

IL-12 和 IL-6 与实验性急性坏死性胰腺炎严重程度的关系

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成, 邓德海

赖铭裕, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科
广西壮族自治区南宁市 530021
梁志海, 孙学成, 广西医科大学 广西壮族自治区南宁市 530021
唐国都, 邓德海, 广西医科大学第一附属医院消化内科
广西壮族自治区南宁市 530021
赖铭裕, 男, 1969-07 生, 广西合浦人, 广西医科大学消化内科硕士, 从事消化内科临床工作。
广西自然科学基金资助项目(桂科自), No. 0447054
通讯作者: 唐国都, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路 6 号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。 tguodu02@yahoo.com.cn
电话: 0771-5356501
收稿日期: 2005-03-14 接受日期: 2005-04-01

Correlation of interleukin-12 and interleukin-6 with severity of experimental acute necrotizing pancreatitis

Ming-Yu Lai, Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Xue-Cheng Sun, De-Hai Deng

Ming-Yu Lai, Department of Gerontism Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China.
Zhi-Hai Liang, Xue-Cheng Sun, Graduates of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China
Guo-Du Tang, De-Hai Deng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China
Correspondence to: Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China. tguodu02@yahoo.com.cn
Received: 2005-03-14 Accepted: 2005-04-01

Abstract

AIM: To investigate the change of serum interleukin-12 (IL-12) and interleukin-6 (IL-6) concentrations and the correlation with the severity of pancreas damages in experimental acute necrotizing pancreatitis (ANP).

METHODS: Ninety-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into ANP (group A, $n = 36$), IL-10-interfering (group I, $n = 32$) and control group (group C, $n = 24$). Rats in group A and I were injected intraperitoneally with 6% L-Arginine (3×1.0 mg/g) three times at an interval of 1 hour to induce ANP and those in group C received saline intraperitoneal injection only. Rats in Group I were treated with recombinant human IL-10 at 2nd, 5th and 8th hour (10 000 U for each time) after the L-arginine injection. Rats were killed at 4th, 12th, 24th and 36th hour after the last L-arginine injection. The pathological characteristics of the pancreas observed under light microscope. Serum

amylase, IL-12 and IL-6 concentrations were detected by substrate-enzyme technique and ELISA respectively.

RESULTS: The pathological scores of pancreas, the concentrations of serum amylase, IL-12 and IL-6 in rats of group A were markedly higher than group C (24 h, serum amylase: $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$ vs 364.61 ± 64.24 , $P < 0.01$; IL-12: 104.68 ± 23.93 vs 56.72 ± 22.67 pg/L, $P < 0.01$; IL-6: 132.95 ± 26.64 vs 81.90 ± 9.93 pg/L, $P < 0.01$). After administration of IL-10, the pathological scores of pancreas, the concentrations of serum amylase, IL-12 and IL-6 in were significantly decreased in group I as compared with those in group A (24 h, pathological scores: 4.75 ± 1.75 vs 7.89 ± 1.17 , $P < 0.01$; serum amylase: $1\ 481.13 \pm 336.48$ vs $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$, $P < 0.01$; IL-12: 81.31 ± 17.23 vs 104.68 ± 23.93 pg/L, $P < 0.05$; IL-6: 96.80 ± 18.28 vs 132.95 ± 26.64 pg/L, $P < 0.01$). The concentration of IL-12 was positively correlated with pathological scores of pancreas ($r = 0.603$, $P < 0.001$) and serum amylase concentration ($r = 0.323$, $P < 0.05$), but had no marked relations with IL-6 concentration ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The serum concentrations of IL-12 and IL-6 are markedly elevated in experimental ANP. The pancreatic damages are improved after IL-10 administration. Serum IL-12 is positively related to the severity of pancreatic damages.

