1、TNF-α mRNA表达水平的变化

采用雨蛙素诱导胰腺腺泡细胞发生体外AP,分别在雨蛙素加入后30 min,1、3、6、12 h检测NCX1、TNF-α mRNA的表达变化,筛选最佳雨蛙素刺激时间点。qRT-PCR结果显示在雨蛙素刺激腺泡细胞1 h后,NCX1表达达到高峰,变化最为明显,其表达量(3.205±0.428)较阴性对照组表达量(0.709±0.125)明显升高($P<0.01$);与此同时TNF-α的表达量(1.823±0.265)较阴性对照组(0.408±0.03)也显著升高($P<0.01$)。

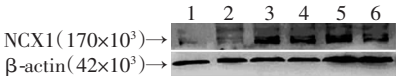
2.3 NCX1抑制剂KB-R7943对AP中NCX1、TNF-α、IL-6 mRNA表达变化的影响

选取1 h为最佳作用时间点,采用雨蛙素诱导胰腺腺泡细胞发生体外AP,qRT-PCR实验结果显示雨

蛙素组的 NCX1 mRNA 表达量(16.044 ± 0.692)明显高于阴性对照组(1.000 ± 0.134)($P < 0.001$);TNF-α mRNA 表达量(2.121 ± 0.255)明显高于阴性对照组(1.000 ± 0.110)($P < 0.01$);同时 IL-6 mRNA 表达量(7.469 ± 0.813)也明显高于阴性对照组(1.000 ± 0.431)($P < 0.01$)。而当加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 处理细胞后,qRT-PCR 结果显示雨蛙素 + NCX1 抑制剂组的 NCX1 mRNA 表达量(0.386 ± 0.175)明显低于雨蛙素组($P < 0.001$);TNF-α mRNA 表达量(0.691 ± 0.149)明显低于雨蛙素组($P < 0.01$);同时 IL-6 mRNA 表达量(0.506 ± 0.173)也明显低于雨蛙素组($P < 0.01$)。这表明 NCX1 抑制剂 KB-R7943 能明显下调雨蛙素诱导的 AP 中 NCX1、TNF-α、IL-6 mRNA 的增高。

2.4 雨蛙素刺激胰腺腺泡细胞后不同时间点 NCX1 蛋白表达水平的变化

采用雨蛙素诱导胰腺腺泡细胞发生体外 AP 后,分别在雨蛙素加入后 30 min,1、3、6、12 h 检测 NCX1 蛋白的表达变化,Western blot 结果显示雨蛙素刺激细胞 1 h 后,NCX1 蛋白水平较阴性对照组明显升高($P < 0.05$,图 2)。



1:阴性对照组;2:雨蛙素刺激 30 min;3:雨蛙素刺激 1 h;4:雨蛙素刺激 3 h;5:雨蛙素刺激 6 h;6:雨蛙素刺激 12 h

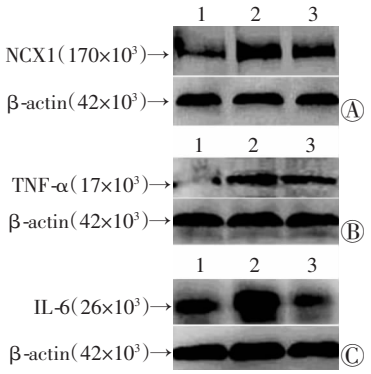
图 2 Western blot 检测雨蛙素刺激腺泡细胞后 NCX1 在不同时间点蛋白表达水平的变化

2.5 NCX1 抑制剂 KB-R7943 对 AP 中 NCX1、TNF-α、IL-6 蛋白表达变化的影响

选取 1 h 为最佳时间点,采用雨蛙素诱导胰腺腺泡细胞发生体外 AP,Western blot 检测结果显示雨蛙素组 NCX1 及炎症因子 TNF-α、IL-6 的蛋白表达较阴性对照组均明显上调($P < 0.01$)。而当使用 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 处理细胞后,NCX1 以及炎症因子 TNF-α、IL-6 的蛋白表达水平较雨蛙素组均明显下降($P < 0.05$)。由此可见,NCX1 抑制剂 KB-R7943 能明显下调雨蛙素诱导的 AP 中 NCX1、TNF-α、IL-6 的蛋白增高(图 3)。

