

- [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(50): 9433-9436.
- [6] 张子怡, 陈宝军, 张英杰, 等. 肾阳虚、肾阴虚证大鼠模型的建立与稳定性观察[J]. 福建中医药, 2015, 46(1): 51-54.
- [7] 张景岳. 景岳全书[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011.
- [8] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [9] 吕景芳. “双固一通”电针法对老年阳虚证模型大鼠肝脏能量代谢的影响[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.
- [10] 邱 林. 基于“线粒体能量代谢”探讨肾气丸“少火生气”配伍机理[D]. 武汉: 湖南中医药大学, 2018.
- [11] 陈志敏, 胡昌江, 潘 新, 等. 补骨脂和肉豆蔻炮制对脾肾阳虚泄泻大鼠能量代谢的影响[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1298-1301.
- [12] 粟介耀. 三大营养物质的代谢关系分析[J]. 农家参谋, 2017(13): 169.
- [13] 马春媚. 一氧化氮对桃果实三羧酸循环相关酶活性及蛋白质结构的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [14] 胡 齐, 宋雅芳, 孙 莹. 中医“脾主肌肉”与线粒体生物合成中能量代谢的相关性探讨[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 1018-1020.
- [15] 焦俊霞, 高维娟, 钱 涛, 等. 黄芪有效成分对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 *cyt-c*、CCO 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 211-215.
- [16] 冀晓敏, 王秀娟, 王 蕾. “阴中求阳”理论源流及现代研究[J]. 中医药信息, 2014, 31(5): 44-46.
- [17] 赵丽颖, 夏 天, 宋文嘉. 右归丸的现代研究进展[J]. 吉林中医药, 2012, 32(4): 425-427.
- [18] 秦 臻, 任艳玲. 基于“阳为气、阴为味”探讨左归丸、右归丸的组方特点[J]. 中医杂志, 2017, 58(7): 545-547; 551.

清胰Ⅱ号颗粒对急性胰腺炎小鼠的作用及其机制

杨晓燕^{1,3}, 雷 蕾², 杜艺玫^{1,3,4}, 秦 琳^{1,3,4}, 张倩茹^{1,3,4}, 何芋岐^{1,4}, 郑传痴^{5*}, 周旭美^{1*}

(1. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563003; 2. 遵义医科大学附属医院, 贵州 遵义 563003; 3. 遵义医科大学药学院药学实验室, 贵州 遵义 563003; 4. 遵义医科大学教育部药理重点实验室, 贵州 遵义 563003; 5. 遵义医科大学第二附属医院药剂科, 贵州 遵义 563003)

摘要: **目的** 探讨清胰Ⅱ号颗粒对急性胰腺炎小鼠的作用及其机制。**方法** 采用无胆碱乙酰硫氨酸饲料诱导小鼠急性胰腺炎模型, 检测血清淀粉酶水平, 观察胰腺组织病理损伤情况, 采用 qRT-PCR 检测胆汁酸通路关键蛋白编码基因表达, 并对其进行聚类分析、主成分分析。**结果** 与模型组比较, 清胰Ⅱ号颗粒不同剂量组小鼠血清淀粉酶水平降低, 的胰腺组织病理形态改善, 并呈剂量依赖性, 同时可显著下调 *Mapk1*、*Slco1a1* 基因表达。**结论** 清胰Ⅱ号颗粒对急性胰腺炎小鼠的作用机制可能与改善胆汁酸代谢有关。

关键词: 清胰Ⅱ号颗粒; 急性胰腺炎; 血清淀粉酶; 胆汁酸; 胆固醇

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0951-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.049

清胰Ⅱ号颗粒临床上用于治疗急性胰腺炎或重症急性胰腺炎。该方以大黄为君药, 配伍栀子、延胡索、木香、赤芍等药材, 具有利胆退黄、清热解毒、活血化瘀等功效^[1-2]。清胰Ⅱ号颗粒在保护胰腺细胞、保护肠黏膜、调节炎症因子等方面具有显著活性^[3-4]。为方便给药并提高患者依从性, 清胰Ⅱ号颗粒已被开发成为复方颗粒制剂。

