

# 内质网应激在大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的临床意义

李 杨, 赵 鹏, 苏 春, 陈建立, 刘 洋, 张国志<sup>△</sup> (河北联合大学附属医院, 河北唐山 063000)

**【摘要】 目的** 探讨内质网应激相关分子葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 及 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP), 是否参与大鼠重症急性胰腺炎 (SAP) 并发肝损伤的发生和发展。**方法** 采用 5% 牛磺胆酸钠建立大鼠 SAP 肝损伤模型, 将 80 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 2 组, 假手术组 (sham 组) 及模型组, 各 40 只, 每组又按时间点随机分为 3、6、12、24、36 h 5 个组。采用全自动生化仪检测血清淀粉酶 (AMY)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的含量变化, HE 染色观察大鼠肝脏组织的形态学变化, 免疫印迹 (Western Blot) 法检测大鼠肝脏组织 GRP78 及 CHOP 的表达水平。**结果** (1) 模型组血清 AMY、ALT 及 AST 水平逐渐升高, 且 12 h 达到峰值 ( $P < 0.05$ ); 模型组比对应的 Sham 组血清酶水平明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 (2) HE 染色结果显示, 肝脏在 24 h 时损伤最严重。 (3) 模型组 GRP78 及 CHOP 表达水平逐渐增加, 且以 24 h 表达水平最高 ( $P < 0.05$ ); 模型组比对应的 sham 组 GRP78 及 CHOP 表达显著增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** SAP 肝损伤发病中 24 h 最严重, GRP78 及 CHOP 表达明显增加, 其可能参与 SAP 肝损伤的发生和发展。

**【关键词】** 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78; CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白; 重症急性胰腺炎; 肝损伤

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.12.024 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)12-1720-03

**The function of endoplasmic reticulum stress in rat severe acute pancreatitis-associated liver injury** LI Yang, ZHAO Peng, SU Chun, CHEN Jian-li, LIU Yang, ZHANG Guo-zhi<sup>△</sup> (Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the changes of endoplasmic reticulum stress-related molecules glucose-regulated protein 78 (GRP78) and CCAAT/enhancerbinding protein homologous protein (CHOP) in the severe acute pancreatitis-associated liver injury and to discuss whether endoplasmic reticulum stress (ERS) participate in the progress of severe acute pancreatitis-associated liver injury. **Methods** The subject established the model of severe acute pancreatitis-associated liver injury by 5% sodium taurocholate. 80 male SD rats were randomly divided into sham groups ( $n=40$ ) and model groups ( $n=40$ ). Then each groups were randomly divided into 3h, 6h, 12h, 24h and 36h according time points. The changes of serum amylase (AMY), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by automatic biochemical analyzer. Pathological changes of the liver were observed with HE staining. The expression of GRP78 and CHOP were detected by Western blot. **Results** (1) The level of serum enzyme were significantly increased and reached the peak value at 12h in model groups ( $P < 0.05$ ). The level of serum enzyme in the model groups were significantly increased compared with corresponding time points of sham groups ( $P < 0.05$ ). (2) The HE staining showed that the injury of the liver was the most serious at 24 h. (3) Western blot test showed that the expression of GRP78 and CHOP in the model groups were significantly increased and reached the peak value at 24 h ( $P < 0.05$ ). The expression of GRP78 and CHOP in the model groups were significantly increased compared with corresponding time points of sham groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The injury of the liver was the most serious at 24h and ERS may be involved in the progress of severe acute pancreatitis-associated liver injury.

**【Key words】** endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78; CCAAT/enhancerbinding protein homologous protein; severe acute pancreatitis; liver injury

重症急性胰腺炎 (SAP) 是临床常见急腹症之一, 其病情凶险, 病死率高, 大多数 SAP 患者在胰腺出血、坏死的同时, 伴有心、肝、肺、肾、胃、肠等器官损伤。其中, 肝脏损伤在胰腺外器官损伤中发病率甚高, 达 88.9%。SAP 并发肝损伤不但可以加重胰腺炎病情, 而且容易引起多器官功能障碍, 导致患者病死, 病死率高达 30%~40%<sup>[1]</sup>。众多研究表明, SAP 发病机制可能与炎性介质、氧自由基、线粒体应激及内质网应激有关。目前, 内质网应激被认为是肝损伤发生过程中较重要的因子。

内质网应激 (ERS) 是指在各种不良情况下被破坏, 功能发

生紊乱, 使大量错误折叠、未折叠蛋白在内质网腔内累积及钙平衡紊乱的过程。当 ERS 时葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 可以启动未折叠蛋白反应 (UPR)<sup>[2]</sup>, UPR 具有增强内质网腔内蛋白折叠和降解的功能, 并下调蛋白合成能力, 减轻各种应激对细胞的损伤, 使细胞适应当前环境而生存; 但在持续而又严重的 ERS 过程中, UPR 将不足以抵抗 ERS, 从而刺激细胞产生一系列促进细胞凋亡的蛋白, 如 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP)、Caspase-12, 从而导致细胞凋亡<sup>[3]</sup>。近年来, 关于 ERS 与各种因素造成的肝损伤的关系已有了一些研究报道,

