

重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染对胰腺细胞损伤的保护作用

简捷¹, 黄缘², 刘利珍³, 李双¹, 邓峰¹

(¹南昌大学第三附属医院消化内科, 江西 南昌 330008; ²南昌大学第二附属医院消化内科, 江西 南昌 330006; ³上海市嘉定区中心医院肿瘤科, 上海 201800)

[摘要] 目的: 研究重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染对内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)引起的大鼠胰腺 AR4-2J 细胞损伤的保护机制。方法: 实验分为 4 组: A 组(正常对照组), B 组(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组), C 组(空载质粒 pEGFP-N2 转染+5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组), D 组(重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染+5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS 处理组)。流式细胞仪检测各组处理 24 h 后细胞凋亡情况。处理 0、6、12、24 h 后分别提取各组总 RNA 及蛋白, RT-PCR 及 Western blot 分别检测 Pim-3、细胞间黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、紧密连接蛋白闭锁蛋白(Occludin) mRNA 及蛋白的表达。结果: 处理 24 h, 各组细胞凋亡率分别为: A 组(7.85 \pm 1.14)%, B 组(53.13 \pm 5.73)%, C 组(51.76 \pm 5.17)%, D 组(21.13 \pm 4.15)%, D 组细胞相对 B、C 组凋亡明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$); D 组 Pim-3 表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$); 处理 12 h 后 B、C、D 组 ICAM-1 高表达, 24 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$); 处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin 高表达, 12 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 丝/苏氨酸激酶 Pim-3 能够抑制胰腺细胞炎症反应和胰腺细胞凋亡, 可能与上调闭锁蛋白和下调细胞间黏附分子的表达有关。

[关键词] 丝/苏氨酸激酶 Pim-3; 紧密连接蛋白闭锁蛋白; 细胞间黏附分子; 凋亡; 脂多糖

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)06-710-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160613

Protective role of recombinant plasmid pEGFP-N2/Pim-3 transfecting in rat pancreatic acinar cells damaged by lipopolysaccharide

Jian Jie¹, Huang Yuan², Liu Lizhen³, Li Shuang¹, Deng Feng¹

(¹Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330008;

²Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006;

³Department of Oncology, the Jiading District Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201800, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective role of recombinant plasmid pEGFP-N2/Pim-3 transfecting in rat pancreatic acinar cells AR4-2J damaged by lipopolysaccharide(LPS). **Methods:** AR4-2J cells were divided into 4 groups: Group A, as the normal control group; Group B, treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS; Group C, transfected with blank plasmid pEGFP-N2 and treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS; Group D, transfected with recombinant plasmid pEGFP-N2 /Pim-3 and treated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS. Flow cytometry examined the apoptosis of AR4-2J cells in four groups after 24 h. RT-PCR was performed to detect the mRNA expression of Pim-3, intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and Occludin in AR4-2J cells of four groups treated in 0, 6, 12, 24 h, and Western blot was performed to detect the protein expression of Pim-3, ICAM-1, and Occludin in each group. **Results:** The apoptotic rates of Groups B and C were(53.13 \pm 5.73)% and (51.76 \pm 5.17)%, respectively, both significantly higher than that of Group D (21.13 \pm 4.15)%(both $P < 0.05$). The expressions of Pim-3 mRNA and protein in Groups A, B and C remained a low level. The Pim-3 expression of Group D was significantly higher than those in Groups A, B and C(both $P < 0.05$). The ICAM-1 mRNA and protein expression levels of Groups B, C and D were constantly upregulated 6 h later, all significantly higher than those of Group A (all $P < 0.01$), and the ICAM-1 expressions of Groups B and C were significantly higher than Group D(both $P < 0.05$). The Occludin mRNA and protein expression levels of Groups B, C and D began to increase 6 h later, and peaked 12 h later, all significantly higher than those of Group A (all $P < 0.01$), and the Occludin expressions of Groups B and C were significantly lower than that of Group D(both $P < 0.05$). **Conclusion:** Pim-3 gene can inhibit the apoptosis of pancreatic acinar cell damaged by LPS,

and also can upregulate the expression of Occludin and downregulate the expression of ICAM-1 to inhibit the pancreatic inflammatory reaction induced by LPS.

