

• 药理与临床 •

基于内质网自噬系统探究泽泻汤对高脂血症急性胰腺炎的防治作用

张荣展¹, 汤甜甜¹, 黄芳¹, 宋婧², 周佳^{1*}

1. 中国药科大学中药学院 中药药理与中医药学系, 江苏 南京 211198

2. 厦门大学 实验动物中心, 福建 厦门 361102

摘要: 目的 研究泽泻汤对高脂血症急性胰腺炎(hyperlipidemia acute pancreatitis, HLAP)的防治作用及机制。方法 雄性 C57BL/6J 小鼠以高脂饮食喂养, ig 泽泻汤干预 8 周后, ip 雨蛙素(50 $\mu\text{g/kg}$)制备 HLAP 模型。采用试剂盒检测小鼠血清中三酰甘油(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)水平及淀粉酶(amylase, AMY)、脂肪酶(lipase, LPS)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性;采用油红 O 染色观察肝脏组织脂质蓄积情况,苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏、胰腺组织病理学变化;采用 Western blotting 检测胰腺组织中血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、核因子 E2 相关基因(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)、免疫球蛋白重链结合蛋白(binding immunoglobulin protein, BIP)、真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)、p-eIF2 α 、Bcl-2 相互作用蛋白(Bcl-2 interacting coiled-coil protein-1, Beclin-1)、自噬蛋白 5(autophagy-related protein 5, ATG5)、自噬蛋白 12(autophagy-related protein 12, ATG12)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II/I(microtubule-associated protein light chain 3-II/I, LC3-II/I)及溶酶体相关膜蛋白 1(lysosomal associated membrane protein 1, LAMP-1)表达。采用棕榈酸(200 mmol/L)和雨蛙素(10 nmol/L)处理胰腺腺泡 AR42J 细胞构建 HLAP 细胞模型,给予泽泻汤干预后,采用试剂盒检测细胞培养上清液中 LPS、T-SOD 活性;采用 DCFH-DA 荧光探针、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)及 MMP 水平;采用透射电镜观察细胞超微结构及自噬变化;采用 Western blotting 检测细胞中 HO-1、Nrf2、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)、BIP、eIF2 α 、p-eIF2 α 、Beclin-1、ATG5、LC3-II/I 和 LAMP-1 表达。结果 与模型组比较,泽泻汤能够降低小鼠血清中 TC、TG 水平及 AMY、LPS 活性($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),抑制肝脏组织中的脂质蓄积,减轻肝脏及胰腺组织病理损伤,同时上调血清及胰腺腺泡细胞中 SOD、CAT 活性($P<0.05$ 、 0.01),下调 ROS 水平($P<0.001$),上调胰腺组织及细胞中 HO-1、Nrf2、LAMP1 表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),下调 Keap1、BIP、eIF2 α 、p-eIF2 α 、Beclin-1、ATG5、ATG12 及 LC3-II/I 表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 泽泻汤可以防治 HLAP,其作用机制可能与抑制内质网应激诱导的过度自噬、恢复自噬通量有关。

关键词: 泽泻汤;高脂血症急性胰腺炎;氧化应激;线粒体功能障碍;内质网应激;自噬;白术内酯 II;白术内酯 III;泽泻醇 A;泽泻醇 B;23-乙酰泽泻醇 B;23-乙酰泽泻醇 C

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)11-3705-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.013

Effect of Zexie Decoction on hyperlipidemia acute pancreatitis based on endoplasmic reticulum-autophagy system

ZHANG Rongzhan¹, TANG Tiantian¹, HUANG Fang¹, SONG Jing², ZHOU Jia¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine Pharmacology and Traditional Chinese Medicine, College of Traditional Chinese Medicine, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. Laboratory Animal Center, Xiamen University, Xiamen 361102, China

Abstract: Objective To investigate the preventive effect and mechanism of Zexie Decoction (泽泻汤) on hyperlipidemia acute

收稿日期: 2024-01-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81973410)

作者简介: 张荣展(1999—),男,硕士研究生,研究方向为中药药理学。E-mail: zrz758910@163.com

*通信作者: 周佳(1986—),女,副教授,硕士生导师,研究方向为中药药理学。E-mail: cpuzj_2016@163.com

pancreatitis (HLAP). **Methods** Male C57BL/6J mice were fed with a high-fat diet and ig Zexie Decoction for eight weeks, HLAP model was prepared by ip cerulein (50 $\mu\text{g/kg}$). Levels of triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and activities of amylase (AMY), lipase (LPS), total superoxide dismutase (T-SOD), catalase (CAT) in the serum of mice were detected by kit; Lipid accumulation in liver tissue was observed by oil red O staining, histopathological changes in liver and pancreatic tissue were observed by HE staining; The protein expressions of heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), binding immunoglobulin protein (BIP), eukaryotic translation initiation factor 2 α (eIF2 α), p-eIF2 α , Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1 (Beclin-1), autophagy-related protein 5 (ATG5), autophagy-related protein 12 (ATG12), microtubule-associated protein light chain 3-II/I (LC3-II/I) and lysosomal associated membrane protein-1 (LAMP-1) in pancreatic tissue were detected by Western blotting. AR42J cells were incubated with palmitic acid (200 mmol/L) and cerulein (10 nmol/L) to establish the HLAP cell model after intervention with Zexie Decoction, activities of LPS and T-SOD in culture supernatant of cells were detected by kit; The DCFH-DA fluorescent probe and mitochondrial membrane potential (MMP) fluorescent probe were used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) and MMP levels; The changes in ultrastructure and autophagy of cells were observed by electron microscopy; The protein expressions of HO-1, NRF2, kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), BIP, eIF2 α , p-eIF2 α , Beclin-1, ATG5, LC3-II/I and LAMP-1 in cells were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, Zexie Decoction reduced the levels of TC, TG and activities of AMY and LPS in serum of mice ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), inhibited the accumulation of lipid droplets in liver tissues, attenuated the pathological damage of liver and pancreatic tissues, up-regulated the activities of SOD and CAT in serum and pancreatic acinar cells ($P < 0.05, 0.01$), down-regulated the level of ROS ($P < 0.001$), up-regulated the expressions of HO-1, Nrf2 and LAMP1 in pancreatic tissues and cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), down-regulated the expressions of Keap1, BIP, eIF2 α , p-eIF2 α , Beclin-1, ATG5, ATG12 and LC3-II/I ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Zexie Decoction can prevent HLAP and its mechanism may be related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced excessive autophagy and restoration of autophagic flux.

