

巨噬细胞膜包裹的 PEG-PLGA 载雷公藤红素纳米粒 靶向治疗重症急性胰腺炎的大鼠体内药效学研究

乔尉真, 曹曦, 张志荣, 龚涛, 符垚*

(四川大学华西药学院, 靶向药物及释药系统教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 急性胰腺炎常伴随局部或全身性炎症反应, 本研究旨在开发一种雷公藤红素靶向治疗急性胰腺炎的策略。首先, 选择小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为模型巨噬细胞, 通过细胞溶胀、机械破坏和密度梯度离心法提取巨噬细胞膜; 采用探头超声法制备平均粒径约 150 nm 左右的 PEG-PLGA 纳米粒; 利用挤膜法将细胞膜挤过 400 nm 多孔聚碳酸酯膜而制备巨噬细胞膜包裹的 PEG-PLGA 纳米粒。体内分布研究发现, 该细胞膜包裹的纳米粒有很好地胰腺炎靶向性; 与未包膜纳米粒比较, 载雷公藤红素巨噬细胞膜包裹的纳米粒对胰腺局部和全身炎症有较好的治疗效果。

关键词: RAW264.7 巨噬细胞; PEG-PLGA; 纳米粒; 雷公藤红素; 急性胰腺炎

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 01-0127-06

Celastrol-loaded macrophage membrane camouflaged PEG-PLGA nano-particles for targeted therapy of severe acute pancreatitis in rats

QIAO Wei-zhen, CAO Xi, ZHANG Zhi-rong, GONG Tao, FU Yao*

(Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery Systems, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Severe acute pancreatitis (SAP) is characterized by both local and systemic inflammatory responses. This study was designed to develop a site-specific delivery strategy for SAP therapy using celastrol (CLT). First, murine RAW264.7 cells were used as a model of macrophage cell line, cell membranes were obtained by emptying intracellular contents *via* hypotonic lysing, mechanical membrane disruption, and differential centrifugation. Poly(ethylene glycol) methyl ether-block-poly(lactic-co-glycolic acid) (PEG-PLGA) nanoparticles (NPs) were then prepared by sonication. With the collected membrane materials, macrophage membrane coated PEG-PLGA NPs (RNPs) were then prepared by extrusion through a 400 nm polycarbonate membrane. Biodistribution study in rats with SAP showed RNPs selectively accumulated in the inflamed pancreatic tissues. Compared with CLT loaded NPs, CLT loaded RNPs were proven to effectively attenuate local pancreatic inflammation and systemic inflammation in rats with SAP.

Key words: RAW264.7 macrophage; poly(ethylene glycol) methyl ether-block-poly(lactic-co-glycolic acid); nanoparticle; celastrol; severe acute pancreatitis

急性胰腺炎 (acute pancreatitis, AP) 是以胰腺间

质水肿、出血、腺泡细胞空泡变性、坏死及炎症细胞浸润为病理特征的急性炎症性疾病。AP 常伴有局部或全身性炎症反应, 约 20% 发展为重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP), 死亡率高达 40% 以上。因此, SAP 是常见的严重威胁人类健康的重大疾

收稿日期: 2017-08-29; 修回日期: 2017-09-24.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81690261, 81503018).

*通讯作者 Tel: 86-28-85503798, E-mail: yfu4@scu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0846

病之一^[1-3]。急性胰腺炎相关性肺损伤是 SAP 最为严重的全身并发症。迄今为止, AP 及相关性肺损伤的病理生理机制及影响 SAP 发生发展的因素尚不清楚。有文献^[4, 5]报道胰腺实质中活化的单核巨噬细胞、多核粒细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 等多种促炎细胞因子而引发急性胰腺炎局部炎症的形成并引起全身炎症反应, 而全身促炎细胞因子的过度表达又加重了急性胰腺炎的严重程度。

