

小白菊内酯对急性胰腺炎大鼠全身炎症及肠道损伤的影响^Δ

赵亚男^{1*}, 张蕊², 王淑玲³, 杨春春¹, 王杨³, 杨明月^{1#} (1. 河北医科大学第一医院胃肠病诊疗二科, 石家庄 050023; 2. 河北医科大学第一医院胃肠病诊疗四科, 石家庄 050023; 3. 河北医科大学第一医院胃肠病诊疗三科, 石家庄 050023)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)06-0704-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.06.11



摘要 目的 探讨小白菊内酯(PLT)调节Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)/核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)/血红素加氧酶1(HO-1)信号通路对急性胰腺炎(AP)大鼠全身炎症及肠道损伤的影响。方法 以胆胰管内注射3.5%牛磺胆酸钠溶液(1 mL/kg)的方式建立AP大鼠模型,并将造模成功的大鼠分为AP组、PLT(300 μg/kg)组、地塞米松(2 mg/kg)组、抑制剂(11 mg/kg Nrf2抑制剂ML385)组、PLT+抑制剂组(300 μg/kg PLT+11 mg/kg ML385),每组10只;另取10只大鼠作为假手术组。各组大鼠尾静脉/腹腔注射相应药液和(或)生理盐水1次。24 h后,检测其血清脂肪酶、淀粉酶、氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)]及炎症因子[白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6和肿瘤坏死因子α(TNF-α)]水平;观察其结肠黏膜、胰腺组织病理学变化,并进行Chiu、Schmidt评分,检测其结肠黏膜组织细胞凋亡情况及Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达情况。结果 与假手术组比较,AP组大鼠结肠黏膜、胰腺组织炎症细胞浸润明显,可见细胞脱落或组织坏死且出血严重;血清中脂肪酶、淀粉酶、MDA、IL-1β、IL-6、TNF-α水平,Chiu、Schmidt评分,以及结肠黏膜组织的细胞凋亡率和Keap1蛋白的表达均显著升高或上调,血清SOD水平和结肠黏膜组织中Nrf2、HO-1蛋白的表达均显著降低或下调($P<0.05$)。与AP组比较,PLT组、地塞米松组大鼠上述指标均显著改善,抑制剂组则进一步恶化($P<0.05$);抑制剂可显著逆转PLT对AP大鼠上述指标的改善作用($P<0.05$)。结论 PLT抑制了AP大鼠的炎症反应及氧化应激,减轻了肠道损伤,其机制可能与抑制Keap1蛋白的表达、激活Nrf2/HO-1信号通路有关。

关键词 小白菊内酯;急性胰腺炎;炎症;肠道损伤;Keap1/Nrf2/HO-1信号通路

Effects of parthenolide on systemic inflammation and intestinal injury in rats with acute pancreatitis

ZHAO Yanan¹, ZHANG Rui², WANG Shuling³, YANG Chunchun¹, WANG Yang³, YANG Mingyue¹ (1. Dept. Two of Gastroenterology Diagnosis and Treatment, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050023, China; 2. Dept. Four of Gastroenterology Diagnosis and Treatment, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050023, China; 3. Dept. Three of Gastroenterology Diagnosis and Treatment, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of parthenolide (PLT) on systemic inflammation and intestinal injury in rats with acute pancreatitis (AP) by regulating the Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor-erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **METHODS** AP rat model was established by injecting 3.5% sodium taurine cholate solution (1 mL/kg) into the biliary pancreatic duct, and modeled rats were divided into AP group, PLT (300 μg/kg) group, dexamethasone (2 mg/kg) group, inhibitor (11 mg/kg Nrf2 inhibitor ML385) group, and PLT+inhibitor group (300 μg/kg PLT+11 mg/kg ML385), with 10 rats in each group. Another 10 rats were taken as a sham operation group. Each group was given relevant medicine or normal saline via tail vein/intraperitoneal injection once. After 24 h, serum lipase and amylase levels, the levels of oxidative stress index [superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA)] and inflammatory factors [interleukin-1β (IL-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α (TNF-α)] were detected. The histopathological changes in colon mucosa and pancreas were observed, and Chiu and Schmidt scores were performed. The cell apoptosis in colon mucosa and the protein expressions of Keap1, Nrf2 and HO-1 were detected. **RESULTS** Compared with the sham operation group, there was obvious inflammatory cell infiltration in colon mucosa and pancreatic tissue, cell shedding or tissue necrosis and severe bleeding; serum levels of lipase, amylase, MDA, IL-1β, IL-6 and TNF-α, Chiu and Schmidt scores, apoptotic rate and protein expression of Keap1 in colonic mucosa were significantly increased or up-regulated, while SOD level and protein expressions of Nrf2 and HO-1 were decreased or down-regulated significantly ($P<0.05$). Compared with the AP group, the above indexes in the PLT group and dexamethasone group were significantly improved, while those in the inhibitor group further

