

参附注射液对内毒素休克模型大鼠肺组织炎症的改善作用及抗炎机制研究^Δ

刘霞^{1*},艾飞²,褚春薇¹,陈向云¹,郭俊峰¹,杨毅¹,梅丽艳³,苗纪飞³,温泉³,叶森³,黎晖^{3#}(1.贵州中医药大学基础医学院,贵阳 550025;2.贵州中医药大学第二临床医学院,贵阳 550025;3.广州中医药大学基础医学院,广州 510006)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1492-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.11

摘要 目的:研究参附注射液对内毒素休克模型大鼠肺组织炎症的改善作用及其抗炎机制。方法:将48只大鼠随机分为正常组、模型组、地塞米松组(阳性对照,1 mg/kg)和参附注射液低、中、高剂量组(5、10、15 mL/kg),每组8只。除正常组外,其余各组大鼠腹腔注射脂多糖(LPS)复制内毒素休克模型,造模后各组大鼠腹腔注射给药1次。给药24 h后,苏木精-伊红(HE)染色后观察大鼠肺组织病理学变化并进行病理学评分;逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定肺组织中核转录因子κB(NF-κB)信号通路相关蛋白P65、P50 mRNA的表达水平;Western blot法测定肺组织中P65、P50蛋白的表达水平,并检测肺组织细胞核和细胞浆中P65蛋白的表达水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测大鼠血浆中肿瘤坏死因子α(TNF-α)水平。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺泡间隔增厚,血管明显充血,肺间质大量中性粒细胞浸润;肺组织病理学评分和P65、P50 mRNA及蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$),细胞核、细胞浆中P65蛋白和血浆中TNF-α水平均显著升高($P<0.001$)。与模型组比较,地塞米松组和参附注射液中、高剂量组大鼠肺泡结构完整,无明显出血,炎性细胞浸润程度明显改善;肺组织病理学评分和P65、P50 mRNA及蛋白的表达水平以及血浆中TNF-α水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$),地塞米松组和参附注射液低、中剂量组大鼠肺组织细胞核、细胞浆中P65蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结论:参附注射液可通过降低肺组织中P65、P50 mRNA及蛋白的表达水平及血浆中TNF-α的水平,改善内毒素休克模型大鼠肺组织的炎症反应。

关键词 参附注射液;急性肺损伤;内毒素休克;核转录因子κB;P65;P50;大鼠

Improvement and Anti-inflammation Mechanism of Shenfu Injection on Lung Tissue in Endotoxin Shock Model Rats

LIU Xia¹, AI Fei², CHU Chunwei¹, CHEN Xiangyun¹, GUO Junfeng¹, YANG Yi¹, MEI Liyan³, MIAO Jifei³, WEN Quan³, YE Sen³, LI Hui³(1.School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2.Second Clinical Medical College, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 3.School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement and anti-inflammation mechanism of Shenfu injection on lung tissue of endotoxin shock model rats. METHODS: Totally 48 rats were randomized into control group, model group, dexamethasone group (positive control, 1 mg/kg) and Shenfu injection low-dose, medium-dose and high-dose groups (5, 10, 15 mL/kg), with 8 rats in each group. Except for normal group, other groups were given intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) to induce endotoxin shock model. After modeling, each group was given relevant medicine once intraperitoneally. 24 h after medication, HE staining was used to observe pathological changes of lung tissue in rats and pathological scoring was conducted. RT-PCR was used to determine mRNA levels of P65 and P50 proteins related to NF-κB signaling pathway. Western blot assay was used to determine the expression levels of P65 and P50 proteins in lung tissue, and the expression levels of P65 protein in nucleus and cytoplasm of lung tissue were also determined. The level of TNF-α in plasma in rats were determined by ELISA. RESULTS: Compared with control group, alveolar septum became thicker, obvious vascular engorgement was found, and a large number of neutrophils infiltrated the interstitium in model group. Histopathological score, mRNA and protein expression levels of P65 and P50 in lung tissues were increased significantly ($P<0.01$ or $P<0.001$); the protein expression of levels P65 in nucleus and cytoplasm and level of TNF-α in plasma were increased significantly ($P<0.001$). Compared with model group, alveolar structure of rats in dexamethasone group and Shenfu injection medium-dose and high-dose groups was complete, no obvious bleeding was

