DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.020

论著

文章编号:1000-5404(2003)12-1076-03

大鼠重症急性胰腺炎过程中UTI抑制IL-6表达的研究

柏健鹰,郭 红,赵晓晏 (第三军医大学附属新桥医院消化内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨尿胰蛋白酶抑制剂(Urinary trypsin inhibitor, UTI)缓解重症急性胰腺炎(Severe acute pancreatitis, SAP)病变的作用机制。方法 应用柱层析法分离纯化得到高纯度UTI;在大鼠胰腺实质内注射5%牛磺胆酸钠液建立大鼠急性出血坏死型胰腺炎模型;酶联免疫吸附法动态检测大鼠正常对照组、SAP模型组和UTI治疗组各组IL-6水平。结果 ①获得了高纯度的UTI;②成功制备大鼠SAP模型;③SAP组大鼠IL-6较NC组显著升高,给与UTI治疗显著降低。结论 UTI减轻大鼠SAP模型的病理损伤程度,与UTI抑制IL-6表达有关。

关键词:尿胰蛋白酶抑制剂;重症急性胰腺炎;白介素-6;大鼠
中图法分类号:R392.13;R576;R977.3 文献标识码:A

Inhibitory effect of urinary trypsin inhibitor on IL-6 expression in severe acute pancreatitis in rats

BAI Jian-ying, GUO Hong, ZHAO Xiao-yan (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the role of human urinary trypsin inhibitor (UTI) in severe acute pancreatitis (SAP). Methods UTI was highly purified from the urine of patients with acute pancreatitis by column chromatography. SAP models were established by injection of 5% sodium taurocholate (NaTc) at dose of 0.1 ml/100 g weight under pancreatic capsule. The interleukin-6 (IL-6) level in each group was measured by ELISA. Results ① The highly purified UTI with high yield was harvested. ② SAP models were established successfully. ③ The level of IL-6 in SAP group was significantly higher than that in NC, but in UTI group, the increase was not obvious. Conclusion The alleviating effect of UTI on the pathological damage degree in rats with SAP is related to the inhibitive effect of UTI on the expression of IL-6.

Key words: urinary trypsin inhibitor; severe acute pancreatitis; interleukin-6; rats

尿胰蛋白酶抑制物(Urinary trypsin inhibitor, UTI)是一种对酸对热较稳定的丝氨酸蛋白酶抑制物,存在于人和其它动物的血和尿中,具有多种抗蛋白酶活性和抗炎功能[1]。研究证实它能有效减轻重症急性胰腺炎发病过程中病理损伤,具有保护作用[2]。越来越多的证据显示,IL-6在急性胰腺炎发病以及病情进展的病理生理过程中发挥重要作用[3,4]。然而UTI对急性胰腺炎IL-6表达的影响少见报道。

本研究拟在建立大鼠重症急性胰腺炎模型(Severe acute pancreatitis, SAP)的基础上,自行分离纯化[1]人UTI,探讨UTI对SAP IL-6表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

Sephadex G-75、SP-Sephadex C-25(Pharmacia公司);UTI标准品(Sigma公司产品,我校试剂中心分装)、5%牛磺胆酸钠液(Sigma公司);IL-6 ELISA试剂盒(IBL公司)。

1.2 尿胰蛋白酶抑制剂(UTI)的分离纯化鉴定[5]

1.2.1 尿液收集 收集急性重症胰腺炎患者尿液共9.2 L,-20 ℃保存。

1.2.2 盐析 每100 ml尿液中加入固体硫酸铵66.2 g至90%饱和度,边加边搅拌,充分溶解混匀,4 ℃冰箱中静置过夜后于4 ℃、5 000 r/min离心20 min。取沉淀置-20 ℃保存,待层析。

1.2.3 Sephadex G-75层析 将沉淀溶解于0.1 mol/L乙酸铵溶液(pH 4.0)中,加入4 cm×40 cm Sephadex G-75层析柱中层析(层析柱事先以相同缓冲液平衡过),相同缓冲液洗脱,每10 ml分段收集。以BAEE为底物,测定其抑制胰蛋白酶活性,以牛

作者简介:柏健鹰(1972-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事急性胰腺炎方面的研究。电话:(023)68774604
收稿日期:2002-11-18;修回日期:2003-02-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血清白蛋白为标准品。选取第 3 个高峰保存, 待进一步层析。

