

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1587-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240612

## 趋化因子CCL19诱导巨噬细胞M1极化对小鼠慢性胰腺炎的促进作用及其机制

崔连莺<sup>1</sup>, 张晓伟<sup>1</sup>, 翟悦<sup>1</sup>, 潘悦<sup>2</sup>, 于秀艳<sup>1</sup>

(1. 吉林省肿瘤医院检验科, 吉林 长春 130012; 2. 大连理工大学医学部药理学系, 辽宁 大连 116024)

**[摘要]** **目的:** 探讨趋化因子C-C基序配体19 (CCL19) 诱导巨噬细胞M1极化对小鼠慢性胰腺炎的促进作用, 并阐明其相关机制。**方法:** 选取10只雄性C57BL/6N小鼠, 提取小鼠胰腺腺泡细胞和腹腔巨噬细胞, 构建巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系, 共培养体系细胞分为对照组、模型组和小干扰RNA CCL19 (si-CCL19) 组, 显微镜下观察各组腺泡细胞形态表现。随机选取40只小鼠, 分为正常组和慢性胰腺炎组, 每组20只。HE染色观察2组小鼠胰腺组织病理形态表现, 免疫荧光染色法观察2组小鼠胰腺组织中角质蛋白19 (CK19)、淀粉酶、M1型巨噬细胞相关标志物诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和F4/80表达情况及各组共培养体系细胞中腺泡细胞形态表现及CK19和淀粉酶表达情况, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测2组小鼠血清和各组共培养体系细胞中肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-6和IL-1 $\beta$ 水平, 免疫组织化学法观察2组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达情况, Western blotting法检测2组小鼠胰腺组织和各组共培养体系细胞中CCL19蛋白和关键蛋白核因子 $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路相关蛋白P65、磷酸化P65 (p-P65)、 $\kappa$ B抑制物激酶 $\alpha/\beta$  (IKK $\alpha/\beta$ )、磷酸化IKK $\alpha/\beta$  (p-IKK $\alpha/\beta$ )、I $\kappa$ B $\alpha$ 和磷酸化I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) 表达水平。**结果:** HE染色, 正常组小鼠胰腺组织腺泡细胞的紧密排列; 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织腺泡细胞产生了明显的空泡化, 即腺泡细胞导管化, 小鼠胰腺炎模型制备成功。免疫荧光染色法, 与对照组比较, 模型组腺泡细胞严重的空泡化明显, CK19表达明显增加, 淀粉酶表达明显减少; 与模型组比较, si-CCL19组中腺泡细胞导管化程度降低, CK19表达明显减少, 淀粉酶表达明显增加; 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中淀粉酶表达明显减少, CK19和M1型巨噬细胞标志物iNOS及F4/80表达均明显增加。ELISA法, 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 模型组细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, si-CCL19组细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。免疫组织化学法, 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达明显增加。Western blotting法, 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达水平和NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-P65及p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组细胞中CCL19、p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-P65和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, si-CCL19组细胞中CCL19、p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-P65和p-I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** CCL19通过NF- $\kappa$ B信号通路促进巨噬细胞M1型极化, 诱导炎症微环境的产生, 促进胰腺炎的发生发展。

**[关键词]** 胰腺炎; C-C基序配体19; 巨噬细胞; M1型极化; 核因子 $\kappa$ B

**[中图分类号]** R364.5 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2024-02-22

**[基金项目]** 吉林省科技厅自然科学基金项目 (YDZJ202401123ZYTS)

**[作者简介]** 崔连莺 (1982-), 女, 吉林省长春市人, 副主任技师, 医学博士, 主要从事临床免疫学和分子生物学方面的研究。

**[通信作者]** 于秀艳, 主任技师, 硕士研究生导师 (E-mail: 2360984054@qq.com)

## Promotion effect of chemokine CCL19-induced macrophage M1 polarization on chronic pancreatitis in mice and its mechanism

CUI Lianzhi<sup>1</sup>, ZHANG Xiaowei<sup>1</sup>, ZHU Hua<sup>1</sup>, PAN Yue<sup>2</sup>, YU Xiuyan<sup>1</sup>

(1. Clinical Laboratory, Tumor Hospital, Jilin Province, Changchun 130012, China; 2. Department of Pharmacy, School of Medical Science, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**ABSTRACT** **Objective:** To discuss the promotion effect of chemokine C-C motif ligand 19 (CCL19) induced macrophage M1 polarization on chronic pancreatitis of the mice, and to clarify its related mechanism. **Methods:** Ten male C57BL/6N mice were selected, and the pancreatic acinar cells and peritoneal macrophages were extracted from these mice to construct the macrophage-acinar cell co-culture system. The co-culture system cells were divided into control group, model group, and small interfering RNA CCL19 (si-CCL19) group. The morphology of the acinar cells in various groups were observed under microscope. Forty mice were randomly selected and divided into normal group and chronic pancreatitis group, and there were 20 mice in each group. HE staining was used to observe the pathomorphology of pancreatic tissue of the mice in two groups; immunofluorescence staining was used to observe the expressions of cytokeratin 19 (CK19), amylase, M1 macrophage-related markers inducible nitric oxide synthase (iNOS), and F4/80 in pancreatic tissue of the mice in two groups and morphology of follicular cells and the expressions of CK19, amylase in the co-culture system cells in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, and IL-1 $\beta$  in serum of the mice in two groups and in the co-culture system cells in various groups; immunohistochemistry was used to observe the expression of CCL19 protein in pancreatic tissue of the mice in two groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of CCL19 protein and two nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway-related proteins P65, phosphorylate P65 (p-P65), kappa B inhibitor of kinase  $\alpha/\beta$ (IKK $\alpha/\beta$ ), phosphorylated IKK $\alpha/\beta$  (p-IKK $\alpha/\beta$ ), I $\kappa$ B $\alpha$ , phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$ ) in pancreatic tissue of the mice in two groups and in the co-culture system cells in various groups. **Results:** The HE staining results showed that the acinar cells in pancreatic tissue of the mice in normal group were tightly arranged; compared with normal group, the acinar cells of the mice in chronic pancreatitis group showed obvious vacuolation and acinar cell ductal metaplasia, indicating successful preparation of the mouse pancreatitis model. The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the acinar cells in model group exhibited severe vacuolation, the CK19 expression was significantly increased, and the amylase expression was significantly decreased; compared with model group, the acinar cell ductal metaplasia in si-CCL19 group was decreased, the CK19 expression was significantly decreased, and the amylase expression was significantly increased; compared with normal group, the expression of amylase in pancreatic tissue of the mice in chronic pancreatitis group was significantly decreased, while the expressions of CK19 and M1 macrophage markers iNOS and F4/80 were significantly increased. The ELISA results showed that compared with normal group, the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  of the mice in chronic pancreatitis group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with control group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in the cells in model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in the cells in si-CCL19 group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The immunohistochemistry results showed that compared with normal group, the expression of CCL19 protein in pancreatic tissue of the mice in chronic pancreatitis group was significantly increased. The Western blotting results showed that compared with normal group, the expression levels of CCL19 protein and NF- $\kappa$ B signaling pathway-related