^Δ 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金资助项目(No. 81760738)

* 副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中医药抗炎症分子机制。E-mail:liuxia0851@126.com

通信作者:研究员,博士生导师,博士。研究方向:中医药抗炎症分子机制。E-mail:lihui@gzucm.edu.cn

observed, and the degree of inflammatory cell infiltration was improved significantly. Histopathological score, mRNA and protein expression levels of P65 and P50 in lung tissue and level of TNF- α in plasma were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$). The protein expression level of P65 in nucleus and cytoplasm of lung tissue were decreased significantly in dexamethasone group and Shenfu injection low-dose and medium-dose groups were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$). CONCLUSIONS: Shenfu injection can decrease mRNA and protein expression levels of P65 and P50 in lung tissue, level of TNF- α in plasma, and protect lung tissue of endotoxin shock rats.

KEYWORDS Shenfu injection; Acute lung injury; Endotoxin shock; NF- κ B; P65; P50; Rat

内毒素休克属于感染性休克,多因细菌细胞壁上的脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)导致,常伴随急性肺损伤,甚至多器官衰竭^[1]。流行病学调查显示,约50%内毒素休克患者伴随急性肺损伤,甚至急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[2]。核转录因子 κ B(Nuclear factor κ B, NF- κ B)是炎症因子转录的核心, NF- κ B信号通路的过度激活可使炎症发展成不可控状态, NF- κ B信号通路活化的标志是P65、P50蛋白从细胞浆迁移至细胞核(该过程称为核转位),从而启动下游炎症因子的转录,故抑制其核转位则可抑制过度的炎症反应^[3-4]。

感染性休克属中医外感病“厥脱”范畴,用扶阳固脱的参附注射液有确切疗效^[5-7]。药理研究表明,参附注射液对内毒素休克模型大鼠肺泡巨噬细胞表达的P65蛋白具有抑制作用^[8]。但参附注射液是否能抑制内毒素休克模型大鼠肺组织中P65蛋白的核转位,目前尚未见报道。本实验通过建立内毒素休克模型大鼠,观察参附注射液对内毒素休克模型大鼠肺组织炎症的改善作用,检测大鼠肺组织中P65、P50蛋白的表达和P65蛋白的核转位以及大鼠血浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达水平,以期参附注射液的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Neofuge 1600R 台式高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司); Ama 240 高压灭菌锅(英国 Astell 公司); EnSpire 多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); DHP-9012 恒温培养箱(上海一恒科技有限公司); PowerPac300 电泳仪、170-3930 转膜仪、CFX96 荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)仪均购自美国 Bio-Rad 公司; 5200 全自动化学发光图像分析仪(上海天能科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

LPS(美国 Sigma 公司,批号:20160920);参附注射液(雅安三九药业有限公司,批号:20170324,规格:10 mL);肝素(海通药业有限公司,批号:170212136);地塞米松注射液(艾美捷科技有限公司,批号:100129-201704,规格:10 mg/mL);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔单克隆抗体(内参,批号:9100002004)、羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)-辣根过氧化物酶标记物(HRP)(批号:

GR313248-1)均购自美国 Abcam 公司;H3 兔单克隆核抗体(内参,碧云天生物技术有限公司,批号:SC-376769); P65 兔单克隆抗体(批号:9034P501D)、P50 兔单克隆抗体(批号:9034P501D)均购自美国 Cell 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(上海贝博生物试剂公司,批号:BB18121);大鼠 TNF- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(华美生物工程有限公司,批号:CSB-E11987r);核/浆蛋白分离试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号:20170605);逆转录试剂盒(美国 Thermo 公司,批号:AK6501);qPCR 扩增试剂盒(天根生物科技发展有限公司,批号:FP209-02);增强化学发光(ECL)液(美国 Millipore 公司,批号:1801501)。

