

番石榴叶总黄酮对慢性胰腺炎小鼠纤维化的影响

王曼雪¹, 张桂贤², 刘洪斌^{2*}, 刘大卫², 张一³, 李东华³, 聂卫²

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020;
3. 天津市南开医院, 天津 300100)

[摘要] 目的: 探讨番石榴叶总黄酮(total flavonoids from *Psidium guajava* leaves, TFPGL)对慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)小鼠纤维化的影响及其机制。方法: 将50只C57BL/6小鼠随机均分为正常组, CP模型组, oxidized ATP(oxATP)组, TFPGL低、高剂量组。后4组小鼠腹腔注射雨蛙素 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (溶于200 μL 生理盐水), 每天6次, 每周3 d, 连续6周, 建立慢性胰腺炎小鼠模型。6周后, oxATP组腹腔注射oxATP($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 溶于200 μL 生理盐水)2周, TFPGL低、高剂量组分别予以TFPGL 0.186, 0.372 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃2周。同时, 正常组小鼠腹腔注射与模型组等体积、等频率的生理盐水。苏木素-伊红(HE)染色评估胰腺损伤程度; 天狼星红染色检测胰腺组织胶原含量; 免疫组化检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA), 核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(nucleotide binding oligomerization domain-like receptor 3, NLRP3), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(cysteiny aspartate specific proteinase-1, Caspase-1)的蛋白表达水平; 酶联免疫吸附法测定胰腺组织中IL-1 β (interleukin-1 β), IL-18水平。结果: 与正常组比较, 雨蛙素注射后胰腺损伤加重($P < 0.01$), Caspase-1, NLRP3, α -SMA, IL-1 β , IL-18水平升高($P < 0.01$)。天狼星红染色显示胰腺组织细胞周围胶原I(Col I), 胶原III(Col III)含量较正常组升高($P < 0.01$)。与模型组比较, oxATP组及TFPGL低、高剂量组炎症损伤及纤维化程度均减轻, 表现为天狼星红染色程度减轻($P < 0.05, P < 0.01$), Caspase-1, NLRP3, α -SMA, IL-1 β , IL-18水平均降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: TFPGL可通过抑制P2X7R介导NLRP3炎性体信号途径活化显著减轻慢性胰腺炎模型小鼠的慢性炎症及纤维化程度。

[关键词] 番石榴叶总黄酮; 慢性胰腺炎; 胰腺纤维化; 核苷酸结合寡聚化结构域样受体3; 嘌呤能2X7受体

[中图分类号] R22; R24; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0175-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181039

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1026.013.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 10:59

Effect of Total Flavonoids from *Psidium guajava* Leaves on Pancreatic Fibrosis of Chronic Pancreatitis Mice

WANG Man-xue¹, ZHANG Gui-xian², LIU Hong-bin^{2*}, LIU Da-wei², ZHANG Yi³, LI Dong-hua³, NIE Wei²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China; 3. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of total flavonoids from *Psidium guajava* leaves (TFPGL) on pancreatic fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis (CP). **Method:** Fifty male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, CP model group, oxidized ATP (oxATP) group, high-dose TFPGL group and low-dose TFPGL group. CP model were built in the latter four groups by intraperitoneally injecting $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ cerulein (dissolved in 200 μL of physiological saline) per hour, 6 times per day, three times per week, for six consecutive weeks. Six weeks later, oxATP ($15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day, dissolved in 200 μL of physiological saline) was given to oxATP group through intraperitoneal injection. And $0.186 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day and $0.372 \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day TFPGL were given by gavage to high-dose TFPGL group and low-dose TFPGL group for two

[收稿日期] 20171120(012)

[基金项目] 天津市卫生计生委科技基金项目(2014KY39);天津市自然科学基金项目(17JCYBJC27700)