1.2.4　SP-Sephadex C-25 层析　　上述高活性段加入 3 cm× 35 cm SP-Sephadex C-25 柱中层析(层析柱事先以 pH 4.0, 0.1 mol/L 乙酸铵溶液平衡过), 以相同缓冲液洗脱, 线性提高 pH 值至 6.0, 每 5 ml 分段收集。同样方法测定其抑制胰蛋白酶活性和蛋白质含量。选择第 2 个高峰保存备用。

1.2.5　提取物的浓缩保存　　提取物以聚乙二醇浓缩为 1 000 IU/ml, 以 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 分装后－20 ℃保存备用。

1.2.6　UTI 的鉴定　　本实验采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯亮蓝染色, 与标准品对照, 鉴定 UTI 提取物。

1.3　大鼠重症胰腺炎模型的建立[6]

1.3.1　实验动物　　健康成年 Wistar 大鼠 54 只, 体质量 200～300 g, 雌雄不限, 由本校实验动物中心提供。

1.3.2　方法及分组　　用随机数字表法随机将 54 只大鼠随机分成正常对照组(NC, n= 18)、SAP 模型组(SAP, n= 18), UTI 治疗组(UTI, n= 18)。

所有大鼠实验前禁食 12 h, 不禁水。大鼠采用 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射进行麻醉。取平卧位将大鼠固定, 常规皮肤准备、消毒后在无菌条件下进行手术。先行右股静脉置抗凝留置针, 以备抽血标本用。经上腹正中切口入腹。探查, 显露胃并把其提出切口外, 向上方翻转, 旨在使胰腺实质充分显露。在胰尾进针, 沿被膜下向胰头方向推进, 在不同部位将 5%牛磺胆酸钠液(1 ml/kg)注入, 使整个胰腺均匀隆起。退出针头以 5%甲硝唑液冲洗腹腔, 关腹。在大鼠背部皮下注入生理盐水 4～5 ml。正常对照组以生理盐水(1 ml/kg)代替 5%牛磺胆酸钠液, 其余操作同 SAP 组。UTI 组: 在建立 SAP 模型前 10 min 静脉推注 UTI 10 IU/g, 2 min 推完, 余操作同 SAP 组。

1.4　ELISA 法观察各组不同时相点 IL-6 变化

1.4.1　胰腺组织标本　　各组分别于术后 1、2、4、6、12 h(包括 NC 组术前麻醉状态下)各取 2 只大鼠在麻醉状态下采取胰腺组织标本。取部分胰腺组织修成 1 mm× 1 mm× 1 mm 小块, 3%戊二醛固定, 24 h 后用 1%锇酸处理, 环氧树脂 618 包埋, 制成超薄切片, 醋酸锂及柠檬酸铅电子染色。另取部分胰腺组织修成 10 mm× 10 mm× 2 mm 小块材, 立即将组织固定于 10%福尔马林液中, 常规石蜡制片。分别进行肉眼、光镜以及透射电镜的观察。

1.4.2　血标本　　各组(包括 NC 组 6 例、SAP 组 8 例和 UTI 组 8 例)分别于术前麻醉状态下, 术后 1、2、4、6、12 h 分别采取血标本, 置入离心机内, 以 3 500 r/min 离心 15 min, 置于－20 ℃保存, 用酶联免疫吸附法测定 IL-6。具体步骤参照试剂盒说明书。

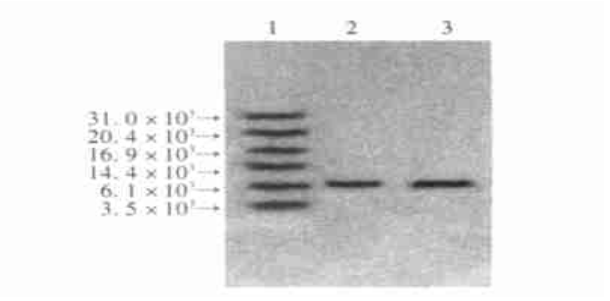
1.5　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间均数采用 t 检验。

2　结果

2.1　UTI 的分离纯化鉴定

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。可见提取的 UTI 和 UTI 标准品均呈现单一沉淀弧, 二者处于相对应的位置, 分子质量约为 6 200, 见图 1。



