

# 大黄素和黄芩苷联用对急性胰腺炎模型大鼠 Akt/Nrf2 通路的影响研究<sup>Δ</sup>

李慧艳<sup>1\*</sup>, 张超<sup>1</sup>, 张松<sup>2</sup>, 徐灏<sup>1</sup>, 刘洁<sup>1</sup>, 李菲<sup>1</sup>, 杨琦<sup>1#</sup> (1. 西安市第三医院消化内科, 西安 710000; 2. 空军军医大学唐都医院药剂科, 西安 710032)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1754-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.07

**摘要** 目的: 研究大黄素和黄芩苷联用对急性胰腺炎(AP)模型大鼠的改善作用和机制。方法: 将70只大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄素组(250 mg/kg)、黄芩苷组(250 mg/kg)、奥曲肽组(阳性对照, 10 μg/kg)、N-乙酰半胱氨酸组(阳性对照, 180 mg/kg)和大黄素+黄芩苷组(125 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷), 每组10只。除假手术组外, 其余各组大鼠均复制AP模型, 造模成功后静脉注射给予相应药物。在给药后3、6、12、24 h, 测定各组大鼠血清中淀粉酶、脂肪酶水平; 在给药24 h后, 检测大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、髓过氧化物酶(MPO)和胰腺组织中半胱氨酸天冬氨酸酶3(Caspase-3)水平, 并采用Western blot法检测各组大鼠胰腺组织中蛋白激酶B(Akt)磷酸化和核因子E2相关因子2(Nrf2)蛋白表达水平。另取40只大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄素+黄芩苷组(125 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷)和大黄素+黄芩苷+LY294002(Akt特异性抑制剂)组(125 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷+100 mg/kg LY294002), 每组10只, 进行机制验证实验。同法造模、给药, 24 h后检测大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平。结果: 与假手术组比较, 从给药后3 h开始, 模型组大鼠血清中淀粉酶、脂肪酶水平即显著升高( $P < 0.01$ ); 给药后24 h, 大鼠血清中MDA、MPO和胰腺组织中Caspase-3水平均显著升高( $P < 0.01$ ), 血清中SOD、GSH和胰腺组织中Akt磷酸化及Nrf2蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 从给药后6 h开始, 各给药组大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平均显著降低( $P < 0.01$ ); 给药24 h后, 各组大鼠血清中MDA、MPO和胰腺组织中Caspase-3水平均显著降低( $P < 0.01$ ), 血清中SOD、GSH和胰腺组织中Akt磷酸化及Nrf2蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。机制验证实验中, 与大黄素+黄芩苷组比较, 大黄素+黄芩苷+LY294002组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化及Nrf2蛋白表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。结论: 大黄素和黄芩苷联用对AP模型大鼠具有一定的改善作用, 其机制可能与促进Akt磷酸化上调Nrf2蛋白表达, 并促进其下游抗氧化酶的表达, 从而降低体内氧化应激水平有关。

**关键词** 大黄素; 黄芩苷; 急性胰腺炎; 氧化应激; 蛋白激酶B; 核因子E2相关因子2; 大鼠

嘱, 需要药品时临时借用等特殊情况等诸多原因所致。这也正是住院药房药事管理的难点所在, 同时也提醒质控小组日后的检查重点应集中在这四个方面。

药事质量与安全控制指标在我院住院药房建立并实施的1年中, 已显示初步成效。住院药房可以通过检查质控指标及时发现问题, 有针对性地解决问题。由于此指标实施使用时间较短, 还存在许多不当之处, 在今后的工作中仍需对质控指标项目不断优化和完善, 以保证药品管理的质量, 不断提升药学服务水平, 保障患者用药安全。

## 参考文献

- [1] 鞠解奇. 医院药房管理与药学服务质量的相关性研究[J]. 中国医药指南, 2011, 9(35): 241-242.
- [2] 高燕青, 赵春梅. 我院门诊药房加强处方干预的措施及体

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.30801487); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No.2016JM8090)