[第一作者] 王曼雪, 硕士, 从事慢性胰腺炎药理学研究, Tel: 022-27313851, E-mail: wangmanxue@tmu.edu.cn

[通信作者] *刘洪斌, 博士, 研究员, 从事中西医结合治疗肝胆胰疾病的药理学研究, Tel: 022-27313851, E-mail: jtss@sina.com

weeks, respectively. Meanwhile, the control group received 0.9% sterile sodium chloride through intraperitoneal injection at the same frequency and volume of the model group. The degree of pancreatic damage was evaluated by HE staining, and the content of pancreatic tissue collagen was detected by Sirius red staining. The expressions of nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were assessed by immunohistochemical staining. The IL-1 β and IL-18 levels in pancreatic tissues were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Result:** Compared with the control group, the pancreatic damage aggravated ($P < 0.01$), and the levels of Caspase-1, NLRP3, α -SMA, IL-1 β and IL-18 increased ($P < 0.01$). After injection with caerulein. Picric acid-sirius red staining in pancreatic tissues showed that the pericellular accumulations of collagen I (Col I) and collagen III (Col III) ($P < 0.001$), were increased compared with the control group. Compared with the model group, ameliorated inflammatory injury and fibrosis ($P < 0.05$, $P < 0.01$), were observed in oxATP and TFPGL groups, which was manifested as decrease in degree of picric acid-sirius red staining and levels of Caspase-1, NLRP3, α -SMA, IL-1 β and IL-18. **Conclusion:** TFPGL can alleviate chronic inflammatory reaction and fibrosis in the model mice of chronic pancreatitis, which related to the inhibition of P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation.

[Key words] total flavonoids from *Psidium guajava* leaves; chronic pancreatitis; pancreatic fibrosis; nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3 (NLRP3); purinergic 2X7 receptor9 (P2X7R)

慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是各种病因引起胰腺组织和功能不可逆改变的慢性炎症性疾病, 主要临床表现为反复发作的上腹部疼痛和胰腺内、外分泌功能不全^[1]。由于 CP 发病率的逐年上升及患者较低的生活质量, 寻求有效治疗慢性胰腺炎的药物则尤为重要。胰腺纤维化是 CP 的重要病理过程, 可导致胰腺功能性组织丧失、胰管狭窄或扩张、腺泡细胞萎缩、胰管结石以及炎症细胞浸润等后果^[2]。抑制胰腺纤维化的发展可有效缓解 CP 症状并成为防止 CP 恶变的有效手段。但胰腺纤维化发病机制复杂, 目前尚无有效抑制胰腺纤维化的药物。胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs) 的激活是胰腺纤维化过程中的关键细胞, 研究显示核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide binding oligomerization domain like receptor 3, NLRP3) 的活化可激活下游半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteinyl aspartate-specific proteinase-1, Caspase-1), 从而导致促炎因子大量释放并激活 PSCs^[3]。细胞膜嘌呤能 2X7 受体 (purinergic P2X7 receptor, P2X7R) 是与 NLRP3 炎症体功能密切相关的 ATP (adenosine triphosphate, ATP) 门控离子通道。NLRP3 炎症体可将 P2X7R 激活引起的胞质 K⁺ 外流转化为促炎信号进一步激活炎症体^[4]。前期研究发现 P2X7R 拮抗剂 oxATP (oxidized ATP, oxATP) 可显著抑制胰腺的慢性炎症及纤维化进程, 提示 P2X7R-NLRP3 炎症体信号通路活化在 CP 慢性炎症及纤维化过程中起重要作用^[5]。

中药治疗具有多层次、多靶点、毒副作用小等特点, 对于防治慢性疾病有其独特优势^[6]。番石榴叶为桃金娘科番石榴属植物, 提取物主要成分为鞣质、三萜、挥发油、多糖和酮类化合物等, 其中黄酮类化合物含量为 1.27%, 是主要的生物活性成分^[7-8]。研究证明口腔填喂番石榴汁可减轻胆淤型肝损伤中肝纤维化程度并抑制肝细胞凋亡, 但其机制未明^[9]。据报道, 番石榴叶和果实中均含有丰富的黄酮类化合物^[10]。本实验选用番石榴叶总黄酮 (total flavonoids from *Psidium guajava* leaves, TFPGL) 为实验药物, 观察用药后小鼠胰腺组织中 P2X7R-NLRP3 炎症体信号通路的表达及纤维化程度, 旨在为 TFPGL 进一步研究及治疗慢性胰腺炎提供参考和依据。

