

研究论文

白介素6通过阻断L型钙离子通道活性抑制急性胰腺炎大鼠结肠纵行肌条收缩

唐亚¹, 梁世伟¹, 全晓静², 罗和生², 刘颖^{1,*}

¹桂林医学院第二附属医院消化科, 桂林 541100; ²武汉大学人民医院消化科, 武汉 430060

摘要: 本文旨在探讨白介素6 (interleukin 6, IL-6)对急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)大鼠结肠纵行肌条收缩的作用及其机制。用雨蛙肽和脂多糖联合诱导法制备AP大鼠模型, 用生物机能实验系统观察IL-6对大鼠结肠纵行平滑肌条自发性收缩的影响, 用ELISA检测血清IL-6的水平, 用免疫组织化学染色法观察IL-6在结肠的表达分布, 用全细胞膜片钳技术观察IL-6对结肠平滑肌细胞L型钙离子通道的影响。结果显示, 与对照组相比, AP组大鼠结肠平滑肌条收缩幅度显著减小($P < 0.05$), 收缩周期延长($P < 0.05$); IL-6可延长大鼠结肠平滑肌条收缩周期, 但对肌条的自发性收缩幅度无影响。AP组大鼠血清IL-6浓度明显高于对照组, 差异具有显著性($P < 0.01$); 对照组大鼠结肠中IL-6表达较弥散, 而在AP组结肠腺体、黏膜及黏膜下层中IL-6表达明显增强。IL-6可显著降低大鼠结肠平滑肌细胞L型钙离子通道的峰电流密度。以上结果提示, AP大鼠结肠运动减弱, 其机制可能是表达上调的IL-6阻断结肠平滑肌细胞L型钙离子通道活性, 进而抑制结肠纵行平滑肌收缩。

关键词: 急性胰腺炎; 白介素6; 平滑肌细胞; L型钙离子通道; 膜片钳

中图分类号: R657.5

IL-6 inhibits colonic longitudinal muscle contraction by inactivating L-type calcium channel in rats with pancreatitis

TANG Ya¹, LIANG Shi-Wei¹, QUAN Xiao-Jing², LUO He-Sheng², LIU Ying^{1,*}

¹Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541100, China; ²Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of interleukin 6 (IL-6) on the contraction of colon longitudinal muscle strips in rats with acute pancreatitis (AP) and its underlying mechanism. Rat AP model was established by combined injection (i. p.) of ceruletide and lipopolysaccharide. The effect of IL-6 on spontaneous contraction of longitudinal smooth muscle strips of rat colon was observed by biological function experiment system. The level of serum IL-6 was detected by ELISA, the expression and distribution of IL-6 in colon were observed by histochemical staining, and the effect of IL-6 on L-type calcium channel in colon smooth muscle cells was observed by whole cell patch clamp technique. The results showed that, compared with the control group, AP group exhibited reduced contractile amplitude and longer contraction cycle of colon smooth muscle strips. IL-6 prolonged the contraction cycle of colon smooth muscle strips, but did not affect their spontaneous contraction amplitude. Serum IL-6 concentration in AP group was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). IL-6 was diffusely distributed in the colon of the control group, but the expression of IL-6 was significantly up-regulated in the colon gland, mucosa and submucosa of the AP group. IL-6 significantly decreased the peak current density of L-type calcium channel in rat colon smooth muscle cells. These results suggest that the colon motility of AP rats is weakened, and the mechanism may be that up-regulated IL-6 inactivates L-type voltage-dependent calcium channels, and then inhibits the contraction of colon longitudinal smooth muscle.

Key words: acute pancreatitis; interleukin-6; smooth muscle cells; L-type calcium channel; patch clamp

Received 2019-02-09 Accepted 2019-07-22

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81660097, 81460111).

*Corresponding author. Tel: +86-773-5587900; E-mail: liuying1009@sina.com

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是临床上常见的急腹症, 少数患者可伴发多器官功能障碍及胰腺局部并发症, 病情进展快, 死亡率高^[1], 多数患者病情轻, 数周内可痊愈, 预后好。AP 是由胰酶活化引起的胰腺组织自身消化所致的胰腺水肿、出血及坏死等炎性损伤。虽然已知 AP 有多种疾病危险因素, 但到目前为止, AP 的发病机制及病理生理过程尚不完全清楚。细胞因子与 AP 的病程密切相关, 例如: 白介素 6 (interleukin 6, IL-6) 是重要的促炎因子和免疫调节因子, Chen 等研究显示, 抗 IL-6 受体抗体对实验性重症 AP 有治疗作用, 其机制与 IL-6 炎症信号转导通路的失活有关^[2]; Zhou 等^[3]和 Tang 等^[4]研究显示, 在 AP 动物模型和细胞系中, 胃促生长素通过调节胰腺腺泡 $[Ca^{2+}]_i$ 水平起到抑制炎症作用。

AP 的肠道动力减退与细胞因子介导的炎症有关, 本研究组前期研究显示, 重症 AP 结肠组织中 IL-6 浓度升高^[5]。研究表明, 炎症介质可抑制胃肠动力, 例如: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、IL-1 β 可浓度依赖性地抑制大鼠胃底肌条的收缩^[6]; 粒细胞集落刺激因子、IL-6 可抑制大鼠空肠肌条的收缩^[7]。IL-6 通过结合两种类型的膜受体, 即 IL-6 α 受体 (IL-6R α) 和 IL-6 β 受体 (gp130) 发挥其生物学作用^[8-10]。近年来的多项研究结果表明, IL-6 在 AP 中可作为胰腺病变的有效指标, 可用于评估炎症反应的程度^[11-13]; 同时 IL-6 可作为 AP 严重程度的早期预测指标, 其水平的升高预示 AP 患者可能会出现器官功能衰竭和其他严重疾病^[14, 15]。

