

文章编号:1005-6947(2008)09-0852-05

· 胰腺炎专题研究 ·

急性胰腺炎外周血中性粒细胞凋亡及 XIAP 表达的意义

廖立秋, 李宜雄, 欧阳洋, 吕新生

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 探讨急性胰腺炎(AP)外周血中性粒细胞(PMN)的凋亡及X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)的表达意义。方法 采用流式细胞仪分别测定重症急性胰腺炎(SAP)组,轻症急性胰腺炎(MAP)组和正常对照(NC)组外周血PMN的凋亡情况,采用RT-PCR和Western Blotting技术测定各组外周血PMN中XIAP mRNA及蛋白的表达,分析PMN凋亡及XIAP表达与疾病严重程度的关系。结果 PMN凋亡SAP组为(2.15±0.40)%,MAP组为(4.16±0.14)%,NC组为(4.31±0.12)%,SAP组和MAP组PMN凋亡较NC组明显减少($P < 0.05$),而SAP组PMN凋亡显著少于MAP组($P < 0.01$)。SAP组及MAP组XIAP mRNA的表达较NC组增加($P < 0.05$),而SAP组显著高于MAP组($P < 0.01$)。各组PMN XIAP蛋白水平与其mRNA水平一致。结论 XIAP可能参与介导SAP外周血PMN的凋亡延迟,且与疾病的严重程度有关。 [中国普通外科杂志,2008,17(9):852-856]

关键词: 胰腺炎;中性粒细胞;细胞凋亡;X连锁凋亡抑制蛋白

中图分类号: R 657.5

文献标识码: A

Role of expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in polymorphonuclear neutrophils during acute pancreatitis

LIAO Liqiu, LI Yixiong, OU Yangyang, LU Xinsheng

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of apoptosis and the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in polymorphonuclear neutrophils (PMNs) during acute pancreatitis (AP). **Methods** Blood from normal control (NC, $n = 15$), mild acute pancreatitis (MAP, $n = 15$) and severe acute pancreatitis (SAP, $n = 15$) were collected. PMNs apoptosis was detected by flow cytometry. PMNs were isolated from each group and XIAP mRNA and protein levels were assessed by RT-PCR and Western Blotting. **Results** PMNs apoptosis in SAP group was (2.15±0.40)%, MAP group was (4.16±0.14)%, NC group was (4.31±0.12)%. PMNs apoptosis rate in SAP and MAP groups was decreased compared to NC group ($P < 0.05$), in SAP group was markedly decreased compared to MAP group ($P < 0.01$). The expression of XIAP in SAP and MAP groups was increased as compared to NC group ($P < 0.01$), and XIAP expressed in SAP was markedly increased compared to MAP group ($P < 0.01$). **Conclusions** XIAP may contribute to the severity of acute pancreatitis through suppression of apoptosis of PMNs.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9):852-856]

Key words: Pancreatitis; PMN; Apoptosis; XIAP

CLC number: R 657.5

Document code: A

收稿日期:2008-06-17; 修订日期:2008-08-16。

作者简介:廖立秋,男,中南大学湘雅医院博士研究生,主要从事肝胆胰脾外科的临床与基础方面的研究。

通讯作者:李宜雄 E-mail:liyixiong6@hotmail.com

急性胰腺炎(AP)是临床上常见的急腹症,大多数为轻型,但约有25%的胰腺炎发展成重症急性胰腺炎(SAP),引起全身炎症反应综合征(SIRS),并逐渐发展为多器官衰竭(MOF),病死率可高达30%~50%^[1]。研究发现,外周血中性粒细胞(PMN)凋亡延迟在SAP的发生发展中起重要作用,是胰腺炎患者发生SIRS并进展为MOF的重要环节^[2]。X连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是凋亡抑制蛋白家族中的一员,可能参与介导外周血PMN的凋亡调节^[3]。本研究拟通过检测AP患者外周血PMN凋亡及其XIAP的表达,分析XIAP在SAP外周血PMN凋亡延迟中的可能作用。

1 资料与方法

1.1 病例分组

SAP组15例,系本院普外科2006年12月—2008年4月住院的患者;其中男9例,女6例;年龄28~58岁,平均(46.61±14.45)岁。轻症急性胰腺炎(MAP)组15例,均为本院普外科同期住院患者;男10例,女5例;年龄33~74岁,平均(51.95±16.76)岁。正常对照(NC)组15例,为正常志愿者;其中男8例,女7例;年龄22~60岁,平均(47.05±12.51)岁。3组性别、年龄均具有可比性($P>0.05$)。