^Δ 基金项目 河北省卫生健康委医学科学研究课题计划项目 (No. 2023030993)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 急性胰腺炎的诊治。E-mail: 19933039126@126.com

通信作者 主治医师, 博士。研究方向: 急性胰腺炎的诊治。E-mail: 237997551@qq.com

deteriorated ($P<0.05$). Inhibitor could significantly reverse the improvement effect of PLT on the above indexes in AP rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** PLT inhibits inflammation and oxidative stress in AP rats, alleviates intestinal damage, and its mechanism may be related to inhibiting protein expression of Keap1 and activating Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS parthenolide; acute pancreatitis; inflammation; intestinal injury; Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种严重影响患者健康的腹部急性病症,极易引起全身炎症、多器官衰竭甚至死亡,约20%的患者可能进展为重症AP^[1-2]。尽管近年来AP的诊治取得了很大进展,但仍然缺乏有效的治疗药物^[3];同时,AP进展会导致炎症指标和细胞因子的过度释放,从而增加肠道通透性、诱发细菌感染、损伤肠道屏障,因此改善AP致肠道损伤、研发相应治疗药物已成为学界的研究重点之一。

小白菊内酯(parthenolide, PLT)是一种天然的倍半萜内酯类成分,具有抗炎、抗凋亡和抗氧化等多种有益作用,可通过抑制炎症小体激活、减少炎症细胞浸润等途径来发挥抗AP作用^[4-5]。但AP的发病机制较为复杂,促炎细胞因子过度释放、氧化应激、自噬等均与该疾病的发生发展有关^[6]。核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是氧化应激反应的核心,可通过Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1, Keap1)介导的泛素-蛋白酶体降解途径来与抗氧化反应元件结合,调节血红素加氧酶1(heme oxygenase-1, HO-1)等抗氧化酶的表达,从而参与维持机体抗氧化与氧化的动态平衡^[7]。已有研究表明,Keap1/Nrf2/HO-1信号通路是氧化应激的关键通路,调节该通路可抑制氧化应激,从而减轻AP损伤^[8],但PLT能否通过该通路发挥抗AP作用尚不清楚。基于此,本研究通过建立AP大鼠模型,初步探讨了PLT对AP大鼠全身炎症和肠道损伤的改善作用及潜在机制,旨在为PLT用于治疗AP提供理论参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AU600型全自动生化分析仪、BX53型光学显微镜(日本Olympus公司), Multi-skan GO型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司), SN-188型凝胶成像分析仪(深圳市三莉科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

PLT对照品(纯度 $\geq 98\%$, 货号WKQ-0000599)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(货号A003-2)均购自南京建成生物工程研究所;地塞米松原料药(纯度99.99%, 货号AH07753)购自美国Sigma公司;Nrf2抑制剂ML385的对照品(纯度 $\geq 98\%$, 货号HY-B0094)购自美国MedChemExpress公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(货号BC0170)购自北京索宝莱科技有限公司;牛磺胆酸钠(货号C0905)购自上海

赢瑞生物医药科技有限公司;兔抗Keap1、Nrf2、HO-1、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号分别为ab119403、ab313825、ab189491、ab8227)和白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号分别为ab100704、ab100713、ab100747)均购自英国Abcam公司;TUNEL染色试剂盒(货号A112)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号GB23303)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为7周龄的SPF级雄性SD大鼠,共60只,体重(210 ± 20)g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,生产许可证号为SCXK(吉)2020-0002。所有大鼠均饲养于温度22℃、相对湿度55%、每12h光/暗循环的实验房内,适应性喂养1周后进行后续实验。本研究方案已获得河北医科大学第一医院伦理委员会的批准(批准号20220579),实验操作严格遵循3R原则。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