2.6 NCX1 抑制剂 KB-R7943 对 AP 模型大鼠胰腺组织病理学改变的影响

各组大鼠胰腺组织经 HE 染色,镜下见阴性对照组胰腺腺泡排列规则,腺泡腔完整,无炎性细胞浸润,未见充血、水肿及坏死等。而雨蛙素组镜下可见胰腺叶间隔及小叶间隔距离增宽,伴有炎性细胞浸润,血管充血扩张,以及散在多发坏死。在雨蛙素 + NCX1 抑制剂组可见腺腺泡排列基本规则,腺泡腔大部分完整,胰腺叶间隔及小叶间隔距离有所增宽,有少量炎性细胞浸润,无明显血管扩张及充血坏死。可见使用 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 后,其胰腺组织的病理改变较雨蛙素组明显减轻(图 4)。



1:阴性对照组;2:雨蛙素组;3:雨蛙素 + NCX1 抑制剂组
a:$P < 0.01$,与阴性对照组比较;b:$P < 0.05$,与雨蛙素组比较;c:$P < 0.01$,与雨蛙素组比较

图 3 Western blot 检测各组胰腺腺泡细胞中 NCX1(A)、TNF-α(B)、IL-6(C)的蛋白表达变化

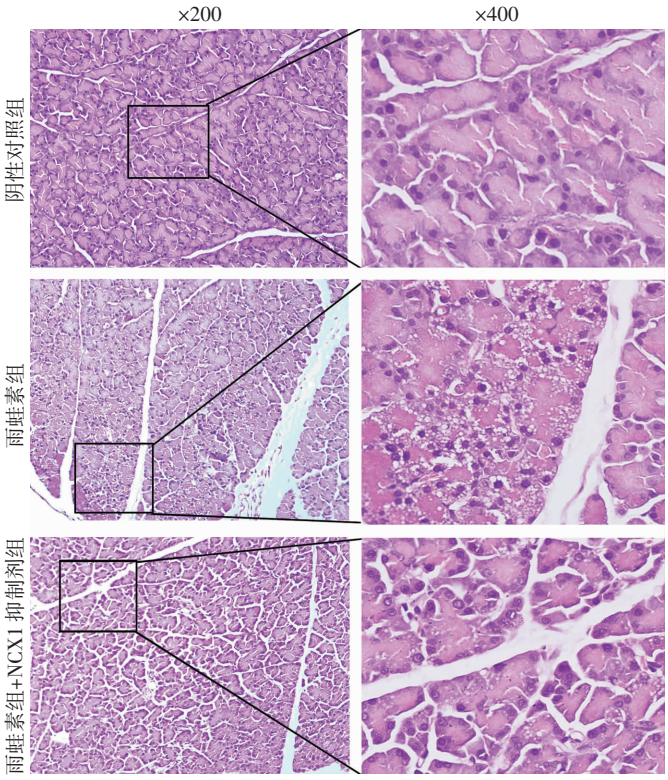


图 4 各组胰腺组织病理学变化 (HE)

2.7 NCX1 抑制剂 KB-R7943 对 AP 模型大鼠血清淀粉酶浓度的影响

采用生化分析仪测定各组 AP 模型大鼠血清淀粉酶浓度。结果显示雨蛙素组血清淀粉酶浓度(1 938.15 ± 99.97) IU/L 明显高于阴性对照组(322.01 ± 20.70) IU/L ($P<0.001$)。而同时腹腔注射 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 后,其血清淀粉酶浓度(1 192.47 ± 93.59) IU/L 较雨蛙素组有明显下降($P<0.01$)。

2.8 NCX1 抑制剂 KB-R7943 对 AP 模型大鼠胰腺组织内 NCX1、TNF-α、IL-6 mRNA 表达的影响

采用雨蛙素腹腔注射 SD 大鼠建立急性胰腺炎模型 6 h 后,麻醉致死大鼠。提取胰腺组织总 RNA,qRT-PCR 检测各组大鼠胰腺组织中 NCX1 以及炎症因子 TNF-α、IL-6 mRNA 的表达。结果显示雨蛙素组的 NCX1 mRNA 表达量(0.527 ± 0.059)明显高于阴性对照组(0.237 ± 0.034)($P<0.01$);TNF-α mRNA 表达量(0.920 ± 0.260)明显高于阴性对照组(0.173 ± 0.063)($P<0.01$);IL-6 mRNA 表达量(0.507 ± 0.006)也明显高于阴性对照组(0.127 ± 0.078)($P<0.01$)。而当加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 后,雨蛙素 + 抑制剂组的 NCX1 mRNA 表达量(0.158 ± 0.059)明显低于雨蛙素组($P<0.01$);TNF-α mRNA 表达量(0.362 ± 0.065)明显低于雨蛙素组($P<0.01$);IL-6 mRNA 表达量(0.290 ± 0.053)也明显低于雨蛙素组($P<0.05$)。这就说明在大鼠体内,NCX1 抑制剂 KB-R7943 也能够明显下调 AP 中 NCX1 及炎症因子 TNF-α、IL-6 mRNA 的增高。

