

大黄及大黄蒽醌类有效成分对胰腺腺泡细胞损伤的保护作用

吴 丽, 徐春蕾, 季易彦, 蔡宝昌(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 探讨大黄及大黄蒽醌类有效成分对胰腺腺泡细胞 AR42J 损伤的保护作用。**方法** 取生长良好的 AR42J 细胞, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度接种于 6 孔板中, 设空白对照组、模型组、大黄含药血清(10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%)组, 每组 3 个复孔, 培养 24 h 待细胞贴壁后弃上清, 空白对照组加入含 10% 空白血清培养液、模型组用含 10% 空白血清培养液配置造模液(雨蛙素终浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 脂多糖终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、大黄含药血清组分别加入不同浓度的含药血清, 继续培养 24 h 后, 检测细胞上清液中淀粉酶含量, 取细胞检测细胞内胰蛋白酶、脂肪酶的含量。另取 AR42J 细胞, 以 $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度接种于 6 孔板中, 设正常对照组、模型组、大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚组, 上述大黄蒽醌类成分分别设 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共 4 个剂量, 每组 3 个复孔, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下, 分别培养 3, 6, 12, 24 h 后, 取细胞上清液, 检测上清液中淀粉酶的含量。**结果** 大黄含药血清在 2.5% 到 10% 浓度范围内, 能显著抑制 AR42J 细胞内蛋白酶、脂肪酶含量, 降低细胞培养上清液中淀粉酶的水平。对大黄蒽醌的研究结果提示, 大黄素在模型复制 3 h 后即能显著降低 AR42J 细胞分泌淀粉酶, 且呈明显的剂量依赖性, 在 24 h 内, 大黄素各剂量组均表现出较强的抑制淀粉酶的作用; 芦荟大黄素及大黄酸在 40 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量下也能显著降低细胞上清液中淀粉酶水平, 而大黄素甲醚及大黄酚作用较弱。**结论** 大黄蒽醌是大黄保护胰腺腺泡细胞损伤的重要物质基础, 其中, 大黄素的作用最强。

关键词: 大黄; 大黄蒽醌; 胰腺腺泡; 细胞损伤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0590-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.017

Protective Effects of Radix et Rhizoma Rhei and Its Anthraquinone Effective Components on Pancreatic Acinar Cell Injury

WU Li, XU Chunlei, JI Yiyan, CAI Baochang (School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of Radix et Rhizoma Rhei (RRR) and its anthraquinone effective components on injury of pancreatic acinar AR42J cells. **Methods** Rat pancreatic acinar AR42J cells were cultured in 6-well plates at the concentration of $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, and were divided into normal control group (10% blank serum), acute pancreatitis (AP) model group (10% blank serum culture with $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ of cerulein and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of lipopolysaccharide added), RRR-containing serum (10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625% medicated serum) groups. After culturing for 24 continuous hours, the amylase content in the cell supernatant, and the cellular trypsin and lipase were measured. In the other experiment, AR42J cells were cultured in 6-well plates at the concentration of $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, and were divided into normal control group, model group, rhubarb anthraquinone groups (emodin, rhein, aloe-emodin, chrysophanol, and physcion at final concentration of 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively). After culturing for 3, 6, 12, 24 hours under the conditions of 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 , the level of amylase in cell supernatant was measured. **Results** Within the dose range of 2.5% to 10%, RRR-containing serum could inhibit the content of the trypsin and lipase in AR42J cells significantly, and at the same time, could decrease the level of amylase in the supernatant of cell culture fluid. The results of rhubarb anthraquinone showed that emodin could

收稿日期: 2014-04-11

作者简介: 吴丽, 女, 讲师, 研究方向: 中医药治疗消化系统疾病机制研究。Email: wuli87107@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81073022); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2011ZXYX4-006)。

significantly decrease the secretion of amylase in AR42J cells after modeling for 3h, presenting an obvious dose-dependent manner. Within the limits of 24h, emodin at different concentrations showed strong inhibitory effects on amylase levels. Aloe-emodin and rhein at the concentrations of 40 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could also significantly reduce amylase levels in the cell supernatant, but the effects of the physcion and chrysophanol were weak. **Conclusion** Anthraquinone is the important material of Radix et Rhizoma Rhei which could protect pancreatic acinar cells from damage, and the protective effect of emodin is the strongest.

