

网络出版时间: 2024-12-26 14:46:03 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20241226.1133.001>

◇ 基础医学研究 ◇

红景天仿生纳米药物对急性胰腺炎大鼠的胰腺保护作用及其机制

张彤哲 赵喜容 李培武

(兰州大学第二医院急诊科, 兰州 730030)

摘要 目的 探究红景天(Rho)的仿生纳米药物在急性胰腺炎大鼠中的胰腺保护作用及其机制。方法 以红细胞膜囊泡(EMV)作为仿生纳米药物包裹材料,构建红景天仿生纳米药物,同时构建急性胰腺炎大鼠模型并分为急性胰腺炎模型(AP)组、Rho组、EMV组、Rho的EMV仿生纳米药物(R-EMV)组。对R-EMV组大鼠进一步使用NLRP3激活剂BMS-986299(R-EMV+BMS-986299组)和抑制剂MCC950(R-EMV+MCC950组)干预。观察大鼠腹水量变化,并采用酶联免疫吸附试验检测血清白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、内皮素(ET)、二胺氧化酶(DAO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)水平;苏木精-伊红(HE)染色法观察胰腺组织病理变化;免疫组化、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹(Western blot)分析胰腺组织NOD样受体蛋白3(NLRP3)、核转录因子- κ B(NF- κ B)表达水平。结果 制备的R-EMVs呈近圆形,平均粒径为(244.61 \pm 1.08)nm,Zeta电位为-(11.13 \pm 1.25)mV;同时,EMV可以负载(58.67 \pm 0.79) μ g的Rho。与Sham组比较,AP组大鼠腹水量较高($t=33.79, P<0.01$),外周血免疫指标IL-1 β 、IL-6、ET、DAO水平升高($t=38.25, 42.54, 29.20, 34.92$, 均 $P<0.01$),AP组可见明显组织充血水肿、小叶间隙增宽,大量炎症细胞浸润,胰腺病理评分升高($t=30.06, P<0.01$)。与AP组比较,Rho组腹水量、胰腺干重比、病理评分、淀粉酶、脂肪酶水平均下降($F=1523.7, 543.3, 839.9, 446.1, 172.2, P<0.05$);与其他组相比,AP组血清IL-1 β 、IL-6、ET、DAO水平均出现一定程度的降低。与AP组相比,R-EMV组中NF- κ B p65、NLRP3蛋白水平降低,NF- κ B、NLRP3免疫组化染色评分降低($t=24.54, 26.91$, 均 $P<0.001$)。同时,R-EMV+MCC950组中的血清IL-1 β 、IL-6、ET、DAO、MDA、SOD、GSH水平较AP组、R-EMV组、R-EMV+BMS-986299组呈现明显低表达状态。结论 R-EMV在急性胰腺炎中具有较好的胰腺保护作用,其机制与降低NF- κ B/NLRP3通路活性并下调IL-6等炎症因子和MDA等氧化应激指标的表达有关。

关键词 红景天; 仿生纳米; 急性胰腺炎; 胰腺损伤; 大鼠; 机制

中图分类号 R 576.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0001-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.001

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)作为常见的急性腹部疾病,其发病机制复杂,临床表现多样,严重影响患者的生命健康^[1]。因此,深入研究和开发新型治疗药物,对于优化AP的治疗和降低其病死率具有重要意义。研究^[2]表明,中药红景天(Rhodiola rosea, Rho)中的有效成分能够在一定程度上减轻AP引起的胰腺损伤,并改善胰腺功能。然而,传统的Rho制剂在靶向性方面仍存在一定不足,这限制了其在AP治疗中的应用。近年来,随着纳米技术的发展,将传统草药与现代科技相结合的研究逐渐成为一个新的研究热点。红细胞膜囊泡(erythro-

cyte membrane vesicles, EMV)作为一种体内给药的细胞载体,能够构建仿生纳米药物包裹材料。将其与Rho结合制备出Rho的红细胞膜囊泡(Rho erythrocyte membrane vesicles, R-EMV),不仅能够提高活性成分的生物利用度,还能通过靶向输送至病变部位,实现更有效的治疗效果^[3]。该研究旨在探讨制备出的R-EMV对大鼠AP引发的胰腺损伤的保护作用及其机制,期望为AP患者提供更加有效和安全的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 50只SPF级别雄性SD大鼠,190~220g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SYXK(京)2020-0013,实验动物伦理编号:KTSQ2024-03。所有大鼠于清洁动物

2024-11-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82260135)

作者简介:张彤哲,男,硕士,副主任医师;

李培武,男,博士,主任医师,通信作者,E-mail: wuzi360@126.com

房中饲养 相对湿度控制为 50% 左右,温度控制为 22 ~ 25 °C,以 12 h 为一个周期进行明暗交替照射,同时保证大鼠能够自由摄食和饮水。

1.1.2 实验试剂与仪器 Rho 注射液(规格: 10 ml,国药准字: Z20060362,通化玉圣药业有限公司); NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 抑制剂 MCC950 [纯度: > 98.00%, CAS 号: 256373-96-3,美国 GLP BIO 公司]; NLRP3 激活剂 BMS-986299 (纯度: 99.95%, CAS 号: HY-439396-121387,美国 MCE 公司); 核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 兔单抗 (货号: IPD-ANM2578,湖北艾普蒂生物工程公司); NLRP3 兔单抗 (货号: BA3677,武汉博士德生物工程公司); 羊抗兔二抗 (英国 Abcam 公司); 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海科艾博生物技术); 染料伊红 (长沙瀚辰生物); 光学显微镜 (型号: ST-7045,深圳市西派克光学仪器有限公司)。相关植物的图、化学结构式见图 1。

1.2 方法

1.2.1 R-EMV 的制备 制备 R-EMV,首先需收集小鼠抗凝血液样品,在离心处理后获得红细胞,然后使用 PBS (pH = 7.4) 对细胞进行洗涤,离心弃上清液后得到红细胞沉淀物,进一步通过 PBS 低渗处理将其放置于离心机中 (4 °C),以 14 000 r/min 的转速进行离心处理后弃去上清液,重复上述步骤,直至沉淀为红细胞膜。获得红细胞膜后,将其通过 PBS 进行重悬,进而在经过冰浴超声处理后通过 Avanti 微型挤出机分别对 1 000、400、200 nm 的聚碳酸酯多孔膜进行挤压,从而获取 200 nm 的 EMV。最后,在 EMV 中加入经 DMSO 溶解的 Rho,并在超声后置于一定温度下进行孵育,进一步清洗后待其浓缩体积为 250 μ l,即可得到 R-EMV。

