

宋冰,汪永锋,余四九,等. 基于TLR4/MYD88信号通路探讨大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠模型的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 17-26.

Song B, Wang YF, Yu SJ, et al. Study on the protective effect of Dahuang Mudan Decoction on rat model of acute pancreatitis based on TLR4/MYD88 signaling pathway [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 17-26.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.003

基于TLR4/MYD88信号通路探讨大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠模型的保护作用

宋冰^{1,2}, 汪永锋², 余四九^{1*}, 张延英², 康万荣²

(1. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730000)

【摘要】 目的 基于TLR4/MYD88信号通路研究大黄牡丹汤对逆行性胰胆管注射法制作急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)大鼠模型的保护作用。**方法** SPF级Wistar大鼠96只,按照随机数字表法分为:假手术组、AP模型观察组、奥曲肽阳性对照组、大黄牡丹汤高、中、低剂量组,除假手术组经胰胆管逆行注射生理盐水,其余各组均采用经胰胆管逆行注射5%牛磺胆酸钠溶液造模,给与药物干预6d。观察大鼠一般生存状况;测定血清淀粉酶(AMS)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量;HE观察胰腺病理组织改变;RT-PCR、Western Blot、IHC法检测胰腺组织TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4基因蛋白表达水平;ELISA法检测胰腺组织中炎症因子IL-2、iNOS、IFN- γ 含量。**结果** (1)与假手术组比较,AP模型观察组大鼠一般生存状况相对较差,血清淀粉酶(AMS)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)均显著升高,镜下可见胰腺组织结构散乱,坏死、充血严重,胰腺组织中TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4基因蛋白表达水平均显著升高,胰腺组织匀浆液中IL-2、iNOS、IFN- γ 含量均显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);(2)干预后,各治疗组大鼠一般生存状况有不同程度改善,血清淀粉酶(AMS)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)均下降,镜下间质性水肿以及坏死灶明显改善,胰腺组织中TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4基因蛋白表达水平均下降,胰腺组织匀浆液中IL-2、iNOS、IFN- γ 含量均下降,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 大黄牡丹汤改善急性胰腺炎大鼠胰腺损伤,其作用机制可能与抑制TLR4/MYD88信号通路有关。

【关键词】 TLR4/MYD88信号通路;大黄牡丹汤;急性胰腺炎;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021)01-0017-10

Study on the protective effect of Dahuang Mudan Decoction on rat model of acute pancreatitis based on TLR4/MYD88 signaling pathway

SONG Bing^{1,2}, WANG Yongfeng², YU Sijiu^{1*}, ZHANG Yanying², KANG Wanrong²

(1. Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070, China. 2. Gansu University of Chinese Medicine, Gansu Industry Technology Center for Laboratory Animal, Lanzhou 730000)

Corresponding author: YU Sijiu. E-mail: sjyu@163.com

【Abstract】 Objective Based on the TLR4/MYD88 signaling pathway to study the protective effect of Dahuang Mudan Decoction on the rat model of acute pancreatitis (AP) made by retrograde pancreaticobiliary duct injection. **Methods** 96 Wistar rats (SPF grade) were divided into: sham operation group, AP model observation group, octreotide

【基金项目】 国家自然科学基金(81760828), 甘肃省中医药管理局科研课题(GZK-2019-26)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(81760828), Scientific Research Project of Gansu Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine(GZK-2019-26)。

【作者简介】 宋冰(1982—),男,博士,研究方向:实验动物医学。Email: songbing@gszy.edu.cn

【通信作者】 余四九(1961—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:兽医产科学。Email: sjyu@163.com

positive control group, Dahuang Mudan Decoction high, medium and low dose groups according to the random number table method. Except for the sham operation group, which was injected by retrograde with normal saline through the pancreaticobiliary duct, the other groups were modeled by retrograde injection of 5% sodium taurocholate solution through the pancreaticobiliary duct, followed by drug intervention for 6 days. To observe the general living conditions of rats, to measure the contents of serum amylase (AMS), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), The expression levels of TLR4, MyD88, IRAK-2 and IRAK-4 were detected by RT-PCR, Western Blot and IHC, and the contents of IL-2, iNOS and IFN- γ were detected by ELISA. **Results** (1) Compared with the sham operation group, the rats in the AP model observation group had a relatively poor general survival condition, a significant increase in serum amylase (AMS), alanine aminotransferase (ALT), glutamic oxaloacetase (AST). Under the microscope, the pancreatic tissue structure was scattered, necrosis and congestion were serious. The expression levels of TLR4, MyD88, IRAK-2 and IRAK-4 gene protein in pancreatic tissue were significantly increased, and the contents of IL-2, iNOS and IFN- γ in pancreatic tissue homogenate were significantly increased ($P < 0.05$). (2) After intervention, the general living conditions of the rats in the treatment group were improved in different degrees, serum amylase (AMS), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were decreased, interstitial edema and necrotic foci were significantly improved under the microscope, the expression levels of TLR4, MyD88, irak-2 and IRAK-4 gene protein in pancreatic tissue were decreased, and the contents of IL-2, iNOS and IFN- γ in pancreatic tissue homogenate were decreased, especially in the large dose group of Dahuang Mudan decoction, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dahuang Mudan decoction can improve pancreatic injury in rats with acute pancreatitis, and its mechanism may be related to the inhibition of TLR4/MyD88 signaling pathway.

【Keywords】 TLR4/MyD88 signal pathway; Dahuang Mudan Decoction; acute pancreatitis; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)在临床中较为常见,是外科急腹症之一,该病发病较急,经常出现局部和胰腺外并发症,导致全身炎症反应综合征和序贯性多器官功能障碍综合征^[1]。现代医学关于该病的治疗,主要强调早期控制,尚无特效疗法。而近年在临床治疗中发现^[2-3]及时使用中医药对恢复胃肠道功能可起到积极作用,同时可以间接减少多种并发症的发生发展,有效增强治疗效果,降低死亡率。王勋等^[4]通过临床观察发现,大黄牡丹汤干预 AP 患者,能够显著改善患者腹痛腹胀、恶心呕吐等症状,尿淀粉酶、血淀粉酶、血白细胞等相关数值有显著下降。因此,深入研究大黄牡丹汤防治急性胰腺炎意义重大。