[Key words] Pim-3; Occludin; ICAM-1; apoptosis; lipopolysaccharide

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(06):710-715]

急性胰腺损伤主要由于胰腺胰蛋白酶的自身消化作用而引起胰腺水肿、充血,或者出血、坏死。如何保护胰腺细胞功能成为急性胰腺损伤研究领域的热点。以往研究主要集中在药物抑制胰液分泌、抑酸、抗炎等治疗方面,但对于一些重症胰腺坏死,药物治疗的效果差、病死率高。现在研究多集中在胰腺细胞损伤的分子机制及基因治疗方面^[1-3]。

原癌基因能通过各种分子途径促进肿瘤的发生、发展和转移。但在各种组织器官急性损伤时,原癌基因能及时刺激细胞生长、增殖,从而促进损伤组织修复。丝/苏氨酸激酶 Pim-3 是一种原癌基因,它广泛表达于人类各个组织细胞中,能使在细胞生长通路中起关键作用的蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基磷酸化,并通过不同于 PI3K-Akt-MTOR 分子途径的另一条通路,促进细胞的生长和增殖。

多种细胞生长因子、细胞生长通路可介导 Pim-3 的表达^[4]。细胞黏附分子(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)能够介导异型细胞间及细胞-胞外基质之间的黏附作用,参与免疫、炎症及肿瘤转移等一系列重要的生理和病理过程^[5-6]。炎症细胞浸润与上皮细胞的通透性密切相关。紧密连接蛋白闭锁蛋白(Occludin)是上皮细胞紧密连接中最重要的结构蛋白,可通过外环以拉链式结合产生严密的细胞旁封闭,还能与不同的分子结合,参与紧密连接形成的信号调节^[7-8]。本研究观察 Pim-3 基因细胞转染对损坏胰腺细胞的抗凋亡作用,以及对 ICAM-1 及 Occludin 表达的影响,探讨 Pim-3 基因在损坏胰腺细胞中的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料

AR4-2J 大鼠胰腺腺泡细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。胎牛血清(Hyclone 公司,美国),DMEM 培养基(Gibco 公司,美国),Annexin V-FITC 试剂盒(Beckman Coulter 公司,美国),DL2000 标准参照物(北京天根公司),无内毒素质粒小提取试剂盒、Lipofectamine™ 2000 及 TRIzol 试剂盒(In-

vitrogen 公司,美国),Pim-3、ICAM-1、Occludin、 β -肌动蛋白、兔抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),*E.coli JM109* 菌株、空载质粒 pEGFP-N2 及重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3(江西省分子医学重点实验室)。引物由上海 Sangon 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

A 组:正常对照组,不作任何处理,6 只;B 组:内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理组, LPS 终浓度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6 只;C 组:空载质粒转染 LPS 处理组, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, pEGFP-N2 转染, $n=6$ 只;D 组:重组质粒转染 LPS 处理组, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LPS, pEGFP-N2/Pim-3 转染, 6 只。

1.2.2 细胞培养

AR4-2J 细胞在含 20%胎牛血清、100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养基于 5%CO₂ 37℃培养箱中培养,每 2 d 更换 1 次培养液,用 0.25%EDTA 消化细胞,以 1:4 传代,取对数生长期细胞,以 1×10^6 个/孔接种于 24 孔培养板。

1.2.3 质粒提取及细胞转染

按无内毒素质粒小提取试剂盒说明书进行操作,提取物经 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶电泳,与 DL10000 参照物对照,并用核酸蛋白检测仪进行浓度及纯度检测。所提取质粒按 Lipofectamine 2000 说明书进行操作,48 h 后在倒置显微镜下观察细胞内绿色荧光蛋白,确认转染成功。