1.2.2 R-EMV 特性

1.2.2.1 标准曲线制作 将 Rho 标准品 (1.26

mg) 置于量瓶中,加入甲醇溶液将其溶解并在量瓶中稀释至刻度线,以得到 Rho 标准品溶液。分别取不同浓度的标准品溶液置于 EP 管中 (< 1 ml 时使用甲醇溶液进行定量补充至 1 ml),进一步混合均匀后通过高效液相色谱仪进行上样检测。检测过程中,色谱条件设定为:波长为 425 nm,每次进样的量为 40 μ l,流动相采用甲醇与水的混合液,其体积比为 87 : 13,流速控制为 1.0 ml/min,柱温维持在 35 °C。最后,详细记录检测结果,并根据浓度与峰面积之间的关系进行线性回归分析,最终得到标准曲线的方程。

1.2.2.2 包封率测定 为了测定 EMV 溶液对 Rho 的包封率,首先使用甲醇溶液将 EMV 溶液稀释至设定的线性范围,然后通过持续 3 min 振荡使溶液混合均匀后,将其置于 4 °C 的低温条件下,进一步离心取出上清液后,加入高效液相色谱仪中进行检测,同时根据检测结果,将数据代入标准曲线方程中,从而计算出包封的 Rho 药量,即为包封率。

1.2.2.3 R-EMV 释放曲线制作 通过透析法对 R-EMV 中 Rho 的释放进行测定。首先将 Rho 溶液置入 14 ku 截留分子量 (MWCO) 透析袋中,然后将其置于 0.1% SDS 磷酸盐缓冲液中进行搅拌透析。同时,于不同时间段内分别取出 50 μ l R-EMV 溶液,并在每次取样后于透析袋中补充 50 μ l 1 \times PBS 溶液。在完成取样后,参照包封率测定方法对不同时间点的样品进行测定,进而通过计算得出药物释放率,并据此绘制了 R-EMV 的释放曲线。

1.2.3 大鼠 AP 模型制备 取 40 只大鼠进行 AP 模型制备:首先使用水合氯醛 (10%) 将大鼠麻醉后将其固定,在对其皮肤进行备皮和消毒处理后,沿大鼠上腹正中中线进行切口,以充分暴露其胰腺、胰管和十二指肠,然后以 0.1 ml/min 的速率向胆胰管内泵入 4% 牛磺胆酸钠溶液 (0.1 ml/100 g),进行造模。在完成注射后,需夹闭输液管,持续时间大约 2 min,

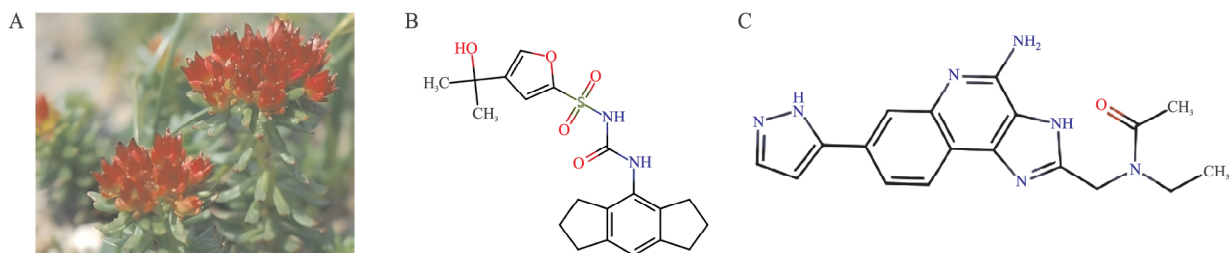


图 1 相关植物的图、化学结构式

Fig. 1 Diagrams and chemical structure of related plants

A: Picture of Rhodiola plants; B: Chemical structure of NLRP3 inhibitor MCC950; C: Chemical structure of NLRP3 activator BMS-986299.

在此过程中,可以清晰地观察到胰腺出现水肿充血的现象,证明此次造模成功。最后,将十二指肠和胰腺恢复原位后,逐层关闭大鼠腹腔。

1.2.4 分组干预 将所有建模成功的大鼠分为 AP 模型(AP)组、Rho 组、EMV 组、R-EMV 组。另选取 10 只未建模的健康大鼠纳入假手术(Sham)组。其中,Sham 组开腹后仅翻动肠管后关闭腹腔;Rho 组进一步分为低剂量(L-Rho)、中剂量(M-Rho)和高剂量(H-Rho)组并在造模成功后 2 h 分别予以 5、10、15 ml/kg 的 Rho 注射液腹腔注射;EMV 组、R-EMV 组腹腔注射最优剂量 Rho 的等量 EMV、R-EMV。对 R-EMV 组大鼠再使用 NLRP3 激活剂 BMS-986299(R-EMV + BMS-986299 组)和抑制剂 MCC950(R-EMV + MCC950 组)干预,分别给予 10 mg/kg BMS-986299、MCC950 腹腔注射;每 6 h 给药 1 次,24 h 后处死大鼠采集动脉血静置后以 3 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.5 腹水量及干湿重比 建模成功后 24 h,需密切关注各组大鼠的生存状况。同时,对大鼠进行采血后打开其腹腔,最大程度地吸取出其中的腹水并详细记录各组大鼠的腹水量。使用 4% 枸橼酸钠溶对注射器进行润洗,并抽取 5 ml 全血样本,于室温条件下,以 3 500 r/min 离心处理 10 h,保留上层血浆。进一步使用生理盐水进行仔细冲洗去除附着的血液,随后进行称重并记录其湿重,并将胰腺样本置于恒温干燥箱中,于 105 °C 条件下进行烘干处理,直至达到连续两次称量质量差低于 0.2 mg,并获取干重,最后计算干重与湿重的比值。

1.2.6 ELISA 检测血清淀粉酶、脂肪酶、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 、内皮素(endothelin, ET)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)水平 将样本血清解冻后,遵循 ELISA 试剂盒操作说明书进行检测。然后,使用先进的多功能酶标仪来对样本在 450 nm 波长下的吸光度值进行测量,进而通过多功能酶标仪测量样本在 450 nm 波长处的吸光度值,并绘制标准曲线,最后分别计算血清中淀粉酶、脂肪酶、IL-6、IL-1 β 、ET、DAO 的水平。为了确保数据的准确性,将随机抽取每组 5 个样本进行检测,使用 ELISA 法进一步检测血清中的淀粉酶、脂肪酶、IL-1 β 、IL-6、ET、DAO 的水平。

