

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*

张帆^{1,2} 汤礼军^{1,2} 黄竹² 吴俊^{2,3} 黄尚卿²

(1. 西南医科大学临床医学院, 四川 泸州 646000; 2. 西部战区总医院全军普通外科中心, 四川 成都 610083;

3. 西南交通大学医学院, 四川 成都 610031)

【摘要】 目的 探讨鹅去氧胆酸(CDCA)对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠胰腺及肠道损伤的影响及意义。**方法** 将 45 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 SAP 组、CDCA 组和假手术(Sham)组, 每组 15 只。SAP 组大鼠先普食喂养一周后采用胰胆管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠的方法建立 SAP 模型, CDCA 组大鼠先喂养含 0.5% CDCA 的同质饲料一周, 再进行造模, 建模后 24 h 收集组织标本, Sham 组大鼠喂养方法同 SAP 组, 麻醉开腹仅拨动十二指肠降部后关腹。首先, 使用 HE 染色法观察小肠和胰腺组织的病理学改变; 其次, 使用 ELISA 法检测大鼠血清淀粉酶、脂肪酶、二胺氧化酶(DAO)、肠型脂联素结合蛋白(IFABP)、D-乳酸(D-Lac)、IL-1 β 、IL-6、IL-18 和 TNF- α 水平; 采用 TUNEL 法检测肠黏膜上皮细胞凋亡情况; 最后, 使用 Western blot 测小肠组织 TGR5 以及 NLRP3 蛋白表达。**结果** 与 SAP 组相比, CDCA 干预后的大鼠胰腺和小肠组织病理损伤减轻, 病理评分下降($P < 0.05$); ELISA 法检测得出血清炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α)、淀粉酶、脂肪酶以及血清 DAO、IFABP 和 D-Lac 的水平也明显降低($P < 0.05$)。TUNEL 检测结果显示 Sham 组肠黏膜上皮细胞的凋亡较 SAP 组也有明显缓解($P < 0.05$); 经过 CDCA 干预后, 小肠黏膜细胞凋亡指数及凋亡率较 SAP 组有明显下降($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, SAP 造模后大鼠的小肠组织中 TGR5 蛋白表达较 Sham 组明显增多($P < 0.05$); 同时, 小肠组织的 NLRP3 在进行 SAP 造模后也明显增多, 而经 CDCA 干预后, 小肠组织 NLRP3 蛋白表达也降低。**结论** CDCA 能显著降低 SAP 大鼠的胰腺及肠道损伤, 发挥一定的保护作用, 其作用机制可能与激活肠道的 TGR5 受体来抑制 NLRP3 的表达有关。

【关键词】 鹅去氧胆酸; 重症急性胰腺炎; 肠道损伤

【中图分类号】 R657.5⁺1 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.12.002

Effect and significance of Chenodeoxycholic Acid on pancreatic and intestinal injury in rats with severe acute pancreatitis

ZHANG Fan^{1,2}, TANG Lijun^{1,2}, HUANG Zhu², WU Jun^{2,3}, HUANG Shangqing²

(1. School of Clinical Medical Sciences, Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China;

2. PLA Center of General Surgery, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China;

3. College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects and significance of chenodeoxycholic acid (CDCA) on pancreatic and intestinal injury in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** Forty-five male SD rats were randomly divided into three groups (15 rats of each group), namely SAP group, CDCA group and sham-operated (Sham) group. Rats in SAP group were first fed with universal diet for one week and then modeled by retrograde injection of 5% sodium taurocholate into the pancreaticobiliary duct. CDCA group were first fed with homogenous diet containing 0.5% CDCA for one week and then modeled, and tissue specimens were collected 24 hours after modeling. Tissue and serum specimens were collected. Firstly, the pathological changes of small intestine and pancreas tissues were observed by HE staining method; secondly, the levels of serum amylase, lipase, DAO, IFABP, D-Lac, IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α were

基金项目: 国家临床重点专科项目(41732113); 国家自然科学基金(81772001)

通信作者: 汤礼军, E-mail: tanglj2016@163.com

引用本文: 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. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.12.002

detected by ELISA method. The apoptosis of intestinal mucosal epithelial cells was detected by TUNEL assay. Finally, the small intestine tissues were detected by WB method. The expression of TGR5 protein and inflammatory vesicles NLRP3 in small intestine tissue was detected by WB method. **Results** Compared with the SAP group, the histopathological damage of the pancreas and small intestine in the rats after CDCA intervention was reduced and the pathological score decreased ($P<0.05$), and the levels of serum inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α), amylase, lipase, and serum DAO, IFABP and D-Lac were also significantly reduced by ELISA ($P<0.05$). TUNEL assay results showed that apoptosis of intestinal mucosal epithelial cells was also significantly alleviated compared with the SAP group ($P<0.05$); finally, the expression of TGR5 protein as well as inflammatory vesicles NLRP3 in small intestinal tissues was also reduced after CDCA intervention. **Conclusion** CDCA significantly reduced pancreatic and intestinal injury in SAP rats and exerted certain protective effects, and this effect may be achieved by activating the TGR5 receptor in the intestine to inhibit the NLRP3 inflammasome.

