

孙银凤,杨丹,白敏,等. 大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(2): 169-176.
Sun YF, Yang D, Bai M, et al. Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(2): 169-176.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.02.003

大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用

孙银凤^{1,2}, 杨丹¹, 白敏¹, 宋冰^{1,2}, 康万荣^{1,2}, 汪永锋^{1,2*}, 张延英^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 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 探讨大黄牡丹汤对急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用。**方法** 将96只SPF级Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、大黄牡丹汤高、中、低剂量组(14、7、3.5 g/(kg·d))、奥曲肽组(10 μg/(kg·d)),各16只,采用5%牛磺胆酸钠溶液逆行注射胰胆管复制模型,于造模前1h及造模后12、24h分别给药1次,采集样本。观察大鼠一般体征,生化测定血清淀粉酶(AMS)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、胆碱酯酶(ChE)、C反应蛋白(CRP)含量,HE染色观察胰腺和肝组织病理形态变化,ELISA法检测大鼠肝组织TNF-α、IL-1β、IL-6含量;Western Blot法检测大鼠肝组织PI3K/Akt/NF-κB通路关键蛋白表达水平。**结果** (1)与空白组比较,模型组大鼠一般生存状况相对较差,AMS、ALT、AST、CRP含量增高,ChE含量降低;HE染色镜下可见胰腺组织结构不完整、坏死、充血和炎性浸润严重,肝细胞排列紊乱、坏死、脂肪样变、炎症浸润明显;肝组织匀浆液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均显著升高;肝组织中PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax蛋白表达水平平均升高,Bcl-2蛋白表达水平下降($P < 0.05$)。(2)与模型组比较,各治疗组大鼠生存状态改善;镜下胰腺组织水肿、充血、坏死程度明显改善,肝细胞排列紊乱、坏死、脂肪样变、炎症浸润等情况明显减轻;AMS、ALT、AST、CRP含量不同程度降低,ChE含量升高;肝组织匀浆液中TNF-α、IL-1β、IL-6含量均下降;肝组织中PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bax蛋白表达水平平均下降,Bcl-2蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。**结论** 大黄牡丹汤有效改善急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)模型大鼠一般状态、生化指标以及胰腺和肝组织病理改变,其作用机制可能是通过调控PI3K/Akt/NF-κB信号通路,从而减轻肝损伤。

【关键词】 急性胰腺炎;大黄牡丹汤;肝损伤;PI3K/Akt/NF-κB信号通路

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2022) 02-0169-08

Protective effect of Dahuang Mudan Decoction on liver injury in rats with acute pancreatitis

SUN Yinfeng^{1,2}, YANG Dan¹, BAI Min¹, SONG Bing^{1,2}, KANG Wanrong^{1,2}, WANG Yongfeng^{1,2*}, ZHANG Yanying^{1,2*}

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China. 2. Gansu Experimental Animal Industry Technology Center, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

Corresponding author: WANG Yongfeng. E-mail: wyf@gszy.edu.cn; ZHANG Yanying. E-mail: 1360599656@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of Dahuang Mudan against liver injury in rats with acute pancreatitis. **Methods** Overall, 96 SPF Wistar rats were randomly divided into blank, model, Dahuang Mudan decoction high-, medium-, and low-dose (14, 7, 3.5 g/(kg·d), respectively), and octreotide (10 μg/(kg·d)) groups, with

【基金项目】 国家自然科学基金(82160871, 81760828), 甘肃中医药大学研究生创新基金(2021CX35), 甘肃中医药大学科学研究与创新基金项目(2021KCYB-6)。

Fund by National Natural Science Foundation of China(82160871, 81760828), Graduate Innovation Fund of Gansu University of Traditional Chinese Medicine(2021CX35), Scientific Research and Innovation Fund Project of Gansu University of Traditional Chinese Medicine (2021KCYB-6).