1.2.7 胰腺组织病理学检测 取得大鼠的胰腺组织样品,将其中一部分置于多聚甲醛(4%)中进行固定并过夜,在其脱水处理后,使用石蜡固定,进而将其切片后通过脱蜡脱苯,苏木精-伊红染色法

(hematoxylin-eosin staining, HE) 进行染色,最后在正置荧光显微镜下对胰腺组织病理变化进行观察,检测过程中,以王亚平等^[4]的标准化评分系统为参考,进一步对大鼠胰腺组织样品进行病理学评分。通过随机的方法抽取各组 5 个样本进行检测。

1.2.8 ELISA 检测胰腺组织氧化应激水平 使用 BCA 试剂盒对胰腺组织样品的蛋白浓度进行测定,其中包含丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)以及谷胱甘肽(glutathione, GSH)表达水平,检测过程中严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.9 免疫组化检测胰腺组织 NLRP3、NF- κ B 蛋白表达 使用免疫组化法分别对胰腺组织中 NLRP3、NF- κ B 蛋白表达进行检测。首先将切片的胰腺组织样品进行脱蜡和封闭后,加入一抗 NLRP3、NF- κ B,并在 4 °C 条件下孵育过夜。然后在室温下孵育二抗,通过二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)进行显色后,采用苏木精进行复染并封片。最后,采用双盲法进行阅片,同时运用半定量标准对病理学特征进行评估。

1.2.10 逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)实验检测胰腺组织 NLRP3、NF- κ B mRNA 表达水平 分别取得各组大鼠的胰腺组织样品磨成粉末,并将其转移至 EP 管中,按照每 100 mg 组织加入 1 ml 裂解液后提取总 RNA 并测量其浓度,提取过程中遵循试剂盒说明书操作。并将引物序列列于表 1。检测过程中,通过随机的方法分别检测每组至少 3 个样本,且每个样本 3 个复孔;以 GAPDH 为内参基因,分别在 95 °C 预变性 10 min,95 °C、5 s,55 °C、10 s,72 °C、15 s 的反应条件下重复循环 40 次。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法来计算。

1.2.11 蛋白质印迹(Western blot)分析胰腺组织 NLRP3、NF- κ B、p65 蛋白表达水平 将大鼠胰腺组织样品置于 EP 管中,在液氮速冻后放入冰箱进行保存。随后,取部分冷冻后的组织研磨成粉末,进而加入蛋白裂解液通过冰上超声进行裂解,进一步离心后取上清液,并测量总蛋白浓度。随后,在转膜、封闭后孵育,给予 β -actin、NLRP3、NF- κ B、p65 一抗(1:1 000),于 4 °C 摇床孵育过夜,其次用山羊抗小鼠、山羊抗兔(1:3 000)、(1:5 000)二抗在室温下孵育 2 h;最后,每组随机抽取 3 个样本通过电化学发光成像分析系统显影,并利用 Image J 软件分别对蛋白条带的灰度值进行分析。

表1 RT-PCR 引物序列

Tab.1 The real-time PCR primer and the primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
NLRP3	F: GACTGGATAGGTTTGCTGGGAT
	R: TGGGTGTAGCGTCTGTTGAGGT
NF-κB	F: GGAGAAGTGTCCAGGAAGTT
	R: GTCCACTCTGCTGGAAAAAC
GAPDH	F: AAAGGGTCATCATCTCCGCC
	R: AGTGATGGCATGGACTGTGG

1.3 统计学处理 采用 SPSS 27.0、GraphPad Prism 软件进行分析, 计量资料经正态性检验, 均符合正态分布, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差检验, 事后两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 R-EMV 制备情况 所制备的 R-EMVs 呈近圆形, 平均粒径为 (244.61 ± 1.08) nm, 具有明显的脂质双层结构 (图 2A)。Zeta 电位为 $-(11.13 \pm 1.25)$ mV, 表明纳米药物体系稳定具有良好的单分散性 (图 2B)。为了研究 EMV 负载 Rho 的能力, 将 EMV 与 Rho 置于 0.5 ml 全血中共孵育, 结果显示, EMV 可以负载 (58.67 ± 0.79) μg 的 Rho。同时, 在 1 h 时, Rho 的体外释放量仅在 3% 左右, 在 74 h 时仍然还有约 20% 的 Rho 没有被释放 (图 2C), 由此说明 R-EMV 具有良好的缓释作用。

2.2 大鼠模型构建情况 本次模型构建及模型干预过程中未出现大鼠死亡事件。与 Sham 组比较, AP 组大鼠腹水量明显较高 ($t = 33.79, P < 0.01$, 图 3A); ELISA 检测外周血免疫指标结果显示, AP 组 IL-1β、IL-6、ET、DAO 水平均升高 ($t = 38.25、42.54、29.20、34.92$, 均 $P < 0.01$, 图 3B ~ E)。对采集的胰

腺组织标本进行分析显示, Sham 组大鼠胰腺腺泡细胞显示清晰, 未见明显炎症细胞浸润; 与 Sham 组相比, AP 组可见明显组织充血水肿、小叶间隙增宽, 大量炎症细胞浸润, 见图 3F。同时, AP 组胰腺病理评分较 Sham 组升高 ($t = 30.06, P < 0.01$, 图 3G)。说明了本次 AP 模型构建成功, 并且 IL-6、IL-1β、ET、DAO 水平均在 AP 中呈现高表达。

2.3 Rho 对 AP 治疗效果的影响 使用不同剂量的 Rho 注射液对 AP 组大鼠进行了干预后, 单因素方差分析对多组间的腹水量、胰腺干湿重比、病理评分、淀粉酶、脂肪酶水平进行比较, 差异均有统计学意义 ($F = 1.523.7、543.3、839.9、446.1、172.2, P < 0.05$); 与 AP 组比较, 各剂量 Rho 组的以上各指标表达均下降 ($P < 0.01$)。见图 4。