\* 主治医师, 硕士。研究方向: 急性胰腺炎发病机制。E-mail: lihuiyan2017@126.com

# 通信作者: 副主任医师。研究方向: 胃肠动力及急性胰腺炎机制。E-mail: 969211665@qq.com

- 会[J]. 中国药房, 2012, 23(1): 92-94.
- [3] 唐哲, 韦韡, 西娜. 我院加强药品盘点监管的探讨[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1378-1380.
- [4] 郭丽兰. 浅谈我院药库规范化管理的具体实施[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(22): 2964.
- [5] 王梅芬, 孙亚军. 高警讯药物临床使用安全管理概述[J]. 现代护理, 2007, 13(13): 1250-1252.
- [6] 李艳萍, 陈建达, 戴森茂. 在JCI理念下规范我院高警讯药品的管理[J]. 海峡药学, 2015, 27(4): 276-278.
- [7] 聂庆英. 医院特殊药品的规范化管理讨论[J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(13): 139.
- [8] 叶丽娟. 医院药房特殊药品安全管理分析[J]. 中医药管理杂志, 2013, 21(5): 493-494.
- [9] 陈旭青, 冷静, 陶瑛瑛, 等. 品管圈在病区药房的应用[J]. 中国药业, 2013, 22(2): 71-73.
- [10] 杨翠琳, 罗晓梅. 住院药房药品质量管理体会[J]. 临床合理用药杂志, 2014, 7(2A): 185-186.
- [11] 高宁. 以细节管理提高该院病房药房工作质量[J]. 医药卫生管理, 2016, 13(4): 184-186.

(收稿日期: 2017-09-21 修回日期: 2017-12-14)

(编辑: 刘萍)

## Effects of Emodin Combined with Baicalin on Akt/Nrf2 Pathway in Acute Pancreatitis Model Rats

LI Huiyan<sup>1</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, ZHANG Song<sup>2</sup>, XU Hao<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, LI Fei<sup>1</sup>, YANG Qi<sup>1</sup> (1.Dept. of Gastroenterology, Xi'an Third Hospital, Xi'an, 710000; 2.Dept. of Pharmacy, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study the effects of emodin combined with baicalin on acute pancreatitis (AP) model rats and its possible mechanism. **METHODS:** A total of 70 rats were randomly divided into sham operation group, model group, emodin group (250 mg/kg), baicalin group (250 mg/kg), octreotide group (positive control, 10 µg/kg), *N*-acetyl cysteine group (positive control, 180 mg/kg), emodin+baicalin group (125 mg/kg emodin+125 mg/kg baicalin), with 10 rats in each group. Except for sham operation group, AP model was induced in each group. After modeling, relevant medicines were given intravenously. After 3, 6, 12, 24 h of medication, the serum levels of amylase and lipase were determined. After 24 h medication, serum levels of SOD, MDA, GSH, MPO and level of Caspase-3 in pancreatic tissue were determined. The levels of Akt phosphorylation and expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue of rats were determined by Western blot assay. Another 40 rats were randomly divided into sham operation group, model group, emodin+baicalin group (125 mg/kg emodin+125 mg/kg baicalin) and emodin+baicalin+LY294002 (Akt specific inhibitor) group (125 mg/kg emodin+125 mg/kg baicalin+100 mg/kg LY294002), with 10 rats in each group. Mechanism verification test was performed. The modeling and medication method of those groups were same to above groups, 24 h later. The level of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein were determined in pancreatic tissue of rats. **RESULTS:** Compared with sham operation group, the serum levels of amylase, lipase of rats were significantly increased in model group after 3 h of medication ( $P<0.01$ ); levels of MDA, MPO in serum and Caspase-3 in pancreatic tissue were significantly increased in model group ( $P<0.01$ ), while the levels of SOD, GSH in serum and the levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein were decreased significantly in pancreatic tissue of rats ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the serum levels of amylase and lipase were decreased significantly in administration groups after 6 h of medication ( $P<0.01$ ). After 24 h medication, the levels of MDA, MPO in serum and Caspase-3 in pancreatic tissue were decreased significantly ( $P<0.01$ ), while the levels of SOD, GSH in serum and the levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein were increased significantly in pancreatic tissue of rats ( $P<0.01$ ). In mechanism verification test, compared with emodin+baicalin group, the levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue were decreased significantly in emodin+baicalin+LY294002 group ( $P<0.01$ ). **CONCLUSIONS:** Emodin combined with baicalin shows certain improvement effect on AP rats, the mechanism is that the level of Akt phosphorylation is promoted so as to up-regulate the expression of Nrf2 protein, and the expression of antioxidant enzyme is promoted so as to reduce the level of oxidative stress in AP model rats.

