

# 自噬相关蛋白 Beclin1 及 IL-18 与急性胰腺炎疾病程度的相关性

黄野<sup>1,2</sup> 李红昌<sup>2</sup> 毕礼明<sup>2</sup> 陈亚峰<sup>2</sup> 高磊<sup>2</sup> 潘丽芸<sup>2</sup> 孙文杰<sup>2</sup> 刘欢<sup>2</sup> 李劼<sup>2</sup> 奉典旭<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 检测急性胰腺炎(AP)患者血清自噬相关蛋白 Beclin1、白介素-18(IL-18)的表达并探讨其与AP病情严重程度的相关性。方法 全自动生化检测仪测定血清淀粉酶(Amy)含量,采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清 Beclin1、IL-18含量,并用改良CT严重指数(MCTSI)、急性生理与慢性健康评分II(APACHE-II)评分方法进行评分。结果 重症急性胰腺炎(SAP)组及轻型急性胰腺炎(MAP)组患者血清 Amy、Beclin1 及 IL-18 水平较对照(Ctr)组升高( $P < 0.01$ )。SAP组血清 Amy、Beclin1 及 IL-18 水平较 MAP 组升高( $P < 0.01$ ); Ctr 组 MCTSI、APACHE-II 评分基本为 0, AP 发病时 MCTSI、APACHE-II 评分增高, MAP 和 SAP 与 Ctr 比较, MCTSI、APACHE-II 评分增高; 并且 SAP 患者 MCTSI、APACHE-II 评分较 MAP 患者 MCTSI、APACHE-II 评分升高( $P < 0.01$ )。血清 Beclin1 与血清 IL-18 水平及 MCTSI 和 APACHE-II 评分均相关, 相关系数  $r$  分别为 0.918 9、0.977 1 和 0.926 0。结论 在 AP 患者中, 血清 Beclin1、IL-18

水平及 MCTSI、APACHE-II 评分升高, 血清 Beclin1 与血清 IL-18 水平及 MCTSI、APACHE-II 评分均相关, 血清 Beclin1 与 AP 的发生及其程度密切相关, 在评估及预测 AP 严重程度方面有一定的作用。

**关键词** Beclin1; 急性胰腺炎; 炎症因子; 白介素-18

中图分类号 R 657.5+1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1606-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.022

关于急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的实验性研究<sup>[1-5]</sup>表明 AP 的发生发展与自噬密切相关。自噬相关蛋白 Beclin1 在自噬过程中起到重要的调控作用<sup>[6]</sup>。AP 治疗领域的研究显示, 炎症水平与 AP 的严重程度密切相关, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-18(interleukin-18, IL-18)等促炎症细胞因子是 AP 从局部免疫反应发展到全身炎症反应综合征并最终导致死亡的关键因素, IL-18 的水平在一定程度上可以代表疾病的炎症程度<sup>[7]</sup>。

该研究随机收集 AP 患者, 分别为轻型急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)、重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)以及健康人作为对照。各组留取血液, 检测血清淀粉酶( ( amylase ,

2019-06-24 接收

项目基金: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81673789); 上海市卫计委重点项目(编号: 201440027)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学上海普陀中心临床学院, 上海 200062

<sup>2</sup> 上海市普陀区中心医院普外科, 上海 200062

作者简介: 黄野, 男, 硕士研究生;

奉典旭, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: fdianxu@sohu.com

cancerous tissues were assessed by qRT-PCR and Western blot assays. **Results** Immunohistochemistry showed that hnRNP L was highly expressed in HCC tissues ( $P = 0.001$ ), and the positive expression rates of HCC and paracancerous tissues were 77.7% (72/90) and 53.3% (48/90), respectively. The results of qRT-PCR and Western blot showed that at the transcriptional and translational levels, the expression of hnRNP L in HCC tissues was significantly higher than that in corresponding adjacent tissues ( $P < 0.001$ ). Clinicopathological features analysis showed that high-level expression of hnRNP L in HCC tissues was significantly associated with age, vascular invasion, Edmondson grade and Barcelona Clinic Liver Cancer stage ( $P = 0.018$   $\rho$ .039  $\rho$ .001  $\rho$ .018). Furthermore, the expression intensity of hnRNP L was positively correlated with the expression of CD68 (TAMs marker) and CD206 (M2 macrophage marker) ( $\kappa = 0.448$   $\rho$ .455  $P < 0.001$ ), but negatively correlated with the expression of CD11c (M1 macrophage marker) ( $\kappa = -0.394$   $P < 0.001$ ). **Conclusion** The expression of hnRNP L in HCC tissues is significantly higher than that in adjacent tissues and correlated with the malignant characteristics of HCC. At the same time, the expression of hnRNP L is correlated to the polarization of macrophages, suggesting that hnRNP L may regulate the development of HCC by participating in the polarization of macrophages.