Key Words: Interleukin-12; Inteleukin-6; Acute necrotizing pancreatitis

Lai MY, Liang ZH, Tang GD, Sun XC, Deng DH. Correlation of interleukin-12 and interleukin-6 with severity of experimental acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1550-1553

摘要

目的: 探讨血清白介素12(IL-12)浓度在急性坏死性胰腺炎(ANP)中的变化以及他与胰腺病变严重程度的关系。

方法: SD 大鼠 92 只随机分为 3 组, 胰腺炎组(A 组, $n = 36$)和干预组(I 组, $n = 32$)大鼠都分 3 次 60 g/L 左旋精氨酸(L-arginine)ip 建立 ANP 大鼠模型; I 组在诱导胰腺炎后 2, 5, 8 h 分 3 次 ip IL-10 各 10 000 U。正常对照组(C 组, $n = 24$)接受同剂量的生理盐水。于 4, 12, 24, 36 h 分批处死大鼠, 光镜下观察胰腺组织并进行病理评分, 用酶底物法检测血清淀粉酶, 用 ELISA 法检测 IL-12 和 IL-6 浓度。

结果: A组胰腺病理评分、血清淀粉酶、IL-12及IL-6的水平显著高于对照组(24 h, 血清淀粉酶: $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$ vs 364.61 ± 64.24 , $P < 0.01$; IL-12: 104.68 ± 23.93 vs 56.72 ± 22.67 pg/L, $P < 0.01$; IL-6: 132.95 ± 26.64 vs 81.90 ± 9.93 pg/L, $P < 0.01$), I组可使各观察指标较A组明显下降(24 h, 病理评分: 4.75 ± 1.75 vs 7.89 ± 1.17 , $P < 0.01$; 血清淀粉酶: 1481.13 ± 336.48 vs $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$, $P < 0.01$; IL-12: 81.31 ± 17.23 vs 104.68 ± 23.93 pg/L, $P < 0.05$; IL-6: 96.80 ± 18.28 vs 132.95 ± 26.64 pg/L, $P < 0.01$); IL-12与病理评分($r = 0.603$, $P < 0.001$)及血清淀粉酶水平($r = 0.323$, $P < 0.05$)存在正相关, 但是与IL-6无显著相关性($P > 0.05$).

结论: 大剂量L-arginine ip诱导的ANP大鼠中, 血清IL-12及IL-6显著上升, 应用IL-10可减轻胰腺病变程度, IL-12浓度与胰腺病变正相关.

关键词: 白介素 12; 白介素 6; 急性坏死性胰腺炎

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成, 邓德海. IL-12和IL-6与实验性急性坏死性胰腺炎严重程度的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1550-1553 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1550.asp>

0 引言

急性胰腺炎(AP)常见轻症、重症患者的临床经过与预后均相差很远. 如发生急性坏死性胰腺炎(ANP)则进展快、死亡率高, 常因并发多器官功能衰竭(MOF)而致死. 研究表明, ANP的发病机制不单只与消化酶的活化有关, 还与由于前炎症因子大量释放形成的系统性炎症反应综合征(SIRS)有关, 也正是SIRS引起的多器官功能衰竭导致了ANP的高死亡率^[1]. 所以, 如何在疾病早期准确地预测AP的预后就成了一个热点话题. 由于ANP与SIRS的密切关系, 从细胞因子中寻找与病情严重度相关的新指标成为可能的思路. IL-12是由P35和P40组成的异源二聚体细胞因子, 主要由树突状细胞, 巨噬细胞, B淋巴细胞以及其他一些抗原提呈细胞产生, 他是一个具有多种生物功能的细胞因子, 在细胞免疫应答过程中具有重要作用^[2]. IL-12在ANP中的变化目前报道甚少. IL-6可由单核/巨噬细胞、T细胞、B细胞等多种细胞产生, 参与到烧伤、脓毒症、重大手术等机体的许多急性反应中, 已经有许多研究证实血清IL-6水平与AP的严重程度正相关^[3]. 我们通过实验性大鼠胰腺炎模型的研究探讨IL-12在ANP中的变化以及其与AP严重程度的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性SD大鼠92只, 清洁级, 2-3月龄, 质量250-350 g, 购自广西医科大学实验动物中心提供, 随机分成正常对照组(C组24只)、急性胰腺炎