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是一种由多病因

诱导的胰腺局部及全身炎症性疾病, 病死率较高、并发症较多, 是消化系统危急重症之一^[5]。AP 发病机制较为复杂, 主要有胰酶自身消化、炎症因子、胆源性胰腺炎等^[6], 但机制尚不明确。胆汁淤积倒流引起的胰蛋白酶对胰腺组织的自身消化与 AP 发病直接相关^[7-8]。胆汁酸是胆汁的重要组成部分, 在 AP 发病过程中起到重要作用。法尼醇受体 (Farnesoid X receptor, FXR) 是胆汁酸代谢通路的关键酶,

收稿日期: 2020-08-04

基金项目: 上海市复方中药重点实验室开放基金资助项目 (2014OP01); 贵州省科学基金 (黔科 LH [2015] 7484)

作者简介: 杨晓燕 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为临床药学。E-mail: yxyang-ibs@qq.com

* 通信作者: 郑传痴 (1976—), 副主任药师。E-mail: chuanchi-zheng@163.com

周旭美 (1962—), 教授, 研究方向为药物分析。Tel: (0852) 8609343, E-mail: zmzxzm@163.com

可调节胆汁酸代谢通路上 OATP、OST α/β 、NTCP 等代谢酶的表达进而控制胆固醇代谢成为胆汁酸^[9-10], 维持胆汁酸稳态。研究表明, 清胰Ⅱ号颗粒对急性胰腺炎的治疗作用与调节胆汁酸代谢、调节胆汁酸平衡有关。研究清胰Ⅱ号颗粒对 FXR 介导的胆汁酸代谢通路的影响, 分析关键的调控靶点。

1 材料

1.1 动物 雌性 KM 昆明种小鼠, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 由第三军医大学大坪医学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK 渝 2012-0005, 实验前适应性喂养 1 周。

1.2 试剂与药物 大黄 (批号 150323)、栀子 (批号 150327)、延胡索 (批号 150323)、木香 (批号 150323)、赤芍 (批号 150327)、牡丹皮 (批号 150323)、厚朴 (批号 150323)、芒硝 (批号 150203) 由遵义医科大学附属医院中药房提供, 经遵义医科大学附属医院杨建文教授鉴定为正品。清胰Ⅱ号颗粒根据文献 [11] 报道的工艺制备。胆碱乙硫氨酸饲料 (江苏协同饲料有限公司)。醋酸奥曲肽注射液 (北京诺华制药有限公司)。引物 (上海捷瑞生物工程有限公司); Trizol (北京索莱宝科技有限公司); SYBR green (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 仪器 AU5800 全自动生化分析仪 (美国贝克曼库尔特公司); Thermo 微量分光光度计 (美国 Thermo 公司); 逆转录仪、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 模型建立 40 只小鼠分为 4 批, 每批 10 只, 分别给予无胆碱乙硫氨酸 (CDE) 饲料 1、2、3、4 d, 眼眶取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清, 检测血清淀粉酶水平, 根据其变化及小鼠死亡率来对造模时间进行筛选。

2.2 分组与给药 105 只小鼠随机分为正常组, 模型组, 清胰Ⅱ号颗粒低、中、高剂量组, 阳性对照组, 阴性对照组, 每组 15 只, 除正常组外, 其余各组小鼠按“2.1”项下方法造模, 然后模型组立即处死。清胰Ⅱ号颗粒低、中、高剂量组, 阳性对照组, 阴性对照组立即停止饲喂 CDE 饲料, 改为普通饲料。根据临床治疗时间, 清胰Ⅱ号颗粒低、中、高剂量组分别按 3.9、7.8、15.6 g/kg 剂量给药 3 d, 阳性对照组给予醋酸奥曲肽 (20 μ g/kg) 3 d, 正常组、阴性对照组给予等体积生理盐水 3 d, 并且阴性对照组不给予药物治疗, 用于观察急性胰腺炎发展。给药 3 d 后, 检测小鼠血清淀粉酶水平, 10% 甲醛固定胰腺, HE 染色观察其病理变化, 肝脏在 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻保存。