2.4 R-EMV 对 AP 胰腺损伤及 NF-κB、NLRP3 表达的影响 将 AP、H-Rho、EMV、R-EMV 组病理评分进行比较, 组间存在差异 ($F = 252.3, P < 0.05$); 同时, 与其他各组相比, R-EMV 组病理评分降低, 差异有统计学意义 ($t = 23.09、5.37、15.59$, 均 $P < 0.001$), 见图 5A、B。提示 R-EMV 组的胰腺损伤呈明显的抑制现象。经单因素方差分析结果显示, 各组间血清 IL-1β、IL-6、ET、DAO 水平差异有统计学意义 ($F = 65.2、158.8、115.4、148.4$, 均 $P < 0.05$), 且各组与 AP 组比较, 水平均出现一定程度的降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 5C ~ F。以上结果说明 R-EMV 能够抑制 AP 的胰腺损伤, 并降低其炎症反应、降低肠黏膜屏障损伤。

进一步使用 RT-PCR 检测胰腺组织 NLRP3、NF-κB mRNA 表达水平 (图 5G), 与其他各组相比, R-EMV 组的 AP 大鼠 NF-κB、NLRP3 mRNA 表达明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 其他各组与 AP 组比较, NF-κB、NLRP3 mRNA 表达同样降低, 差

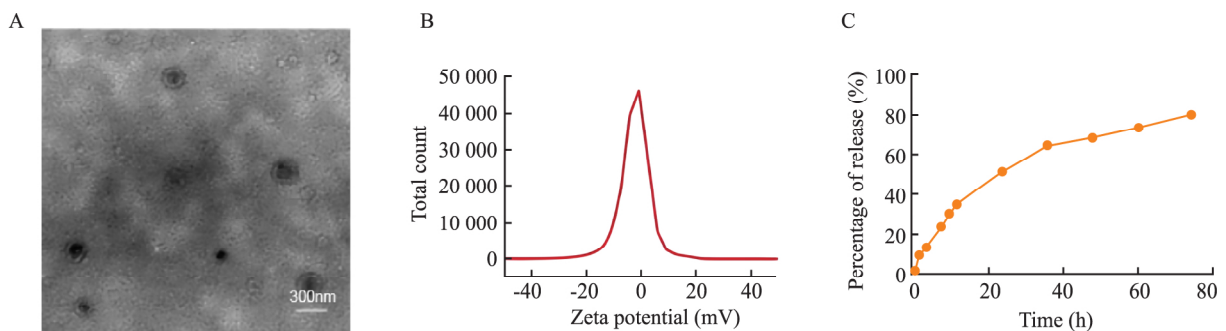


图2 R-EMV 的制备结果

Fig.2 Results of preparation of R-EMV

A: Transmission electron microscope (TEM) image of R-EMV; Bar is 300 nm; B: Zeta potential distribution of R-EMV; C: Release curve of R-EMV.

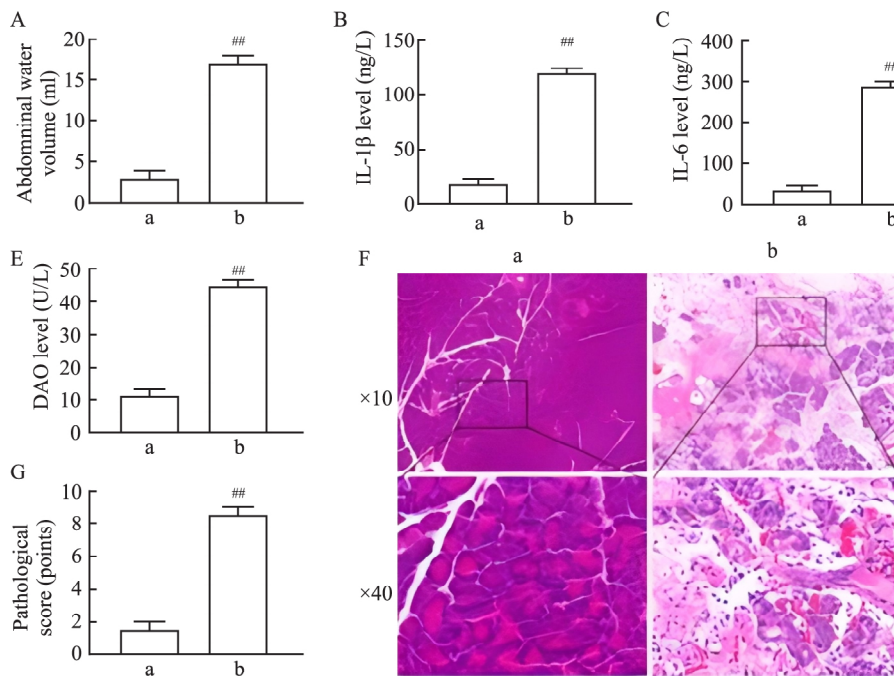


图3 大鼠建模结果图

Fig.3 Rat modeling results

A: Comparison of abdominal water volume in rats; B: Comparison of serum IL-1 β level in rats; C: Comparison of serum IL-6 level in rats; D: Comparison of serum ET level in rats; E: Comparison of serum DAO level in rats; F: Observation of rat pancreatic tissue by HE staining; G: Comparison of pancreatic pathology score; a: Sham group; b: AP group; ## $P < 0.01$ vs Sham group.

