

下调 CCN1 表达抑制重症急性胰腺炎炎症反应

郭美霞 李敏利 吴晓尉 王 彬 张晓华

摘 要 **目的** 探究富半胱氨酸蛋白 61 (Cyr61/CCN1) 在重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 大鼠模型中的表达水平, 及其对胰腺组织炎症的影响。**方法** 36 只 SD 雄性大鼠随机分成空白对照组 (control 组)、SAP 模型组 (SAP 组) 及 SAP + CCN1 干预组 (CCN1 治疗组); 采用 4% 牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射制备 SAP 大鼠模型, 分别于造模后 6、12、18h 检测各指标; 采用 ELISA 法检测血清 TNF- α 表达情况及血清淀粉酶 (AMY) 的水平, HE 染色方法观察胰腺病理形态学改变, Western blot 法检测胰腺组织 CCN1 活化情况。**结果** 与 control 组比较, SAP 组 AMY、TNF- α 血清水平随造模时间延长明显升高, 胰腺损伤程度逐步加重 ($P < 0.05$), SAP 各组 CCN1 表达水平明显高于空白对照组; CCN1 治疗组 AMY、TNF- α 血清水平较 SAP 组明显下降, 胰腺损伤程度明显减轻 ($P < 0.05$), 各时间点比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** CCN1 在 SAP 早期炎症反应过程中可能起促进作用, 下调 CCN1 的表达可减轻 SAP 炎症反应。

关键词 重症急性胰腺炎 富半胱氨酸蛋白 61 肿瘤坏死因子 α

中图分类号 R333

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.07.021

Down-regulation of CCN1 Inhibits Inflammatory Response in Severe Acute Pancreatitis. GUO Meixia, LI Minli, WU Xiaowei, et al. Department of Gastroenterology, General Hospital of Eastern Theater Command, Jiangsu 210002, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of Cysteine-rich 61 (Cyr61/CCN1) in severe acute pancreatitis (SAP) rats and the effect of pancreatic tissue inflammation. **Methods** A total of thirty-six male SD rats were randomized into control groups (Control groups), SAP groups and CCN1 treatment groups. SAP was induced by retrograde infusion of 4% sodium taurocholate into the biliary-pancreatic duct. Detect each indicator at 6, 12, 18h. The levels of amylase (AMY), TNF- α in serum were determined by ELISA. The histopathologic changes of pancreas were examined under a light microscope. The expression of CCN1 in pancreas was detected by Western blot. **Results** Compared with the normal control group, the serum levels of AMY and TNF- α in the SAP group increased significantly with prolonged modeling time. In addition, SAP groups showed severe degrees of pancreatic injury gradually ($P < 0.05$). The expression of CCN1 was significantly higher in SAP groups than the control group. Compared with the SAP group, the serum levels of AMY and TNF- α in the CCN1 treatment groups reduced significantly with prolonged modeling time. Pancreatic injury was significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** CCN1 plays an important role in SAP rats, and down-regulating the expression of CCN1 can alleviate the SAP inflammatory response.

Key words Severe acute pancreatitis; Cysteine-rich 61; TNF- α

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 是由多种病因导致的胰腺局部炎性和坏死, 并且伴有全身性炎症反应和多器官功能损害的疾病, “炎症瀑布”反应学说是目前国际认可的发病机制之一。研究显示, SAP 早期释放了大量炎症介质, 并且通过一系列生物级联放大效应, 释放促炎性细胞因子, 主要包括 TNF- α 、IL-6 等, 这些炎症介质在 SAP 发生、发展中起重要调节作用^[1,2]。CCN1 是一种分泌

丰富的、富含半胱氨酸的、肝素结合的细胞外基质相关蛋白, 被认为具有介导细胞黏附和诱导细胞迁移的功能。研究发现, CCN1 作为一种新的促炎性细胞因子参与类风湿关节炎、系统性红斑狼疮的发病机制, 提示 CCN1 作为炎症介质在炎症性疾病中扮演着重要角色, 但 CCN1 在急性胰腺炎中的作用尚未见报道^[3-5]。本研究通过观察 CCN1 信号通路与促炎性细胞因子在 SAP 早期炎症反应过程中的变化, 进一步阐明 SAP 炎症发病机制。

材料与方法

1. 材料和主要仪器: 健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 36 只, 6~8 周龄, 体质量 250g 左右, 购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司。牛磺胆酸钠购自美国 Sigma 公

基金项目: 全军保健专项基金资助项目 (14BJZ28)

