

一种急性胰腺炎腺泡细胞凋亡/坏死体外模型的改良^{*}

陈珂玲¹, 陈家乐¹, 池俊霖^{1,2}, 周总光^{1,2}, 李 园^{1△}

1. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室 消化外科研究室(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 胃肠外科(成都 610041)

【摘要】 目的 首次将共培养体系及混合腹水技术应用于急性胰腺炎腺泡细胞凋亡/坏死体外模型,并与常见的雨蛙素及雨蛙素联合脂多糖(LPS)模型进行对比研究,以观察其改良效果。**方法** 体外培养的大鼠胰腺腺泡细胞株 AR42J 分为 4 组:对照组(培养液+PBS),雨蛙素组(培养液+10 nmol/L 雨蛙素),雨蛙素+LPS 组(培养液+10 nmol/L 雨蛙素+10 mg/L LPS)及改良腹水组。改良腹水组采用牛黄胆酸钠诱导的重症急性胰腺炎动物模型腹水,混合后加入共培养体系,刺激体外培养的同源腺泡细胞造模。共培养体系的设置为:培养板中置入孔径为 1 μ m 的小室,以体积比 1:1 于孔板和小室中分别加入培养液及混合腹水。各组刺激 24 h 后收集腺泡细胞,采用流式细胞术检测腺泡细胞的凋亡/坏死率,Western blot 检测凋亡/坏死相关蛋白 B 淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、受体相互作用蛋白 1(RIP1)的表达情况,透射电镜观察腺泡细胞的亚显微结构。**结果** 改良腹水模型中腺泡细胞以坏死特征为主,与其余 3 组相比,其凋亡率及坏死率均上调,RIP1 及 BAX 蛋白表达水平上调,而 Bcl-2 蛋白呈下调趋势。透射电镜结果显示改良腹水组腺泡细胞细胞器结构破坏,细胞膜降解。而雨蛙素及雨蛙素+LPS 模型与对照组相比,腺泡细胞凋亡率上调,坏死率无改变;促凋亡蛋白 Bax 表达升高,而 RIP1 蛋白的表达水平无显著上调。透射电镜结果显示雨蛙素及雨蛙素+LPS 组细胞染色质固缩成团,胞质降解,细胞膜完整,呈现出典型的凋亡特征。**结论** 相较于以腺泡细胞凋亡特征为主、研究轻症急性胰腺炎的雨蛙素及雨蛙素+LPS 模型,改良的腹水模型以腺泡细胞的坏死特征为主,是研究腺泡细胞坏死及重症急性胰腺炎的良好模型。

【关键词】 急性胰腺炎 体外模型 凋亡/坏死 腹水

An Improved Acute Pancreatitis Apoptosis/Necrosis *in vitro* Model of Acinar Cells CHEN Ke-ling¹, CHEN Jia-le¹, CHI Jun-lin^{1,2}, ZHOU Zong-guang^{1,2}, LI Yuan^{1△}. 1. Institute of Digestive Surgery, State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Gastroenterological Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: liyuanletters@163.com

【Abstract】 Objective To improve the apoptosis/necrosis *in vitro* model of ascites-induced acute pancreatitis (AP) acinar cells by using the co-culture system and mixed ascites technology for the first time. Furthermore, we compared this improved model with cerulein and cerulein+LPS models, and observed the effects of three models on acinar apoptotic/necrotic-related indicators. **Methods** The *in vitro* cultured rat acinar cells AR42J were divided in four groups: control group (medium+PBS), cerulein group (medium+10 nmol/L cerulein), cerulein+LPS group (medium+10 nmol/L cerulein+10 mg/L LPS) and improved ascites group. In the improved ascites group, the ascites of sodium taurocholate-induced rat model was mixed and added into the co-culture system to stimulated *in vitro* cultured homogenous acinar cells. The co-culture system was set as follows: the chambers with the pore size of 1 μ m were placed in the culture plate, and the culture medium and mixed ascites were respectively added to the culture plate and the chamber at a ratio of 1:1. The acinar cells in each group were collected after 24 h stimulation. The apoptotic/necrotic rates, the expressions of apoptosis/necrosis related proteins [B-cell lymphoma protein 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax) and receptor interacting protein 1 (RIP1)], and the ultra-structure of acinar cells were detected by flow cytometry, Western blot and transmission electron microscopy (TEM). **Results** The acinar cells in the improved ascites model were mainly characterized by necrosis; compared with the other 3 groups, the apoptosis rate and necrosis rate were both up-regulated, RIP1 and BAX protein expression levels were up-regulated, and Bcl-2 protein was down-regulated. TEM results showed the organelle structure of acinar cells was destroyed, and the cell membrane was degraded in the improved ascites model. Compared with the control group, apoptosis rate of acinar cells in the cerulein and cerulein+LPS models were increased and necrosis rate were not changed. The expression of pro-apoptotic protein Bax was increased, while the expression level of RIP1 was not significantly increased. TEM results showed that in cerulein group and cerulein+LPS group, the chromatin of the cells was condensed into a mass, the cytoplasm was degraded and the cell membrane was intact, showing typical