取大鼠50只,适应性喂养结束后,禁食12h,在无菌条件下腹腔注射戊巴比妥钠35 mg/kg麻醉,剖开腹部,以动脉夹夹闭肝门附近的胆道胰管,于壶腹部穿刺胰胆管,将3.5%牛磺胆酸钠溶液(以生理盐水为溶剂)以1 mL/kg的剂量按0.1 mL/min的速度缓慢注射到胆胰管内,以复制AP模型(以注射5 min后胰腺水肿、出血、坏死为造模成功),随后取下动脉夹并缝合伤口^[9]。所有大鼠均造模成功,将其随机分为AP组、PLT组、地塞米松组、抑制剂组、PLT+抑制剂组,每组10只;取剩余10只大鼠,以生理盐水替代牛磺胆酸钠溶液,其余操作同前,作为假手术组。PLT组大鼠以300 μ g/kg的剂量腹腔注射PLT(以生理盐水为溶剂),并尾静脉注射等体积的生理盐水^[10];地塞米松组大鼠以2 mg/kg的剂量腹腔注射地塞米松(以生理盐水为溶剂),并尾静脉注射等体积的生理盐水^[11];抑制剂组大鼠以11 mg/kg的剂量尾静脉注射ML385(以生理盐水为溶剂),并腹腔注射等体积的生理盐水^[12];PLT+抑制剂组大鼠以300 μ g/kg的剂量腹腔注射PLT,同时以11 mg/kg的剂量尾静脉注射ML385;假手术组和AP组大鼠同时腹腔注射、尾静脉注射等体积生理盐水;各组大鼠均腹腔/尾静脉注射相应药液和(或)生理盐水1次^[9-10],24 h后进行相关指标检测。

2.2 大鼠血清中脂肪酶、淀粉酶水平检测

予各组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,以颈椎脱位法处死,于腹主动脉取血,血样以3 000 r/min离心15 min,分离上层血清,以全自动生化仪检测其脂肪酶、淀粉酶水平。

2.3 大鼠血清氧化应激指标及炎症因子水平检测

取“2.2”项下各组大鼠血清样品,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪检测其血清氧化应激指标(MDA、SOD)及炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)水平。

2.4 大鼠结肠黏膜组织、胰腺组织病理学变化观察

取血后,分离各组大鼠结肠黏膜、胰腺组织。取适量,用4%多聚甲醛溶液固定后,行乙醇梯度脱水、石蜡包埋、切片(厚约5 μ m)。取部分切片,依次进行苏木精、伊红染色,经乙醇梯度脱水、二甲苯浸泡后,以中性树脂封片,使用光学显微镜观察上述组织的病理学变化。采用Chiu评分对结肠组织的黏膜绒毛、毛细血管扩张、炎症浸润及组织出血进行0~5分的评分(总分为5分,与黏膜损伤程度成正比),具体标准为:无损伤,记0分;组织出现间隙,记1分;组织间隙增加,且肠黏膜与黏膜下层分离,记2分;肠黏膜与黏膜下层进一步分离,肠绒毛两侧可见大量上皮隆起,记3分;大量炎症细胞浸润,血管暴露,且绒毛变钝,记4分;组织形成溃疡,并伴有出血,记5分^[13]。采用Schmidt法对胰腺组织的腺泡坏死、出血、炎症及水肿程度分别进行0~4分的评分(总分为16分,分值越高胰腺损伤越严重),具体标准见表1^[14]。

表1 Schmidt法评分标准

分值	腺泡坏死	出血	炎症	水肿
0	无坏死	无出血	无炎症细胞浸润	无水肿
1	坏死面积1%~10%	实质性出血面积 $\leq$ 25%	高倍视野内白细胞有2~10个	区域性水肿
2	坏死面积>10%~20%	出血面积>25%~50%	高倍视野内白细胞有11~20个	弥散性水肿
3	坏死面积>20%~30%	出血面积>50%~75%	高倍视野内白细胞有21~30个	可见小间隙增加
4	坏死面积>30%	出血面积>75%	高倍视野内白细胞>30个	可见小叶分离

2.5 大鼠结肠黏膜组织细胞凋亡情况观察

取“2.4”项下各组大鼠的剩余结肠黏膜组织切片,脱蜡后,于37 $^{\circ}$ C下以蛋白酶K溶液处理,加入TUNEL反应试剂于37 $^{\circ}$ C下孵育,用磷酸盐缓冲溶液洗涤后,用4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液于室温下复染细胞核,使用显微镜观察细胞凋亡(凋亡细胞呈棕色)情况,并以凋亡细胞/总细胞 $\times$ 100%计算凋亡率。

2.6 大鼠结肠黏膜组织中通路相关蛋白表达检测

取“2.4”项下各组大鼠的结肠黏膜组织适量,提取总蛋白,以BCA法测定浓度后于100 $^{\circ}$ C下煮沸5 min使变性。取变性蛋白适量,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳并转膜,以封闭缓冲液封闭2 h;洗膜后,加入Keap1、Nrf2、HO-1、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:500、1:1 000、1:1 000),于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:2 000),于室温下孵育2 h;以ECL试剂显色后,置于凝胶成像系统下成像。

以 β -actin为内参,采用Image J软件分析各目的蛋白的条带灰度值,用各目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度比值表示目的蛋白的表达水平。

2.7 统计学方法

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析进行多组间比较,以SNK- q 检验进行进一步的两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 PLT对大鼠血清中脂肪酶、淀粉酶水平的影响