proteins p-P65, p-IKK $\alpha/\beta$ , and p-I $\kappa$ B $\alpha$  in pancreatic tissue of the mice in chronic pancreatitis group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with control group, the expression levels of CCL19, p-IKK $\alpha/\beta$ , p-P65, and p-I $\kappa$ B $\alpha$  proteins in the cells in model group were significantly increased ( $P < 0.05$ ); compared with model group, the expression levels of CCL19, p-IKK $\alpha/\beta$ , p-P65, and p-I $\kappa$ B $\alpha$  proteins in the cells in si-CCL19 group were decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CCL19 promotes the macrophage M1 polarization through the NF- $\kappa$ B signaling pathway, induces the formation of inflammatory microenvironment, and promotes the occurrence and development of pancreatitis.

**KEYWORDS** Pancreatitis; C-C motif ligand 19; Macrophages; M1 polarization; Nuclear factor- $\kappa$ B

胰腺是体内仅次于肝脏的第二大腺体, 由内分泌部和外分泌部组成, 外分泌部主要由腺泡细胞和导管细胞构成。腺泡细胞可以产生和释放大量消化酶, 包括淀粉酶和脂肪酶等, 这些消化酶经过胰腺导管输送至十二指肠, 对机体消化过程发挥重要作用。在胰腺炎过程中, 一部分胰腺腺泡细胞发生形态学改变, 转变为管状结构, 成为导管细胞, 不再表达腺泡细胞标记物, 但在治疗后胰腺导管细胞同样具有向腺泡细胞转化的潜能<sup>[1]</sup>。慢性胰腺炎是由多种病因导致的, 胰酶在胰腺内被过度激活后引起胰腺组织自身消化、水肿、出血甚至坏死的炎症反应<sup>[2]</sup>。

免疫微环境是炎症微环境的重要组成部分, 免疫微环境的改变是导致炎症产生的主要因素, 其中巨噬细胞是免疫微环境的重要组成部分<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>显示: 巨噬细胞的 M1 型极化会通过分泌白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等炎症因子促进炎症的产生。核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路, 即 NF- $\kappa$ B/ $\kappa$ B 抑制物激酶  $\alpha/\beta$  (inhibitor of  $\kappa$ B kinase- $\alpha/\beta$ , IKK $\alpha/\beta$ )/磷酸化 IKK $\alpha/\beta$  (phosphorylated IKK $\alpha/\beta$ , p-IKK $\alpha/\beta$ )/P65/磷酸化 P65 (phosphorylated P65, p-P65)/I $\kappa$ B $\alpha$ /磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  (phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$ , p-I $\kappa$ B $\alpha$ ), 其调控巨噬细胞炎症反应, 是巨噬细胞 M1 型极化的重要信号通路<sup>[5]</sup>。C-C 基序配体 19 (C-C motif ligand 19, CCL19) 是 CC 类趋化因子家族成员, 又称为巨噬细胞炎症蛋白 3 $\beta$ , 是内环境稳定性趋化因子。其主要由中性粒细胞、淋巴内皮细胞和淋巴结 T 淋巴细胞释放, 趋化幼稚 T 淋巴细胞和成熟树突细胞 (dendritic cells, DC)<sup>[6]</sup>。CCL19 在慢性胰腺炎中对免疫微环境具体的调控机制尚未完全阐明。因此, 本研究探讨 CCL19 对 NF- $\kappa$ B 信号通路的调节作用, 阐明其诱导巨噬细胞 M1 型极化促进胰腺炎发生的作用机制, 为慢性胰腺炎的临床治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物、主要试剂和仪器** 雄性 C57BL/6N 小鼠 50 只, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。RPMI-1640 培养基、Waymouth 培养基、胎牛血清和 RIPA 缓冲液购自北京 Biosharp 公司, New Super ECL 检测试剂盒购自北京百欧泰生物科技有限公司, 兔抗 CCL19 多克隆抗体、兔抗 p-IKK $\alpha/\beta$  多克隆抗体、兔抗 IKK $\alpha/\beta$  多克隆抗体、兔抗 p-P65 多克隆抗体、兔抗 P65 多克隆抗体、兔抗 p-I $\kappa$ B $\alpha$  多克隆抗体、兔抗 CCL19 多克隆抗体和兔抗 GAPDH 多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 小干扰 RNA CCL19 (small interfering RNA CCL19, si-CCL19) 购自广东省广州锐博生物有限公司, 即用型 HRP 标记的羊抗兔二抗购自北京欣博盛生物科技有限公司, TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  细胞因子酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测试剂盒购自广东省深圳康肽生物科技有限公司, 荧光标记 DAPI 购自北京索莱宝科技有限公司, I $\kappa$ B $\alpha$  一抗、免疫荧光兔抗角质蛋白 19 (cytokeratin 19, CK19) 多克隆抗体、兔抗 Amylase 多克隆抗体、兔抗 F4/80 多克隆抗体、兔抗诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 多克隆抗体、Alexa Fluor 488 山羊抗兔二抗和 Rhodamine 山羊抗兔二抗购自美国 Proteintech 公司, 免疫组织化学试剂购自青岛海氏海诺医疗科技有限公司, 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。低温高速离心机和 -80 $^{\circ}$ C 冰箱购自美国 Thermo 公司, 酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司, 倒置相差显微镜和倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司, 电泳仪购自北京六一有限公司。