^{*} 国家自然科学基金(No. 81470886、No. 81770640)资助

[△] 通信作者, E-mail: liyuanletters@163.com

apoptosis characteristics. **Conclusion** Compared with cerulein and cerulein + LPS models, which mainly focus on apoptosis of acinar cells and applied to mild acute pancreatitis study, the improved ascites model mainly focuses on the necrosis of acinar cells and is a good model for studying acinar cell necrosis and severe acute pancreatitis.

【Key words】 Acute pancreatitis *In vitro* model Apoptosis/necrosis Ascites

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见急腹症,其轻、重症患者病程发展不同,预后差异大,针对轻症急性胰腺炎(mild acute pancreatitis, MAP)和重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)间转化的机制研究是该领域热点。前期报道显示,胰腺腺泡细胞凋亡/坏死的死亡方式与 MAP/SAP 间的转化密切相关^[1-2],近年来针对腺泡细胞凋亡/坏死相关基因、microRNA 以及治疗药物的研究增长迅速^[3-5]。离体细胞实验是 AP 研究中不可或缺的组成部分,其具有成分单一、可控性好,经济成本相对较低等优点。目前腺泡细胞的 AP 体外模型众多,如在体外培养的腺泡细胞中加入炎症因子、酒精及牛磺胆酸钠等试剂造模,最常见的是给予雨蛙素或雨蛙素联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)造模^[6-8]。这些模型因具有简便易操作、均一性好等优点,在 AP 体外研究中,特别是在模拟 MAP 及腺泡细胞凋亡的研究中使用广泛。然而,MAP 及腺泡细胞坏死的体外模型则相对较少,现有的少数几种体外模型大多是照搬体内模型的刺激试剂,忽视了体内、外环境条件的不同,存在脱离临床实际、造模效果不佳等问题。本研究使用 SAP 动物模型的腹水刺激体外培养的同源腺泡细胞造模,并在此基础上首次引入共培养体系、混合腹水等措施进行改良,以更好的模拟临床微环境,提高模型的稳定性和可重复性,并利于后续细胞、分子实验的检测。此外,我们还将该方法与目前常见的雨蛙素造模和雨蛙素联合 LPS 刺激造模的方式相比较,以评价几种模型在诱导胰腺腺泡细胞凋亡/坏死中的优缺点,为后续 AP 凋亡/坏死研究选择体外实验模型提供参考。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及腹水采集

雄性 Wistar 大鼠,体质量 200~220 g,由四川大学实验动物中心提供。动物实验获四川大学动物福利保护委员会批准。环境温度控制在(23±2)℃,光线 12 h 明暗循环交替,饲喂由四川大学动物中心提供的标准饲料。术前 12 h,禁食不禁水。

大鼠腹水采集:腹腔注射 30 mg/kg 剂量的戊

巴比妥麻醉 Wistar 大鼠 5 只。无菌开腹,于胆胰管十二指肠开口处对侧用无菌注射器针头扎一小孔,24 G 软管经由该小孔逆行插入胆胰管中。胆胰管近肝段用动脉夹封闭。微泵以 0.1 mL/min 的速率经由胆胰管插管泵入 50 mg/kg 剂量的牛磺胆酸钠。泵药结束后,静置 5 min 拔管,胰腺复位,逐层关腹。皮下补生理盐水 10 mL。12~18 h 后,于腹腔处开一小口,使用无菌注射器针筒深入大鼠腹腔吸取腹水。每只大鼠通常可得 10~15 mL 腹水。获取腹水后,于无菌操作台中将 5 只大鼠的腹水混合备用。