【作者简介】 孙银凤(1993—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 急性胰腺炎。Email: 1243067671@qq.com

【通信作者】 汪永锋(1967—), 男, 教授, 硕士, 研究方向: 医学解剖学。Email: wyf@gszy.edu.cn;

张延英(1964—), 男, 实验研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物学。Email: 1360599656@qq.com。

* 共同通信作者

16 animals in each group. The acute pancreatitis model was generated by retrograde injection of 5% sodium taurocholate solution into the pancreaticobiliary duct. before the model and every 12 h after the model. Samples were collected 24 h after the mold. To observe the rats' general physical signs, serum amylase (AMS), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), cholinesterase (ChE), and C-reactive protein (CRP) contents were biochemically determined, and hematoxylin and eosin staining used to observe pancreatic and hepatic histopathological changes. ELISA was employed to detect rat liver tissue TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents, and western blotting was used to detect the expression of key rat liver PI3K/Akt pathway proteins. **Results** (1) Compared with the blank group, the model group rats' general survival status was relatively poor; their contents of AMS, ALT, AST, and CRP increased and that of ChE decreased. Microscopic analysis of HE staining showed the pancreatic tissue had incomplete structure, and was necrotic and congested with severe inflammatory infiltration; liver cells showed disordered arrangement, and liver tissue showed necrosis, steatosis, and inflammatory infiltration. The TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents of the liver tissue homogenate were significantly increased; PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, and Bax protein expression levels decreased and Bcl-2 protein expression increased, especially in the Dahuang Mudan high-dose group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (2) Compared with the model group, the general condition of the rats in each treatment group improved to varying degrees: the degree of pancreatic tissue edema, congestion, and necrosis visible under the microscope was significantly improved, and liver cell arrangement disorder, necrosis, steatosis, inflammatory infiltration, among others, were alleviated. AMS, ALT, AST, and CRP contents decreased to varying degrees, and the ChE content increased. Liver tissue homogenate TNF- α , IL-1 β , and IL-6 contents decreased; PI3K, p-Akt, p-NF- κ B p65, and Bax protein levels decreased; while the levels of Bcl-2 protein increased, especially in the Dahuang Mudan high-dose group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dahuang Mudan decoction effectively improved the general health, biochemical indicators, and pathological changes to the pancreas and liver of acute pancreatitis model rats. The mechanism of its liver-damage-reducing action may involve regulation of the PI3K/Akt signaling pathway.

【Keywords】 acute pancreatitis; Dahuang Mudan Decoction; liver injury; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway

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

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)作为病情复杂、并发症多、病死率高的急腹症,易合并心、脑、肺、肾、肝等脏器的损害,发生多系统器官功能衰竭^[1]。肝是 AP 最易受损器官之一,15% ~ 60% 的 AP 患者会合并肝损伤^[2]。大黄牡丹汤由大黄、芒硝、丹皮、桃仁、冬瓜仁 5 味中药组成,共奏泻热破瘀、通腑散结之效。本课题组前期研究表明该方能够有效改善 AP 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^[3-6]。目前 AP 肝损伤发病机制尚未明确,研究发现 AP 肝损伤的发病进展与炎症因子级联效应息息相关,PI3K/Akt/NF- κ B 途径与炎症介质密切相关。因此,本研究进一步基于 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路关键分子深入探讨大黄牡丹汤对 AP 肝损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

96 只 2 月龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重(200 $\pm$ 20)g,购自甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心【SCXK(甘)2020-0001】。饲养于甘肃中医药大学

SPF 级实验动物中心【SYXK(甘)2020-0009】。饲养条件:饮水自由,昼夜各半循环照明,湿度恒定 45% ~ 55%,温度维持 21 ~ 25 $^{\circ}$ C,常规饲养 2 d 后进行实验。正式实验前常规饲养 1 周,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:2021-242)。

1.1.2 主要试剂与仪器

大黄牡丹汤实验处方^[7]:大黄、桃仁、芒硝、牡丹皮、冬瓜子,常规煎煮至浓度达到 1 g/mL,4 $^{\circ}$ C 冷藏备用。奥曲肽,国药一心制药有限公司,171003;牛磺胆酸钠,北京索莱宝科技有限公司,1111J051;大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司,05/2021;PI3K 抗体,abcam 公司,GR3192684-9; p-Akt 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、GAPDH 抗体,ImmunoWay 公司, B0601、B5501、B4101、B1501; p-NF- κ B p65 抗体, GeneTex 公司, 821904930。微量注射泵(深圳圣诺医疗设备有限公司,SN-50T6,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制