1 材料

1.1 动物 6 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 50 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)2012-0001, 体质量 19 ~ 23 g。本动物实验经天津市医药科学研究所动物伦理委员会批准进行 (编号 IMPSEAEP-201609), 实验动物符合伦理委员会规定。实验期间自由采食饮水, 室内通风良好, 昼夜周期 12 h, 相对湿度 (50 ± 10)%, 室温 (22 ± 3) °C。

1.2 药物及试剂 番石榴叶 (河北安国同义中药饮片有限公司, 批号 13220422), 经天津市三潭医院胡志强副主任药师鉴定为桃金娘科植物番石榴 *Psidium guajava* 的干燥叶。雨蛙素及 oxATP (美国 Sigma 公司, 批号分别为 SLBK059A, A6779); α -平滑

肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体, NLRP3抗体, Caspase-1抗体(美国 Novus 公司, 批号分别为 NB600-531, NBP2-12446, NB100-56565); 天狼星红(美国 FLuka 公司, 批号 195251); BCA 蛋白质定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 PA197701); 小鼠 IL-1 β , IL-18 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒, Extraction 缓冲液 PTR(美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab210895, ab216165, ab193970); 苏木素(美国 CST 公司, 批号 14166S000206262017); 伊红染料(上海宏兹公司, 批号 20170220)。

1.3 仪器 KHB ST-360 型酶标仪(上海科华公司), HH-2 型数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), Kubota3500 型冷冻离心机(日本久保田公司); 超声波细胞破碎仪(美国 Sonics 公司); H1220 型烤片机, RM2235 切片机, ASP 200S 型全自动组织脱水机, EG 1150H 型包埋机, EG 1150C 型冷冻台, DM4000B 型显微镜, DM4000B 型图像采集仪(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组及造模 将 50 只 C57BL/6 小鼠随机均分为正常组, 模型组, oxATP 组($15 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), TFPGL 低、高剂量组($0.186, 0.372 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。除正常组外, 其余各组小鼠均采用反复腹腔注射雨蛙素的方法制备慢性胰腺炎小鼠模型, 单次注射剂量为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 溶于生理盐水 $200 \mu\text{L}$, 1 次/h, 6 次/d, 每周 1, 3, 5 注射, 连续注射 6 周^[5]。

2.2 TFPGL 的提取及含量测定 TFPGL 由天津市南开医院药理实验室采用 70% 乙醇回流提取-减压回收试剂-浓缩-过滤-石油醚处理-乙酸乙酯萃取等步骤提取。TFPGL 含量测定以芦丁为标准品测定吸光值, 以浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线。紫外分光光度法测量被检样品 500 nm 处吸光度(芦丁标准品在 500 nm 处有强吸光值, 设为测定波长), 代入标准曲线回归方程计算得出总黄酮含量为 19.8%。

2.3 给药剂量及测定方法 最后一次注射雨蛙素后, oxATP 组及 TFPGL 低、高剂量组小鼠分别予以 2 周 oxATP($15 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 溶于 $200 \mu\text{L}$ 的生理盐水)腹腔注射及 TFPGL($0.186, 0.372 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃。正常组动物在 8 周研究期间注射等量的生理盐水, 注射时间及次数同模型组。最后一次注射完成 24 h 后, 将所有小鼠脱颈处死, 剪取部分胰腺组织置于 10% 甲醛用于苏木精-伊红(HE)染色、天狼

星红苦味酸染色及免疫组化实验, 另一部分新鲜组织用于酶联免疫吸附实验。

2.4 小鼠胰腺组织 HE 染色 固定组织 24 h 后, 将组织脱水、包埋、切片后按 HE 染色常规操作进行脱蜡、染色、脱水、封片。晾片 24 h 后, 显微镜观察胰腺组织的病理结构变化。