1.2.4 LPS 处理细胞

将 LPS 加入细胞培养液中混匀,致其终浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.2.5 流式细胞仪检测 AR4-2J 细胞的凋亡情况

各处理组处理 AR4-2J 细胞 24 h 后,收集细胞, PBS 洗涤 1 次,400 μL Binding Buffer 重悬细胞。取 200 μL 细胞悬液加入 Annexin V 5 μL , PI 10 μL , 避光 20 min, 加入 200 μL Binding Buffer 上机检测细胞凋亡率。用 Cellquest 软件获取数据,用 ModFit 软件进行数据分析。

1.2.6 RT-PCR 检测 Pim-3、ICAM-1、Occludin mRNA 表达

以 β -actin 为内参照,设计引物序列如下:Pim-3

上游引物为 5'-CACTGACTTTGATGGCACCC-3', 下游引物为 5'-ATGCCAGACGAAGACCAG-3', 扩增产物长度为 770 bp; ICAM-1 上游引物为 5'-TCAAACGGGAGATGAATGG-3', 下游引物为 5'-CC-TCCTCCTGAGCCTTCTG-3', 扩增产物长度为 230 bp; Occludin 上游引物为 5'-CTGTCTATGCTCGT-CATCG-3', 下游引物为 5'-CATTCCCCGATCTAAT-GACG-3', 扩增产物长度 294 bp; β -actin 上游引物 5'-CTTCTTGGGCATGGAGTC-3', 下游引物为 5'-GCC-GATCCACACGGAGTA-3', 扩增产物长度 445 bp。分 4 个时间段(0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞, 总 RNA 提取按照 TRIzol 试剂说明书的操作步骤进行。逆转录为 cDNA 后使用 TaKaRa 公司的 LA Taq 扩增 Pim-3、ICAM-1、Occludin 编码区域。PCR 产物全部加入 1% 低熔点琼脂糖凝胶进行电泳检测。利用 Bandleader3.0 软件分析 PCR 产物条带密度。基因表达值以目的基因密度值/ β -actin 基因密度值 $\times 100\%$ 表示, 进行数据分析处理。

1.2.7 Western blot 检测 Pim-3、ICAM-1、Occludin 蛋白表达

分 4 个时间段(0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞, 提取细胞总蛋白, 用 Bradford 法测

定蛋白浓度。取 5×10^6 个细胞, 与 $2 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液等体积混合, 100°C 加热 5 min 后分装于 -70°C 冻存。细胞总蛋白每泳道上样 30 μg , 12.5% SDS 凝胶电泳, 1 mA/ cm^2 半干转印 100 min, 以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2h, 分别加入一抗 4°C 孵育过夜, 二抗 37°C 1 h, ECL 显影, 凝胶成像系统扫描各条带灰度值, 以 β -actin 为参照, 计算比值为统计值。

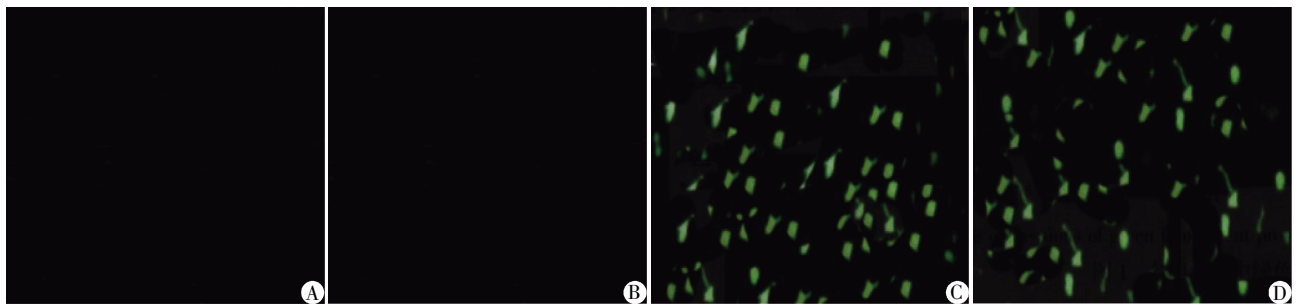
1.3 统计学方法

所有实验至少重复 3 次, 所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间比较用 LSD-*t* 法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染成功的鉴定

