

## CD44 在重症急性胰腺炎大鼠肝脏表达及清胰Ⅱ号颗粒剂保护作用的实验研究\*

李 鹏<sup>1</sup>, 王玲君<sup>2</sup>, 兑丹华<sup>3\*\*</sup>

(1. 滨州医学院附院 肛肠外科, 山东 滨州 256603; 2. 博兴县人民医院, 山东 博兴 256500; 3. 遵义医学院附院 肝胆胰外科, 贵州 遵义 563003)

**[摘要]** 目的: 探讨 CD44 在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时胰腺及肝损害机制中的作用,并观察中药清胰Ⅱ号颗粒剂对 CD44 的影响及机理。方法: 将 36 只 SD 大鼠随机等分为假手术组(A 组)、SAP 组(B 组)、治疗组(C 组),各组以 30 g/L 牛磺胆酸钠逆行注入胰胆管制作大鼠 SAP 模型,A 组大鼠开腹后仅翻动肠管后关腹,术后 1 h C 组以 250 g/L 清胰Ⅱ号灌胃给药(10 mL/kg)6 h 1 次,A 组、B 组用同等剂量生理盐水以相同方式灌胃;制模后 24 h 取材,抽血测定血清淀粉酶(amylase, AMY)、谷草转氨酶(Aspartate aminotransferase, AST)、谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)活性的变化,HE 染色观察胰腺、肝脏组织病理改变,应用免疫组织化学方法检测胰腺、肝组织中 CD44 的表达。结果: SAP 组胰腺及肝脏组织损伤明显,CD44 的表达呈阳性,血清 AMY、AST、ALT 活性显著升高,与 A 组、C 组比较有统计学意义( $P < 0.05$ );C 组胰腺及肝脏组织中 CD44 的表达减弱,血清 AMY、AST、ALT 活性降低,与 SAP 组比较有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: CD44 在 SAP 模型大鼠肝损伤中可能具有重要作用,中药清胰Ⅱ号颗粒可抑制胰腺、肝脏组织 CD44 的表达,减轻 SAP 时胰腺和肝脏损害。

**[关键词]** 抗原,CD44; 胰腺炎; 免疫组织化学; 大鼠

**[中图分类号]** R657.51; R361.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)06-0561-04

### Expression of CD44 in Liver Tissues of Rats with Severe Acute Pancreatitis and Protective Effect of Qingyi II Granules

LI Peng<sup>1</sup>, WANG Lingjun<sup>2</sup>, DUI Danhua<sup>3</sup>

(1. Department of Anorectal Surgery, the Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Binzhou 256603, Shandong, China;  
2. People's Hospital of Boxing County of Shandong, Boxing 256500, Shandong, China; 3. Department of Hepatopancreatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the role of CD44 in pancreas and liver damage in severe acute pancreatitis (SAP), and to investigate the effects of Chinese medicine Qingyi II granules on the expression of CD44 and its mechanism. **Methods:** A total of 36 healthy SD rats were randomly divided into three groups: sham-operated group (group A), SAP model group (group B) and treatment group (group C). SAP model was established by retrograde injection of 30 g/L sodium taurocholate into bile-pancreas duct. Qingyi II Granules 250 g/L was administered by gavage every 6 hours in group C. While the other two groups were infused with same volume of saline instead. All animals were sacrificed after modeling for 24 h. The CD44 expressions in pancreas and liver tissues were detected with immunohistochemistry method. Serum amylase (AMY), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were tested. Pathologic changes of pancreas and liver tissues were observed under microscope. **Results:** Pancreas and liver tissues were damaged seriously in group B, and

\*[基金项目] 贵州省科技厅中医药现代化资助项目[2003(13)]。

\*\* 通讯作者 E-mail: duidanhua@yahoo.com.cn

the expression of CD44 was positive, the serum levels of AMY, AST and ALT were significantly higher than those of groups A and C ( $P < 0.05$ ). The expression level of CD44 was lower and activities of serum AMY, AST and ALT were higher significantly in group C than those in group B. ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** The expression of CD44 may play an important role in pancreas and liver injury in SAP rats. Chinese medicine Qingyi II granules could depress the expressions of CD44 in pancreas and liver tissues, and alleviate the pathologic damage of pancreas and liver in SAP rats.