**KEYWORDS** Emodin; Baicalin; Acute pancreatitis; Oxidative stress; Akt; Nrf2; Rats

急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)是指胰腺内的胰酶被激活后,引发胰腺组织发生自身消化反应,从而造成的胰腺损伤,特别是重症急性胰腺炎(SAP),病情严重而且发展较快,还会伴发其他器官的损伤,死亡率高达20%~30%<sup>[1]</sup>。近年来的文献研究表明,氧化应激在AP的发生和发展过程中扮演着极其重要的角色,而且还与胰腺以外其他器官的损伤有着密切关系<sup>[2]</sup>。当体内氧化自由基水平增加,抗氧化酶活性降低时,会引起炎症反应和微循环障碍,从而引起细胞凋亡和组织损伤,最终导致胰腺和其他器官的损伤<sup>[3]</sup>。因此,抗氧化损伤对治疗胰腺炎及其伴发的其他器官损伤具有积极作用。蛋白激酶B(Akt)/核因子E2相关因子2(Nrf2)是体内重要的内源性抗氧化信号通路,可调节组织内抗氧化酶的表达而发挥抗氧化作用。有研究发现,通过调控Akt/Nrf2通路,可发挥抗氧化和抗炎作用,从而治疗小鼠AP及其并发症<sup>[4-5]</sup>。可见,寻找可以激活Akt/Nrf2信号通路的药物,将对治疗AP有很大的帮助。

大黄和黄芩联合应用治疗AP见于多个中药组方,比如清胰汤、大承气汤、大黄柴苓汤、胰炎灵颗粒等,应用广泛,疗效确切<sup>[6]</sup>。其中大黄素是中药大黄的主要成分之一,可以通过抑制胰酶生成、抗炎、抗氧化和调节免疫功能等机制发挥治疗AP作用<sup>[7]</sup>。黄芪中的黄芩苷对AP大鼠组织中炎症因子具有很好的抑制作用<sup>[8]</sup>,还可通过增加肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)和血红素氧合酶1(HO-1)的蛋白含量改善AP大鼠伴发的肾损伤<sup>[9]</sup>。可见,大黄素和黄芩苷对AP均有一定的改善作用,那么两者合用是否有增效作用还未见文献报道。由于常用于治疗胰腺的中药方剂清胰汤中大黄和黄芩的比例为1:1,且在预实验中笔者发现以此比例配伍应用效果较好,故本研究拟在AP大鼠模型基础上,联合给予大黄素和黄芩苷(1:1),研究二者的增效作用及作用机制。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

Selectra-E全自动生化分析仪(荷兰威图科学公司);

Infinite F50全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司);蛋白凝胶电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.2 药品与试剂

黄芩苷标准品(批号:20151017,纯度: $>98\%$ )、大黄素标准品(批号:20151103,纯度: $>98\%$ )均购自西安赛德有机科技有限责任公司;牛磺胆酸钠(批号:86349,纯度:98%)、*N*-乙酰半胱氨酸(NAC,批号:A750,纯度: $>99\%$ )、Akt 特异性抑制剂 LY294002(批号:M2128,纯度:98%)均购自美国 Sigma 公司;醋酸奥曲肽注射液(瑞士诺华制药有限公司,批号:H20150948,规格:0.1 mg/mL);SOD(批号:20170105)、丙二醛(MDA,批号:20170213)、谷胱甘肽(GSH,批号:20170122)、髓过氧化物酶(MPO,批号:20170204)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3,批号:20170123)测定试剂盒均购自南京建成生物有限公司;血清淀粉酶测定试剂盒(批号:20170315)、血清脂肪酶测定试剂盒(批号:20170311)均购自温州东欧公司;兔抗大鼠 Akt、磷酸化 Akt(p-Akt)、Nrf2 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;羊抗兔二抗(武汉博士德生物科技有限公司)。

## 1.3 动物

健康 Wistar 大鼠 110 只,清洁级,♂,6 周龄,体质量 190~230 g,购自空军军医大学实验动物中心[动物生产合格证号:SCKX(军)2007-007]。大鼠购入后采用灭菌标准饲料喂养,期间自由饮水,室温控制在 20~25 ℃,湿度控制在 40%~70%。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