Keywords: Radix et Rhizoma Rhei; Rhubarb anthraquinone; Pancreatic Acinar Cells; Cell injury

大黄是临床治疗急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的最常用中药,本课题组前期研究发现^[1],大黄附子汤对 AP 大鼠血清淀粉酶水平的影响与实验大鼠血中大黄蒽醌类物质呈明显的正相关,因此,本研究以大鼠胰腺腺泡 AR42J 细胞为对象,采用雨蛙素(caerulein, CAE)联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)方法^[2]制备 AP 的体外细胞模型,探讨大黄含药血清对胰腺腺泡细胞 AR42J 损伤的影响,并进一步比较其中的主要药效物质大黄蒽醌类成分对 AR42J 细胞功能的影响,从腺泡细胞损伤角度研究大黄治疗 AP 的作用物质基础。

1 材料与方法

1.1 AR42J 细胞系 AR42J 细胞系,购于美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),产品编号: CRL-1492TM。

1.2 动物 健康 SD 大鼠,雄性,清洁级,体质量 180~220 g,由南京中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号: SCXK(沪)20080033。

1.3 药物及试剂 生大黄饮片,南京海昌中药集团公司,批号: 110530; 大黄素,大黄酚,大黄酸,大黄素甲醚,芦荟大黄素(纯度达 99.9%以上),均为中国药品生物制品检验所产品,批号分别为 110756, 110796, 110757, 110758, 110795。F12 培养粉, DMSO, 雨蛙素(caerulein, CAE), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 均为 Sigma 公司产品; 淀粉酶试剂盒、脂肪酶试剂盒、蛋白酶试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品,批号: 20120720, 20120613, 20120708。

1.4 仪器 SW-CJ-1G 型超净工作台,苏州净化设备有限公司; MCo-20AIC 型 CO₂ 培养箱,日本三洋科研医疗设备公司; A1301026 型低温高速离心机,上海艾测电子科技有限公司; Synekgy HT 型酶联免疫检测仪,美国 BIO-Tek 公司; CKX-31 型生物显微镜,日本 Olympus 公司。

1.5 大黄含药血清制备^[3] 取大黄 30 g,用 8 倍量水,大火煎至沸腾后改用小火煎 20 min,用纱布滤过药液,药渣加 8 倍量水再煎 20 min,纱布滤过,合并 2 次滤液,旋转蒸发,60 ℃浓缩至 150 mL,制成大黄水煎液。

取 SD 大鼠 30 只,分为空白对照组(蒸馏水)和大黄组(3 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 15 只,灌胃给药,每天 2 次,连续 3 d。第 3 天晚 8 点开始禁食不禁水,第 4 天早上灌胃 2 h 后,颈总动脉取血,分离血清,4 ℃ 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上层血清,于 56 ℃温育 30 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装,置 -20 ℃冰箱保存备用。临用前用空白血清倍比稀释含药血清,分别设 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% 共 5 个浓度梯度。

1.6 大黄蒽醌溶液的制备 分别称取大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚标准品 10 mg,溶于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO),超声助溶 15 min × 2 次,分别制备成终浓度为 3.7 × 10⁴ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3.5 × 10⁴ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3.7 × 10⁴ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3.9 × 10⁴ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、3.5 × 10⁴ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液,分装后置于 -20 ℃冰箱中保存备用。