pEGFP-N2 载体带有绿色荧光蛋白报告基因, 将空载质粒 pEGFP-N2 和重组质粒 pEGFP-N2/Pim-3 转染入 AR4-2J 细胞后, 可观察到空载质粒转染 LPS 处理组及重组质粒转染 LPS 处理组细胞表达绿色荧光蛋白, 而未转染质粒的正常对照组及 LPS 处理组细胞未见绿色荧光, 表明质粒转染成功(图 1)。



A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组。

图 1 荧光显微镜下各组细胞中绿色荧光蛋白的表达($\times 100$)

Figure 1 The expression of green fluorescent protein of four groups under immunofluorescence microscope($\times 100$)

2.2 细胞凋亡检测结果

各组经分别处理 24 h 后, Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率分别为: A 组(7.85 ± 1.14)%、B 组(53.13 ± 5.73)%、C 组(51.76 ± 5.17)%、D 组(21.13 ± 4.15)%。D 组细胞相对 B、C 组凋亡明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 2)。

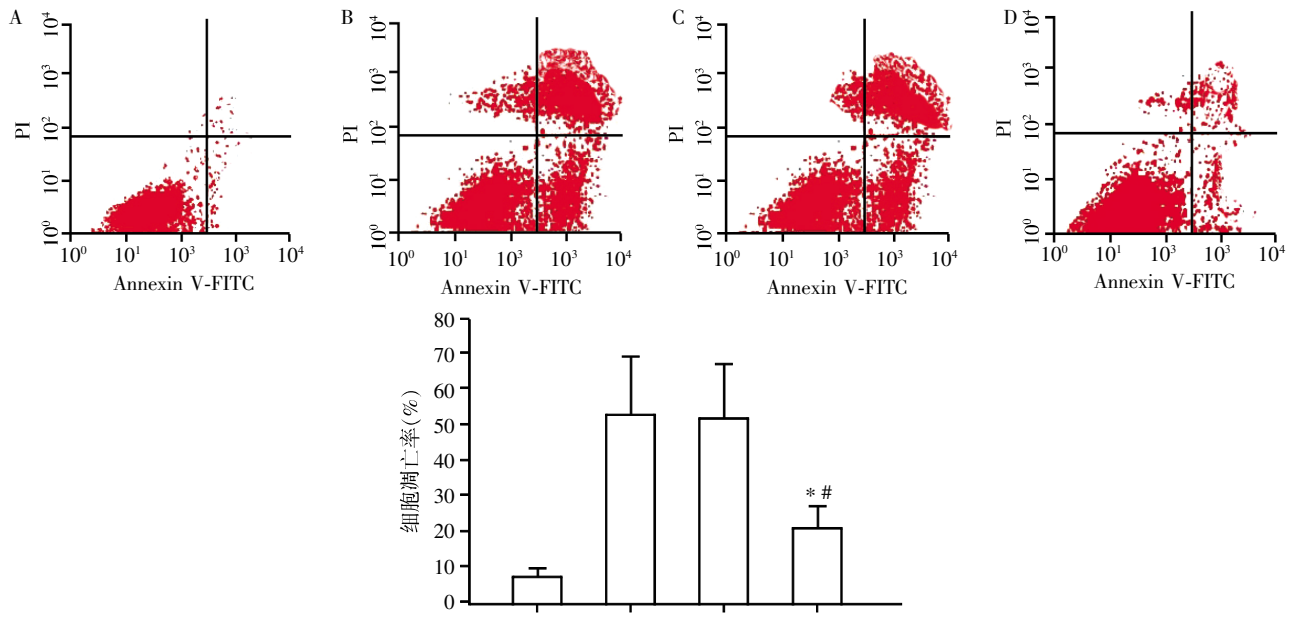
2.3 RT-PCR 结果

分 4 个时间段(处理 0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞进行 RT-PCR 检测。A、B、C 组 Pim-3 mRNA 一直处于低表达水平, D 组 Pim-3 mRNA 表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$,