作者单位: 210002 南京, 中国人民解放军东部战区总医院干部病房二科消化病区

通信作者: 张晓华, 电子信箱: jszhxh@sina.com

司;CCN1shRNA 质粒由威斯腾生物构建,肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 AMY 的 ELISA 试剂盒均购自中国北京丽科创欣生物科技有限公司;垂直板电泳转移装置、Trans-Blot 转膜装置、电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;一抗:CCN1(兔来源),二抗:羊抗兔 IgG 均购自英国 Abcam 公司。

2. 方法:(1)动物分组及 SAP 模型制备:SD 大鼠随机分为空白对照组(control 组)、SAP 模型组(SAP 组)和 SAP+CCN1 干预组(CCN1 治疗组),每组 12 只。术前 12h 禁食,饮水自由。实验大鼠称重,7%水合氯醛(5ml/kg)注射于腹腔进行麻醉,将大鼠仰卧位固定,取上腹正中切口,显露胰腺,确认胰胆管,以无创动脉夹于近肝门处夹毕胰胆管(近端于左右肝管汇合处远,端于近十二指肠处);在贴近十二指肠开口处逆行穿刺胰管,以微量注射器注射 4%牛磺胆酸钠,给药剂量 1ml/kg,速度 0.2ml/min;为保证牛磺胆酸钠充分进入胰腺,注射完毕后继续将胰胆管夹毕(约 5min 后胰腺组织出现肉眼可见的充血、水肿);补充腹腔积液,确认腹腔内无活动性出血后两层关腹。对照组大鼠模拟胰胆管穿刺操作,但不予以注射任何药物。(2)给药方式:C 组于造模前 12h 按照 50 微克/只的剂量尾静脉注射 CCN1shRNA 质粒,1 次注射。A、B 组于相同时间点注射等量 0.9%氯化钠溶液。CCN1shRNA 质粒的构建:在 pLVX-shRNA2 载体中构建 CCN1shRNA。目的核苷酸序列:5'-GTG-GAGTTAACAAGAAACA-3'。按照制造商的说明,使用 Entranster™-in vivo 转染试剂进行转染,重组质粒测序验证并大量抽提。(3)取材时间点:SAP 建模后 6、12、18h。实验鼠称重并麻醉,开腹于腹主动脉取血,静置血液 1~2h 后离心(3000r/min,20min,4℃),取上层血清于-20℃保存用于 ELISA 检测。取胰腺组织两份,一份放入 4%多聚甲醛中 4℃保存用于 HE 检测;另一份置于-80℃冰箱中保存用于 Western blot 法检测。

3. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. SAP 组大鼠血清 AMY 水平的变化:与 control 组比较,SAP 组大鼠血清 AMY 水平均明显升高,该效应与时间呈正相关,3 个时间点中 18h 达最高水平,各

组间比较差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 1);CCN1 治疗组大鼠血清 AMY 水平较 SAP 组明显下降,各组间比较,差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 1)。

表 1 control 组、SAP 组及 CCN1 治疗组血清 AMY 水平变化 ($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

时间点	control 组	SAP 组	CCN1 治疗组
6h	18.98 $\pm$ 0.68	45.58 $\pm$ 0.80 *	27.28 $\pm$ 1.01 #
12h	20.25 $\pm$ 1.28	64.06 $\pm$ 1.97 *	39.90 $\pm$ 1.58 #
18h	19.40 $\pm$ 1.50	97.96 $\pm$ 1.83 *	61.43 $\pm$ 2.10 #

与 control 组比较,**P* < 0.05;与 SAP 组比较,#*P* < 0.05

2. SAP 组大鼠血清 TNF- α 表达情况:与对照组比较,SAP 组血清 TNF- α 表达水平明显上调,并随着作用时间延长而逐渐升高,造模 18h 时升至 3 个时间点的最高值,与对照组比较,差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 2);CCN1 治疗组大鼠血清 TNF- α 表达较 SAP 组明显下降,各组间差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 2)。

表 2 control 组、SAP 组及 CCN1 治疗组血清 TNF- α 水平变化 (pg/ml , $\bar{x} \pm s$, *n* = 4)

时间点	control 组	SAP 组	CCN1 治疗组
6h	57.47 $\pm$ 1.70	104.87 $\pm$ 2.05 *	68.05 $\pm$ 2.86 #
12h	55.83 $\pm$ 0.93	180.78 $\pm$ 3.74 *	95.30 $\pm$ 2.03 #
18h	56.83 $\pm$ 2.08	221.55 $\pm$ 3.35 *	141.88 $\pm$ 2.30 #