1.7 实验方案 取生长良好的 AR42J 细胞,以 1 × 10⁵ mL⁻¹ 浓度接种于 6 孔板中,设空白对照组、模型组、大黄含药血清组(10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%),共 7 组,每组设 3 个复孔,培养 24 h 待细胞贴壁后弃上清,空白对照组加入含 10% 空白血清培养液、模型组细胞加入造模液 200 μL (CAE 终浓度为 10⁻⁷ mol·L⁻¹, LPS 终浓度为 10 mg·L⁻¹)及 1.8 mL 培养液,大黄含药血清组加入 200 μL 造模液、200 μL 不同浓度的含药血清及 1.6 mL 培养液,继续培养 24 h 后,检测细胞上清液中淀粉酶的含量,取细胞检测细胞内胰蛋白酶、脂肪酶的含量。

另取生长良好的 AR42J 细胞,以 1 × 10⁵ mL⁻¹ 浓度接种于 6 孔板中,设正常对照组,模型组,大黄素、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚组,

上述大黄蒽醌类成分分别设 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共 4 个剂量, 并观察 3, 6, 12, 24 h 共 4 个培养时间点, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 待细胞贴壁后弃上清, 正常对照组加入培养液、模型组加入 200 μL 造模液及 1.8 mL 培养液, 大黄蒽醌类成分组, 在模型复制前分别加入 200 μL 造模液、200 μL 不同浓度药物及 1.6 mL 培养液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 条件下, 分别培养 3, 6, 12, 24 h 后, 取细胞上清液, 检测上清液中淀粉酶的含量。

1.8 胰蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶含量测定 上述各组胰腺腺泡细胞经不同刺激剂作用至相应时间点后, 4 $^{\circ}\text{C}$, 800 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 收集细胞及培养上清液, 细胞破碎后检测细胞中蛋白酶及脂肪酶含量, 取细胞上清液稀释 10 倍, 用于检测酶含量, 按试剂盒说明书步骤操作检测淀粉酶活性。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 15.0 统计软件, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大黄含药血清对 AR42J 细胞内胰蛋白酶含量的影响 CAE 联合 LPS 刺激 AR42J 细胞 24 h 后, AR42J 细胞合成的蛋白酶、脂肪酶及淀粉酶水平显著增高, 与正常对照组细胞比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)。2.5 %, 5 %和 10 %大黄含药血清组能降低细胞合成胰蛋白酶和淀粉酶的水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$); 5 %及 10 %大黄含药血清组能显著降低细胞内脂肪酶水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 1。

表 1 大黄含药血清对AR42J 细胞合成蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$, $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 1 Effects of RRR-containing serum on intracellular trypsin, lipase and amylase activation in AR42J cells

组别	剂量	胰蛋白酶	脂肪酶	淀粉酶
正常对照组	—	0.11 $\pm$ 0.03	1.19 $\pm$ 0.28	30.33 $\pm$ 4.33
模型组	—	0.51 $\pm$ 0.10**	3.65 $\pm$ 0.71**	73.48 $\pm$ 9.80**
大黄含药血清组	10%	0.31 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	2.15 $\pm$ 0.32 $\Delta\Delta$	51.91 $\pm$ 7.33 $\Delta\Delta$
	5%	0.29 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	2.44 $\pm$ 0.55 Δ	52.93 $\pm$ 7.64 $\Delta\Delta$
	2.5%	0.37 $\pm$ 0.08 Δ	2.97 $\pm$ 0.49	57.20 $\pm$ 11.27 Δ
	1.25%	0.44 $\pm$ 0.07	3.21 $\pm$ 0.93	72.06 $\pm$ 8.40
	0.625%	0.44 $\pm$ 0.03	3.19 $\pm$ 0.88	69.82 $\pm$ 10.48

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.2 大黄素对AR42J 细胞上清液淀粉酶含量的影响 结果显示, CAE 联合 LPS 刺激 AR42J 细胞 3 h 后, 细胞上清液中淀粉酶含量即显著升高($P<0.01$), 且在 24 h 内持续上升, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$)。在 3 h 时间点, 大黄素 4 个剂量组均能显著降低 AR42J 细胞上清液中淀粉酶的含量, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。在 6~24 h 范围内, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄素组能显著降低细胞上清液中淀粉酶水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 2。