文献^[6, 7]报道纳米制剂可以显著提高胰腺炎治疗药物的药效。但是, 血胰屏障的存在导致治疗效果差强人意。近年来, 细胞膜仿生纳米粒作为新型递药系统引起了研究者的广泛关注。红细胞膜纳米粒、血小板膜纳米粒、肿瘤细胞膜纳米粒及白细胞膜纳米粒等被广泛用于小分子药物、疫苗及大分子药物的靶向递送^[8-11]。细胞膜仿生纳米粒因继承了细胞膜上的特异性受体或膜蛋白可用于实现特异性靶向递送, 并在肿瘤等疾病模型上显示出较好的治疗效果^[10, 12-15]。

巨噬细胞属免疫细胞, 是参与炎症反应的重要细胞之一。巨噬细胞在脊椎动物体内参与非特异性和特异性防卫, 主要功能是以固定细胞或游离细胞的形式对细胞残片及病原体进行吞噬及消化, 并激活淋巴细胞或其他免疫细胞, 令其对病原体作出反应^[16-20]。在病理生理过程中巨噬细胞起着极为重要的作用, 可以向肺组织迁移并释放多种细胞因子如 TNF- α 、白细胞介素-8 (IL-8)、IL-6 和白细胞介素-1 (IL-1) 等; 反过来, 这些细胞因子又可趋化中性粒细胞、T 细胞和嗜酸性粒细胞等迁移^[16, 18]。因此, 若能有效抑制细胞和炎症因子的释放, 则可以有效改善炎症。巨噬细胞膜包裹纳米粒的研究已有文献^[10]报道, 但主要用于抗肿瘤治疗的研究。本文首次提出利用巨噬细胞膜修饰 PEG-PLGA 纳米粒用于炎症靶向治疗的研究。

本研究通过提取小鼠单核巨噬细胞的细胞膜, 挤膜法制备细胞膜包裹的 PEG-PLGA 纳米粒 (RNPs), 进一步构建 SAP 大鼠模型, 以雷公藤红素 (CLT) 为模型药物对该载药 RNPs 的体内靶向性和药效进行了初步考察。

材料与方法

试剂和药品 磷酸盐缓冲液 (PBS)、RPMI-1640 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶溶液、注射用青霉素钠、注射用硫酸链霉素 (北京索莱宝生物科技有限公司); 标准胎牛血清 (FBS, 上海复蒙生物制品

有限责任公司); 牛磺胆酸钠 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 大鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒、大鼠 IL-6 ELISA 检测试剂盒 (美国 R&D 公司); MPO 测定试剂盒、淀粉酶测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。其余试剂均为分析纯。

仪器 Zeta Sizer-NanoZS90 激光散射粒径分析仪 (英国 Malvern 公司); PEG-PLGA (1 : 50 : 50, M_w 45 000 ~ 75 000, 成都电子科技大学); 脱氧胆酸钠 (SDC, 美国 Amresco 公司); 聚乙二醇硬脂酸酯 15 (Solutol HS15, 德国 BASF 公司); 脂质体挤出仪 (美国 Avanti Polar Lipids 公司); 微量移液器 (法国 Gilson 公司); 涡旋振荡器 (德国 IKA 公司); 电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗器械厂); LDZX-50KB 立式压力蒸气灭菌器 (上海申安医疗器械厂); 化学发光仪 Varioskan Flash instrument (美国 Thermo Scientific 公司); 3K15-通用台式冷冻离心机 (德国 Sigma Aborzentrifugen 公司)。

细胞 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 (中国科学院上海细胞生物研究所), 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下连续培养, 隔天换液。

动物 Wistar 大鼠, 雄性, 重量 190 ~ 220 g, 购自四川大学华西医学中心实验动物中心。饲养条件: 温度 (25 ± 2) °C, 采用标准饲料喂养, 自由饮水及进食。动物实验依据四川大学关于实验动物的饲养和使用准则进行。