Key words: Zexie Decoction; hyperlipidemia acute pancreatitis; oxidative stress; mitochondrial dysfunction; endoplasmic reticulum stress; autophagy; atractylenolide II; atractylenolide III; alisol A; alisol B; alisol B 23-acetate; alisol C 23-acetate

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是一种胰腺外分泌炎症性疾病, 伴有组织损伤和坏死等情况^[1], 会引起剧烈腹痛和多器官功能障碍, 病情严重者可导致全身炎症反应综合相关的胰腺外器官衰竭, 死亡率为 1%~5%^[2]。高甘油三酯血症是急性胰腺炎的第 3 大病因^[3]。随着生活水平以及饮食结构的改变, 现代社会高脂血症急性胰腺炎 (hyperlipidemia acute pancreatitis, HLAP) 的发病率逐年激增, 并有年轻化趋势。虽然 HLAP 的症状与其他病因引起的急性胰腺炎相似, 但 HLAP 的临床严重程度和并发症发生率往往更高^[4]。然而, 目前尚缺乏有效的药物可以改变 HLAP 的病程, 给社会造成了非常沉重的负担。因此, 如何科学、有效地防治 HLAP 的发生发展已经是医学研究的迫切需要。

HLAP 发生时脂质过氧化物增加, 胰腺细胞膜稳定性降低, 氧自由基产生增多, 以致难以抗衡脂质过氧化对胰腺和胰外脏器的损伤^[5]。而线粒体作为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生的主要来源, 也是 ROS 的主要攻击对象, AP 发生时引起了严重的线粒体损伤^[6]。线粒体功能失调可导致自噬异常。最近的研究表明, 自噬受损是实验和人

类胰腺炎的主要病理事件^[7]。此外, 内质网与自噬关系十分密切, 在八肽胆囊收缩素过量刺激时会引起细胞内发生内质网应激, 并主要通过其中的蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) /真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 途径促进了自噬起始阶段自噬小泡的形成^[8]。在实验性胰腺炎的腺泡细胞中积累的自噬液泡主要是大的自噬酶体, 含有大量受损线粒体等内容物, 表明溶酶体降解效率低下。研究表明, 无论是敲除自噬蛋白 5/7 (autophagy-related protein 5/7, ATG5/7), 在自噬体形成水平上破坏, 还是自噬完成时破坏, 如溶酶体相关膜蛋白 1/2 (lysosomal associated membrane protein 1/2, LAMP1/2) 基因敲除, 上述情况均会表现出胰蛋白酶原活化以及外分泌胰腺中内质网应激等反应^[9]。

高脂血症是 AP 的常见病因之一, 两者常互为因果。根据临床特征, 高脂血症当属于“膏”“脂”范畴, 系由痰浊、淤血壅塞脉道而成, 与肝、脾、肾 3 脏联系密切^[10]。高血脂状态下, 机体血液黏稠度增高, 血液循环障碍以及大量游离脂肪酸的产生,

都会导致 AP。临床研究表明,HLAP 治疗的关键在于调节血脂,改善胰腺微循环状态^[11-12]。《金匱要略》中经典方剂泽泻汤在治疗高脂血症研究中作用显著,泽泻汤以泽泻为君药,以白术为臣药,二者相互配伍,共奏祛湿化痰、健运脾胃之效^[13]。现代药理学研究表明,泽泻汤具有调血脂和抗动脉粥样硬化等作用^[14]。基于以上背景,本研究提出泽泻汤保护 HLAP 的机制可能与调控腺泡细胞自噬途径有关,为中西医结合防治 HLAP 等疾病提供理论基础及实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 60 只,体质量(20±2) g,由厦门大学模式动物研究所提供,符合普通实验动物质量标准,动物许可证号 SCXK(闽)2018-0003,饲养于厦门大学动物实验中心内,温度控制在 21~24 ℃,相对湿度 40%~70%,光/暗周期为 12 h,自由摄食与饮水,适应性饲养 1 周。本研究进行的实验遵守了伦理准则,并获得了厦门大学动物伦理委员会的批准,伦理编号为 XMULAC20231000。

1.2 细胞

大鼠胰腺外分泌细胞 AR42J(货号 CL-0025)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药品与试剂

泽泻(四川眉山,批号 201107)、白术(安徽亳州,批号 210601)经中国药科大学中药学院黄芳教授分别鉴定为泽泻科植物东方泽泻 *Alisma orientale* (Sam.) Juzep. 的干燥块茎、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎;雨蛙素(质量分数≥95%,批号 S62702)购自上海源叶生物科技有限公司;高脂饲料(批号 D12492)购自南通特洛菲饲料科技有限公司;AR42J 细胞专用培养基(批号 CM-0025)、重组胰蛋白酶消化液(批号 PB180241)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;脂肪酶检测试剂盒(批号 A054-2-1)、三酰甘油(triglyceride, TG)检测试剂盒(批号 A110-1-1)、总胆固醇(total cholesterol, TC)检测试剂盒(批号 A111-1-1)购自南京建成生物工程研究所;淀粉酶检测试剂盒(批号 E-BC-K006-M)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)检测试剂盒(批号 E-BC-K020-M)、检测试剂盒(批号 E-EL-00060c)、过氧化氢酶(catalase, CAT)检测试剂盒(批号 E-BC-K031-M)、

购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 P0009)、ROS 检测试剂盒(批号 S0033S)、油红 O 染色试剂盒(批号 C0157M)购自上海碧云天生物科技股份有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测试剂盒(JC-10,批号 CA1310)购自北京索莱宝科技有限公司;微管相关蛋白轻链 3-II/I(microtubule-associated protein light chain 3-II/I, LC3-II/I)抗体、Beclin-1 抗体、ATG5 抗体、ATG12 抗体、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)抗体、核因子 E2 相关基因(nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)抗体、Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)抗体、免疫球蛋白重链结合蛋白(binding immunoglobulin protein, BIP)抗体、eIF2 α 抗体、p-eIF2 α 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、鼠抗兔 IgG 二抗购自美国 CST 公司,批号分别为 12741、3459、1294、4180、43966、12721、8047、3177、5324、9721、2118、7074;LAMP-1 抗体(批号 ab24179)购自英国 Abcam 公司。

1.4 仪器

CLM-050B-8 型 CO₂ 细胞培养箱(新加坡艺思高科技有限公司);PowerPac™ HC 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon 5200 型化学发光系统(上海天能生命科学有限公司);SW-CJ-1C 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);JXFSTPRP-24 型研磨仪(上海净信实业发展有限公司);1-14K 型冷冻超速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Multiskan SkyHigh 型多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司);IX53 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Tanon 4600 型系列全自动化学发光/荧光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 泽泻汤的制备

按 5:2 比例将泽泻和白术分别粉碎成粗粉,加 10 倍量的水浸泡 1 h 后,提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,将 2 次滤液混合并减压浓缩成浸膏,1 g 浸膏对应 2 g 生药量。采用 HPLC 法测定白术内酯 II、白术内酯 III、泽泻醇 A、泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 B、23-乙酰泽泻醇 C 的质量分数,分别为 0.136、0.123、0.244、0.239、0.259、0.252 mg/g。除菌,装

瓶,置于 4℃ 冰箱保存备用。细胞给药前,将泽泻汤浸膏溶于 1 mL 超纯水中,制成 1 g/mL 的泽泻汤药液,超声处理后未见不溶物,通过 0.22 μm 滤膜滤过除菌后放于 -20℃ 保存。

2.2 动物分组、造模及给药

随机挑取雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,体质量 18~22 g,适应性饲养 1 周后,所有动物实验设计遵循 3R 原则。按随机数字表法分为高脂对照组、模型组和泽泻汤高、低剂量 (36、4 g/kg,参照临床剂量进行预实验后设置的安全剂量) 组,每组 15 只。各组给予高脂饲料喂养,高脂对照组与模型组 ig 给予蒸馏水,各给药组 ig 泽泻汤,1 次/d,连续 8 周。末次给药结束后,禁食 12 h,高脂对照组小鼠每隔 1 h ip 1 次生理盐水,共注射 7 次。其余各组小鼠每隔 1 h ip 1 次雨蛙素 (50 μg/kg),共注射 7 次^[15]。

2.3 小鼠血清中 TC、TG 水平及淀粉酶、脂肪酶、T-SOD、CAT 活性的测定

所有小鼠均在第 1 次注射雨蛙素 18 h 后麻醉处死,眼眶取血并解剖小鼠,取出肝脏、胰腺组织,并保存于 -80℃ 冰箱。收集各组小鼠新鲜血液,4℃、3 000×g 离心 15 min,收集上层血清。按照试剂盒说明书检测各组小鼠血清中 TC、TG 水平及淀粉酶、脂肪酶、T-SOD、CAT 活性。