采用 3%戊巴比妥钠进行麻醉,按文献^[8-9]方法

复制 AP 大鼠模型,麻醉后将大鼠固定,进行剔毛和消毒,然后于剑突下切开,充分显露胰胆管与十二指肠肠,夹闭胰胆管远端,从十二指肠肠壁穿刺进入胰胆管,用动脉夹固定针头。将 5% 牛磺胆酸钠溶液使用微量泵恒速向胰胆管管内注入,注射完成后,继续夹闭 5 min,然后取下头皮针,等待 5 min 后逐层缝合即可。

1.2.2 动物分组及实验干预

大黄牡丹汤折算剂量参考《中药药理实验方法学》^[10],根据人大鼠体表面积换算,大黄牡丹汤高、中、低组分别给予(14、7、3.5 g/kg)。空白组、模型组给予等体积蒸馏水灌胃。奥曲肽组予 10 μg/kg 奥曲肽背部皮下注射。各治疗组分别于造模前 1 h、造模后 12、24 h 分别给药治疗。

1.2.3 样本采集及指标检测

采用 3% 戊巴比妥钠进行麻醉,心脏采血后,离心机统一分离血清并冻存,取胰腺和肝组织,部分组织用 4% 多聚甲醛固定,部分组织 -80℃ 冰箱冻存。

1.2.4 各组大鼠一般状态。

观察大鼠的精神和活动状态、扭体反应、弓背反应及便质改变等情况。

1.2.5 各组大鼠胰腺、肝组织病理学改变

取用甲醛固定的胰腺组织和肝组织,进行 HE 染色,脱蜡→覆水→苏木精染色→乙酸分化→伊红染色→脱水→封片等步骤,然后选取合适的放大倍数观察胰腺、肝组织病理形态变化,肝组织 HE 染色完毕后,参照 Camargo 等^[11]病理组织评分法对肝组织镜下病理进行评分(见表 1)。

1.2.6 血清生化指标检测

取冻存血清,用全自动生化仪检测 AMS、ALT、AST、ChE、CRP 含量。

1.2.7 ELISA 法检测各组大鼠肝组织 TNF-α、IL-

1β、IL-6 含量

将肝组织制备成匀浆液,用 ELISA 试剂盒进行检测各组大鼠肝组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量,一切操作严格按照说明书进行,依据标准曲线计算肝组织匀浆样本中各个指标的含量。

1.2.8 Western Blot 法检测各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平

各组大鼠干预 24 h 后,将肝组织匀浆后,提取总蛋白并测定浓度,然后电泳、转膜、封闭,分别经过一抗过夜、二抗孵育和曝光等步骤,用 Image J 软件进行扫描并分析条带。以 GAPDH 为内参。

1.3 统计学分析

结果用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 24.0 软件处理所有数据,组间均数差异的比较用方差分析,方差齐用 LSD 法比较,方差不齐用 Tamhane's T2 法比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大黄牡丹汤对各组大鼠一般体征的影响

空白组大鼠一切体征正常,无异常反应出现;而模型组大鼠在造模后出现精神倦怠,眯眼,毛色杂乱,弓背、扭体反应明显;各治疗组在药物干预后观察到上述体征均有不同程度改善,其中大黄牡丹汤高剂量组大鼠的改善作用最为明显。

2.2 大黄牡丹汤对各组大鼠胰腺组织 HE 染色观察

如图 1 所示,空白组大鼠的胰腺组织病理切片未见异常改变,模型组大鼠可见胰腺腺泡间隙扩张,间质水肿和充血,部分腺泡细胞坏死,内含大量炎细胞浸润;各治疗组大鼠可见部分腺泡细胞水肿、出血及炎性细胞浸润均有不同程度减轻,尤以大黄牡丹汤高剂量组胰腺组织损伤程度最轻。