1.2 诊断标准

AP诊断均符合中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组2003年12月制定的《中国急性胰腺炎诊治指南(草案)》。不包括由胰腺肿瘤或其他腹部肿瘤、手术、创伤、妊娠等引起的胰腺炎患者及48h内死亡的爆发性胰腺炎患者。入院后患者均给予胰腺炎常规治疗^[4]。

1.3 实验方法及检测指标

1.3.1 PMN的分离 NC组于检测日晨AP患者诊断明确后24h内空腹采集静脉血40mL,分置于含肝素液的干燥抗凝管内,摇匀待分离。每管加入6%葡聚糖生理盐水溶液10mL,37℃水浴中静置60min。将淋巴细胞分离液(天津灏洋)平衡至室温,抽取其中20mL加入另一50mL离心管A内。吸取抗凝血上层缓慢加入淋巴细胞分离液中,静置5min;20℃,2000r/min,离心20min。当溶液分4层时,弃去第1层和第2层,加入等体积红细胞裂解液(NHCl 8.29g, KHCO₃ 1g, EDTA 0.37g, 加ddH₂O至1L,新鲜配置)混匀,冰上裂解15min;4℃,1000r/min,离心

10min。见管底有沉淀,再次加入等体积红细胞裂解液,混匀,冰上裂解10min;4℃,1000r/min,10min离心去上清液。以磷酸盐缓冲液(PBS)10mL洗涤细胞沉淀,4℃,1000r/min,离心5min,2次。取少许PMN行瑞氏染色和台盼蓝染色,纯度大于95%,活力大于98%。收集适量细胞进行以下实验。

1.3.2 PMN凋亡测定 取105新鲜分离的PMN,75%乙醇固定。由北京鼎国生物技术有限公司采用流式细胞仪以Annexin V-FITC染色法检测PMN凋亡细胞所占的比例(%)。

1.3.3 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测XIAP的mRNA水平 取 5×10^7 个细胞,加入TRIzol 1mL(Invitrogen, Carlsbad, CA),按试剂盒说明书提取细胞中总RNA。用紫外分光光度计测定A260/A280值,重复3次。测得该比值稳定于1.8~2.0,计算总RNA浓度。取0.5μg的RNA按逆转录试剂盒(Invitrogen, Carlsbad, CA)说明书逆转录合成cDNA,然后进行XIAP和β-actin同管PCR扩增。XIAP引物序列:上游5'-TGG CAC GAG CAG GGT TTC TTTA-3',下游5'-TGG GGT TAG GTG AGC ATA GTC TGG-3'(扩增产物片段404bp)。β-actin引物序列:上游5'-GTC ATC ACC ATT GGC AAT GAG -3',下游5'-CGT CAC ACT TCA TGA TGG AGTT -3'(扩增产物片段121bp)。引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR反应体系为25μL。反应条件:XIAP95℃预变性3min后,94℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸1min;共30个循环,最后72℃延伸10min。扩增后产物在含有0.5mmol/L溴化乙啶的1.5%琼脂糖凝胶中电泳30min。电泳后将凝胶经Quantity one图像处理系统中测定各产物的光密度(OD)。扩增产物OD值均以β-actin为基准进行校正。

1.3.4 免疫印迹(Western Blotting)检测XIAP的蛋白表达水平 收集 5×10^8 个细胞,加入2×十二烷基硫酸钠(SDS)蛋白裂解液50μL,裂解15min;超声裂解5s,3次;沸水变性10min。依据蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物)说明测定蛋白浓度,计算蛋白量。将蛋白分装于-20℃保存备用。取蛋白20μg,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)120V电泳90min,120V恒压转膜70min,5%脱脂牛奶室温封闭2h,经0.5μg/mL抗XIAP抗体(R&D),孵育4℃过夜,洗一抗15min,4次;抗羊二抗

(Santa Cruz) 1:10 000 稀释室温孵育 50 min; 洗二抗 15 min, 4 次; 加 ECL 显色液 (Pierce Chemical), 暗室压片, 显影, 定影。抗 β -actin 抗体 (Sigma) 以 1:10 000 稀释, 室温孵育 1 h; 洗一抗 15 min, 4 次; 抗鼠二抗 (Santa Cruz) 1:10 000 稀释室温孵育 50 min; 洗二抗 15 min, 4 次; 加 ECL 显色液 (Pierce Chemical), 暗室压片, 显影, 定影。蛋白条带灰度值均以 β -actin 为基准进行校正。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 13 统计分析软件包进行处理。所得数值以均数 \pm 准差表示, 组间差异采用单因