**Key words** heterogeneous-nuclear ribonucleoprotein L; hepatocellular carcinoma; macrophage polarization; TAMs

Amy)、Beclin1 及 IL-18 同时进行改良 CT 严重指数评分(modified CT severity index, MCTSI)、急性生理与慢性健康评分(acute physiology and chronic health evaluation, APACHE-II) 探讨 AP 发病时血清 Beclin1 与 IL-18 水平以及疾病严重程度关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例资料

1.1.1 资料来源 本研究入组者患者,共 30 例,其中 MAP 患者 10 例,SAP 患者 10 例,正常对照 10 例。入组者采集时间:2013 年 10 月~2015 年 12 月。

1.1.2 AP 入组标准 参考中华医学会外科分会胰腺外科学组《急性胰腺炎诊治指南(2014)》。符合以下 3 项特征中的 2 项可诊断为 AP:腹痛(急性、突发、持续、剧烈的上腹部疼痛,常向背部放射);血清 Amy 和(或)脂肪酶活性至少高于正常上限值 3 倍;增强电子计算机断层扫描(computed tomography, CT)/磁共振成像或腹部超声呈 AP 影像学改变。

本研究入组的 AP 患者同时符合以下条件:患者发病 24 h 内进入本研究机构;患者年龄为 18~70 (43.36±6.32) 岁;既往无严重的心、脑、肺、肾、肝等基础疾病。① MAP 诊断标准符合 AP 诊断,不伴有器官功能衰竭及局部或全身并发症。② SAP 诊断标准符合 AP 诊断,有器官功能衰竭,或存在局部或全身并发症。

1.1.3 主要的试剂及仪器设备 Beclin1 ELISA 检测试剂盒、IL-18 ELISA 检测试剂盒购自武汉优尔生(USCN)科技股份有限公司;离心机(Centrifuge 5810)购自德国 Eppendorf 公司;超低温冰箱(MDF-382E)购自日本 Sanyo 公司;64 排螺旋 CT 购自德国西门子公司;自动生化检测仪(INTEGRA 400)购自上海 Cobas 公司。

### 1.2 研究方法

1.2.1 研究分组 在符合入组标准的前提下,通过随机数字表法进行分组:① 对照组(Ctr):无任何基础疾病的健康者。② MAP 组:患者符合上述 MAP 入组标准。③ SAP 组:患者符合上述 SAP 入组标准。

1.2.2 标本采集 各组留取静脉血 5 ml,AP 患者血液系入院后留取,保证在发病 24 h 内。采集的血液标本常温下静置 2 h,高速离心机 4℃ 下以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,分装入 EP 管中,放置