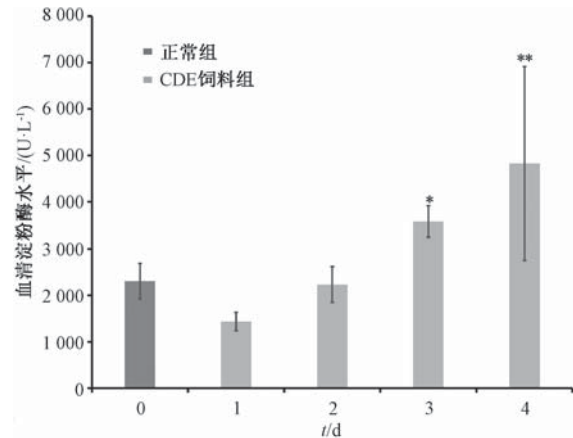
2.3 qRT-PCR 检测胆汁酸通路关键蛋白编码基因 mRNA 表达 取小鼠肝脏组织 10~30 mg, Trizol 法提取总 RNA, 取 2 μ L, 采用超微量分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值及 RNA 浓度, 逆转录为 cDNA。以 Gapdh 为内参, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 复性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 循环 39 次, 55 $^{\circ}$ C 延伸 5 s, 读取样本 C_t 值, 计算基因相对表达。

2.4 数据分析 通过 SPSS 11.5 软件进行统计学处理, 计

量资料均以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 2 组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。采用 R 包 gplots 中的 heatmap_2 函数对基因表达数据进行聚类分析, mixOmics 工具包中的 PCA 函数进行主成分分析。

3 结果

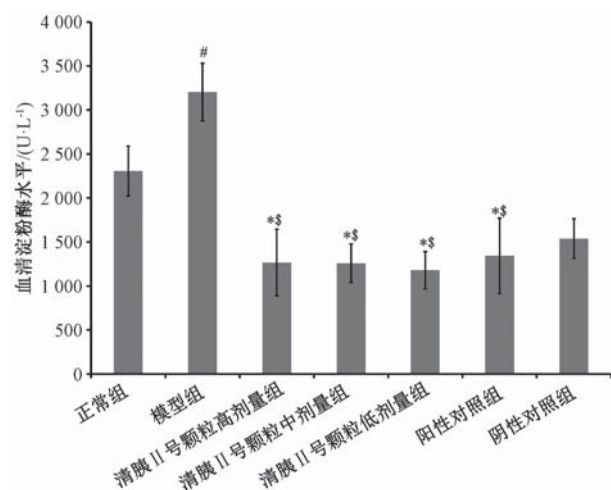
3.1 造模时间 图 1 显示, 给予 CDE 饲料后, 模型组小鼠血清淀粉酶水平持续升高, 3 d 后更明显 (*P*<0.05, *P*<0.05), 表明造模成功, 但继续饲喂会导致小鼠大量死亡, 故确定造模时间为 3 d。



注: 与正常组比较, **P*<0.05, ***P*<0.01。

图 1 造模时间对小鼠血清淀粉酶水平的影响

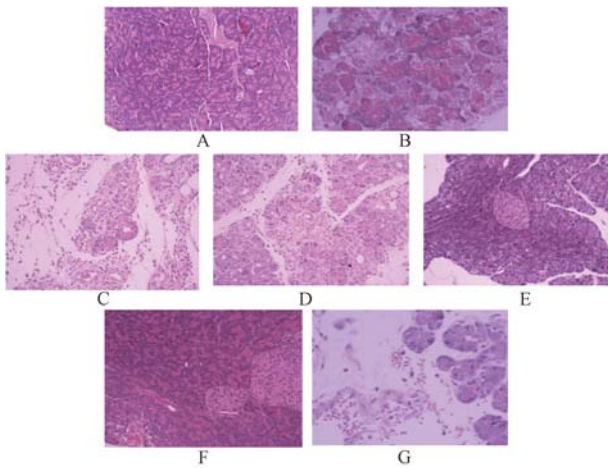
3.2 清胰Ⅱ号颗粒对小鼠血清淀粉酶水平的影响 图 2 显示, 与模型组、阴性对照组比较, 清胰Ⅱ号颗粒高、中、低剂量组小鼠血清淀粉酶水平降低 (*P*<0.05), 但无明显量效关系。