图 3); A 组 ICAM-1 mRNA 一直处于低表达水平, 处理 12 h 后, B、C、D 组 ICAM-1 mRNA 高表达, 24 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 4); A 组 Occludin mRNA 一直处于低表达水平, 处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin mRNA 高表达, 12 h 达高峰, 相对于 A 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$), D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 5)。

2.4 Western blot 结果

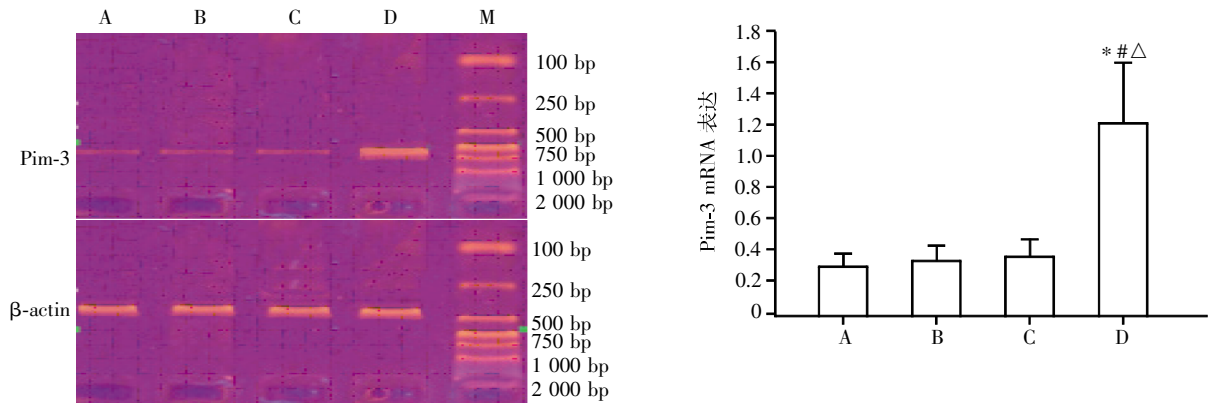
分 4 个时间段(处理 0、6、12、24 h)收集各处理组 AR4-2J 细胞进行 Western blot 检测(图 6)。A、B、



A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 B 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 流式细胞仪检测各组 AR4-2J 细胞的凋亡情况

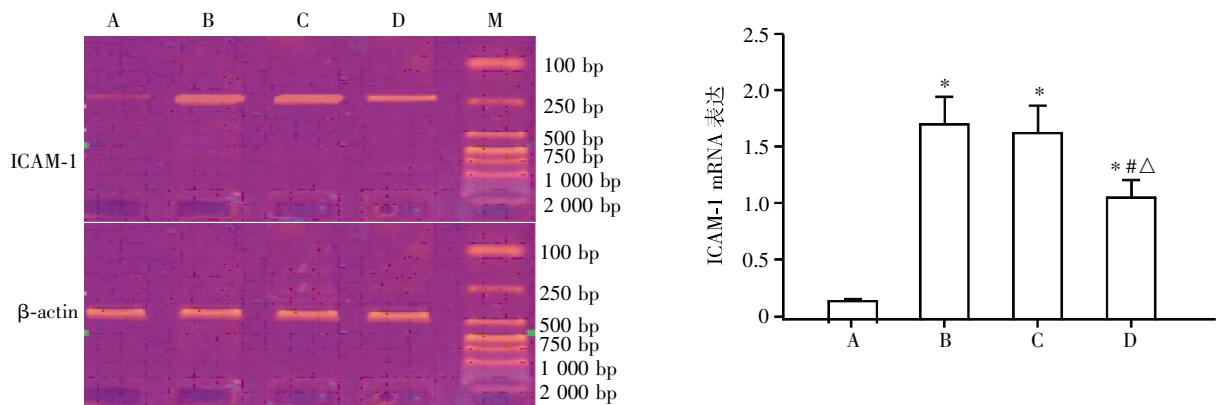
Figure 2 AR4-2J cells apoptosis in four groups by flow cytometry analysis