1.3 动物

SPF 级健康 SD 大鼠, δ , 体质量为(220 \pm 20) g, 购于广州中医药大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0020。大鼠单笼饲养于 22 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 55% 的实验动物房中,自由取食。实验动物方案经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准,实验操作和取材均遵循《关于善待实验动物的指导性意见》《实验动物管理条例》和《实验动物许可管理办法》规定进行。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

将 48 只大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(30 mg/kg)进行麻醉,暴露右颈总动脉,插管连接生物技能系统(BL-420)以检测血压,取其中 40 只经腹腔注射 LPS(15 mg/kg)建立内毒素休克模型大鼠,其余 8 只为正常组,注射与 LPS 等量的生理盐水。观察造模大鼠的动脉压直至达到休克状态后(以血压下降 30% 作为大鼠休克的指标)^[9],将造模成功的大鼠分为模型组、地塞米松组(阳性对照,1 mg/kg,根据临床用药剂量换算而得)和参附注射液低、中、高剂量组(5、10、15 mL/kg,根据临床用药剂量的 2.5、5、7.5 倍换算而得),每组 8 只,腹腔注射给药 1 次。

2.2 采集样本

各组大鼠给药 24 h 后,注射戊巴比妥钠进行麻醉,心脏取血置于抗凝采血管,静置 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心(离心半径为 40 cm)10 min,取上清液于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。各组大鼠采血后迅速取出肺组织,生理盐水洗净,左肺用于 PCR 及 Western blot 分析,右肺固定于 4% 多聚甲醛,用于形态学观察。

2.3 大鼠肺组织病理学观察

对固定后的肺组织进行常规脱水包埋,制备厚度为4 μm 的石蜡切片,经苏木精-伊红(HE)染色后于显微镜下观察各组肺组织结构。每组随机观察3只大鼠的切片,每张切片随机选出5个高倍视野,参照相关文献方法^[10],以肺泡充血、出血、中性粒细胞浸润和肺泡间隔增厚程度等指标进行病理学评分(极轻度损伤:0分;轻度损伤:1分;中度损伤:2分;重度损伤:3分;严重损伤:4分),将4项指标得分相加作为总分,病理学评分越高,说明肺组织损伤越严重。

2.4 大鼠肺组织中P65、P50 mRNA水平检测

各组大鼠取20 mg肺组织,提取样品总RNA,按逆转录试剂盒说明书操作获得cDNA。以cDNA为模板,按qPCR扩增试剂盒操作,以GAPDH为内参基因,分别对P65、P50基因进行扩增。引物序列由上海生工生物工程公司设计并合成。PCR反应体积为20 μL ,反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 反应5 s;60 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 s;共反应40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法^[11]计算P65、P50 mRNA的表达水平。RT-PCR引物序列见表1。

表1 RT-PCR引物序列

Tab 1 Primer sequence of RT-PCR

基因	引物序列	引物长度, bp
P65	上游引物:5'-ACCTGGAGCAAGCCATTAGC-3'	100
	下游引物:5'-CGGACCGCATTCAAGTCATA-3'	
P50	上游引物:5'-CAACATCTCCTTGCTGGCT-3'	97
	下游引物:5'-TCCGGCCGCTATATGCAAG-3'	
GAPDH	上游引物:5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	108
	下游引物:5'-TCTTCTGGGTGGCAGTGATG-3'	

2.5 大鼠肺组织中P65、P50蛋白表达水平检测

各组大鼠取50 mg肺组织,加液氮研磨成粉末状,加含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液冰上裂解30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心15 min(离心半径为13.5 cm)后取上清液,即为蛋白样品。所得蛋白样品根据BCA蛋白定量试剂盒检测浓度后保存至-80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。将各组蛋白煮沸变性后,按每泳道30 μg 质量上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭后分别加P65兔单克隆抗体(1:1 000)、P50兔单克隆抗体(1:1 000)和GAPDH兔单克隆抗体(1:5 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST缓冲液洗膜后,加羊抗兔IgG-HRP(1:20 000)室温孵育1 h,滴加ECL液后于全自动化学发光图像分析仪进行曝光显影,采用Image J软件分析光密度值,以GAPDH为内参,以相应蛋白与内参的光密度比值表示相应蛋白的相对表达量。