2.4 油红 O 检测小鼠肝组织的脂质沉积情况

小鼠肝组织经常规固定后切片,无菌水清洗 3 次,室温下置于油红 O 工作液中避光孵育 10 min,苏木素复染,甘油密封,显微镜下观察并拍照。

2.5 HE 染色检测小鼠肝脏、胰腺组织的病理变化

小鼠肝脏、胰腺组织经福尔马林固定后,采用流水反复冲洗 12 h,切片 (0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm),使用 80%、90%、95%、100% 乙醇各脱水 2 h,二甲苯透明后石蜡包埋,切成 4 μm 左右厚度的薄片,贴片后二甲苯透明,给予 100%、95%、85%、75% 梯度乙醇复水,HE 染色,封片,显微镜下观察并拍照。

2.6 细胞培养

AR42J 细胞用含 20% 胎牛血清、1% 青链霉素的 Ham's F-12K 培养基,于 5% CO₂、37℃ 培养箱中进行培养。2~3 d 换 1 次液,培养 1 周时以 1:2~1:4 的比例进行传代。

2.7 细胞分组、造模及给药

将对数生长期的 AR42J 细胞以 5×10⁵ 个/mL 接种到 6 孔板中,每孔 2 mL,培养 24 h 使细胞贴壁。设置对照组、模型组和泽泻汤高、中、低剂量

(2.0、1.0、0.5 mg/mL) 组。对照组加入基础培养基;模型组加入用基础培养基配制的棕榈酸 (终浓度 200 mmol/L) 和雨蛙素 (终浓度 10 nmol/L) 培养 24 h,构建 HLAP 细胞模型;各给药组在加入棕榈酸和雨蛙素前 24 h 加入不同质量浓度的泽泻汤,37℃、5% CO₂ 培养箱中共培养 48 h。

2.8 CCK-8 法检测 AR42J 细胞活力

取对数生长期的 AR42J 细胞以 2.5×10³ 个/mL 接种于 96 孔板中,培养 24 h 使细胞贴壁。将泽泻汤母液用完全培养基分别稀释成 0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、16.000 mg/mL 的给药溶液,每孔加入药物,另设置不加入药物的对照组,培养 24 h,每孔加入 100 μL CCK-8 试剂,置于培养箱中培养 4 h 后,采用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.9 细胞培养上清液中脂肪酶、T-SOD 活性的测定

按照“2.7”项下方法进行分组和给药,收集各组细胞培养上清液,4℃、3 000×g 离心 15 min,收集上层培养基。按照试剂盒说明书测定各组细胞培养上清液中脂肪酶、T-SOD 活性。

2.10 泽泻汤对 HLAP 模型细胞 ROS 水平的影响

AR42J 细胞以 2.5×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,按照“2.7”项下方法进行分组和给药后,用稀释后的 DCFH-DA 孵育细胞,调节细胞密度为 1×10⁶ 个/mL,孵育 20~30 min,使探针和细胞充分接触。选择激发波长 488 nm、发射波长 525 nm,用倒置荧光显微镜观察荧光强弱。

2.11 泽泻汤对 HLAP 模型细胞 MMP 的影响

AR42J 细胞以 2.5×10⁵ 个/mL 接种于 24 孔板中,每孔 1 mL,按照“2.7”项下方法进行分组和给药后,各孔加入 JC-10 染色工作液 1 mL,充分混匀,避光孵育 20 min,加入 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次后,用倒置荧光显微镜观察并拍照。

2.12 泽泻汤对 AR42J 细胞中自噬小体形成的影响

按照“2.7”项下方法进行分组和给药,收集各组细胞,用 2.5% 戊二醛固定细胞 24 h 以上,用 2% 多二甲砷酸钠缓冲液冲洗 3 次,再用 1% 锇酸固定 2 h,双蒸水冲洗 3 次,依次置于梯度乙醇中脱水,丙酮和 EPON-812 (1:1) 包埋剂处理,聚合后半薄切片,甲苯胺蓝染色,光镜下定位并超薄切片,再进行枸橼酸铅和醋酸铀双染,最后在透射电镜下观察各组细胞超微结构并拍照。

2.13 Western blotting 检测各组小鼠胰腺组织和 AR42J 细胞中相关蛋白表达

按照“2.7”项下方法进行分组和给药,收集各组细胞,用 RIPA 裂解缓冲液裂解并提取各组小鼠胰腺组织和 AR42J 细胞总蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭后,分别加入 HO-1、Nrf2、Keap1、eIF2 α 、p-eIF2 α 、BIP、Beclin-1、ATG5、ATG12、LC3-II/I、LAMP-1 (1:1 000) 和 GAPDH 抗体 (1:10 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 1 h,采用 ECL 化学发光试剂盒观察蛋白显色情况,通过 Image J 软件分析条带灰度值。

2.14 统计学分析

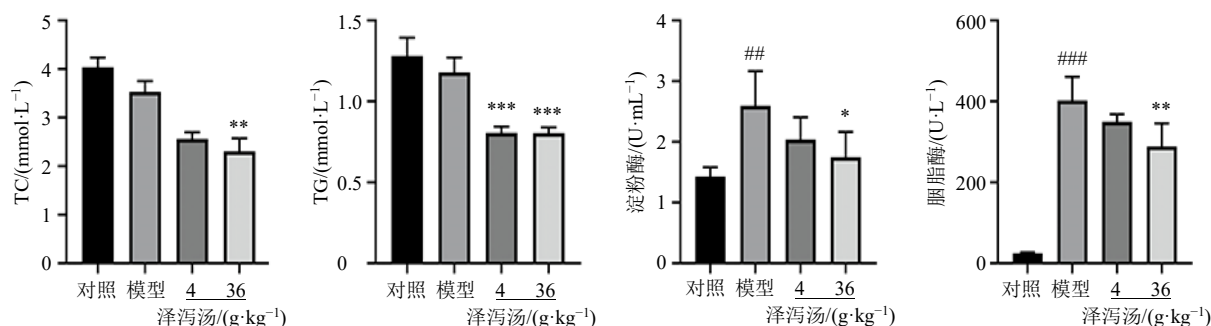
所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 GraphPad prism

9.0 软件进行数据分析。采用单因素方差分析,再通过 Tukey's 检验来校正。

3 结果

3.1 泽泻汤对 HLAP 小鼠血清中 TC、TG 水平及淀粉酶、脂肪酶活性的影响

如图 1 所示,与模型组比较,泽泻汤高剂量组小鼠血清中 TC 水平显著降低 ($P < 0.01$),泽泻汤各剂量组小鼠血清中 TG 水平显著降低 ($P < 0.001$)。淀粉酶和脂肪酶活性升高是 AP 的关键指标。与对照组比较,模型组小鼠血清中淀粉酶、脂肪酶活性明显升高 ($P < 0.01$ 、 0.001);与模型组比较,泽泻汤高剂量组小鼠血清中淀粉酶、脂肪酶活性明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明,HLAP 小鼠造模成功,相较高脂对照组,HLAP 组小鼠炎症反应及损伤程度更重,泽泻汤干预后可明显减轻病变严重程度。



与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下同。
 $^{*}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 泽泻汤对 HLAP 小鼠血清中 TC、TG 水平及淀粉酶、脂肪酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Effect of Zexie Decoction on TC, TG levels, and amylase, lipase activities in serum of HLAP mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.2 泽泻汤对 HLAP 小鼠肝脏及胰腺组织病理变化的影响