【Key words】 Chenodeoxycholic acid; Severe acute pancreatitis; Intestinal injury

重症急性胰腺炎(Severe acute pancreatitis, SAP)是以胰腺的广泛炎症反应伴组织坏死为主要特征的病变,病情发展迅速,当疾病进展为多器官功能障碍综合征(Multiple organ dysfunction syndrome, MODS)时,死亡率较高^[1]。肠道是重症急性胰腺炎胰腺外并发症最常见的器官之一, SAP 所继发的肠道炎性介质的过度释放、缺血-再灌注及一氧化氮损伤、氧化应激反应和肠上皮细胞凋亡在肠道损伤中起到了重要作用,也与 SAP 的严重程度和愈后密切相关^[2-5]。因此,减轻肠道损伤成为治疗 SAP 时胰腺外并发症中尤为重要的一步。在胆道梗阻性胰腺炎中,血清总胆汁酸浓度会明显上升^[6],排入肠道的胆汁酸量会明显减少,并且血清循环总胆汁酸的水平与急性胰腺炎患者的多器官功能衰竭密切相关^[7-8]。而在非胆道梗阻性胰腺炎中,已经证实牛磺熊去氧胆酸(Tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)能显著减轻急性胰腺炎中内质网的应激反应以及腺泡细胞的损伤^[9-10],并且通过肠道细菌的代谢作用减轻胰腺炎的肠道损伤^[11]。那么,与 TUDCA 同为治疗胆固醇性结石,且已经证实多种疾病的肠道损伤具有保护作用的鹅去氧胆酸(Chenodeoxycholic acid, CDCA)是否也具有类似于 TUDCA 的胰腺炎中胰腺和肠道保护的功能,值得研究。基于此,本研究探讨补充外源性胆汁酸 CDCA 对急性重症胰腺炎大鼠胰腺及肠道损伤的影响和意义,以期为 SAP 早期胰外并发症的治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 健康雄性大鼠(6~8 周龄)45 只购自成都达硕实验动物有限公司,体重 200~300 g,随机分为 Sham 组($n=15$)、SAP 组($n=15$)、CDCA 组($n=15$)。实验前,先进行一周的适应性喂养,室温和湿度适宜,交替光照和黑暗各 12 h。本实验所有检测方法和动物实验程序均经过中国人民解放军西部战区总医院动物伦理委员会批准。

1.2 试剂和仪器 牛磺胆酸钠(中国索莱宝)用生理盐水配制成 5% 浓度,水合氯醛(成都艾泽威生物科技有限公司)用生理盐水配制成 5% 浓度,鹅去氧胆酸(浙江英沃迪生物科技有限公司)配制成含 0.5% CDCA 的特殊饲料,淀粉酶、脂肪酶、二胺氧化酶(Diamine Oxidase, DAO)、肠型脂肪酸结合蛋白(Intestinal Fatty Acid-Binding Protein, IFABP)、D-乳酸(D-lactic acid)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-18(Interleukin-18, IL-18)和肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)检测的 ELISA 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司, TGR5 抗体购自爱必信生物科技有限公司,核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)购自 Affinity 公司。

1.3 模型制备 SAP 组:SD 大鼠术前禁食、自由饮水 12 h,随后腹腔注射 5% 的水合氯醛 0.7 mL/100 g 进行麻醉。麻醉后,大鼠固定于操作台,作一长约 5 cm 的上腹部正中切口,上至剑突,随后铺无菌手术单并暴露腹腔,找到十二指肠降部,向左翻转,暴露肠系膜右侧面,定位胆胰管近十二指肠开口处,随后用小动脉夹夹闭肝门处的胆总管,使用 4 号针头逆行穿刺,成功后使用 1 mL 注射器缓慢推注 5% 牛磺胆酸钠 1 min,推注用量为 0.1 mL/100 g,推注完成后依次去掉小动脉夹和 4 号针头,停留观察 5 min 后关腹,然后置于室温 23~25℃ 的复苏室待醒。CDCA 组:先喂养含 0.5% CDCA 的饲料一周,随后造 SAP 模。Sham 组:喂养方法同 SAP 组,麻醉开腹仅拨动十二指肠降部后关腹。造模成功后 24 h 取标本,小肠取回肠末端近盲肠处 4~5 cm,血液通过腹主动脉采集。

1.4 小肠和胰腺组织病理学检测 经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,严格按照病理实验检测的程序进行修剪、梯度脱水、包埋、切片、HE 染色、封片,最后镜检合

格的样片。胰腺组织病理评分参照 Kusske 评分方法^[12],小肠组织病理评分参照 Chiu's 评分方法^[13]。

1.5 酶联免疫吸附测定(Enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)法检测血清淀粉酶、脂肪酶、炎症因子、肠道损伤相关指标 血清淀粉酶、脂肪酶、DAO、IFABP、D-Lac、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 水平均采用 ELISA 法测定。实验方法以订购的试剂盒说明书为标准,经过包被、封闭、洗涤、加样、温育、加酶结合物、加显色底物等标准步骤进行检测。

1.6 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling,TUNEL)法检测肠黏膜上皮细胞凋亡情况 小肠组织采用 TUNEL 法检测肠上皮细胞的凋亡情况,经过脱蜡、水化、浸洗、固定、反应、DAB 显色等标准实验步骤后,使用荧光显微镜观察,计算凋亡指数。