**1.2 小鼠胰腺腺泡细胞和腹腔巨噬细胞提取** 提取胰腺腺泡细胞: 胰蛋白酶抑制剂加入 1% 青-链霉素双抗和血清培养基混匀, 磷酸二氢钾溶液、丙酮酸钠和 1% 青-链霉素双抗消化液备用。取 5 只小

鼠,脱臼处死,置于75%乙醇溶液浸泡,立即切取小鼠胰腺组织,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤2次,置于消化液中剪碎消化20 min。吸取上清液至离心管中,皿中加入消化液,二次消化。吸出所有消化液,加入含大豆酶抑制剂的Waymouth培养基终止消化,  $1\ 720\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min,弃上清液,加入培养基,重复离心1次,弃上清。乙酸溶液中里加入鼠尾胶原后,加入到培养皿中,冲洗内壁。紫外照射放置1 h, PBS缓冲液冲洗2次,获得胰腺腺泡细胞,吸取培养液并加入新的培养基培养。

**提取腹腔巨噬细胞:**取5只小鼠,脱臼处死,置于75%乙醇溶液中浸泡,切开小鼠腹腔,后用镊子夹起腹膜,吸取冷PBS和酶缓冲液注入至腹腔中灌洗,手指揉小鼠腹部,用镊子夹起腹膜再用针管吸出灌洗液,灌洗液中含有的巨噬细胞即为被采集的腹腔巨噬细胞。

**1.3 小鼠胰腺腺泡细胞与巨噬细胞共培养体系制备和分组** 采用巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系, Transwell小室培养,下室为巨噬细胞,上室为腺泡细胞。共培养体系分为对照组、模型组和si-CCL19组,对照组下室的巨噬细胞为未极化的原代巨噬细胞,模型组下室的巨噬细胞为  $40\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )和  $400\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的与炎症发展密切相关的M1型巨噬细胞, si-CCL19组下室为M1型巨噬细胞并转染si-CCL19, 3组培养体系的上室均为提取的原代腺泡细胞<sup>[7]</sup>。按照参考文献[8]中方法培养腺泡细胞。共培养体系中的细胞制备结束后,加入RPMI-1640培养基,孵育18 h,显微镜观察腺泡细胞形态表现。

**1.4 小鼠胰腺炎模型制备** 选取40只体质量为20~22 g的C57BL/6N小鼠,分为正常组和慢性胰腺炎组,每组20只。慢性胰腺炎组小鼠腹腔注射雨蛙素  $50\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 诱导小鼠胰腺炎模型,每周给药3 d,每日6次,每次间隔1 h;正常组小鼠注射同等次数和剂量的生理盐水,至第4周造模结束,处死小鼠后解剖,取出小鼠胰腺组织<sup>[9]</sup>。显微镜下观察胰腺炎模型小鼠胰腺组织导管化情况和CK19和淀粉酶表达情况,判定小鼠胰腺炎模型制备情况。

**1.5 HE染色观察2组小鼠胰腺组织病理形态表现** 小鼠胰腺组织石蜡切片脱蜡后,苏木素染色3~8 min,自来水冲洗,于1%盐酸乙醇溶液分化

数秒,自来水冲洗,0.6%氨水返蓝,流水冲洗,伊红染色1~3 min。切片脱水,中性树胶封片,显微镜观察2组小鼠胰腺组织病理形态表现。

**1.6 免疫荧光染色法观察2组小鼠胰腺组织中CK19、淀粉酶、iNOS和F4/80表达情况及各组共培养体系细胞中腺泡细胞形态表现及CK19和淀粉酶表达情况** 小鼠胰腺组织石蜡切片脱蜡后进行抗原修复,置于抗原修复液体中,放入微波炉,中火处理30 min。冷却至室温后,回收抗原修复液。加入3%过氧化氢溶液浸泡10 min,冲洗。5%山羊抗兔血清封闭,水洗。加入兔抗CK19一抗、兔抗Amylase一抗、兔抗F4/80一抗和兔抗iNOS一抗,室温孵育2 h。回收一抗, PBS缓冲液洗涤3次。孵育山羊抗兔二抗,置于室温避光1 h,回收二抗,使用PBS缓冲液冲洗。DAPI染色5 min后冲洗,显微镜观察2组小鼠胰腺组织中CK19、淀粉酶、iNOS和F4/80免疫荧光强度及各组共培养体系细胞中腺泡细胞形态表现及CK19和淀粉酶免疫荧光强度。

**1.7 ELISA法检测2组小鼠血清和各组共培养体系细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平** 取2组小鼠血清,根据试剂盒说明书操作,检测2组样本中炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平。酶标仪检测波长450 nm处各样本吸光度(A)值,绘制标准曲线,计算2组小鼠血清和各组共培养体系细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平。

**1.8 免疫组织化学法观察2组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达情况** 小鼠胰腺组织石蜡切片脱蜡后抗原修复,血清封闭,水洗。加入兔抗CCL19一抗孵育1.5 h。PBS缓冲液洗涤3次,孵育山羊抗兔二抗,置于室温30 min,苏木素染色。将复染后切片置于水中,冲洗后脱水,中性树胶封片。显微镜观察2组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达情况。

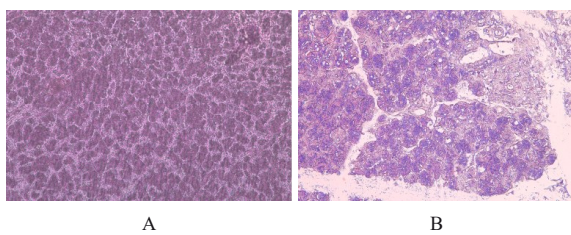
**1.9 Western blotting法检测2组小鼠胰腺组织和各组共培养体系细胞中CCL19蛋白及NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达水平** 将巨噬细胞和小鼠胰腺腺组织于RIPA缓冲液中裂解,细胞置于冰上快速充分研磨1 min,胰腺组织于液氮中取出后,置于破碎机研磨充分破碎。冰上放置15 min。置于  $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $11\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min,吸上清于新的离心管中。加入含 $\beta$ -巯基乙醇的上样缓冲液;置于  $95\ ^\circ\text{C}$ 的金属浴模块中加热变性10 min。制备10%SDS-