AP组大鼠血清中脂肪酶、淀粉酶水平均较假手术组显著升高($P<0.05$);PLT组、地塞米松组大鼠血清中脂肪酶、淀粉酶水平均较AP组显著降低,而抑制剂组上述指标则较AP组显著升高($P<0.05$);PLT+抑制剂组大鼠脂肪酶、淀粉酶水平较PLT组显著升高,但较抑制剂组显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠血清中脂肪酶、淀粉酶水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$, kU/L)

组别	淀粉酶	脂肪酶	组别	淀粉酶	脂肪酶
假手术组	1.42 $\pm$ 0.15	0.42 $\pm$ 0.05	地塞米松组	2.81 $\pm$ 0.30 ^b	0.94 $\pm$ 0.10 ^b
AP组	6.04 $\pm$ 0.62 ^a	2.16 $\pm$ 0.23 ^a	抑制剂组	8.86 $\pm$ 0.91 ^b	3.18 $\pm$ 0.33 ^b
PLT组	2.75 $\pm$ 0.29 ^b	1.03 $\pm$ 0.11 ^b	PLT+抑制剂组	5.42 $\pm$ 0.56 ^{cd}	1.16 $\pm$ 0.12 ^{cd}

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与AP组比较, $P<0.05$;c:与PLT组比较, $P<0.05$;d:与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

3.2 PLT对大鼠血清中氧化应激指标的影响

AP组大鼠血清中MDA水平较假手术组显著升高,SOD水平显著降低($P<0.05$)。PLT组、地塞米松组大鼠血清中MDA水平较AP组显著降低,SOD水平显著升高;而抑制剂组血清中大鼠MDA水平较AP组显著升高,SOD水平显著降低($P<0.05$)。PLT+抑制剂组大鼠血清中MDA水平较PLT组显著升高,SOD水平显著降低($P<0.05$);而MDA水平较抑制剂组显著降低,SOD水平显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组大鼠血清中氧化应激指标水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	MDA/(μ mol/L)	SOD/(U/mg)	组别	MDA/(μ mol/L)	SOD/(U/mg)
假手术组	86.06 $\pm$ 8.71	45.63 $\pm$ 4.66	地塞米松组	102.06 $\pm$ 10.34 ^a	35.06 $\pm$ 3.61 ^b
AP组	186.24 $\pm$ 18.76 ^a	16.85 $\pm$ 1.71 ^a	抑制剂组	264.85 $\pm$ 26.75 ^a	10.24 $\pm$ 1.08 ^b
PLT组	97.82 $\pm$ 9.88 ^b	34.76 $\pm$ 3.57 ^b	PLT+抑制剂组	165.26 $\pm$ 16.61 ^{cd}	15.06 $\pm$ 1.53 ^{cd}

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与AP组比较, $P<0.05$;c:与PLT组比较, $P<0.05$;d:与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

3.3 PLT对大鼠血清中炎症因子水平的影响

AP组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均较假手术组显著升高($P<0.05$);PLT组、地塞米松组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均较AP组显著降低,而抑制剂组上述指标则均较AP组显著升高($P<0.05$);PLT+抑制剂组大鼠血清中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平均较PLT组显著升高,但较抑制剂组显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组大鼠血清中炎症因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$, pg/mL)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组	7.66 $\pm$ 0.78	12.76 $\pm$ 1.31	4.06 $\pm$ 0.42
AP组	29.34 $\pm$ 3.05 ^a	50.31 $\pm$ 5.11 ^a	17.64 $\pm$ 1.82 ^a
PLT组	15.18 $\pm$ 1.53 ^b	28.61 $\pm$ 2.91 ^b	7.19 $\pm$ 0.73 ^b
地塞米松组	14.95 $\pm$ 1.51 ^b	28.16 $\pm$ 2.88 ^b	8.06 $\pm$ 0.82 ^b
抑制剂组	45.16 $\pm$ 4.57 ^b	78.64 $\pm$ 7.92 ^b	37.19 $\pm$ 3.79 ^b
PLT+抑制剂组	27.61 $\pm$ 2.82 ^{cd}	48.67 $\pm$ 4.89 ^{cd}	16.52 $\pm$ 1.68 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与AP组比较, $P<0.05$; c: 与PLT组比较, $P<0.05$; d: 与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