肠道动力减退是 AP 早期病程中常见的并发症, 主要表现为便秘和麻痹性肠梗阻等, 可引起肠黏膜缺血再灌注损伤、黏膜屏障功能受损、肠道细菌过多、细菌及其内毒素易位, 导致继发感染, 影响 AP 发展与转归^[16]。AP 中胃肠道动力减退症状的发生与神经递质、胃肠激素、炎症因子、血液循环障碍等因素相关, 但具体机制尚未完全阐明^[17]。而 IL-6 是否参与 AP 结肠动力紊乱的发生, 目前尚不确定。鉴于此, 本研究采用雨蛙肽联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 AP 大鼠模型 (该模型能较准确模拟 AP 的损伤情况^[18-21]), 观察 AP 大鼠结肠动力和 IL-6 表达水平的变化, 并研究 IL-6 对大鼠结肠平滑肌 L 型钙离子通道的影响, 以期明确 IL-6 与 AP 大鼠结肠动力异常的关系。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级健康 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 180~220 g, 由桂林医学院实验动物中心提供, 动物许可证号为 SCXK(桂)2013-0001。给大鼠喂食混合配方饲料, 保持大鼠生活环境通风和清洁, 自由进食和饮水。动物实验方案获得桂林医学院医学伦理委员会批准。

1.2 试剂与仪器 EPCIO 膜片钳放大器购自德国 HEKA 公司; AB-104 电子天平购自 Mettler Toledo; 倒置相差显微镜 (IX71 型) 购自日本 Olympus 公司; 张力换能器、低温离心机购自 Thermo Electron; 解剖显微镜购自日本 Olympus 公司; RM6240 多通道生理信号采集处理系统购自成都仪器厂; 酶标仪 (FlexStation 3) 购自美国 Molecular Devices 公司; 雨蛙肽 (FI-6934) 购自 MCE 公司; LPS (L8880) 购自 Solarbio 公司; 胶原酶、牛血清白蛋白购自美国 GIBCO 公司; 胰蛋白酶抑制剂购自美国 Sigma 公司; IL-6、羊抗小鼠 IL-6 抗体 (K5007) 购自 DaKo 公司; 膜片钳微电极拉制仪 (P97 型) 购自美国 Sutter 公司。

1.3 溶液配制 无钙生理盐溶液 (physiological salt solution, PSS)(mmol/L): KCl 5.0, MgCl₂ 1.2, NaCl 135.0, HEPES 10.0, 葡萄糖 10.0, 用 NaOH 调 pH 值至 7.4; 台式液 (mmol/L): NaH₂PO₄ 0.42, NaCl 147.0, MgCl₂ 1.05, CaCl₂ 2.0, Na₂HPO₄ 2.0, KCl 4.0, 葡萄糖 5.5, 用 NaOH 调 pH 值至 7.4; 消化液: 0.25% 牛血清白蛋白溶于无钙 PSS 中, 加入 0.15% II 型胶原酶和 0.1% 胰蛋白酶抑制剂; L 型钙离子通道电流 (I_{CaL}) 电极内液 (mmol/L): CsCl 135, MgCl₂ 4, HEPES 10, Na₂ATP 2, EGTA 10, TEA 20。

1.4 大鼠分组及 AP 模型的制备 将大鼠随机分为对照组和 AP 组, 每组 $n = 10$ 。AP 模型按照文献报道方法^[19]进行: 在实验前将受试大鼠禁食 18 h, 自由饮水, AP 组大鼠腹腔注射 50 μ g/kg 雨蛙肽, 连续 6 次, 每次间隔 1 h, 在最后一次注射雨蛙肽后, 立即腹腔注射 10 mg/kg LPS; 同时对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。分别记录两组大鼠造模前 1 天排便粒数, 造模结束 24 h 内观察并记录两组大鼠排便粒数。

1.5 胰腺组织病理学检查 在 10% 中性缓冲甲醛中固定大鼠胰腺组织 24 h, 常规组织脱水渗透进行石蜡包埋、切片脱蜡、HE 染色; 在显微镜下观察两组胰腺, 参照 Schmidt 等^[22]评分标准进行胰腺组

织病理评分。

1.6 结肠平滑肌条的制备及收缩活性的记录

将大鼠用脊椎脱臼法处死后立即开腹, 在离回盲瓣1 cm处剪取一段长约4 cm的结肠, 放入通有95% O₂和5% CO₂混合气体的4 °C台氏液中, 沿着肠系膜剪开肠管并清除肠内容物, 在硅胶板上固定好黏膜面朝上的结肠, 在解剖显微镜下迅速剥离黏膜和黏膜下层(避免肠黏膜表面IL-6对实验结果造成影响), 显露出平滑肌层, 沿着肠管纵轴走向制备纵行肌条(3 mm × 8 mm)。将纵行肌条放入装有恒温(37 °C)台式液的浴槽中, 在浴槽底部挂钩上固定肌条的一端, 肌条另一端用丝线固定在张力换能器上, 浴槽中持续灌入95% O₂和5% CO₂的混合气体。给予纵行肌条前负荷1.5 g, 孵育1 h, 每隔20 min更换一次台式液。在两组大鼠结肠平滑肌条出现规律收缩并稳定后, 观察记录, 同时在对照组肌条灌流液中加入4.6 pmol/L、46 pmol/L或0.46 nmol/L IL-6, 观察肌条自发性收缩的变化。