[**Key words**] antigens CD44; pancreatitis; immunohistochemistry; rats

重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis SAP) 是临床常见的急腹症, 病情凶险, 病死率高达 40%<sup>[1]</sup>。近年来研究表明, 白细胞过度激活在组织内浸润及其所释放的细胞因子和炎症介质, 是导致 SAP 合并多脏器损伤的主要原因。CD44 是存在于淋巴细胞膜上的糖蛋白, 能介导白细胞与内皮细胞黏附迁移于组织内与受损靶细胞相结合的重要媒介, 国内外对 CD44 与肿瘤转移、耐药关系的研究报道较多, 而对其与 SAP 肝损害的关系报道少见。本研究通过复制 SAP 模型, 检测大鼠胰腺、肝组织 CD44 表达情况, 并观察清胰 II 号颗粒剂对其的影响, 为 SAP 的诊断治疗提供一个新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

清洁级 SD 大鼠 36 只, 由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, 体重为  $(200 \pm 10)$  g, 雌、雄各半 [合格证号 SCXK - (军) 2002008], 一抗 (小鼠抗大鼠) CD44 购自 Chemicon 公司, 牛磺胆酸钠购自美国 Sigma 公司, 清胰 II 号颗粒剂由遵义医学院附属医院提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组及制模** 将 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (A 组)、SAP 组 (B 组)、治疗组 (C 组), 每组 12 只。以 30 g/L 牛磺胆酸钠逆行注入胰胆管制作大鼠 SAP 模型<sup>[2]</sup>, A 组大鼠开腹后仅翻动肠管后关腹。术后 1 h, C 组大鼠灌喂清胰 II 号颗粒剂 (250 g/L) 10 ml/kg, A 组及 B 组灌喂生理盐水按 10 ml/kg, 每 6 h 重复灌胃 1 次, 共 3 次, 术后 24 h 处死大鼠留取标本。

**1.2.2 血清标本的采集与检测** 造模后 24 h 处死动物, 下腔静脉取血 5 ml 离心后留置血清, 自动生化分析仪测定 AMY、AST、ALT 活性。

**1.2.3 组织形态学观察** 大鼠处死后, 取各组大鼠胰腺、肝脏组织切片后常规 HE 染色, 光镜下观

察其病理学变化, 参考 Schmidt 方法<sup>[3]</sup>, 4 种积分累计为胰腺及肝脏组织评分。

**1.2.4 CD44 表达的测定** 取部分胰、肝标本并立即快速冰冻切片, 根据试剂盒要求, 用免疫组织化学方法进行测定, 在光镜下观察, 细胞膜或胞浆是黄色或棕黄色为 CD44 阳性表达。应用电子计算机免疫组织化学病理图像分析仪系统, 在同一条件下, 对免疫组化切片的 CD44 进行定量分析。每张切片随机选取 3 个高倍视野, 经计算机处理以阳性面积  $\times$  阳性细胞百分比作为 CD44 的表达量。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行数据分析。计量资料呈正态分布且方差齐同者, 采用方差分析, 以  $q$  检验进行两两比较; 偏态分布或方差不齐者, 采用秩和检验, 将数据经秩转换后作两两比较的  $q$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清 AMY、AST、ALT 活性。

B 组、C 组的 AMY、AST、ALT 活性高于 A 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); C 组 AMY、AST、ALT 活性低于 B 组, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清 AMY、AST、ALT 活性 (U/L)

Tab. 1 Changes of serum AMY, AST and ALT levels of rats in the three groups (Unit: U/L)

组别	n	AMY	AST	ALT
A 组	12	1296.87 $\pm$ 82.06	53.38 $\pm$ 6.11	43.38 $\pm$ 7.05
B 组	12	6117.25 $\pm$ 297.67 <sup>(1)</sup>	673.63 $\pm$ 31.01 <sup>(1)</sup>	535.00 $\pm$ 32.26
C 组	12	2545.62 $\pm$ 19.37 <sup>(1)(2)</sup>	123.75 $\pm$ 13.47 <sup>(1)(2)</sup>	91.25 $\pm$ 7.96 <sup>(1)(2)</sup>

注: <sup>(1)</sup>与 A 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 B 组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.2 胰腺、肝组织病理学评分

B 组胰腺、肝组织病理学评分高于 A 组 ( $P < 0.05$ ); 与 B 组比较, C 组胰腺、肝组织的病理学评

分降低( $P < 0.05$ ); C 组胰腺、肝组织病理学评分高于 A 组( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 各组大鼠组织病理学评分比较

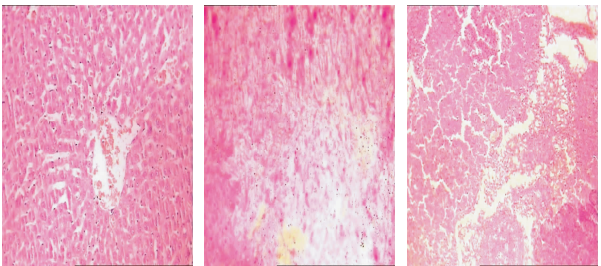
Tab.2 Comparison of tissue pathology scores of rats in each group