1.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小肠组织 TGR5 以及 NLRP3 的蛋白表达情况 小肠组织采用 Western blot 检测 TGR5 以及 NLRP3 的蛋白表达情况,按照小肠组织总蛋白提取、蛋白浓度测定、变性、

SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、免疫反应、化学发光、图像采集等步骤,最后计算 TGR5 以及 NLRP3 蛋白在各组小肠组织的相对表达量。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行实验数据的统计分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两组计量资料间比较采用 *t* 检验,3 组及 3 组以上比较采用 ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CDCA 对大鼠胰腺组织病理损伤观察结果比较

HE 染色后在光镜下观察到 Sham 组大鼠的胰腺组织大体结构正常,SAP 组大鼠的胰腺组织可见小叶间明显水肿,腺泡间隔变大,腺泡细胞排列紊乱、萎缩,同时呈现溶解性坏死(黑色箭头),呈嗜酸性的无结构纤维状,并可见大量炎症细胞浸润(黄色箭头),间质可见明显出血(绿色箭头)。与 SAP 组比较,CDCA 组胰腺组织病理损伤显著减轻,主要表现为胰腺组织镜下大体结构清晰,但仍可见小叶间水肿,少量的腺泡细胞坏死(黑色箭头)及少量的炎症细胞弥散性浸润(黄色箭头),见图 1。

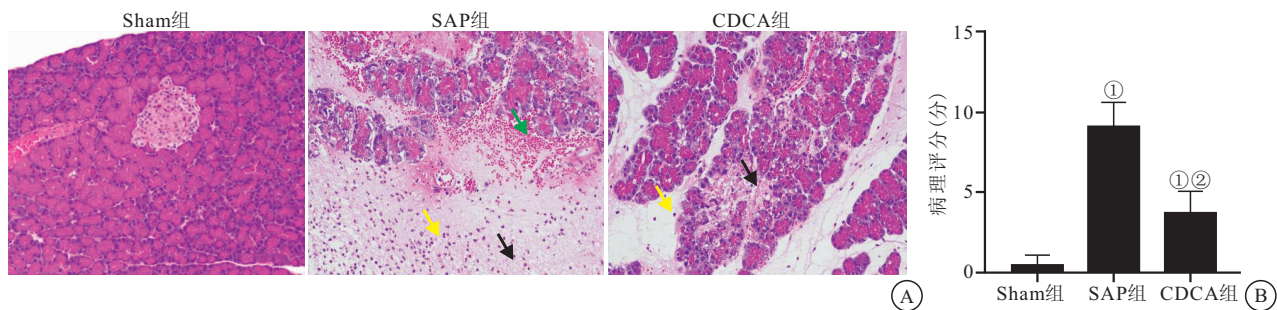


图 1 CDCA 对大鼠胰腺组织病理损伤观察结果以及病理评分比较

Figure 1 Observation on histopathological damage of rat pancreas by CDCA and comparison of pathological scores

注:A. Sham 组、SAP 组以及 CDCA 组大鼠胰腺组织 HE 染色(标尺=100 μ m);B. 各组大鼠胰腺组织病理评分。与 Sham 组相比,① $P < 0.05$;与 SAP 组相比,② $P < 0.05$

2.2 CDCA 对大鼠胰腺炎的血清指标影响的比较 SAP 组大鼠的胰腺炎血清指标淀粉酶、脂肪酶的水平较 Sham 组有明显升高($P < 0.05$),经 CDCA 干预后均有明显下降($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠胰腺炎相关指标血清淀粉酶、血清脂肪酶水平比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of serum amylase and serum lipase levels in rats of each group

指标	Sham 组	SAP 组	CDCA 组
淀粉酶(mIU/mL)	17.19 $\pm$ 1.16	50.65 $\pm$ 9.29 ^①	29.64 $\pm$ 6.40 ^{①②}
脂肪酶(U/mL)	4.08 $\pm$ 0.35	31.60 $\pm$ 8.17 ^①	13.62 $\pm$ 2.62 ^{①②}

注:与 Sham 组相比,① $P < 0.05$;与 SAP 组相比,② $P < 0.05$

2.3 CDCA 对大鼠血清全身炎症指标影响的比较 与 Sham 组相比,SAP 组大鼠血清全身炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-18 以及 TNF- α 水平均有明显升高($P <$

0.05);而经过 CDCA 干预后,大鼠的全身炎症指标均有明显下降($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α 表达水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)
Table 2 Comparison of serum IL-1 β , IL-6, IL-18 and TNF- α expression levels in rats of each group

指标	Sham 组	SAP 组	CDCA 组
IL-1 β	4.42 $\pm$ 2.40	39.89 $\pm$ 13.60 ^①	17.51 $\pm$ 6.90 ^{①②}
IL-6	13.58 $\pm$ 3.58	71.46 $\pm$ 16.90 ^①	29.02 $\pm$ 8.15 ^{①②}
IL-18	0.06 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.07 ^①	0.10 $\pm$ 0.02 ^②
TNF- α	3.88 $\pm$ 1.34	30.08 $\pm$ 4.63 ^①	11.74 $\pm$ 3.15 ^{①②}