目前, Frossard 等^[5]发现在胰腺腺泡细胞内,包括胰蛋白酶在内的广泛酶激活现象能够促使腺体自溶、局部炎症、细胞坏死,进而引起氧自由基的产生和血管损伤,级联式放大促炎条件,加重胰腺组织损伤。本课题组前期研究表明大黄牡丹汤新方能够显著改善 AP 大鼠胰腺病理组织改变,并能够显著下调 AP 大鼠血清内炎症因子含量,然而关于大黄牡丹汤有效干预急性胰腺炎发病的具体分子机制尚不明晰^[6]。刘涛等^[7]报道在非酒精性脂肪肝大鼠模型中使用大黄素能够抑制大鼠肝内 Toll 样

受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MYD88)的表达。故本研究复制 AP 动物模型,研究大黄牡丹汤对 AP 模型大鼠 TLR4/MYD88 信号通路关键分子 TLR4、MYD88、白细胞介素-1 受体相关激酶 2(interleukin-1 receptor associated kinase 2, IRAK-2)和白细胞介素-1 受体相关激酶 4(interleukin-1 receptor associated kinase 4, IRAK-4)表达以及下游炎症因子白细胞介素 2(interleukin-2, IL-2)、 γ 干扰素(interferon- γ , INF- γ)、一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)含量的影响,以探讨急性胰腺炎发病的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

96 只 2 月龄 SPF 级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,购自甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心【SCXK(甘)2015-0002】。于甘肃中医药大学 SPF 级实验室常规饲养【SYXK(甘)2015-0005】,相对湿度 45% ~ 55%,室温(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 12 h 光暗周期循环,常规标准饲料喂养,自由水食,适应性喂养 3 d 后进行实验,实验过程中所有操作

均遵守甘肃中医药大学实验动物伦理原则(审批号:2017-048)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大黄牡丹汤药材购自甘肃中医药大学附属医院,由甘肃中医药大学李越峰教授鉴定为正品。实验处方^[8]:大黄 12 g、牡丹皮 9 g、桃仁 12 g、冬瓜子 30 g、芒硝 9 g,由甘肃中医药大学附属医院药剂科制剂室提供,应用多功能提取罐,所有药材除芒硝外加 10 倍量蒸馏水浸泡 4 h,按常法煎煮 2 次,每次 40 min,滤出药液中加入芒硝,用旋转蒸发仪浓缩,达到每 1 mL 药液中生药含量为 4 g,经高温灭菌,在室温下冷却,放入冰箱 4℃ 冷藏备用。

奥曲肽(国药一心制药有限公司,170504);大鼠白细胞介素 6(IL-6)试剂盒、大鼠白细胞介素 2(IL-2)试剂盒、大鼠 γ 干扰素(INF- γ)试剂盒、大鼠一氧化氮合酶(iNOS)试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,1907R);反转录试剂盒(Promega,0000366052);Real time qPCR 试剂盒(TaKaRa,#AI82513A);GAPDH 抗体(ImmunoWay, B1501);TLR4 抗体(GeneTex, NO.821904926);MYD88 抗体(ImmunoWay, B2801);IRAK-2 抗体(GeneTex, NO.821904926);IRAK-4 抗体(GeneTex, NO.821904926);HRP-羊抗兔 IgG(博士德生物工程有限公司, BST13C23C54)。

微量注射泵(深圳圣诺医疗设备有限公司, SN-50T6, 中国);高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司, SCIENTZ-48, 中国);高速低温离心机(Eppendorf, 5910R, 美国);逆转录仪(BIO-RAD, S1000TM, 美国);凝胶成像分析系统(BIO-RAD, Chemi DOC XRS+, 美国);酶联免疫检测仪(BIO-RAD, Benchmark Plus, 美国);实时定量 PCR 仪(Roche, 瑞士);超微量分光光度计(Putten, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制

参见文献^[9-10],大鼠在造模前 12 h 禁食但不禁水,手术前采用腹腔注射 3% 戊巴比妥钠方式进行麻醉,麻醉后仰卧固定于大鼠固定板上,常规备毛,消毒处理后,于剑突下切开,充分显露十二指肠与胰胆管,采用无损伤血管夹双重夹闭胰胆管远端胆管近肝门处,使用 0.45 mm 头皮针通过十二指肠外壁穿刺进入肠腔,经胰胆管开口于十二指肠处的乳头穿入胰胆管,用无损伤血管夹固定针头。将新鲜配置 5% 牛磺胆酸钠溶液(1 mL/kg)使用微量泵恒

速(0.1 mL/min)向主胰管内注入,注射完成后,无损伤血管夹继续夹闭 5 min,以保证药物可以充分进入胰腺小叶,5 min 后将血管夹取下,整复十二指肠,分层缝合关腹。假手术组的操作与上述基本相同,但把注入胰胆管内液体改为生理盐水。模型评价标准:一般生存状况观察、血液生化指标、胰腺组织病理学变化。

1.2.2 动物分组及实验干预

大黄牡丹汤剂量参考《中药药理实验方法学》^[11],根据临床用量的体重折算,大鼠的等效剂量约为 7 g/kg,即大黄牡丹汤中剂量组;按照等比级数分组确定大黄牡丹汤高、低剂量组的给药剂量分别为 14 g/kg、3.5 g/kg。(国药一心制药有限公司)奥曲肽(针对重症胰腺炎)临床使用剂量为皮下注射 0.1 mg,根据临床用量的体重折算,大鼠的等效剂量约为 10 μ g/kg。

Wistar 大鼠分为:(1)假手术组(行假手术,灌胃生理盐水),即 A 组;(2)AP 模型观察组(上述方法造模,灌胃生理盐水),即 B 组;(3)奥曲肽阳性对照组(上述方法造模,皮下注射奥曲肽 10 μ g/kg),即 C 组;(4)大黄牡丹汤高剂量(上述方法造模,灌胃大黄牡丹汤 14 g/kg)组,即 D 组;(5)大黄牡丹汤中剂量(上述方法造模,灌胃大黄牡丹汤 7 g/kg)组,即 E 组;(6)大黄牡丹汤低剂量(上述方法造模,灌胃大黄牡丹汤 3.5 g/kg)组,即 F 组。每组 16 只,除假手术组经胰胆管逆行注射生理盐水,其余各组均同上采用牛磺胆酸钠溶液造模。