巨噬细胞细胞膜的提取 用 2 mmol·L⁻¹ EDTA 消化培养皿中的 RAW264.7, 重悬于 PBS 中, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 除去上清液, 用配好的 Tris 低渗溶液重复吹打, 20 000 r·min⁻¹ 离心 2 min, 再用加了蔗糖的低渗溶液重复吹散, 6 000×g 离心 15 min, 重复 2 次。探头超声打碎细胞, 6 000×g 离心 15 min 得到的沉淀即是细胞膜。

载药细胞膜纳米粒的制备 将脱氧胆酸钠 (SDC) 20 mg 和 Solutol HS15 (HS15) 20 mg 溶于适量水中, 超声溶解; 将模型药物雷公藤红素 (CLT) 或近红外荧光探针 (Did) 与 PEG-PLGA 20 mg 溶于适量氯仿, 超声溶解; 将有机相迅速加入水相, 冰水浴条件下探头超声形成初乳。初乳于 40 °C 水浴减压旋转蒸发, 除去有机溶剂, 即得 PEG-PLGA 纳米粒。将提取的细胞膜通过挤膜器 (400 nm), 大概 20 次后将均匀的细胞膜与纳米粒混合通过挤膜器, 挤膜 20 次后离心, 即得比较均匀的细胞膜纳米粒。

大鼠 SAP 模型 参照 Aho 的方法^[21-23], Wistar 大鼠经 1% 戊巴比妥钠 ($45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射麻醉后, 将其固定于手术板上。常规消毒, 取腹正中切口进腹。切口长约 3~5 cm, 暴露胃, 提起胃可看见胰腺及十二指肠, 寻找到胰胆管, 在近肝门处用无损伤动脉夹夹闭胆总管, 用自制的胰岛素针头 (针头平面向上), 沿十二指肠乳头逆行穿刺入胆胰管, 并向前推进 3~5 mm, 用手夹紧针头。以 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 匀速向胰胆管内推注 3% 牛磺胆酸钠 $0.1 \text{ mL}/100 \text{ g}$, 约 3~5 min 后见胰腺组织出血、坏死, 表明 SAP 模型制作成功, 然后退出针头, 连续缝合关闭腹腔, 并开始计时。动物实验均分为生理盐水组、溶液组、NPs 组和 RNPs, 荧光素 Did 的给药剂量是 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, CLT 给药剂量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。均在模型建立后立即给药。

标本采集 各实验组 (生理盐水组、原料药组、NPs 组和 RNPs 组) 于术后各时间点麻醉后经原切口进腹, 观察胰腺炎症, 分别采集血液标本和组织标本。大鼠处死前经心脏采血 3~4 mL, 置于空白试管中, 室温凝固后以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上层血清置 EP 管中于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 供血清淀粉酶、TNF- α 和 IL-6 测定。大鼠处死后快速切取胰腺和肺组织, 一部分置于液氮中, 于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用, 用于组织髓过氧化物酶检测; 另一部分置于 4% 多聚甲醛固定液中固定, 用于病理学和免疫组化评价。

血清淀粉酶 (AMS) 含量的测定——碘淀粉比色法 淀粉酶能水解淀粉生成葡萄糖、麦芽糖及糊精, 在底物浓度已知且过量的情况下, 加入碘液与未水解的淀粉结合生成蓝色复合物, 根据蓝色的深浅可推算出水解的淀粉量, 从而计算出 AMS 的活力。100 mL 血清中 AMS, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 与底物作用 30 min, 水解 10 mg 淀粉为 1 个单位。

腹水积液质量的测定 干纱布称量后, 用其蘸干胸腔和腹腔, 再称湿纱布重量。腹水和胸腔积液量 (g) = 湿纱布重量 - 干纱布重量。

血清中 TNF- α 和 IL-6 测定 均采用双抗体夹心 ELISA 法检测, 具体操作按照试剂盒说明进行。

组织中髓过氧化物酶 (MPO) 的测定 胰腺和肺组织 MPO 活性测定按照试剂盒说明书进行, 应用 Beckman DU640 型分光光度仪检测。

HE 染色 在不同的实验天数处死大鼠, 取胰腺和肺组织块放入预先准备好的 10% 中性福尔马林固定液中, 固定 24 h 后使组织的蛋白质变性凝固。HE 染色, 组织显微镜下观察。