1.2 实验细胞及分组

大鼠胰腺腺泡细胞株 AR42J,购自中国科学院上海细胞库。用含有 200 mL/L 胎牛血清(BI,以色列)的 F12-K 培养基(GIBCO,美国)加入 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素,于 37℃、50 mL/L CO₂ 标准培养箱中培养,隔天换液,2~3 d 传代一次。取对数期 AR42J 细胞以 3×10⁵/孔的密度均匀铺于 6 孔板中,每组铺 3 孔,实验重复 3 次以上。24 h 后,待所种细胞贴壁后,分为 4 个组,各组按如下条件加入刺激药物。

对照组:每孔加入 2 mL 培养液及等体积 PBS 溶液;雨蛙素组:每孔加入 2 mL 培养液,并加入 10 nmol/L 雨蛙素(Sigma,美国);雨蛙素+LPS 组:每孔加入 2 mL 培养液、10 nmol/L 雨蛙素及 10 mg/L LPS(Sigma,美国);改良腹水组:在改良腹水组中引入共培养体系(图 1),于 6 孔板中置入 1 μm 孔径的 Transwell 小室(Millipore,美国),孔板中加入 1 mL 培养液,小室中加入混合后的 1 mL 无菌腹水进行共培养,培养液与无菌腹水的体积比为 1:1。在共培养体系中,溶解于腹水中的炎症因子、酯类等有效成分可通过室膜上的小孔与体外培养的腺泡细胞相互作用。而小室中的巨噬细胞和蛋白物等大于室膜上小孔的孔径,不可穿过小孔,与腺泡细胞在物理位置上分隔。

1.3 流式细胞检测腺泡细胞凋亡及坏死

分组培养 24 h 后,分别收集细胞样本:预冷 PBS 清洗 1~2 次,用不含 EDTA 的胰酶消化,再次离心、清洗后得实验样本,根据 Annexin V-PI 凋亡

检测试剂盒(BD,美国)说明书,按要求加入缓冲液及染料,于暗处孵育 15 min 后,使用流式细胞仪(Beckman,Cytoflex,美国)检测各组细胞凋亡及坏死率。在流式细胞仪检测中,Annexin V 以 FITC 标记,PI 以 PE 标记,Annexin V-FITC 阳性而 PI-PE 阴性为凋亡细胞,Annexin V-FITC 及 PI-PE 均阳性为坏死细胞。

1.4 Western blot 检测 Bax、Bcl-2、RIP1 蛋白

分组培养 24 h 后,分别收集组细胞样本,采用 Western blot 检测方法对 4 组细胞中坏死相关蛋白 RIP1、促凋亡蛋白 Bax 和凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达情况进行检测。采用凯基全蛋白提取试剂盒(凯基,中国)提取全蛋白,BCA 试剂盒(Pierce,美国)测定蛋白浓度。各组分别取 20 μg 蛋白进行电泳,以作总蛋白定量。本实验采用 BIO-RAD 免染胶试剂盒(TGX Stain-Free),配合使用 BIO-RAD 凝胶成像系统,直接使用总蛋白归一化定量(即以总蛋白为参照)。电泳后转膜、封闭。加入一抗,Bax、Bcl-2、RIP1 抗体均以 1 : 1 000 稀释(CST,美国)。4 ℃ 孵育过夜后,加二抗(1 : 5 000 稀释,CST,美国)孵育,显影剂(Millipore,美国)显影。采用 Image-Pro Plus

图像分析软件分析灰度值。以各条带灰度值与全蛋白总灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.5 透射电镜观察细胞超微结构变化