M: DL2 000 marker; A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 RT-PCR 检测各组 Pim-3 mRNA 表达结果 (24 h)

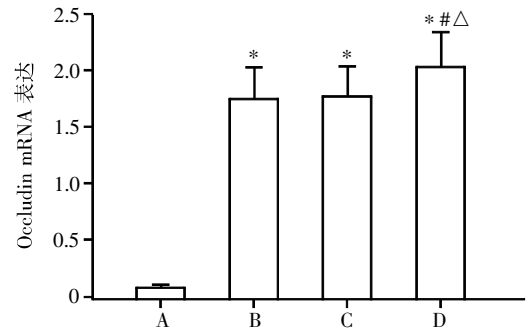
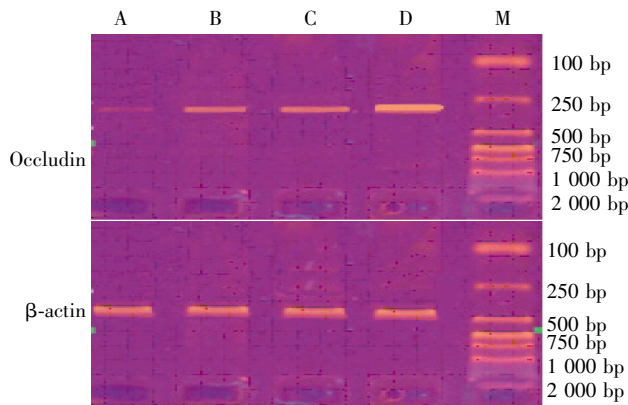
Figure 3 RT-PCR product of Pim-3 mRNA (24 h)



M: DL2 000 marker; A: 正常对照组; B: LPS 处理组; C: 空载质粒转染 LPS 处理组; D: 重组质粒转染 LPS 处理组; 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 RT-PCR 检测各组 ICAM-1 mRNA 表达结果 (24 h)

Figure 4 RT-PCR product of ICAM-1 mRNA (24 h)



M;DL2 000 marker; A:正常对照组;B:LPS 处理组;C:空载质粒转染 LPS 处理组;D:重组质粒转染 LPS 处理组。与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图 5 RT-PCR 检测各组 Occludin mRNA 表达结果(12 h)

Figure 5 RT-PCR product of Occludin mRNA (12 h)

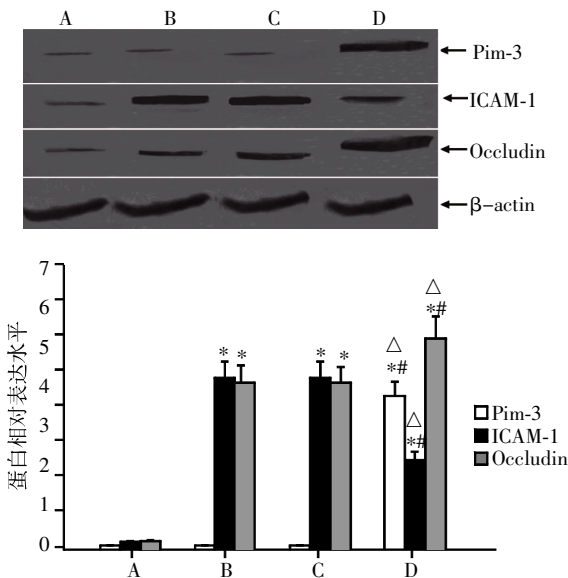
C 组 Pim-3 蛋白一直处于低表达水平,D 组 Pim-3 蛋白表达与 A、B、C 组之间的差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组 ICAM-1 蛋白一直处于低表达水平,处理 12 h 后 B、C、D 组 ICAM-1 蛋白高表达,24 h 达高峰,相对于 A 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),D 组与 B、C 组差异有统计学意义($P < 0.05$);A 组 Occludin 蛋白一直处于低表达水平,处理 6 h 后, B、C、D 组 Occludin 蛋白高表达,12 h 达高峰,相对于 A 组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),D 组与 B、C 组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