表 1 肝组织镜下病理评分标准

Table 1 Pathological scoring criteria of liver tissue under microscope

评分 Grading	损伤程度 Degree of injury
0	无损伤 No injury
1	轻微损伤:细胞核固缩,局限性胞质空泡形成 Minor lesion. Nuclear pyknosis, localized cytoplasmic vacuole formation
2	中度损伤:广泛性细胞核固缩,血管充血、水肿,点状坏死 Moderate injury. Extensive nuclear pyknosis, vascular congestion, edema, punctate necrosis
3	严重损伤:中性粒细胞浸润,肝细胞坏死,严重充血 Severe injury. Neutrophil infiltration, hepatocyte necrosis, hepatic cord congestion

2.3 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 HE 染色观察

如图 2 所示,空白组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞大小均匀,无变性、坏死等病理改变,无炎症细胞浸润;模型组大鼠局部可见肝细胞点状坏死,明显充血、水肿,胞质内可见微小的圆形脂肪空泡,并伴有少量炎症细胞浸润;各治疗组大鼠血管充血、水肿明显减轻,偶见点状坏死,少量炎细胞浸润,肝组织炎症明显改善,未发现片状坏死等情况,以大黄牡丹汤高剂量组肝组织损伤程度最轻。

2.4 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织病理学评分的影响

空白组大鼠基本处于 0 分区域,模型组大鼠 6 只处于 3 分区域,2 只处于 2 分区域,奥曲肽组大鼠 1、2、3 分区域均散见,大黄牡丹汤高剂量组大鼠集中于 1、2 分区域,中剂量组超过半数散于 2 分区域,低剂量组多处于 2、3 分区域,大黄牡丹汤组大鼠明显呈剂量依赖性,提示大黄牡丹汤能够有效改善大鼠肝损伤(见表 2)。