注: 与正常组比较, #*P*<0.05; 与模型组比较, **P*<0.05; 与阴性对照组比较, \$*P*<0.05。

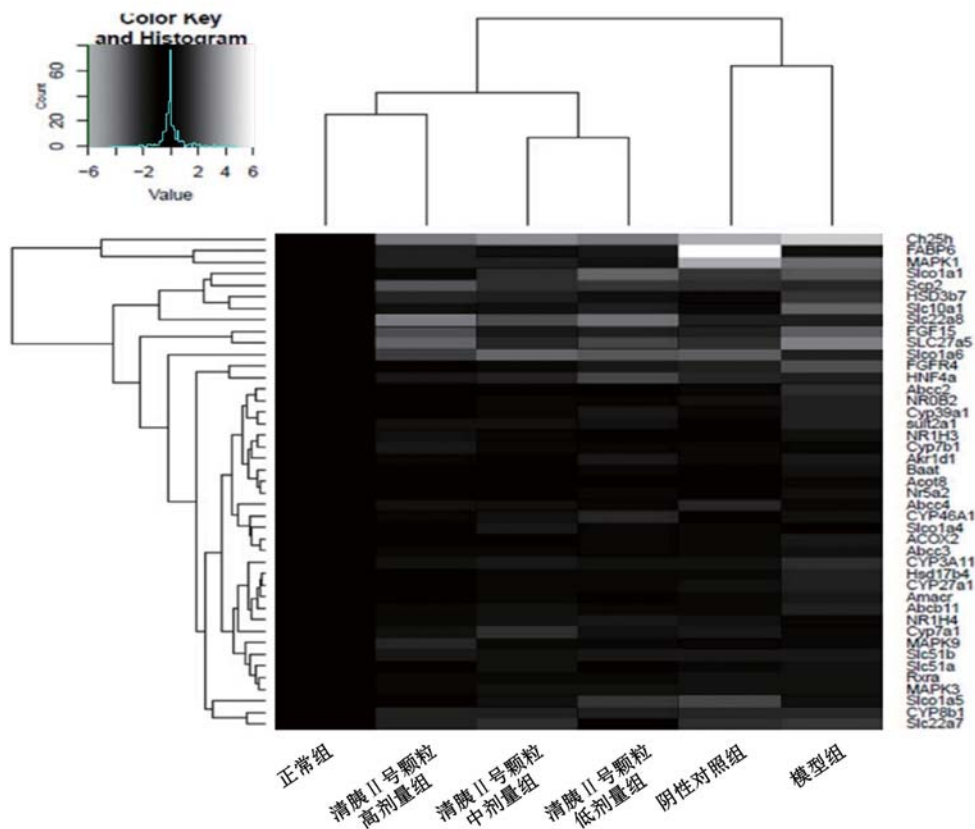
图 2 清胰Ⅱ号颗粒对小鼠血清淀粉酶水平的影响

3.3 小鼠胰腺组织病理变化 图 3 显示, 正常组小鼠未见胰腺肿大、变硬、充血、炎细胞浸润等胰腺炎症状; 模型组小鼠胰腺组织出现大片凝固性坏死、细胞结构不清、出



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为清胰 II 号颗粒低剂量组 (3.9 g/kg), D 为清胰 II 号颗粒中剂量组 (7.8 g/kg), E 为清胰 II 号颗粒高剂量组 (15.6 g/kg), F 为阳性对照组, G 为阴性对照组。

图 3 各组小鼠胰腺组织病理变化



注: 白色表示上调, 灰色表示下调, 黑色代表无明显变化。

图 4 清胰 II 号颗粒对小鼠胆汁酸通路基因表达调控的聚类分析图

预后, 对上述变化均表现出一定回调, 并且与正常组在得分图上重合。图 5B 显示, *Mapk1* 对组间区分贡献最大, 即为受清胰 II 号颗粒复方颗粒影响最明显的基因。另外, 虽然 *Slco1a1* 在聚类分析中表现出较大变化, 但主成分分析表明它对组间区分的贡献明显弱于 *Mapk1*。

血及炎细胞浸润; 清胰 II 号颗粒低、中剂量组小鼠可见少量炎细胞浸润和肉芽组织增生, 而高剂量组小鼠胰腺组织水肿减轻, 出血明显改善, 炎细胞浸润不显著; 阳性对照组小鼠炎症、出血等症状得以改善; 阴性对照组小鼠可见明显出血、炎细胞浸润, 细胞轮廓不清晰等病理变化。