1.7 两组大鼠血清IL-6浓度测定

对照组及AP组于造模结束24 h收集大鼠腹主动脉血5 mL, 3 000 r/min离心15 min, 收集上清液并将其置于-80 °C低温冰箱保存, 留待检测。采用酶联免疫吸附实验(ELISA)双抗体夹心法检测两组大鼠血清中IL-6水平, 操作步骤按照试剂盒说明书进行, 检测数据用酶标仪读取。

1.8 免疫组织化学法检测结肠IL-6的表达分布

用10%多聚甲醛固定洗净肠内容物后的结肠标本(长度为1 cm), 清洗后常规进行脱水、透明、浸蜡、包埋, 石蜡包埋厚约5 μm切片; 脱蜡水化后的结肠进行10~15 min抗原修复, 加入3%的过氧化氢, 在室温下避光温育15 min以封闭内源性过氧化物酶, 在室温下用血清封闭30 min; 甩除封闭液, 4 °C湿盒中抗IL-6抗体(1:100)孵育切片过夜, PBS洗涤3次, 每次3 min, 在切片稍微干燥后, 用二抗(HRP标记)室温条件下温育样品1 h, 洗涤3次, 每次3 min; 在切片稍甩干后, 将新鲜配制的DAB显色液滴加入圆圈中, 在显微镜下控制显色时间, 阳性信号为棕黄色或棕褐色, 用自来水冲洗切片以终止显色反应; 用苏木素复染3 min左右, 水洗后用1%的盐酸酒精分化数秒, 再次用自来水水洗返蓝; 将切片依次放入不同浓度梯度酒精和二甲苯中脱水透明, 最后将切片放置于通风橱中风干, 用中性树胶封片; 在显微镜下镜检, 细胞核在苏木

素染色下呈蓝色, 以胞浆棕黄色颗粒状沉积为阳性, 采集图像分析。

1.9 结肠平滑肌细胞的制备及钙离子通道电流的记录

在持续充以95% O₂和5% CO₂气体的无钙PSS溶液中加入与对照组相同部位的结肠, 在解剖显微镜下去除黏膜层和黏膜下层, 将平滑肌分离成3 mm × 5 mm组织块, 并在37 °C消化液中消化20至30 min, 用无钙PSS溶液洗净消化酶后, 将其储存在0~4 °C无钙PSS溶液中, 并在1~8 h内使用, 使用前用滴管将其吹打成细胞悬浮液。在倒置显微镜的灌流槽中滴入细胞悬浮液, 并在细胞贴于管壁后, 以2~3 mL/min速度用台式液持续灌流。将电极内液灌入控制的微电极中, 入水电阻控制在4~8 MΩ。使用三维操纵器在倒置显微镜下调节电极封接细胞, 当微电极与细胞膜封接电阻达1 GΩ以上时, 在补偿快电容并负压吸破细胞膜后形成全细胞模式, 以阶跃方波电压刺激, 记录电流。刺激模式: 将膜电压钳制在-50 mV, 阶跃刺激从-50 mV开始, 以每10 mV阶跃去极化至+40 mV, 维持时间为500 ms, 刺激间隔为10 s, 引出I_{Ca,L}; 信号采集频率为10 kHz, 滤波频率为200 Hz, 用Axon700B放大器及pClamp 10.2软件采集I_{Ca,L}, 并自动计算出膜电容; 因为I_{Ca,L}衰减严重是在记录最初5 min和20 min后, 因此选择在5~20 min时间范围加入外源性IL-6。

1.10 数据处理及统计分析

数据用mean ± SEM表示, 用GraphPad Prism 7.0软件进行统计检验分析, 配对t检验用于自身对照, 组间比较采用两独立样本t检验, P < 0.05时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺肉眼观察及病理学改变

AP组大鼠腹腔中可见淡黄色或淡红色腹水, 胃肠道扩张明显; 胰腺呈深红色, 表面及周围腹膜、肠系膜可见钙皂斑; 对照组腹腔无腹水形成, 腹内器官未见异常改变。

HE染色结果显示, AP组大鼠胰腺小叶间质水肿严重, 腺泡间隙增大, 腺泡间隙出现多处点状出血, 有较多腺泡坏死, 有大量炎症细胞浸润; 对照组胰腺无异常改变(图1)。胰腺组织病理评分结果显示, 符合AP的改变, AP组评分(8.000 ± 0.422)显著高于对照组(0.500 ± 0.269), 差异具有显著性(P < 0.000 1)。以上结果表明, AP组的病理学改变符合AP表现, 模型构建成功。

2.2 两组大鼠排便粒数比较

对照组在注射等量生理盐水前后排便粒数无显著差异(数据未显示);和造模前自身相比,AP组造模后排便粒数显著减少($P < 0.0001$)(图2A);造模后,AP组排便粒数明显少于对照组(18.200 ± 2.091 vs 59.200 ± 0.250 , $P < 0.0001$)(图2B)。