PAGE 浓缩胶和分离胶进行电泳操作。使用聚偏二氟乙烯膜于 300 mA 电流条件下进行转膜。TBST 溶液洗膜, 脱脂牛奶封闭, 兔抗 CCL19 一抗 (1:1 000)、兔抗 p-IKK $\alpha$ / $\beta$  一抗 (1:1 000)、兔抗 IKK $\alpha$ / $\beta$  一抗 (1:1 000)、兔抗 p-P65 一抗 (1:1 000)、兔抗 P65 一抗 (1:1 000)、兔抗 p-I $\kappa$ B $\alpha$  一抗 (1:1 000)、兔抗 GAPDH 一抗 (1:1 000) 和兔抗 I $\kappa$ B $\alpha$  一抗 (1:1 000), 室温孵育 2 h 后回收, 再用 TBST 溶液清洗 3 次, 加入即用型 HRP 标记的羊抗兔二抗。孵育 1 h 后回收清洗。配制显影液, 均匀洒在 PVDF 膜上, 将膜置于显影仪中显影, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.10 统计学分析** 采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件进行统计学分析。2 组小鼠血清和各组共培养体系细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  水平, CCL19 蛋白和 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平均符合正态分布, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。2 组间样本均数比较采用两独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 2 组小鼠胰腺组织病理形态表现** 正常组小鼠胰腺组织腺泡细胞紧密排列。与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织腺泡细胞产生了明显的空泡化, 即腺泡细胞导管化, 小鼠胰腺炎模型制备成功。见图 1。



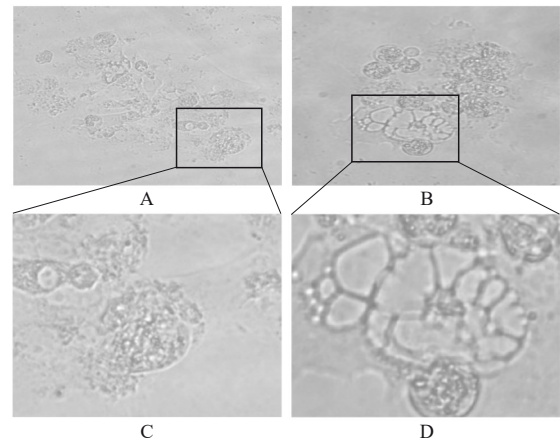
A: Normal group; B: Chronic pancreatitis group.

图 1 HE 染色观察 2 组小鼠胰腺组织病理形态表现 ( $\times 200$ )

Fig. 1 Histopathology of pancreatic tissue of mice in two groups observed by HE staining ( $\times 200$ )

**2.2 各组 M1 极化巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系中腺泡细胞形态表现和细胞中 CK19 和淀粉酶表达情况** 荧光显微镜下, 绿色荧光强度代表 CK19 的表达, 红色荧光强度代表淀粉酶的表达。与对照

组比较, 模型组腺泡细胞严重的空泡化明显, CK19 表达明显增加, 淀粉酶表达明显减少。与模型组比较, si-CCL19 组中腺泡细胞导管化程度降低, CK19 表达明显减少, 淀粉酶表达明显增加。见图 2~5。



A, C: Control group; B, D: Model group. A, B:  $\times 200$ ; C: Partial enlargement of A; D: Partial enlargement of B.

图 2 对照组和模型组 M1 极化巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系腺泡细胞形态表现

Fig. 2 Morphology of follicular cells in M1-polarised macrophage-adenocyte co-culture systems in control group and model group

**2.3 2 组小鼠胰腺组织中 CK19、淀粉酶、iNOS 和 F4/80 表达情况** 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中淀粉酶表达明显减少, CK19 和 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 及 F4/80 表达均明显增加。见图 6 和 7。

**2.4 2 组小鼠血清和各组共培养体系细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  水平** 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组细胞中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, si-CCL19 组细胞中炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 8~9。

**2.5 2 组小鼠胰腺组织中 CCL19 蛋白表达情况** 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中 CCL19 蛋白表达明显增加。见图 10。

**2.6 2 组小鼠胰腺组织和各组共培养体系细胞中 CCL19 蛋白及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平** 与正常组比较, 慢性胰腺炎组小鼠胰腺组织中 CCL19、p-IKK $\alpha$ / $\beta$ 、p-P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平

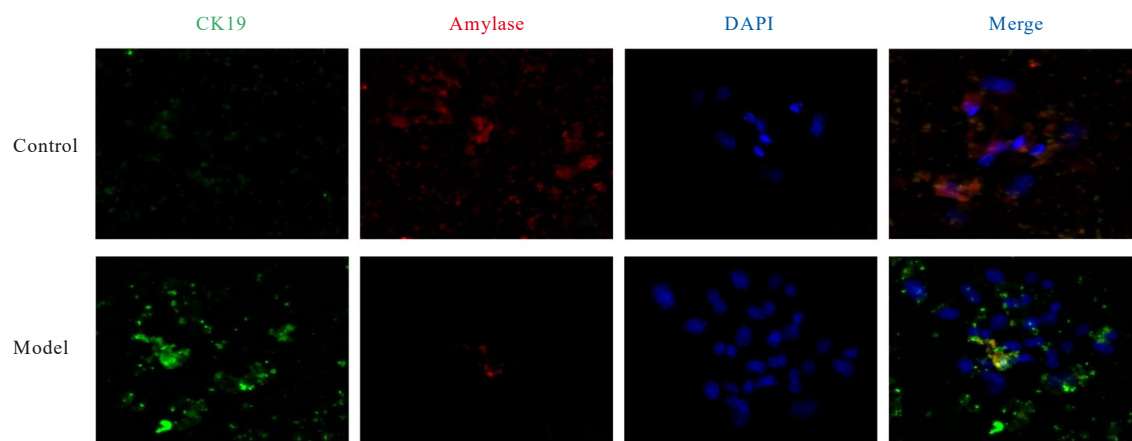
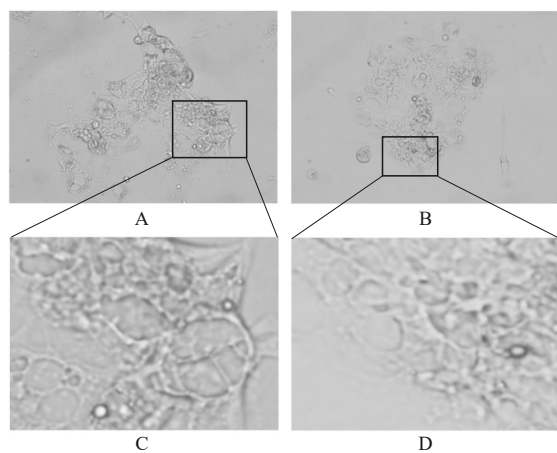