2.6 大鼠肺组织中P65蛋白核转位的检测

肺组织细胞核、细胞浆中蛋白的提取步骤严格按核/浆蛋白分离试剂盒说明书进行。各组大鼠取50 mg肺组织,加液氮研磨成粉末状,加200 μL 预冷的Buffer A涡旋剧烈振荡15 s,冰上放置15 min;加11 μL 预冷的Buffer B涡旋剧烈振荡5 s,冰上放置1 min;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 500

r/min离心5 min后收集上清液,即为细胞浆蛋白。在离心沉淀物(细胞核)中加入100 μL 预冷的Buffer C,超声(频率:200 W,功率:50 Hz)裂解2 min,冰上放置40 min,其间每隔10 min涡旋15 s;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 500 r/min离心10 min,收集上清液,即为细胞核蛋白。细胞核、细胞浆蛋白浓度测定、电泳、转膜、抗体孵育及曝光显影等操作步骤同“2.5”项下方法,其中一抗孵育时细胞浆蛋白内参GAPDH,细胞核蛋白内参H3。

2.7 大鼠血浆中TNF- α 水平测定

采用ELISA对各组大鼠血浆中所含TNF- α 水平进行测定,测定方法严格按大鼠TNF- α ELISA试剂盒方法操作。

2.8 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间用单因素方差分析进行组间比较,两组间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺组织病理学观察结果

正常组大鼠肺组织结构清晰,肺泡间隔较薄,肺泡结构完整,无充血、出血和明显的炎性细胞浸润。与正常组比较,模型组大鼠肺泡间隔增厚,血管明显充血(见图1中 \uparrow),肺间质见大量中性粒细胞浸润(见图1中 \square),病理学评分显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组和参附注射液低、中、高剂量组大鼠肺泡结构完整,无明显出血,炎性细胞浸润程度明显改善,病理学评分均显著降低($P < 0.01$)。各组大鼠肺组织病理学变化见图1,各组大鼠病理学评分结果见表2。

3.2 各组大鼠肺组织中P65、P50 mRNA表达水平测定结果

与正常组比较,模型组大鼠肺组织中P65、P50 mRNA表达水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,地塞米松组和参附注射液低、中、高剂量组大鼠肺组织中P65、P50 mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。各组大鼠肺组织中P65、P50 mRNA表达水平测定结果见表3。

3.3 各组大鼠肺组织中P65、P50蛋白表达水平测定结果

与正常组比较,模型组大鼠肺组织中P65、P50蛋白的表达水平显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$);与模型组比较,地塞米松组和参附注射液中、高剂量组大鼠肺组织中P65、P50蛋白的表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。各组大鼠肺组织中P65、P50蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表4。

3.4 各组大鼠肺组织中P65蛋白核转位测定结果

与正常组比较,模型组大鼠肺组织细胞核和细胞浆中P65表达水平均显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,地塞米松组和参附注射液低、中剂量组大鼠肺组织细胞核和细胞浆中P65表达水平均显著降低($P < 0.001$),说明地塞米松和参附注射液抑制了P65蛋白的核转位。各