注:与 Sham 组相比,① $P < 0.05$;与 SAP 组相比,② $P < 0.05$

2.4 CDCA 对大鼠肠道组织病理损伤观察结果的比较 HE 染色结果显示,Sham 组大鼠小肠组织结构正常,SAP 组大鼠的小肠结构明显破坏,小肠绒毛形态

明显异常,大量的肠绒毛上皮细胞脱落(绿色箭头),部分组织的肠绒毛相互融合、断裂、脱落(蓝色箭头),伴有大量炎性细胞浸润(黄色箭头),同时可见固有层

裸露,毛细血管充血、扩张;而经过 CDCA 干预后大鼠的小肠病理损伤有明显缓解,但仍可见少量的上皮细胞脱落(绿色箭头)及炎性细胞浸润(黄色箭头),见图 2。

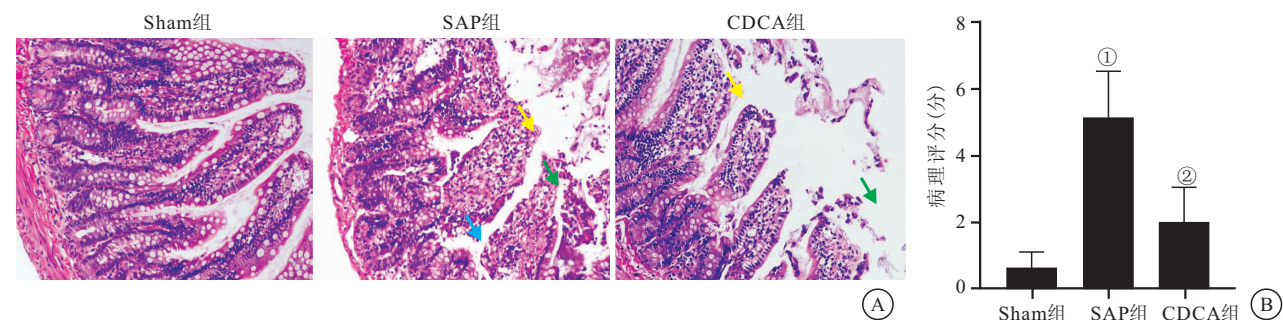


图 2 CDCA 对大鼠小肠组织病理损伤观察结果比较

Figure 2 Comparison on the results of histopathological damage observed in the small intestine of rats by CDCA

注: A. Sham 组、SAP 组以及 CDCA 组大鼠小肠组织 HE 染色(标尺=100 μ m); B. 各组大鼠小肠组织病理评分。与 Sham 组相比,① $P<0.05$;与 SAP 组相比,② $P<0.05$

2.5 CDCA 对大鼠肠道组织的肠道损伤标志物影响的比较 与 Sham 组相比,SAP 组大鼠的肠道组织损伤的特异性标志物 DAO、IFABP 以及 D-Lac 水平较 sham 组有明显升高($P<0.05$),经 CDCA 干预后均下降($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠肠道损伤标志物血清 DAO 水平、IFABP、D-Lac 水平表达比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison on expression of serum DAO, IFABP and D-Lac levels in rats in each group

损伤标志物	Sham 组	SAP 组	CDCA 组
DAO(mIU/mL)	2142.00 $\pm$ 491.90	4968.00 $\pm$ 1176.00 ^①	3096.00 $\pm$ 757.50 ^{①②}
IFABP(ng/mL)	2.34 $\pm$ 0.45	40.93 $\pm$ 13.59 ^①	9.75 $\pm$ 3.68 ^{①②}
D-Lac(nmol/mL)	4.25 $\pm$ 0.96	13.42 $\pm$ 1.78 ^①	6.61 $\pm$ 1.65 ^②

注:与 Sham 组相比,① $P<0.05$;与 SAP 组相比,② $P<0.05$

2.6 CDCA 对小肠黏膜上皮细胞凋亡影响的观察结果及凋亡率的比较 TUNEL 法检测小肠黏膜上皮细胞凋亡的结果显示,SAP 组大鼠的小肠黏膜细胞凋亡指数及凋亡率较 Sham 组明显升高($P<0.05$);经过 CDCA 干预后,小肠黏膜细胞凋亡指数及凋亡率较