油红 O 染色 (图 2-A) 结果显示,对照组和模型组小鼠肝脏内可见分布密集的脂滴,红色较重,形状大而圆且部分脂滴连成片状;与模型组比较,泽泻汤低、高剂量组肝脏组织脂肪染色面积、红色脂滴数量及红色深度均有不同程度的减轻。

肝脏组织的 HE 染色 (图 2-B) 结果显示,对照组和模型组小鼠肝脏组织中肝小叶结构受损明显,淋巴细胞填充严重,大多数肝细胞呈弥漫性脂肪变性,呈气球样变性;与模型组比较,泽泻汤低、高剂量组小鼠肝脏组织的气球样变性,脂肪变性以及炎性介质填充出现不同程度改善,但以泽泻汤高剂量组最为明显。

胰腺组织的 HE 染色 (图 2-C) 结果显示,与对

照组比较,模型组小鼠胰腺组织水肿明显加重,腺泡细胞呈现空泡化,炎性细胞浸润严重;与模型组比较,泽泻汤低、高剂量组小鼠胰腺组织形态清晰可见,细胞排列整齐,整个胰腺组织病变得到改善。

3.3 泽泻汤改善 HLAP 小鼠的氧化应激水平

如图 3-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 T-SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,泽泻汤各剂量组血清中 T-SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),泽泻汤高剂量组血清中 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$)。如图 3-C、D 所示,对照组和模型组小鼠胰腺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平较低,与模型组比较,泽泻汤高剂量组小鼠胰腺组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。以上结果表明泽泻汤能够上调 Nrf2、HO-1 表达,从而发挥抗氧化应激的作用。

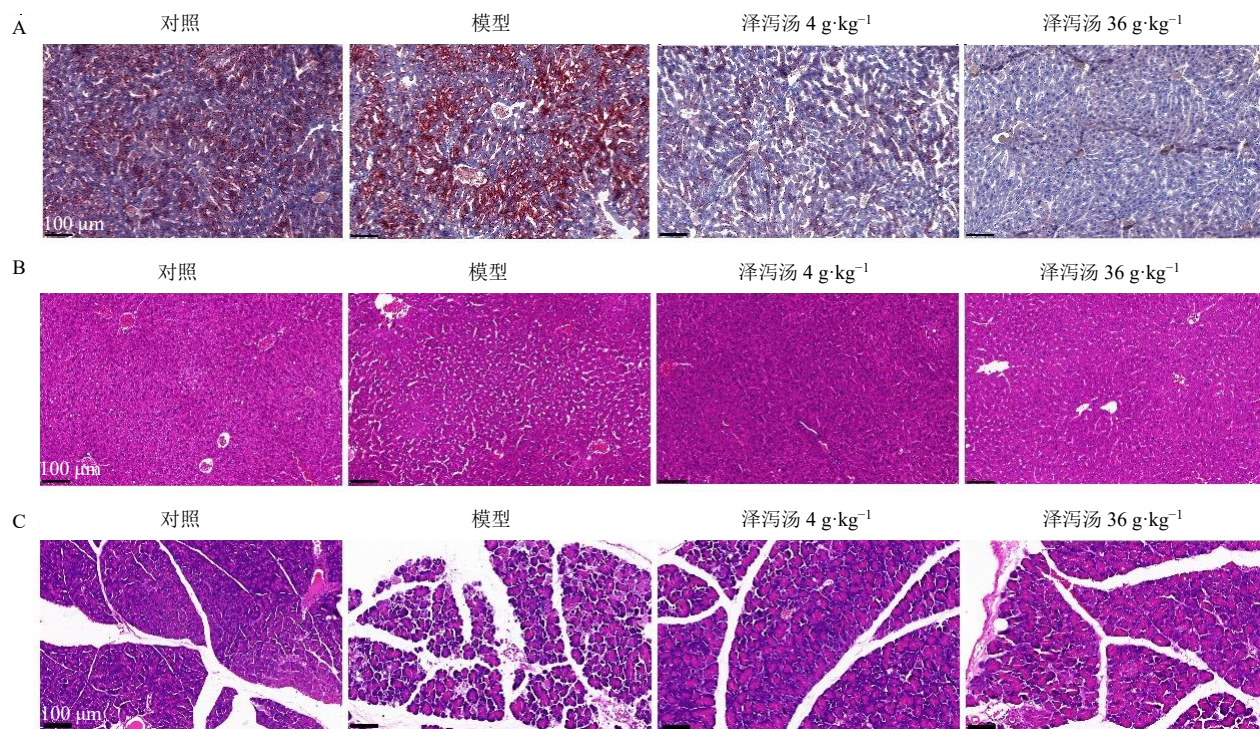
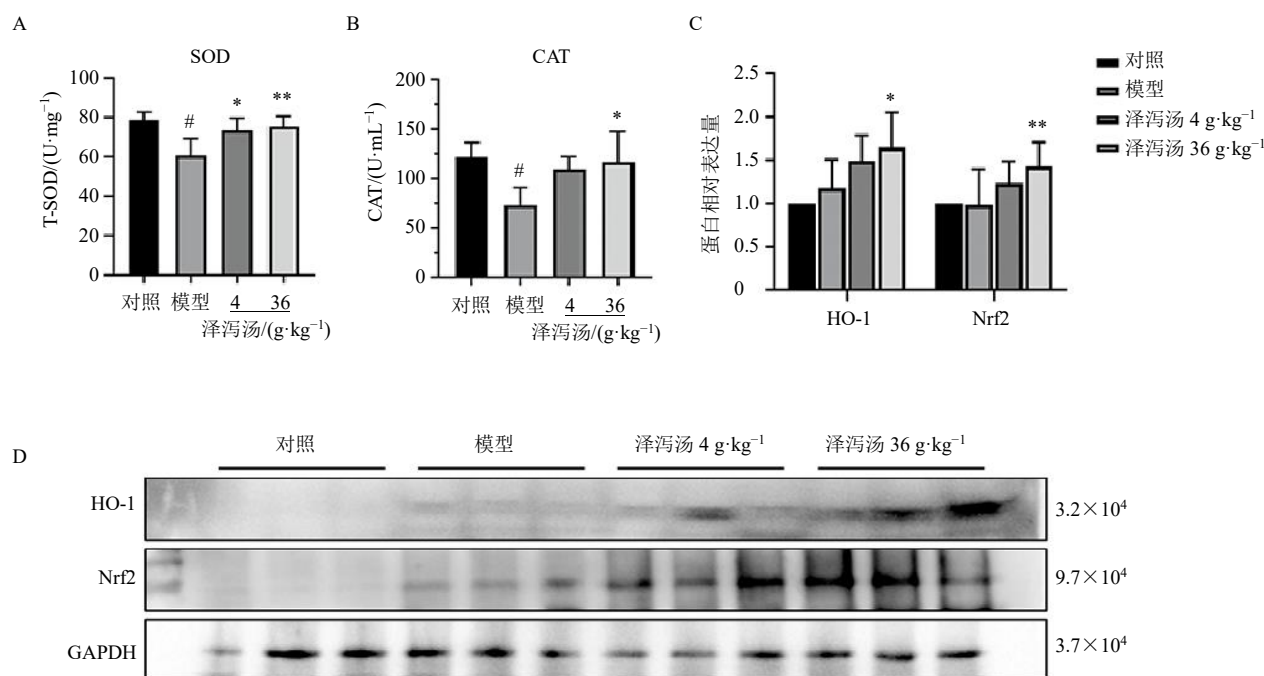


图 2 各组小鼠肝脏油红 O 染色 (A)、HE 染色 (B) 及胰腺 HE 染色 (C) 结果 ($\times 200$)

Fig. 2 Results of liver oil red O staining (A), HE staining (B) and pancreatic HE staining (C) in each group of mice ($\times 200$)



A、B-泽泻汤对 HLAP 小鼠血清中 T-SOD、CAT 活性的影响 ($n = 5$); C、D-泽泻汤对 HLAP 小鼠胰腺组织中 HO-1、Nrf2 蛋白表达的影响 ($n = 9$)。

A, B-effect of Zexie Decoction on activities of T-SOD and CAT in serum of HLAP mice ($n = 5$); C, D-effect of Zexie Decoction on expressions of HO-1 and Nrf2 proteins in pancreatic tissue of HLAP mice ($n = 9$).