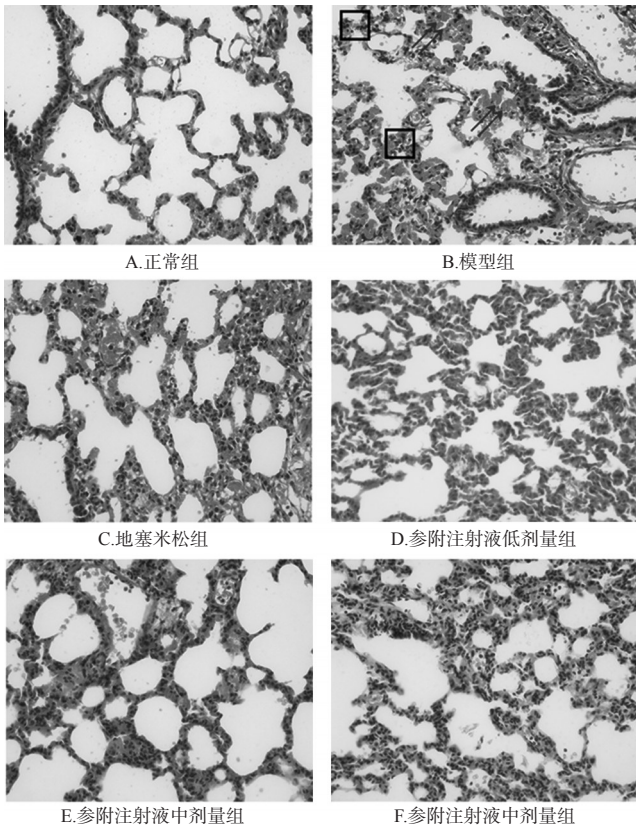


图1 各组大鼠肺组织病理学变化(HE, ×400)

Fig 1 Pathological changes of lung tissue in rats in each group(HE, ×400)

表2 各组大鼠病理学评分结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Pathological score of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	病理学评分
正常组	1.667 ± 0.574
模型组	11.330 ± 1.528**
地塞米松组	6.014 ± 1.025 ^{##}
参附注射液低剂量组	7.425 ± 1.156 ^{##}
参附注射液中剂量组	3.333 ± 0.549 ^{##}
参附注射液高剂量组	7.103 ± 0.932 ^{##}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ^{##} $P < 0.01$

表3 各组大鼠肺组织中P65、P50 mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 mRNA levels of P65 and P50 in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	P65 mRNA	P50 mRNA
正常组	1.060 ± 0.139	1.050 ± 0.142
模型组	2.753 ± 0.222***	2.612 ± 0.364***
地塞米松组	1.746 ± 0.181 ^{###}	1.544 ± 0.179 ^{###}
参附注射液低剂量组	2.354 ± 0.241 [#]	1.822 ± 0.292 ^{##}
参附注射液中剂量组	1.752 ± 0.203 ^{###}	1.533 ± 0.123 ^{###}
参附注射液高剂量组	1.337 ± 0.143 ^{###}	1.316 ± 0.228 ^{###}

注:与正常组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

Note: vs. normal group, *** $P < 0.001$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

组大鼠细胞核、细胞浆中P65蛋白表达电泳图见图3,测定结果见表5。

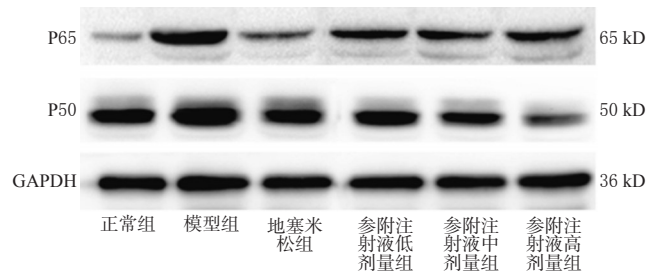


图2 各组大鼠肺组织中P65、P50蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electrophoregram of protein expression of P65 and P50 in lung tissue of rats in each group

表4 各组大鼠肺组织中P65、P50蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 4 Protein levels of P65 and P50 in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	P65	P50
正常组	0.188 ± 0.038	0.826 ± 0.168
模型组	0.795 ± 0.124***	1.264 ± 0.177**
地塞米松组	0.449 ± 0.060	0.938 ± 0.124 [#]
参附注射液低剂量组	0.655 ± 0.072	0.810 ± 0.153 [#]
参附注射液中剂量组	0.552 ± 0.126 [#]	0.703 ± 0.135 ^{###}
参附注射液高剂量组	0.515 ± 0.044 ^{###}	0.417 ± 0.088 ^{###}