SAP 组有明显下降($P<0.05$),见图 3。

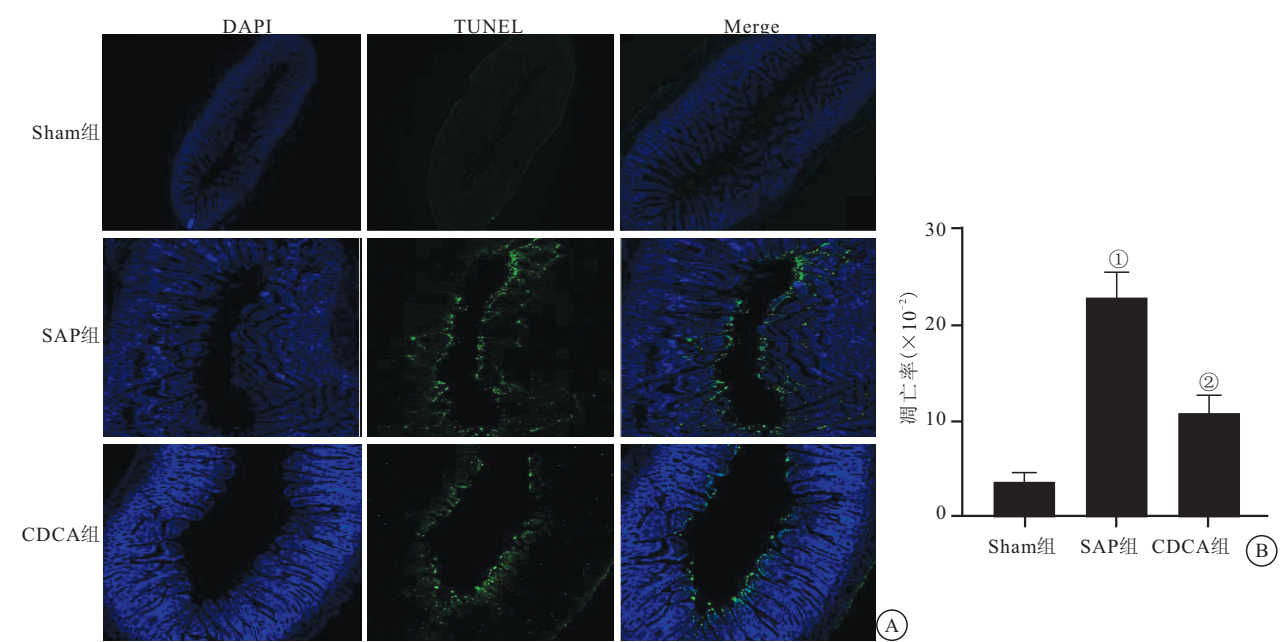


图 3 CDCA 对小肠黏膜上皮细胞凋亡影响的观察结果及凋亡率的比较

Figure 3 Observations on the effect of CDCA to the apoptosis of small intestinal mucosal epithelial cells and comparison of the apoptosis rate

注: A. TUNEL 法检测小肠黏膜上皮细胞的凋亡; B. 各组大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡率的比较。与 Sham 组相比,① $P<0.05$;与 SAP 组相比,② $P<0.05$

2.7 CDCA 对小肠组织 TGR5 以及 NLRP3 蛋白表达的影响 Western blot 检测小肠组织的 TGR5 及 NLRP3 蛋白表达结果显示, SAP 造模后大鼠的小肠组织中 TGR5 蛋白的表达较 Sham 组明显增多($P < 0.05$);同时,小肠组织的 NLRP3 在进行 SAP 造模后也明显增多,而在进行 CDCA 干预后表达明显下降($P < 0.05$),见图 4。

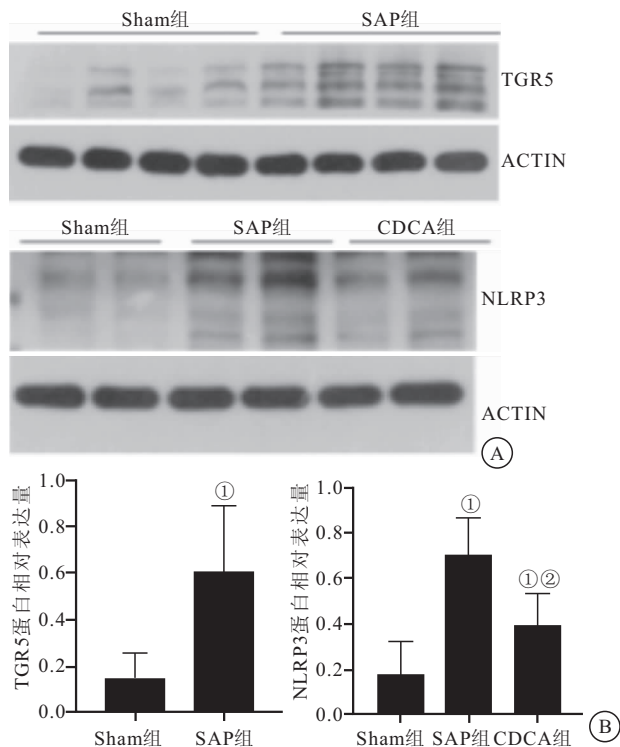


图 4 CDCA 对小肠组织 TGR5 蛋白以及 NLRP3 表达影响的比较

Figure 4 Comparison of the effects of CDCA on the expression of TGR5 protein and NLRP3 in small intestine tissues

注: TGR5 以及 NLRP3 蛋白表达; B. 各组大鼠小肠组织 TGR5 及 NLRP3 蛋白相对表达量。与 Sham 组比较, ① $P < 0.05$; 与 SAP 组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

研究证实, 肠道是人体内最大的免疫器官, SAP 并发胰外损伤时首当其冲; 在发生 SAP 时, 肠黏膜屏障以及肠道免疫功能受损, 导致肠内细菌穿过受损的黏膜进入肠外器官和血液循环, 从而继发 SIRS 和 MODS^[14]。因此, 阻止肠道这一“扳机点”部位的损伤, 不仅可以减轻 SAP 的严重程度, 还能改善疾病的预后, 降低死亡率, 使此研究具有了现实的临床意义。

