

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.02.008

急性胰腺炎中 E-钙粘蛋白的诊断价值

袁伟红¹, 潘琦^{1△}, 陈国昌¹, 陈义钢²

(1. 宜兴市人民医院消化科, 江苏宜兴 214200; 2. 上海交通大学医学院 200025)

摘要:目的 探讨 E-钙粘蛋白(E-cad)在急性胰腺炎中的表达及其严重性的诊断价值。方法 24 只雄性 SD 大鼠随机均分为对照组、轻症急性胰腺炎组(MAP 组)和重症急性胰腺炎组(SAP 组)。通过腹腔注射 L-精氨酸造模,建模 24 h 后测定血清中淀粉酶活性及 E-cad 表达变化,胰腺组织进行病理组织学观察,蛋白免疫印迹(Western blot)检测胰腺组织 E-cad 的蛋白表达。结果 MAP 组和 SAP 组胰腺病理评分、血清淀粉酶值明显高于对照组($P < 0.05$),SAP 组与 MAP 组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$);血清 E-cad 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结果显示:MAP 组($1\ 025.50 \pm 131.33$)pg/mL 和 SAP 组($1\ 561.75 \pm 144.82$)pg/mL 均明显高于对照组(626.50 ± 72.12)pg/mL,且两组之间比较差异也有统计学意义($P < 0.05$);Western blot 检测胰腺组织中 SAP 组 E-cad 表达强于对照组及 MAP 组。结论 E-cad 在急性胰腺炎早期表达明显增高,对其严重性具有一定的诊断价值。

关键词:胰腺炎;诊断;E-钙粘蛋白

中图分类号:R576

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)02-0168-03

The diagnosis value of E-cadherin in acute pancreatitis of rat

Yuan Weihong¹, Pan Qi^{1△}, Chen Guochang¹, Chen Yigang²

(1. Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Yixing City, Yixing, Jiangsu 214200, China;

2. School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China)

Abstract: Objective To explore the diagnosis value and expression of E-cadherin in the acute pancreatitis. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into control group, mild acute pancreatitis (MAP) group and severe acute pancreatitis (SAP) group, 8 case in each groups. The animal model was established by intraperitoneal injection of L-arginine. After 24 hours, the serum levels of amylase and the expression change of variation E-cadherin were tested. The pancreas tissue was taken for histopathological score under microscope. The expression of E-cadherin at protein level in pancreatic tissue was detected by Western Blot. **Results** The histological scores of pancreas and serum amylase were significantly higher in the MAP and SAP groups than those in control group ($P < 0.05$), and difference between SAP group and MAP group was also very significant ($P < 0.05$). The result of ELISA showed that the serum E-cadherin in MAP group [$(1\ 025.50 \pm 131.33)$ pg/mL] and SAP group [$(1\ 561.75 \pm 144.82)$ pg/mL] were significantly higher than that in control group [(626.50 ± 72.12) pg/mL, $P < 0.05$], and there was significant difference between MAP group and SAP group ($P < 0.05$). The result of Western Blot was similar to the result of ELISA. **Conclusion** E-cadherin may have diagnosis value in the acute pancreatitis.

Key words: pancreatitis; diagnosis; E-cadherin

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种具有潜在严重后果的常见疾病,尤其重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)病情复杂,临床表现凶险,可导致胰外多器官的严重损伤而致功能衰竭,病死率高^[1-2]。目前尚无单一的指标能在发病早期(48 h内)快速、准确、方便的预测急性胰腺炎的严重程度^[3]。Pittard等^[4],Sewpaul等^[5]研究发现全身炎症反应和 AP 患者中 E-钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)的表达明显增高,且其表达增高在疾病早期即被发现。本实验通过建立轻症胰腺炎(mild pancreatitis acute, MAP)及 SAP 的大鼠模型,通过分析各组 E-cad 表达情况,揭示 E-cad 在 AP 中的早期诊断价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 24 只,体质量 160~180 g,清洁级,购自浙江省实验动物中心,大鼠适应性饲养 1 周后进行造模实验。大鼠随机均分为 3 组:对照组、轻症急性胰腺炎组