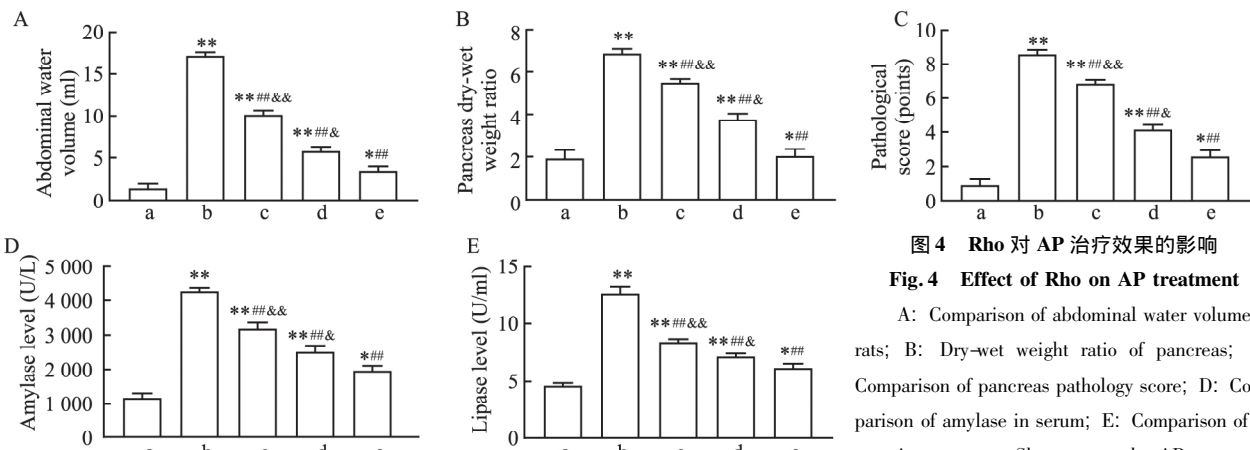


图4 Rho对AP治疗效果的影响

Fig.4 Effect of Rho on AP treatment

A: Comparison of abdominal water volume in rats; B: Dry-wet weight ratio of pancreas; C: Comparison of pancreas pathology score; D: Comparison of amylase in serum; E: Comparison of lipase in serum; a: Sham group; b: AP group; c:

L-Rho group; d: M-Rho group; e: H-Rho group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham group; ### $P < 0.01$ vs AP group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs H-Rho group.

异具有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。同时, Western blot 实验显示, R-EMV 组中 NF-κB p65、NLRP3 蛋白水平较 AP 组明显降低 (图 5H)。说明 R-EMV 能够有效降低 AP 中的 NF-κB、NLRP3 表达。免疫组化技术检测大鼠胰腺组织中 NF-κB、NLRP3 的表达情况 (图 5I、J), 结果显示, 与 AP 相比, R-EMV 组大鼠中 NF-κB、NLRP3 免疫组化染色评分降低 ($t = 24.54, 26.91$, 均 $P < 0.001$), 同时, 各组与 AP 组比较, 染色评分结果差异有统计学意义 (均 $P < 0.001$)。说明了 R-EMV 可在一定程度上影响 NF-κB/NLRP3 通路的表达。

2.5 R-EMV 对 AP 大鼠 NF-κB/NLRP3 通路表达及胰腺损伤的影响 HE 染色后进行胰腺组织病理学量化评分, 与 R-EMV 组相比, R-EMV + BMS-986299 组大鼠的胰腺组织病理评分较高 ($P < 0.01$), 见图 6A。ELISA 检测结果显示, AP、R-EMV + MCC950、R-EMV、R-EMV + BMS-986299 组四组间血清 IL-1β、IL-6、ET、DAO 水平表达差异有统计学意义 ($F = 729.1, 812.0, 667.4, 707.4$, 均 $P < 0.001$), 且 R-EMV + MCC950 组 IL-1β、IL-6、ET、DAO 表达较 Sham 组高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 较 AP、R-EMV 组低 ($P < 0.01$), 见图 6B ~ E。使用 ELISA 法检测各

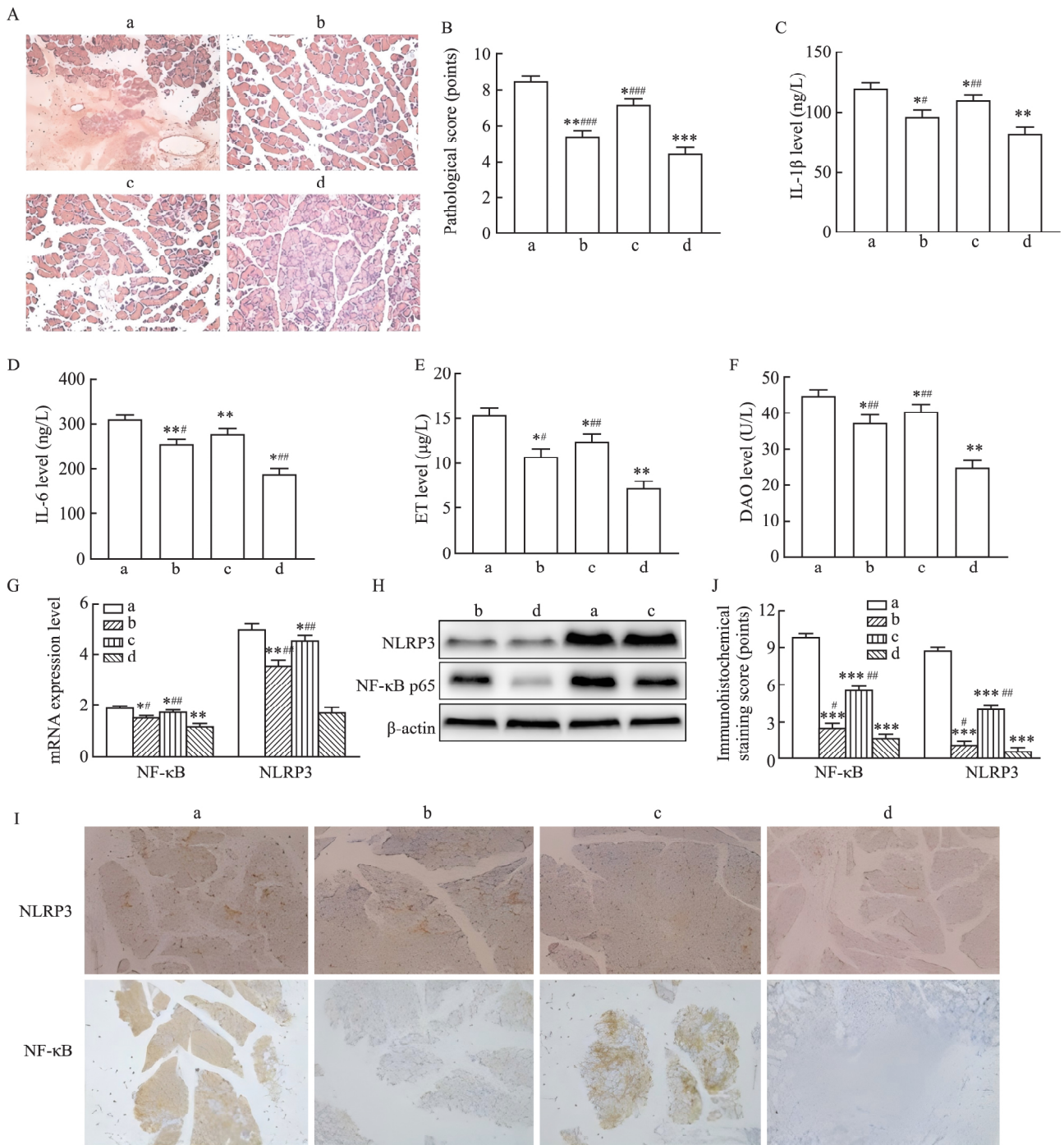


图5 R-EMV对AP胰腺损伤及NF-κB、NLRP3表达的影响

Fig. 5 Effects of R-EMV on pancreatic injury and expression of NF-κB and NLRP3 in AP