1: Marker; 2: Standard product; 3: Extract

图 1　提取物 SDS-聚丙烯酰腰凝胶电泳

Fig 1　Map of the purified product by SDS-gel electrophoresis

2.2　胰腺组织的病理学观察

2.2.1　肉眼观察　　NC 组胰腺组织为粉红色, 质地柔软, 未见异常; SAP 组胰腺组织自 1 h 后均有明显水肿、出血, 2 h 后均见血性腹水, 且随时间延长腹水量逐渐增多, 4 h 后可见明显钙化灶及出血坏死灶; UTI 组 2 h 后可见轻度水肿, 6 h 后见少量腹水, 12 h 后均可见钙化灶及坏死灶。

2.2.2　光镜检查　　NC 组胰腺组织结构基本正常, SAP 组 1 h 后可见胰腺间质大量红细胞及炎性细胞浸润, 2 h 后可见胰内及胰周脂肪组织坏死, 胰管和血管损伤严重, 可见微血栓形成, 4 h 后可见明显钙化灶和大片状坏死及出血现象。UTI 组病理改变较 SAP 组明显减轻, 2 h 后胰腺间质可见大量红细胞, 淋巴结内炎性细胞浸润, 4 h 见少量细胞凋亡, 6 h 可见小片状坏死及出血。

2.2.3　电镜观察　　NC 组未见明显异常, SAP 组 1 h 后可见胰腺细胞内线粒体肿胀, 内嵴模糊、断裂或空泡样变, 内质网扩张甚至溶解, 2 h 后粗面内质网脱颗粒, 溶酶体肿胀, 次级溶酶体增多, 其它细胞器碎片与溶酶体相融合成一大空泡样结构, 见图 2; UTI 组 2 h 后可见胰腺细胞内线粒体肿胀, 内嵴模糊, 内质网扩张, 6 h 后可见空泡样变, 髓鞘样小体, 见图 3。

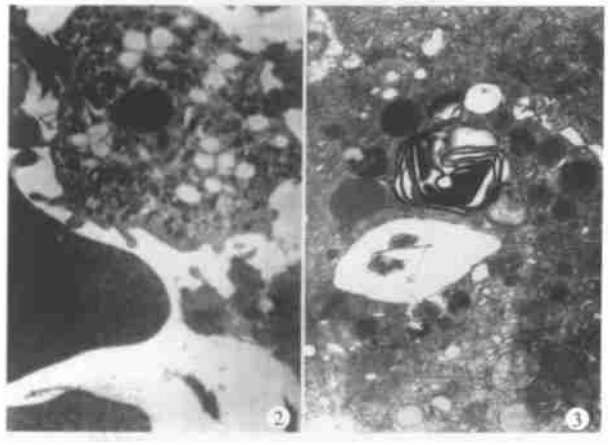


图 2　SAP 组 4 h　(TEM× 4 000)

Fig 2　Spleen of SAP group at the 4th hour　(TEM× 4 000)

图 3　UTI 组 6 h　(TEM× 4 000)

Fig 3　Spleen of SAP group at the 6th hour　(TEM× 4 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 各组各时相点 IL-6 的测定结果，见表 1

表 1 各组 IL-6 的表达水平（mg/L，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Expression level of IL-6 in each group（mg/L，$\bar{x}\pm s$）

Group	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	12 h
NC	12.0±1.8	12.0±1.8	12.0±1.8	12.0±1.8	12.0±1.8	12.0±1.8
SAP	11.8±1.8	73.7±11.7 **△△	116.4±19.1 **△△	176.6±16.4 **△△	106.0±15.5 **	175.3±12.6 **
UTI	11.1±1.1	19.3±2.3 *	48.6±4.5 **	72.4±8.0 **	11.1±1.1	11.1±1.1