3.4 聚类分析 采用 RT-PCR 测定胆汁酸通路上 46 个关键蛋白编码基因 mRNA 表达, 并对其进行聚类分析, 结果见图 4, 可知清胰 II 号颗粒高剂量组与正常组聚为一类, 清胰 II 号颗粒中、低剂量组聚为一类并与清胰 II 号颗粒高剂量组、正常组共聚为一类, 阴性对照组与模型组聚为一类。由此表明, 小鼠给予高剂量清胰 II 号颗粒后, 其胆汁酸通路整体基因轮廓可回调至近正常状态, 而中、低剂量组作用不显著; 与模型组比较, 阴性对照组小鼠胆汁酸通路基因轮廓未明显改善。

3.5 主成分分析 图 5A 显示, 阴性对照组与正常组在图上分布于不同的象限, 表明急性胰腺炎小鼠在胆汁酸代谢通路的基因调控上有显著变化; 不同剂量清胰 II 号颗粒干

3.6 基因表达分析 图 6 显示, *Mapk1*、*Slco1a1* 基因表达调控与清胰 II 号颗粒疗效呈正相关, 前者在模型组中显著上调, 在阴性对照组中无回调, 而在清胰 II 号颗粒高、中、低剂量组中显著下调; 后者在模型组、阴性对照组中显著上调, 在清胰 II 号颗粒高剂量组中显著下调。由此表明,

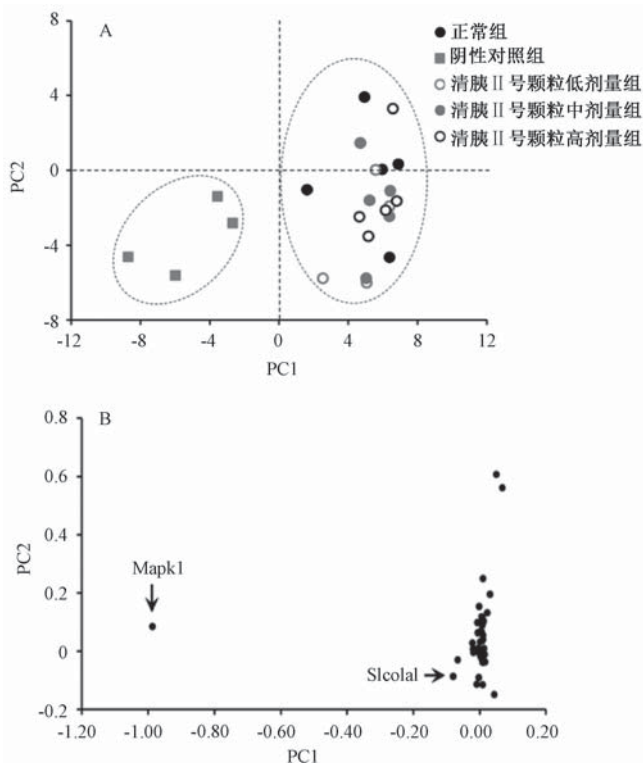


图5 清胰Ⅱ号颗粒对小鼠胆汁酸通路基因表达调控的主成分分析图

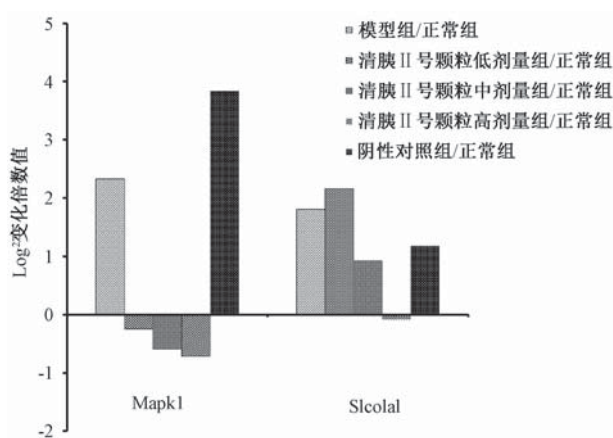


图6 清胰Ⅱ号颗粒对 *Mapk1*、*Slco1a1* 基因表达的调控作用

Mapk1、*Slco1a1* 可能是胰腺炎发病及治疗的关键靶点基因。

4 讨论

本实验采用 CDE 饲料诱导小鼠急性胰腺炎, 给予不同剂量的清胰Ⅱ号颗粒, 通过测定血清淀粉酶并结合病理观察。结果发现, 清胰Ⅱ号颗粒可显著改善胰腺病理情况、降低血清淀粉酶、改善胰腺出血、减少单核细胞等炎性细胞渗出。