3 讨论

近年来钙超载学说在急性胰腺炎发病机制的研究中逐渐受到重视。已有文献报道证实,当可诱导急性胰腺炎发生的超强刺激因素如酒精代谢产物、胆汁酸、脂肪酸等破坏了腺泡细胞内 Ca^{2+} 的平衡时,其内质网 Ca^{2+} 储存池消耗殆尽,进而诱发细胞外钙离子大量涌入胞内,而胞液中持续的 Ca^{2+} 升高将会导致胰蛋白酶原的异常激活[17],使得细胞大量坏死。而当腺泡细胞的应答不强烈时,Ca^{2+} 从内质网储存池中释放不完全,细胞的坏死发生也相对减少。可见钙超载导致的腺泡内胰蛋白酶原的异常激活,进而引发的自身消化是急性胰腺炎发生的关键事件[18]。

文献[19 – 20]报道 CRAC 钙通道、TRPV1 通道、TRPC3 钙通道等与 AP 的发生有密切关系,但给予上述钙通道特异性的阻断剂或者通过 shRNA 敲除其表达后,并不能完全抑制因刺激因素导致的细胞内钙升高,只能在一定程度上有效的降低钙超载的程度。由此可见,上述离子通道并非是介导 AP 钙超载的唯一途径,必然还存在着其他参与钙超载调控的钙离子通道。因此,本研究就钠钙交换体 NCX1 在促进急性胰腺炎发生、发展中的作用进行探讨。

首先我们从大鼠胰腺中分离胰腺腺泡细胞,采用雨蛙素孵育诱导体外急性胰腺炎发生。Western blot 和 qRT-PCR 结果证实在 AP 中 NCX1 蛋白及其 mRNA 表达水平较阴性对照组明显升高,炎症因子 TNF-α、IL-6 在蛋白和 mRNA 表达水平较阴性对照组也显著上调。而当加入 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 预处理腺泡细胞后,NCX1 蛋白及 mRNA 的表达水平较雨蛙素组均明显下调;同时 TNF-α、IL-6 在蛋白和 mRNA 水平较雨蛙素组也显著下调。文献[14,21 – 22]报道在 AP 中,胰腺腺泡细胞能够通过自身分泌炎症细胞因子,促进白细胞向损伤胰腺组织趋化,加重局部及全身炎症反应,促进腺泡细胞坏死。这就从细胞水平说明钠钙交换体 NCX1 与急性胰腺炎的发生、发展密切相关,而抑制钠钙交换体 NCX1 可有效降低钙超载,从而减轻腺泡细胞自身分泌的 AP 相关炎症因子水平,进而可以减轻 AP 炎症反应。

当然急性胰腺炎发生是复杂的病理生理过程,各因素之间既互相独立又相互渗透,共同促进 AP 的发生、发展,选择性建立动物 AP 模型是探讨其发病机制和治疗策略的新视窗。所以我们进一步采用雨蛙素注射大鼠腹腔建立动物胰腺炎模型[12],发现雨蛙素组 AP 大鼠的血清淀粉酶较阴性对照组正常大鼠明显升高($P<0.001$);而抑制 NCX1 后,大鼠血清淀粉酶较雨蛙素组又明显下降($P<0.01$)。此外我们通过 qRT-PCR 也验证了在雨蛙素组大鼠胰腺组织中 NCX1 及炎症因子 TNF-α、IL-6 mRNA 较阴性对照组有明显上调;而通过 KB-R7943 抑制 NCX1 后,其 NCX1、TNF-α 及 IL-6 mRNA 较雨蛙素组又显著下调。这表明在 AP 模型大鼠中,抑制 NCX1 功能后可以明显抑制与急性胰腺炎相关的炎症因子及淀粉酶的升高。最后我们观察了 AP 模型大鼠的胰腺组织学改变,HE 染色结果显示当我们使用 NCX1 特异性抑制剂 KB-R7943 后,与雨蛙素组大鼠相比,胰腺组织的病理改变明显减轻,这就充分说明抑制 NCX1 后可以有效减轻、缓解大鼠急性胰腺炎的严重程度。

参考文献:

[1] Sah R P, Garg P, Saluja A K. Pathogenic mechanisms of a-

cute pancreatitis[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2012, 28(5): 507-515.