图 3 泽泻汤对 HLAP 小鼠氧化应激水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of Zexie Decoction on oxidative stress level in HLAP mice ($\bar{x} \pm s$)

3.4 泽泻汤通过抑制内质网应激诱导的自噬改善 HLAP

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠胰腺组织中 eIF2 α 、p-eIF2 α 、BIP、Beclin-1、ATG5、ATG12、LC3-II/I 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 溶酶体相关膜蛋白 LAMP-1 的表达显著降低 ($P<0.05$), 结果表明内质网应激会引起自

噬流受损的现象; 与模型组比较, 泽泻汤各剂量组小鼠胰腺组织中 eIF2 α 、p-eIF2 α 和 BIP、Beclin-1、LC3-II/I 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$ 、 0.001), LAMP-1 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 泽泻汤高剂量组 ATG5、ATG12 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.001$)。上述结果表明, 泽泻汤可以通过抑制内质网应激, 恢复自噬通量从而改善 HLAP。

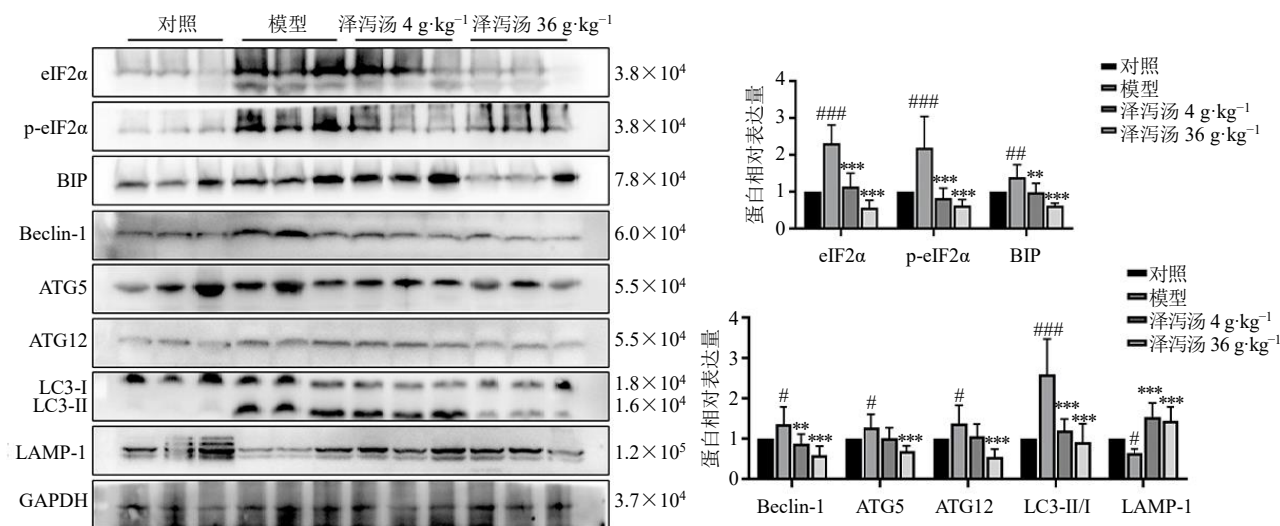


图 4 泽泻汤对 HLAP 小鼠内质网应激诱导自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

Fig. 4 Effect of Zexie Decoction on expressions of autophagy-related proteins induced by endoplasmic reticulum stress in HLAP mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

3.5 泽泻汤改善 AR42J 细胞损伤和氧化应激

CCK-8 法检测泽泻汤对 AR42J 细胞活力的影响, 如图 5-A 所示, 泽泻汤 (0.125、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000 mg/mL) 对细胞活力无显著影响, 说明泽泻汤在该质量浓度范围内对 AR42J 细胞没有毒性作用。选择质量浓度为 0.5、1.0、2.0 mg/mL 的泽泻汤进行后续研究。如图 5-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组 AR42J 细胞培养上清液中脂肪酶活性明显升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, 泽泻汤各剂量组脂肪酶、T-SOD 活性均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。以上结果表明, 棕榈酸和雨蛙素联用可诱导胰腺腺泡细胞损伤, 泽泻汤干预后有效缓解损伤程度。

为了进一步研究泽泻汤抗氧化应激的作用, 采用 DCF 荧光探针检测 ROS 的生成。如图 5-D、E 所示, 与对照组比较, 模型组绿色荧光增强 ($P<0.001$); 与模型组比较, 泽泻汤各剂量组绿色荧光显著降低 ($P<0.001$)。Western blotting 结果 (图 5-F、G) 显示, 与对照组比较, 模型组 Nrf2、HO-1 蛋白

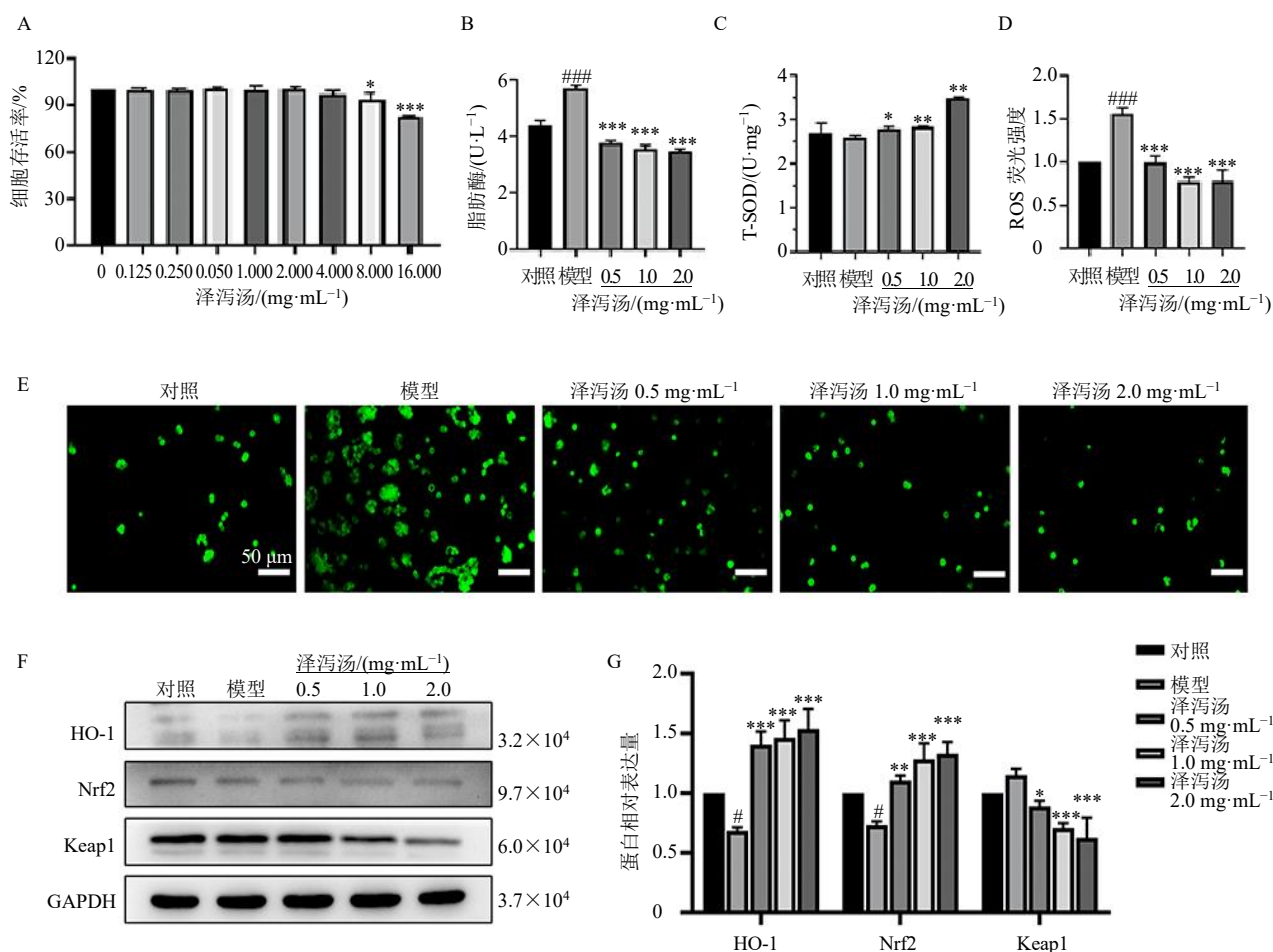
表达水平显著降低 ($P<0.05$), Keap1 蛋白表达水平呈升高趋势; 与模型组比较, 泽泻汤各剂量组 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), Keap1 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001)。表明泽泻汤可以改善 AR42J 细胞的氧化损伤。