胰腺损伤多表现为胰腺细胞炎症、坏死,在临床上急性胰腺损伤发病危急,进展快,严重并发症多,其发病机制尚未完全阐明。大量实验证实,胰腺损伤后可激活多种炎症介质,如肿瘤坏死因子、缓激肽、血小板激活因子、内皮素等,引起炎症反应,激活多种蛋白酶,导致胰腺及周围组织自身消化^[9-12]。

Pim 激酶家族是一组钙/钙调蛋白调节激酶 (CAMP) 家族,该家族成员包括 Pim-1、Pim-2、Pim-3,它们在激酶结构域高度同源,其生物学功能也存在显著重叠。Pim 激酶家族能够通过磷酸化细胞生长通路中起关键作用蛋白质分子内的丝/苏氨酸残基,促进细胞增殖及分化。Pim-1、Pim-2 已被大量实验证实是细胞生物通路中的关键分子,然而 Pim-3 的生物学功能研究较少。Pim-3 作为一个新型的 Pim 家族成员,定位于染色体 22q13,表达丝/苏氨酸激酶活性,能磷酸化众多特异性底物,分别在细胞增殖、分化、凋亡中发挥着重要调控作用。研究发现 Pim-3 在肝癌、胰腺癌、结肠癌、胃癌等内胚层衍生的消化道肿瘤中表达异常增加。Pim-3 可活化 Bad 凋亡蛋白,使其 112 位丝氨酸磷酸化,从而失去活性,抑制细胞凋亡,促进细胞增殖。研究也表明原癌基因 Pim-3 能够正性调控胰腺细胞增生及修复,抑制胰腺细胞凋亡^[13]。本研究也证实 Pim-3 细胞转染对胰腺细胞损伤具有明显保护作用,抑制细胞凋亡。

ICAM-1 作为黏附分子,一方面参与细胞免疫屏障功能,另一方面也促进了细胞的炎症反应。细胞炎症进展,需借助于其细胞表面黏附分子与细胞外基质及其他细胞的一系列相互作用,研究表



A:正常对照组;B:LPS 处理组;C:空载质粒转染 LPS 处理组;D:重组质粒转染 LPS 处理组;与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.05$;与 C 组比较,Δ $P < 0.05$ 。

图 6 Western blot 检测各组 Pim-3(24 h)、ICAM-1(24 h)、Occludin(12 h) 蛋白表达

Figure 6 Protein expressions of Pim-3(24 h),ICAM-1(24 h) and Occludin(12 h) by Western blot in each group