3.4 PLT对大鼠结肠黏膜组织、胰腺组织病理学的影响

假手术组大鼠结肠黏膜、胰腺结构均正常。AP组大鼠结肠黏膜组织、胰腺组织炎症细胞浸润明显, 结肠黏膜细胞脱落/胰腺组织坏死、出血严重, Chiu、Schmidt评分均较假手术组显著升高($P<0.05$)。PLT组、地塞米松组大鼠结肠黏膜、胰腺组织上述病理损伤均较AP组有所减轻, Chiu、Schmidt评分均较AP组显著降低($P<0.05$); 而抑制剂组大鼠上述病理损伤均较AP组严重, Chiu、Schmidt评分均显著升高($P<0.05$)。经PLT+抑制剂联合干预后, 大鼠结肠黏膜、胰腺组织上述病理损伤均较抑制剂组减轻, Chiu、Schmidt评分均显著降低($P<0.05$); 但病理损伤均较PLT组加重, Chiu、Schmidt评分均显著升高($P<0.05$)。结果见图1、表5。

表5 各组大鼠结肠黏膜组织、胰腺组织病理评分比较($\bar{x} \pm s, n=10$, 分)

组别	Chiu评分	Schmidt评分	组别	Chiu评分	Schmidt评分
假手术组	0.15 $\pm$ 0.02	0.22 $\pm$ 0.03	地塞米松组	0.67 $\pm$ 0.07 ^b	2.21 $\pm$ 0.23 ^b
AP组	2.05 $\pm$ 0.22 ^a	7.62 $\pm$ 0.78 ^a	抑制剂组	3.24 $\pm$ 0.35 ^b	10.52 $\pm$ 1.07 ^b
PLT组	0.72 $\pm$ 0.08 ^b	2.16 $\pm$ 0.22 ^b	PLT+抑制剂组	1.67 $\pm$ 0.18 ^{cd}	6.97 $\pm$ 0.71 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与AP组比较, $P<0.05$; c: 与PLT组比较, $P<0.05$; d: 与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

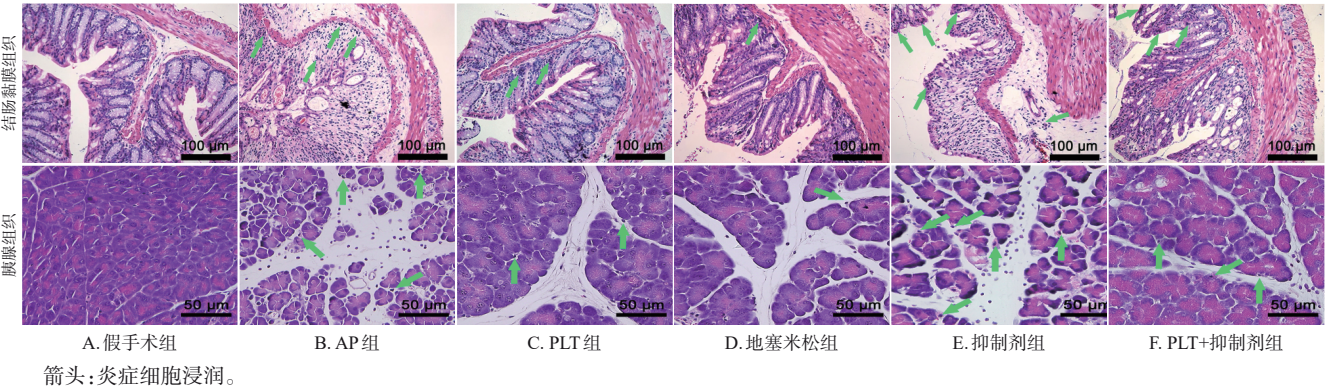


图1 PLT对大鼠结肠黏膜、胰腺组织病理学影响的显微图(HE染色)

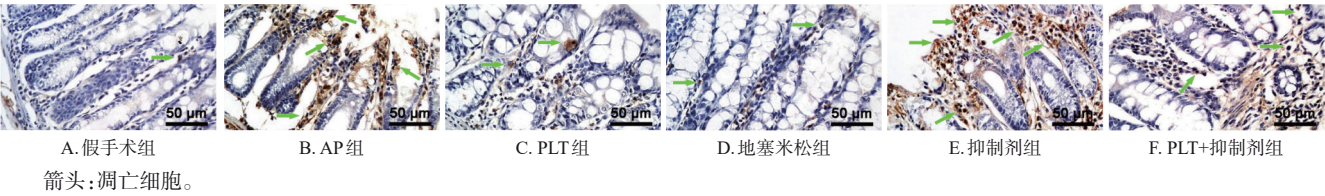


图2 PLT对大鼠结肠黏膜组织细胞凋亡影响的显微图(TUNEL染色)