将大鼠适应性喂养 1 周后随机分为假手术组、模型组、大黄素组(250 mg/kg)、黄芩苷组(250 mg/kg)、大黄素+黄芩苷组(125 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷)、NAC 组(180 mg/kg)和奥曲肽组(10  $\mu$ g/kg),每组 10 只,进行药效及机制考察实验。为了验证蛋白分子之间的作用,重新取 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄素+黄芩苷组(250 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷)和大黄素+黄芩苷+LY294002 组(125 mg/kg 大黄素+125 mg/kg 黄芩苷+100 mg/kg LY294002),进行机制验证实验(检测大鼠胰腺组织中 Akt 磷酸化及 Nrf2 蛋白表达水平)。NAC 和奥曲肽给药剂量根据临床使用剂量折算而来,大黄素和黄芩苷根据临床常用剂量设定,比例根据前期预实验结果确定。模型组和给药组大鼠均采用 50 g/L 的牛磺胆酸钠经十二指肠行胆胰管逆行进行加压注射,注射速度为 0.1 mL/min,制备大鼠 AP 模型<sup>[9]</sup>;假手术组大鼠开腹后仅翻动胰腺,随即关腹。给药组大鼠造模后立即静脉注射给予相应剂量的药物;假手术组和模型组大鼠给予相同体积的生理盐水。

### 2.2 样本采集与处理

分别在大鼠给药后 3、6、12、24 h 抽取血液标本,于 EP 管中静置,然后以 1 500 $\times$ g 低温离心 10 min,吸取血清并分装于冻存管中,放 -80 ℃ 冰箱冻存,用于测定血清中淀粉酶、脂肪酶及其他生化指标;末次取血后采用颈椎脱臼法处死大鼠,取胰腺组织测定其中蛋白表达情况。

### 2.3 血清中淀粉酶和脂肪酶水平的测定

按照试剂盒方法进行的操作,检测各组大鼠给药后 3、6、12、24 h 血清中淀粉酶和脂肪酶水平,测定仪器为全自动血生化分析仪。

### 2.4 血清中 SOD、MDA、GSH 和 MPO 水平的测定

给药 24 h 后,各组大鼠血清中 SOD 水平采用黄嘌呤氧化酶法测定,GSH 水平采用分光光度法测定,MDA 水平采用硫代巴比妥酸法测定,MPO 水平采用酶化学法测定,各指标测定步骤严格按照相应试剂盒说明书操作完成。

### 2.5 胰腺组织中 Caspase-3 水平的测定

取 50 mg 胰腺组织,加入冰组织裂解液 500  $\mu$ L,组织研磨仪研磨 5 min 至无组织块,冰浴 10 min,然后以 10 000 $\times$ g 离心 10 min,收集上清,置于 -80 ℃ 冰箱中冻存。用检测缓冲液按 1:10 的比例稀释,采用比色法测定各组大鼠胰腺组织中 Caspase-3 水平,具体操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,检测波长为 450 nm。

### 2.6 胰腺组织中 Akt 磷酸化及 Nrf2 蛋白表达水平的测定

采用 Western blot 法测定除奥曲肽和 NAC 组外其余各组大鼠胰腺组织中 Akt 磷酸化及 Nrf2 蛋白表达水平。取胰腺组织,与组织蛋白提取液一起在组织匀浆机上匀浆,然后 10 000 $\times$ g 离心 10 min,收集组织上清液,采用二喹啉甲酸(BCA)法对上清液中蛋白定量,然后将蛋白置于 -70 ℃ 冰箱中保存,备用。蛋白在 100 ℃ 条件下变性后,取等量蛋白(25  $\mu$ g)上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,采用半干转膜法转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂奶粉封闭后,用相应一抗(1:1 000)在 4 ℃ 下孵育,振荡过夜;TBST 液漂洗 3 遍,羊抗兔二抗(1:5 000)孵育 1 h;TBST 液漂洗 3 遍,采用化学发光超敏显色试剂盒显影。实验结果采用 Quantity one 软件进行分析,以目的蛋白和内参( $\beta$ -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平,以 p-Akt/Akt 比值表示 Akt 的磷酸化水平。将假手术组比值设置为 1,以其他组与假手术组的比值计算其相对值。

### 2.7 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件对结果进行分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和 LSD 检验进行组间比较。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血清中淀粉酶和脂肪酶水平的测定结果