A: Rat pancreatic tissue was observed by HE staining $\times 200$; B: Comparison of pancreatic pathological score; C: Comparison of serum IL-1 β level in rats; D: Comparison of serum IL-6 level in rats; E: Comparison of serum ET level in rats; F: Comparison of serum DAO level in rats; G: *NF-κB* and *NLRP3* mRNA level were measured by RT-PCR; H: Western blot of *NLRP3* and *NF-κB* p65; I: Immunohistochemical detection of *NF-κB* and *NLRP3* expression in pancreatic tissues $\times 400$; J: Immunohistochemical staining score; a: AP group; b: H-Rho group; c: EMV group; d: R-EMV group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs AP group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs R-EMV group.

组胰腺组织中氧化应激水平, AP、R-EMV + MCC950、R-EMV、R-EMV + BMS-986299 组四组间 MDA、SOD、GSH 表达水平差异有统计学意义 ($F =$

451.1、328.7、129.8, 均 $P < 0.001$), 且 R-EMV + MCC950 组 MDA 表达较 Sham 组升高 ($P < 0.05$), 较 AP、R-EMV 组降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),

R-EMV + MCC950 组 SOD、GSH 表达较 Sham 组降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、较 AP、R-EMV 组升高 ($P < 0.05$)，见图 6F~H。以上结果说明了 R-EMV 可与 MCC950 发挥协同作用，进而改善胰腺损伤情况。这也进一步验证了 R-EMV 能够抑制 NF- κ B/NLRP3 通路表达，进而抑制 AP 的胰腺损伤。

3 讨论

尽管 Rho 在传统医学中被广泛应用，但在药效稳定性和生物利用度等方面仍存在一定的局限性。为了解决这些问题，本研究以 EMV 作为体内给药的细胞载体，通过透射电镜图像观察到其纳米颗粒呈近圆形，且具有明显的脂质双层结构。此外，体外释放试验结果提示，R-EMV 具有较好的缓释特性，进一步说明 R-EMV 能够显著聚集于胰腺，从而实现胰腺损伤部位的靶向给药。既往研究^[5]进一步证实了 EMV 能够提高药物的治疗效果。为深入了解 R-EMV 在 AP 治疗中的作用，本研究构建了 AP 大鼠模型，同时在对比 AP 大鼠与正常大鼠的血清指标时发现，AP 大鼠 ET、DAO、IL-6、IL-1 β 水平明显升高。这表明，在 AP 状态下，肠黏膜屏障损伤和炎症反应同时发生。这一结果与 Zhang et al^[6] 的研究

发现相一致。为了进一步了解 Rho 在 AP 中的治疗作用，本研究对其设置了不同的剂量干预，结果显示，Rho 在很大程度上降低 AP 大鼠的腹水量，并改善其病理状态，并且这一过程与 Rho 剂量的升高密切相关。同时，本研究结果表明，高剂量的 *Rhodiola rosea* 能够增强对 AP 的治疗效果。因此推测，R-EMV 能够对 AP 起到一定的治疗效果。但 R-EMV 影响 AP 的其他因素及机制还需要深入研究。

NF- κ B 作为炎症反应的关键调节因子，其在激活炎症反应中起到重要作用^[7]。研究^[8]表明，当 NF- κ B 被激活后，能够诱发机体发生炎症反应，并促进各脏器组织进一步发生损伤。Wang et al^[9] 在研究中发现，抑制 NF- κ B 活化能够在一定程度上减轻重症 AP 出现的炎症。这也就进一步提示了 NF- κ B 可能是 AP 大鼠发生胰腺损伤的重要环节。同时，Zhang et al^[10] 在研究中同样指出，NF- κ B/NLRP3 通路的激活能够促进炎症和 EMT 反应进而促进肺纤维化。为了明确 R-EMV 在 AP 中的干预效果，本次研究对 AP 大鼠注射了 R-EMV 进行观察，同时以 H-Rho 的结果作为参考比较，结果显示，R-EMV 组的 ET、DAO、IL-6、IL-1 β 水平均呈现出一定的下降趋势，并且大鼠胰腺病理状态也有所改善，由此可见，