2.3 两组大鼠结肠平滑肌条自发性收缩活动的比较

与对照组($1.029 \text{ g} \pm 0.071 \text{ g}$)相比,AP组的肌条收缩张力($0.742 \text{ g} \pm 0.078 \text{ g}$)明显减小,差异具有显著性($P = 0.015$)(图3B);与对照组($104.100 \text{ s} \pm 6.140 \text{ s}$)相比,AP组肌条收缩周期($128.900 \text{ s} \pm 8.053 \text{ s}$)明显延长,差异具有显著性($P = 0.025$)(图3C)。

2.4 两组大鼠血清IL-6浓度比较

ELISA检测结果显示,和对照组相比,AP组血清IL-6浓度明显升高,差异具有显著性($P < 0.01$)(图4)。

2.5 两组大鼠结肠IL-6分布

免疫组织化学染色结果显示,IL-6为分泌型蛋

白,对照组大鼠结肠中表达较弥散;而在AP组大鼠结肠中IL-6表达明显上调,在肠腺体、黏膜及黏膜下层中均可见明显表达(图5)。

2.6 IL-6对结肠肌条收缩活性的影响

以台氏液灌流肌条稳定自发收缩时的张力幅度值作为基础值,对照组浴槽加入4.6、46 pmol/L IL-6时,肌条收缩幅度及周期均无明显改变;当加入0.46 nmol/L IL-6时,肌条收缩周期由(115.600 ± 7.547)s延长为(173.900 ± 15.080)s($P = 0.0086$)(图6);但加入0.46 nmol/L IL-6前后肌条收缩张力幅度分别为(0.640 ± 0.113)g和(0.572 ± 0.100)g,二者之间差异无显著性($P = 0.6648$)。

2.7 IL-6对结肠平滑肌钙离子通道的影响

对照组结肠平滑肌细胞呈长梭形,细胞膜电容约为60 pF,台式液灌流5 min后采集 $I_{Ca,L}$ 作为自身对照组。钳制电位设为-50 mV,阶跃刺激从-50 mV开始,阶跃为10 mV,去极化至+40 mV,

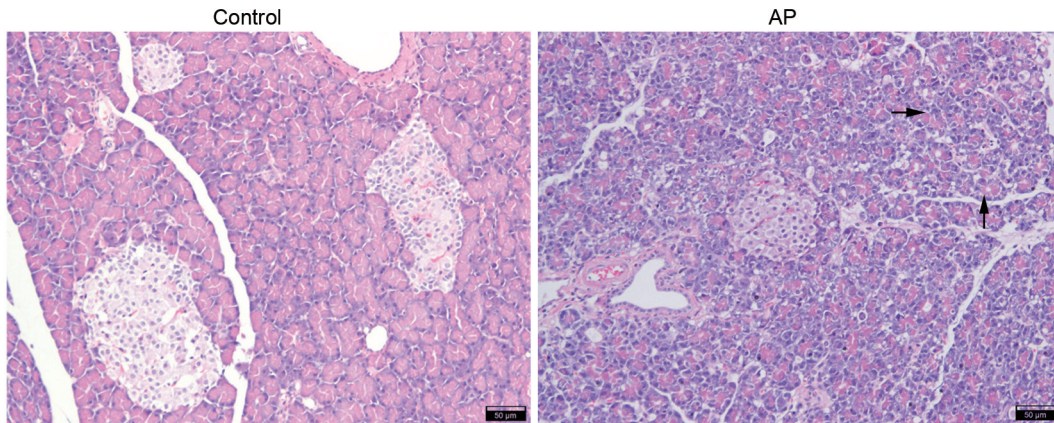


图 1. 各组大鼠胰腺组织病理学改变

Fig. 1. Pathological changes of pancreas in different groups. Black arrows indicate acinar necrosis. Scale bar, 50 μm

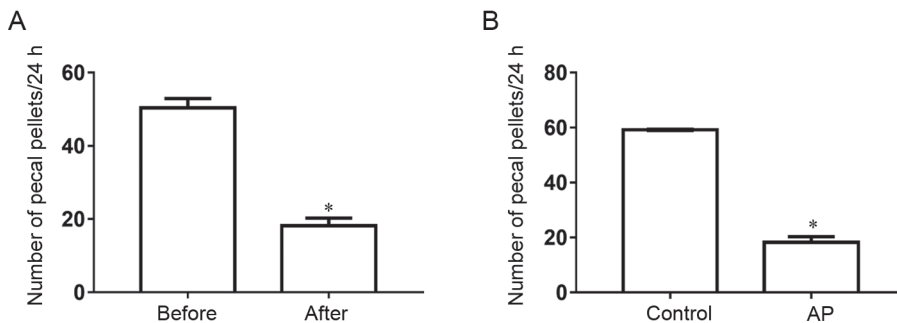


图 2. 造模前后各组大鼠排便粒数

Fig. 2. The number of stools in different groups before and after model establishment. A: Comparison of the number of stools before and after model establishment in the AP group. B: Comparison of the number of stools between the two groups after model establishment. Mean \pm SEM, $n = 10$. * $P < 0.0001$ vs before or control.