从给药后3 h开始,模型大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平均显著高于假手术组( $P<0.01$ ),而且随着给药时间的延长血清中淀粉酶和脂肪酶水平逐渐升高。大黄素和黄芩苷单独给药时,均可以降低模型大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平,但在给药后3 h时与模型组比较差异并没有统计学意义( $P>0.05$ ),从给药后6 h开始差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。而大黄素和黄芩苷联合给药时,可显著降低模型大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平,且从给药后3 h开始与模型组比较差异即具有统计学意义( $P<0.01$ );而且与相同时间点的单用大黄素和黄芩苷比较,联用效果更好,且与奥曲肽和NAC效果相当。给药不同时间后各组大鼠血清中淀粉酶水平的测定结果见表1,脂肪酶水平的测定结果见表2。

**表1 给药不同时间后各组大鼠血清中淀粉酶水平测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )**

**Tab 1 Level determination of amylase in serum of rats in each group after different medication times( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )**

组别	给药时间			
	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	1 639.2±372.5	1 689.4±326.2	1 658.5±335.8	1 692.1±342.4
模型组	5 425.6±542.7**	7 426.6±583.7**	8 913.4±588.3**	9 618.8±589.4**
大黄素组	5 237.3±552.1	5 024.1±572.5 <sup>##</sup>	4 317.1±538.4 <sup>##</sup>	3 518.3±451.4 <sup>##</sup>
黄芩苷组	5 284.5±571.5	4 819.3±544.9 <sup>##</sup>	4 184.2±521.5 <sup>##</sup>	3 637.2±471.3 <sup>##</sup>
大黄素+黄芩苷组	4 536.2±473.3 <sup>##</sup>	3 891.3±448.2 <sup>##</sup>	3 182.4±452.4 <sup>##</sup>	2 619.4±413.2 <sup>##</sup>
奥曲肽组	4 289.1±519.2 <sup>##</sup>	3 719.5±452.8 <sup>##</sup>	3 012.2±448.9 <sup>##</sup>	2 463.5±429.3 <sup>##</sup>
NAC组	4 319.4±523.8 <sup>##</sup>	3 915.2±513.1 <sup>##</sup>	3 029.5±441.6 <sup>##</sup>	2 515.7±425.8 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$

**表2 给药不同时间后各组大鼠血清中脂肪酶水平的测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )**

**Tab 2 Level determination of lipase in serum of rats in each group after different medication times( $\bar{x}\pm s, n=10, U/L$ )**

组别	给药时间			
	3 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	84.5±24.2	87.3±26.1	92.1±28.3	91.3±26.9
模型组	1 328.4±136.2**	1 581.8±139.2**	1 739.8±142.4**	1 928.7±144.5**
大黄素组	1 293.2±131.5	1 142.5±133.6 <sup>##</sup>	9 72.6±103.7 <sup>##</sup>	883.9±97.2 <sup>##</sup>
黄芩苷组	1 238.7±142.6	1 092.8±139.8 <sup>##</sup>	915.9±98.2 <sup>##</sup>	831.5±89.3 <sup>##</sup>
大黄素+黄芩苷组	985.3±99.3 <sup>##</sup>	814.8±88.2 <sup>##</sup>	769.2±89.4 <sup>##</sup>	614.5±88.5 <sup>##</sup>
奥曲肽组	976.5±100.2 <sup>##</sup>	793.6±92.4 <sup>##</sup>	727.4±86.2 <sup>##</sup>	579.3±87.1 <sup>##</sup>
NAC组	994.2±100.7 <sup>##</sup>	805.7±89.9 <sup>##</sup>	738.9±87.9 <sup>##</sup>	598.3±86.4 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$

### 3.2 血清中MDA、MPO、SOD和GSH水平的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠血清中MDA、MPO水平显著增加( $P<0.01$ ),而SOD、GSH水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,给药组大鼠血清中MDA、MPO

水平均显著降低( $P<0.01$ ),SOD和GSH水平均显著升高( $P<0.01$ ),且大黄素+黄芩苷组大鼠血清中SOD和GSH水平显著低于大黄素组和黄芩苷组( $P<0.01$ )。各组大鼠血清中MDA、MPO、SOD、GSH水平的测定结果见表3。