入 -80℃ 冰箱内保存。用于检测血清 Amy、Beclin1 及活性氧(reactive oxygen species, ROS)。

拷贝 AP 患者入院 24 h 内腹部增强 CT 图片,用于进行腹部 CT 评分。

### 1.3 指标检测

1.3.1 Amy 测定 经本院检验科全自动生化分析仪测定。

1.3.2 血清 Beclin1 测定 采用双抗夹心酶联免疫吸附(ELISA)法,具体操作步骤按试剂盒说明书逐步进行。

1.3.3 血清 ROS 含量测定 ROS 的检测也是采用 ELISA 试剂盒,具体操作同血清 Beclin1 的测定方法相同。

1.3.4 腹部 CT 评分 腹部 CT 评分采用改良的 CT 严重指数评分(MCTSI)标准,见表 1。

表 1 MCTSI(修正 CT 严重指数)评分

| 指标       | 数值              | 评分 |
|----------|-----------------|----|
| ①胰腺炎症    | 正常胰腺            | 0  |
|          | 胰腺内变形或不伴有胰周脂肪炎症 | 2  |
|          | 胰腺或胰周积液,胰周脂肪坏死  | 4  |
| ②胰腺坏死    | 无坏死             | 0  |
|          | 坏死范围≤30%        | 2  |
|          | 坏死范围>30%        | 4  |
| ③胰腺外的并发症 | 一处或多处胸水         | 0  |
|          | 血管性并发症          | 2  |
|          | 实质器官并发症         | 2  |
|          | 胃肠道的累积          | 2  |

MCTSI 总分 = ① + ② + ③

1.3.5 APACHE II 评分 根据 APACHE II 评分表各项检测指标进行评分。APACHE II 评分表包含年龄指数、急性生理学评分、慢性健康指数三部分,三部分评分相加分数,反应全身症状,分数越高,病情越严重。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 24.0 进行统计分析,各组计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,在符合正态分布情况下,多样本均数比较采用单因素方差分析,相关性分析用两两相关性检验(主要采用 Poisson 回归分析,  $r$  为 Pearson 相关系数)。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 血清 Amy、Beclin1、IL-18 浓度 与 Ctr 组相比,MAP 组和 SAP 组血清 Amy、Beclin1、IL-18 浓度均升高 ( $P < 0.01$ );MAP 组与 SAP 组相比,血清 Amy、Beclin1、IL-18 浓度差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2、图 1。

**2.2 腹部 CT 及 MCTSI、APACHE-II 评分** 正常对照者 CT 轮廓光滑,密度均匀,胰腺周边无渗出,见图 2A; MAP 患者 CT 提示胰腺体积轻度增大,胰腺周围脂肪间隙模糊,见图 2B; SAP 患者 CT 提示胰腺密度降低,结构紊乱,胰腺周围渗出液明显,多累

及腹腔和腹膜后间隙,范围广泛,见图 2C。

Ctrl 组 MCTSI、APACHE-II 评分基本为零,AP 发病时 MCTSI、APACHE-II 增高,MAP 和 SAP 与 Ctrl 相比, MCTSI、APACHE-II 评分增高;并且 SAP 患者 MCTSI、APACHE-II 评分较 MAP 患者升高。见表 3、图 3。

表 2 血清 Amy、Beclin1、IL-18 浓度 (n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

| 血清指标            | Ctrl 组            | MAP 组                  | SAP 组                       | F 值   |
|-----------------|-------------------|------------------------|-----------------------------|-------|
| Amy (U/L)       | 78.467 ± 15.008   | 350.547 ± 80.078 **    | 1 096.770 ± 204.409 ***##   | 120.6 |
| Beclin1 (ng/ml) | 0.128 ± 0.021     | 0.215 ± 0.037 **       | 0.707 ± 0.112 ***##         | 142.7 |
| IL-18 (pg/ml)   | 352.890 ± 189.292 | 1 456.523 ± 493.005 ** | 2 589.210 ± 1 229.568 ***## | 24.95 |

与 Ctrl 组比较: \*\* P < 0.01; 与 MAP 组比较: ## P < 0.01

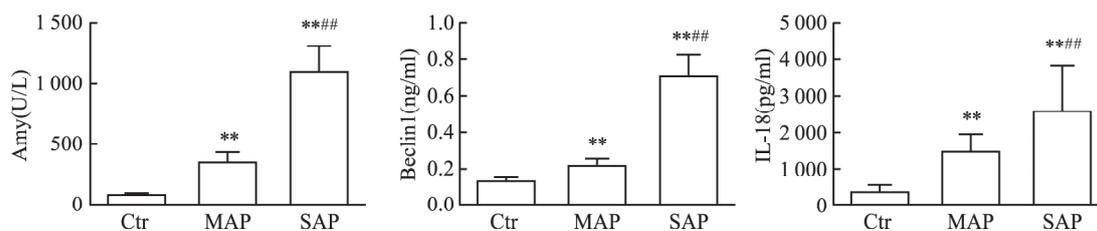


图 1 血清 Amy、Beclin1、IL-18 浓度变化

与 Ctrl 组比较: \*\* P < 0.01; 与 MAP 组比较: ## P < 0.01



图 2 不同组腹部 CT 图像

A: Ctrl 组 CT 图像; B: MAP 患者 CT 图像; C: SAP 患者 CT 图像

表 3 各组 MCTSI、APACHE-II 评分比较 (n = 10,  $\bar{x} \pm s$ )