分组培养 24 h 后,PBS 收集各组细胞至 EP 管中,3 000 r/min 离心 10 min,去上清,沿管壁轻轻加入 5 mL/L 戊二醛,于 4 ℃ 静置 15 min。再 10 000 r/min 离心 15 min,弃上清,30 mL/L 戊二醛固定。后采用 10 mL/L 四氧化锇再固定,丙酮逐级脱水,包埋,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双重染色。HITACHI H-7650 型透射电镜(日立,日本)观察、采图。

1.6 统计学方法

定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同模型腺泡细胞凋亡/坏死率变化

各模型组细胞的凋亡/坏死情况见图 2 和表 1。与对照组比较,雨蛙素及雨蛙素+LPS 组凋亡率上升($P < 0.05$),但坏死率差异无统计学意义。改良

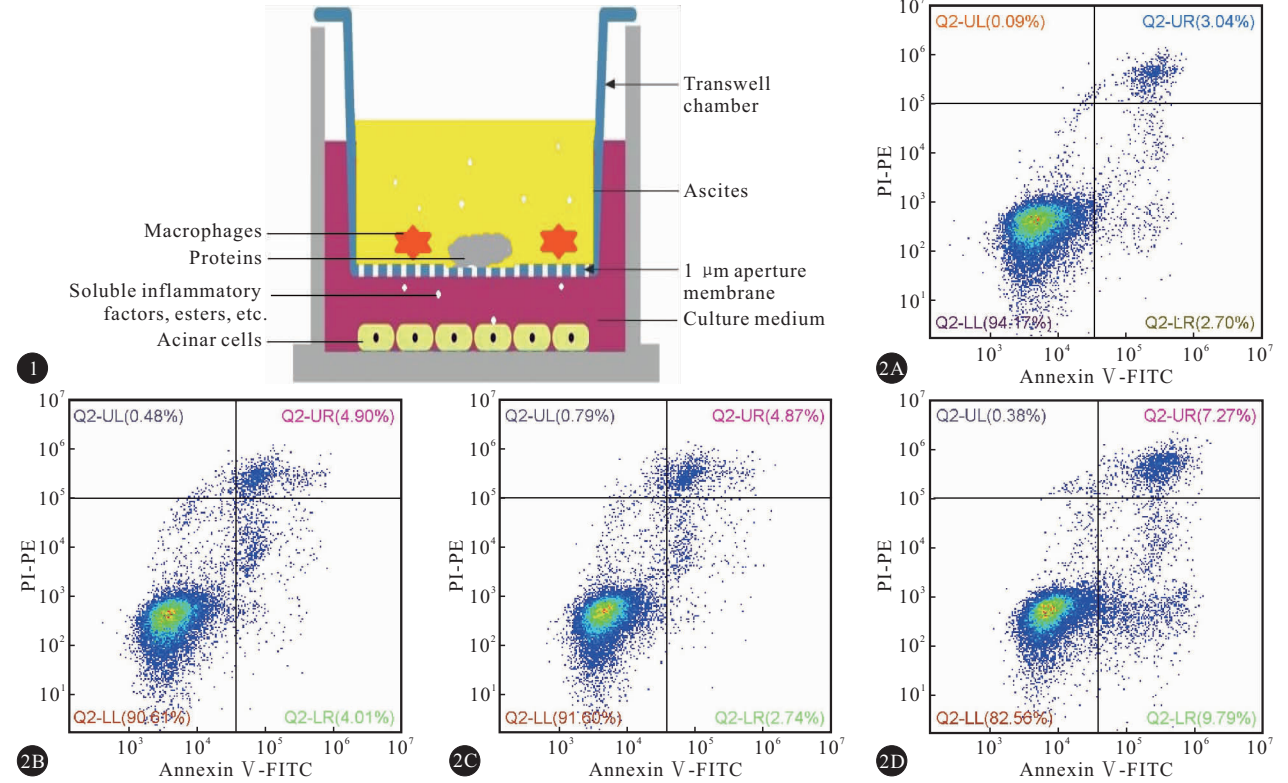


图 1 共培养体系示意图 图 2 各组 AR42J 细胞的流式分布图

Fig 1 Co-culture system Fig 2 Flow cytometry analyzes of AR42J cells in different groups

A: Control group; B: Cerulein group; C: Cerulein+LPS group; D: Improved ascites group