胰腺炎患者胰腺组织广泛坏死, 其血清淀粉酶水平可能与正常水平持平甚至更低, 检测结果易受其他因素影响而出现误差^[12]。当急性胰腺炎发病后, 血清淀粉酶可上升, 但在 3 d 后血清淀粉酶的水平也会逐渐降低^[13], 本实验表现出相应的趋势, 阴性对照组的 AMS 低于正常组。因

此, 为避免实验误差, 采用 AMS、病理切片对清胰Ⅱ号颗粒的药理作用进行综合评价。

胆汁的分泌、吸收、代谢受到疾病因素、不良饮食习惯等影响^[14], 胆道中的胆汁酸和胆固醇严重失衡, 造成胆固醇在胆管沉积形成结石^[15]而滞留于胆道系统。持续的胆结石累积或胆结石摩擦导致胰胆管共同解剖通路堵塞, 胆汁及胰液流入十二指肠的过程受阻^[7]。胆汁酸等消化液回流回胰腺, 激活的胰酶原对胰腺自身组织结构进行消化, 从而导致胰腺炎的发生^[8]。清胰Ⅱ号颗粒给药之后, 小鼠胆汁酸通路的 *Mapk1* 和 *Slco1a1* 显著下调。

Mapk1 是一组能被内源性物质激活的蛋白激酶, 是细胞内重要的信号传导系统。在胆汁酸代谢通路 (图 7) 中, *Mapk1* 信号通路是通过肠道调节肝脏胆汁酸合成与转运的重要途径, 在胰腺炎中起到重要的作用^[16]。肝脏合成的胆汁酸会通过转运蛋白转运至胆管, 通过胆管进入小肠, 在小肠内激活肠道 FXR, 肠道 FXR 上调肠上皮成纤维细胞因子 (Fibroblast growth factors, FGF15) 的表达^[17], 而后者会随着门静脉血流进入肝脏并转运至肝细胞内诱导 *Mapk1* 表达进而抑制 *Cyp7a1* 和 *Cyp8b1* 的表达^[18], 抑制胆固醇代谢为胆汁酸。*Slco1a1* 是动物及人体内重要的膜转运蛋白, 介导了胆汁酸的细胞转运^[19], 胆汁酸是 OATP1 的配体, FXR 可以抑制 OATP1 表达减少胆汁酸的吸收^[20]。

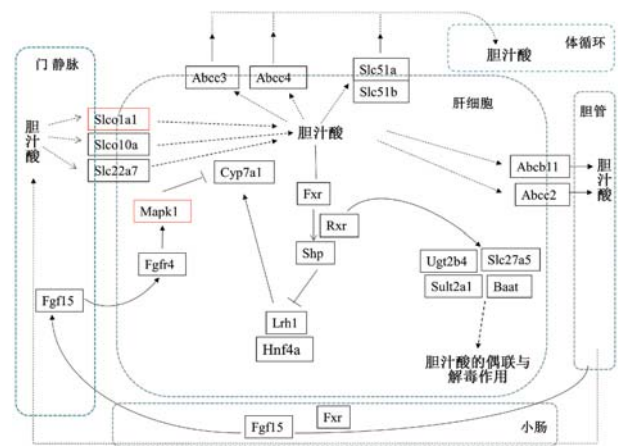


图7 胆汁酸通路的肝肠循环 (KEGG map04976)

基于胰腺炎与胆汁酸通路的关系探讨清胰Ⅱ号颗粒的作用机制, 发现清胰Ⅱ号颗粒能显著下调 *Mapk1* 并上调 *Cyp7a1* 和 *Cyp8b1*, 促进胆固醇分解代谢为胆汁酸, 同时下调 *Slco1a1*, 减少胆汁酸的吸收, 使胆汁酸通路恢复平衡, 避免胆结石的形成堵塞胰胆管, 最终改善胰腺炎症状。