注:与正常组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

Note: vs. normal group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$

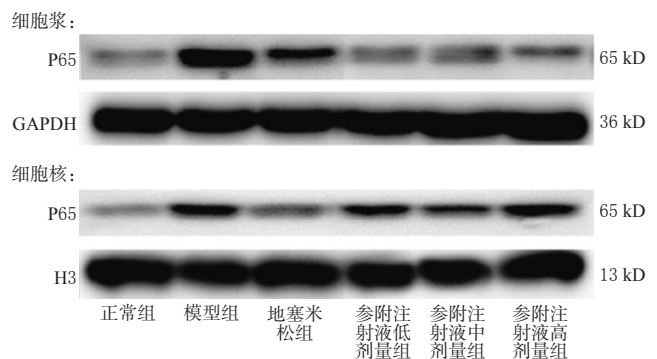


图3 各组大鼠肺组织细胞核、细胞浆中P65蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoregram of protein expression of P65 in nucleus and cytoplasm of lung tissue of rats in each group

3.5 各组大鼠血浆中TNF-α水平测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血浆中TNF-α水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,地塞米松组和参附注射液低、中、高剂量组大鼠血浆中TNF-α水平显著降低($P < 0.001$)。各组大鼠血浆中TNF-α水平测定结果见表6。

表5 各组大鼠肺组织细胞核、细胞浆中P65蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 5 Protein expression of P65 in nucleus and cytoplasm of lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	P65(细胞核)	P65(细胞浆)
正常组	0.233 ± 0.028	0.417 ± 0.035
模型组	0.704 ± 0.094***	1.033 ± 0.078***
地塞米松组	0.373 ± 0.037###	0.741 ± 0.068##
参附注射液低剂量组	0.545 ± 0.074#	0.464 ± 0.079###
参附注射液中剂量组	0.456 ± 0.092##	0.528 ± 0.071###
参附注射液高剂量组	0.589 ± 0.052	0.468 ± 0.177###

注:与正常组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$

Note: vs. normal group, *** $P < 0.001$; vs. model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

表6 各组大鼠血浆中TNF- α 水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 6 TNF- α level in plasma of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TNF- α , $\mu\text{g/mL}$
正常组	41.19 ± 7.16
模型组	266.00 ± 22.84***
地塞米松组	90.48 ± 15.52###
参附注射液低剂量组	120.70 ± 13.63###
参附注射液中剂量组	90.00 ± 12.78###
参附注射液高剂量组	94.90 ± 17.04###

注:与正常组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,### $P < 0.001$

Note: vs. normal group, *** $P < 0.001$; vs. model group, ### $P < 0.001$

4 讨论

参附注射液为中药复方注射液,其组方源自《伤寒论》四逆加人参汤,方中红参为君药,为扶正补虚之要药,附子为臣药,能温通十二经之阳气,助君相之火以破寒结之痹;临床上常用于感染性、失血性休克等阳气脱失之症,亦用于寒凝腹痛,惊悸怔忡等阳气虚少之症^[5-7]。

LPS是引起内毒素休克的常见病因,在内毒素休克过程中,常伴随着急性肺损伤,因此选用LPS建立内毒素休克模型大鼠^[1-2]。实验发现,内毒素休克模型大鼠急性肺损伤病理学形态主要表现为肺泡间隔水肿、肺泡隔毛细血管淤血明显、大量中性粒细胞浸润;内毒素休克模型大鼠给予参附注射液后,可显著减轻急性肺损伤的病理改变,为参附注射液改善内毒素所致急性肺损伤提供了依据。