3.6 泽泻汤恢复 AR42J 细胞 MMP 水平

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组红色荧光降低, 绿色荧光增强, MMP 大幅下降 ($P<0.01$), 线粒体功能异常; 给予不同质量浓度的泽泻汤干预后, MMP 呈剂量相关性升高 ($P<0.05$ 、 0.001), 表明线粒体功能趋于恢复。以上结果表明, 泽泻汤可以恢复腺泡细胞线粒体功能。

3.7 泽泻汤对 AR42J 细胞超微结构及自噬的影响

如图 7 所示, 对照组细胞多圆形, 核内染色质分布均匀, 未见自噬样结构及凋亡细胞; 模型组细胞多肿胀, 核内染色质轻度凝集, 可见自噬体样结构明显增多, 典型者呈现双层膜样的液泡状结构; 泽泻汤干预后, AR42J 细胞中核内染色质分布较均匀, 偶见极少量自噬体样结构。



A-不同质量浓度的泽泻汤对 AR42J 细胞存活率的影响; B-泽泻汤对 AR42J 细胞培养上清液中脂肪酶活性的影响; C-泽泻汤对 AR42J 细胞中 SOD 活性的影响; D、E-泽泻汤对 AR42J 细胞 ROS 含量的影响; F、G-泽泻汤对 AR42J 细胞 HO-1、Nrf2、Keap-1 蛋白表达的影响。

A-effect of different concentrations of Zexie Decoction on survival rate of AR42J cells; B-effect of Zexie Decoction on lipase activity in supernatant of AR42J cell culture; C-effect of Zexie Decoction on SOD activity in AR42J cells; D-effect of Zexie Decoction on ROS content in AR42J cells; F, G-effect of Zexie Decoction on expressions of HO-1, Nrf2 and Keap-1 proteins in AR42J cells.

图 5 泽泻汤改善 AR42J 细胞损伤和氧化应激 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Zexie Decoction improves cell damage and oxidative stress in AR42J cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8 泽泻汤通过抑制内质网应激诱导的自噬改善 AR42J 细胞损伤

如图 8 所示,与对照组比较,模型组 AR42J 细胞中 eIF2 α 、p-eIF2 α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),自噬相关蛋白 Beclin-1、ATG5 表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,泽泻汤各剂量组 eIF2 α 、p-eIF2 α 、Beclin-1、ATG5 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),LAMP-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001);泽泻汤中、高剂量组 BIP 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),LC3-II/I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。上述结果表明,泽泻汤可以通过抑制内质网应激,恢复自噬通量从而改善胰腺腺泡损伤。

4 讨论

AP 是临床上常见的急腹症之一,主要病因包括胆系疾病、酗酒、高脂血症等。近年来,传统饮食结构被打破,高脂高蛋白饮食的摄入,导致 HLAP 发病率逐年攀升^[16]。根据中医理论,各种内源性因素作用机体均可造成脾的功能障碍、脂类的合成降解异常而形成高脂血症,过多脂质在脉管中堆积阻塞会促进瘀血产生,瘀血化热引起胰腺组织微循环障碍,最终导致胰腺炎的发生^[17]。在临床上主要通过血浆置换等手段缓解 HLAP^[18],没有明确的药物可以有效治疗 HLAP,因此在本研究中未使用阳性药作为对照。传统中药成为治疗 HLAP 的新选择。泽泻汤出自张仲景所著的《金匮要略》,有利水除饮、