组(A组36只)、和IL-10干预组(I组32只). 左旋精氨酸(L-arginine, 美国Sigma公司产品, 分析纯); 重组人IL-10蛋白和大鼠血清IL-6 ELISA检测试剂盒, 购自美国R & D公司; 大鼠血清IL-12检测试剂盒(比利时Biosource). 通过深圳晶美生物工程技术有限公司购进. 1.2 方法 参照尚宏清 *et al*^[4]建模方法并经本实验室改良的ip L-arginine法制备大鼠AP模型^[5]. 所有大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水; A组大鼠分3次给予ip 60 g/L L-arginine(3×1.0 mg/g), 间隔1 h, 诱导ANP模型; I组于L-arginine注射诱导胰腺炎后2, 5, 8 h分3次进行ip IL-10各10 000 U, 共30 000 U; C组大鼠ip生理盐水对照, 用量同L-arginine. 在注射L-arginine造模后4, 12, 24, 36 h共4个时点分批处死大鼠, 从腹主动脉取血, 留血清-80℃下保存待测, 并取胰腺组织用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片及HE染色. 由病理科医生对大鼠胰腺组织在光镜下观察并进行盲法病理评分, 大鼠胰腺组织病理学评分参考Kusske组织学评估标准^[6]进行, 按水肿、炎细胞浸润、坏死3方面的轻重程度评分. 血清淀粉酶浓度用底物酶学法在大型生化仪(Hitachi 7170)上检测, 血清IL-12、IL-6浓度用ELISA方法按说明书操作检测.

统计学处理 应用SPSS 10.0 for Windows软件包分析, 对病理评分采用 t 检验, 对血清淀粉酶、IL-12, IL-6数据进行One-Way ANOVA单因素方差分析. 实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 用Spearman法计算IL-12与病理评分的相关性, 用Pearson法计算IL-12与血清淀粉酶水平、IL-6浓度的相关性. $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义.

2 结果

2.1 病理改变和血清淀粉酶 A组和I组大鼠解剖后在腹腔内可见数量不等的淡黄色或红色血性腹水, 而且同时可观察到鼓肠、腹腔脏器粘连、脂肪皂化现象, 胰腺外观变成灰白色, 部分有暗红色出血样改变. 大鼠生存时间越长, 以上大体病理变化越重. I组大鼠大体病理改变比A组要轻. C组大鼠大体观无变化. A组胰腺标本在镜下可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 在胰腺实质、间质内有中性粒细胞、淋巴细胞浸润以及出血灶形成. 第36时点改变最重, 甚至出现大片胰腺组织凝固性坏死、腺小叶结构消失. I组改变相对较轻. C组标本只见轻度水肿及少量炎症细胞浸润. 根据Kusske方法对每一大鼠的胰腺组织在光镜下的表现评分. C组在光镜下的改变轻, 腺泡结构完整、腺小叶清晰、偶见有水肿或轻度炎症浸润者, 未见细胞坏死, 评分在0-2分间, 不进行统计计算(表1).

表1 胰腺组织病理评分和血清淀粉酶(mean±SD)

	分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
病理评分	A	9	4.44 ± 1.33	5.33 ± 1.66	7.89 ± 1.17	8.33 ± 1.12
	I	8	4.13 ± 1.13	3.75 ± 1.28 ^a	4.75 ± 1.75 ^b	7.00 ± 1.60 ^a
血清淀粉酶	C	6	378.83 ± 49.00	352.00 ± 37.93	364.61 ± 64.24	377.17 ± 64.45
	A	9	497.67 ± 61.68 ^e	675.22 ± 153.88 ^f	3 264.89 ± 1 627.18 ^f	1 709.33 ± 736.57 ^f
	I	8	412.75 ± 92.47 ^c	413.38 ± 85.53 ^d	1 481.13 ± 336.48 ^{cd}	1 122.80 ± 525.57 ^{cd}

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01, ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs A组; ^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01 vs C组.