数据分析 采用 Origin 8.5 软件进行统计学分

析。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间均数差异采用 Student's *t*-test 进行检验。

结果

1 RNPs 的制剂表征

取制备的 NPs 和 RNPs 用纯水稀释 50 倍, 于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 下用激光散射粒径分析仪测定, 重复测定 3 次, 记录粒径均值和 zeta 电位均值。粒径分布以多分散性指数 (PDI) 值表示。如表 1 所示, 未包膜纳米粒 NPs 和包膜纳米粒 RNPs 粒径分别在 138.8 和 178.3 nm 左右, zeta 电位发生显著变化, 从 -23.6 mV 上升至接近细胞膜电位的 -10.2 mV , 此结果表明细胞膜纳米粒成功制备。此外, 载药纳米粒的包封率在 80% 以上, 且粒径和电荷均未见明显变化。

Table 1 Size, polydispersity index (PDI) and zeta potential of nanoparticles (NPs), membrane, and macrophage membrane coated PEG-PLGA NPs (RNPs). $n=3$, $\bar{x} \pm s$

Parameter	NPs	Membrane	RNPs
Size/nm	138.8 ± 2.1	213.5 ± 6.7	178.3 ± 5.5
PDI	0.137 ± 0.021	0.257 ± 0.058	0.225 ± 0.032
Zeta potential/mV	-23.6 ± 2.5	-9.5 ± 1.8	-10.2 ± 2.5

2 RNPs/Did 在 SAP 大鼠的体内分布

根据前述方法成功建立 SAP 大鼠模型, 以近红外荧光探针 Did 为模型化合物考察包膜纳米粒在炎症大鼠模型中的体内分布特征。Did 是一种应用很广的近红外探针 ($\lambda_{\text{ex}}=634 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=648 \text{ nm}$), 由于它的脂溶性很强, 所以不会发生泄漏, 常常被用于纳米载体的表征^[24]。给药分为 Did 溶液组、NPs/Did 组和 NNPs/Did 组。于造模 1 和 3 h 后分别处死大鼠, 取胰腺组织, 在活体成像仪上观察并对荧光强度进行半定量 (图 1)。如图 1 所示, 在 1 和 3 h 时, Did 溶液组在胰腺组织几乎无分布, 普通纳米粒 NPs/Did 在炎症胰腺组织有分布, 而修饰细胞膜后 NNPs/Did 组在炎症胰腺组织的分布最多; 半定量结果显示 NNPs/Did 在胰腺组织的聚集量较 Did 溶液和 NPs/Did 组显著增加 ($P<0.05$)。

3 NPs/CLT 在 SAP 大鼠模型中的药效学考察

根据上述实验方法采集标本, 主要考察了以下药效指标: 血清淀粉酶、腹水重量、TNF- α 、IL-6、胰腺 MPO、肺 MPO 及胰腺干湿比。

据文献^[25]报道 AMS、腹水、干湿比、MPO、TNF- α 及 IL-6 是评价 SAP 的几个重要指标, 在患病后会发

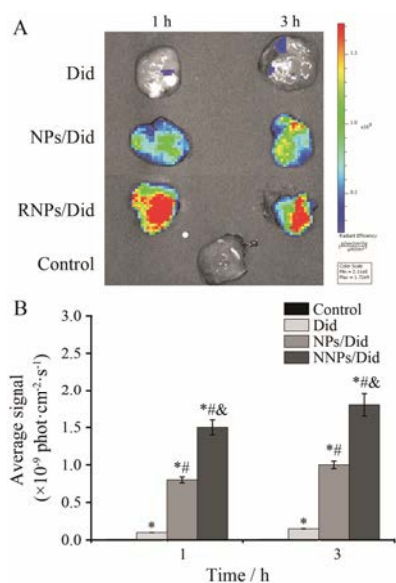


Figure 1 Biodistribution in the pancreas of severe acute pancreatitis (SAP) rats in 1 h and 3 h (A). Semiquantitative analysis of fluorescence intensity of pancreas (B). $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs Did; & $P < 0.05$ vs NPs/Did