1.2.3 形态指标测试及取材

记录各组大鼠的摄食量和体重。药物干预 6 d 后,心脏采血后颈椎脱臼法处死,分离血清冻存,剖取胰腺组织,生理盐水清洗干净后,部分使用组织固定液固定以备病理切片观察以及免疫组化检测,剩余组织冻存在超低温冰箱(-80℃),用于后期检测炎症因子、基因和蛋白表达水平。

1.2.4 血清生化指标检测

取冻存血清,用生化分析仪检测淀粉酶(AMS)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)含量。

1.2.5 HE 染色观察胰腺组织病理学改变

取多聚甲醛固定后的胰腺组织,石蜡包埋、切片,依次进行二甲苯梯度脱蜡→乙醇脱水→苏木素染色→分化液分化→流水冲洗→乙醇梯度脱水→伊红染色→乙醇梯度脱水→二甲苯透明→中性树

胶封片。10 × 10 倍镜下拍照,观察大鼠胰腺组织病理改变。

1.2.6 实时定量荧光 PCR (RT-PCR) 检测胰腺组织基因表达

取胰腺病灶组织,加入 TRIzol 提取总 RNA。采用超微量分光光度计测定其浓度以及 OD260/

OD280 比值。采用 Promega 公司反转录试剂盒配置 20 μL 体系将 RNA 反转录为 cDNA 以备 PCR 扩增反应。引物委托宝生物工程(大连)有限公司制备,序列见表 1。选取 β-Actin 作为内参基因,得到各扩增反应的 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的 mRNA 相对表达量。

表 1 基因的引物序列

Table 1 Primer sequences used for each gene

引物 Primers		序列 Sequences	长度 (bp) Size (bp)
TLR4	F	5'-CCAGCCTCCTCAGAAACAGA-3'	145
	R	5'-TCCCTCCAGCAGTGAAGAAG-3'	
MYD88	F	5'-GGACTGCCAGAAATACATACGC-3'	94
	R	5'-CTTTGTCTGTGGGACACTGCTC-3'	
IRAK-2	F	5'-AGGAGGATGCCCCCTTGTTTC-3'	181
	R	5'-TCACTGATTTCGGTGGCTTTG-3'	
IRAK-4	F	5'-CTGCTGCCAGATGCTGTTCC-3'	97
	R	5'-ACGCTTGTCTCTGTTCTTTTCC-3'	
β-Actin	F	5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	150
	R	5'-GACTCATCGTACTCTCTGCTTGCTG-3'	

1.2.7 Western Blot 测试胰腺组织蛋白表达

取胰腺病灶组织,加入组织裂解液提取总蛋白,采用 BCA 试剂盒对蛋白提取液进行定量分析,随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,120 V 恒压转至 PVDF 膜,室温封闭 3 h,一抗 4℃ 冰箱孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,最后采用化学发光底物进行化学发光,显影后用 Bio-RAD Quantity one 图像分析软件进行扫描分析,并使用 Image J 软件进行数据分析。

1.2.8 免疫组化法 (IHC) 测试胰腺组织蛋白表达

取固定后胰腺组织进行石蜡包埋,切片,常规脱蜡至水,阻断内源性过氧化物酶,血清封闭;滴加一抗至切片,4℃ 孵育过夜;滴加二抗至切片,室温孵育 1 h;应用 DAB 液进行显色,完成后自来水冲洗,终止反应;复染细胞核,脱水封片;光镜下观察大鼠胰腺组织中蛋白表达情况,棕黄色为阳性染色;通过 Image J 分析并计算各组的平均光密度 (IOD) 值。

1.2.9 酶联免疫法 (ELISA) 测试胰腺组织中炎症因子 IL-2, iNOS 及 IFN-γ 含量

取胰腺病灶组织,加入生理盐水制备组织匀浆液,采用江苏菲亚生物科技有限公司的酶联免疫试剂盒进行检测,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,配制并滴加标准品、组织匀浆液稀释液,依次加入酶标试剂及显色剂 A、B,最后于酶标仪上读取光度值,按照说明书绘制标准曲线,并计算炎症因子含量。

1.3 统计学分析

计量资料以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。实验数据均采用 SPSS 22.0 和 Graph Pad Prism 8 软件处理,多组间比较先进行方差齐性检验,方差齐者两两比较应用 LSD-*t* 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 法比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般生存状况观察

假手术组大鼠表现为反应灵敏、皮毛浓密光泽、活动度正常。而 AP 模型观察组大鼠造模后表现为眯眼、被毛杂乱失泽、倦卧嗜睡。各药物干预组大鼠在治疗期间观测到被毛杂乱失泽、反应迟钝、少食怠动、消瘦倦卧、逐渐减轻,尤其以大黄牡丹汤高剂量组大鼠一般生存状况改善明显。

2.2 生化指标检测

如图 1 所示,与假手术组比较,AP 模型观察组大鼠 AMS、ALT、AST 含量显著降低组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与 AP 模型观察组比较,各治疗组大鼠 AMS、ALT、AST 均有下降趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著,组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 大鼠胰腺组织病理改变

干预 6 d 后,各组大鼠胰腺组织病理改变如图 2 所示,假手术组 (A 组) 大鼠的胰腺组织腺泡以及小叶导管结构未见异常,未观察到明显的水肿、充血

和炎性细胞浸润;AP 模型观察组(B 组)大鼠的胰腺组织腺泡细胞大量坏死,小叶导管结构模糊,叶间隔明显增宽,可见大量充血、水肿以及炎性细胞浸润;奥曲肽阳性对照组及大黄牡丹汤高、中、低剂量组大鼠的胰腺组织腺泡细胞坏死,小叶导管结构模糊,叶间隔增宽,可见出血以及炎性细胞浸润,但均较 AP 模型观察组(B 组)大鼠不同程度减轻,尤以大黄牡丹汤高剂量组显著。

2.4 大鼠胰腺组织 TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4 基因表达

如图 3 所示,与假手术组比较,AP 模型观察组大鼠 TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4 基因表达显著升高,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 AP 模型观察组比较,奥曲肽阳性对照组及大黄牡丹汤