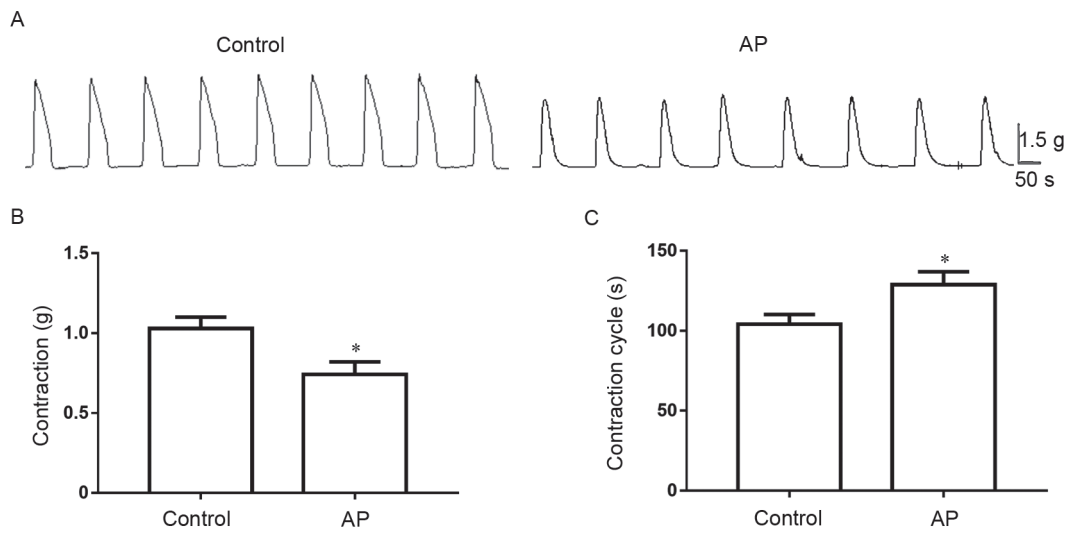


图 3. 两组大鼠结肠平滑肌条自发性收缩活性比较

Fig. 3. Comparison of spontaneous contractile activity of colon smooth muscle strips between the two groups. A: Original traces of contraction tension. B: Contraction tension. C: Contraction cycle. Mean \pm SEM, $n = 10$. * $P < 0.05$ vs control.

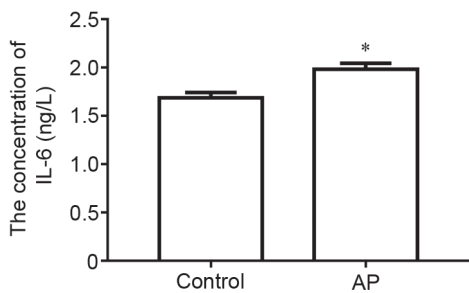


图 4. 两组大鼠血清白介素6浓度比较

Fig. 4. Comparison of serum interleukin-6 (IL-6) concentration between the two groups. The level of serum IL-6 was detected by ELISA. Mean \pm SEM, $n = 10$. * $P < 0.01$ vs control.

维持 500 ms 引出 $I_{Ca,L}$, 峰电流在约 0 mV 处出现 (图 7A); 用快速喷药法 (在平滑肌细胞正上方约 2 mm 以垂直角度快速滴下一一定量的 IL-6 溶液) 给予平滑肌细胞 0.46 nmol/L IL-6 后, 其峰电流仍在约 0 mV 处出现, 但 0 mV 处电流密度显著减少, 电流密度由给药前的 (-3.344 ± 0.432) pA/pF 降低为 (-2.317 ± 0.390) pA/pF, 差异具有显著性 ($P = 0.0002$) (图 7C、D)。

3 讨论

AP 是一种发病机制复杂的常见急腹症, 临床

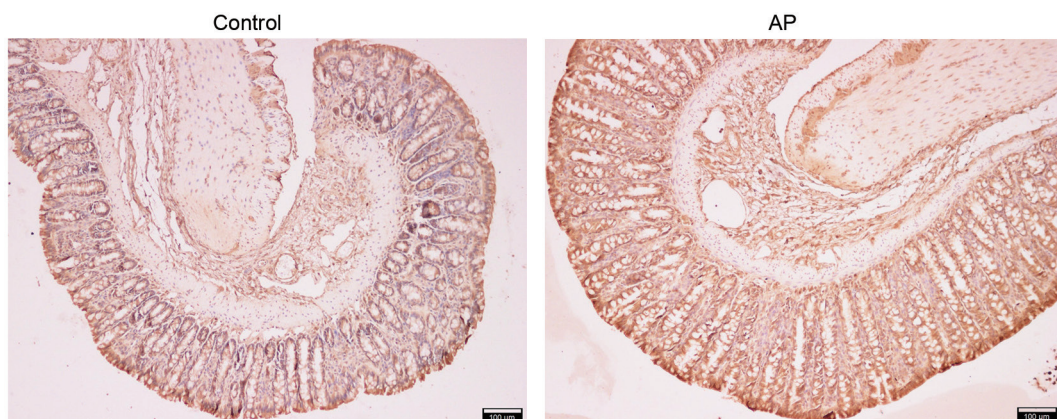


图 5. 白介素6 (IL-6) 在两组大鼠结肠的分布

Fig. 5. Distribution of interleukin 6 (IL-6) in the rat colon of the two groups detected by immunohistochemical staining. Scale bar, 100 μ m.