图3 对照组和模型组M1极化巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系细胞中CK19及淀粉酶表达情况(免疫荧光,  $\times 200$ )  
Fig. 3 Expressions of CK19 and amylase in cells in M1-polarised macrophage-adenocyte co-culture systems in control group and model group (Immunofluorescence,  $\times 200$ )



A, C: Model group; B, D: Si-CCL19 group. A, B:  $\times 200$ ;  
C: Partial enlargement of A; D: Partial enlargement of B.

图4 模型组和si-CCL19组M1极化巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系腺泡细胞形态表现

Fig. 4 Morphology of follicular cells in M1-polarised macrophage-adenocyte co-culture systems in model group and si-CCL19 group

均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组细胞中 CCL19、p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, si-CCL19 组细胞中 CCL19、p-IKK $\alpha/\beta$ 、p-P65 和 p-I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。图 11~13。

### 3 讨论

慢性胰腺炎是一种胰腺进行性炎症, 病发后会伴随出现腹痛及内、外分泌失调等症状<sup>[10]</sup>。长期的慢性胰腺炎是诱发胰腺癌的主要诱因之一,

因此治疗慢性胰腺炎对预防胰腺癌的发生具有重要意义<sup>[11-12]</sup>。慢性胰腺炎患者胰腺腺泡细胞导管化的过程可以通过多种机制发生, 包括细胞类型的选择性增殖或丢失及祖细胞的分化或转分化<sup>[13-14]</sup>。胰腺炎患者胰腺组织中 CK19 表达增加, 淀粉酶表达减少<sup>[10]</sup>。本研究结果显示: 胰腺炎小鼠胰腺组织中 M1 型巨噬细胞数量增加, CCL19 蛋白及 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平升高, 提示 CCL19 可能与小鼠慢性胰腺炎中 M1 型巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路有密切关联。敲低 CCL19 后, NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达水平明显降低, 且 si-CCL19 组腺泡细胞导管化程度降低, 提示抑制 CCL19 蛋白表达可以抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路, 进而抑制巨噬细胞 M1 型极化, 抑制慢性胰腺炎的产生。

在慢性胰腺炎中, 免疫微环境的改变是导致慢性胰腺炎发生发展的重要因素<sup>[15]</sup>。巨噬细胞是胰腺炎中丰富的免疫细胞群体, 且具有高度异质性, 可以响应微环境发生表型转化, 包括经典激活巨噬细胞 (M1 型) 和交替激活巨噬细胞 (M2 型)<sup>[16]</sup>。M1 型巨噬细胞具有促炎作用, 会在炎症部位富集并产生多种促炎细胞因子, 如 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等<sup>[17-18]</sup>。CK19 和淀粉酶表达情况为评价慢性胰腺炎的重要指标, 而 iNOS 和 F4/80 表达情况是评价 M1 巨噬细胞的指标。本研究结果显示: M1 型巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系中, 模型组腺泡细胞出现了明显的空泡化, 即腺泡细胞导管化, 且 CK19 表达增加, 淀粉酶表达减少, 证实 M1 型

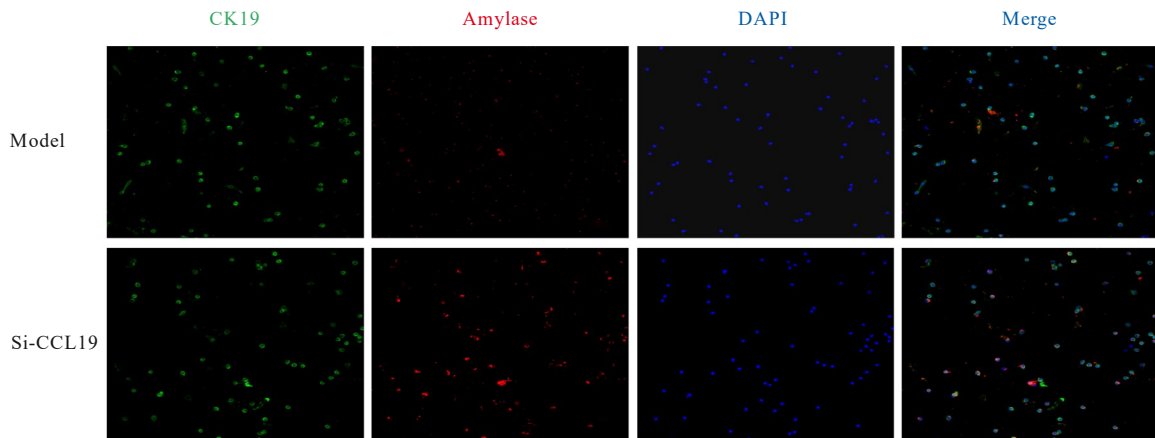


图5 模型组和 si-CCL19 组 M1 极化巨噬细胞-腺泡细胞共培养体系细胞中 CK19 及淀粉酶表达情况(免疫荧光, ×200)  
 Fig. 5 Expressions of CK19 and amylase in cells in M1-polarised macrophage-adenocyte co-culture systems in model group and si-CCL19 group (Immunofluorescence, ×200)