组别	胰腺(分)	肝(分)
A 组	$0.56 \pm 0.31$	$0.38 \pm 0.09$
B 组	$13.75 \pm 1.08^{(1)}$	$2.43 \pm 0.39^{(1)}$
C 组	$9.45 \pm 1.68^{(1)(2)}$	$1.01 \pm 0.92^{(1)(2)}$

注: <sup>(1)</sup>与 A 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 B 组比较,  $P < 0.05$ 。

2.3 CD44 在肝脏和胰腺的表达

在胰腺、肝脏组织中,各组均有不同程度 CD44 表达,胰腺主要表达于胞膜,肝脏主要表达于胞浆。B 组 CD44 阳性表达量高于 A 组和 C 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),C 组 CD44 阳性表达量高于 A 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1 及图 2。见表 3、图 2、图 3。



A 组 B 组 C 组

图 1 各组大鼠肝组织(HE ×200)

Fig.1 Sections of liver tissue of rats in the 3 groups (HE, ×200)

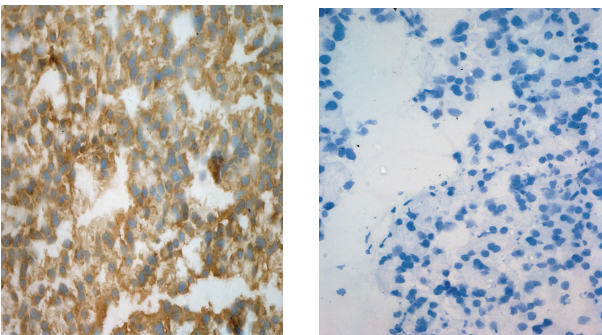
表 3 各组大鼠胰腺、肝组织 CD44 表达水平  
Tab.3 CD44 expression levels in pancreatic tissue and liver tissue of rats in each group

组别	胰腺	肝
A 组	$0.46 \pm 0.07$	$0.51 \pm 0.06$
B 组	$4.12 \pm 0.62^{(1)}$	$6.23 \pm 1.26^{(1)}$
C 组	$2.31 \pm 1.68^{(1)(2)}$	$3.06 \pm 1.51^{(1)(2)}$

注: <sup>(1)</sup>与 A 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 B 组比较,  $P < 0.05$ 。

3 讨论

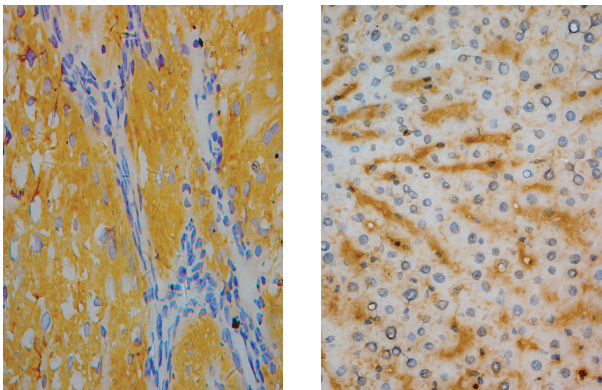
SAP 常并发肝损伤,并可以加重 SAP 病情或延长胰腺炎的病程。SAP 发病机制尚未阐明,细胞因子与急性胰腺炎肝损伤的关系受到重视,研究发



治疗前 治疗后

图 2 SAP 组清胰 II 号颗粒剂治疗前后胰腺组织 CD44 的表达(400 ×)

Fig.2 Expression of CD44 in pancreatic tissue of rats in group SAP before and after the treatment of Qingyi II Granules



治疗前 治疗后

图 3 SAP 组清胰 II 号颗粒剂治疗前后肝脏组织 CD44 的表达(400 ×)

Fig.3 Expression of CD44 in liver tissue of rats in group SAP before and after the treatment of Qingyi II Granules

现促炎因子作用过度活跃,可以导致全身炎症反应综合症,发生多器官功能损害。

CD44(cluster of differentiation, CD)主要参与细胞与细胞、细胞与基质间的连接及淋巴细胞的激活<sup>[4]</sup>,对维持上皮结构的紧密和完整性有重要意义。Weiss 等<sup>[5]</sup>研究表明,阻断 CD44 可以减少单核细胞在炎症局部的迁移和聚集,体外实验也提示,抗 CD44mAb 可活化单核细胞,刺激单核细胞产生及释放细胞因子,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等<sup>[6]</sup>,这些细胞因子是 SAP 继发肝损伤的关键因素<sup>[7]</sup>,与 SAP 病情程度密切相关。李军成、田斌等<sup>[8]</sup>认为,CD44 参与了急性胰腺炎病程急性期的急性炎症反应。本研究发现,制模后 CD44 在胰腺、肝组织中