表 1 不同模型 AR42J 凋亡率及坏死率变化

Table 1 Apoptosis rate and necrosis rate of AR42J cells in different models

Group	Apoptosis rate/%	Necrosis rate/%
Control	2.74±0.12	3.81±0.36
Cerulein	4.02±0.27*	4.03±0.29
Cerulein+LPS	3.79±0.21*	4.17±0.16
Improved ascites	9.81±0.33*·#·△	7.47±0.32*·#·△

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. cerulein group; △ $P < 0.05$, vs. Cerulein+LPS group

腹水组中凋亡率和坏死率均较对照组上调,且改良腹水组中细胞的凋亡率和坏死率亦高于雨蛙素组及雨蛙素+LPS 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。雨蛙素及雨蛙素+LPS 组凋亡率和坏死率

差异均无统计学意义。

2.2 不同模型腺泡细胞凋亡/坏死相关蛋白表达变化

见图 3。与对照组相比,雨蛙素组、雨蛙素+LPS 组的坏死相关蛋白 RIP1 的表达无上调($P > 0.05$),促凋亡蛋白 Bax 表达均升高($P < 0.05$),凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达升高(雨蛙素+LPS 组, $P < 0.05$)或无上调(雨蛙素组, $P > 0.05$)。雨蛙素组 RIP1 和 Bax 蛋白表达与雨蛙素+LPS 组相比,差异均无统计学意义,Bcl-2 蛋白低于雨蛙素+LPS 组($P < 0.05$)。改良腹水组 RIP1 和 Bax 蛋白的表达高于其余 3 组,Bcl-2 的表达水平低于其余 3 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

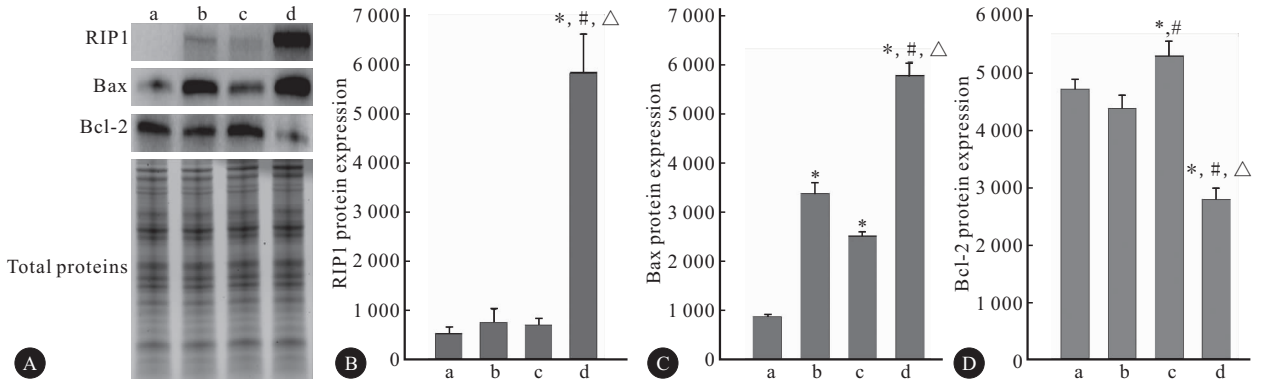


图 3 凋亡/坏死相关蛋白在不同模型组中的表达变化

Fig 3 The expression of apoptosis/necrosis related protein in different models

A: The protein expression measured by western blot; B: Quantification of RIP1 protein expression; C: Quantification of Bax protein expression; D: Quantification of Bcl-2 protein expression; a: Control group; b: Cerulein group; c: Cerulein+LPS group; d: Improved ascites group. * $P < 0.05$, vs. a; # $P < 0.05$, vs. b; △ $P < 0.05$, vs. c

2.3 不同模型腺泡细胞亚显微结构的改变

透射电镜结果显示,对照组中的细胞核仁边界清晰,细胞器丰富,形态正常,大小适中(图 4A)。雨蛙素组细胞中线粒体略有肿胀,部分细胞有自噬小体出现(图 4B)。雨蛙素+LPS 组以典型的细胞凋