表2 AP大鼠血清IL-12和IL-6含量(pg/L)(mean±SD)

	分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
IL-12	C	6	52.15 ± 16.95	48.99 ± 14.61	56.72 ± 22.67	55.48 ± 19.53
	A	9	80.99 ± 28.41	130.41 ± 30.61 ^b	104.68 ± 23.93 ^b	106.68 ± 23.69 ^b
	I	8	81.31 ± 17.23	80.60 ± 31.38 ^c	81.31 ± 17.23 ^c	93.75 ± 18.49
IL-6	C	6	88.10 ± 34.08	83.97 ± 14.32	81.90 ± 9.93	74.01 ± 248.67
	A	9	199.81 ± 94.23 ^a	159.17 ± 46.02 ^b	132.95 ± 26.64 ^b	123.92 ± 34.74 ^a
	I	8	120.34 ± 75.95 ^c	101.35 ± 22.98 ^d	96.80 ± 18.28 ^d	82.48 ± 38.81 ^c

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs C组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs A组.

A组各时点淀粉酶水平较C组升高,在第24时点达到高峰, I组比A组降低(表1).

2.2 血清IL-12和血清IL-6水平 除第4时点差异无显著意义外, IL-12在A组水平均较C组高,第12 h达到高峰,此后有所降低. I组除第4、36时点与A组差异无统计学意义外,其余时点均较A组低(表2). A组大鼠IL-6水平较对照组为高,其中第4时点即达到高峰,此后IL-6水平有所下降.与A组相比, I组各时点均有所下降. IL-12水平与病理评分以及血清淀粉酶水平相关,但与IL-6水平不相关(表3).

表3 IL-12与其他观察指标的相关性

	IL-12	
	r值	P值
病理评分	0.603	<0.001
血清淀粉酶	0.323	<0.05
IL-6	0.192	>0.05

3 讨论

大剂量腹腔注射L-arginine能建立可靠的ANP模型. ANP发病后机体产生大量的免疫细胞因子,如IL-1, TNF- α , IL-6等. IL-6作为ANP早期开始升高的细胞因子,他在血清里的浓度与ANP的严重程度有关,可以用于预测ANP的严重程度^[7-9]. 本结果提示,成功建立ANP模型后, A组IL-6水平均较C组明显升高,而且高峰出现在建模后4 h, 24 h点以后浓度有所下降.

而且,在应用IL-10进行干预后, C组大鼠的IL-6浓度显著降低. IL-10作为具有免疫抑制作用的细胞因子,对ANP进行干预可以起到减轻病变程度、改善预后的作用^[10]. Warzecha *et al*^[11]在动物实验中使用IGF-1可减轻胰腺损害,同时观察到血清IL-10水平的升高,认为IGF-1的作用是通过增加IL-10水平改善胰腺血流达到的. 另外, Chen *et al*^[12]利用腺病毒质粒介导的人IL-10基因对大鼠AP进行治疗,也证实了IL-10的治疗作用. 我们的实验在使用IL-10ip后使C组的病理评分以及血清IL-6水平都明显下降,可以认为IL-10能有效地改善胰腺病变. Sweeney *et al*^[13]认为,无论AP后是否发生SIRS, AP早期都会发生T细胞的激活,另有学者发现在AP早期, Th1型CD4+细胞能诱发巨噬细胞的活化以及前炎症因子释放^[14]. 张群华 *et al*^[15]利用经胰胆管逆行注射牛磺胆酸建立大鼠ANP模型后观察到模型组血清IL-12水平的上升. 在临床研究中, Pezzilli *et al*^[16]进行认为AP患者血清IL-12在病变早期就明显升高;重症急性胰腺炎(SAP)组血清IL-12水平较明显高于轻症急性胰腺炎(MAP)组^[14, 17]. 这些都说明, IL-12作为细胞免疫过程中的一个重要调节因子,在AP发生后体内单核细胞、B淋巴细胞等被激活, IL-12的分泌增加,血清浓度将会升高,并参与了AP的发生发展过程. 我们观察到建模12 h后A组血清IL-12水平的比C组显著增高,与上述结果类似. 而应用IL-10干预的I组比A组有所下降,说明了IL-10对AP发生后的免疫抑制可能通

过影响 T 细胞功能的途径进行, 其机制与 IL-10 通过对单核细胞分泌 IL-12、IL-18 及 HLA-DR 和 CD80 表达的调节, 影响 T 细胞的活化、分化及其介导的免疫应答有关^[18].