清胰Ⅱ号颗粒高剂量给药时可明显减轻胰腺炎的症状, 可能通过调节肝脏和血液循环之间的胆汁酸转运而实现^[21]。但长期、大剂量的使用可能会对机体造成损害, 易导致消化道不良反应^[22]。长期毒性实验表明清胰Ⅱ号颗粒无消化道的功能性损害, 说明该制剂具有安全性^[23]。

综上所述, 清胰Ⅱ号颗粒治疗急性胰腺炎的潜在机制可能是通过调控胆汁酸通路来调节胆固醇代谢以及胆汁酸

转运,促使胆汁酸通路恢复平衡。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 傅兴圣, 陈 菲, 刘训红, 等. 大黄化学成分与药理作用研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(16): 1534-1538; 1568.
- [3] 兑丹华, 舒 涛, 余德刚. 清胰 II 号治疗急性胰腺炎疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2002, 11(5): 399-400.
- [4] 庄宝雄, 谢义明, 张阳德, 等. 清胰 II 号对急性胰腺炎炎症因子调节作用的临床研究[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(3): 205-208.
- [5] 赵先林, 朱世峰, 康鸿鑫, 等. 急性胰腺炎与表观遗传调控机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(1): 227-230.
- [6] Lee P J, Papachristou G I. New insights into acute pancreatitis [J]. *Nature reviews Gastroenterology&hepatology*, 2019, 16(8): 1.
- [7] 武 亮, 艾迎春. 急性胰腺炎相关发病机制及病因的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2019, 40(5): 618-620.
- [8] 王培环. 急性胰腺炎 351 例病因分析[D]. 福州: 福建医科大学, 2012.
- [9] Ding L, Yang L, Wang Z T, et al. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases[J]. *Acta Pharm Sinica. B*, 2015, 5(2): 135-144.
- [10] Cui J Y, Aleksunes L M, Tanaka Y, et al. Bile acids via FXR initiate the expression of major transporters involved in the enterohepatic circulation of bile acids in newborn mice [J]. *Americal Journal of Physiology*, 2012, 302(9): 979-996.
- [11] 姚晓东, 周旭美, 张倩茹, 等. 清胰利胆口服液质量标准研究[J]. 遵义医学院学报, 2011, 34(6): 580-582.
- [12] 李孝才. 急性胰腺炎早期诊断中联合检验血清淀粉酶、脂肪酶与 C 反应蛋白的临床价值[J]. 现代消化及介入诊疗, 2016, 21(3): 458-460.
- [13] 杜奕奇, 陈其奎, 李宏宇, 等. 中国急性胰腺炎诊治指南 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2706-2711.
- [14] 康瑞光, 张毓娟. 内镜微创治疗胆结石的临床研究进展 [J]. 中国校医, 2019, 33(7): 548-550.
- [15] 朱正春. 胆结石的形成原因[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(68): 188.
- [16] Dygai A M, Zhdanov V V, Zyuz' kov G N, et al. Role of NF- κ B-Dependent Signaling and p38 MAPK Signaling Pathway in the Control of Hemopoiesis during Cytostatic Administration[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, 157(1): 32-36.
- [17] Stroeve J H, Brufau G, Stehaard F, et al. Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice[J]. *Laboratory Investigation*, 2010, 90(10): 1457-1467.
- [18] Kong B, Wang L, Chiang John Y L, et al. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1034-1043.
- [19] Konig J, Seithel A, Gradhand U, et al. Pharmacogenomics of human OATP transporters [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006, 372(6): 432-443.
- [20] Maeda T, Miyata M, Yotsumoto T, et al. Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice[J]. *Mol Pharm*, 2004, 1(4): 281-289.
- [21] 周小爽, 欧水平. 清胰 II 号临床与实验研究现状分析[J]. 遵义医学院学报, 2017, 40(5): 579-582.
- [22] 张新立. 浅议中药大黄的临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2012, 31(9): 68.
- [23] 雷 蕾, 茆芮婕, 汪 巍, 等. 清胰复方制剂对大鼠的长期毒性研究[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(1): 11-13.