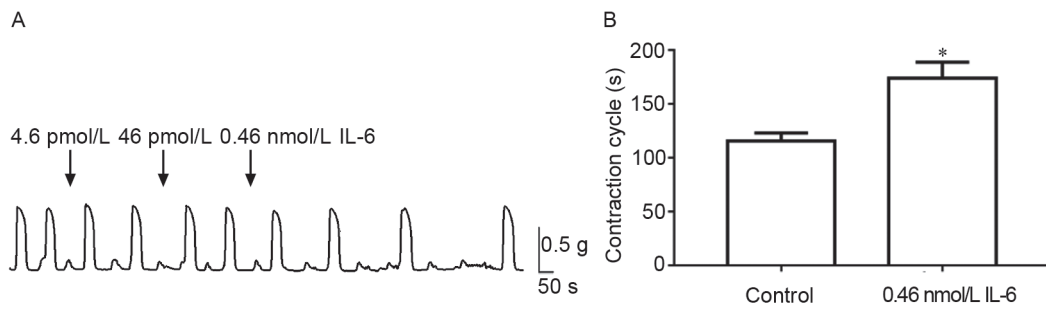


图 6. 白介素6 (IL-6)对结肠肌条收缩活性的影响

Fig. 6. Effect of interleukin 6 (IL-6) on contractile activity of colon muscle strips. *A*: Original traces of contraction tension. *B*: Contraction cycle. Mean \pm SEM, $n = 10$. * $P < 0.01$ vs control.

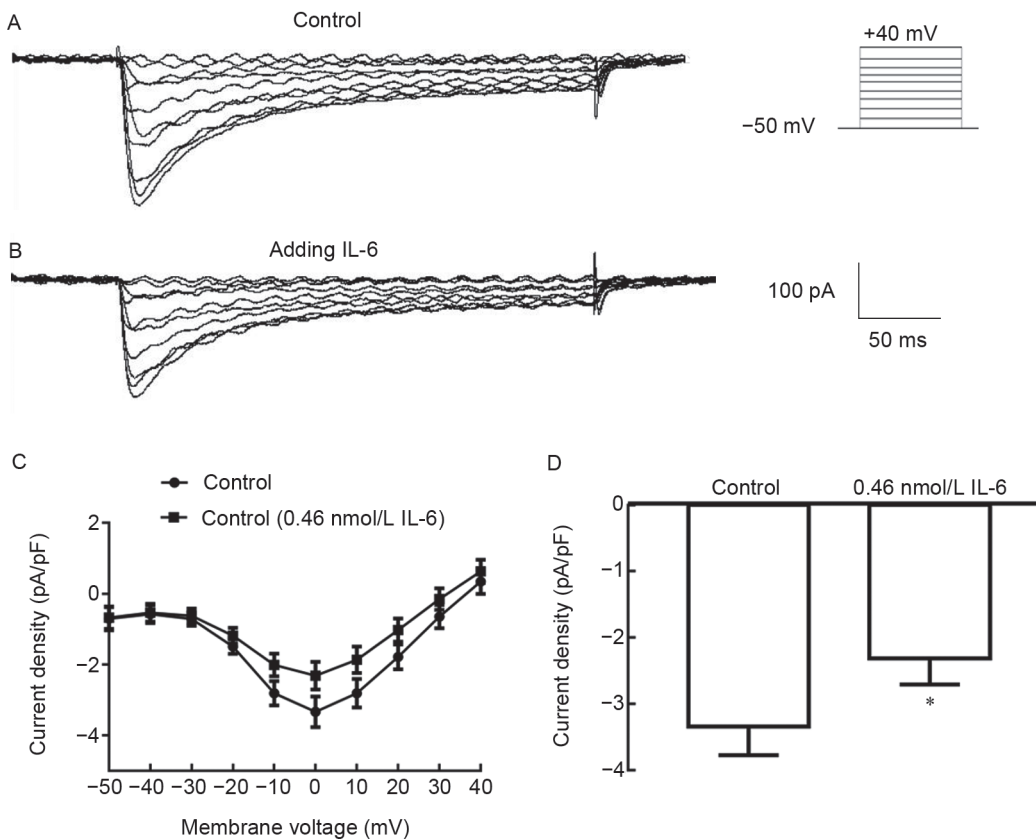


图 7. 白介素6大鼠结肠平滑肌细胞L型钙离子通道的影响

Fig. 7. Effect of interleukin-6 (IL-6) on L-type calcium channels in rat colon smooth muscle cells detected by whole cell patch clamp. *A*: Original current traces. *B*: *I/V* curves. *C*: Peak current density. *D*: Current density at 0 mV. Mean \pm SEM, $n = 7$. * $P < 0.001$ vs control.