另外, 相关性分析的结果表明 IL-12 的水平是与病理评分以及血清淀粉酶都存在正相关的关系. 血清淀粉酶作为诊断 AP 的重要指标, 虽然水平高低与胰腺病变的轻重程度不成比例, 但针对淀粉酶水平的动态观察对判断疾病轻重程度尚有一定价值. IL-12 与血清淀粉酶存在正相关 ($P < 0.05$), $r = 0.323$. 通过动态观察血清 IL-12 的水平可能可以了解胰腺病变的动态变化. 另外, IL-12 与胰腺病理评分的相关系数为 $r = 0.603$ ($P < 0.001$), 说明 IL-12 的血清浓度高低是与胰腺的病变程度密切相关, 早期测定血清 IL-12 水平可以作为预测 AP 病变严重程度的指标. 另外, 我们也注意到了 IL-12 浓度与 IL-6 浓度无相关, 这可能与 ANP 发生发展中, 炎性递质和细胞因子呈网络反应而导致细胞因子浓度升高早晚不一有关.

4 参考文献

- 1 Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:99-103
- 2 杨家和, 钱其军, 吴孟超, 郭亚军. 白介素 12: 重要的免疫调节因子. *世界华人消化杂志* 1999;7:71-72
- 3 Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:343-351
- 4 尚宏清, 李非, 张再兴, 孙家邦. 分次大剂量 L-精氨酸腹腔内注射致大鼠急性坏死性胰腺炎模型的研究. *首都医科大学学报* 2000;21:322-324
- 5 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海锋. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- κ B 和一氧化氮合酶的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:711-713
- 6 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996;120:284-288
- 7 Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Scholmerich J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991;101:782-785
- 8 Jiang CF, Shiao YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004;67:442-446
- 9 王昌成, 马兴刚, 徐淮, 朱九成, 王建营, 陈刚英. 血清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 在早期诊断重症急性胰腺炎中的价值. *中华急诊医学杂志* 2001;10:252-253
- 10 王健, 易继林. 白介素-10 治疗急性胰腺炎的实验研究. *中国危重病急救医学* 2002;14:371-374
- 11 Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Konturek SJ, Tomaszewska R, Stachura J, Konturek PC. IGF-1 stimulates production of interleukin-10 and inhibits development of caerulein-induced pancreatitis. *Physiol Pharmacol* 2003;54:575-590
- 12 Chen ZQ, Tang YQ, Zhang Y, Jiang ZH, Mao EQ, Zou WG, Lei RQ, Han TQ, Zhang SD. Adenoviral transfer of human interleukin-10 gene in lethal pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:3021-3025
- 13 Sweeney KJ, Kell MR, Coates C, Murphy T, Reynolds JV. Serum antigen (s) drive the proinflammatory T cell response in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003;90:313-319
- 14 Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:363-370
- 15 张群华, 蔡端, 吴树强, 姜永峰, 侯兰娣, 张延龄. 急性坏死性胰腺炎大鼠的炎性递质变化和生长抑素的作用. *中华医学杂志* 1997;77:355-358
- 16 Pezzilli R, Miniero R, Cappelletti O, Barakat B. Behavior of serum interleukin 12 in human acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:247-251
- 17 艾迎春, 韩桂华, 郭公新, 陈福军. IL-8 和 IL-12 与急性胰腺炎分类的探讨. *黑龙江医药科学* 2004;27:34-35
- 18 姚婷, 王书奎, 陈军, 姚堃, 秦浚川, 季晓辉. M-CSF、IL-10 对单核细胞 IL-12、IL-18 产生及 HLA-DR 和 CD80 表达的影响. *细胞与分子免疫学杂志* 2004;20:67-69

编辑 潘伯荣 审读 张海宁