2.5 胰腺胶原含量检查及定量分析 石蜡切片采用苦味酸天狼星红染色评估胰腺组织胶原含量。切片脱蜡处理后, 0.1% (质量分数)天狼星红-饱和苦味酸溶液在室温下滴染 1 h, 流水冲洗后苏木精复染 10 min。1% 盐酸分化 30 s, 自来水碱化后脱水透明, 中性树脂封片。对胰腺组织胶原类型及其表达程度用偏振光显微镜进行分析, 用 Image-Pro Plus 6 图像分析软件量化 I 型胶原(Col I)和 III 型胶原(Col III)的含量(以视野中黄红色及绿色胶原相对面积表示)和胶原容积分数(collagen volume fractions, CVFs)。

$$\text{CVFs} = (\text{绿色胶原面积} + \text{黄红色胶原面积}) / \text{总面积} \\ (\text{照片视野面积}) \times 100\%$$

2.6 免疫组化检测胰腺组织 Caspase-1, NLRP3, α -SMA 蛋白的表达 将胰腺组织石蜡切片 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘片 30 min 后室温复温 30 min。将石蜡切片置于新鲜二甲苯脱蜡及乙醇梯度脱水后, 3% H_2O_2 室温孵育 10 min。TBST 漂洗 5 min, 3 次后, 将切片置于 EDTA 溶液微波热修复 10 min。羊血清封闭 1 h, Caspase-1, NLRP3 或 α -SMA (均用羊血清工作液稀释至 1:200)孵育 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 漂洗 5 min, 3 次后, 生物素标记羊抗兔 IgG 常温孵育 1 h。DAB 显色 10 min, TBST 漂洗 5 min, 3 次, 苏木素复染、脱水、透明, 中性树脂封片, 镜下观察表达情况。

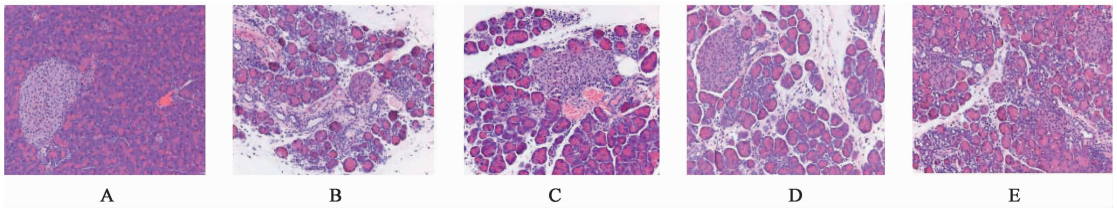
2.7 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 IL-1 β 及 IL-18 水平 新鲜胰腺组织用预冷 PBS 洗去血迹后, 称取胰腺组织 50 mg, 移入 2 mL 离心管, 加入预冷 PTR 缓冲液 500 μL 。利用超声波细胞破碎仪匀浆 10 s, 该过程在冰上进行。将组织匀浆液在冰上孵育 20 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 $18\,000 \times g$ 20 min, 吸取上清液至新 2 mL 离心管中。用 BCA 法检测蛋白浓度。测得样品蛋白质量浓度为 $13 \sim 16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用 PTR 缓冲液配平蛋白至相同质量浓度 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。应用 ELISA 实验试剂盒说明书方法测定 IL-1 β 及 IL-18 水平。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行数据统计分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间比较采用单因素方差分析, 组间数据比较采用 LSD-*t* 法, 两组组间比较采用配对样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CP 小鼠胰腺组织 HE 染色及胰腺慢性炎症及纤维化评分的影响 与正常组比较,模型组小鼠胰腺可见显著的慢性炎症及纤维化 ($P < 0.01$),表

现为腺体萎缩、组织纤维化、管状复合结构增生和炎性细胞浸润;与模型组比较,oxATP 组及 TFPGL 低、高剂量组细胞浸润、腺泡萎缩及纤维化程度评分较模型组均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. oxATP 组;D. TFPGL 0.186 $g \cdot kg^{-1}$ 组;E. TFPGL 0.372 $g \cdot kg^{-1}$ 组(图 2,3 同)

图 1 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Fig.1 Effect of TFPGL on pancreatic histopathology in CP mice(HE, $\times 200$)