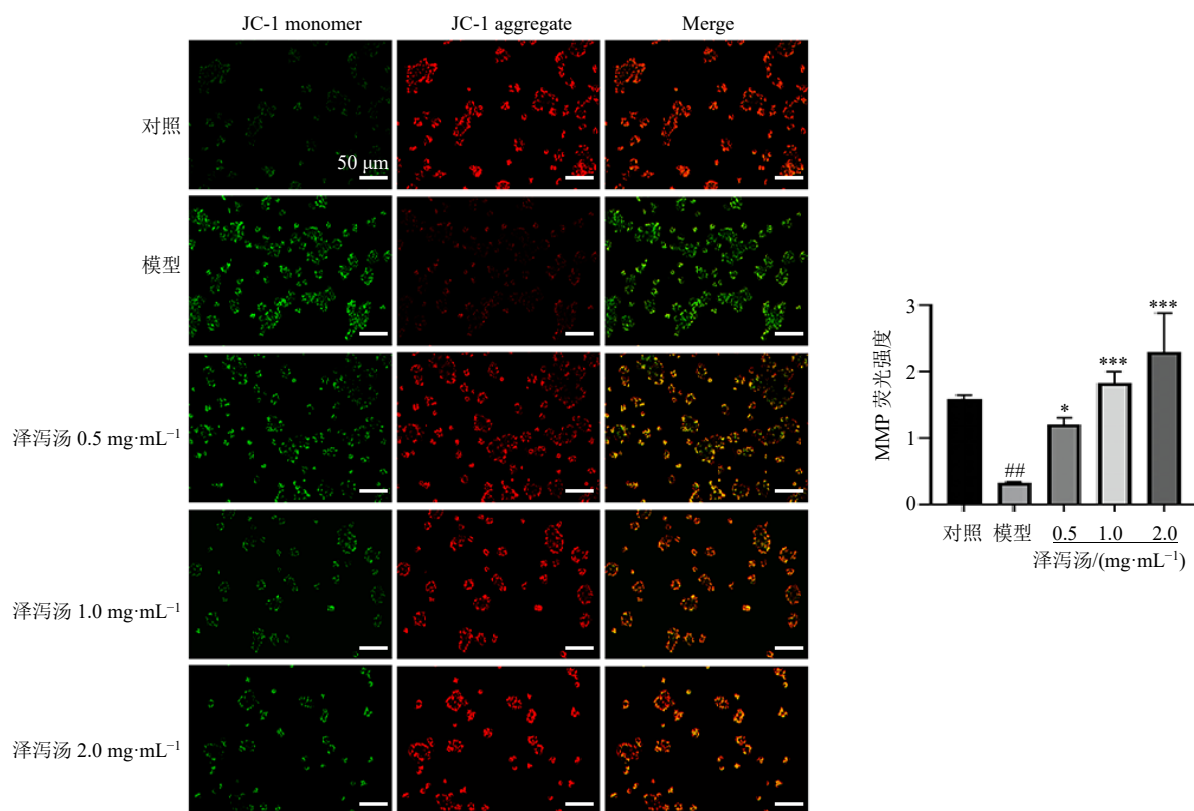
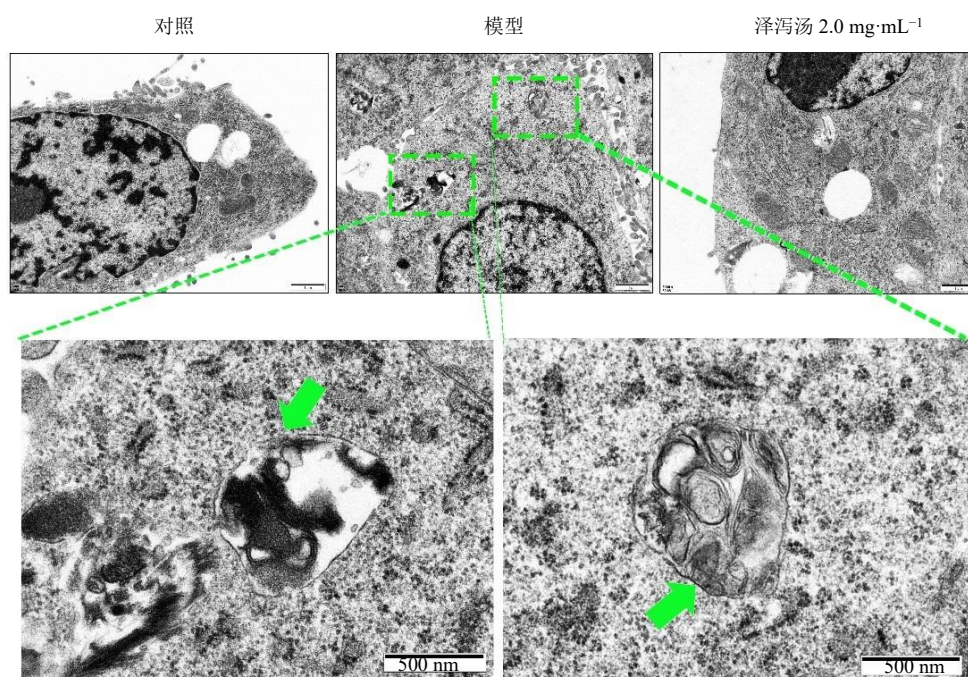


图 6 泽泻汤对 AR42J 细胞中 MMP 水平的影响 ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of Zexie Decoction on MMP level in AR42J cells ($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



箭头表示自噬体结构。

Arrows indicate autophagosome structure.

图 7 泽泻汤对 AR42J 细胞超微结构及自噬的影响 ($\times 5\ 000$)

Fig. 7 Effect of Zexie Decoction on ultrastructure and autophagy of AR42J cells ($\times 5\ 000$)

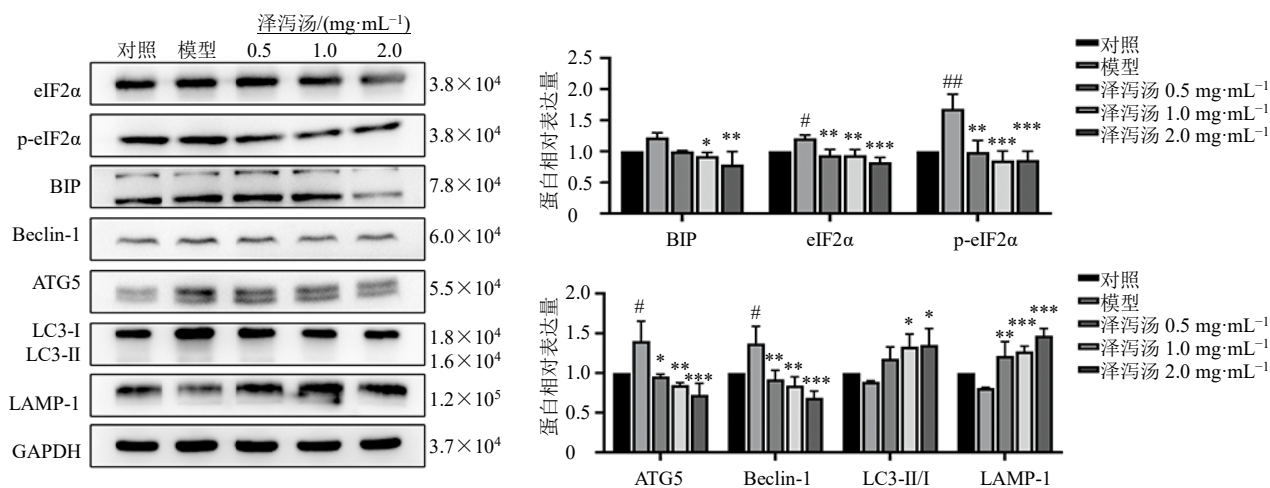


图 8 泽泻汤对 AR42J 细胞中内质网应激诱导自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of Zexie Decoction on expressions of autophagy-related proteins induced by endoplasmic reticulum stress in AR42J cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

健脾制水之功效。现代药理学研究也证明，泽泻汤具有改善脂质代谢紊乱^[19]、抗炎^[20]等药理作用，白术内酯 III 和泽泻醇 A 可通过腺苷酸激活蛋白激酶（adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK）途径减轻高脂肪饮食引起的肥胖和代谢紊乱^[21]。王亚平等^[22]发现高脂血症可进一步加重 AP 的组织损伤程度，HLAP 的损伤程度较非 HLAP 更严重。有研究报道高脂血症可异常激活内质网应激反应，通过内质网应激肌醇依赖性激酶 1（endoplasmic reticulum stress inositol-requiring enzyme-1, IRE1）/c-Jun 氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase, JNK）通路诱导自噬活性，导致心肌组织细胞发生自噬性死亡^[23]，脂质代谢异常在肝脏能够激活 AMPK/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin, mTOR）通路活化自噬，进一步活化胰蛋白酶原引起腺泡细胞的凋亡损伤^[24]。但是泽泻汤防治 HLAP 的具体机制尚不清楚。

本研究首先通过检测小鼠血清中 TG、TC、淀粉酶及脂肪酶等生化指标确认了泽泻汤具有调血脂、抗炎的作用，能够明显改善小鼠肝脏组织脂滴蓄积以及胰腺组织坏死、空泡化现象从而防治 HLAP。氧化应激是 HLAP 的主要发病机制之一，氧化系统与抗氧化防御系统的失衡，堆积过量的 ROS，导致蛋白质、脂质等氧化损伤，进而加重 HLAP 严重程度^[25-26]。本研究发现泽泻汤组小鼠血清中 T-SOD、CAT 活性显著升高，胰腺组织以及腺泡细胞中 HO-1、Nrf2 蛋白表达水平显著升高，提