与 control 组比较,**P* < 0.05;与 SAP 组比较,#*P* < 0.05

3. 胰腺组织病理学检查:依据 Kusske 评分标准,从分别从水肿、炎症、出血、坏死 4 个方面对各组病理进行评估比较,对照组大鼠胰腺结构未见明显异常,腺泡结构正常,排列整齐。SAP 组 6h 胰腺小叶正常结构发生改变,间隙增宽,间质充血水肿;SAP 组 12h 胰腺小叶结构破坏,可见少量片状坏死,部分间质血管破裂,并可见大量炎性细胞浸润,胰周脂肪液化坏死;SAP 18h 组胰腺组织见大量坏死区,坏死区腺泡正常结构完全消失(图 1)。与 control 组比较,各时间点大鼠胰腺病理评分比较,差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 3);CCN1 治疗组大鼠胰腺小叶结构破坏、炎性细胞浸润较 SAP 组明显减轻,与 SAP 组比较,各时间点大鼠胰腺病理评分差异均有统计学意义(*P* 均 < 0.05,表 3)。

4. SAP 大鼠胰腺 CCN1 表达情况:Western blot 法检测结果显示,CCN1 在 control 组大鼠胰腺几乎无表达,SAP 组 6h 可见少量表达,随时间延长,CCN1 表达上调,SAP 12h 组表达明显增加,18h 升至最高值,各

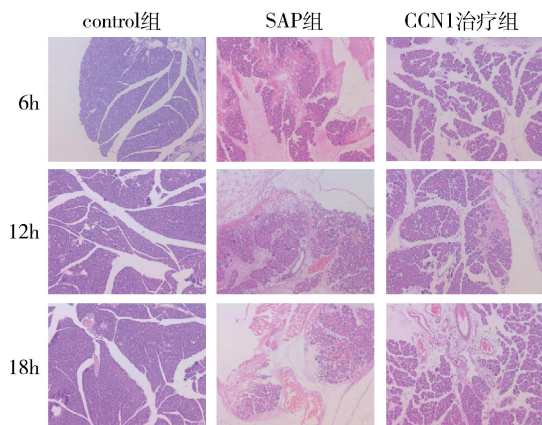


图1 大鼠胰腺组织病理切片(HE, ×100)

表3 control组、SAP组及CCN1治疗组Kusske评分(分, $\bar{x} \pm s, n=4$)

时间点	control组	SAP组	CCN1治疗组
6h	0.33	8.67*	6.30 [#]
12h	0.33	11.67*	7.33 [#]
18h	0.33	13.33*	9.33 [#]

与control组比较, * $P < 0.05$; 与SAP组比较, [#] $P < 0.05$

时间点与control组比较, 差异均有统计学意义(P 均 <0.05); CCN1治疗组胰腺组织CCN1表达明显减少, 各时间点与SAP组比较差异均有统计学意义(P 均 <0.05 , 图2)。

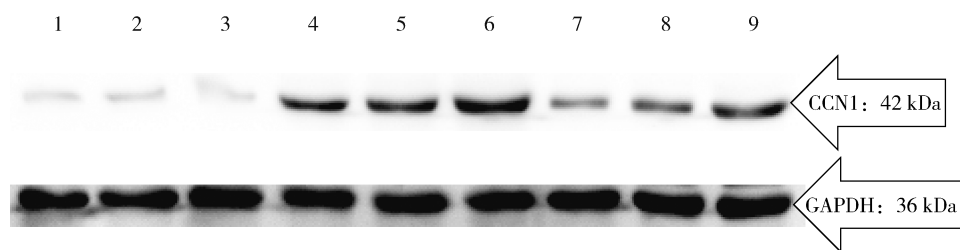


图2 CCN1蛋白表达检测

1~3. control组6、12、18h; 4~6. SAP组6、12、18h; 7~9. CCN1治疗组6、12、18h; 各组分别于6、12、18h检测大鼠胰腺组织CCN1蛋白表达

讨 论

重症急性胰腺炎在发病早期, 胰腺腺泡细胞受损后胰酶释放、单核-吞噬细胞激活, 大量的细胞因子释放, 从而触发炎症介质瀑布样级联反应(cascades), 迅速导致的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory reaction syndrome, SIRS)和多器官衰竭(multiple organ failure, MOF)。阻断胰腺炎早期炎症级联反应可作为突破口, 寻找胰腺炎新的治疗靶点。