表 1 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of TFPGL on histopathological score in pancreas of CP mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	炎性细胞 浸润评分	腺泡萎缩 评分	纤维化 评分
正常	-	0	0	0
模型	-	$3.49 \pm 0.31^{1)}$	$2.84 \pm 0.36^{1)}$	$3.27 \pm 0.42^{1)}$
oxATP	1.5×10^{-5}	$2.34 \pm 0.28^{2)}$	$1.81 \pm 0.34^{2)}$	$2.19 \pm 0.36^{2)}$
TFPGL	0.186	$2.56 \pm 0.22^{2)}$	$2.05 \pm 0.19^{2)}$	$2.33 \pm 0.25^{2)}$
	0.372	$2.15 \pm 0.23^{2)}$	$1.65 \pm 0.16^{2)}$	$2.08 \pm 0.18^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

3.2 对 CP 小鼠胰腺组织胶原含量及 CVFs 的影响

在偏光镜下,Col I 呈黄或红色,Col III 呈绿色。在光镜下,可见模型组,oxATP 组,TFPGL 低、高剂量组胶原特异性着色为红色,腺泡及胰岛萎缩,代之以胶原纤维。在偏光镜下可见,与正常组比较,雨蛙素注射后形成的慢性胰腺炎纤维化以 Col I 为主,且

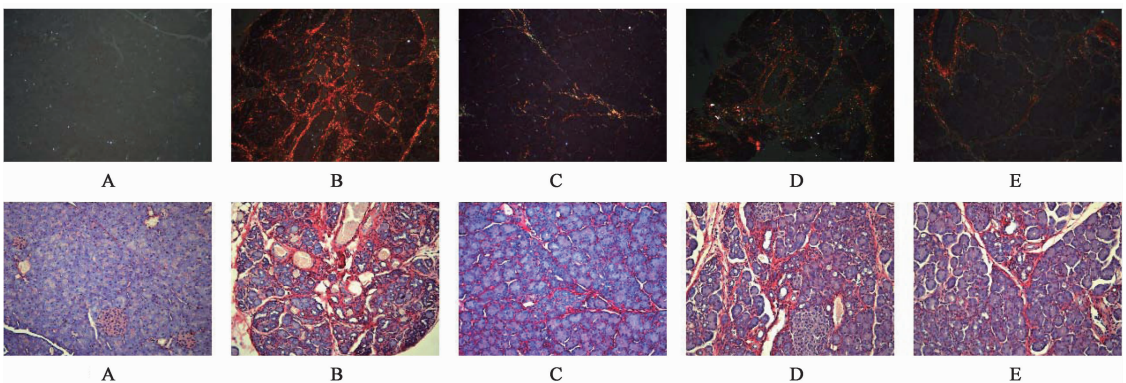
胶原含量显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,TFPGL 低、高剂量组 Col I,Col III 型胶原蛋白减少 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中 TFPGL 高剂量组 Col I 显著减少 ($P < 0.01$)。见表 2,图 2。

表 2 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织胶原含量及 CVFs 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TFPGL on pancreatic collagen content and CVFs in CP mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	Col I	Col III	CVFs /%
正常	-	74.23 ± 3.22	72.55 ± 3.16	2.05 ± 0.19
模型	-	$968.62 \pm 56.70^{1)}$	$144.55 \pm 12.09^{1)}$	$48.96 \pm 3.38^{1)}$
oxATP	1.5×10^{-5}	$494.34 \pm 34.34^{2)}$	$96.54 \pm 8.38^{2)}$	$23.65 \pm 1.41^{2)}$
TFPGL	0.186	$465.30 \pm 25.12^{2)}$	$112.26 \pm 8.74^{2)}$	$39.42 \pm 2.83^{2)}$
	0.372	$228.66 \pm 14.39^{3)}$	$60.74 \pm 5.26^{2)}$	$13.71 \pm 1.24^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。



上图为偏光镜下视野,下图为光镜下视野

图 2 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织胰腺纤维化的影响 (苦味酸天狼星, $\times 200$)