(MAP 组)、重症急性胰腺炎组(SAP 组)。大鼠实验前禁食 12 h,通过 L-精氨酸腹腔注射造模(MAP 组为 6% L-精氨酸,剂量 $1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{次}^{-1}$;SAP 组为 20% L-精氨酸,剂量 $2.5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{次}^{-1}$),共 2 次,间隔 1 h,对照组注射等量生理盐水;造模前后均自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及试剂盒 L-精氨酸、戊巴比妥钠(国药化学试剂有限公司);E-cad 酶联免疫吸附剂测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(美国 GBD 公司);羊抗大鼠 E-cad 抗体(美国 Santa Cruz 公司);ECL 显像试剂盒(美国 Piers 公司)。

1.2.2 标本采集与检测 大鼠于成功造模 24 h 后经 2%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。留取血清用于血淀粉酶及 ELISA 检测。血清淀粉酶活性采用全自动生化分析仪测定,血清 E-cad 表达按照 ELISA 说明书检测。留取大鼠的胰

腺组织一部分用 10% 中性甲醛固定 24~48 h, 石蜡包埋行病理切片检查, 另一部分液氮冻存用于提取蛋白。

1.2.3 胰腺组织病理学评分 苏木精-伊红(HE)染色后, 每张切片随机选取 10 个高倍镜视野, 以水肿、感染、出血和坏死评价胰腺组织损伤程度。具体参考 Rongione 等^[6]的评分标准进行病理评分, 各项最低分为 0 分, 最高分为 4 分, 取各项评分之和为最终得分。

1.2.4 Western blot 检测胰腺组织 E-cad 蛋白水平改变 考马斯亮蓝染色测定提取胰腺组织蛋白样品浓度并调整各上样量至 30 μg, 加入 2×上样缓冲液, 煮沸 5 min 后取上清液在制备好的 10% 的十二烷基-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上(每份样品按顺序加至 2 个孔中)行垂直电泳分离。硝酸纤维素膜电转移印迹。以含 5% 脱脂奶粉封闭, 而后将膜从正中剪开, 一部分加入羊抗大鼠 E-cad 抗体(1:1 000 稀释), 再以辣根过氧化物酶耦联兔抗羊 IgG 抗体(1:2 000 稀释)孵育; 另外一部分加入小鼠抗大鼠 β-actin(1:1 000 稀释), 再以辣根过氧化物酶耦联山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:4 000 稀释)孵育, 以上各步骤间用 PBS-T 常温下充分洗膜, 最后用增强化学发光法(ECL)显色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 ANOVA 单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 胰腺等组织大体形态及病理学改变 SAP 组大鼠胰腺组织出血坏死, 部分见血性腹水, 光镜示胰腺小叶轮廓破坏, 间质水肿, 中性粒细胞和单核细胞浸润; MAP 组可见胰腺肿大, 胰腺周围少量脂肪坏死, 光镜下可见部分胰腺组织明显小叶间水肿, 少量炎性细胞浸润, 未见出血和腺泡细胞坏死; 对照组大鼠腹腔无渗出, 胰腺无水肿, 病理切片光镜下无明显改变。病理评分: MAP 组(6.75±2.12)分和 SAP 组(10.38±0.56)分明显高于对照组(1.75±0.16)分, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且 SAP 组与 MAP 组比较, SAP 组高于 MAP 组($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组胰腺病理评分、血清淀粉酶和 E-cad 比较情况($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	胰腺病理评分(分)	血清淀粉酶(U/L)	E-cad(pg/mL)
对照组	1.75±0.16	301.75±26.89	626.50±72.12
MAP 组	6.75±2.12 ^a	1 003.83±111.52 ^a	1 025.50±131.33 ^a
SAP 组	10.38±0.56 ^{ab}	1 497.29±319.57 ^{ab}	1 561.75±144.82 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 MAP 组比较。