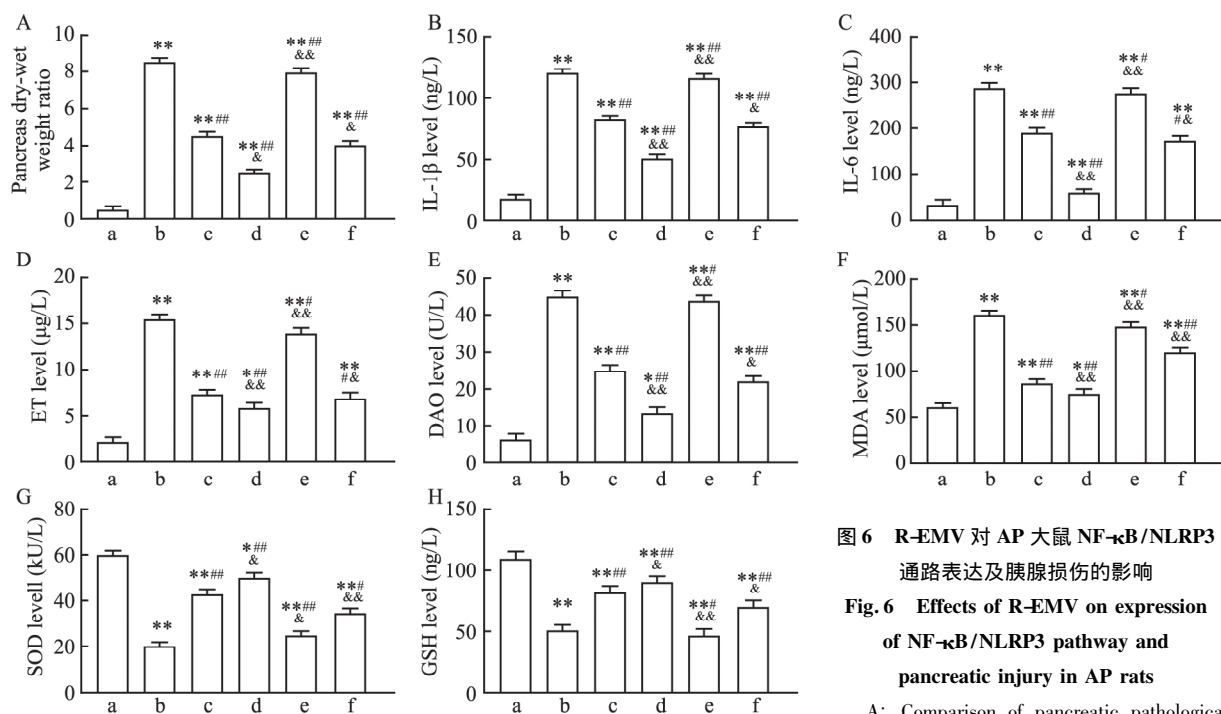


图 6 R-EMV 对 AP 大鼠 NF- κ B/NLRP3 通路表达及胰腺损伤的影响
Fig. 6 Effects of R-EMV on expression of NF- κ B/NLRP3 pathway and pancreatic injury in AP rats

A: Comparison of pancreatic pathological scores; B: Comparison of serum IL-1 β level in rats; C: Comparison of serum IL-6 level in rats; D: Comparison of serum ET level in rats; E: Comparison of serum DAO level in rats; F: Comparison of serum MDA level; G: Comparison of serum SOD level; H: Comparison of serum GSH level; a: Sham group; b: AP group; c: R-EMV group; d: R-EMV + MCC950 group; e: R-EMV + BMS-986299 group; f: R-EMV + MCC950 + BMS-986299 group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs AP group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs R-EMV group.

R-EMV 能够减轻 AP 胰腺损伤，并且这一过程有 NF- κ B/NLRP3 通路的参与。分析其机制可能是，R-

EMV 通过抑制 NF- κ B 活性,进而在一定程度上降低其下游蛋白 NLRP3 的活化^[11],从而使得 NLRP3 炎症小体无法激活^[12]进而抑制了 IL-6、IL-1 β 等炎症因子的表达^[13],并且在这一过程中,肠道黏膜的氧化应激反应被减弱,从而促进了肠道黏膜机械屏障功能的减弱,从而减轻肠道胰腺损伤^[14]。

研究^[15-16]表明,Rho 不仅能够调节 NF- κ B、p38 和 JNK 等与炎症相关的信号通路,减少 IL-1 β 、TNF α 和 NGF 等炎症因子的释放,进一步缓解炎症造成的损伤,还能够调控 MAPK、JAK2/STAT3 等信号通路,抑制 IL-6、IL-8 和 PAF 等表达,进一步减轻炎症应答,在调节炎症反应和细胞凋亡过程中发挥着关键作用^[17]。为了明确 R-EMV 在 AP 治疗中的具体机制,探究其与 NF- κ B/NLRP3 通路之间的机制联系,本次研究以 R-EMV 作为干预基础,并对其分别添加了 NF- κ B/NLRP3 通路激活剂和抑制剂进行观察,结果显示,与 R-EMV + BMS-986299 组相比,R-EMV + MCC950 组炎症状态改善更快,说明 R-EMV 能够通过抑制 NF- κ B/NLRP3 通路活性进而抑制胰腺损伤的发生。此外,为了确保研究结果的可靠性,本研究又在 R-EMV + BMS-986299 组的基础上加入了 MCC950 进行干预,结果显示,R-EMV + MCC950 + BMS-986299 组胰腺组织的病理损伤程度被有效逆转,说明 R-EMV 能够通过抑制 NF- κ B/NLRP3 通路表达进而干预 AP 的胰腺损伤进程。

综上所述,R-EMV 在 AP 中具有较好的胰腺保护作用,能够通过改善机体炎症状态,从而抑制胰腺组织病变,并在一定程度上减轻胰腺损伤,这一过程与降低 NF- κ B/NLRP3 通路活性并下调 IL-6 等炎症因子和 MDA 等氧化应激指标的表达有关。因此,R-EMV 与 AP 之间存在密切联系,在疾病的临床治疗中具有一定的潜力。然而,此次研究仅在动物层面进行观察,未深入了解其细胞、分子机制,R-EMV 在临床应用的安全性还需要进一步探究。