**表3 各组大鼠血清中MDA、MPO、SOD、GSH水平的测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )**

**Tab 3 Serum levels of MDA, MPO, SOD and GSH of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=10$ )**

组别	MDA, nmol/mL	MPO, U/g	SOD, U/g	GSH, U/g
假手术组	4.39±0.79	0.43±0.19	368.2±17.4	125.2±13.5
模型组	10.14±1.31**	1.79±0.33**	148.5±19.2**	47.5±11.3**
大黄素组	8.13±0.86 <sup>##</sup>	1.26±0.29 <sup>##</sup>	194.1±18.3 <sup>##</sup>	71.7±9.8 <sup>##</sup>
黄芩苷组	7.92±0.77 <sup>##</sup>	1.14±0.31 <sup>##</sup>	205.7±19.1 <sup>##</sup>	79.2±9.4 <sup>##</sup>
大黄素+黄芩苷组	6.17±0.79 <sup>##</sup>	0.79±0.22 <sup>##</sup>	305.1±32.2 <sup>##ΔΔ</sup>	95.2±10.2 <sup>##ΔΔ</sup>
奥曲肽组	5.81±0.65 <sup>##</sup>	0.69±0.24 <sup>##</sup>	318.5±29.8 <sup>##</sup>	102.1±9.8 <sup>##</sup>
NAC组	5.96±0.74 <sup>##</sup>	0.73±0.19 <sup>##</sup>	324.2±33.7 <sup>##</sup>	95.7±11.3 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与大黄素组、黄芩苷组比较, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. emodin group and baicalin group, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.3 胰腺组织中Caspase-3水平的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠胰腺组织中Caspase-3水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,大黄素+黄芩苷组、奥曲肽组和NAC组大鼠胰腺组织中Caspase-3水平显著降低( $P<0.01$ ),并且大黄素+黄芩苷组显著低于大黄素组和黄芩苷组( $P<0.01$ ),与奥曲肽组和NAC组效果相当( $P>0.05$ )。各组大鼠胰腺组织中Caspase-3水平的测定结果见表4。

**表4 各组大鼠胰腺组织中Caspase-3水平的测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )**

**Tab 4 The level of Caspase-3 in pancreatic tissue of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=10$ )**

组别	Caspase-3
假手术组	1
模型组	6.3±0.52**
大黄素组	6.1±0.62
黄芩苷组	4.2±0.39
大黄素+黄芩苷组	2.5±0.41 <sup>##ΔΔ</sup>
奥曲肽组	2.1±0.33 <sup>##</sup>
NAC组	2.3±0.38 <sup>##</sup>

注:与假手术组比较, \*\* $P<0.01$ ;与模型组比较, <sup>##</sup> $P<0.01$ ;与大黄素组、黄芩苷组比较, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. emodin group and baicalin group, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.4 胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,给药组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ ),且大黄素+黄芩苷组显

著低于大黄素组、黄芩苷组( $P<0.01$ )。各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达的电泳图见图1,测定结果见表5。

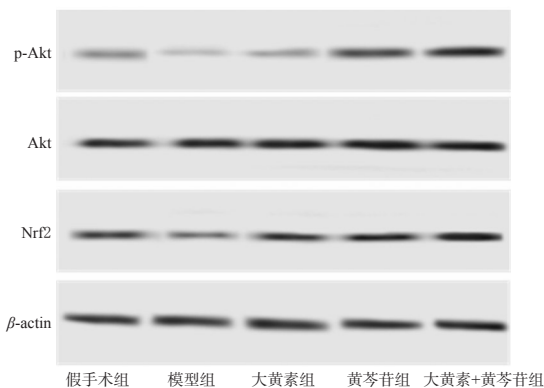


图1 各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electropherogram of the levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue of rats in each group

表5 各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化水平和Nrf2蛋白表达水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 5 The levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	p-Akt/Akt	Nrf2
假手术组	1	1
模型组	0.27 ± 0.21**	0.31 ± 0.22**
大黄素组	0.83 ± 0.25 <sup>##</sup>	1.26 ± 0.31 <sup>##</sup>
黄芩苷组	1.32 ± 0.31 <sup>##</sup>	1.52 ± 0.36 <sup>##</sup>
大黄素+黄芩苷组	2.21 ± 0.35 <sup>##ΔΔ</sup>	2.25 ± 0.37 <sup>##ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ,与大黄素组和黄芩苷组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. emodin group and baicalin group, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.5 机制验证结果

与假手术组比较,模型组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,大黄素+黄芩苷组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ )。与大黄素+黄芩苷组比较,大黄素+黄芩苷+LY294002组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化和Nrf2蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表6。