| 评分项目         | Ctrl 组        | MAP 组            | SAP 组               | F 值   |
|--------------|---------------|------------------|---------------------|-------|
| 腹部 CT 评分     | 0.060 ± 0.013 | 2.409 ± 0.346 ** | 6.862 ± 0.877 ***## | 279.4 |
| APACHE II 评分 | 0.571 ± 0.787 | 4.571 ± 1.134 ** | 9.286 ± 1.113 ***## | 127.1 |

与 Ctrl 组比较: \*\* P < 0.01; 与 MAP 组比较: ## P < 0.01

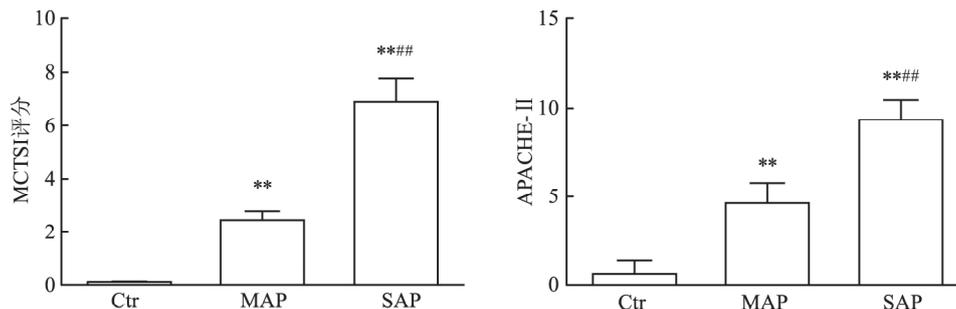


图 3 MCTSI、APACHE-II 评分变化

与 Ctrl 组比较: \*\* P < 0.01; 与 MAP 组比较: ## P < 0.01

**2.3 血清 Beclin1 与 IL-18 浓度的相关性** 血清 Beclin1 浓度与血清 IL-18 浓度做直线相关回归分析可得出  $y = 3\,821.9607x + 104.3045$ , 相关系数为  $r = 0.9189$ ,  $P < 0.01$ , 提示血清 Beclin1 与 IL-18 浓度相关。见图 4。

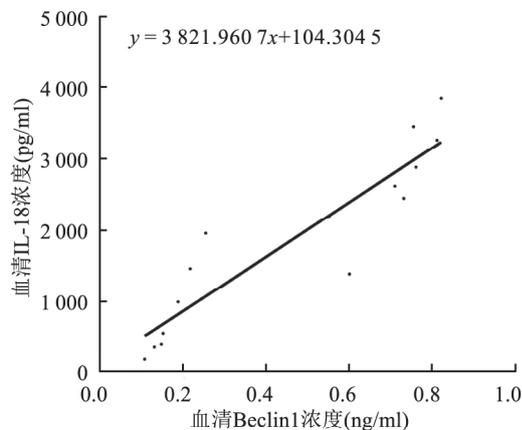


图4 血清 Beclin1 与 IL-18 相关性分析

**2.4 血清 Beclin 浓度与 MCTSI、APACHE-II 评分的相关性分析** 血清 Beclin1 浓度与 MCTSI、APACHE-II 评分做直线相关回归分析可得出  $y = 10.6112x - 0.596$ ,  $y = 12.9806x + 0.263$ , 相关系数为  $r = 0.9771$ ,  $r = 0.9260$ ,  $P < 0.01$ , 提示血清 Beclin1 浓度与 MCTSI、APACHE-II 评分相关。见图 5。