亡特征为主,大量细胞的染色质固缩成团,聚体在核膜边缘,胞质降解,细胞膜仍完整(图 4C)。改良腹水组细胞坏死现象明显,其细胞染色质呈细颗粒状,细胞器结构破坏,细胞膜结构已降解不完整(图 4D)。

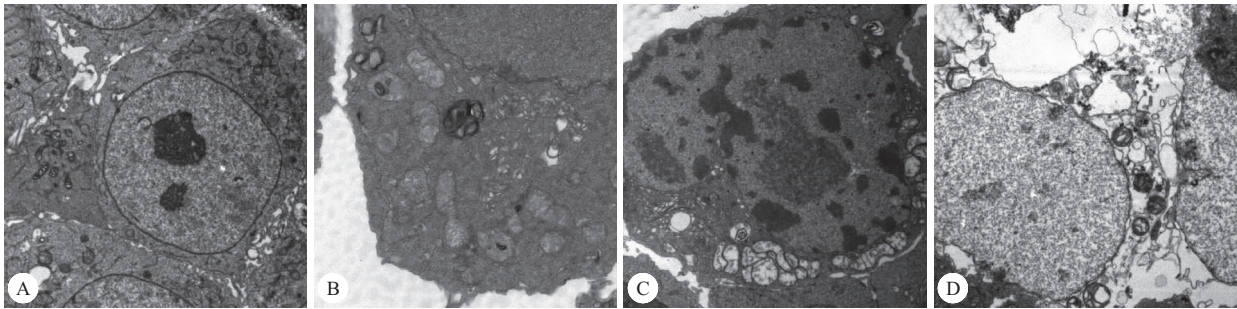


图 4 不同造模方式对腺泡细胞亚显微结构的影响

Fig 4 Effects of different models on ultra-structure of acinar cells

A: Control group, ×10 000; B: Cerulein group, ×30 000; C: Cerulein+LPS group, ×15 000; D: Improved ascites group, ×15 000

3 讨论

目前,AP腺泡细胞的凋亡/坏死体外模型众多,但效果参差不齐,应用较为混乱。本研究引入共培养体系对传统腹水诱导的AP腺泡细胞体外模型进行改良,并与常见的雨蛙素和雨蛙素联合LPS模型进行比较,以评价几种模型在诱导胰腺腺泡细胞凋亡/坏死中的优势、缺点及应用特点,为后续AP凋亡/坏死研究对比、遴选体外实验模型提供参考,现分析总结如下。

MAP和SAP因严重程度不同,治疗方案及预后差异较大。MAP具有自限性,治疗方案相对简单,患者死亡率低,主要以腺泡细胞的凋亡特征为主。目前,MAP体外模型较为成熟、统一,典型代表为基于“胰腺自消化”学说的雨蛙素刺激模型。雨蛙素是胆囊收缩素(CCK)类似物,通过CCK受体,刺激腺泡细胞,激活溶酶体酶水解组织蛋白B,导致胰蛋白酶原激活成胰蛋白酶,从而导致腺泡细胞的“自我消化”^[9-10]。本研究显示,雨蛙素组、雨蛙素+LPS组及改良的腹水组均可造成腺泡细胞的凋亡率上调,但改良腹水组中腺泡细胞的坏死率亦显著升高,电镜结果显示其具有更明显的坏死特征,故对于模拟MAP及腺泡细胞的凋亡的研究,雨蛙素及雨蛙素+LPS模型更符合其临床特征。但单纯雨蛙素刺激与雨蛙素+LPS组二者在造成腺泡细胞凋亡的效果上并无明显差异,基于节约成本和操作简便的原因,建议在MAP及腺泡细胞凋亡研究中首选单纯雨蛙素刺激模型。

SAP是在多种病因下由局部胰腺组织损伤引发机体免疫细胞活化、释放大量细胞因子发生级联效应,从而引起的全身炎症反应,以全身炎症反应综合征和多器官功能障碍为SAP患者重要的临床病理特征,腺泡细胞主要以坏死的死亡方式为主^[11]。目前常见的SAP体外模型相对较少,且较为混乱,大多照搬活体动物模型的刺激方式,如在体外培养环境中加入酒精、牛黄胆酸钠等化学试剂。牛黄胆酸钠是胆汁酸的主要成分,其在动物体中造模的原理在于模拟胆总管下端梗阻时胆汁反流入胰胆管时引起AP,并调动全身炎症细胞产生大规模的炎症反应,可导致血清酶的大幅度上升及多器官损伤,而造成SAP的活体模型^[11-12]。酒精刺激模型亦是