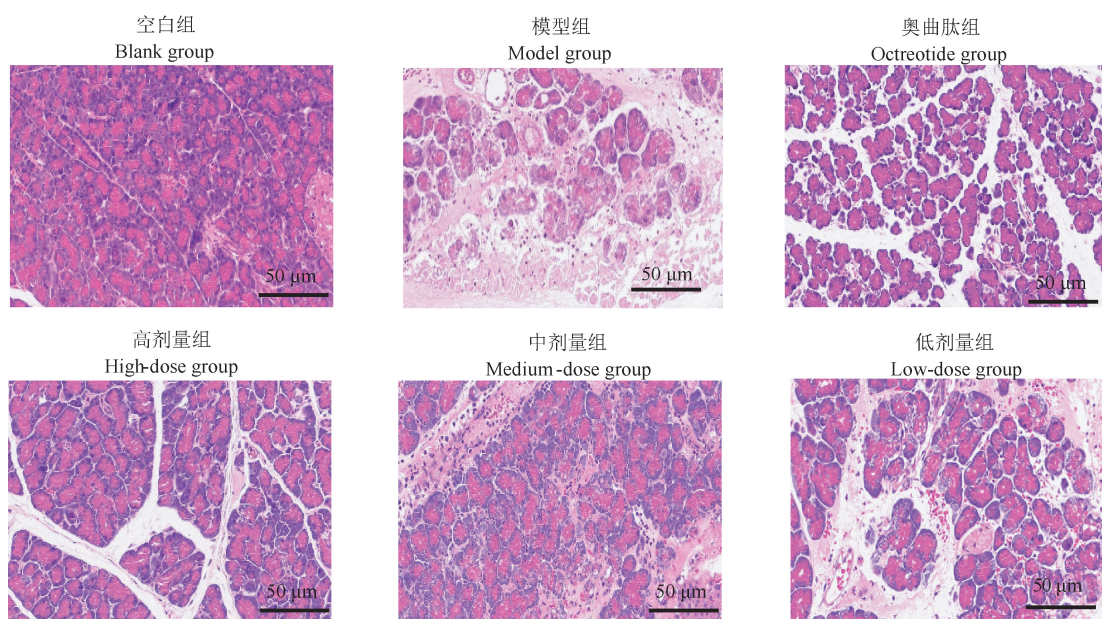


图 1 各组大鼠胰腺组织病理变化

Figure 1 Pathological changes of pancreatic tissue of rats in each group

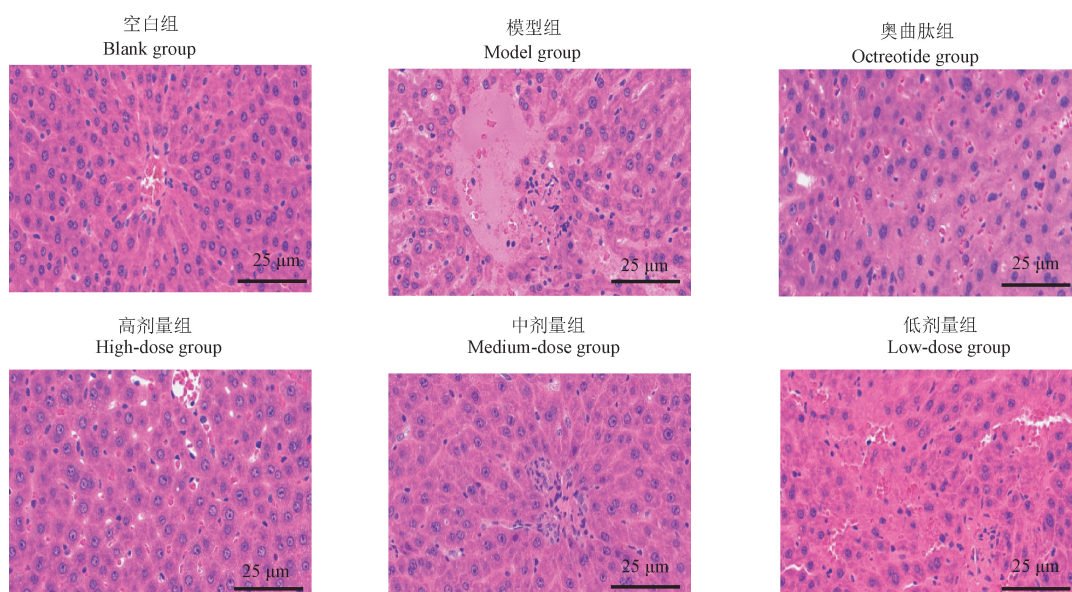


图 2 各组大鼠肝组织病理变化

Figure 2 Pathological changes of liver tissue of rats in each group

表 2 大黄牡丹汤对 AP 大鼠模型肝损伤病理分级的影响($n = 8$)

Table 2 Effects of Dahuang Mudan Decoction on the pathological grading of liver injury in AP rat model($n = 8$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	不同病变程度的分布例数 Number of cases with different degree of lesion			
		0	1	2	3
空白组 Blank group	—	8	0	0	0
模型组 Model group	—	0	0	2	6
奥曲肽组 Octreotide group	10^{-5}	0	2	3	3
高剂量组 High-dose group	14	0	3	3	2
中剂量组 Medium-dose group	7	0	2	4	2
低剂量组 Low-dose group	3.5	0	1	3	4

2.5 大黄牡丹汤对各组大鼠生化指标的影响

与空白组比较,模型组大鼠 AMS、ALT、AST、CRP 含量显著性升高,而 ChE 含量显著性降低($P < 0.05$);在各治疗组大鼠中 AMS、ALT、AST、CRP 含量均有下降趋势,而 ChE 含量有上升趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著($P < 0.05$)(见表 3)。

2.6 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各治疗组

大鼠上述指标均呈下降趋势,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著($P < 0.05$)(见表 4)。

2.7 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

与空白组相比,模型组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bax 蛋白表达显著升高,而 Bcl-2 蛋白表达呈下降趋势($P < 0.05$);与模型组比,各治疗组大鼠 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bax 蛋白表达均不同程度下降,而 Bcl-2 蛋白表达不同程度上升,其中尤以大黄牡丹汤高剂量组显著($P < 0.05$)(见表 5、图 3)。