Fig.2 Effect of TFPGL on pancreatic fibrosis in CP mice (Picric acid-sirius red, $\times 200$)

3.3 对 CP 小鼠胰腺组织中 α -SMA, NLRP3, Caspase-1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组

胰腺组织中 α -SMA, NLRP3, Caspase-1 表达显著升高 ($P < 0.01$); 而 oxATP, TFPGL 治疗后, 胰腺组织中 α -SMA, NLRP3 和 Caspase-1 表达均较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 其中 TFPGL 高剂量组小鼠胰腺组织 α -SMA, NLRP3 和 Caspase-1 表达较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3, 图 3。

3.4 对 CP 小鼠胰腺组织中 IL-1 β 及 IL-18 含量的影响 与正常组比较, 模型组小鼠胰腺组织中 IL-1 β 及 IL-18 含量均显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组

表 3 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织中 α -SMA, NLRP3, Caspase-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of TFPGL on expression of α -SMA, NLRP3, Caspase-1 in pancreatic tissues of CP mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3	Caspase-1	α -SMA
正常	-	2 ± 0.18	4.5 ± 0.41	3 ± 0.27
模型	-	23 ± 2.07 ¹⁾	20 ± 1.8 ¹⁾	28 ± 2.52 ¹⁾
oxATP	1.5 × 10 ⁻⁵	1.01 ± 0.09 ²⁾	0.95 ± 0.01 ²⁾	10 ± 0.09 ²⁾
TFPGL	0.186	12 ± 1.08 ²⁾	13.5 ± 1.22 ²⁾	17 ± 1.53 ²⁾
	0.372	7.5 ± 0.68 ³⁾	9 ± 0.81 ³⁾	12 ± 1.08 ³⁾

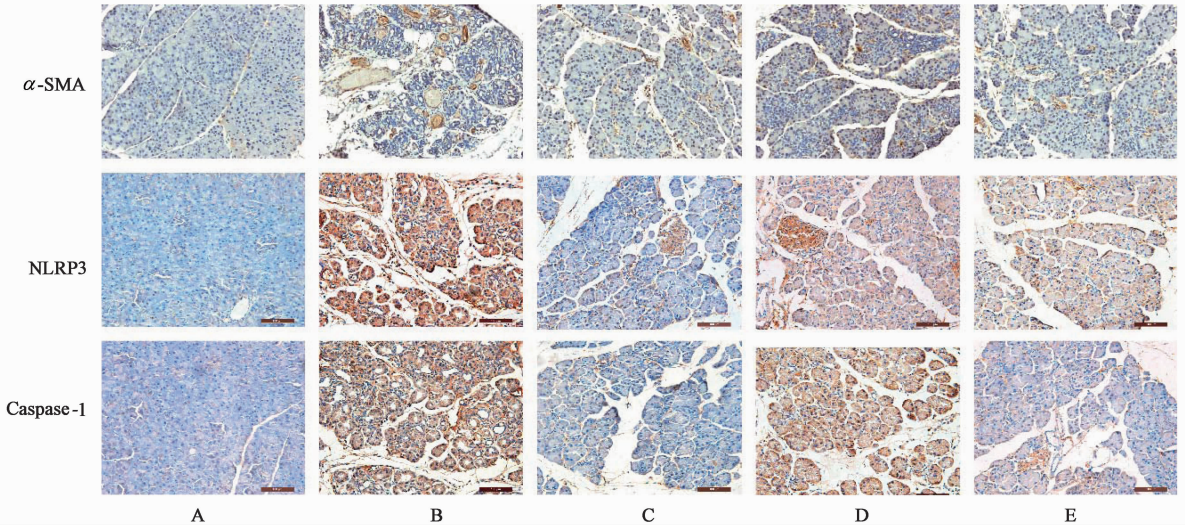


图 3 各组小鼠 α -SMA, NLRP3 和 Caspase-1 在胰腺组织中的表达 (IHC, ×200)

Fig. 3 Expressions of α -SMA, NLRP3 and Caspase-1 in pancreatic tissues of each groups (IHC, ×200)