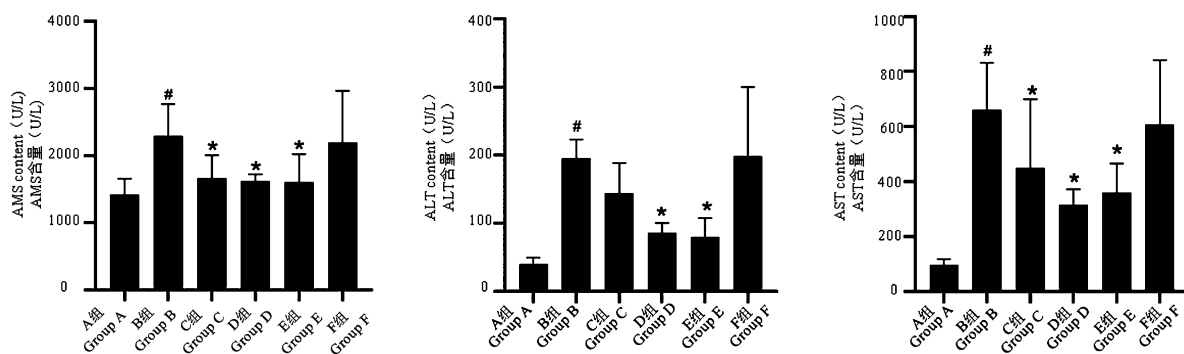
高、中、低剂量组大鼠 TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4 基因表达均有下降趋势,其中以大黄牡丹汤高剂量组显著,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 大鼠胰腺组织 TLR4、MYD88 蛋白表达

如图 4、5 所示,与假手术组比较,AP 模型观察组大鼠 TLR4、MYD88 蛋白表达显著升高,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 AP 模型观察组比较,奥曲肽阳性对照组及大黄牡丹汤高、中、低剂量组大鼠 TLR4、MYD88 蛋白表达均有下降趋势,其中以大黄牡丹汤高剂量组显著,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 大鼠胰腺组织 IRAK-2、IRAK-4 蛋白表达

如图 6 所示,光镜下观察,可以明显看到组织形态的改变,黄染颗粒为阳性染色,主要表达于胞核、



注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与 AP 模型观察组比较,^{*} $P < 0.05$ 。(下同)

图 1 大黄牡丹汤对血清生化指标的影响

Note. Compared with the group A, [#] $P < 0.05$. Compared with group B, ^{*} $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of Dahuang Mudan Decoction on biochemical indexes of serum

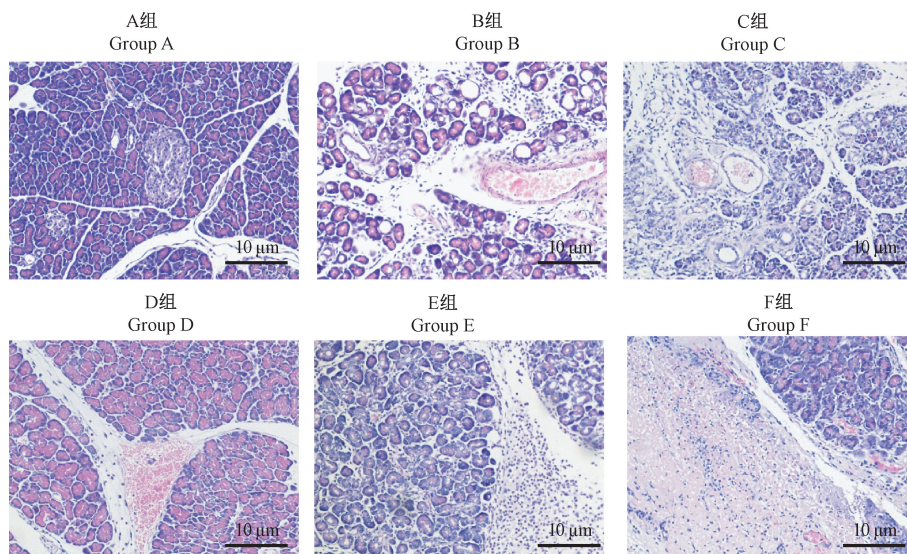


图 2 大黄牡丹汤对胰腺组织病理的影响($\times 100$)

Figure 2 Effect of Dahuang Mudan Decoction on pancreatic histopathology($\times 100$)

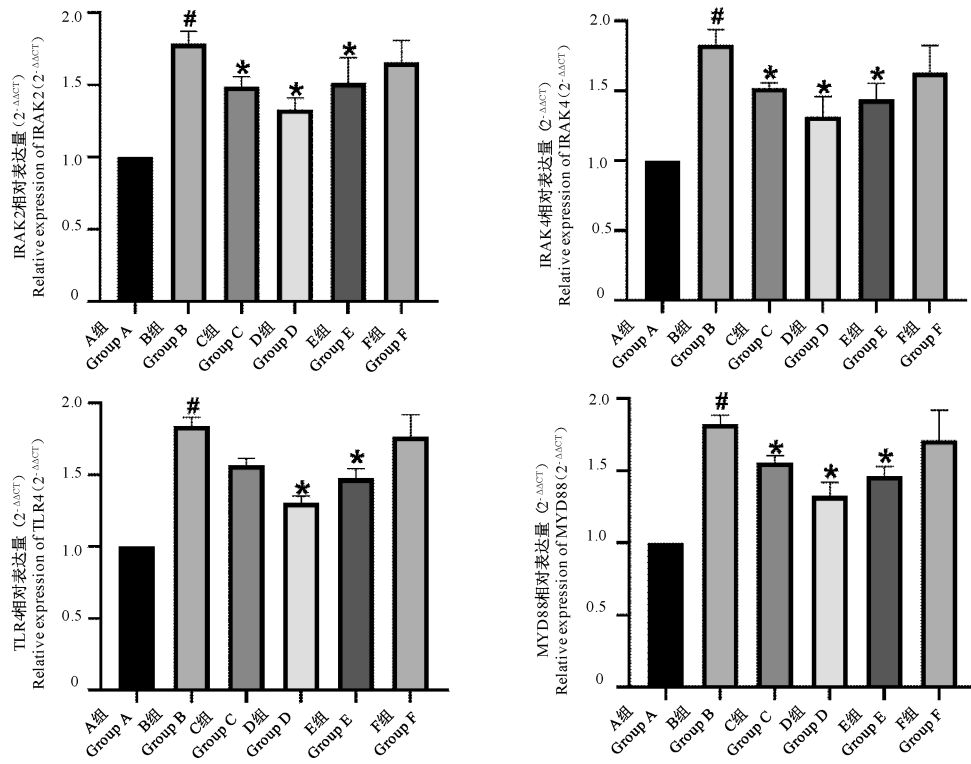


图 3 大黄牡丹汤对 TLR4、MYD88、IRAK-2、IRAK-4 基因表达的影响

Figure 3 Effect of Dahuang Mudan Decoction on TLR4/MYD88/IRAK-2/IRAK-4 gene expression