表 3 大黄牡丹汤对 AP 大鼠肝组织 AMS、ALT、AST、ChE、CRP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of DaHuang MuDan Decoction on the contents of AMS, ALT, AST, ChE and CRP liver tissues of AP rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	血清淀粉酶(U/L) AMS(U/L)	谷丙转氨酶(U/L) ALT(U/L)	谷草转氨酶(U/L) AST(U/L)	胆碱酯酶(U/L) ChE(U/L)	C 反应蛋白(mg/L) CRP(mg/L)
空白组 Blank group	—	1390.83 $\pm$ 246.85	49.80 $\pm$ 8.44	67.02 $\pm$ 10.86	108.50 $\pm$ 22.85	0.02 $\pm$ 0.01
模型组 Model group	—	2704.17 $\pm$ 403.85 [#]	152.52 $\pm$ 25.13 [#]	415.38 $\pm$ 56.59 [#]	55.67 $\pm$ 20.23 [#]	0.06 $\pm$ 0.01 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10^{-5}	1946.17 $\pm$ 355.52 [*]	113.83 $\pm$ 29.83 [*]	232.27 $\pm$ 71.24 [*]	77.50 $\pm$ 22.03	0.04 $\pm$ 0.01 [*]
高剂量组 High-dose group	14	1878.67 $\pm$ 110.77 ^{*Δ}	73.15 $\pm$ 24.77 [*]	173.02 $\pm$ 51.08 [*]	88.50 $\pm$ 20.39 [*]	0.02 $\pm$ 0.01 [*]
中剂量组 Medium-dose group	7	1883.60 $\pm$ 436.74 ^{*Δ}	78.02 $\pm$ 13.03 [*]	221.98 $\pm$ 76.88 [*]	83.00 $\pm$ 25.63	0.03 $\pm$ 0.01 [*]
低剂量组 Low-dose group	3.5	2411.38 $\pm$ 527.56	163.58 $\pm$ 84.03	370.82 $\pm$ 143.82	65.17 $\pm$ 29.43	0.04 $\pm$ 0.01 [*]

注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与低剂量组比较, ^{Δ} $P < 0.05$ 。(下表同)

Note. Compared with blank group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with low-dose group, ^{Δ} $P < 0.05$. (The same in the following tables)

表 4 大黄牡丹汤对 AP 大鼠肝组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of DaHuang Mudan Decoction on the contents of TNF-α, IL-1β and IL-6 in liver tissues of AP rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	TNF-α(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)
空白组 Blank group	—	116.42 ± 8.52	131.66 ± 7.61	83.86 ± 6.05
模型组 Model group	—	148.63 ± 4.61 [#]	184.50 ± 10.25 [#]	133.83 ± 4.11 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	130.30 ± 3.81 [*]	154.89 ± 5.82 [*]	105.57 ± 3.05 [*]
高剂量组 High-dose group	14	122.07 ± 3.96 ^{*Δ}	144.34 ± 7.29 ^{*Δ}	92.88 ± 2.97 ^{*Δ}
中剂量组 Medium-dose group	7	123.09 ± 7.51 ^{*Δ}	159.67 ± 5.90 ^{*Δ}	98.45 ± 5.93 ^{*Δ}
低剂量组 Low-dose group	3.5	138.92 ± 8.37 [*]	178.41 ± 14.85	115.25 ± 6.88 [*]

表 5 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of DaHuang Mudan Decoction on the protein expression levels of PI3K, p-Akt, p-NF-κB p65, Bcl-2 and Bax in liver tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Groups	剂量(g/kg) Dose(g/kg)	PI3K/GAPDH	p-Akt/GAPDH	p-NF-κB p65/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
空白组 Blank group	—	0.97 ± 0.06	0.60 ± 0.03	1.15 ± 0.09	1.63 ± 0.17	1.01 ± 0.05
模型组 Model group	—	1.37 ± 0.07 [#]	1.34 ± 0.07 [#]	1.69 ± 0.10 [#]	1.22 ± 0.06 [#]	1.58 ± 0.07 [#]
奥曲肽组 Octreotide group	10 ⁻⁵	1.20 ± 0.05 [*]	1.26 ± 0.05	1.47 ± 0.11 [*]	1.25 ± 0.07	1.29 ± 0.06 [*]
高剂量组 High-dose group	14	1.15 ± 0.06 ^{*Δ}	1.08 ± 0.06 ^{*Δ}	1.33 ± 0.11 ^{*Δ}	1.43 ± 0.14 ^{*Δ}	1.18 ± 0.04 ^{*Δ}
中剂量组 Medium-dose group	7	1.17 ± 0.03 ^{*Δ}	1.10 ± 0.07 ^{*Δ}	1.39 ± 0.05 ^{*Δ}	1.19 ± 0.09 ^Δ	1.26 ± 0.03 ^{*Δ}
低剂量组 Low-dose group	3.5	1.36 ± 0.03	1.42 ± 0.09	1.57 ± 0.12	0.92 ± 0.10 [*]	1.40 ± 0.03 [*]