比较, oxATP, TFPGL 治疗后, 小鼠胰腺组织中 IL-1 β 及 IL-18 含量呈现下降趋势 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 TFPGL 对 CP 小鼠胰腺组织中 IL-1 β 及 IL-18 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of TFPGL on IL-1 β and IL-18 content in pancreatic tissues of CP mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18
正常	-	34.23 ± 5.22	42.55 ± 3.16
模型	-	196.62 ± 16.70 ¹⁾	174.55 ± 12.09 ¹⁾
oxATP	1.5 × 10 ⁻⁵	94.34 ± 9.34 ²⁾	96.54 ± 8.38 ²⁾
TFPGL	0.186	116.32 ± 9.25 ²⁾	104.28 ± 9.68 ²⁾
	0.372	70.51 ± 6.32 ²⁾	83.92 ± 7.17 ²⁾

4 讨论

抑制胰腺纤维化已成为治疗 CP 具有前景的方法之一。活化的 PSCs 被认为是胰腺纤维化进程中的主要效应细胞, 如将 PSCs 作为治疗靶标可能干预或逆转胰腺纤维化进程。研究证明转化生长因子- β (TGF- β), 结缔组织生长因子 (CTGF), 血小板源性

生长因子 (PDGF), IL-10 等细胞因子可通过协同、拮抗或补充作用影响 PSCs 的活化^[11]。另外, PSCs 的发现揭示抗肝纤维化药物也可用于胰腺纤维化的治疗。NLRP3 炎症小体作为固有免疫的重要组成部分在慢性胰腺炎的发病过程中起着重要作用^[12-13]。前期的研究已证明抑制 NLRP3 炎症复合体的激活可抑制 PSCs 活化, 从而延缓慢性胰腺炎纤维化进程^[5]。P2X7R 作为 NLRP3 炎症体激活的上游受体可介导 NLRP3 的激活。NLRP3 激活后通过核苷酸结合域的同型相互作用寡聚化, 使热蛋白结构域 (pyrin domain, PYD) 聚集, 并与凋亡相关斑点样蛋白 (apoptotic speck protein, ASC) 的 PYD 相互作用, 诱导 Caspase-1 聚集、活化, 切割胞质目标分子如促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18^[14]。促炎因子持续刺激并激活 PSCs, 促进了胶原合成的病态性增多, 最终导致了胰腺纤维化^[15]。

中药作为 CP 的治疗药物之一, 其疗效和特色优势均得到临床检验。目前已有多项研究证明中药有效成分可抑制炎症及纤维化的进展, 如丹参酸乙、

表没食子儿茶素没食子酸酯、鳖甲提取物等,但其机制未明^[16-17]。其中黄酮类化合物如芹黄素可促进 PSCs 增殖和细胞凋亡,虎皮樟总黄酮、荔枝核总黄酮可抑制肝星状细胞的增殖^[18]。番石榴叶总黄酮是番石榴叶的主要活性成分,现有研究证明番石榴汁治疗后可减轻胆淤型肝损伤中的肝纤维化^[9]。本研究显示,经过持续 6 周雨蛙素注射后,HE 染色、天狼星红染色及 α -SMA 免疫组化染色结果均显示小鼠胰腺组织表现出明显的胰腺纤维化及腺泡萎缩、炎性细胞浸润等炎症表现。模型组 Col I, Col III 明显增多,且以 Col I 为主。NLRP3 和 Caspase-1 的蛋白表达水平明显升高,且小鼠纤维化程度与 NLRP3 炎症体信号通路中的 NLRP3, Caspase-1 蛋白表达趋势一致。模型组 α -SMA 免疫组化显示,染色部位多位于腺泡细胞周围及近导管、血管区域,这与 PSCs 在胰腺组织中的分布相符。P2X7R 拮抗剂及 TFPGL 治疗后,与模型组比较,HE 染色、苦味酸天狼星红染色及 α -SMA 免疫组化染色均显示小鼠胰腺纤维化程度受到了一定的抑制,且 NLRP3, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 蛋白表达减少,提示 TFPGL 可能通过抑制 NLRP3 炎症体的活性,间接减少 IL-1 β , IL-18, IL-33 等促炎因子的修饰与活化,从而抑制 PSCs 激活。NLRP3 炎症体也可促进 TGF- β I 及 TGF- β III 的表达,与 TGF β -Smad 信号通路之间互有影响,预示 TFPGL 可能抑制 NLRP3 炎症体激活间接抑制了 TGF- β I 表达,从而减少细胞外基质的生成^[19]。