本课题组早期研究发现, $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1$ 、 $\text{IL}-6$ 是急性胰腺炎的主要促炎性细胞因子, 且血清及胰腺组织中的浓度随造模时间延长明显升高, 西地那非作用于牛黄胆酸钠诱导的急性胰腺炎大鼠中, 发现 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$ 基因表达明显被抑制后, 胰腺炎症较对照组明显减轻^[6-8]。本研究结果表明, $\text{TNF}-\alpha$ 在SAP组大鼠血清浓度明显升高, 与之前的研究结果一致, 且于造模前12h按照50微克/只的剂量尾静脉注射CCN1shRNA质粒后, 发现血清 $\text{TNF}-\alpha$ 及AMY浓度较SAP组明显降低, 表明CCN1抑制剂可通过降低炎症介质 $\text{TNF}-\alpha$ 浓度, 从而达到减轻炎症的目的。

既往研究发现CCN1可诱导炎症细胞因子单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)mRNA及蛋白水平表达

增加, 且呈剂量及时间依赖性; 分别用CCN1受体阻断剂即整合素 $\alpha_v\beta_3$, FAK抑制剂, PI_3K 抑制剂及AKT抑制剂干预后发现 $\text{NF}-\kappa\text{B}$ 明显抑制^[9], 提示CCN1参与炎症反应的发生、发展。CCN1因其在炎症中的作用而受到特别关注, 本研究旨在探讨CCN1对牛磺胆酸钠诱导的急性胰腺炎大鼠模型的影响, 结果表明, SAP组大鼠血清及胰腺组织中CCN1较control组明显增加, 随着造模时间延长, CCN1浓度呈上升趋势, 胰腺组织炎症坏死评分较正常对照组明显增加, 说明CCN1在急性胰腺炎中呈时间依赖性, 且与胰腺组织炎症程度呈正相关; 经尾静脉注射CCN1shRNA质粒的急性胰腺炎大鼠, 血清及胰腺组织中CCN1浓度明显降低, 胰腺组织的炎症坏死较SAP组明显减轻。该方法对大鼠SAP模型具有良好的治疗效果, 抑制CCN1可降低胰腺炎症、炎症细胞因子表达, 这些发现支持了CCN1抑制剂在动物模型中的抗炎作用, 这为研发急性胰腺炎新的治疗靶点提供依据。

综上所述, 本研究证实了CCN1和 $\text{TNF}-\alpha$ 在急性胰腺炎中扮演重要角色, 与炎症严重程度呈正相关, 抑制了CCN1的表达, 胰腺炎症明显减轻, 但CCN1是否是这条信号通路的始动因素, 是哪个信号

因子激活了这条信号通路,是否还有其他炎性细胞因子参与其中,还需要开展进一步研究,这也是本课题组下一步的研究方向。

参考文献

- 1 Fei S, Li W, Xiang L, *et al.* Protective effect of alprostadil on acute pancreatitis in rats via inhibiting janus kinase 2 (JAK2)/STAT3 signal transduction pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25 (13): 7694 – 7701
- 2 Mota R, Sanchez Bueno F, Berenguer Pina JJ, *et al.* Therapeutic treatment with poly (ADPribose) polymerase inhibitors attenuates the severity of acute pancreatitis and associated liver and lung injury [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 151(7): 998 – 1005
- 3 Zhang Q, Wu J, Cao Q, *et al.* A critical role of Cyr61 in interleukin17 – dependent proliferation of fibroblast – like synoviocytes in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60: 3602 – 3612
- 4 Lin J, Zhou Z, Huo R, *et al.* Cyr61 induces IL – 6 production by fibroblast – like synoviocytes promoting Th17 differentiation in rheumatoid arthritis[J]. *Immunol*, 2012, 188: 5776 – 5784
- 5 Jinpiao Lin, Ningli Li, Huijuan Chen, *et al.* Serum Cyr61 is associ-

ated with clinical disease activity and inflammation in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Medicine*, 2015, 94 (19): e834 – 841

- 6 李敏利, 张晓华. SOCS3 及促炎因子在大鼠重症急性胰腺炎早期炎症反应中的变化 [J]. *解放军医学杂志*, 2019, 3 (44): 233 – 237
- 7 Zhang XH, Li ML, Wang B, *et al.* Caspase – 1 inhibition alleviates acute renal injury in rats with severe acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10457 – 10463
- 8 Dazhang Fanga, Qi Lina, Cheng Wanga, *et al.* Effects of sildenafil on inflammatory injury of the lung in sodium taurocholate – induced severe acute pancreatitis rats [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 52(1): 333 – 344
- 9 You JJ, Yang CH, Yang CM, *et al.* Cyr61 induces the expression of monocyte chemoattractant protein – 1 via the integrin $\alpha v \beta 3$, FAK, PI₃K/Akt, and NF – κ B pathways in retinal vascular endothelial cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(1): 133 – 140