胆汁酸作为胆汁的主要成分, 不仅可以促进脂肪和脂溶性维生素的吸收^[15], 还能与胆汁酸受体相互作用来调节自身代谢和肠道功能稳态^[16]。在以往的研究中, 主要聚焦于胆汁酸在肝胆疾病中的作用, 直到最近几年才将其影响逐步扩展到肝胆以外, 主要包括在肠道缺血再灌注损伤中的保护作用^[17], 对肠道干细

胞的激活、促进肠上皮细胞再生的作用^[18], 对肠道免疫细胞群组成的调节^[19]以及癌症预防和治疗的新方向等^[20-21]。CDCA 作为胆汁酸中的一种, 口服后在肠道内变成石胆酸(Lithocholic acid, LCA), LCA 又能在肠道内代谢为 3-oxoLCA 和 isoalloLCA, 随后被修饰成特定的免疫调节分子, 进而在肠道发挥促炎或抗炎的免疫调节作用^[22]。因此, 本实验探究了 CDCA 在 SAP 大鼠的胰腺及肠道中是否也具有类似的效果。本研究结果表明, 经过 CDCA 干预后再进行 SAP 造模的大鼠胰腺组织病理损伤较 Sham 组有明显的减轻, 病理评分也显著下降; 同时, 血清淀粉酶、脂肪酶以及全身炎症因子(IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α)的表达水平也明显降低, 使大鼠的全身炎症反应得到了有效的控制。研究显示^[23], 在进行急性胰腺炎造模后, 胰腺中胆汁酸受体 TGR5 的表达水平会明显升高, 作为保护性因素, 被特异性激动剂激活后, 通过抑制活性氧等途径来减轻胰腺损伤及全身炎症反应。因此, 探明 CDCA 在 SAP 肠道损伤中的作用, 有助于为临床治疗 SAP 的胰腺外并发症提供新的思路。

肠道损伤的转归也是影响 SAP 进展和预后的重要因素, 肠道的损伤不仅能刺激机体进一步产生炎症因子, 肠黏膜屏障的破坏还能导致细菌入血造成全身感染而进一步加重 SAP。因此, 接下来我们研究了 CDCA 对肠道本身的影响。本研究发现, CDCA 干预后可以显著减轻肠道损伤的严重程度, 表现为小肠的病理评分以及肠道上皮细胞的凋亡率显著降低; 同时, 肠道损伤的特异性血清标志物 DAO、IFABP 和 D-Lac 的水平较 SAP 组也有明显下降。对于 CDCA 减轻肠道损伤的作用机制, 在其他疾病模型中已有研究, 主要是通过激活肠道胆汁酸受体——法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)来发挥作用。肌球蛋白轻链激酶(Myosin light-chain kinase, MLCK)是一种能够影响肠道连接蛋白表达, 进而改变肠黏膜屏障通透性和完整性的蛋白激酶。Song 等^[24]研究发现 CDCA 可以通过 FXR-MLCK 途径在脂多糖诱导的大鼠肠上皮损伤中发挥保护作用; 同时, 在肠道的缺血再灌注损伤中, CDCA 也能通过促进肠道连接蛋白的表达, 维持肠黏膜屏障的完整, 以发挥保护肠道的作用^[17]。但是, 同为胆汁酸受体的 TGR5 在肠道中的影响目前报道鲜少, 前文已述, TGR5 受体的激活对于胰腺具有一定保护作用, 对于全身炎症反应也有一定的抑制作用^[25]; 而在肠道组织中也广泛表达的 TGR5 受体是否在 CDCA 的激活下发挥其作用, 值得探究。因此本研究中我们推测胆汁酸 CDCA 减轻 SAP 大鼠胰腺和肠道损伤的作用机制, 可能与激活肠道特异性的

胆汁酸受体 TGR5 有关。

TGR5 受体作为 G 蛋白偶联受体家族(G protein-coupled receptors, GPCRs)中的一种,在人类的多种组织器官如胰腺、肠道中广泛表达^[26]。本研究用 Western blot 试验证实了小肠组织的 TGR5 受体在进行 SAP 造模后表达会明显升高;而 CDCA 作为 TGR5 受体的强激动剂,在激活 TGR5 受体后可以通过 TGR5-cAMP-PKA 轴来抑制 NLRP3 的表达^[27]。NLRP3 是多种蛋白质组成的复合物,其表达增高提示炎性小体的激活增多,能够调节胱冬肽酶-1 的活化,促使前体 IL-1 β 和前体 IL-18 的成熟及分泌。IL-1 β 是早期炎症扩散和无菌性炎症的重要细胞因子,而 IL-18 也在机体内发挥促炎效果,两者的分泌增多会导致炎细胞浸润,进一步加重组织的损伤^[28];另外, NLRP3 还介导了急性胰腺炎中胰腺的炎症和损害^[29]。在本文中,由于 SAP 造模后血清炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 分泌增多,因此我们将目光聚焦于 NLRP3 炎性小体上,通过 Western blot 实验表明 NLRP3 在 SAP 大鼠的小肠组织中表达升高,而在 CDCA 干预后的小肠组织中 NLRP3 的表达降低。以上结果提示了胆汁酸受体 TGR5 和 NLRP3 炎性小体参与了 SAP 大鼠中胰腺及肠道损伤的过程。推测 SAP 造模后, TGR5 受体作为保护性因素在肠道组织中的表达升高,经过 CDCA 干预后 TGR5 受体激活,通过抑制肠道 NLRP3 的表达,从而抑制了全身的炎症反应,减轻了胰腺及肠道的损伤。