生显著变化。如图 2 所示，模型组与正常大鼠相比，各指标均显著升高 ($P < 0.05$)，说明大鼠 SAP 模型造

模成功。其次，CLT 组相对于模型组明显改善肝、肺 MPO 的含量 ($P < 0.05$)，普通纳米粒组相对于溶液组改善了胰腺干湿比、胰腺 MPO 及血清中 TNF- α 、IL-6 的含量。RNP 相对于普通纳米粒组均改善了以上几种指标的含量 ($P < 0.05$)。由此可见，① CLT 溶液具备一定抗炎作用^[26-29]；② 与 CLT 溶液比较，载 CLT 的普通纳米粒 NPs/CLT 有进一步降低各指标水平的趋势，如显著降低胰腺干湿比、胰腺 MPO 和 TNF- α 水平 ($P < 0.05$)；③ 在普通纳米粒表面包裹巨噬细胞膜后，包膜纳米粒 RNP/CLT 可以进一步提高 CLT 对 SAP 的疗效，上述各项指标与 NPs/CLT 组比较均显著降低 ($P < 0.05$)。

4 胰腺和肺组织病理学分析

如图 3 所示，胰腺 HE 染色结果显示模型组和 CLT 组胰腺间质明显增宽水肿，炎症细胞浸润明显，胰腺小叶结构破坏，有出血和大片坏死；RNP/CLT 组胰腺水肿明显减轻，炎症细胞浸润较少，小叶散在性少量出血，散在腺泡灶性坏死。表明 RNP/CLT 处理可有效降低牛磺胆酸钠诱导的大鼠胰腺组织损伤。