NF- κB 信号通路是参与炎症反应,产生炎症因子的主要信号通路。NF- κB 家族成员以同源或异源二聚体的形式存在,而其中最常见二聚体形式为P65、P50二聚体,也称为标准的NF- κB 分子^[12]。P65、P50二聚体通常以无活性状态存在于细胞浆中,当受到损伤因素的刺激时,抑制P65活性的NF- κB 抑制蛋白(I κB)经泛素化途径降解,游离的P65、P50二聚体即向核内迁移,与 κB 位点结合,从而启动炎症因子TNF- α 、白细胞介素1 β (IL-1 β)等转录^[4,13]。过度激活免疫反应致使炎症发展为

非可控状态,从而导致器官功能衰竭甚至死亡。

相关研究发现,参附注射液对肺损伤具有一定的治疗作用,但作用机制尚不明确,仍待进一步研究^[14-18]。NF- κB 信号通路活化的标志为P65的核转位^[4],而参附注射液是否能影响P65的核转位,目前尚未见到相关报道,因此本课题不仅检测了P65、P50蛋白的转录和表达,同时也检测了P65的在细胞核和细胞浆中的分布情况。研究结果发现,内毒素休克模型大鼠肺组织中P65、P50 mRNA和蛋白的表达水平均显著升高,P65不仅在细胞浆中表达增多,细胞核内P65的表达也显著增加,提示原本分布于细胞浆中的P65大量向细胞核内转移,说明NF- κB 信号通路激活。TNF- α 是早期促炎因子,在感染性疾病中TNF- α 常作为判断病情严重程度和转归的指标^[19]。TNF- α 启动子区含有 κB 结合位点,因此NF- κB 信号通路的活化可增加TNF- α 的转录和翻译并分泌至细胞外,分泌出细胞外的TNF- α 可再次激活NF- κB 信号通路,加剧炎症反应^[20-21]。

综上所述,参附注射液对内毒素休克模型大鼠肺组织炎症具有改善作用,其作用机制与降低肺组织NF- κB 信号通路中P65、P50 mRNA和蛋白的表达水平,抑制P65的核转位有关,该实验结果可为其临床应用提供实验依据及参考。

参考文献

- [1] WANG G, HAN D, ZHANG Y, et al. A novel hypothesis: up-regulation of HO-1 by activation of PPARgamma inhibits HMGB1-RAGE signaling pathway and ameliorates the development of ALI/ARDS[J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5(5): 706-710.
- [2] BLANK R, NAPOLITANOL M. Epidemiology of ARDS and ALI[J]. *Crit Care Clin*, 2011, 27(3): 439-458.
- [3] MARUYAMA T. The nuclear I κB family of proteins controls gene regulation and immunohomeostasis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(2): 836-840.
- [4] CHEN J, CHEN ZJ. Regulation of NF- κB by ubiquitination[J]. *Curr Opin Immunol*, 2013, 25(1): 4-12.
- [5] 熊利红, 秦丹梅. 参附注射液治疗休克临床观察[J]. *中国中医急症*, 2013, 22(1): 156.
- [6] 何木龙, 陈少军. 参附注射液治疗休克(厥脱证)38例的临床观察[J]. *实用中西医结合临床*, 2016, 16(1): 20-22.
- [7] 熊旭东, 徐康雅, 曹伦. 参附注射液治疗厥脱四期临床验证[J]. *中国中医急症*, 2005, 14(8): 745-746.
- [8] 王进, 乔礼芬, 李永胜, 等. 参附注射液对脂多糖诱导的大鼠肺泡巨噬细胞核转录因子- κB 的激活和细胞因子产生的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2009, 38(1): 15-18.
- [9] LIU X, XU Q, MEI LY, et al. Paenol attenuates acute lung injury by inhibiting HMGB1 in lipopolysaccharide-induced shock rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.05.032.
- [10] KOTANIDOU A, LOUSTRARI H, PAPADOMICHELAKIS E, et al. Inhaled activated protein C attenuates lung

Box-Behnken设计-响应面法优化芡实中总维生素E的提取工艺研究^Δ

王红^{1,2*}, 吴启南^{2#}, 崔永伟¹, 伍城颖², 沈蓓², 樊修和²(1.南京市溧水区中医院药剂科, 南京 211200; 2.南京中医药大学药学院, 南京 210023)