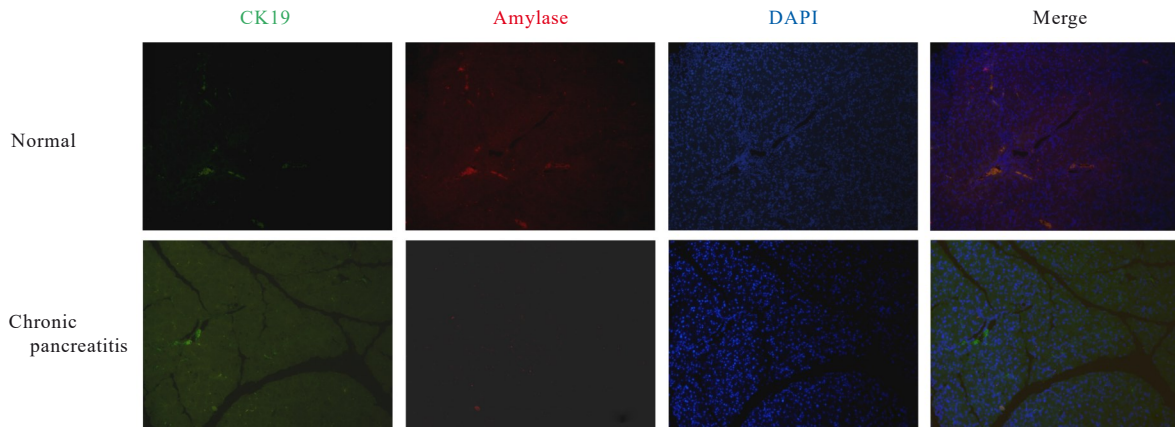


图6 2组小鼠胰腺组织中 CK19 和淀粉酶表达情况(免疫荧光, ×200)  
 Fig. 6 Expressions of CK19 and amylase in pancreatic tissue of mice in two groups (Immunofluorescence, ×200)

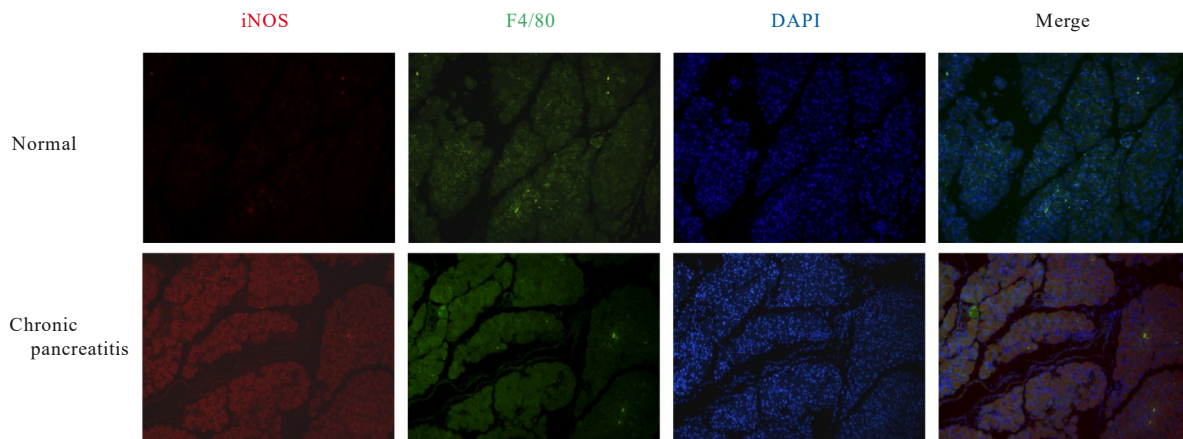
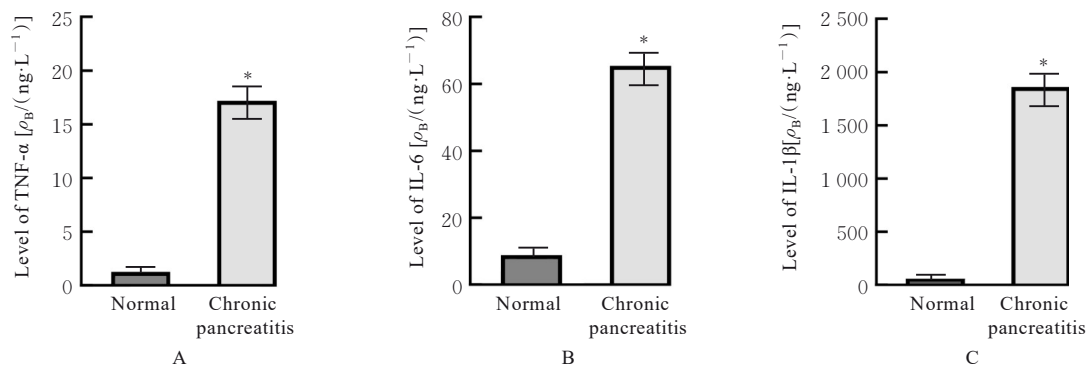


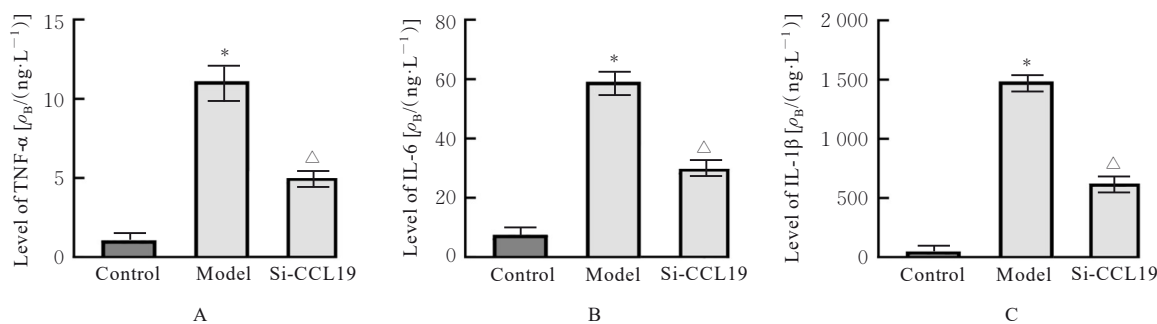
图7 2组小鼠胰腺组织中 M1 型巨噬细胞标志物 iNOS 和 F4/80 表达情况(免疫荧光, ×200)  
 Fig. 7 Expressions of M1 type macrophage markers iNOS and F4/80 in pancreatic tissue of mice in two groups (Immunofluorescence, ×200)



A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-6; C: IL-1 $\beta$ . \* $P < 0.05$  compared with normal group.