(收稿日期: 2021 – 10 – 25)

(修回日期: 2021 – 11 – 29)

(接第 115 页)

参考文献

- 1 Nishida T. Diagnosis and clinical implications of diabetes in liver cirrhosis: a focus on the oral glucose tolerance test [J]. *J Endocr Soc*, 2017, 1(7): 886 – 896
- 2 陈曦阳光, 吴君. 乙型肝炎肝硬化并发原发性肝癌相关危险因素 Meta 分析 [J]. *肝脏*, 2019, 24(4): 398 – 404
- 3 赵娟, 李娟, 于红卫, 等. 乙型肝炎肝硬化合并 2 型糖尿病病人能量代谢特点的研究 [J]. *肠外与肠内营养*, 2015, 22(1): 6 – 9
- 4 Zhao J, Wang ZY, Li J, *et al.* Influence of diabetes mellitus mellitus on energy metabolism in patients with alcoholic liver cirrhosis [J]. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2020, 32(1): 110 – 115
- 5 Fagour C, Gonzalez C, Suberville C, *et al.* Early decrease in resting energy expenditure with bedtime insulin therapy [J]. *Diabetes Metab*, 2009, 35(4): 332 – 335
- 6 Liu HC, Zhou YB, Chen D, *et al.* Effect of intensive vs conventional insulin therapy on perioperative nutritional substrates metabolism in patients undergoing gastrectomy [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(21): 2695 – 2703
- 7 中华医学会肝病学会分会. 肝硬化诊治指南 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(11): 2408 – 2425
- 8 中华医学会糖尿病学会分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. *中华糖尿病杂志*, 2018, 10(1): 4 – 67
- 9 中华医学会内分泌学会分会. 中国糖尿病患者低血糖管理的专家共识 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2012, 28(8): 619 – 623
- 10 惠威, 徐斌, 郭新会. 乙型肝炎病毒相关的肝源性糖尿病糖代谢异常的临床分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2012, 28(7): 538 – 541

- 11 林敏, 杨明, 张敏, 等. 糖尿病患者胰岛素释放峰值后移的临床意义及其与胰岛 β 细胞功能的相关性研究 [J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8(6): 83 – 85
- 12 Li H, Sun F, Yang W, *et al.* Clinical study of abnormal glucose metabolism and insulin resistance in patients with liver cirrhosis [J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(4): 3522 – 3528
- 13 Clarembeau F, Bale G, Lanthier N. Cirrhosis and insulin resistance: current knowledge, pathophysiological mechanisms, complications and potential treatments [J]. *Clin Sci: Lond*, 2020, 134(16): 2117 – 2135
- 14 郭雅丽, 卢书明, 李春艳, 等. 肝硬化并糖尿病患者胰岛素抵抗及与肝功能关系探讨 [J]. *大连医科大学学报*, 2017, 39(4): 378 – 382
- 15 Taguchi K, Yamanaka – Okumura H, Mizuno A, *et al.* Insulin resistance as early sign of hepatic dysfunction in liver cirrhosis [J]. *J Med Invest*, 2014, 61(1 – 2): 180 – 189
- 16 张国忠, 娄金丽, 汪洋, 等. 慢性乙型肝炎肝源性糖尿病和肝硬化伴肝源性糖尿病患者肝纤维化指标与胰岛素抵抗的相关性分析 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(15): 1610 – 1612
- 17 Okabayashi T, Ichikawa K, Namikawa T, *et al.* Effect of perioperative intensive insulin therapy for liver dysfunction after hepatic resection [J]. *World J Surg*, 2011, 35(12): 2773 – 2778
- 18 李日明. 2 型糖尿病并非酒精性肝硬化患者胰岛素强化治疗的相关性探讨 [J]. *临床医学工程*, 2014, 21(10): 1271 – 1272
- 19 赵娟, 惠威, 窦爱华, 等. 肝硬化合并糖尿病患者发生低血糖症的临床分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2): 329 – 332

(收稿日期: 2021 – 12 – 29)

(修回日期: 2022 – 02 – 06)