## 4 讨论

奥曲肽是临床常用的治疗胰腺炎的药物,具有较好的治疗效果;NAC对大鼠胰腺炎具有很好的治疗效果,而且其主要通过抗氧化发挥的作用,因此本研究选择这两个药物为阳性对照药物。有研究发现,血清淀粉酶和血清脂肪酶联合检测对诊断AP患者具有重要意义<sup>[10-11]</sup>。

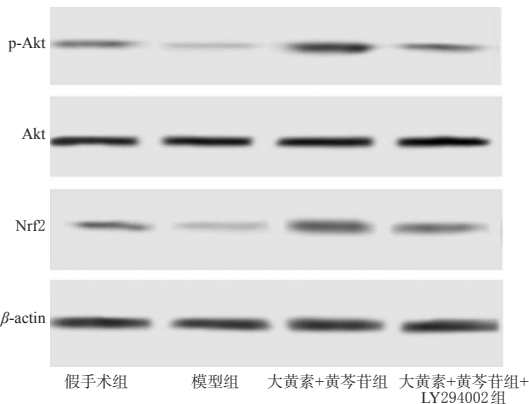


图2 机制验证实验中各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化及Nrf2蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electropherograms of the level of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue of rats in each group in mechanism verification test

表6 机制验证实验中各组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化及Nrf2蛋白表达水平的测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 6 The levels of Akt phosphorylation and the expression of Nrf2 protein in pancreatic tissue of rats in each group in mechanism verification test( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	p-Akt/Akt	Nrf2
假手术组	1	1
模型组	0.22 ± 0.21**	0.27 ± 0.21**
大黄素+黄芩苷组	2.25 ± 0.31 <sup>##</sup>	2.31 ± 0.34 <sup>##</sup>
大黄素+黄芩苷+LY294002组	1.17 ± 0.27 <sup>ΔΔ</sup>	1.21 ± 0.31 <sup>ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ,与大黄素+黄芩苷组比较,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. emodin+baicalin group, <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

在本研究中,模型组大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平均显著升高,符合AP模型特征,提示造模成功。大黄素和黄芩苷单独给药后从6 h开始,对模型大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平有一定的抑制作用;而二者联用时,在3 h时即可显著抑制模型大鼠血清中淀粉酶和脂肪酶水平,表明两者联用效果优于单用。

氧自由基生成过多和抗氧化酶系统的破坏被认为是导致AP发生时细胞损伤的关键因素,同时也是导致全身性氧化应激的主要因素<sup>[12]</sup>。为了反映药物对体内氧化应激的作用,本研究测定了血清中氧化指标MDA、MPO、SOD和GSH的水平。结果发现,模型组大鼠血清中MDA和MPO水平较假手术组均显著升高( $P<0.01$ ),表明造模后大鼠处于较高的氧化应激水平。大黄素和黄芩苷单独给药后,血清中MPO和MDA水平有所降低,而二者联用后大鼠血清中MPO和MDA水平进一步降低,表明大黄素和黄芩苷联用能够有效促进抗氧化酶表达,且效果优于单用。

体内过量的氧自由基和炎症因子会诱导细胞凋亡,凋亡是一种机体自我保护调节机制,但过量的凋亡会造成组织坏死,引起组织损伤<sup>[13]</sup>。Caspase家族在介导氧化应激和凋亡信号中具有重要作用,其中Caspase-3在介导细胞凋亡过程中扮演着重要角色<sup>[14]</sup>。在本研究结果中,模型组大鼠胰腺组织中Caspase-3水平显著升高,表明凋亡被过度激活;大黄素和黄芩苷单独给药后大鼠胰腺组织中Caspase-3水平被不同程度地抑制,而二者联用时则进一步降低了Caspase-3水平,发挥出更好的抗凋亡作用。