图8 ELISA法检测2组小鼠胰腺组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平

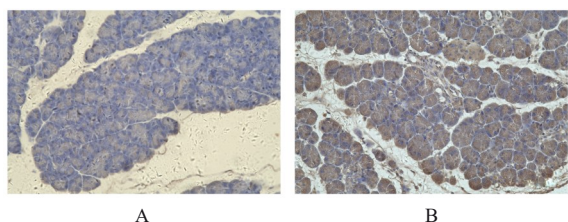
Fig. 8 Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in pancreatic tissue of mice in two groups detected by ELISA method



A: TNF- $\alpha$ ; B: IL-6; C: IL-1 $\beta$ . \* $P < 0.05$  compared with control group;  $\Delta P < 0.05$  compared with model group.

图9 ELISA法检测各组共培养体系细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-1 $\beta$ 水平

Fig. 9 Levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in cells in co-culture systems in two groups detected by ELISA method



A: Normal group; B: Chronic pancreatitis group.

图10 免疫组织化学法观察2组小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达情况( $\times 200$ )

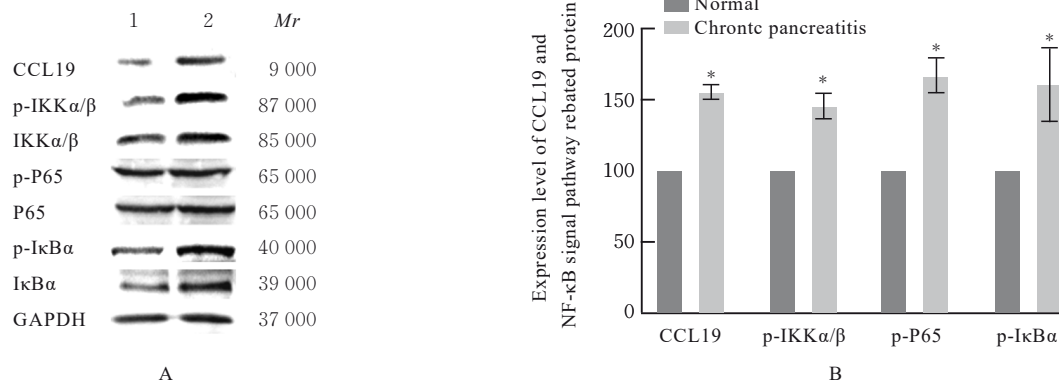
Fig. 10 Expressions of CCL19 protein in pancreatic tissue of mice in two groups observed by immunohistochemistry ( $\times 200$ )

极化的巨噬细胞诱导腺泡细胞导管化, 进而导致胰腺炎的产生。

CCL19是CC类趋化因子家族成员, 是内环境稳定性趋化因子<sup>[19]</sup>。CCL19与免疫微环境有密切关联, 同时还可以通过调控免疫微环境对多种炎症具有促进作用<sup>[20]</sup>。例如, CCL19可以通过趋化巨噬细胞加重小鼠结肠炎, 通过招募中性粒细胞加重

LPS诱导的急性肺部炎症, 也可通过抑制中性粒细胞的积累抑制皮肤炎症的发生<sup>[21-23]</sup>。本研究成功构建小鼠胰腺炎模型, 胰腺炎小鼠胰腺组织中CCL19蛋白表达水平明显升高, 并伴有巨噬细胞浸润增加。在脂多糖处理的肝细胞中, 多功能干细胞与转录激活因子相互作用激活了CCL19的转录, CCL19反作用于巨噬细胞, 促进了其在肝脏中的积累<sup>[24]</sup>。本研究结果显示: CCL19可以通过促进NF- $\kappa$ B信号通路相关蛋白表达, 进而对巨噬细胞M1型极化发挥促进作用, 诱导小鼠慢性胰腺炎的发生发展, 提示CCL19在炎症中是一个重要的免疫微环境调控靶点, 可以通过干预CCL19对炎症过程中的免疫微环境起调控作用, 从而达到治疗目的。

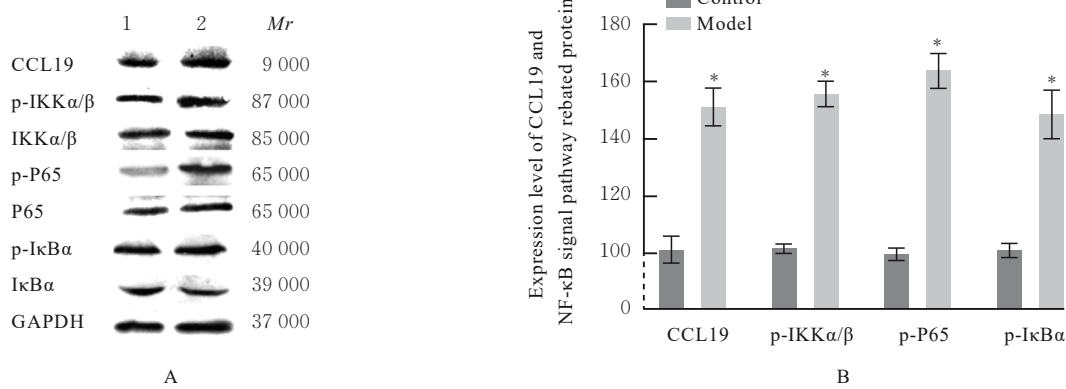
综上所述, CCL19通过NF- $\kappa$ B信号通路促进巨噬细胞M1型极化, 诱导炎症微环境的产生, 从而促进胰腺炎的发生发展。CCL19可以作为治疗慢性胰腺炎的靶点, 本研究为后续胰腺炎相关疾病的临床治疗提供了新的思路。



Lane 1: Normal group; Lane 2: Chronic pancreatitis group. \* $P < 0.05$  compared with normal group.