表 2 大黄素对 AR42J 细胞淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 2 Effects of emodin on the level of amylase in AR42J cells supernatant

组别	剂量 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	淀粉酶含量 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	—	8.13 $\pm$ 1.77	20.83 $\pm$ 8.08	36.04 $\pm$ 7.56	52.58 $\pm$ 14.99
模型组	—	21.26 $\pm$ 4.05**	43.43 $\pm$ 7.50**	71.82 $\pm$ 7.40**	96.10 $\pm$ 13.59**
大黄素组	80	8.56 $\pm$ 1.20 $\Delta\Delta$	26.84 $\pm$ 5.02 $\Delta\Delta$	40.00 $\pm$ 8.18 $\Delta\Delta$	41.26 $\pm$ 16.26 $\Delta\Delta$
	40	10.38 $\pm$ 1.88 $\Delta\Delta$	28.02 $\pm$ 3.97 $\Delta\Delta$	36.92 $\pm$ 6.73 $\Delta\Delta$	50.57 $\pm$ 18.91 $\Delta\Delta$
	20	10.96 $\pm$ 1.24 $\Delta\Delta$	29.97 $\pm$ 4.46 Δ	50.29 $\pm$ 16.84 Δ	69.18 $\pm$ 11.80 Δ
	10	14.59 $\pm$ 2.73 Δ	33.02 $\pm$ 2.08	78.51 $\pm$ 3.64	95.85 $\pm$ 2.72

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.3 芦荟大黄素对 AR42J 细胞上清液淀粉酶含量的影响 结果显示, 在 3~24 h 之间, 模型组淀粉酶含量显著升高, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$); 芦荟大黄素 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组能显著降低 AR42J 细胞上清液中淀粉酶含量, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 3。

表 3 芦荟大黄素对 AR42J 细胞淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 3 Effects of aloe emodin on the level of amylase in AR42J cells supernatant

组别	剂量 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	淀粉酶含量 / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	—	8.13 $\pm$ 1.77	20.83 $\pm$ 8.08	36.04 $\pm$ 7.56	52.58 $\pm$ 14.99
模型组	—	21.26 $\pm$ 4.05**	43.43 $\pm$ 7.50**	71.82 $\pm$ 7.40**	96.10 $\pm$ 13.59**
芦荟大黄素组	80	9.65 $\pm$ 0.33 $\Delta\Delta$	25.48 $\pm$ 4.45 $\Delta\Delta$	44.40 $\pm$ 6.25 $\Delta\Delta$	54.09 $\pm$ 15.69 $\Delta\Delta$
	40	15.53 $\pm$ 4.75 Δ	32.25 $\pm$ 5.74 Δ	52.13 $\pm$ 8.77 Δ	73.46 $\pm$ 14.45 Δ
	20	16.40 $\pm$ 2.58	35.05 $\pm$ 7.11	67.16 $\pm$ 3.26	82.01 $\pm$ 8.31
	10	22.93 $\pm$ 2.76	33.27 $\pm$ 6.77	77.19 $\pm$ 4.29	82.26 $\pm$ 15.08

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.4 大黄酸对 AR42J 细胞上清液淀粉酶含量的影响

结果显示, 在 3~24 h 之间, 模型组淀粉酶含量显著升高, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$); 大黄酸 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组在各时间点均能显著降低细胞上清液中淀粉酶水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。大黄素 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组在 6, 12, 24 h 的时间范围内, 能降低细胞上清液淀粉酶水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 4。

表 4 大黄酸对 AR42J 细胞淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 4 Effects of rhein on the level of amylase in AR42J cells supernatant