综上所述,慢性胰腺炎过程中 P2X7R-NLRP3 信号通路激活,促炎因子 IL-1 β , IL-18 活化成熟并激活 PSCs,这与胰腺纤维化的进展密切相关。TFPGL 可抑制 NLRP3 炎症体的激活,并显著改善雨蛙素诱导的慢性胰腺炎小鼠纤维化。这为 TFPGL 的综合应用提供助益,并有待于进一步临床研究证明。

[参考文献]

[1] 苗毅,刘续宝,赵玉沛,等.慢性胰腺炎诊治指南(2014)[J].临床肝胆病杂志,2015,31(3):322-326.
[2] Braganza J M, Lee S H, Mecloy R F, et al. Chronic pancreatitis [J]. Lancet, 2011, 377(9772): 1184.
[3] Apte M V, Haber P S, Darby S J, et al. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis [J]. Gut, 1999, 44(4): 534.
[4] Franceschini A, Capece M, Chiozzi P, et al. The P2X7 receptor directly interacts with the NLRP3 inflammasome scaffold protein [J]. FASEB J, 2015, 29

(6): 2450-2461.
[5] ZHANG G X, WANG M X, NIE W, et al. P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and pancreatic fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis [J]. Pancreas, 2017, 46(10): 1327-1335.
[6] 朱国雪,吴纯伟,梁生旺,等.中药质量控制的数字化研究进展 [J].中国实验方剂学杂志,2016,22(11): 225-229.
[7] 彭珊珊,肖峰.无花果叶、番石榴叶中黄酮类化合物的提取与测定 [J].食品科学,2005,26(9): 300-302.
[8] 邵萌,王英,翦雨青,等.番石榴叶乙醇提取物的化学成分研究 [J].中国中药杂志,2014,39(6): 1024-1029.
[9] 仇凯.番石榴汁在胆淤型肝损伤中的保肝作用初步研究 [D].长沙:中南大学,2013.
[10] 舒积成.番石榴、马鞭草化学成分及马鞭草药材质量标准研究 [D].上海:上海中医药大学,2010.
[11] 余晓云,陈婕,侯晓华.胰腺星状细胞活化相关因子研究进展 [J].世界华人消化杂志,2006,14(20): 2009-2013.
[12] Yun-Hee Y, Ayinuer A, Bolormaa V, et al. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage [J]. Endocrinology, 2011, 152(11): 4039-4045.
[13] Aruna R, Geetha A, Suguna P. Rutin modulates ASC expression in NLRP3 inflammasome: a study in alcohol and cerulein-induced rat model of pancreatitis [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 396(1-2): 269-280.
[14] Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? [J]. Science, 2010, 327(5963): 296-300.
[15] Mews P, Phillips P, Fahmy R, et al. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis [J]. Gut, 2002, 50(4): 535-541.
[16] 曹雯,廖明,周燕,等.牛磺酸、表没食子儿茶素没食子酸酯和三羟基异黄酮联合用药对肝纤维化大鼠的治疗作用及机制 [J].中国实验方剂学杂志,2015, 21(4): 107-111.
[17] 熊莎,高建蓉,胡祖良,等.鳖甲提取物对抑制 TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响 [J].中国实验方剂学杂志,2017,23(19): 155-159.
[18] Mrazek A A, Porro L J, Bhatia V, et al. Apigenin inhibits pancreatic stellate cell activity in pancreatitis [J]. J Surg Res, 2015, 196(1): 8-16.
[19] WANG W, WANG X, CHUN J, et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium [J]. J Immunol, 2013, 190(3): 1239-1249.

[责任编辑 周冰冰]