3.5 PLT对大鼠结肠黏膜组织细胞凋亡的影响

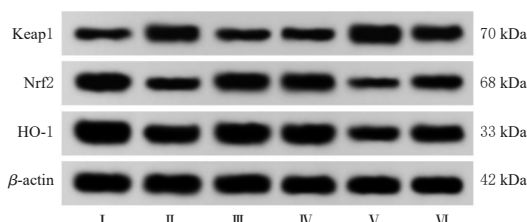
AP组大鼠结肠黏膜组织的细胞凋亡率[(24.06 $\pm$ 2.43)%]较假手术组[(7.26 $\pm$ 0.75)%]显著升高($P<0.05$); PLT组、地塞米松组大鼠结肠黏膜组织的细胞凋亡率[(12.06 $\pm$ 1.24)%、(11.85 $\pm$ 1.20)%]均较AP组显著降低, 而抑制剂组[(33.62 $\pm$ 3.42)%]则较AP组显著升高($P<0.05$); PLT+抑制剂组大鼠结肠黏膜组织的细胞凋亡率[(23.06 $\pm$ 2.33)%]较PLT组显著升高, 但较抑制剂组显著降低($P<0.05$)。结果见图2。

3.6 PLT对大鼠结肠黏膜组织 Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达的影响

AP组大鼠结肠黏膜组织中Keap1蛋白的表达较假手术组显著上调, Nrf2、HO-1蛋白的表达显著下调($P<0.05$)。PLT组、地塞米松组大鼠结肠黏膜组织中Keap1蛋白的表达较AP组显著下调, Nrf2、HO-1蛋白的表达均显著上调; 而抑制剂组大鼠Keap1蛋白的表达较AP组显著上调, Nrf2、HO-1蛋白的表达显著下调($P<0.05$)。PLT+抑制剂组大鼠结肠黏膜组织中Keap1蛋白的表达较PLT组显著上调, Nrf2、HO-1蛋白的表达显著下调($P<0.05$); 而Keap1蛋白的表达较抑制剂组显著下调, Nrf2、HO-1蛋白的表达显著上调($P<0.05$)。结果见图3、表6。

4 讨论

AP是临床常见且严重的腹部炎症性疾病之一, 具有发病迅速的特点, 可诱发器官衰竭、继发性胰腺感染及胰腺周围坏死, 相关死亡率高达20%, 严重危及患者生命^[15]。目前, 临床尚缺乏用于AP的有效治疗药物, 因此深入阐释AP发病机制对AP治疗具有重要的理论和临床意义。



I :假手术组; II :AP组; III :PLT组; IV :地塞米松组; V :抑制剂组; VI :PLT+抑制剂组。

图3 各组大鼠结肠黏膜组织中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的电泳图

表6 各组大鼠结肠黏膜组织中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Keap1/ β -actin	Nrf2/ β -actin	HO-1/ β -actin
假手术组	0.28 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.11	1.57 $\pm$ 0.16
AP组	0.76 $\pm$ 0.08 ^a	0.42 $\pm$ 0.05 ^a	0.84 $\pm$ 0.09 ^a
PLT组	0.34 $\pm$ 0.04 ^b	0.88 $\pm$ 0.09 ^b	1.32 $\pm$ 0.14 ^b
地塞米松组	0.38 $\pm$ 0.40 ^b	0.81 $\pm$ 0.09 ^b	1.26 $\pm$ 0.13 ^b
抑制剂组	1.22 $\pm$ 0.13 ^b	0.26 $\pm$ 0.03 ^b	0.57 $\pm$ 0.06 ^b
PLT+抑制剂组	0.68 $\pm$ 0.07 ^{cd}	0.52 $\pm$ 0.06 ^{cd}	0.82 $\pm$ 0.09 ^{cd}

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与AP组比较, $P<0.05$; c: 与PLT组比较, $P<0.05$; d: 与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

研究表明, AP的主要病理机制是胰蛋白酶被激活, 导致胰腺自我消化, 促进诸多促炎细胞因子和趋化因子的合成和释放, 并刺激巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞的募集和活化; 而活化的免疫细胞又进一步产生更多的炎症介质, 从而加速免疫细胞浸润并加重炎症反应, 最终引发全身炎症^[16]。IL-1 β 、IL-6、TNF- α 作为关键炎症因子, 可促进炎症反应的发生^[17]。胰腺腺泡细胞分泌的淀粉酶和脂肪酶是AP发生发展的重要标志物^[18]。肠道则是AP最直接的靶器官, 肠道损伤是AP患者早期死亡的主要原因^[19]。研究表明, 氧化应激是细胞损伤和AP发生的关键因素, 严重的AP与氧化还原失衡密切相关, 可导致脂质过氧化产物MDA增加和抗氧化酶SOD减少^[20]。本研究结果显示, AP大鼠脂肪酶、淀粉酶明显增加, 炎症因子水平显著升高; HE染色观察结果显示, AP大鼠结肠黏膜及胰腺组织病理损伤严重, Chiu、Schmidt评分均显著升高, 结肠黏膜组织的细胞凋亡明显增加, 表明AP大鼠结肠黏膜及胰腺组织受损严重。