以急性上腹痛及血淀粉酶或脂肪酶升高为特点。大量动物实验和临床研究证实，胰腺腺泡释放炎症细胞因子，可引起炎症的级联反应，在严重的情况下，甚至出现全身炎症反应综合征，导致多脏器功能衰竭^[23-26]。本研究首先建立 AP 模型，由于排便粒数被认为是结肠动力的有效评价指标之一，因此可用排便颗粒对其结肠动力进行评估，结果显示 AP

组大鼠在造模后 24 h 后排便粒数较对照组减少；本研究还检测了两组大鼠结肠肌条自发性收缩活性，结果显示 AP 组肌条收缩幅度显著低于对照组，收缩周期较对照组延长，验证了 AP 可引起结肠动力减退。另外，本研究结果显示，IL-6 在对照组大鼠结肠中表达较弥散，而在 AP 组大鼠结肠中则表达增强，在肠腺体、黏膜及黏膜下层中均可见明显表

达, 提示局部结肠动力减退可能与 AP 大鼠结肠 IL-6 表达增多有关。

AP 引起胃肠道动力紊乱的另一个重要机制是平滑肌的舒缩活动发生异常。平滑肌的舒缩活动取决于其内在固有的电生理活动, 其机制是平滑肌各种离子通道状态的改变。胃肠道平滑肌收缩主要取决于细胞内外 Ca^{2+} 浓度差的变化。胃肠平滑肌中的钙离子通道有 L 型和 T 型电压依赖性钙离子通道, L 型钙离子通道是胃肠道平滑肌主要的钙离子通道, 具有高阈值、大电导、慢失活以及失活取决于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 等特点^[27-30]。当平滑肌细胞膜电位达到 -80 mV 时, L 型和 T 型钙离子通道都可以被激活; 当膜电位为 -30 mV 时, 只有 L 型钙离子通道具有活性, 而 T 型钙离子通道失活^[31-33], 因此本研究选用 $-50 \sim -40 \text{ mV}$ 的钳制电压研究 IL-6 对结肠平滑肌细胞 L 型钙离子通道的影响, 结果显示 IL-6 可显著降低 $I_{\text{Ca,L}}$ 电流密度。与这个电生理学实验结果相一致, 本研究显示 IL-6 可延长引起结肠平滑肌条的收缩周期。不过, 本研究结果未显示 IL-6 能引起肌条自发性收缩明显改变, 其原因可能是由于 AP 胃肠道动力减退的发生与神经递质、胃肠激素、炎症因子、血液循环障碍等多种因素相关^[17]。

综上所述, AP 大鼠结肠运动减弱, 其机制可能是表达上调的炎性介质 IL-6 阻断结肠平滑肌细胞 L 型电压依赖性钙离子通道活性, 进而抑制结肠纵行肌收缩。目前 AP 发病机制尚不完全明确, 仍需进一步的研究来明确 IL-6 的经典信号转导通路在 AP 发病过程中的作用, 并阐明各种 IL-6 受体的不同作用机制, 从而加深对 AP 发病机理的认识。

参考文献

- Halonen KI, Leppaniemi AK, Puolakkainen PA, Lundin JE, Kempainen EA, Hietaranta AJ, Haapiainen RK. Severe acute pancreatitis: prognostic factors in 270 consecutive patients. *Pancreas* 2000; 21(3): 266-271.
- Chen KL, Lv ZY, Yang HW, Liu Y, Long FW, Zhou B, Sun XF, Peng ZH, Zhou ZG, Li Y. Effects of tocilizumab on experimental severe acute pancreatitis and associated acute lung injury. *Crit Care Med* 2016; 44(8): e664-e677.
- Zhou J, Qin M, Wang H, He J, Fu H, Shi H, Liang Z, Tang G. Cav 1.2 and Cav 2.2 expression is regulated by different endogenous ghrelin levels in pancreatic acinar cells during acute pancreatitis. *Int J Mol Med* 2018; 41(5): 2909-2916.
- Tang X, Tang G, Liang Z, Qin M, Fang C, Zhang L. Effects of ghrelin miRNA on inflammation and calcium pathway in pancreatic acinar cells of acute pancreatitis. *Pancreas* 2017; 46(10): 1305-1313.
- Liu Y, Liao R, Qiang Z, Zhang C. Pro-inflammatory cytokine-driven PI3K/Akt/Sp1 signalling and H_2S production facilitates the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *Biosci Rep* 2017; 37(2). pii: BSR20160483.
- Montuschi P, Tringali G, Parente L, Preziosi P, Navarra P. Interleukin-1 β - and tumour-necrosis-factor-induced inhibition of rat gastric fundus motility *in vitro*. *Pharmacol Res* 1994; 30(1): 25-33.
- Hierholzer C, Kalff JC, Chakraborty A, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ, Tweardy DJ. Impaired gut contractility following hemorrhagic shock is accompanied by IL-6 and G-CSF production and neutrophil infiltration. *Dig Dis Sci* 2001; 46(2): 230-241.
- Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol* 2014; 26(1): 75-79.
- Allocca M, Jovani M, Fiorino G, Schreiber S, Danese S. Anti-IL-6 treatment for inflammatory bowel diseases: next cytokine, next target. *Curr Drug Targets* 2013; 14(12): 1508-1521.
- Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, Yao Y. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther* 2014; 141(2): 125-139.
- Noel P, Patel K, Durgampudi C, Trivedi RN, de Oliveira C, Crowell MD, Pannala R, Lee K, Brand R, Chennat J, Slivka A, Papachristou GI, Khalid A, Whitcomb DC, DeLany JP, Cline RA, Acharya C, Jaligama D, Murad FM, Yadav D, Navina S, Singh VP. Peripancreatic fat necrosis worsens acute pancreatitis independent of pancreatic necrosis via unsaturated fatty acids increased in human pancreatic necrosis collections. *Gut* 2016; 65(1): 100-111.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Centorrino T, Ciccolo A, McDonald MC, de Sarro A, Caputi AP, Thiemermann C. Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice. *Cytokine* 2002; 18(5): 274-285.
- Li N, Wang BM, Cai S, Liu PL. The role of serum high mobility group box 1 and interleukin-6 levels in acute pancreatitis: a meta-analysis. *J Cell Biochem* 2018; 119(1): 616-624.
- Rao SA, Kunte AR. Interleukin-6: an early predictive marker for severity of acute pancreatitis. *Indian J Crit Care Med* 2017; 21(7): 424-428.
- Sathyanarayan G, Garg PK, Prasad H, Tandon RK. Elevated level of interleukin-6 predicts organ failure and severe disease in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol*