参考文献

- [1] Mederos M A, Reber H A, Girgis M D. Acute pancreatitis: a review [J]. *JAMA*, 2021, 325(4): 382-90. doi: 10.1001/jama.2020.20317.
- [2] Wang X, Qian J, Meng Y, et al. Salidroside ameliorates severe acute pancreatitis-induced cell injury and pyroptosis by inactivating Akt/NF- κ B and caspase-3/GSDME pathways [J]. *Heliyon*, 2023, 9(2): e13225. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e13225.
- [3] Sang Z, Xu L, Ding R, et al. Nanoparticles exhibiting virus-mimic surface topology for enhanced oral delivery [J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 7694. doi: 10.1038/s41467-023-43465-y.
- [4] 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):225-36. doi:10.13294/j.aps.2022.0011.
- [4] Wang Y P, Zhao Z, Tang L, et al. Vascular endothelial growth factor induces inflammatory injury of pancreatic tissue by activating autophagy in hyperlipidemic acute pancreatitis rats [J]. *Acta Physiol Sin*, 2022, 74(2): 225-36. doi: 10.13294/j.aps.2022.0011.
- [5] Wu Q, Wang J, Wang Y, et al. Targeted delivery of celastrol to glomerular endothelium and podocytes for chronic kidney disease treatment [J]. *Nano Res*, 2022, 15(4): 3556-68. doi: 10.1007/s12274-021-3894-x.
- [6] Zhang Y, Jiang Y, Li H, et al. Effect of STING signaling on intestinal barrier damage in severe acute pancreatitis [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 428(2): 113630. doi: 10.1016/j.yexcr.2023.113630.
- [7] El-Shitany N A, Eid B G. Icarin modulates carrageenan-induced acute inflammation through HO-1/Nrf2 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109567. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109567.
- [8] Li S, Zhang Y, Lu R, et al. Peroxiredoxin 1 aggravates acute kidney injury by promoting inflammation through Mincle/Syk/NF- κ B signaling [J]. *Kidney Int*, 2023, 104(2): 305-23. doi: 10.1016/j.kint.2023.04.013.
- [9] Wang Z, Liu J, Li F, et al. Mechanisms of qingyi decoction in severe acute pancreatitis-associated acute lung injury via gut microbiota: targeting the short-chain fatty acids-mediated AMPK/NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(4): e0366422. doi: 10.1128/spectrum.03664-22.
- [10] Zhang Y, Liang J, Cao N, et al. Coal dust nanoparticles induced pulmonary fibrosis by promoting inflammation and epithelial-mesenchymal transition via the NF- κ B/NLRP3 pathway driven by IGF1/ROS-mediated AKT/GSK3 β signals [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8: 500. doi: 10.1038/s41420-022-01291-z.
- [11] Liu Q, Sun Y, Zhu Y, et al. Melatonin relieves liver fibrosis induced by Txnrd3 knockdown and nickel exposure via IRE1/NF- κ B/NLRP3 and PERK/TGF- β 1 axis activation [J]. *Life Sci*, 2022, 301: 120622. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120622.
- [12] Zeng Y, Liu X, Yi Q, et al. Free total rhubarb anthraquinones protect intestinal mucosal barrier of SAP rats via inhibiting the NLRP3/caspase-1/GSDMD pyroptotic pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117873. doi: 10.1016/j.jep.2024.117873.
- [13] He Y, Li Z, Xu T, et al. Polystyrene nanoplastics deteriorate LPS-modulated duodenal permeability and inflammation in mice via ROS driven-NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 1): 135662. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135662.
- [14] Liu W, Guo K. Tannic acid alleviates ETEC K88-induced intestinal damage through regulating the p62-keap1-Nrf2 and TLR4-NF- κ B-NLRP3 pathway in IPEC-J2 cells [J]. *J Sci Food Agric*, 2024, 104(9): 5186-96. doi: 10.1002/jsfa.13343.
- [15] 朱光昭,方璐,严婕,等.红景天苷调控 miR-20a-5p/TIMP2 轴对类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞增殖和迁移的影响[J].*安徽医科大学学报*,2024,59(5):803-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.009.
- [15] Zhu G Z, Fang L, Yan J, et al. Effects of salidroside on proliferation and migration of fibroblastoid synovial cells in rheumatoid ar-

thritis by regulating miR-20a-5p/TIMP2 axis [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(5): 803–9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.009.

[16] Zhang W, Zhang W, Huo L, et al. Rosavin suppresses osteoclastogenesis *in vivo* and *in vitro* by blocking the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and mitogen-

activated protein kinase (MAPK) signaling pathways [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(5): 383. doi: 10.21037/atm-20-4255.

[17] Zheng Q H, Du L Y, Zhao Y, et al. Mechanism of *Rhodiola rosea*-*Euonymus alatus* drug pair against rheumatoid arthritis: network pharmacology and experimental validation [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2023, 11(12): e1127. doi: 10.1002/iid3.1127.

Protective effect of *Rhodiola rosea* bionic nanomedicine on pancreas of acute pancreatitis rats and its mechanism

Zhang Tongzhe, Zhao Xirong, Li Peiwu

(Dept of Emergency, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030)

Abstract Objective To explore the protective effect and mechanism of *Rhodiola rosea* (Rho) bionic nanomedicine in rats with acute pancreatitis. **Methods** Erythrocyte membrane vesicles (EMV) were used as biomimetic nanomedicine coating materials to construct Rho biomimetic nanomedicine. Meanwhile, rat models of acute pancreatitis were constructed and divided into acute pancreatitis model (AP) group, Rho group, EMV group and *Rhodiola rosea* erythrocyte membrane vesicles (R-EMV) group. R-EMV group rats were further treated with NLRP3 activator BMS-986299 (R-EMV + BMS-986299 group) and inhibitor MCC950 (R-EMV + MCC950 group). The changes of abdominal water volume were observed, and serum levels of interleukin (IL-6), IL-1 β , endothelin (ET), diamine oxidase (DAO), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of pancreatic tissue. Immunohistochemistry, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to analyze the expression of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) and nuclear transcription factor-Kappa B (NF- κ B) in pancreatic tissue. **Results** The prepared R-EMVs were nearly circular, the average particle size was (244.61 \pm 1.08) nm, and the Zeta potential was -(11.13 \pm 1.25) mV. At the same time, the EMV could load (58.67 \pm 0.79) μ g of Rho. Compared with Sham group, the abdominal water volume of rats in AP group was significantly higher ($t = 33.79$, $P < 0.01$), and the levels of peripheral blood immune indexes IL-1 β , IL-6, ET and DAO increased ($t = 38.25$, 42.54, 29.20, 34.92, all $P < 0.01$). In AP group, there were obvious tissue hyperemia and edema, widening of lobular space, infiltration of a large number of inflammatory cells, and increased pancreatic pathological score ($t = 30.06$, $P < 0.01$). Compared with AP group, abdominal water volume, dry-wet weight ratio of pancreas, pathological score, amylase and lipase levels in Rho group decreased ($F = 1523.7$, 543.3, 839.9, 446.1, 172.2, $P < 0.05$). Compared with other groups, the levels of serum IL-1 β , IL-6, ET and DAO in AP group decreased to some extent. Compared with AP group, NF- κ B p65 and NLRP3 protein levels and NF- κ B and NLRP3 immunohistochemical staining scores decreased in R-EMV group ($t = 24.54$ and 26.91, both $P < 0.001$). At the same time, the levels of serum IL-1 β , IL-6, ET, DAO, MDA, SOD and GSH in R-EMV + MCC950 group were significantly lower than those in AP group, R-EMV group and R-EMV + BMS-986299 group. **Conclusion** R-EMV has a good pancreatic protection effect in acute pancreatitis, which is related to reducing the activity of NF- κ B/NLRP3 pathway and down-regulating the expression of inflammatory factors such as IL-6 and oxidative stress indicators such as MDA.

Key words *Rhodiola rosea*; biomimetic nanometer; acute pancreatitis; pancreatic injury; rat; mechanism

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82260135)

Corresponding author Li Peiwu, E-mail: wuzi360@126.com