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	淀粉酶含量/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	-	8.13 $\pm$ 1.77	20.83 $\pm$ 8.08	36.04 $\pm$ 7.56	52.58 $\pm$ 14.99
模型组	-	21.26 $\pm$ 4.05**	43.43 $\pm$ 7.50**	71.82 $\pm$ 7.40**	96.10 $\pm$ 13.59**
大黄酸组	80	15.17 $\pm$ 1.98 $^{\Delta}$	28.28 $\pm$ 4.93 $^{\Delta\Delta}$	48.00 $\pm$ 6.03 $^{\Delta}$	43.27 $\pm$ 11.55 $^{\Delta\Delta}$
	40	17.20 $\pm$ 3.70	30.05 $\pm$ 6.88 $^{\Delta}$	48.09 $\pm$ 13.52 $^{\Delta}$	60.38 $\pm$ 9.64 $^{\Delta\Delta}$
	20	18.72 $\pm$ 5.12	33.61 $\pm$ 6.48	67.25 $\pm$ 13.31	68.18 $\pm$ 8.68 $^{\Delta}$
	10	18.43 $\pm$ 3.81	40.30 $\pm$ 6.31	71.74 $\pm$ 16.2	79.50 $\pm$ 11.33

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

2.5 大黄素甲醚对 AR42J 细胞分泌淀粉酶的影响
结果显示, 大黄素甲醚 40 和 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组在 24 h 时间点, 能显著降低细胞上清液中淀粉酶的水平, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 5。

表 5 大黄素甲醚对 AR42J 细胞淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 5 Effects of physcion on the level of amylase in AR42J cells supernatant

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	淀粉酶含量/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	-	8.13 $\pm$ 1.77	20.83 $\pm$ 8.08	36.04 $\pm$ 7.56	52.58 $\pm$ 14.99
模型组	-	21.26 $\pm$ 4.05**	43.43 $\pm$ 7.50**	71.82 $\pm$ 7.40**	96.10 $\pm$ 13.59**
大黄素组	80	19.01 $\pm$ 3.59	33.86 $\pm$ 5.20	67.34 $\pm$ 19.06	56.60 $\pm$ 19.40 $^{\Delta\Delta}$
	40	20.54 $\pm$ 2.69	37.76 $\pm$ 3.74	64.26 $\pm$ 7.78	68.93 $\pm$ 22.82 $^{\Delta}$
	20	20.90 $\pm$ 3.87	38.01 $\pm$ 7.75	59.95 $\pm$ 12.71	75.72 $\pm$ 10.19
	10	16.47 $\pm$ 2.48	41.31 $\pm$ 9.70	59.34 $\pm$ 12.70	80.25 $\pm$ 13.70

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

2.6 大黄酚对 AR42J 细胞上清液淀粉酶含量的影响
结果显示, 大黄酚 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组在 24 h 时间点能显著降低细胞上清液中淀粉酶的含量, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.01$), 见表 6。

表 6 大黄酚对 AR42J 细胞淀粉酶的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 6 Effects of chrysophanol on the level of amylase in AR42J cells supernatant

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	淀粉酶含量/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$			
		3 h	6 h	12 h	24 h
正常对照组	-	8.13 $\pm$ 1.77	20.83 $\pm$ 8.08	36.04 $\pm$ 7.56	52.58 $\pm$ 14.99
模型组	-	21.26 $\pm$ 4.05**	43.43 $\pm$ 7.50**	71.82 $\pm$ 7.40**	96.10 $\pm$ 13.59**
大黄酚组	80	20.75 $\pm$ 4.66	26.75 $\pm$ 4.86	66.81 $\pm$ 9.90	63.14 $\pm$ 12.86 $^{\Delta\Delta}$
	40	17.63 $\pm$ 2.85	31.66 $\pm$ 3.52	62.41 $\pm$ 11.76	84.53 $\pm$ 7.66
	20	22.28 $\pm$ 3.83	35.30 $\pm$ 5.59	67.43 $\pm$ 18.30	86.54 $\pm$ 4.42
	10	20.97 $\pm$ 5.27	36.99 $\pm$ 10.92	67.78 $\pm$ 3.58	89.31 $\pm$ 7.86