[2] Petersen O H, Tepikin A V, Gerasimenko J V, *et al*. Fatty acids, alcohol and fatty acid ethyl esters: toxic Ca^{2+} signal generation and pancreatitis[J]. Cell Calcium, 2009, 45(6): 634-642.

[3] Weber H, Roesner J P, Nebe B, *et al*. Increased cytosolic Ca^{2+} amplifies oxygen radical-induced alterations of the ultrastructure and the energy metabolism of isolated rat pancreatic acinar cells[J]. Digestion, 1998, 59(3): 175-185.

[4] Yamaguchi Y, Akizuki E, Matsumura F, *et al*. Intracellular calcium affects neutrophil chemoattractant expression by macrophages in rats with cerulean-induced pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 1998, 43(4): 863-869.

[5] Ward J B, Petersen O H, Jenkins S A, *et al*. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? [J]. Lancet, 1995, 346(8981): 1016-1019.

[6] Li J, Zhou R, Zhang J, *et al*. Calcium signaling of pancreatic acinar cells in the pathogenesis of pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(43): 16146-16152.

[7] Mukai M, Terada H, Sugiyama S, *et al*. Effects of a selective inhibitor of Na^+/Ca^{2+} exchange, KB-R7943, on reoxygenation-induced injuries in guinea pig papillary muscles[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2000, 35(1): 121-128.

[8] Herchuelz A, Kamagate A, Ximenes H, *et al*. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca^{2+} ATPase in beta cell function and death[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1099: 456-467.

[9] Hamming K S, Soliman D, Webster N J, *et al*. Inhibition of beta-cell sodium-calcium exchange enhances glucose-dependent elevations in cytoplasmic calcium and insulin secretion [J]. Diabetes, 2010, 59(7): 1686-1693.

[10] Khananshvili D. Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions[J]. Pfluger Arch, 2014, 466(1): 43-60.

[11] Dong H, Shim K N, Li J M, *et al*. Molecular mechanisms underlying Ca^{2+}-mediated motility of human pancreatic duct cells[J]. Ann J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(6): C1493-C1503.

[12] Sathish V, Delmotte P F, Thompson M A, *et al*. Sodium-calcium exchange in intracellular calcium handling of human airway smooth muscle[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23662.

[13] Tamizhselvi R, Koh Y H, Sun J, *et al*. Hydrogen sulfide induces ICAM-1 expression and neutrophil adhesion to caerulein-treated pancreatic acinar cells through NF-kappaB and Src-family kinases pathway[J]. Exp Cell Res, 2010, 316(9): 1625-1636.

[14] 付兰英, 饶春燕, 赵晓晏. 硫化氢对离体大鼠胰腺腺泡细胞炎症因子表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(8): 784-788.

[15] Chang P C, Wo H T, Lee H L, *et al*. Paradoxical effects of KB-R7943 on arrhythmogenicity in a chronic myocardial infarction rabbit model[J]. J Cardiol, 2014, [Epub ahead of print].

[16] Kim M S, Hong J H, Li Q, *et al*. Deletion of TRPC3 in mice reduces store-operated Ca^{2+} influx and the severity of acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 2009, 137(4): 1509-1517.

[17] Criddle D N, Gerasimenko J V, Baumgartner H K, *et al*. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? [J]. Cell Death Differ, 2007, 14(7): 1285-1294.

[18] Gerasimenko J V, Gerasimenko O V, Petersen O H. The role of Ca^{2+} in the pathophysiology of pancreatitis[J]. J Physiol, 2014, 592(Pt 2): 269-280.

[19] Gerasimenko J V, Gryshchenko O, Ferdek P E, *et al*. Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel blockade as a potential tool in antipancreatitis therapy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(32): 13186-13191.

[20] Vigna S R, Shahid R A, Liddle R A. Ethanol contributes to neurogenic pancreatitis by activation of TRPV1[J]. FASEB J, 2014, 28(2): 891-896.

[21] Gukovskaya A S, Gukovsky I, Zaninovic V, *et al*. Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor-alpha. Role in regulating cell death and pancreatitis[J]. J Clin Invest, 1997, 100(7): 1853-1862.

[22] Ramudo L, Manso M A, Vicente S, *et al*. Pro- and anti-inflammatory response of acinar cells during acute pancreatitis. Effect of N-acetyl cysteine[J]. Cytokine, 2005, 32(3/4): 125-131.

(收稿:2015-01-31;修回:2015-03-02)

(编辑 王 红)