4 结论

胆汁酸 CDCA 可能通过激活 SAP 大鼠肠道组织的 TGR5 蛋白,从而抑制 NLRP3 的表达及炎性小体的激活,减轻大鼠全身的炎症反应,缓解胰腺和小肠损伤的严重程度,在 SAP 中发挥了一定的保护作用。本研究为 SAP 早期胰外并发症的治疗提供了新的方向,但具体的作用机制还需要更深一步的研究证实。

【参考文献】

- [1] 李非,曹锋.中国急性胰腺炎诊治指南(2021)[J].中国实用外科杂志,2021,41(7):739-746.
- [2] HUANG L, JIANG Y, SUN Z, *et al.* Autophagy Strengthens Intestinal Mucosal Barrier by Attenuating Oxidative Stress in Severe Acute Pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(4): 910-919.
- [3] 刘成思,王卫星.急性胰腺炎肠黏膜屏障损伤机制的研究进展[J].中国医药导报,2019,16(3):33-36.
- [4] 赵建锋,杜杰,周森,等.重症急性胰腺炎肠屏障功能损伤机制研究进展[J].中国现代医药杂志,2016,18(4):91-94.
- [5] CAPURSO G, ZERBONI G, SIGNORETTI M, *et al.* Role of the gut barrier in acute pancreatitis[J]. Journal of clinical gas-

- troenterology, 2012, 46 Suppl: S46-51. doi: 10.1097/MCG.0b013e3182652096.
- [6] MALESZKA A, DUMNICKA P, MATUSZYK A, *et al.* The Diagnostic Usefulness of Serum Total Bile Acid Concentrations in the Early Phase of Acute Pancreatitis of Varied Etiologies[J]. International journal of molecular sciences, 2017, 18(1): 106. doi: 10.3390/ijms18010106.
- [7] XIE X, DONG J, LU G, *et al.* Increased circulating total bile acid levels were associated with organ failure in patients with acute pancreatitis[J]. BMC gastroenterology, 2020, 20(1): 222. doi: 10.1186/s12876-020-01243-w.
- [8] TRAN Q T, TRAN V H, SENDLER M, *et al.* Role of Bile Acids and Bile Salts in Acute Pancreatitis: From the Experimental to Clinical Studies[J]. Pancreas, 2021, 50(1): 3-11.
- [9] SEYHUN E, MALO A, SCHÄFER C, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, acinar cell damage, and systemic inflammation in acute pancreatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(5): G773-782. doi: 10.1152/ajpgi.00483.2010.
- [10] MALO A, KRÜGER B, SEYHUN E, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(4): G877-886. doi: 10.1152/ajpgi.00423.2009.
- [11] WAN Y D, ZHU R X, PAN X T, *et al.* Bile Acid Supplementation Improves Murine Pancreatitis in Association With the Gut Microbiota[J]. Front Physiol, 2020, 11: 650.
- [12] KUSKE A M, RONGIONE A J, ASHLEY S W, *et al.* Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice[J]. Surgery, 1996, 120(2): 284-288.
- [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]. Archives of Surgery, 1970, 101(4): 478-483.
- [14] TAKAHASHI Y, FUKUSHIMA J, FUKUSATO T, *et al.* Prevalence of ischemic enterocolitis in patients with acute pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(8): 827-832. doi: 10.1007/s00535-005-1637-5.
- [15] 李森,贾子衡,魏雪睿,等.胆汁酸的代谢稳态调控作用综述[J].上海交通大学学报(医学版), 2020, 4(8): 1126-1130.
- [16] HEGYI P, MALÉTH J, WALTERS J R, *et al.* Guts and Gall: Bile Acids in Regulation of Intestinal Epithelial Function in Health and Disease. [J]. Physiological reviews, 2018, 98(4): 1983-2023.
- [17] 李烁,王璇,张楚旌,等.胆汁酸 CDCA 及其受体 FXR 在肠道缺血再灌注损伤中的作用和机制的研究[J].中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1875.
- [18] SORRENTINO G, PERINO A, YILDIZ E, *et al.* Bile Acids Signal via TGR5 to Activate Intestinal Stem Cells and Epithelial Regeneration[J]. Gastroenterology, 2020, 159(3): 956-968.
- [19] CAMPBELL C, MCKENNEY PT, KONSTANTINOVSKY D, *et al.* Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells[J]. Nature, 2020, 581(7809): 475-479.

- [17] YU L M, LIANG H L, LU Z H, *et al.* Membrane receptor-dependent Notch1/Hes1 activation by melatonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vivo and in vitro studies[J]. J Pineal Res, 2015, 59: 420-433.
- [18] 李丽, 顾文燕. Notch1/Hes1 通路活化通过抑制氧化应激改善高糖诱导的心肌细胞肥大[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(3): 216-220.
- [19] 王楷扬, 李小丽, 蔡永青. 内质网应激在心脏疾病中的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(11): 1310-1314.
- [20] 刘珂珂, 吕梦, 纪晓迪, 等. 稳心颗粒调控内质网应激途径抑制心肌梗死心肌凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3): 56-62.
- [21] 葛红吉, 郭媛利, 周南, 等. 黄芪甲苷抑制内质网应激对缺氧/复氧损伤 H9c2 心肌细胞的保护作用[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(5): 514-517, 521.
- [22] KUBRA K-T, AKHTER M S, UDDIN M A, *et al.* Unfolded protein response in cardiovascular disease[J]. Cell Signal, 2020, 524: 109-116.
- [23] LIU M Q, CHEN Z, CHEN L X. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37: 425-433.
- [24] YU Y L, SUN G B, LUO Y, *et al.* Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress- related signaling pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6: 217-230.