注: 与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

3 讨论
AR42J 细胞是大鼠胰腺腺泡细胞株, 具有同正常胰腺腺泡细胞相同的受体表达和信号传导系统, 被广泛应用于体外研究胰腺腺泡细胞的分泌、信号转导、细胞骨架功能、凋亡及胰腺炎机制等方面。

目前, AP 体外模型最常用的两种模型复制物质是 CAE 和 LPS。其中, CAE 是一种与胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 类似的十肽物质, 具有与 CCK 相似的生物学功能, 在生理剂量下可调节胰腺分泌, 但超生理剂量的 CAE 则能诱导 AP 的发生。CAE 诱发 AP 的机制尚未完全阐明, 目前认为可能与下列因素有关: 激活胰腺细胞内消化酶和氧自由基、过度刺激胰腺分泌、诱导肾素-血管紧张素系统表达上调^[4]、损害胰腺腺泡细胞膜、使大分子物质进入细胞内、从而导致腺泡细胞的破坏^[5], 激活 NF- κ B、导致炎症介质释放^[6-7]等。另外一种常用的胰腺腺泡细胞刺激剂 LPS 是一种内毒素, 也是构成革兰氏阴性细菌细胞壁外膜的一种生物大分子, 在 AP 病情进展过程中, 多种炎症介质可以引起肠道黏膜通透性增加, 肠黏膜屏障功能严重破坏, 肠道菌群失调、微生态环境紊乱, 以及肠道动力发生障碍, 从而导致肠道细菌易位继发感染和内毒素血症。LPS 通过 CD4 系统作用于单核巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞, 激活细胞内一系列信号转导系统诱导细胞产生多种生物活性分子, 促进病情向重症急性胰腺炎(SAP)发展, 诱导多器官功能不全综合征和系统性炎症反应综合征的发生。多项研究表明^[8], LPS 可以通过多种途径直接导致腺泡细胞损伤, 如 LPS 既可以引起细胞内贮钙的释放, 又可以引起细胞外钙离子内流, 导致胰腺腺泡胞浆内钙超载。还有研究显示, 大剂量 LPS 可直接引起腺泡细胞水肿, 出现膜连接性空泡及胞质膜的断裂、腺细胞和溶酶体的破坏。基于 CAE 和 LPS

在 AP 发病过程中的不同作用机制, 两者除单独应用外^[9-11], 还常常联合被应用于 SAP 的体内外模型研究^[12], 能很好的模拟 SAP 的临床发病机制及病情进展情况。

在前期进行的 CAE 联合 LPS 制备 AP 细胞模型的探索研究中, 我们发现在 CAE 终浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、LPS 终浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的联合造模液影响下, AR42J 细胞出现明显的细胞形态学改变, 在模型复制 3 h 后细胞上清液中淀粉酶水平显著增高, 24 h 后细胞活力显著降低, 流式细胞术结果显示部分细胞死亡。因此, 本研究采用 CAE 联合 LPS 的方法, 模拟体外 SAP 模型, 研究大黄及其有效成分对胰腺腺泡细胞损伤的保护作用, 初步研究结果显示, 在 2.5 % 到 10 % 剂量范围内, 大黄含药血清能显著减少细胞内胰蛋白酶、脂肪酶含量, 同时能降低细胞培养上清液中淀粉酶的水平。对大黄蒽醌的研究结果提示, 大黄素在模型复制 3 h 后即能显著降低 AR42J 细胞分泌淀粉酶, 且呈明显的剂量依赖性, 在 3~24 h 范围内, 大黄素各剂量组均表现出较强的抑制淀粉酶的作用; 大黄酸及芦荟大黄素在 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量下也能显著降低细胞上清液中淀粉酶水平, 而大黄素甲醚及大黄酚作用相对较弱。即大黄蒽醌类成分抑制 AR42J 细胞合成分泌胰酶作用的强弱顺序为大黄素>大黄酸≈芦荟大黄素>大黄素甲醚≈大黄酚。我们注意到, 在基本结构为 1, 8 二羟基蒽醌类成分中, 活性最强的大黄素 R₁ 基团与作用弱的大黄素甲醚及大黄酚相同(图 1), 推测其作用与 R₂ 位的 -OH 有关, 此外, 当 R₁ 位具有活性基团 -COOH 或 -CH₂OH 时, 化合物也能抑制胰酶的合成分泌作用, 提示 R₁ 位极性基团对胰酶分泌也有一定影响。