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* NC；△△：$P<0.01$ *vs* UTI

3 讨论

尿胰蛋白酶抑制剂（Urinary trypsin inhibitor，UTI）是从人尿中分离出来的具有抑制多种丝氨酸蛋白酶活性的糖蛋白。根据尿的来源和分离纯化方法不同，得到的 UTI 的理化性质差异较大，分子质量为 6 000～70 000[7]。本研究采用硫酸铵盐析法分离尿中 UTI，方法简单，费用低廉，所需设备要求不高。利用分子筛原理，应用 Sephadex G-75 和 SP-Sephadex C-25 两步法成功纯化提取物，获得 UTI 纯品，经鉴定达到电泳纯，分子质量为 6 200。研究结果表明，采用硫酸铵盐析和层析法（分子筛）分离纯化尿液中 UTI 仍然是一种行之有效的方法，能够满足实验室少量应用的需要。

本研究采用胰腺实质内注射改良法建立大鼠急性出血坏死型胰腺炎模型[6]。动态观察重症急性胰腺炎病理改变，发现 UTI 组光镜、电镜下病理改变均明显轻于 SAP 组，UTI 组在 6 h 内未出现大片状坏死，结果提示 UTI 能有效减轻重症急性胰腺炎发病过程中病理损伤，具有一定保护作用。越来越多的实验显示，IL-6 在急性胰腺炎发病及发展的过程中发挥重要作用。IL-17、TNF-a、IL-1b 等致炎细胞因子能显著增高胰腺腺泡肌成纤维细胞 IL-6 mRNA 的表达及 IL-6 的分泌[8]；以 IL-6 为主的大量炎性细胞因子可致重症胰腺炎向多器官功能衰竭发展[9]；IL-6 甚至可以作为预示急性胰腺炎患者并发呼吸衰竭的指标[10]。本研究显示 IL-6 水平在早期即出现大幅度显著性增高，而 6 h 后，其水平虽然仍继续升高，但其增高幅度且明显减小，提示 IL-6 可能在急性胰腺炎起病早期起着至关重要的作用。结果与相关报道相符[11]。本研究动态观测 IL-6 的水平，显示 UTI 组水平虽较 NC 组显著增高，但其增高水平却显著低于 SAP 组，提示 UTI 能够有效抑制大鼠 SAP IL-6 水平的增高，从而缓解重症急性胰腺炎的病变。研究显示 UTI 对 IL-6 表达的抑制可能是通过抑制单核细胞释放 IL-6 实现的，具体机制有待进一步研究证实。

参考文献：

[1] Hirose J, Ozawa T, Miura T, *et al*. Human neutrophil elastase degrades inter-alpha-trypsin inhibitor to liberate urinary trypsin inhibitor related proteins[J]. Biol Pharm Bull, 1998, 21(7): 651－656.

[2] Kakinuma C, Kuwayama C, Kaga N, *et al*. Trophoblastic apoptosis in mice with preterm delivery and its suppression by urinary trypsin inhibitor [J]. Obster Gynecol, 1997, 90(1): 117－124.

[3] Shimada M, Andoh A, Hata K, *et al*. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators[J]. J Immunol, 2002, 168(2): 861－868.

[4] Mayer J, Rau B, Gansauge F, *et al*. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications[J]. Gut, 2000, 47(4): 546－552

[5] Muramatu M, Mori S, Matsuzawa Y, *et al*. Purification and characterization of urinary trypsin inhibitor, UTI68, from normal human urine, and its cleavage by human uropepsin[J]. J Biochem, 1980, 88(5): 1317－1329.

[6] 薛建国，王 宇，许元弟. 建立大鼠急性出血坏死性胰腺炎模型方法的改进[J]. 中华实验外科杂志，1994，11(5)：313

[7] 阎家麒，戴承铨，朱建梅，等. 人尿胰蛋白酶抑制剂工艺研究[J]. 中国医药工业杂志，1992，23(4)：149－150.

[8] Shimada M, Andoh A, Hata K, *et al*. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators[J]. J Immunol, 2002, 168(2): 861－868.

[9] Yoshinaga K, Washizuka M, Segawa Y. Fasting exacerbates acute pancreatitis by occlusion of the common bile duct in rats[J]. Jpn J Pharmacol, 2000, 84(4): 455－461

[10] Mayer J, Rau B, Gansauge F, *et al*. Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications[J]. Gut, 2000, 47(4): 546－552

[11] Kanayama N, Maehara K, Suzuki M, *et al*. The role of chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor in inhibition of LPS-induced increase of cytosolic free Ca^{2+} in HL60 cells and HUVEC cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 238(2): 560－564.

（编辑 汪勤俭）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net