图 11 2 组小鼠胰腺组织中 CCL19 和 NF-κB 信号通路相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

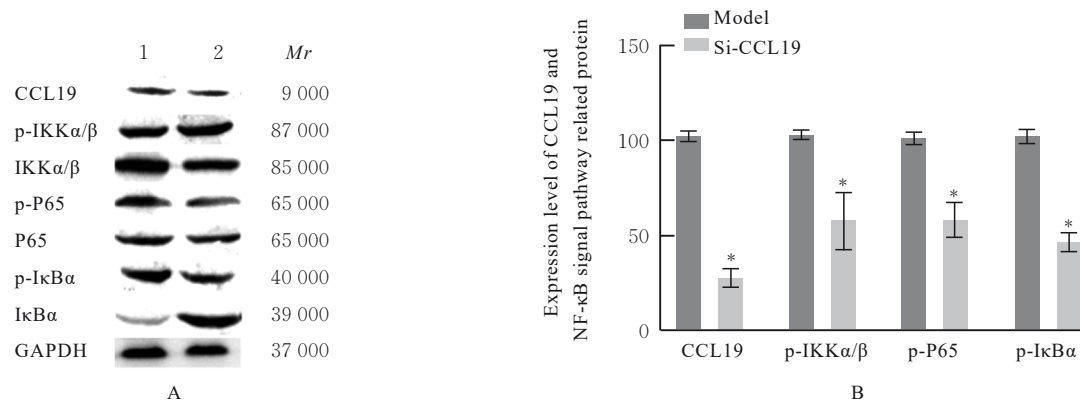
Fig. 11 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of CCL19 and NF-κB signaling pathway related proteins in pancreatic tissue of mice in two groups



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group. \* $P < 0.05$  compared with control group.

图 12 对照组和模型组共培养体系细胞中 CCL19 及 NF-κB 信号通路相关蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 12 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of CCL19 and NF-κB signaling pathway-related proteins in cells in co-culture systems in control group and model group



Lane 1: Model group; Lane 2: Si-CCL19 group. \* $P < 0.05$  compared with model group.

图 13 模型组和 si-CCL19 组共培养体系细胞中 CCL19 和 NF-κB 信号通路相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 13 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of CCL19 and NF-κB signaling pathway related proteins in cells in co-culture systems in model group and si-CCL19 group

**利益冲突声明:**

所有作者声明不存在利益冲突。

**作者贡献声明:**

崔连莺参与实验设计、细胞实验和论文撰写, 张晓伟参与细胞实验和实验数据整理, 翟悦和潘悦参与动物实验, 于秀艳参与实验设计和数据整理。

**[参考文献]**

- [1] ZHAO H, HUANG X Z, LIU Z X, et al. Use of a dual genetic system to decipher exocrine cell fate conversions in the adult pancreas[J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 1.
- [2] BEYER G, HABTEZION A, WERNER J, et al. Chronic pancreatitis[J]. *Lancet*, 2020, 396(10249): 499-512.
- [3] WATANABE T, KUDO M, STROBER W. Immunopathogenesis of pancreatitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(2): 283-298.
- [4] KALKMAN H O, FEUERBACH D. Antidepressant therapies inhibit inflammation and microglial M1-polarization[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163: 82-93.
- [5] 李思瑞, 冯泽清, 吴玉章. C1632通过MAPK和NF- $\kappa$ B抑制巨噬细胞M1型极化[J]. *免疫学杂志*, 2022, 38(3): 185-192.
- [6] 关少培, 陆爱国. 趋化因子CCL19在介导免疫细胞抗肿瘤中的作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2015, 35(3): 454-459.
- [7] KLETTING S, BARTHOLD S, REPNIK U, et al. Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines[J]. *ALTEX*, 2018, 35(2): 211-222.
- [8] LIU M M, YANG Y J, KANG W L, et al. Berberine inhibits pancreatic intraepithelial neoplasia by inhibiting glycolysis via the adenosine monophosphate-activated protein kinase pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 915: 174680.
- [9] 刘萌萌. 黄连素对胰腺癌的治疗作用及其机制研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2022.
- [10] MARSTRAND-DAUCÉ L, LORENZO D, CHASSAC A, et al. Acinar-to-ductal metaplasia (ADM): on the road to pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) and pancreatic cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 9946.
- [11] TAO X F, CHEN Q, LI N, et al. Serotonin-RhoA/ROCK axis promotes acinar-to-ductal metaplasia in caerulein-induced chronic pancreatitis [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 125: 109999.
- [12] KICHLER A, JANG S. Chronic pancreatitis: epidemiology, diagnosis, and management updates [J]. *Drugs*, 2020, 80(12): 1155-1168.
- [13] 王张鹏, 吴俊, 景光旭, 等. 急性胰腺炎相关腹腔积液的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(5): 1227-1233.
- [14] KIRKEGÅRD J, MORTENSEN F V, CRONIN-FENTON D. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2017, 112(9): 1366-1372.
- [15] GUPTA A, GOEDE D, TUIITE R, et al. Chronic pancreatitis[J]. *BMJ*, 2018: k2126.
- [16] 苑舒月, 刘春艳, 刘冰, 等. 巨噬细胞的极化与牙周炎[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(17): 2699-2707.
- [17] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-6440.
- [18] CHEN L, GAO B Y, ZHANG Y D, et al. PAR2 promotes M1 macrophage polarization and inflammation via FOXO1 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(6): 9799-9809.
- [19] PANG N Z, SHI J X, QIN L, et al. IL-7 and CCL19-secreting CAR-T cell therapy for tumors with positive glypican-3 or mesothelin[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 118.
- [20] ADACHI K, KANO Y, NAGAI T, et al. IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor[J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(4): 346-351.
- [21] YAN Y, HU K, FU M, et al. CCL19 and CCL28 assist herpes simplex virus 2 glycoprotein D to induce protective systemic immunity against genital viral challenge[J]. *mSphere*, 2021, 6(2): e00058-e00021.
- [22] DUAN D M, WANG K K, WEI C, et al. The BCMA-targeted fourth-generation CAR-T cells secreting IL-7 and CCL19 for therapy of refractory/recurrent multiple myeloma[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 609421.
- [23] YAN Y, CHEN R F, WANG X, et al. CCL19 and CCR7 expression, signaling pathways, and adjuvant functions in viral infection and prevention[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 212.
- [24] SCAPINI P, LAUDANNA C, PINARDI C, et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19[J]. *Eur J Immunol*, 2001, 31(7): 1981-1988.