同时，肺组织 HE 染色结果显示正常组肺组织结

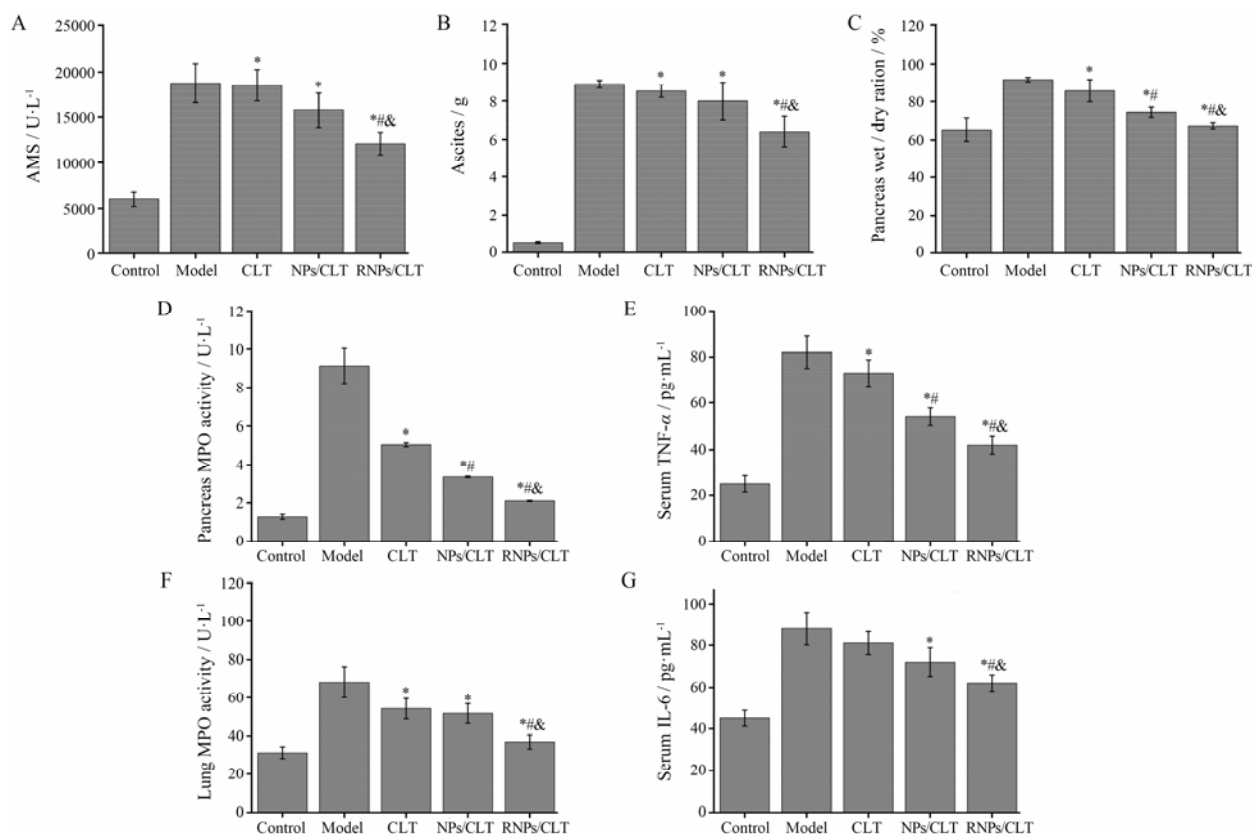


Figure 2 The therapeutic effect of celastrol (CLT), NPs/CLT, and RNP/CLT on local and systemic inflammation in SAP rats. The serum amylase (AMS) concentrations (A), the weight of ascites (B), the pancreas wet/dry ratio (C), myeloperoxidase (MPO) activity (D), TNF- α (E), lung MPO activity (F), and IL-6 (G) in pancreas or lung was greatly downregulated after various CLT-based treatments. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs model; # $P < 0.05$ vs CLT; & $P < 0.05$ vs NPs/CLT