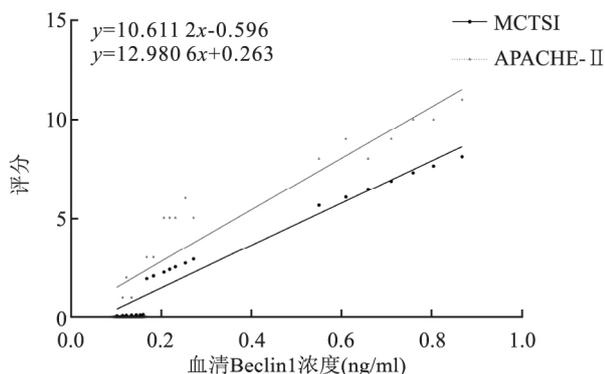


图5 血清 Beclin1 与 MCTSI、APACHE-II 评分相关性分析

### 3 讨论

AP 临床上起病急、变化快、并发症多,死亡率高,一直是临床上治疗的难点和挑战,及时、准确、高效地对 AP 患者进行合理诊治尤为重要<sup>[8]</sup>。明确 AP 的发病机制是提高其治愈率的根本,大多数研究<sup>[9]</sup>认为其病理基础系胰蛋白酶原在胰腺细胞内

非正常的激活,从而引起胰腺的自我消化,进一步引起局部及全身炎症反应。但胰腺细胞内的酶原具体是如何激活的,目前尚不完全清楚,AP 时自噬的改变则是近年新的研究热点。自噬相关信号转导通路错综复杂,自噬相关蛋白 Beclin1 对自噬的发生和发展有着重要的调节作用<sup>[10-11]</sup>。正常细胞的生命活动过程中,自噬活动可通过吞噬清除炎性小体的免疫学作用、活性氧以及抑制炎症因子的激活等多个方面进而抑制炎症反应的产生与发展<sup>[12]</sup>。然而在 AP 中,自噬受损,炎症因子无法及时清除,进一步引起胰腺细胞受损<sup>[13]</sup>。其中,炎症因子 IL-18 与 AP 的病情进展密切相关<sup>[7]</sup>。

Mareninova et al<sup>[4]</sup>通过对分离胰腺细胞、动物模型和人体组织的研究,发现 AP 时自噬量受损,胰腺腺泡内大量异常自噬空泡堆积;自噬的异常增多是导致酶原激活的诱因,他们认为自噬的病理性改变导致胰腺腺泡细胞空泡的形成以及酶原的激活,最终诱发了 AP 的形成。Beclin1 是自噬调控的重要分子机制之一,Beclin1 的表达和自噬相互促进,血清 Beclin1 水平的增高可以间接反映 AP 时自噬的过度激活。这也对临床治疗 AP 有一定的启示,或许可以通过减少自噬相关蛋白 Beclin1 的表达而抑制胰腺腺泡细胞自噬的发生,从而减少胰蛋白酶原的激活以及急性胰腺炎时胰腺组织水肿、出血及坏死的发生。

本研究显示,AP 患者发病早期血清自噬相关蛋白 Beclin1 水平升高,并且 SAP 较 MAP 血清 Beclin1 水平增高更明显;Beclin1 是自噬形成调控的主要因素之一,这也提示 AP 的早期伴随着自噬的积聚增多。AP 发病时,IL-18 产生增多,并且血清 Beclin1 与 IL-18 浓度存在有相关性。本研究结果也表明,AP 患者 MCTSI、APACHE-II 评分升高较为明显,并在一定程度上能反映疾病的严重程度;在对血清 Beclin1 浓度和 MCTSI、APACHE-II 评分进行相关性分析,发现二者有相关性。

综上所述,本实验结果提示:AP 患者发病早期,炎症水平升高,炎症因子血清 IL-18 与血清 Beclin1 水平正相关,并且血清 Beclin1 水平与疾病严重程度指标 MCTSI、APACHE-II 评分成正相关,因此对血清 Beclin1 水平的检测可能是评估预测 AP 严重程度的一个较为有效的指标。在本次实验的基础上,进一步明确二者之间具体关系,可能会为评估预测 AP 严重程度提供更为有力的证据。