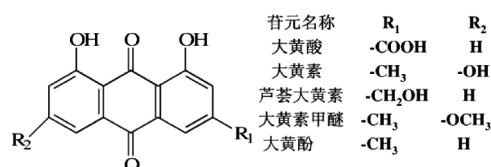


图 1 大黄蒽醌分子结构式

Figure 1 The molecular structure of rhubarb anthraquinone

在一项大黄蒽醌影响细胞线粒体功能的研究发现, 大黄素对线粒体呼吸链抑制作用最强, 能显著抑制复合体 I 琥珀酸脱氢酶和复合体 II NADH-FMN,

大黄酸作用次之, 芦荟大黄素较弱, 而大黄素甲醚与 大黄酚对呼吸链电子传递复合体 I 和复合体 II 均无明显抑制作用。这与影响线粒体功能及抑制胰酶合成分泌的有效成分相同。由此, 我们推测, 大黄蒽醌特别是大黄素可能通过影响细胞线粒体功能抑制 AR42J 细胞合成分泌胰酶, 进而达到保护胰腺腺泡细胞的作用, 其具体机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Liu X, Wang XL, Wu L, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of Da-Huang-Fu-Zi-Tang in rats by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS method[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 606.
- [2] Wu L, Cai B, Liu X, et al. Emodin attenuates calcium overload and endoplasmic reticulum stress in AR42J rat pancreatic acinar cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1): 267.
- [3] 巫莉萍, 邓时贵, 黄海定. 大黄对 LPS 损伤肺泡 II 型上皮细胞水通道蛋白 AQP-1 及 AQP-5 mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 213.
- [4] Tsang SW, Cheng CH, Leung PS. The role of the pancreatic renin-angiotensin system in acinar digestive enzyme secretion and in acute pancreatitis[J]. Regul Pept, 2004, 119(3): 213.
- [5] Sah RP, Dawra RK, Saluja AK. New insights into the pathogenesis of pancreatitis[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2013, 29(5): 523.
- [6] Lima PR, Melo TS, Carvalho KM. 1, 8-cineole(eucalyptol)ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF-κB activity in mice[J]. Life Sci, 2013, 92(24): 1195.
- [7] Huang H, Liu Y, Daniluk J, et al. Activation of nuclear factor-κB in acinar cells increases the severity of pancreatitis in mice [J]. Gastroenterology, 2013, 144(1): 202.
- [8] Hang H, Li YY, Wang SN, et al. Effects of Lipopolysaccharide on calcium homeostasis in isolated rat pancreatic acinar cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 790.
- [9] Lee J, Seo JH, Lim JW, et al. Membrane proteome analysis of cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: implication for early event of acute pancreatitis[J]. Gut Liver, 2010, 4(1): 84.
- [10] Yu JH, Lim JW, Kim H. Altered gene expression in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells: pathologic mechanism of acute pancreatitis[J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2009, 13(6): 409.
- [11] Chen P, Huang L, Zhang Y, et al. The antagonist of the JAK-1/STAT-1 signaling pathway improves the severity of cerulein-stimulated pancreatic injury via inhibition of NF-κB activity[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(5): 731.
- [12] Tian R, Tan JT, Wang RL, et al. The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(3): 3.

(编辑: 宋威)