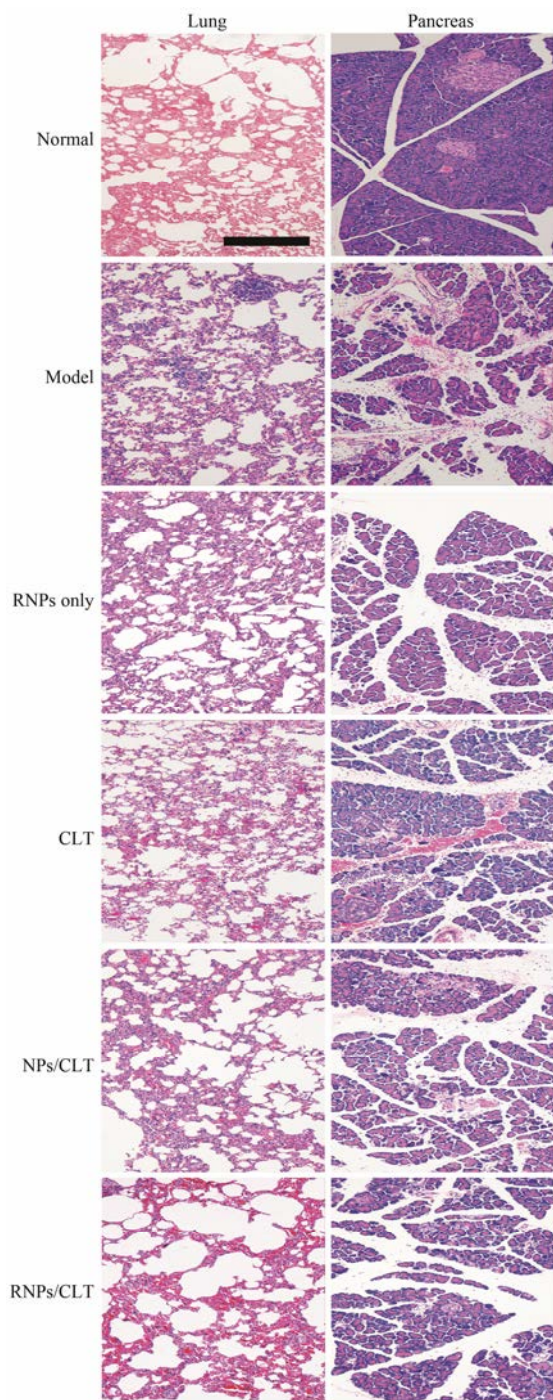


Figure 3 Morphological analysis of pancreatic and lung tissues in each treatment group by hematoxylin-eosin staining. Scale bar = 100 μ m

构清晰, 肺泡大小正常, 肺泡壁完整, 肺间质无明显渗出与出血, 无炎症细胞浸润; 模型组和 CLT 溶液组大鼠肺组织充血水肿并明显实变, 大量炎症细胞浸润, 肺泡结构破坏, 微血栓形成; RNPs/CLT 组预处理后大鼠肺组织间质水肿、出血及炎症细胞浸润等病理变化较模型组和 CLT 组明显减轻, 肺泡结构基本完整。表明 RNPs/CLT 预处理可有效降低牛磺胆酸钠诱

导的大鼠肺组织损伤。

讨论

本研究成功构建了小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞膜包裹的 PEG-PLGA 纳米递药系统。SAP 大鼠模型的体内分布研究表明 RNPs 可显著提高了药物在炎症胰腺组织中的分布量。以 CLT 作为模型药物, 体内药效学研究初步表明 RNPs/CLT 可显著提高 CLT 对 SAP 的治疗效果。这可能与细胞膜表面的一些膜蛋白和受体有关, 机制尚待进一步研究。综上, 巨噬细胞膜包裹 PEG-PLGA 纳米粒的递药策略既保存了纳米粒低毒、长循环等优点, 又赋予纳米粒特异性的炎症靶向特性, 且本研究为利用雷公藤红素治疗 SAP 提供了重要参考, 在胰腺炎或其他炎症的治疗过程中有很好的前景。

References

- [1] Lu B, Qian JM. Research progress on etiology and pathogenesis of severe acute pancreatitis [J]. *Chin J Pract Surg* (中国实用外科杂志), 2012, 32: 590-592.
- [2] Xu GM. The present situation and prospect of acute pancreatitis [J]. *Chin J Pract Internal Med* (中国实用内科杂志), 2004, 24: 705-706.
- [3] Pandol SJ, Forsmark CE, Hart PA. Acceleration of our understanding of recurrent acute and chronic pancreatitis [J]. *Pancreatology*, 2016, 16: 692-693.
- [4] Agrawal V, Crisi GM, D'Agati VD, et al. Renal sarcoidosis presenting as acute kidney injury with granulomatous interstitial nephritis and vasculitis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2012, 59: 303-308.
- [5] Liang J, Lü JC, Song ZF, et al. Risk factors of infected pancreatic necrosis secondary to severe acute pancreatitis [J]. *Hepatobil Pancreat Dis*, 2016, 15: 428-433.
- [6] Attia MS, Al-Radadi NS. Progress of pancreatitis disease biomarker alpha amylase enzyme by new nano optical sensor [J]. *Biosen Bioelectron*, 2016, 86: 413-419.
- [7] Zhang HW, Wang LQ, Xiang QF, et al. Specific lipase-responsive polymer-coated gadolinium nanoparticles for MR imaging of early acute pancreatitis [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 356-367.
- [8] Anselmo AC, Mitragotri S. Cell-mediated delivery of nanoparticles: taking advantage of circulatory cells to target nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2014, 190: 531-541.
- [9] Balasubramanian V, Correia A, Zhang H, et al. Biomimetic engineering using cancer cell membranes for designing