但 SAP 肝损伤与 ERS 的研究甚少。现探讨 SAP 并发肝损伤过程中 ERS 是否参与。报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体质量 250~280 g (河北联合大学实验动物中心提供)。大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为假手术组 (sham 组) 和模型组, 各 40 只, 各组又按时间点随机分为 3、6、12、24、36 h 5 个组, 每组各 8 只。

**1.2 动物模型** 术前 12 h 禁食, 自由饮水, 采用 10% 水合氯醛溶液 0.3 mL/100 g 行腹腔内注射麻醉、固定。经上腹正中切口入腹, 提起十二指肠及胰腺, 沿胰胆管方向, 寻找十二指肠大乳头开口位置, 于其开口略偏下对系膜缘肠壁上选一无血管区, 使用 24 号一次性静脉留置针进针, 进入肠腔后拔出针头 3~5 mm, 然后使导管前端贴系膜缘肠壁向乳头开口方向缓慢滑行, 探入胰胆管内, 顺其推进 5~7 mm 后, 应用微型动脉夹分别夹闭十二指肠大乳头开口及胰胆管肝门端。然后注射 3% 牛磺胆酸钠 1 mL/100 g, 持续 10 s, 停留 3 min, 去除动脉夹, 拔出留置针, 分层缝合腹壁, 造模成功, 术后大鼠自由饮食、饮水。sham 组仅打开腹腔, 翻动胰腺组织后关腹。

**1.3 主要试剂** 牛磺胆酸钠购于美国 Sigma 公司, 水合氯醛购于天津欧博凯化工有限公司, CHOP、BiP Antibody 购于美国 Cell Signaling 公司,  $\beta$ -Tublin、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、抗鼠 IgG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Beyo ECL Plus 均购于碧云天生物技术研究所, 显影剂 D-72、定影剂 D-72 购于天津市世纪奥博商贸有限公司。

**1.4 血清酶检测** 模型组及 sham 组分别于术后第 3、6、12、24、36 h 再次麻醉, 经原切口入腹, 使用采血针从下腔静脉采血 3.5 mL, 应用全自动生化仪检测血清淀粉酶 (AMY)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 的水平变化。

**1.5 HE 染色** 各组大鼠采血后, 分别取部分肝组织于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 取部分肝组织冻存。4% 多聚甲醛溶液固定的肝组织进行常规石蜡包埋切片, 行 HE 染色, 光镜下观察各时间点肝脏组织的病理学改变。

**1.6 免疫印迹法 (Western Blot)** 将冻存肝组织研磨, 加入组

织裂解液 (100  $\mu$ L/100 mg) 裂解蛋白, 然后高速离心 (4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min), 留取上清液。按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明检测样品蛋白浓度, 计算上样量。采用 SDS-PAGE 电泳, 经硝酸纤维素膜转移, 10% 脱脂奶粉封闭, 加 1 抗, 4  $^{\circ}$ C 摇床过夜。回收 1 抗, PBS 洗膜 3 次, 10 分钟/次, 加入相应 2 抗孵 1.5 h, 回收 2 抗, PBS 洗膜 3 次, 10 分钟/次。然后按照 Beyo ECL Plus 说明显色, X 光线胶片曝光。以  $\beta$ -Tublin 孵育作为内参照。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各样本之间的多重比较使用 SNK 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 各组大鼠血清酶学检测结果比较** 模型组大鼠血清 AMY、ALT 及 AST 水平在建模成功后逐渐升高, 于 12 h 达到峰值 (P < 0.05), 然后下降; 模型组比相对应的 sham 组血清酶水平明显升高, 差异有统计学意义 (P < 0.05); sham 组各时间点之间的血清酶水平无明显变化, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 1。

**2.2 各组大鼠肝脏病理学变化** sham 各组肝脏病理学无明显变化, 镜下可见肝细胞大小形态正常, 肝窦无扩张、淤血, 肝小叶无水腫、坏死, 汇管区无炎性细胞浸润; 3、6 h 可见肝细胞轻度水腫, 肝窦略扩张; 12 h 可见肝细胞水腫加重, 胞浆呈颗粒状, 肝窦扩张、淤血; 24 h 肝细胞水腫进一步加重, 出现气球样变, 肝窦明显扩张、淤血, 炎性细胞浸润, 并且出现点状或灶状坏死; 36 h 时可见肝细胞水腫减轻, 肝窦扩张、淤血有所减轻。提示 SAP 并发肝损伤于 24 h 损伤最严重。见图 1。