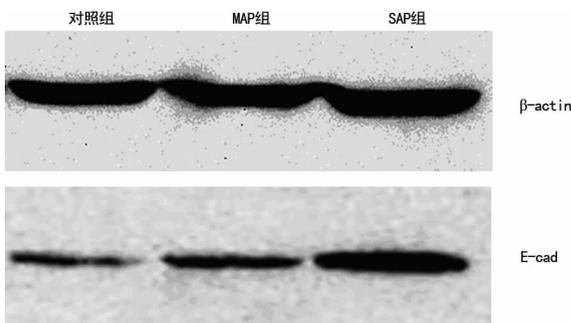


图 1 Western blot 检测 E-cad 蛋白的表达

2.2 血清淀粉酶和 E-cad 表达水平 全自动生化分析仪检测

显示:血清淀粉酶值 MAP 组和 SAP 组明显高于对照组, 且 SAP 组与 MAP 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。ELISA 检测血清 E-cad 结果显示 MAP 组和 SAP 组均明显高于对照组, 且 SAP 组与 MAP 组比较差异也有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 Western blot 检测胰腺组织中 E-cad 蛋白的表达 与预染蛋白 Mark 相对比, β-actin 和 E-cad 特异性免疫印迹条带的相对分子量分别为 43×10^3 和 120×10^3 (图 1)。经电脑扫膜其灰度示, SAP 组 E-cad 表达明显强于对照组及 MAP 组。

3 讨 论

AP 系多种病因导致胰酶在胰腺内被激活后消化自身胰腺及其周围组织所引起的化学性炎症反应^[7]; 临床症状轻重不一, 轻者有胰腺水肿, 重者胰腺发生坏死或出血, 可出现休克和腹膜炎甚至多器官功能障碍, 病情凶险, 病死率高^[8]。近年来 AP 的发病率呈增长趋势, 虽然积极采取各种治疗方法, 但病死率仍高达 20%~30%^[1]。由于血清淀粉酶高低不一定反映病情轻重, 临床胰腺病理取材困难等原因, AP 的早期诊断、早期治疗及疾病严重程度的早期判断仍然是亟待解决的难题。

由于发病因素较复杂, 目前 AP 确切的发病机制尚未完全阐明。Rinderknecht 等^[9]提出的白细胞过度激活假说受到普遍的认可, 该假说认为异常激活的胰酶在造成胰腺损伤的同时, 激活了胰腺内的炎症细胞, 使其释放炎症介质, 而这些介质进入血液循环激活了机体其他组织的炎症细胞, 进一步释放大量的炎症介质而产生一系列连锁反应促成全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征^[10]。E-cad 是一个相对分子量为 120×10^3 的钙依赖性细胞黏附分子, 介导上皮细胞间黏附的跨膜糖蛋白, 在细胞外钙离子参与下介导同种亲和性细胞间的黏附^[11]; E-cad 的异常表达, 导致细胞易去分化, 细胞间连接松散, 易于脱落, 并进一步诱导血管炎症细胞因子等生成, 促进趋化因子转移^[12-13]。Pittard 等^[4]研究发现全身炎症反应综合征患者可溶性 E-cad 的表达水平显著增高, 更为重要的是, 可溶性 E-cad 显著增高在炎症反应早期即被发现。

本研究参照 Czakó 等^[14]的急性胰腺炎造模方法的, 腹腔注射 L-精氨酸建立 AP 的大鼠模型, 检测血清淀粉酶值和胰腺病理, 结果显示 MAP 组和 SAP 组血清淀粉酶值和胰腺病理评分均较对照组明显增高, 差异有统计学意义, 证实造模成功。E-cad 的 ELISA 检测结果及 Western blot 检测胰腺组织中 E-cad 蛋白的表达都显示 SAP 组 E-cad 的含量显著高于 MAP 组, 且两者都显著高于对照组, 提示急性胰腺炎早期(本实验设定为 24 h)E-cad 蛋白高表达, 与 Sewpaul 等^[5]有类似的结果, 提示 E-cad 在 AP 早期具有一定的诊断价值, 可能是判断 AP 严重程度的一个早期客观指标^[15]。本研究为了与现阶段急性胰腺炎诊断的实验室“金标准”——血清淀粉酶比较, 选取了造模后 24 h 为采样时间。其更确切的临床诊断价值尚需多个时间点的对照和临床大样本多中心的统计学分析。

参考文献:

[1] Whitcomb DC. Clinical practice. Acute pancreatitis[J]. N Engl J Med, 2006, 354(20):2142-2150.
 [2] Tian R, Wang RL, Xie H, et al. Overexpressed miRNA-155 dysregulates intestinal epithelial apical junctional complex in severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(45):8282-8291.