- compartmentalized nanoreactors with organelle-like functions [J]. *Adv Mater*, 2016. DOI: 10.1002/adma.201605375.
- [10] Cao H, Dan Z, He X, et al. Liposomes coated with isolated macrophage membrane can target lung metastasis of breast cancer [J]. *ACS Nano*, 2016, 10: 7738–7748.
- [11] Choi J, Kim HY, Ju EJ, et al. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors [J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 4195–4203.
- [12] Gu XT, Li Y. The progress of the study of the nanoparticle loading system of membrane modification [J]. *Chin J Pharm (中国药学杂志)*, 2017, 48: 94–101.
- [13] Yoo JW, Irvine DJ, Discher DE, et al. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 521–535.
- [14] Molinaro R, Corbo C, Martinez JO, et al. Biomimetic proteolipid vesicles for targeting inflamed tissues [J]. *Nat Materials*, 2016, 15: 1037–1046.
- [15] Fang R, Hu CMJ, Luk BT, et al. Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14: 2181–2188.
- [16] Batrakova EV, Li S, Reynolds AD, et al. A macrophage – nanozyme delivery system for Parkinson’s disease [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 1498–1506.
- [17] Brynskikh AM, Zhao Y, Mosley RL, et al. Macrophage delivery of therapeutic nanozymes in a murine model of Parkinson’s disease [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5: 379–396.
- [18] Wang Z, Li J, Cho J, et al. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils [J]. *Nat Nanotechnol*, 2014, 9: 204–210.
- [19] Tran TH, Rastogi R, Shelke J, et al. Modulation of macrophage functional polarity towards anti-inflammatory phenotype with plasmid DNA delivery in CD44 targeting hyaluronic acid nanoparticles [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16632.
- [20] Alizadeh D, Zhang L, Hwang J, et al. Tumor-associated macrophages are predominant carriers of cyclodextrin-based nanoparticles into gliomas [J]. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 2010, 6: 382–390.
- [21] Lombardi B, Estes LW, Longnecker DS. Acute hemorrhagic pancreatitis (massive necrosis) with fat necrosis induced in mice by *DL*-ethionine fed with a choline-deficient diet [J]. *Am J Pathol*, 1975, 79: 465–480.
- [22] Rao KN, Eagon PK, Okamura K, et al. Acute hemorrhagic pancreatic necrosis in mice. Induction in male mice treated with estradiol [J]. *Am J Pathol*, 1982, 109: 8–14.
- [23] Chetty U, Gilmour HM, Taylor TV. Experimental acute pancreatitis in the rat – a new model [J]. *Gut*, 1980, 21: 115–117.
- [24] Lu W, Tan YZ, Jiang XG. Establishment of coculture model of blood-brain barrier *in vitro* for nanoparticle’s transcytosis and toxicity evaluation [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 296–304.
- [25] Li J, Zhang J, Fu Y, et al. Dual pancreas- and lung-targeting therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis mediated by a phenolic propanediamine moiety [J]. *J Control Release*, 2015, 212: 19–29.
- [26] Zhang DH, D’Alessio P, Yang CX, et al. A New Study on the Anti-inflammatory Mechanism of Tripterygium Retene Has Been Found: Non-toxic Dose-inhibiting Human Vascular Endothelial Cells Activate the Expression of Adhesion Molecules and Reduce Their Adhesion to White Blood Cells [C]. The Fourth National Conference Paper on the Academic Conference of Lei Gong, 2004.
- [27] Xu WM, Zhang LX, Cheng ZH, et al. Inhibitory effect of tripteryne on activities of IL-1, IL-2 and release of PGE₂ [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1991, 26: 641–646.
- [28] Zhang LX, Yu FX, Zheng QY, et al. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of tripteryne [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 1990, 25: 573–577.
- [29] Xu QQ, Zhou ZS, Xiang M. Progress in the study of signal pathways for chronic inflammation-associated pancreatic carcinogenesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 174–181.