## 参考文献

- [1] Helin H, Mero M, Markkula H, et al. Pancreatic acinar ultra-structure in human acute pancreatitis[J]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1980, 387(3): 259–70.
- [2] Watanabe O, Baccino F M, Steer M L, et al. Supramaximal caerulein stimulation and ultrastructure of rat pancreatic acinar cell: early morphological changes during development of experimental pancreatitis[J]. *Am J Physiol*, 1984, 246(4): 457–67.
- [3] Ji L, Li L, Qu F, et al. Hydrogen sulphide exacerbates acute pancreatitis by over-activating autophagy via AMPK/mTOR pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(12): 2349–61.
- [4] Mareninova O A, Hermann K, French S W, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(11): 3340–55.
- [5] Sherwood M W, Prior I A, Voronina S G, et al. Activation of trypsinogen in large endocytic vacuoles of pancreatic acinar cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(13): 5674–9.
- [6] Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by beclin 1 in the heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 95: 19–25.
- [7] Zhang X H, Li M L, Wang B, et al. Caspase-1 inhibition alleviates acute renal injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(30): 10457–63.
- [8] Lankisch P G, Apte M, Banks P A. Acute pancreatitis[J]. *Lancet*, 2015, 386(9988): 85–96.
- [9] Gukovskaya A S, Gukovsky I, Algül H, et al. Autophagy, inflammation, and immune dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(5): 1212–36.
- [10] 徐凌凡, 梁朝朝, 邵胜, 等. 自噬基因 Beclin-1 在前列腺癌组织中的表达及意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(12): 1799–801.
- [11] Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy[J]. *Redox Biol*, 2015, 4(5): 184–92.
- [12] Netea-Maier R T, Plantinga T S, Fl V D V, et al. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease[J]. *Autophagy*, 2016, 12(2): 245–60.
- [13] 黄野, 李红昌, 陈亚峰, 等. 自噬在急性胰腺炎中的作用及研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(3): 362–6.

## The relevance of autophagy-associated protein Beclin1 and IL-18 with the disease level of acute pancreatitis

Huang Ye<sup>1 2</sup>, Li Hongchang<sup>2</sup>, Bi Liming<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Anhui Medical University Shanghai Putuo Center Clinical Institute, Shanghai 200062;

<sup>2</sup>Dept of General Surgery, Shanghai Putuo Central Hospital, Shanghai 200062)

**Abstract Objective** To detect the serum autophagy-associated protein Beclin1, interleukin-18 (IL-18) among the acute pancreatitis (AP) patient in the clinic and discuss its relevance with the severe extent of AP. **Methods** The Amy content was detected by full-automatic biochemical detector, the contents of serum Beclin1 and IL-18 detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the evaluation was done by modified CT severity index (MCTSI) and acute physiology and chronic health evaluation-II (APACHE-II) scoring methods. **Results** The level of serum Amy, Beclin1 and IL-18 among patients in severe acute pancreatitis (SAP) group and mild acute pancreatitis (MAP) group increased compared with the control (Ctr) group ( $P < 0.01$ ). The level of serum Amy, Beclin1 and IL-18 in the SAP group increased compared with MAP group ( $P < 0.01$ ); the scores of MCTSI and APACHE-II in the Ctr group were basically zero; the scores of MCTSI and APACHE-II increased during the paroxysm of AP, the MAP and SAP group had higher marks in the scores of MCTSI and APACHE-II compared with Ctr; and scores of MCTSI and APACHE-II in SAP patients were higher than that of MAP patients ( $P < 0.01$ ). The level of serum Beclin1 and IL-18 were correlated with both MCTSI and APACHE-II score, the coefficient of association  $r$  was 0.9189, 0.9771 and 0.9260, respectively. **Conclusion** Among the clinical AP patients, the level of serum Beclin1 and IL-18, the increased score of MCTSI and APACHE-II, the level of serum Beclin1 and IL-18, as well as the score of MCTSI and APACHE-II are all correlated. The serum Beclin1 is closely correlated with the paroxysm and extent of AP, hence it plays a certain role in the evaluation and prediction of predicting the severe extent of AP.

**Key words** Beclin1; acute pancreatitis; inflammatory factor; IL-18