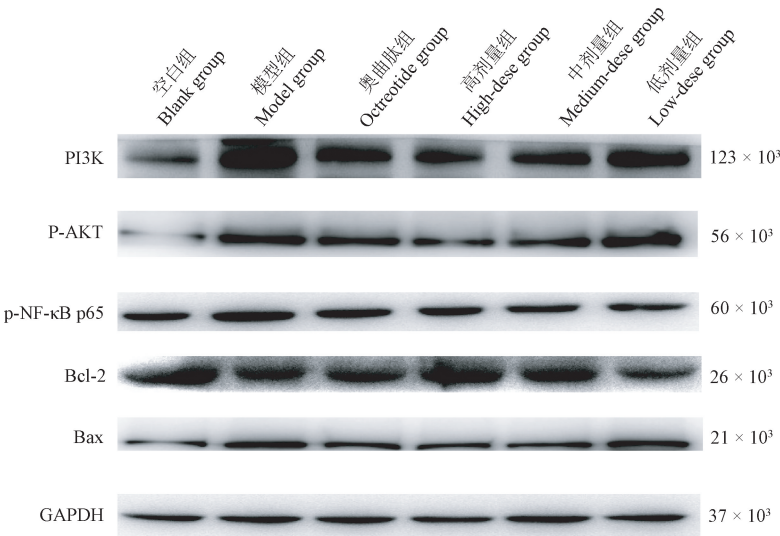


图 3 大黄牡丹汤对各组大鼠肝组织 PI3K、p-Akt、p-NF-κB p65、Bcl-2、Bax 蛋白表达电泳

Figure 3 Protein expression electrophoresis of PI3K, p-Akt, p-NF-κB p65, Bcl-2 and Bax in liver tissues of rats in each group treated by Rhubarb Mudan Decoction

3 讨论

AP 发生时, PI3K/Akt 通路活化, 可以诱导促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β)的趋化和表达, 导致“炎症级联风暴反应”, 进一步损伤其他器官, 肝与胰腺毗邻, AP 发生时产生的炎症因子可通过局部扩散或门静脉血流进入肝直接损伤肝细胞, 使得肝损伤成为 AP 发生时重要的并发症^[12-13]。

大黄牡丹作为张仲景的经方之一, 出自《金匱要略》, 主治湿热蕴结, 气血凝滞所致肠痈。方中大黄与丹皮二者合用, 共泻肠腑湿热瘀结, 为方中君药。芒硝和桃仁俱为臣药, 其中芒硝助大黄荡涤实热, 促其速下; 桃仁破血逐瘀, 协君药以通瘀滞。冬瓜仁清理利湿, 排脓消痈, 涤荡湿热, 是为佐药。本方泻热与逐瘀并用, 使瘀结湿热速下, 痛随利减, 痈肿得消, 诸症自愈。

在 AP 炎症期间, 炎症细胞因子使 PI3K/Akt/NF- κ B 通路活化, 活化的 NF- κ B 转录因子进入细胞核, 恢复其转录激活活性。NF- κ B 的活化可以诱导促炎因子的表达, 进而趋化大量炎症细胞浸润、聚集到炎症部位, 最终导致炎症反应^[12]。

AP 在发展过程中, 炎症级联效应的爆发, 使大量炎症因子进入肝, 引起肝细胞的异常凋亡。Lapierre 等^[14]发现, AP 发生时肝细胞的异常凋亡与肝的损伤程度密切相关, 且组织损伤情况与病理改变相符合。刘宏等^[15]研究发现, AP 肝损伤大鼠肝细胞异常凋亡数量与凋亡指数呈正相关。Bcl-2 蛋白家族包括抗凋亡蛋白(Bcl-2)和促凋亡蛋白(Bax), Bax/Bcl-2 比率的升高是细胞凋亡的原因之一, 因此, 可通过降低 Bax/Bcl-2 的比率来减轻肝损伤^[16]。