**2.3 SAP 肝损伤后 GRP78、CHOP 的含量变化** 模型各组 GRP78 及 CHOP 的表达水平逐渐增多, 且以 24 h 表达水平最高, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 模型各组比相对应的 sham 各组 GRP78 及 CHOP 表达水平明显增多, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 模型组 6、12、24、36 h 比相对应的 sham 各组 CHOP 的表达水平明显增多, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。sham 各组之间 GRP78 及 CHOP 表达水平, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。见图 2。

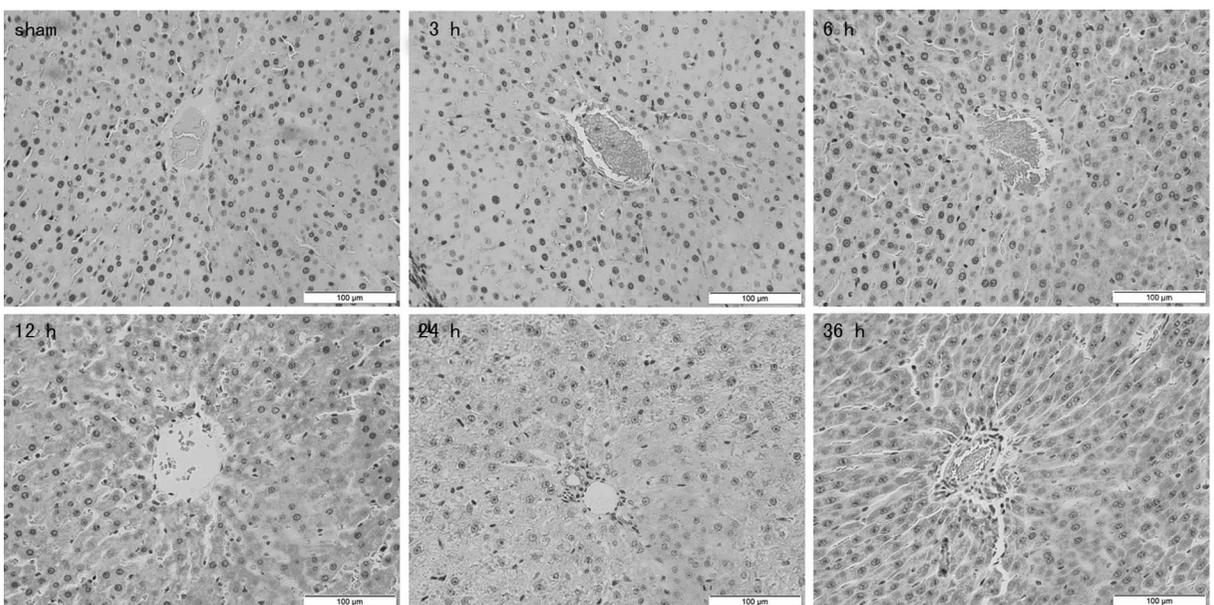


图 1 各模型组大鼠肝脏组织病理变化 (HE,  $\times 400$ )

表 1 各组大鼠血清 AMY、ALT 及 AST 检测值结果比较 (U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

检测项目	3 h	6 h	12 h	24 h	36 h
AMY(模型组)	1 067.6 ± 123.6	2 299.5 ± 333.3	5 400.5 ± 349.9	4 757.0 ± 320.8	3 538.9 ± 329.8
AMY(sham 组)	645.0 ± 84.5	654.5 ± 80.2	656.4 ± 78.1	650.0 ± 88.5	650.1 ± 82.0
ALT(模型组)	112.6 ± 11.8	275.1 ± 19.4	405.1 ± 11.0	317.9 ± 12.3	213.9 ± 13.5
ALT(sham 组)	44.3 ± 3.6	46.6 ± 3.6	46.9 ± 3.1	46.6 ± 3.7	44.5 ± 2.9
AST(模型组)	224.6 ± 22.7	436.0 ± 35.4	634.8 ± 32.5	451.0 ± 34.3	394.3 ± 33.3
AST(sham 组)	126.0 ± 13.3	126.3 ± 11.5	128.0 ± 12.2	127.0 ± 12.1	125.6 ± 13.6