的表达上调,CD44 在肝脏主要在胞浆阳性表达。结果显示,胰腺炎组病情重,CD44 的表达也增强,说明 CD44 的表达可能与胰腺炎的病情严重程度相关,提示 CD44 在急性胰腺炎中可能发挥着特定的作用,对其病程和预后有重要意义。由此可以推测 CD44 在 SAP 合并多脏器功能损害中可能发挥着重要作用。

中药清胰Ⅱ号在急性胰腺炎的治疗中已广泛应用,多年的临床实践证明,清胰Ⅱ号是治疗 SAP 的有效的复方制剂<sup>[9]</sup>。中药清胰Ⅱ号含有栀子、厚朴、大黄等,厚朴主要有燥湿除满、下气消积,栀子有清热利尿,凉血解毒等作用,在治疗 SAP 方面,中药通里攻下、清除肠道内毒素、抑制细菌移位等的作用已得到初步证实,特别是清胰Ⅱ号的某些效果得到了肯定<sup>[10]</sup>。本研究发现,应用清胰Ⅱ号颗粒剂治疗后,胰腺及肝组织中 CD44 的表达程度,血 AST、ALT 浓度较模型组明显降低( $P < 0.05$ ),这说明经清胰Ⅱ号颗粒剂治疗后,胰腺炎大鼠的肝损害程度减轻。由此可以推测清胰Ⅱ号颗粒剂可能是通过降低 SAP 患者 CD44 表达有效阻断白细胞与内皮细胞黏附,从而阻断白细胞的聚集与浸润,阻断细胞因子的连锁级联反应,减轻对组织的浸润及损害程度。

## 4 参考文献

- [1] Ogawa M, Hirota M, Hayakawa T, et al. Development and use of a new staging system for severe acute pancreatitis based on a nationwide survey in Japan [J]. *Pancreas*,

2002(4):325-330.

- [2] 彭慈军,赵鹏,兑丹华,等. 清胰Ⅱ号对大鼠重症急性胰腺炎肺损伤的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2007(19):1757-1759.
- [3] Schmidt J, Lewandrowsik, Warshaw AL, et al. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. *Int J Pancreatol*, 1992(12):41-51.
- [4] 程湘,程天民. CD44 的基因结构和分子生物学功能 [J]. 国外医学分子生物学分册,1998(7):210-203.
- [5] Weiss JM, Slee J, Renkl AC, et al. An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal langerhans cell and blood dendritic cell function [J]. *J Cell Biol*, 1997(5):1137-1144.
- [6] Tan PH, Santos EB, Rossbach HC, et al. Enhancement of natural killer activity by an antibody to CD44 [J]. *J Immunol*, 1993(3):812-820.
- [7] 张华甫,兑丹华. 清胰Ⅱ号颗粒剂对大鼠重症急性胰腺炎肝损伤的保护作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2011(8):929-930.
- [8] 李军成,田斌,陈易人,等. 大鼠急性胰腺炎急性期脑脊液肿瘤坏死因子- $\alpha$  和脑组织 CD44 表达[J]. 中华消化杂志, 2004(6):373-374.
- [9] 李永渝,高占峰,兑丹华,等. 清胰汤和汉防己甲素对香猪重症急性胰腺炎治疗作用及血药浓度测定[J]. 中国中西医结合杂志, 2003(11):832-836.
- [10] 兑丹华,高占峰,赵鹏,等. 清胰Ⅱ号和粉防己碱对实验性重症胰腺炎的治疗作用[J]. 第三军医大学学报, 2005(24):2418-2421.

(2011-10-13 收稿,2011-11-07 修回)

(上接第 560 页)

墨炉法不需重复处理样品,操作简便、方法可行,故最终采用石墨炉法测定砷。

## 4 参考文献

- [1] 刘童,王永林,王爱民,等. 微波消解-石墨炉原子吸收法测定荭草药材中的铅、镉、铜含量[J]. 贵阳医学院学报, 2010(6):551-554.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北

京:化学工业出版社,2010:70.

- [3] 李辉敏,石向群,刘频健. 石墨炉原子吸收分光光度法测定复叶耳蕨根中铅、镉的含量[J]. 中国药房, 2010(27):2554-2555.
- [4] 刘伟,郭兴辉,徐倩. 原子吸收光谱法测定不同产地夏枯草中重金属含量[J]. 中国实验方剂学, 2010(4):53-55.

(2011-06-10 收稿,2011-07-27 修回)