- [3] Johnson CD, Charnley R, Rowlands B, et al. UK guidelines for the management of acute pancreatitis[J]. *Gut*, 2005, 54 Suppl 3:1-9.
- [4] Pittard AJ, Banks RE, Galley HF, et al. Soluble E-cadherin concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrome and multiorgan dysfunction syndrome[J]. *Br J Anaesth*, 1996, 76(5):629-631.
- [5] Sewpaul A, French JJ, Khoo TK, et al. Soluble E-cadherin; an early marker of severity in acute pancreatitis[J]. *HPB Surg*, 2009;397375.
- [6] Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(3):960-967.
- [7] Tummala P, Tariq SH, Chibnall JT, et al. Clinical predictors of pancreatic carcinoma causing acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2013, 42(1):108-113.
- [8] Zheng YJ, Zhou B, Ding G, et al. Effect of serum from patients with severe acute pancreatitis on vascular endothelial permeability[J]. *Pancreas*, 2013, 42(4):633-639.
- [9] Rinderknecht H. Fatal pancreatitis, a consequence of excessive leukocyte stimulation? [J]. *Int J Pancreatol*, 1988, 3(2/3):105-112.
- [10] 李鑫, 刘静, 王东. VEGF 在大鼠重症急性胰腺炎中的表

达及意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(28):2951-2953.

- [11] Okamoto R, Irie K, Yamada A, et al. Recruitment of E-cadherin associated with alpha-and beta-catenins and p120ctn to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells[J]. *Genes Cells*, 2005, 10(5):435-445.
- [12] Minami K, Okano H, Okumachi A, et al. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20):13753-13761.
- [13] Mayerle J, Schnekenburger J, Krüger B, et al. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(4):1251-1267.
- [14] Czako L, Takács T, Varga IS, et al. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis; inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin [J]. *J Physiol Paris*, 2000, 94(1):43-50.
- [15] Meriläinen S, Mäkelä J, Sormunen R, et al. Effect of acute pancreatitis on porcine intestine; a morphological study [J]. *Ultrastruct Pathol*, 2013, 37(2):127-138.

(收稿日期:2014-09-12 修回日期:2014-10-22)

(上接第 167 页)

参考文献:

- [1] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1999:385-389.
- [2] 程化奇, 熊舜华, 殷新尤, 等. 大鼠更年期实验模型研究[J]. *上海实验动物科学*, 1993, 13(4):192-196.
- [3] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8):55-57.
- [4] 魏元锋, 汪益涵, 张宁, 等. HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆及脑组织中 5 种单胺类神经递质[J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(9):1942-1943.
- [5] 张璐璐, 冯芳, 叶小敏, 等. 高效液相色谱-荧光法测定小鼠脑组织中单胺递质及其相关物质[J]. *中国医科大学学报*, 2010, 41(4):367-371.
- [6] 邹承鲁. 当代生物学[M]. 北京:中国致公出版社, 2000:394-396.
- [7] 石雪蓉. 衰老机制和抗衰老药物的研究现状[J]. *四川解剖学杂志*, 2008, 16(3):43-45.
- [8] 朱蕾, 张茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4):219-222.
- [9] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, et al. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenalin, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60(3):283-296.

- [10] Nowakowska E, Chodera A, Kus K, et al. Reversal of stress-induced memory changes by moclobemide; the role of neurotransmitters[J]. *Pol J Pharmacology*, 2001, 53(3):227-233.
- [11] De la Fuente M, Hernanz A, Medina S, et al. Characterization of monoamine systems in brain regions of prematurely ageing mice[J]. *Neurochemistry Int*, 2003, 43(2):165-172.
- [12] Hamaue N, Ogata A, Terado M, et al. Entacapone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, improves the motor activity and dopamine content of basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus[J]. *Brain Res*, 2010, 1309:110-115.
- [13] Meyer U, Feldon J. Neural basis of psychosis-related behavior in the infection model of schizophrenia[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 204(2):322-334.
- [14] Moreno FA, Parkinson D, Palmer C, et al. CSF neurochemicals during tryptophan depletion in individuals with remitted depression and healthy controls[J]. *Eur Neuropsychopharm*, 2010, 20(1):18-24.
- [15] Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression[J]. *J Clin Psychiatry*, 2000, 61(Suppl 6):4-6.
- [16] Rehman Hu, Masson EA. Neuroendocrinology of aging [J]. *Age Ageing*, 2001, 30(4):279-287.

(收稿日期:2014-09-21 修回日期:2014-10-22)