从病因学上模拟饮酒所造成的SAP。然而当这些活体模型应用于体外培养的腺泡细胞时却产生了问题,即在体外培养环境中只有单纯的腺泡细胞,缺少

动物体特有的器官结构及机体免疫系统的参与,故牛黄胆酸钠及酒精等化学试剂在体外实验中仅能造成腺泡细胞的化学损伤,并不能模拟SAP时大规模的炎症反应和特有的生理过程。此外,还有部分文献报道使用雨蛙素+LPS作为SAP的体外模型^[12-13],而本研究结果复制此模型,却发现与对照组比较,雨蛙素+LPS模型在腺泡细胞的坏死率上并无改变,并不适合用于SAP。我们分析这可能与腺泡细胞中缺乏LPS的典型受体Toll样受体4(Toll like receptor 4,TLR4)有关^[14]。在体内实验中,LPS可通过调动动物体内的炎症细胞上的TLR4受体与雨蛙素造成的胰腺损伤共同造成SAP的动物模型。而体外培养的单纯腺泡细胞中由于缺乏TLR4受体表达,并不能与加入的LPS相互作用,故雨蛙素+LPS模型很难引起体外培养的腺泡细胞坏死率的改变。我们观察到临床SAP患者腹腔内常伴有腹水和大量炎症渗出,腹水中含有的大量酶、酯类成分及炎症因子,均为SAP时引起腺泡细胞凋亡/坏死的重要成分^[15],故从原理上讲,该模型可较好的模拟SAP的病理微环境。国内外均有使用腹水刺激模型进行AP体外造模的报道^[16]。本研究选择SAP活体动物腹水作为离体模型诱导刺激物。然而,在实际操作中,我们发现,传统的腹水刺激模型存在效果不稳定、组间差异大、且腹水中的巨噬细胞、蛋白物等杂质与体外培养的腺泡细胞相混合,不利于后续检测等问题。针对以上问题,本研究对传统的腹水模型作出了以下改进:①选取5只以上同一批次的大鼠,由同一技术人员进行手术。手术完成后,在无菌条件下将5只大鼠的腹水相混合,以减少动物个体之间的差异。再者,大鼠腹水数量多,混合后的同一批次腹水(50~60 mL)可一次性刺激多个处理组/时间组细胞,以避免由于腹水批次不同而引起的组间差异。②我们在体外培养的腺泡细胞中引入共培养体系。新鲜获得的腹水加入共培养小室后,溶解于腹水中的炎症因子、酯类等有效成分可通过室膜上的小孔直接作用于体外培养的腺泡细胞。且腹水中的巨噬细胞亦可在该共培养体系中与腺泡细胞之间产生动态的交互作用,引发持续的炎症反应及细胞因子释放,使其能更好的模拟SAP临床病理微环境。小室中的巨噬细胞和蛋白物等大于室膜上小孔的孔径,不可穿过小孔,与腺泡细胞在物理位置上分隔,对腺泡细胞进行后续检测时,取出小室,即可直接收集干净的腺泡细胞,避免了传统腹水模型中巨噬细胞和蛋白物等与腺泡细胞

相混合,对后续腺泡细胞检测的实验结果造成影响的问题。

此外,本研究的流式细胞学、蛋白分析及透射电镜检测结果亦显示,与对照组相比,三种 AP 体外模型中,仅腹水模型可同时上调腺泡细胞的凋亡率及坏死率,坏死相关蛋白及促凋亡蛋白升高,细胞亚显微结构表现出细胞器结构破坏,细胞膜降解等明显的坏死特征。故结合造模原理与本实验研究结果,我们总结出单纯雨蛙素刺激可作为 MAP 及腺泡细胞凋亡研究的体外模型,而腹水刺激模型则是 SAP 及腺泡细胞坏死研究的良好选择。