素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PMN 凋亡情况

所测结果发现, 各组 PMN 都有一定凋亡。SAP 组为 $(2.15 \pm 0.40)\%$, MAP 组为 $(4.16 \pm 0.14)\%$, NC 组为 $(4.31 \pm 0.12)\%$, SAP 组和 MAP 组 PMN 凋亡较 NC 组明显减少 ($P < 0.05$), SAP 组 PMN 凋亡显著少于 MAP 组 ($P < 0.01$) (表 1) (图 1)。

表 1 各组外周血 PMN 凋亡比例及 XIAP mRNA 和蛋白表达

组别	例数	男	女	年龄(岁)	PMN 凋亡比例(%)	PMN XIAP mRNA	PMN XIAP 蛋白
NC	15	9	6	47.05 \pm 12.51	4.31 \pm 0.12	0.17 \pm 0.02	1.37 \pm 0.06
MAP	15	10	5	51.95 \pm 16.76	4.16 \pm 0.14 ¹⁾	0.49 \pm 0.06 ³⁾	1.77 \pm 0.03 ³⁾
SAP	15	8	7	50.61 \pm 14.45	2.15 \pm 0.40 ^{1),2)}	1.54 \pm 0.13 ^{2),3)}	2.52 \pm 0.09 ^{2),3)}

注:1)与 NC 组比较, $P < 0.05$; 2)与 MAP 组比较, $P < 0.01$; 3)与 NC 组比较, $P < 0.01$

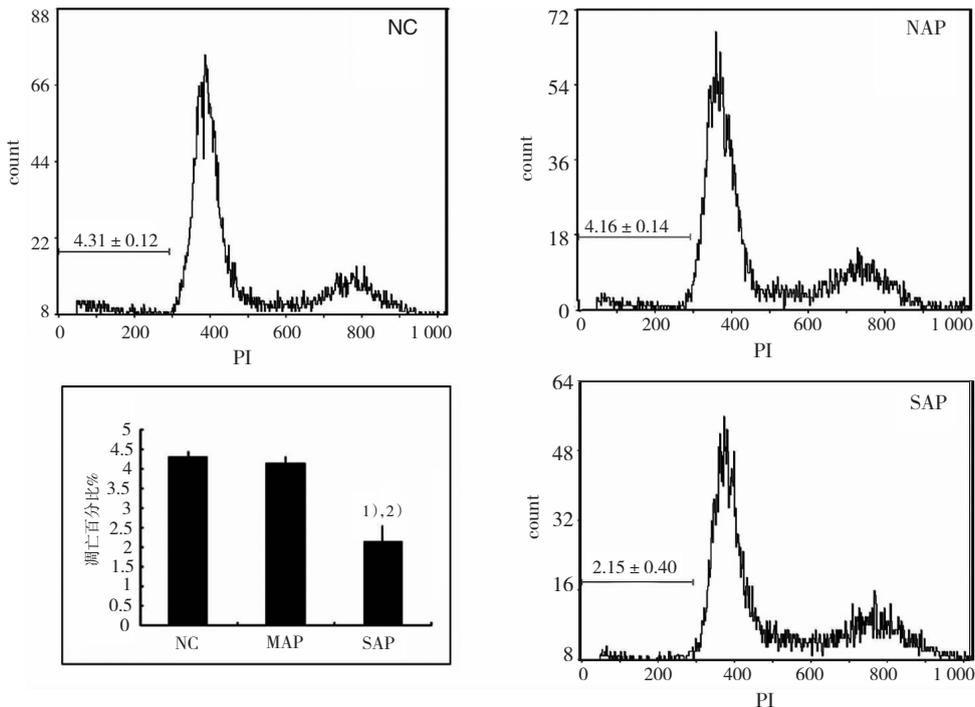


图 1 流式细胞仪检测各组 PMN 凋亡情况及比较

2.2 PMN 中 XIAP 的 mRNA 和蛋白表达水平

3 组 PMN 均有 XIAP mRNA 的表达, NC 组表达量很低。SAP, MAP 组 XIAP mRNA 的表达较 NC 组增加: SAP 组为 1.54 ± 0.13 MAP 组为 $0.49 \pm 0.$