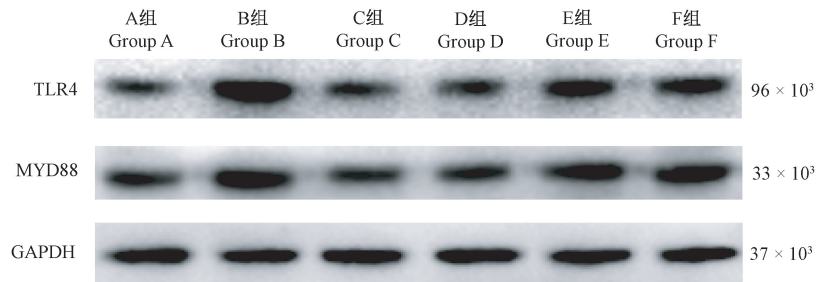


图 4 胰腺组织 TLR4、MYD88 蛋白电泳图

Figure 4 Electrophoresis of TLR4 and MYD88 protein in pancreas

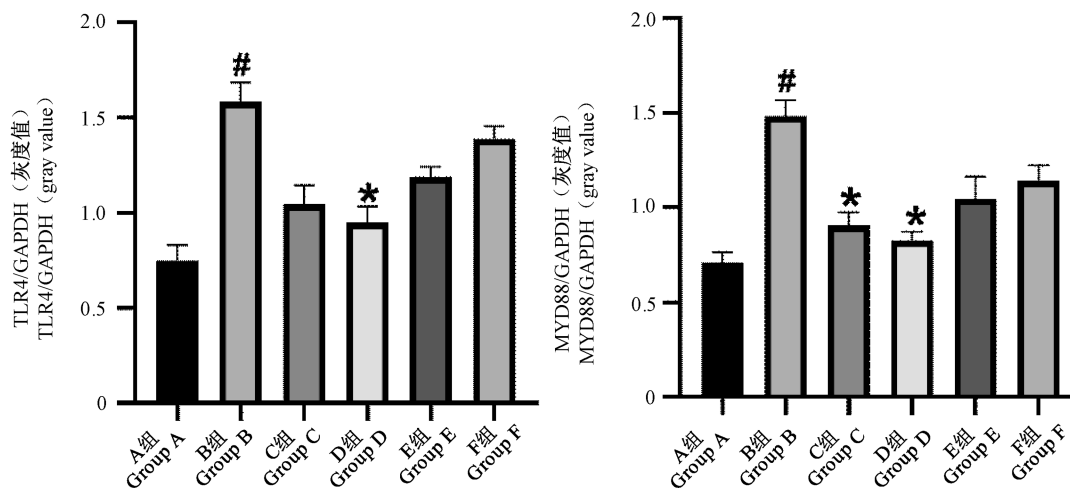


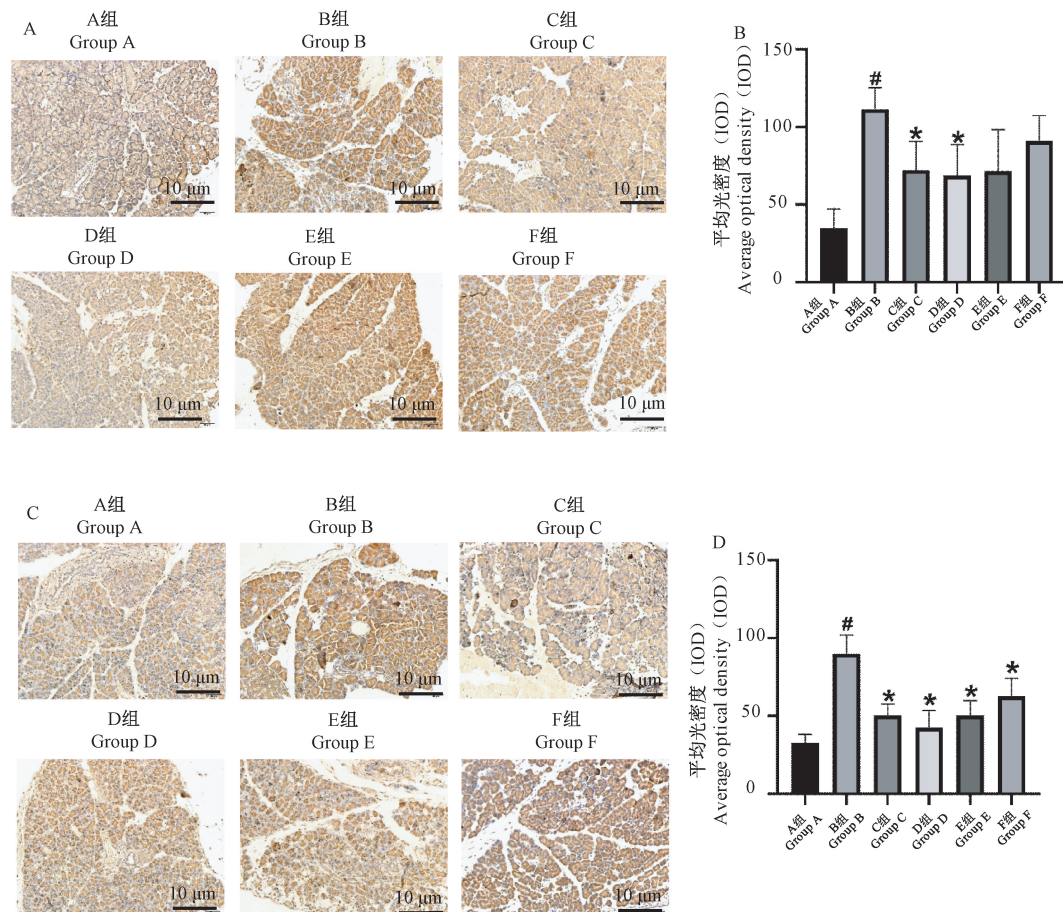
图 5 大黄牡丹汤对 TLR4、MYD88 蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of Dahuang Mudan Decoction on the expression of TLR4 and MYD88