明 ICAM-1 与胰腺炎的发生、发展及进展起关键作用^[14-16]。上皮细胞是细胞黏膜屏障的主要组织结构基础,细胞间的连接复合体参与维持上皮细胞的完整性,其中紧密连接是细胞间最重要的连接方式。大量研究发现细胞炎症的浸润与上皮细胞的通透性密切相关。细胞紧密连接是上皮途径外的另一重要途径,对 LPS 等大分子物质的通过起到关键性调控作用^[17]。Occludin 为细胞紧密连接中最重要的组成蛋白,在胰腺细胞损伤及修复中起关键调控作用^[18-19]。因此可以用 ICAM-1、Occludin 作为检测指标,探讨它们的异常表达与 Pim-3 之间的联系在胰腺细胞损伤中的分子机制。本研究表明 Pim-3 不仅能抑制胰腺损伤细胞的凋亡,而且能够抑制 ICAM-1 表达,上调 Occludin 表达,从而表明 Pim-3 细胞转染对胰腺细胞损伤的保护作用。至于这种作用的内在分子机制,目前尚不清楚。下一步将致力于 Pim-3 基因胰腺活体转染,进一步研究其作用机制,为以后的临床治疗提供帮助。

[参考文献]

- [1] Gorskii VA, Agapov M, Khoreva MV, et al. Effect of lornoxicam therapy on expression of TLR2 and TLR4 mRNA during systemic complications of acute pancreatitis[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2014, 158(1):13-15
- [2] Sherman MH, Yu RT, Engle DD, et al. Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy[J]. *Cell*, 2014, 159(1):80-93
- [3] Hua J, He ZG, Qian DH, et al. Angiopoietin-1 gene-modified human mesenchymal stem cells promote angiogenesis and reduce acute pancreatitis in rats[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7):3580-3595
- [4] Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. The Pim kinase control rapamycin-resistant T cell survival and activation[J]. *J Exp Med*, 2005, 201(2):259-266
- [5] Usami Y, Ishida K, Sato S, et al. Intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(3):568-578
- [6] Astarci E, Sade A, Cimen I, et al. The NF-kappa B target genes ICAM-1 and VCAM-1 are differentially regulated during spontaneous differentiation of Caco-2 cells[J]. *FEBS J*, 2012, 279(16):2966-2986
- [7] Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1257:85-92
- [8] Jiang YJ, Lin JZ, Zhang DL, et al. Bacterial translocation contributes to cachexia and its possible pathway in patients with colon cancer[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(2):131-137
- [9] Xia SH, Xiang XH, Chen K, et al. Roles of BN52021 in platelet-activating factor pathway in inflammatory MS1 cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(25):3969-3979
- [10] Müller CA, Belyaev O, Burr W, et al. Effects of FTY720 and rapamycin on inflammation in taurocholate-induced acute pancreatitis in the rat[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7):1086-1091
- [11] Ge N, Xia Q, Yang ZH, et al. Vascular endothelial injury and apoptosis in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 2015:235017
- [12] Pan YL. The effects of glycyrrhizin on acute pancreatitis in mice[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(24):3943-3947
- [13] Li YY, Popivanova BK, Nagai Y, et al. Pim-3, a proto-oncogene with serine/threonine kinase activity, is aberrantly expressed in human pancreatic cancer and phosphorylates Bad to block Bad-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cell lines[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6741-6747
- [14] Dabrowski A, Osada J, Dabrowska ML, et al. Increased expression of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) on peripheral blood neutrophils in acute pancreatitis[J]. *Adv Med Sci*, 2014, 59(1):102-107
- [15] Zhu HH, Jiang LL. Serum inter-cellular adhesion molecule 1 is an early marker of diagnosis and prediction of severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(20):2554-2560
- [16] Staubli SM, Oertli D, Nebiker CA. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(6):273-283
- [17] Ao, Cruz RG, Hill AD, et al. Paradigms lost-an emerging role for over-expression of tight junction adhesion proteins in cancer pathogenesis[J]. *Ann Transl Med*, 2015, 3(13):184
- [18] Xia XM, Li BK, Xing SM, et al. Emodin promoted pancreatic claudin-5 and occludin expression in experimental acute pancreatitis rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(17):2132-2139
- [19] Chen DX, Li LL, Yan J, et al. The loss of alpha SNAP downregulates the expression of occludin in the intestinal epithelial cell of acute pancreatitis model[J]. *Pancreatol*, 2014, 14(5):347-355