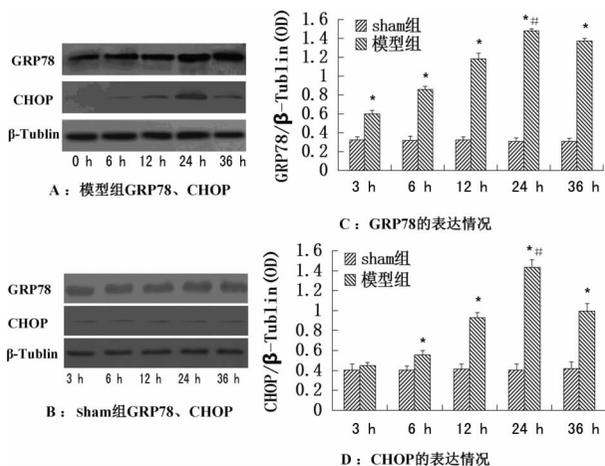


图 2 各组大鼠 GRP78 及 CHOP 的表达情况

### 3 讨 论

本组血清酶检测结果显示,随着 SAP 病情的发展,血清 AMY、ALT 及 AST 逐渐升高,于 12 h 达到高峰,之后降低。肝组织病理学显示,肝细胞逐渐水肿,发生气球样变,肝窦逐渐充血、淤血,汇管区大量炎性细胞浸润,并且肝局部出现点状或片状坏死,于 24 h 最严重,然后有所好转。提示本组成功制造 SAP 肝损伤的模型。

UPR 通路是 ERS 激活信号转导通路中重要的一条通路,其主要由 GRP78 及肌醇酶 1(IRE1)、双链 RNA 活化蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、活化转录因子 6(ATF6)组成<sup>[4]</sup>。当发生 ERS 时,GRP78 分别从 IRE1、PERK、ATF6 分离,从而使这 3 个 ERS 感受蛋白活化<sup>[5]</sup>。活化的 ERS 感受蛋白一方面使 GRP78 表达增多,增强内质网对未折叠、错误折叠蛋白的处理能力<sup>[6]</sup>;另一方面使 CHOP 的表达上调,而 CHOP 高表达能够诱导细胞凋亡。因此当过强或长时间的 ERS 将可能会通过激活 CHOP 途径导致细胞凋亡。Fu 等<sup>[7]</sup>研究表明,敲除 CHOP 基因可使细胞避免出现内质网应激诱导的细胞凋亡。说明 ERS 可通过 CHOP 的高表达诱导细胞凋亡。

本实验蛋白水平研究表明,随着 SAP 肝损伤病情的发展,ERS 相关蛋白 GRP78 及 CHOP 的表达逐渐大量增加,于 24 h 达到高峰,之后有所降低。这与肝脏病理学结果一致,提示 ERS 可能通过 GRP78 及 CHOP 促进肝细胞凋亡,参与 SAP 肝损伤的发生、发展。GRP78 于 24 h 之后表达有所降低,可能是因为当 CHOP 表达达到一定水平,启动细胞凋亡通路对其具有抑制作用<sup>[8]</sup>;而 CHOP 表达减少可能是因为 CHOP 进一步

与 Tribbles 同源蛋白 3 (TRB3)基因上的启动子区域结合,诱导 TRB3 表达,TRB3 能够通过负反馈机制抑制 CHOP 表达<sup>[9]</sup>。因此,本组推测 GRP78 的表达高峰可能在 24 h 之前,其具体的机制以及 ERS 其他相关蛋白在 SAP 肝损伤过程中的具体作用,仍需进一步研究。

综上所述,SAP 肝损伤于 24 h 损伤最严重;ERS 可能参与 SAP 肝损伤的发生、发展。

### 参考文献

- [1] 吴丽,蔡宝昌.急性胰腺炎腺泡细胞损伤机制的研究进展[J].世界华人消化杂志,2012,15(6):1307-1311.
- [2] 刘谋杰,贾大林.内质网应激与缺血性心脏病[J].解剖科学进展,2014,13(2):181-184.
- [3] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3):184-190.
- [4] Petrovski G, Das S, Juhasz B, et al. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(11):2191-2200.
- [5] Xu J, Zhou Q, Xu W, et al. Endoplasmic reticulum stress and diabetic cardiomyopathy[J]. Exp Diabetes Res, 2012, 21(9):827-971.
- [6] Teodoro T, Odisho T, Sidorova E, et al. Pancreatic  $\beta$ -cells depend on basal expression of active ATF6 $\alpha$ -p50 for cell survival even under nonstress conditions[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2012, 302(7):992-1003.
- [7] Fu HY, Okada K, Liao Y, et al. Ablation of C/EBP homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload[J]. Circulation, 2010, 122(4):361-369.
- [8] Avila MF, Cabezas R, Torrente D, et al. Novel interactions of GRP78:UPR and estrogen responses in the brain[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(6):521-532.
- [9] 杜锡潮,韩冰,谢汝佳,等.肝纤维化大鼠肝脏中内质网应激相关分子 CHOP 和 TRB3 的表达变化[J].中国病理生理杂志,2013,25(5):906-912.

(收稿日期:2014-12-22 修回日期:2015-02-15)