- Hepatology 2007; 22(4): 550–554.
- 16 Zhou H, Gao J, Zou D, Wu W, Li Z. Effect of octreotide on enteric motor neurons in experimental acute necrotizing pancreatitis. *PLoS One* 2012; 7(12): e52163.
- 17 Lin Z, Liu Y, Zheng Q, Hu Q. Increased proportion of nitric oxide synthase immunoreactive neurons in rat ileal myenteric ganglia after severe acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2011; 11: 127.
- 18 Nathan JD, Patel AA, McVey DC, Thomas JE, Prpic V, Vigna SR, Liddle RA. Capsaicin vanilloid receptor-1 mediates substance P release in experimental pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(5): G1322–G1328.
- 19 Cao Y, Yang W, Tyler MA, Gao X, Duan C, Kim SO, Aronson JF, Popov V, Takahashi H, Saito H, Evers BM, Chao C, Hellmich MR, Ko TC. Noggin attenuates cerulein-induced acute pancreatitis and impaired autophagy. *Pancreas* 2013; 42(2): 301–307.
- 20 Biczó G, Vegh ET, Shalbueva N, Mareninova OA, Elperin J, Lotshaw E, Gretler S, Lugea A, Malla SR, Dawson D, Ruchala P, Whitelegge J, French SW, Wen L, Husain SZ, Gorelick FS, Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Gukovsky I, Gukovskaya AS. Mitochondrial dysfunction, through impaired autophagy, leads to endoplasmic reticulum stress, deregulated lipid metabolism, and pancreatitis in animal models. *Gastroenterology* 2018; 154(3): 689–703.
- 21 Song L, Wörmann S, Ai J, Neuhofer P, Lesina M, Diakopoulos KN, Ruess D, Treiber M, Witt H, Bassermann F, Halangk W, Steiner JM, Esposito I, Rosendahl J, Schmid RM, Riemann M, Algül H. BCL3 reduces the sterile inflammatory response in pancreatic and biliary tissues. *Gastroenterology* 2016; 150(2): 499–512.e20.
- 22 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215(1): 44–56.
- 23 Sliwinska-Mosson M, Marek G, Grzebieniak Z, Milnerowicz H. Relationship between somatostatin and interleukin-6: A cross-sectional study in patients with acute pancreatitis. *Pancreatol* 2018; 18(8): 885–891.
- 24 Jain S, Midha S, Mahapatra SJ, Gupta S, Sharma MK, Nayak B, Jacob TG, Shalimar, Garg PK. Interleukin-6 significantly improves predictive value of systemic inflammatory response syndrome for predicting severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2018; pii: S1424-3903(18)30086-3.
- 25 Chao KC, Chao KF, Chuang CC, Liu SH. Blockade of interleukin 6 accelerates acinar cell apoptosis and attenuates experimental acute pancreatitis *in vivo*. *Br J Surg* 2006; 93(3): 332–338.
- 26 Tran DD. Interleukin-6 in the early assessment of acute pancreatitis. *Gut* 1993; 34(10): 1467.
- 27 Jung H, Best M, Akkus O. Microdamage induced calcium efflux from bone matrix activates intracellular calcium signaling in osteoblasts via L-type and T-type voltage-gated calcium channels. *Bone* 2015; 76: 88–96.
- 28 Hansen PB, Jensen BL, Andreassen D, Skøtt O. Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ Res* 2001; 89(7): 630–638.
- 29 Young SZ, Platel JC, Nielsen JV, Jensen NA, Bordey A. GABA_A increases calcium in subventricular zone astrocyte-like cells through L- and T-type voltage-gated calcium channels. *Front Cell Neurosci* 2010; 4: 8.
- 30 Brimblecombe KR, Gracie CJ, Platt NJ, Cragg SJ. Gating of dopamine transmission by calcium and axonal N-, Q-, T- and L-type voltage-gated calcium channels differs between striatal domains. *J Physiol* 2015; 593(4): 929–946.
- 31 Dahl GP, Conner GE, Qiu F, Wang J, Spindler E, Campagna JA, Larsson HP. High affinity complexes of pannexin channels and L-type calcium channel splice-variants in human lung: Possible role in clevidipine-induced dyspnea relief in acute heart failure. *EBioMedicine* 2016; 10: 291–297.
- 32 Thakali KM, Kharade SV, Sonkusare SK, Rhee SW, Stimers JR, Rusch NJ. Intracellular Ca²⁺ silences L-type Ca²⁺ channels in mesenteric veins: mechanism of venous smooth muscle resistance to calcium channel blockers. *Circ Res* 2010; 106(4): 739–747.
- 33 Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW. Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther* 2005; 106(3): 347–355.