综上所述,本研究结果显示,雨蛙素以及雨蛙素联合 LPS 的模型均造成以凋亡为主的腺泡细胞死亡方式,建议可选取单纯雨蛙素刺激作为轻症 AP 的体外模型。本研究通过对腹水刺激模型的改良,成功模拟 SAP 临床病理微环境,克服了组间差异大、并由此导致的后续检测结果不稳定等问题,是研究 SAP 及腺泡细胞坏死的良好体外模型。不过,该改良的腹水刺激模型对操作者的手术及无菌操作要求较高,且与其它直接加入化学试剂造模的方法相比较,过程较为繁琐。故需实验者勤于练习,在操作过程中耐心谨慎,作好无菌防控的准备。

参 考 文 献

- [1] GAMAN L, DRAGOS D, VLAD A, *et al.* Phytoceuticals in acute pancreatitis: targeting the balance between apoptosis and necrosis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018:5264592 [2018-01-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5857302/>. doi: 10.1155/2018/5264592.
- [2] SALUJA AK, DUDEJA V. Relevance of animal models of pancreatic cancer and pancreatitis to human disease. *Gastroenterology*, 2013, 144(6):1194-1198.
- [3] LIU Y, CHEN XD, YU J, *et al.* Deletion Of XIAP reduces the severity of acute pancreatitis via regulation of cell death and nuclear factor- κ B activity. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2685 [2018-01-08]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386564/>. doi: 10.1038/cddis.2017.70.
- [4] HU MX, ZHANG HW, FU Q, *et al.* Functional role of MicroRNA-19b in acinar cell necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2016,

36(2):221-225.

- [5] TANOGLU A, YAZGAN Y, KAPLAN M, *et al.* Trimetazidine significantly reduces cerulein-induced pancreatic apoptosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015, 39(1):145-150.
- [6] QIN T, FU Q, PAN YF, *et al.* Expressions of miR-22 and miR-135a in acute pancreatitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(2):225-233.
- [7] PATEL K, DURGAMPUDI C, NOEL P, *et al.* Fatty acid ethyl esters are less toxic than their parent fatty acids generated during acute pancreatitis. *Am J Pathol*, 2016, 186(4):874-884.
- [8] TALUKDAR R, SAREEN A, ZHU H, *et al.* Release of Cathepsin B in Cytosol Causes Cell Death in Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 2016, 151(4):747-758.
- [9] HYUN JJ, LEE HS. Experimental models of pancreatitis. *Clin Endosc*, 2014, 47(3):212-216.
- [10] LERCH MM, GORELICK FS. Models of acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology*, 2013, 144(6):1180-1193.
- [11] MANOHAR M, VERMA AK, VENKATESHAIAH SU, *et al.* Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2017, 8(1):10-25.
- [12] ZHOU X, LIU Z, CHENG X, *et al.* Socs1 and Socs3 degrades Traf6 via polyubiquitination in LPS-induced acute necrotizing pancreatitis. *Cell Death Dis*, 2015, 6:e2012 [2018-02-02]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4720878/>. doi: 10.1038/cddis.2015.342.
- [13] WU L, CAI B, LIU X, *et al.* Emodin attenuates calcium overload and endoplasmic reticulum stress in AR42J rat pancreatic acinar cells. *Mol Med Rep*, 2014, 9(1):267-272.
- [14] LI Y, ZHOU ZG, XIA QJ, *et al.* Toll-like receptor 4 detected in exocrine pancreas and the change of expression in cerulein-induced pancreatitis. *Pancreas*, 2005, 30(4):375-381.
- [15] PEREZ S, PEREDA J, SABATER L, *et al.* Pancreatic ascites hemoglobin contributes to the systemic response in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*, 2015, 81:145-155 [2018-02-02]. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.008>.
- [16] WANG J, XU P, HOU YQ, *et al.* Pancreatitis-associated ascitic fluid induces proinflammatory cytokine expression in THP-1 cells by inhibiting anti-inflammatory signaling. *Pancreas*, 2013, 42(5):855-860.

(2018-05-17 收稿, 2018-08-21 修回)

编辑 吕 熙