本实验通过对凋亡相关蛋白(Bcl-2 和 Bax)的检测, 发现蛋白表达含量治疗前后有差异变化, 但在病理切片上并未明确改变, 以待后续进一步实验证明。

本实验结果显示, 模型组 AP 大鼠一般生存状态相对较差, 肝组织中 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65 蛋白表达显著升高, 炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平显著升高。与模型组比较, 各治疗组 AP 大鼠的一般生存状态不同程度缓解, 肝组织病理损伤不同程度修复, ELISA 结果表明 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量呈下降趋势, 肝组织中 PI3K、p-Akt、p-NF- κ B p65、Bax 蛋白表达水平均呈下降趋势, 其中大黄牡

丹汤高剂量干预效果最为显著。这可能与高剂量大黄牡丹汤有效抑制了 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的活化, 进而抑制 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的异常分泌, 减轻了由此产生的炎症风暴级联放大反应, 提高了肝的防御功能, 进而减轻了肝损伤。

参 考 文 献(References)

- [1] Horibe M, Sasaki M, Sanui M, et al. Continuous regional arterial infusion of protease inhibitors has no efficacy in the treatment of severe acute pancreatitis: a retrospective multicenter cohort study [J]. *Pancreas*, 2017, 46(4): 510-517.
- [2] Zhao G, Zhuo YZ, Cui LH, et al. Modified Da-chai-hu Decoction regulates the expression of occludin and NF- κ B to alleviate organ injury in severe acute pancreatitis rats [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(5): 355-362.
- [3] 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. The protective effect of Dahuang Mudan Decoction on acute pancreatitis in rats based on TLR4/MYD88 signaling pathway [J]. *Acta Lab Ani Sci Sin*, 2021, 29(1): 17-26.
- [4] 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 C, et al. The protective effect of RPD on acute pancreatitis in rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 28(2): 55-58.
- [5] 张延英, 汪永锋, 张艳霞, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎大鼠胰腺细胞凋亡的影响 [J]. *吉林中医药*, 2014, 34(10): 982-984.
Zhang YY, Wang YF, Zhang YX, et al. Effect of RPD on pancreatic cell apoptosis in rats with acute pancreatitis [J]. *Jilin Tradit Chin Med*, 2014, 34(10): 982-984.
- [6] 张延英, 舒畅, 蔡兴, 等. 大黄牡丹汤组方对急性胰腺炎模型大鼠炎症反应及氧化应激水平的影响 [J]. *实验动物科学*, 2014, 31(5): 24-27.
Zhang YY, Shu C, Cai X, et al. Effect of RPD on inflammatory response and oxidative stress in acute pancreatitis model rats [J]. *Lab Anim Sci*, 2014, 31(5): 24-27.
- [7] 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 metabolomics 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- Yuan L, Zhou BT, Wang XS, et al. A comparative study of three severe pancreatitis models in rats of different severity [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(5): 20-23.
- [10] 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.
- [11] Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, et al. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent [J]. Hepatology, 1997, 26(6): 1513-1520.
- [12] Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 86.
- [13] Zhang H, Shan Y, Wu Y, et al. Berberine suppresses LPS-induced inflammation through modulating Sirt1/NF- κ B signaling pathway in RAW264.7 [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 93-100.
- [14] Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis [J]. Transl Res, 2007, 149(3): 107-113.
- [15] 刘宏, 邓明明. 重症胰腺炎肝细胞凋亡的机制及展望 [J]. 重庆医学, 2010, 39(9): 1153-1155.
- Liu H, Deng MM. The mechanism and prospect of hepatocyte apoptosis in severe pancreatitis [J]. Chongqing Med, 2010, 39(9): 1153-1155.
- [16] Aamazadeh F, Ostadrahimi A, Rahbar SY, et al. Bitterapricot ethanolic extract induces apoptosis through increasing expression of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 in PANC-1 pancreatic cancer cells [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(13): 1895-1904.

[收稿日期] 2021-09-03