胞质中;各组的 IOD 值,与假手术组比较,AP 模型观察组大鼠 IRAK-2、IRAK-4 蛋白表达显著升高,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);与 AP 模型观察组比较,奥曲肽阳性对照组及大黄牡丹汤高、中、低剂量组大鼠 IRAK-2、IRAK-4 蛋白表达均有下降趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.7 大鼠胰腺组织 IL-2、iNOS、IFN- γ 含量

如图 7,与假手术组比,AP 模型观察组大鼠 IL-2、iNOS、IFN- γ 含量显著升高,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 AP 模型观察组比,奥曲肽阳性对照组及大黄牡丹汤高、中、低剂量组大鼠 IL-2、iNOS、IFN- γ 均有下降趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著,组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



注:A,B:对 IRAK-2 蛋白表达的影响;C,D:对 IRAK-4 蛋白表达的影响。

图 6 大黄牡丹汤对 IRAK-2、IRAK-4 蛋白表达的影响

Note. A, B. Effect on IRAK-2 protein expression. C, D. Effect on IRAK-4 protein expression.

Figure 6 Effect of Dahuang Mudan Decoction on IOD of IRAK-2/IRAK-4 protein expression

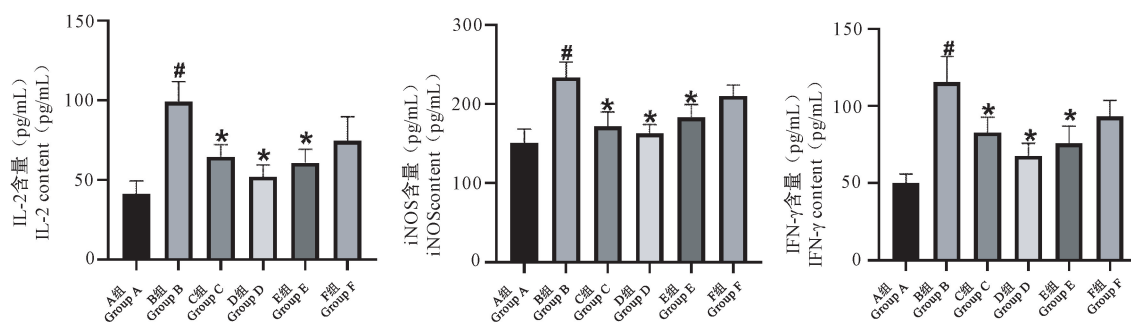


图 7 大黄牡丹汤对炎症因子含量的影响

Figure 7 Effect of Dahuang Mudan Decoction on the content of inflammatory factors

3 讨论

急性胰腺炎作为临床上比较多见的急腹症,其发病原因较多,常导致胰酶在胰腺内被异常激活出现胰腺组织的自身消化、水肿、出血甚至坏死的局部严重炎症反应,如进一步发展可引发全身炎症反应并伴随全身多脏器损伤,引发死亡风险^[12-13]。中医理论认为该病病情重,病势急,属毒热蕴结肠道,气血瘀滞不通之症,治当泄热散结,荡涤瘀滞。大黄牡丹汤出自汉代张仲景《金匮要略·疮痍肠痍浸淫病脉证并治》,该方以大黄、丹皮为君药,荡涤肠腑湿热瘀结之毒,以芒硝、桃仁为臣药,泄积热、下瘀血、除蓄结,冬瓜子为使药,破溃脓血,消除腹内积聚以助君臣之用,全方共奏泄热逐瘀之功,以消肠腑之瘀热。大量研究表明该方不但临床治疗 AP 患者疗效显著,而且能够有效改善急性胰腺炎模型大鼠肝肾功能损伤,降低炎症因子水平,促进胰腺组织修复^[14-15]。

大黄牡丹汤方中大黄的主要成分为蒽醌类大黄素、大黄酸^[16],刘涛等^[7]使用大黄素干预非酒精性脂肪肝大鼠模型,发现能够抑制大鼠肝内 TLR4、MYD88 的表达。曾丹等^[17]使用臭氧应激的方法建立气道炎症小鼠模型,在使用大黄素进行治疗后也发现肺组织中 TLR4、MyD88 表达明显下降,通过该通路发挥抗炎作用。Zhuang 等^[18]、Bi 等^[19]的实验研究则表明大黄素能够显著降低 TLR4 的表达。牡丹皮中主要成分为芍药苷和丹皮酚^[20],芍药苷是一种生物活性单萜糖苷,具有抗氧化、抗炎和抗高血糖的特性,Li 等^[21]通过研究发现芍药苷可以通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 途径减轻动脉粥样硬化炎症。张立才^[22]的研究也表明芍药苷在脊髓损伤大鼠模型中能够通过 TLR4/MYD88 炎症通路减轻大鼠的脊髓损伤。丹皮酚具有止痛、解热和抗过敏作用,Wang 等^[23]研究表明丹皮酚通过调节 TLR4 / MyD88 信号通路对 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠模型起到保护作用。He 等^[24]评估丹皮酚在 LPS 激活的小鼠 N9 小胶质细胞中的抗炎作用,发现丹皮酚显著降低了 TLR4/MyD88/IRAK4/TNFR 相关因子的表达,表明丹皮酚在相关信号传导途径起到了抑制炎症反应的作用。桃仁水煎物有抗炎、抗菌作用,已通过小鼠实验证明可分离出对急性炎症有显著抑制作用的蛋白质 F、蛋白质 G、蛋白质 B^[25]。周玉等^[26-27]使用桃仁对糖尿病大血管纤维化大鼠进

行干预,发现桃仁干预能够降低 TLR4 的表达。兰涛等^[28]研究桃仁提取物对急性胰腺炎大鼠肠道黏膜屏障功能及免疫功能的影响,同样发现中剂量和高剂量组小肠组织中 TLR4 较低剂量组大鼠显著降低。冬瓜子基础化学成分包括氨基酸、无机元素及脂肪酸,刘静^[29]通过研究冬瓜子水提取物、冬瓜子醇提取物、冬瓜子油对大鼠实验性慢性细菌性前列腺炎的治疗作用,发现三种提取物均能显著降低 TNF- α 、IL-6 炎症细胞因子。芒硝主要成份是含水硫酸钠,内服后在肠道内形成高渗盐溶液,吸附大量水分使肠道扩张,引起机械刺激,促进肠蠕动,从而发生排便效应,在急性胰腺炎的临床治疗中有明显效果^[30-31]。上述文献均提示本研究中使用的大黄牡丹汤方剂主要组分在调控 TLR4 和 MyD88 表达以及炎症反应中发挥了重要作用。