PLT是小白菊的主要成分之一, 具有抗炎、抗氧化还原等活性, 同时对脓毒症大鼠肠道屏障功能具有一定的保护作用^[21]。本研究结果显示, 经PLT干预后, AP大鼠的脂肪酶、淀粉酶水平均显著降低, 炎症反应及氧化应激均被抑制, 结肠黏膜及胰腺组织损伤均明显缓解。

Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路是细胞氧化应激的关键通路, 其中Nrf2是一种氧化还原敏感因子, 具有抗氧化和保护细胞的作用: 在正常条件下, Nrf2可结合Keap1, 这对维持细胞氧化还原平衡具有重要作用; 但在应激条件下, Nrf2则被释放并易位至细胞核, 与细胞核中的抗氧化反应元件结合并促进HO-1 编码基因等諸多基因的

转录, 从而增强机体的抗氧化防御能力^[22]。据报道, 天然或合成化合物对AP损伤的缓解作用可能是通过激活Nrf2/HO-1 信号通路实现的^[23]。本研究结果显示, 与假手术组比较, AP组大鼠结肠黏膜组织中Nrf2、HO-1 蛋白的表达均显著下调, Keap1 蛋白的表达显著上调, AP大鼠肠道损伤严重, 提示AP大鼠的肠道损伤可能与Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路异常变化有关; 经PLT干预后, AP大鼠结肠黏膜组织中Nrf2、HO-1 蛋白的表达均显著上调, Keap1 蛋白的表达显著下调, 大鼠血清炎症因子水平显著降低, 结肠黏膜及胰腺组织的病理损伤明显减轻, 提示PLT可抑制AP大鼠的炎症反应及肠道损伤, 其作用可能与下调Keap1 蛋白的表达, 上调Nrf2、HO-1 蛋白的表达有关。为验证上述假设, 本研究设置了抑制剂组和PLT+抑制剂组。结果显示, 单一的抑制剂可进一步抑制AP大鼠结肠黏膜组织中Nrf2、HO-1 蛋白的表达, 上调Keap1 蛋白的表达, 同时可进一步升高炎症因子及氧化应激指标水平, 加重结肠黏膜及胰腺组织病理损伤; 当以PLT+抑制剂联合干预AP大鼠后, PLT对大鼠各指标的改善作用均被显著逆转, 表明PLT可能通过下调Keap1 蛋白的表达, 上调Nrf2、HO-1 蛋白的表达来减轻AP大鼠的炎症反应和肠道损伤。

综上所述, PLT抑制了AP大鼠炎症反应及氧化应激, 减轻了其肠道损伤, 其机制可能与抑制Keap1 蛋白的表达、激活Nrf2/HO-1 信号通路有关。本研究为AP治疗药物的研发提供了一定的参考, 但由于AP涉及的通路较为复杂, 具体机制仍有待后续研究继续完善。

参考文献

- [1] ZHANG D, LI L, LI J, et al. Colchicine improves severe acute pancreatitis-induced acute lung injury by suppressing inflammation, apoptosis and oxidative stress in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113461.
- [2] 代静静, 王兆, 唐奇. 益母草碱通过调节HMGB1/RAGE信号通路对重症急性胰腺炎大鼠的改善作用[J]. 中国药房, 2024, 35(14): 1722-1726.
DAI J J, WANG Z, TANG Q. Effects of leonurine on the improvement of rats with severe acute pancreatitis by regulating HMGB1/RAGE signaling pathway[J]. China Pharm, 2024, 35(14): 1722-1726.
- [3] YANG X F, GENG H, YOU L J, et al. Rhein protects against severe acute pancreatitis *in vitro* and *in vivo* by regulating the JAK2/STAT3 pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 778221.
- [4] SHAIK R A. Parthenolide alleviates indomethacin-induced gastric ulcer in rats via antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic activities[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2024, 397 (10) : 7683-7695.
- [5] KIM M J, BAE G S, JO I J, et al. Fraxinellone inhibits inflammatory cell infiltration during acute pancreatitis by