1)与 NC 比较, $P < 0.01$, 2)与 MAP 比较, $P < 0.01$

006, NC 组为 0.17 ± 0.02 ($P < 0.01$)。SAP 组显著高于 MAP 组 ($P < 0.01$) MAP 高于 NC 组 ($P < 0.05$)。各组 PMN XIAP 蛋白水平与其 mRNA 水平一致 (图 2) (表 1)。

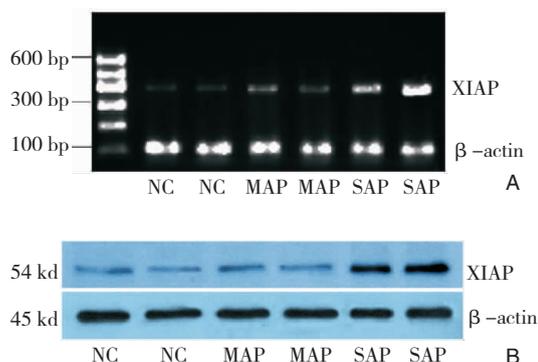
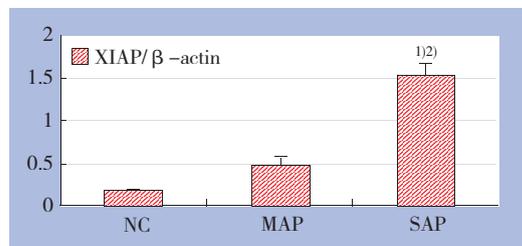


图2 各组外周血 PMN XIAP mRNA 和蛋白表达 A: 各组外周血 PMN XIAP mRNA 的表达; B: 各组外周血 PMN XIAP 蛋白的表达



注:1)与 NC 比较, $P < 0.01$; 2)与 MAP 比较, $P < 0.01$

3 讨论

SAP 发生后, PMN 过度激活, 从循环中向炎症部位迁移, 组织中的 PMN 数量大增, 通过释放活性氧自由基和蛋白水解酶, 促使组织损伤和炎症迁延, 造成 SIRS 和 MOF^[5]。正常情况下, PMN 生存周期很短, 以凋亡方式死亡, 为巨噬细胞识别。这一过程对维持内环境的稳定和促使已发生的炎症局限及消退具有重要意义^[6]。Anwar S 等^[7]在 SIRS 的临床表现中发现外周血 PMN 凋亡延迟, 认为凋亡延迟引起的 PMN 寿命延长可能与 SIRS 或 MOF 相关。O'Neil 等^[8]发现, AP 尤其是 SAP 时, PMN 凋亡延迟, 且 SAP 炎症反应消退依赖于 PMN 凋亡。SAP 的炎症反应持续存在及继发组织损伤与 PMN 凋亡的延缓有关。本研究利用流式细胞技术, 检测正常健康人, MAP 和 SAP 的 PMN 凋亡, 发现 PMN 凋亡在各组间差异均有显著性。AP 时 PMN 凋亡明显较对照组延缓, 尤以 SAP 为著。说明 AP 患者 PMN 凋亡延迟, 且与疾病的严重程度有关联。

许多与炎症相关的因子可以影响 PMN 自发性凋亡的发生进程, 其中以粒细胞集落刺激因子的抑制作用最强^[9]。其机制是抑制 caspase-3/9 的活性。caspase-3 被称为"死亡执行者", 正常时以无活性的前体形式存在于细胞浆中, 其激活是 PMN 凋亡的主要途径; 激活的 caspase-3 通过蛋白水解作用激活 DNA 酶 (caspase-activated DNase, CAD), 介导细胞染色体 DNA 碎裂和磷脂酰丝氨酸 (PS) 移向膜外, 启动细胞凋亡。因此 PMN 中 caspase-3 激活的减少将导致细胞凋亡延迟。研究发现, SIRS 时外周血 PMN 凋亡显著延迟, 其机制为线粒体膜电位维持使从线粒体进入胞浆的

细胞色素 C 减少, 从而使激活的 caspase-9 减少; 同时, caspase-3 的减少活化核转录因子 (NF-κB), 导致 PMN 凋亡延迟^[10]。