TLR4 是 TLR 家族的重要成员之一,广泛分布于胰腺细胞表面,能被感染、缺血、应激损伤等有害刺激激活,并进一步介导细胞内 MyD88 结合丝氨酸/苏氨酸激酶、IRAK-2 和 IRAK-4 形成复合物,进而启动蛋白质-蛋白质相互作用的级联反应,产生促炎症细胞因子和干扰素,启动炎症和免疫反应^[32-35]。大量研究表明抑制 TLR4/MYD88 信号通路的表达可以显著改善炎症反应的发生^[36-37],而且已经有实验表明急性胰腺炎大鼠模型胰腺组织内 TLR4/MYD88 信号通路显著激活并介导下游炎症反应,而药物干预有效下调胰腺组织内 TLR4/MYD88 信号通路关键蛋白表达以及炎症因子含量,这与胰腺组织损伤的改善呈一致性^[38]。

本实验结果显示,与假手术组比较,AP 模型观察组大鼠胰腺组织中 TLR4、MYD88、IRAK-2 以及 IRAK-4 基因蛋白表达以及下游炎症因子(IL-2、iNOS、IFN- γ)含量显著升高($P < 0.05$),这可能是急性胰腺炎早期超强炎症反应发生的重要因素之一。与 AP 模型观察组相比,治疗组大鼠胰腺组织中 TLR4、MYD88、IRAK-2 以及 IRAK-4 基因蛋白表达以及下游炎症因子(IL-2、iNOS、IFN- γ)含量不同程度降低,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组改善最为显著($P < 0.05$)。本研究认为,大黄牡丹汤有效改善大鼠胰腺组织损伤,减轻炎症反应的机制可能抑制 TLR4/MYD88 信号通路有关,为大黄牡丹汤改善急性胰腺炎作用机制的研究提供了理论和实验依据。本研究只是初步探讨了大黄牡丹汤治疗急性胰腺炎的可能机制,具体有效成分及具体分子作用机制

仍需要进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Sadek AS, Khattab RT. The protective role of melatonin on L-arginine-induced acute pancreatitis in a adult male albino rats [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2017, 76(1): 66-73.
- [2] 彭晶. 通腑汤治疗重症急性胰腺炎的临床疗效与观察 [D]. 北京: 北京中医药大学; 2014.
Peng J. Clinical effect and observation of Tongfu Decoction in treating severe acute pancreatitis [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine; 2014.
- [3] 王建刚, 王玉波, 孔娜. 参麦注射液联合肠内营养治疗高脂血症性重症急性胰腺炎的临床研究 [J]. *中国医药导报*, 2019, 16(29): 136-140.
Wang JG, Wang YB, Kong N. Clinical study of Shenmai injection combined with enteral nutrition in the treatment of severe acute pancreatitis with hyperlipidemia [J]. *Chin Med Herald*, 2019, 16(29): 136-140.
- [4] 王勋. 大黄牡丹汤加减综合治疗急性胰腺炎 37 例 [J]. *光明中医*, 2019, 34(4): 85-87.
Wang X. Modified Dahuang Mudan Decoction for 37 cases of acute pancreatitis [J]. *Guangming J Chin Med*, 2019, 34(4): 85-87.
- [5] Frossard JL, Steer ML, Pastor CM. Acute pancreatitis [J]. *Lancet*, 2008, 371(9): 143-52.
- [6] 张艳霞, 张延英, 舒畅, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎大鼠的保护作用 [J]. *中医研究*, 2015, 28(2): 55-58.
Zhang YX, Zhang YY, Shu Ch, et al. The protective effect of Dahuang Mudan Decoction on acute pancreatitis in rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 28(2): 55-58.
- [7] 刘涛, 徐秋玲, 赵岩. 大黄素抑制 NAFLD 大鼠肝脏 TLR4 信号表达的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2): 201-205.
Liu T, Xu QL, Zhao Y. Emodin inhibits TLR4 signal expression in the liver of NAFLD rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2016, 27(2): 201-205.
- [8] 农菲菲, 罗爽, 赵钟祥, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术的大黄牡丹汤治疗 IBD 大鼠的血清代谢组学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(5): 571-579.
Nong FF, Luo S, Zhao ZX, et al. Serum metabonomics study of Dahuang Mudan Decoction in the treatment of IBD rats based on UPLC/Q-TOF-MS technology [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2019, 30(5): 571-579.
- [9] 冯辉, 吴标, 赵习德, 等. 生长抑素联合大柴胡汤对重症急性胰腺炎大鼠的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(7): 1297-1301.
Feng H, Wu B, Zhao XD, et al. The effect of somatostatin combined with Dachaihu decoction on severe acute pancreatitis in rats [J]. *Chin J Pathophys*, 2016, 32(7): 1297-1301.
- [10] 袁琳, 周秉舵, 王晓素, 等. 三种不同严重程度大鼠重症胰腺炎模型比较研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(5): 20-23.
- [11] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2006.
Li YK. Experimental methodology of traditional Chinese medicine pharmacology [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 2006.
- [12] 曹洁, 姚隆. 重症急性胰腺炎营养治疗的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2020, 49(15): 2583-2587.
Cao J, Yao L. Research progress on nutritional therapy of severe acute pancreatitis [J]. *Chongqing Med*, 2020, 49(15): 2583-2587.
- [13] 李劫, 高磊, 陈亚峰, 等. 程序性死亡在急性胰腺炎中的研究进展 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2019, 26(11): 1350-1354.
Li J, Gao L, Chen YF, et al. Research progress of programmed death in acute pancreatitis [J]. *Chin J Bas Clin Gen Surg*, 2019, 26(11): 1350-1354.
- [14] 庞克斌, 刘军昌, 李晓光. 大黄牡丹汤灌肠对重症急性胰腺炎患者炎症反应及微循环的影响 [J]. *贵州医药*, 2019, 43(4): 605-607.
Pang KB, Liu JC, Li XG. Effect of Dahuang Mudan Decoction enema on inflammatory response and microcirculation in patients with severe acute pancreatitis [J]. *Guizhou Med*, 2019, 43(4): 605-607.
- [15] 张光亚, 赵云, 马栋. 大黄牡丹汤对重症急性胰腺炎大鼠肝肾功能及肝肾病理影响 [J]. *四川中医*, 2018, 36(11): 48-51.
Zhang GY, Zhao Y, Ma D. Effect of Dahuang Mudan Decoction on liver and kidney function and liver and kidney pathology in rats with severe acute pancreatitis [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med*, 2018, 36(11): 48-51.
- [16] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. *中医药信息*, 2020, 37(1): 121-126.
Jin LX, Jin LJ, Luan ZQ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacology of rhubarb [J]. *Inform Tradit Chin Med*, 2020, 37(1): 121-126.
- [17] 曾丹, 刘莉, 谭眉灵, 等. 臭牡丹大黄素对臭氧应激小鼠模型 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的调节作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(5): 581-585.
Zeng D, Liu L, Tan ML, et al. Regulation of smelt peony emodin on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in ozone-stressed mouse models [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2018, 29(5): 581-585.
- [18] Zhuang Sh, Zhong J, Zhou QL, et al. Rhein protects against barrier disruption and inhibits inflammation in intestinal epithelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 71(9): 321-327.
- [19] Bi F, Chen F, Li Y, et al. Klotho preservation by Rhein promotes toll-like receptor 4 proteolysis and attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(9): 915-927.