中图分类号 R927.2; R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)11-1497-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.11.12

摘要 目的: 优化芡实中总维生素E的提取工艺。方法: 以芡实总维生素E提取量为考察指标, 提取时间、提取次数、超声功率、粉碎度为考察因素, 采用单因素试验和Box-Behnken设计-响应面法优化芡实总维生素E的提取工艺, 并进行3次(芡实用量分别为2.0、20.0、40.0 g)验证试验。结果: 芡实中维生素E的最佳提取工艺参数为提取时间80 min, 提取次数3次, 超声功率240 W, 粉碎度80目。在验证试验中, 总维生素E的提取量分别为2.063、2.103、2.085 mg/g(RSD分别为2.6%、1.5%、1.3%, $n=3$), 与预测值(2.092 mg/g)的相对误差分别为0.14%、0.53%、0.33%。结论: 优化的提取工艺的方法合理、稳定、可行, 可用于芡实中总维生素E的提取。

关键词 芡实; 维生素E; 优化; 提取工艺; Box-Behnken设计-响应面法

Study on Optimization of the Extraction Technology of Total Vitamin E in *Euryale ferox* by Box-Behnken Design-response Surface Methodology

WANG Hong^{1,2}, WU Qinan², CUI Yongwei¹, WU Chengying², SHEN Bei², FAN Xiuhe²(1.Dept. of Pharmacy, Nanjing Lishui District Hospital of TCM, Nanjing 211200, China; 2.College of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China)

- injury induced by aerosolized endotoxin in mice[J]. *Vascular Pharmacol*, 2006, 45(2): 134-140.
- [11] SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [12] HUXFORD T, MALEK S, GHOSH G. Structure and mechanism in NF- κ B/I κ B signaling[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1999. DOI: 10.1101/sqb.1999.64.533.
- [13] BERKOWITZ B, HUANGD B, CHENPARK FE, et al. The x-ray crystal structure of the NF- κ B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta-kappa B site[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24694-24700.
- [14] ZHANG MY, JI XF, WANG S, et al. Shen-fu injection attenuates postresuscitation lung injury in a porcine model of cardiac arrest[J]. *Resuscitation*, 2012, 83(9): 1152-1158.
- [15] JI XF, YANG L, ZHANG MY, et al. Shen-fu injection attenuates postresuscitation myocardial dysfunction in a porcine model of cardiac arrest[J]. *Shock*, 2011, 35(5): 530-536.
- [16] GU W, LI C, YIN W, et al. Shen-fu injection reduces postresuscitation myocardial dysfunction in a porcine model of cardiac arrest by modulating apoptosis[J]. *Shock*, 2012, 38(3): 301-306.
- [17] AI YH, PENG L, ZHANG LN. Protective effect of Shenfu injection on endotoxin induced acute lung injury[J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2006, 26(4): 285-286.
- [18] 李劲松, 陈继军, 朱涛, 等. 参附注射液联合利奈唑胺治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌重症肺炎的临床观察[J]. *中国药房*, 2017, 28(20): 2800-2803.
- [19] LIANG Y, LI X, ZHANG X, et al. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells[J]. *Shock*, 2014, 41(4): 275-281.
- [20] DAS S, BABICK AP, XU YJ, et al. TNF-alpha-mediated signal transduction pathway is a major determinant of apoptosis in dilated cardiomyopathy[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(7): 1988-1997.
- [21] 王文珊, 傅冷西, 叶君健. TNF- α 信号传导通路的研究进展[J]. *福建医科大学学报*, 2005, 39(1): 27-31.

(收稿日期: 2018-10-26 修回日期: 2019-02-16)

(编辑: 唐晓莲)

^Δ 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2011BAI04B06)

* 中药师, 硕士。研究方向: 中药品质评价。电话: 025-57211712。E-mail: wanghong198942@126.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药资源生产与品质评价。电话: 025-85811507。E-mail: qnwyjs@163.com