凋亡抑制基因 (IAP) 是 Crook 等^[11]于 1993 年在杆状病毒中发现的一类新的癌基因家族, 是一类重要的负性调节 caspase 激活的内源性蛋白。目前发现的人类凋亡抑制基因共有 8 种, XIAP 是 IAP 家族中的一员, 其基因定位于 Xq25, mRNA 全长 2 540 bp, 编码分子质量约为 54 kD 含 497 个氨基酸的蛋白质, 其 N 端有 3 个 BIR 结构, C 端有一个环指结构, 有着很强的凋亡抑制作用^[12]。XIAP 可通过 BIR1-BIR2 结构与 caspase-3 及 caspase-7 的活性部位结合, 直接抑制细胞凋亡的效应分子^[13-14], 并可通过 BIR3-环指结构抑制线粒体途径的起始分子 caspase-9 从而抑制凋亡的起始步骤^[15]。在慢性 PMN 性白血病患者中发现 PMN 凋亡延迟, 其内有 XIAP 蛋白高表达; 说明 XIAP 参与了 PMN 的凋亡^[3]。Mica L 等^[16]也发现 SIRS 时内毒素通过诱导产生 cIAP-2 加速活化降解 caspase-3, 从而延迟 PMN 的凋亡。本研究结果显示, 正常人 PMN 仅低表达 XIAP, AP 尤其是 SAP 患者 PMN 高表达 XIAP, 其水平与各组 PMN 凋亡延迟相关, 推测 XIAP 可能参与调控 AP 时 PMN 的凋亡延迟。特别是 SAP 时外周血 PMN 通过高表达 XIAP, 抑制 caspase 的激活, 使自身凋亡延迟, 导致持续释放炎症介质; 其在 AP 病情恶化中起重要作用。

参考文献:

- [1] Bhatia M, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2001, 2 (4): 496 - 501.
- [2] Chen HM, Hsu JT, Chen JC, et al. Delayed neutrophil ap-

- optosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2005, 31 (4): 360 - 364.
- [3] Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, *et al.* Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (37): 33968 - 33977.
- [4] 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(草案) [J]. *中华消化杂志*, 2004, 24 (3): 190 - 192.
- [5] Chen CC, Wang SS, Lee FY. Action of antiproteases on the inflammatory response in acute pancreatitis [J]. *JOP*, 2007, 8 (4 Suppl): 488 - 494.
- [6] Maianski NA, Maianski AN, Kuijpers TW, *et al.* Apoptosis of neutrophils [J]. *Acta Haematol*, 2004, 111 (1 - 2): 56 - 66.
- [7] Anwar S, Whyte MKB. Neutrophil apoptosis in infectious disease [J]. *Experimental lung research*, 2007, 33 (10): 519 - 528.
- [8] O'Neill S, O'Neill AJ, Conroy E, *et al.* Altered caspase expression results in delayed neutrophil apoptosis in acute pancreatitis [J]. *J Leukoc Biol*, 2000, 68 (1): 15 - 20.
- [9] Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, 13: 2400 - 2407.
- [10] Taneja R, Parodo J, Jia SH, *et al.* Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32 (7): 1460 - 1499.
- [11] Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif [J]. *J Virol*, 1993, 67: 2168 - 2174.
- [12] 菅志远, 李宜雄, 吕新生, 等. RNA 干扰抑制胰腺癌细胞 XIAP 表达对化疗敏感性的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (11): 816 - 820.
- [13] Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, *et al.* Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP [J]. *Cell*, 2001, 104 (5): 769 - 780.
- [14] Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, *et al.* Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP [J]. *Cell*, 2001, 104 (5): 791 - 800.
- [15] Sun C, Cai M, Meadows RP, *et al.* NMR structure of and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP [J]. *Nature*, 1999, 401 (6755): 818 - 822.
- [16] Mica L, Harter L, Trentz O, *et al.* Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2 mediated caspase-3 degradation [J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 199 (4): 595 - 602.

欢迎订阅 2009 年《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内公开发行的国家级期刊 (ISSN1005 - 6947/CN43 - 1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新知识、新技术、临床研究及实用性临床经验。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

《中国普通外科杂志》由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、裘法祖、黎介寿等多位国内外著名普外专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。出版周期短, 时效性强。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。《中国普通外科杂志》已进入多个国内外重要检索系统和大型数据库, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据 - 数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

中国普通外科杂志编辑部已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期和时效性将进一步提高。欢迎订阅, 欢迎赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4 幅面), 每期 96 页, 每月 15 日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价 12.0 元/册, 全年 144 元。国内邮发代号: 42 - 121; 国际代码: M - 6436。编辑部可办理邮购。编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路 87 号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731 - 4327400 网址: <http://www.zpwz.net> E-mail: pw4327400@126.com; jcgssyxc@126.com; zpwzcn@gmail.com