- [20] 陈箫箫, 赵宏苏, 章芳珍, 等. 安徽主产区牡丹皮药材质量差异研究 [J]. 中南药学, 2020, 18(4): 680-684.
Chen XX, Zhao HS, Zhang FZ, et al. Study on the quality difference of Mudan Cortex medicinal materials in the main producing areas of Anhui [J]. Central South Pharmacy, 2020, 18(4): 680-684.
- [21] Li H, Jiao YB, Xie MJ. Paeoniflorin ameliorates atherosclerosis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B activation [J]. Inflammation, 2017, 40(6): 2042-2051.
- [22] 张立才. 芍药苷通过 TLR4 炎症通路和 Nrf2 氧化应激通路减轻大鼠脊髓损伤的实验研究 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23(8): 1030-1033.
Zhang LC. Experimental study of paeoniflorin in reducing spinal cord injury in rats through TLR4 inflammation pathway and Nrf2 oxidative stress pathway [J]. J Hainan Med Univ, 2017, 23(8): 1030-1033.
- [23] Wang F, Zhu M, Jiang N, et al. Paeonol ameliorates lipopolysaccharides-induced acute lung injury by regulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Pharmazie, 2019, 74(2): 101-106.
- [24] He LX, Tong X, Zeng J, et al. Paeonol suppresses neuroinflammatory responses in LPS-activated microglia cells [J]. Inflammation, 2016, 39(6): 1904-1917.
- [25] 颜永刚, 雷国莲, 刘静, 等. 中药桃仁的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2262-2264.
Yan YG, Lei GL, Liu J, et al. Research overview of traditional Chinese medicine peach kernel [J]. Shizhen Guoyi Guoyao, 2011, 22(9): 2262-2264.
- [26] 周玉, 刘国涛, 卢增珍, 等. 中药桃仁对糖尿病大血管纤维化大鼠 TRIB3 基因及 Toll 样受体信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5670-5674.
Zhou Y, Liu GT, Lu ZZ, et al. Effects of Chinese medicine peach kernel on TRIB3 gene and Toll-like receptor signaling pathway in diabetic rats with macrovascular fibrosis [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharmacy, 2019, 34(12): 5670-5674.
- [27] 周玉, 刘国涛, 卢增珍, 等. TRIB3 基因和 TLR4 蛋白在糖尿病血管病变中的表达及桃仁干预作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2018, 24(6): 733-737.
Zhou Y, Liu GT, Lu ZZ, et al. The expression of TRIB3 gene and TLR4 protein in diabetic vascular disease and the intervention effect of peach kernel [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharmacy, 2018, 24(6): 733-737.
- [28] 兰涛, 李志娟, 付立平, 等. 不同剂量桃仁提取物对急性胰腺炎大鼠肠道黏膜屏障功能及免疫功能的作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(3): 339-343, 353.
Lan T, Li ZJ, Fu LP, et al. Effects of different doses of peach kernel extract on intestinal mucosal barrier function and immune function in rats with acute pancreatitis [J]. Chin J Immun, 2015, 31(3): 339-343, 353.
- [29] 刘静. 冬瓜子质量标准及药效学研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学; 2014.
Liu J. Research on quality standards and pharmacodynamics of winter melon seeds [D]. Qingdao: Ocean University of China; 2014.
- [30] 雷载权. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社; 2001.
Lei ZQ. Traditional Chinese medicines [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press; 2001.
- [31] 暴梅佳. 中药芒硝药理作用的研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(30): 166, 179.
Bao MJ. Study on the pharmacological effects of Chinese medicine Glauber's salt [J]. J Clin Med Literature, 2019, 6(30): 166, 179.
- [32] Li G, Wu X, Yang L, et al. TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic in mice with severe acute pancreatitis [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(1): 99-107.
- [33] Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis [J]. Vaccines (Basel), 2017, 5(4): 34.
- [34] Ding JL, Li Y, Zhou XY, et al. Potential role of the TLR4/IRAK-4 signaling pathway in the pathophysiology of acute pancreatitis in mice [J]. Inflamm Res, 2009, 58(11): 783-790.
- [35] Piccinini AM, Midwood KS. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling [J]. Mediators Inflamm, 2010, 2010: 672395.
- [36] 张红利, 贾春新, 李海鸥, 等. 参芍口服液调控 TLR4/MyD88 通路改善糖尿病大鼠心肌炎症损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 28-33.
Zhang HL, Jia CX, Li HO, et al. Shen shao oral liquid regulates TLR4/MyD88 pathway to improve myocardial inflammation injury in diabetic rats [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(8): 28-33.
- [37] Liu MJ, Xie JH, Sun YX. TLR4/MyD88/NF- κ B-mediated inflammation contributes to cardiac dysfunction in rats of PTSD [J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(6): 1029-1035.
- [38] 田喆, 谢晓晶, 孙书林, 等. 黄连素对重症急性胰腺炎大鼠炎症反应的影响 [J]. 海南医学, 2018, 29(4): 448-451.
Tian Z, Xie XJ, Sun SL, et al. Effect of berberine on inflammation in rats with severe acute pancreatitis [J]. Hainan Med J, 2018, 29(4): 448-451.

[收稿日期] 2020-09-22