- suppressing inflammasome activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 169-177.
- [6] PIAO X H, LIU B H, SUI X D, et al. Picroside II improves severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury by inactivating oxidative and inflammatory TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B signaling and improving gut microbiota[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 3589497.
- [7] 王慧, 龚园其, 周仪华, 等. 青藤碱调控 Nrf2/Keap1 信号通路对脓毒症急性肺损伤的改善作用[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(15): 1896-1900.
WANG H, GONG Y Q, ZHOU Y H, et al. Alkaloid sinomenine improves acute lung injury in sepsis by activating Nrf2/Keap1 signaling pathway[J]. *J Pract Med*, 2022, 38(15): 1896-1900.
- [8] XU L L, ZHAO B, SUN S L, et al. High-dose vitamin C alleviates pancreatic injury via the NRF2/NQO1/HO-1 pathway in a rat model of severe acute pancreatitis[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(14): 852.
- [9] 金玲玲, 汤斌斌, 周晶晶, 等. 黄芪总皂苷对重症急性胰腺炎大鼠肠道损伤的保护作用及对肠组织 p38MAPK/NF- κ B 表达的影响[J]. *新中医*, 2021, 53(7): 6-10.
JIN L L, TANG B B, ZHOU J J, et al. Total saponins of *Astragalus* has protective effect on intestinal injury in rats with severe acute pancreatitis and its effect on p38MAPK/NF- κ B expressions in intestinal tissues[J]. *J New Chin Med*, 2021, 53(7): 6-10.
- [10] 李高忠. 小白菊内酯对重症急性胰腺炎大鼠肝损伤的保护作用及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
LI G Z. Protective effect of parthenolide on liver injury in rats with severe acute pancreatitis and its mechanism[D]. Jinan: Shandong University, 2019.
- [11] 高海运, 申立静, 刘海容, 等. 蛇床子素对急性胰腺炎模型大鼠的治疗作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(3): 403-407.
GAO H Y, SHEN L J, LIU H R, et al. Therapeutic effects of osthol on acute pancreatitis model rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(3): 403-407.
- [12] 朱爱玲, 陈恳, 秦耐宇, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨迷迭香酸对急性胰腺炎大鼠氧化损伤的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2023, 40(9): 1494-1500.
ZHU A L, CHEN K, QIN N Y, et al. Effect of rosmarinic acid on oxidative damage in rats with acute pancreatitis based on the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *J Guangxi Med Univ*, 2023, 40(9): 1494-1500.
- [13] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states: I: a morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.
- [14] SCHMIDT J, LEWANDROWSKI K, FERNANDEZ-DEL CASTILLO C, et al. Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 1992, 37(9): 1426-1433.
- [15] YANG X J, HU J, ZHONG C, et al. Total flavonoids of *Chrysanthemum indicum* L. inhibit colonic barrier injury induced by acute pancreatitis by affecting gut microorganisms[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(11): 10132-10141.
- [16] PENG C, LI Z Q, YU X. The role of pancreatic infiltrating innate immune cells in acute pancreatitis[J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18(2): 534-545.
- [17] 冯文静, 穆静辉, 李彦泽, 等. miR-320 通过调节 JAK2/STAT3 和 NF- κ B 信号通路对急性胰腺炎大鼠肠道损伤的影响[J]. *胃肠病学*, 2022, 27(10): 589-595.
FENG W J, MU J H, LI Y Z, et al. Effect of miR-320 on intestinal injury in rats with acute pancreatitis by regulating JAK2/STAT3 and NF- κ B signaling pathways[J]. *Chin J Gastroenterol*, 2022, 27(10): 589-595.
- [18] 张帆, 汤礼军, 黄竹, 等. 鹅去氧胆酸对重症急性胰腺炎大鼠胰腺及肠道损伤的影响及意义[J]. *西部医学*, 2022, 34(12): 1723-1728, 1742.
ZHANG F, TANG L J, HUANG Z, et al. Effect and significance of chenodeoxycholic acid on pancreatic and intestinal injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Med J West China*, 2022, 34(12): 1723-1728, 1742.
- [19] HONG Y P, YU J, SU Y R, et al. High-fat diet aggravates acute pancreatitis via TLR4-mediated necroptosis and inflammation in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8172714.
- [20] LIU D L, WEN L L, WANG Z D, et al. The mechanism of lung and intestinal injury in acute pancreatitis: a review[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 904078.
- [21] GUO N K, SHE H, TAN L, et al. Nano parthenolide improves intestinal barrier function of sepsis by inhibiting apoptosis and ROS via 5-HTR2A[J]. *Int J Nanomedicine*, 2023, 18: 693-709.
- [22] YANG X M, YAO L B, YUAN M, et al. Transcriptomics and network pharmacology reveal the protective effect of Chaikin chengqi decoction on obesity-related alcohol-induced acute pancreatitis via oxidative stress and PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 896523.
- [23] ALRUHAIMI R S, HASSANEIN E H M, ABD EL-AZIZ M K, et al. The melatonin receptor agonist agomelatine protects against acute pancreatitis induced by cadmium by attenuating inflammation and oxidative stress and modulating Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt A): 110833.

(收稿日期: 2024-09-06 修回日期: 2025-01-24)

(编辑: 张元媛)