(收稿日期: 2021-01-11; 修回日期: 2022-02-06; 编辑: 黎仕娟)

(上接第 1728 页)

- [20] FU T, COULTER S, YOSHIHARA E, *et al.* FXR Regulates Intestinal Cancer Stem Cell Proliferation[J]. Cell, 2019, 176(5): 1098-1112.
- [21] KIM E K, CHO J H, KIM E, *et al.* Ursodeoxycholic acid inhibits the proliferation of colon cancer cells by regulating oxidative stress and cancer stem-like cell growth[J]. PLOS ONE, 2017, 12(7): e0181183. doi: 10.1371/journal.pone.0181183.
- [22] HANG S, PAIK D, YAO L, *et al.* Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation [J]. Nature, 2019, 576(7785): 143-148.
- [23] LI B, YANG N, LI C, *et al.* INT-777, a bile acid receptor agonist, attenuates pancreatic acinar cells necrosis in a mouse model of acute pancreatitis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503(1): 38-44.
- [24] SONG M, YE J, ZHANG F, *et al.* Chenodeoxycholic Acid (CDCA) Protects against the Lipopolysaccharide-Induced Impairment of the Intestinal Epithelial Barrier Function via the FXR-MLCK Pathway[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2019, 67(32): 8868-8874.
- [25] GUO C, XIE S, CHI Z, *et al.* Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammation[J]. Immunity, 2016, 45(4): 802-816.
- [26] 高雅卿, 石亚男, 刘巍. TGR5 基本性质及其功能研究进展[J]. 新医学, 2018, 3, 49(3): 150-154.
- [27] GUO C, XIE S, CHI Z, *et al.* Bile Acids Control Inflammation and Metabolic Disorder through Inhibition of NLRP3 Inflammation[J]. Immunity, 2016, 45(4): 802-816.
- [28] 冯华国, 冯毅, 张玲, 等. NLRPs 炎性小体激活和调控机制研究现状[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(20): 3048-3051.
- [29] 夏炳杰, 李桂鲜. NLRP3 炎性小体与急性胰腺炎发生、发展关系的相关研究进展[J]. 吉林医学, 2021, 42(9): 2262-2264.

(收稿日期: 2022-02-18; 修回日期: 2022-10-30; 编辑: 黎仕娟)

(上接第 1735 页)

- [16] BUSTOS F, SEGARRA-FAS A, NARDOCCI G, *et al.* Functional Diversification of SRSF Protein Kinase to Control Ubiquitin-Dependent Neurodevelopmental Signaling[J]. Dev Cell, 2020, 55(5): 629-647.
- [17] HUANG J Q, LI H F, ZHU J, *et al.* SRPK1/AKT axis promotes oxaliplatin-induced anti-apoptosis via NF-kappaB activation in colon cancer[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 280.
- [18] BELALI T, WODI C, CLARK B, *et al.* WT1 activates transcription of the splice factor kinase SRPK1 gene in PC3 and K562 cancer cells in the absence of corepressor BASP1[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020, 1863(12): 194642.
- [19] CHANDRA A, ANANDA H, SINGH N, *et al.* Identification of a novel and potent small molecule inhibitor of SRPK1: mechanism of dual inhibition of SRPK1 for the inhibition of cancer progression[J]. Aging (Albany NY), 2020, 13(1): 163-180.
- [20] ZHOU B, LI Y, DENG Q, *et al.* SRPK1 contributes to malignancy of hepatocellular carcinoma through a possible mechanism involving PI3K/Akt[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 379(1-2): 191-199.
- [21] 康富标, 王玲, 彭焕彦, 等. 人肝细胞癌组织肿瘤相关巨噬细胞的浸润水平及其临床意义[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(11): 923-927.
- [22] YIN X, ZHANG B H, ZHENG S S, *et al.* Coexpression of gene Oct4 and Nanog initiates stem cell characteristics in hepatocellular carcinoma and promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of Stat3/Snail signaling[J]. J Hematol Oncol, 2015, 8(1): 1-13.
- [23] ZOBALOVA R, PROKOPOVA K, STANTIC M, *et al.* The potential role of CD133 in immune surveillance and apoptosis: a mitochondrial connection? [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(12): 2989-3002.
- [24] YANG F, LV L Z, CAI Q C, *et al.* Potential roles of EZH2, Bmi-1 and miR-203 in cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma cell line Hep3B[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(47): 13268-13276.
- [25] MARTIN-OROZCO E, SANCHEZ-FERNANDEZ A, ORTIZ-PARRA I, *et al.* WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 2854.

(收稿日期: 2022-04-14; 修回日期: 2022-05-23; 编辑: 黎仕娟)