示泽泻汤发挥抗氧化损伤的作用。线粒体作为 ROS 产生的主要来源，ROS 的过度生成会导致 MMP 下降，线粒体功能失调^[8]。结果显示，模型组 AR42J 细胞 ROS 荧光强度显著增强，MMP 大幅下降，绿色荧光增强，进一步验证了氧化损伤、线粒体功能障碍是 HLAP 的主要病理特征，上述现象在泽泻汤干预之后均得到逆转。

许多研究发现脂质代谢异常与内质网应激的发生密切相关，高浓度的脂肪酸可以破坏内质网，诱导内质网应激，而内质网应激介导的胰腺腺泡细胞损伤是 AP 发生的早期环节^[27]。内质网与自噬关系十分密切，Logsdon 等^[28]用 cerulein 诱导 AP 小鼠模型，发现炎症因子白细胞介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）破坏内质网稳态，释放大量的钙离子于细胞质中，引起钙离子依赖性自噬异常现象。研究发现在胆囊收缩素（cholecystokinin, CCK）过量刺激下，引起细胞内内质网应激，主要通过 PERK/eIF2 α 途径促进自噬起始阶段自噬小泡的形成^[29]。内质网应激诱导的过度自噬以及自噬通量受损是 AP 主要病理特征之一。本研究结果显示，模型组小鼠胰腺组织及腺泡细胞中 eIF2 α 、p-eIF2 α 、BIP 蛋白表达显著上调，验证了在 HLAP 中，内质网应激诱导过度自噬，溶酶体功能下降，引起自噬通量受损。泽泻汤干预后，能不同程度下调小鼠胰腺组织及腺泡细胞中 eIF2 α 、p-eIF2 α 、BIP、Beclin-1、ATG5、LC3-II/I 蛋白表达，上调 LAMP-1 表达，维持自噬通量的动态平衡，发挥调血脂、抗炎、防治 HLAP 的作用。

综上, 本研究通过体内实验考察了泽泻汤对 HLAP 模型小鼠氧化损伤及内质网应激诱导自噬的作用, 发现泽泻汤可以显著上调血清及组织中 T-SOD、CAT、HO-1、Nrf2 等指标, 下调 eIF2 α 、p-eIF2 α 、BIP、Beclin-1、ATG5、ATG12、LC3-II/I 等自噬相关蛋白, 并上调溶酶体相关蛋白 LAMP-1 的表达。在体外实验中, 进一步验证了泽泻汤能够改善氧化损伤及线粒体功能失调, 并通过抑制内质网诱导的过度自噬, 恢复自噬通量, 从而发挥调血脂、抗炎、防治 HLAP 的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Habtezion A, Gukovskaya A S, Pandol S J. Acute pancreatitis: A multifaceted set of organelle and cellular interactions [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 1941-1950.
- [2] Petrov M S, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(3): 175-184.
- [3] Valdivielso P, Ramírez-Bueno A, Ewald N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis [J]. *Eur J Intern Med*, 2014, 25(8): 689-694.
- [4] de Pretis N, Amodio A, Frulloni L. Hypertriglyceridemic pancreatitis: Epidemiology, pathophysiology and clinical management [J]. *United European Gastroenterol J*, 2018, 6(5): 649-655.
- [5] 冯云霞, 张维丽, 谢沛霖, 等. 葱白提取物对高脂血症大鼠 SREBP2/PCSK9 信号通路和线粒体功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(1): 220-225.
- [6] Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia-reperfusion and remodeling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(7): 165768.
- [7] Mareninova O A, Hermann K, French S W, et al. Impaired autophagic flux mediates acinar cell vacuole formation and trypsinogen activation in rodent models of acute pancreatitis [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(11): 3340-3355.
- [8] Gukovsky I, Pandol S J, Gukovskaya A S. Organellar dysfunction in the pathogenesis of pancreatitis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(10): 2699-2710.
- [9] 巩会杰, 唐建荣, 姚兰杰, 等. 青蒿琥酯通过 miR-21/PTEN 通路对人大肠癌 CCL229 细胞恶性生物学行为抑制作用的研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(8): 2331-2342.
- [10] 王鑫玉, 赵一慕, 高云, 等. 普洱茶素 II 改善高脂血症 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1157-1163.
- [11] 崔钰莹, 朱禹潼, 关溪, 等. 高脂血症急性胰腺炎中医研究进展 [J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2023, 29(5): 708-711.
- [12] 鞠爱霞, 周育生, 单万亭, 等. 泽泻汤对高脂血症模型小鼠 CYP450 酶亚型的影响 [J]. *药学研究*, 2023, 42(12): 959-963.
- [13] 安君, 裴帅, 丁辉, 等. 基于网络药理学和分子对接的泽泻汤治疗高脂血症作用机制研究 [J]. *中国现代中药*, 2023, 25(3): 549-558.
- [14] 余一鸣, 胡永慧, 张莉野, 等. 中药调血脂的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(17): 3636-3644.
- [15] 李全生, 陈晓理, 周总光, 等. 雨蛙素腹腔注射法建立小鼠急性坏死性胰腺炎模型的实验研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2004, 11(4): 335-337.
- [16] 金子鸿, 张国强. 高脂血症性急性胰腺炎的研究进展 [J]. *中日友好医院学报*, 2021, 35(2): 110-112.
- [17] 农振勇, 李凯风. 调脂饮食治疗血脂异常的临床疗效观察 [J]. *中国民康医学*, 2007, 19(3): 147-149.
- [18] 牛荠薪, 孟宪萌, 高允海. 中西医结合治疗高脂血症性急性胰腺炎的研究进展 [J]. *实用中医内科杂志*, 2024, 38(1): 105-109.
- [19] Xie Z S, Li E W, Gao G, et al. Zexie Tang targeting FKBP38/mTOR/SREBPs pathway improves hyperlipidemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 290: 115101.
- [20] Wu J S, Zhang F Q, Ruan H N, et al. Integrating network pharmacology and RT-qPCR analysis to investigate the mechanisms underlying ZeXie Decoction-mediated treatment of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 722016.
- [21] Li Q, Tan J X, He Y, et al. Atractylenolide III ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by activating hepatic adiponectin receptor 1-mediated AMPK pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(4): 1594-1611.
- [22] 王亚平, 赵振, 唐莉, 等. 血管内皮细胞生长因子诱导自噬致高脂血症性急性胰腺炎大鼠胰腺组织细胞炎症损伤 [J]. *生理学报*, 2022, 74(2): 225-236.
- [23] Sozen E, Yazgan B, Tok O E, et al. Cholesterol-induced autophagy via IRE1/JNK pathway promotes autophagic cell death in heart tissue [J]. *Metabolism*, 2020, 106: 154205.
- [24] Sun L, Zhang S, Yu C Y, et al. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2015, 309(11): E925-E935.
- [25] Liu X N, Zhu Q T, Zhang M, et al. Isoliquiritigenin ameliorates acute pancreatitis in mice via inhibition of oxidative stress and modulation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7161592.
- [26] Norberg K J, Nania S, Li X, et al. RCAN1 is a marker of oxidative stress, induced in acute pancreatitis [J]. *Pancreatol*, 2018, 18(7): 734-741.
- [27] 袁国林. 内质网应激反应介导细胞凋亡的机制研究进展 [J]. *国外医学: 生理、病理科学与临床分册*, 2003, 23(6): 614-617.
- [28] Logsdon C D, Ji B A. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(6): 362-370.
- [29] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation [J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.

[责任编辑 李亚楠]