Nrf2蛋白是各种细胞内对抗氧化应激的重要核转录蛋白,机体在受到刺激或者某些激活剂作用时,Nrf2被激活后转移入核,通过抗氧化反应元件(ARE)调控一系列抗氧酶表达,增加细胞对抗氧化应激的能力<sup>[15]</sup>。当Nrf2缺失或者激活有障碍时,细胞对刺激源的敏感性增加,会引起炎症、凋亡或癌变等反应<sup>[16]</sup>。在本研究中,模型组大鼠胰腺组织中Nrf2蛋白表达水平显著低于假手术组,表明Nrf2的激活受阻。当给予大黄素和黄芩苷后,大鼠胰腺组织中Nrf2蛋白表达水平显著升高,而两者联用时Nrf2蛋白表达水平进一步升高,效果优于单用。Akt是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其磷酸化后被激活,可以调控下游靶基因表达,与细胞增殖、分化和凋亡都有着密切的联系<sup>[16]</sup>。同时,Akt激活后可以促进Nrf2蛋白表达,进而促进抗氧化酶表达。在本研究中,模型组大鼠胰腺组织中Akt磷酸化水平降低,而给药后Akt磷酸化水平显著升高,表明大黄素和黄芩苷联用可以激活Akt信号通路。LY294002是一种Akt的特异性抑制剂,与药物同时给予大鼠后发现,其可阻断Akt的激活,Nrf2蛋白表达量也显著降低,表明大黄素和黄芩苷联用通过Akt通路调节Nrf2蛋白表达,从而发挥治疗AP作用。

综上所述,大黄素和黄芩苷联用对AP的改善效果优于大黄素和黄芩苷单用,大黄素和黄芩苷联用可通过Akt通路调控Nrf2蛋白表达,促进其下游抗氧化酶的表达,从而降低体内氧化应激水平,最终发挥治疗AP作用。本研究结果为临床开发相关制剂,证明大黄素和黄芩苷的联用效果提供了实验基础。

## 参考文献

[1] PETER AB, THOMAS LB, CHRISTOS D, et al. Classification of acute pancreatitis-2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus [J]. *Gut*, 2013, 62(1):102-111.

[2] ESREFOLU M, GUL M, ATES B, et al. Antioxidative effect of melatonin, ascorbic acid and N-acetylcysteine on caerulein-induced pancreatitis and associated liver injury in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(2): 259-

264.

[3] 田锐,许飞,王瑞兰,等.氧化应激及凋亡与重症急性胰腺炎肠屏障功能障碍[J]. *中华急诊医学杂志*, 2012, 21(10):1088-1092.

[4] 柳源,刘龙中,徐亚沙,等.清胰Ⅱ号对雨蛙素诱导的急性胰腺炎小鼠Nrf2相关基因水平的影响[J]. *遵义医学院学报*, 2017, 40(1):33-37.

[5] XU P, WANG J, YANG ZW, et al. Regulatory roles of the PI3K/Akt signaling pathway in rats with severe acute pancreatitis[J]. *PLoS One*, 2013.DOI: 10.1371/journal.pone.0081767.

[6] 牛威,郭莲怡.大黄、丹参对重症急性胰腺炎患者的临床疗效观察[J]. *中国药房*, 2013, 24(19):1801-1803.

[7] 李之令,张东,刘江伟,等.大黄素对大鼠重症急性胰腺炎相关性肾损伤缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 的影响[J]. *华西医学*, 2015, 30(4):640-644.

[8] 李慧艳,赵曙光,赵保民,等.黄芩苷对重症急性胰腺炎TNF- $\alpha$ 、IL-6及IL-10的影响[J]. *西南国防医药*, 2009, 19(1):26-29.

[9] 李丹,郑高明.黄芩苷对大鼠重症急性胰腺炎肾损伤保护作用的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(10): 2476-2478.

[10] 王燕,郭婧澜,常欧.血清淀粉酶和脂肪酶联合检测在急性胰腺炎诊断中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(3):265-266.

[11] 李兴国,张艳莉.清下化痰汤对急性重症胰腺炎患者氧化应激及炎症反应的影响[J]. *陕西中医*, 2016, 37(10): 1352-1354.

[12] ZHANG X, CHEN L, LUO L, et al. Study of the protective effects of dexamethasone on ileum mucosa injury in rats with severe acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2008, 37(3):e74-e82.

[13] 李新源,郭亚民,吴新民,等.大鼠急性胰腺炎Caspase-3及Survivin在胰腺组织中表达的实验研究[J]. *河北医药*, 2015, 37(9):1293-1296.

[14] 姚争光,张文,张万年,等. Nrf2-Keap1蛋白相互作用小分子抑制剂的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2017, 27(4):325-333.

[15] KOBAYASHI A, OHTA T, YAMAMOTO M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes[J]. *Methods Enzymol*, 2004, 378(1):273-286.

[16] PAPANIMITRAKOPOULOU V. Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer[J]. *J Thoracic Oncol*, 2012, 7(8):1315-1326.

(收稿日期:2017-11-09 修回日期:2018-03-01)

(编辑:林 静)