

麻黄细辛附子汤对肾阳虚外感证模型小鼠TLRs应答及Cyt-CO介导的凋亡调控的影响[△]

邢淑雁^{1*}, 范珊珊¹, 于钦辉¹, 马青云¹, 孙启慧¹, 杨勇^{2,3,4}, 容蓉^{1,3#}(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 济南 250355; 3. 山东省高校中医药抗病毒协同创新中心, 济南 250355; 4. 山东省中医药抗病毒工程研究中心, 济南 250355)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)06-0669-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.06.05

摘要 目的: 研究麻黄细辛附子汤对肾阳虚外感证模型小鼠Toll样受体(TLRs)应答及细胞色素C氧化酶(Cyt-CO)介导的凋亡调控的影响。方法: 将48只雄性Balb/c小鼠随机分为正常组($n=12$)和造模组($n=36$)。造模组小鼠采用腹腔注射苯甲酸雌二醇溶液(8 mg/kg)+滴鼻接种甲型H1N1流感病毒(20 μ L/只)的方法建立肾阳虚外感复合模型。然后将造模成功的小鼠随机分为模型组、阳性药组(磷酸奥司他韦胶囊, 0.195 g/kg)和麻黄细辛附子汤组(1.802 g/kg, 以生药总量计), 每组12只。各给药组小鼠灌胃相应药液, 正常组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水; 灌胃体积均为20 mL/kg, 每天1次, 连续给药6天。给药期间, 每天测量小鼠体质量、肛温, 并计算其初始体质量百分率; 末次给药后, 计算其脏器(脾、胸腺、肺)指数, 观察其肺组织病理学变化, 检测其肺组织中甲型H1N1流感病毒的病毒载量(以M基因mRNA表达水平反映)以及心脏组织中TLR3、TLR7、髓样分化因子(MyD88)、胱天蛋白酶3(Caspase-3) mRNA表达水平和Cyt-CO活性、细胞色素C(Cyt-C)含量。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠的初始体质量百分率、肛温持续降低($P<0.05$); 脾指数、胸腺指数均显著降低($P<0.05$), 肺指数显著升高($P<0.05$); 肺组织病变严重; 肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平及Cyt-C含量均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 心脏组织中Cyt-CO活性显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 麻黄细辛附子汤组小鼠的初始体质量百分率、肛温自给药第4天起呈上升趋势($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 脾指数、胸腺指数均显著升高($P<0.05$), 肺指数均显著降低($P<0.05$); 肺组织病理损伤明显改善; 肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、Caspase-3 mRNA表达水平和Cyt-C含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 心脏组织中Cyt-CO活性显著升高($P<0.01$)。结论: 麻黄细辛附子汤对肾阳虚外感证模型小鼠具有改善作用, 这可能与可抑制TLRs应答和Cyt-CO介导的凋亡调控途径有关。

关键词 麻黄细辛附子汤; 肾阳虚外感证; 细胞色素C氧化酶; 细胞色素C; 凋亡; Toll样受体; 小鼠

Effects of Mahuang Xixin Fuzi Decoction on TLRs Response and Cyt-CO-mediated Apoptosis Regulation in Mice with Influenza Disease of Kidney-yang Deficiency

XING Shuyan¹, FAN Shanshan¹, YU Qinhui¹, MA Qingyun¹, SUN Qihui¹, YANG Yong^{2, 3, 4}, RONG Rong^{1, 3}
(1. School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Experimental Center, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 3. Shandong Provincial Collaborative Innovation Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 4. Shandong Provincial Engineering Research Center for Antiviral Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Mahuang xixin fuzi decoction on Toll-like receptors (TLRs) response and cytochrome C oxidase (Cyt-CO)-mediated apoptosis regulation in mice with influenza disease of kidney-yang deficiency. METHODS: Totally 48 male Balb/c mice were randomly divided into normal group ($n=12$) and modeling group ($n=36$). The modeling group was intraperitoneally injected with estradiol benzoate solution (8 mg/kg) and intranasally injected with influenza virus H1N1 (20 μ L/mice) to establish the influenza disease compound model of kidney-yang deficiency. After modeling, the mice were randomly divided into model group, positive drug group (Oseltamivir phosphate capsules, 0.195 g/kg), Mahuang xixin fuzi decoction group (1.802 g/kg, by crude drug), with 12 mice in each group. Each group was given relevant medicine

[△]基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81873220, No.81774167); 山东省重大科技创新工程项目(No.2018CXGC1307); 山东省重点研发计划项目(No.2020CXGC010505)

* 硕士研究生。研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。E-mail: xsy407861520@163.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 中药及复方活性成分与质量控制。E-mail: rosierong@163.com

intragastrically, normal group and model group were given corresponding volume of normal saline intragastrically 20 mL/kg, once a day, for consecutive 6 days. During administration, body weight and anal temperature of mice were measured daily; the percentage of initial body weight was calculated. After last medication, the organ (spleen, thymus and lung) indexes were calculated; the pathological changes

of lung tissue were observed. The viral load of influenza A virus H1N1 in lung tissue was detected (reflected by *M* gene mRNA expression); mRNA expressions of TLR3, TLR7, myeloid differentiation factor (MyD88) and Caspase-3 in cardiac tissue as well as the activity of Cyt-CO and the content of cytochrome C (Cyt-C) were also determined. RESULTS: Compared with normal group, initial body weight percentage and anal temperature of the model group continued to decrease ($P<0.05$); the spleen and thymus indexes were decreased significantly ($P<0.05$), while lung index was increased significantly ($P<0.05$); the lung tissue lesions were serious. Viral load in lung tissue, mRNA expressions of TLR3, TLR7, MyD88 and Caspase-3 in cardiac tissue as well as the content of Cyt-C were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the activity of Cyt-CO in cardiac tissue was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with model group, initial body weight percentage and anal temperature of mice in Mahuang xixin fuzi decoction group showed an increasing trend from the fourth day of administration ($P<0.05$ or $P<0.01$). The spleen and thymus indexes were increased significantly ($P<0.05$), while the lung index was significantly decreased ($P<0.05$); the pathological injury of lung tissue was significantly improved; viral load in lung tissue, mRNA expressions of TLR3 and Caspase-3 as well as the content of Cyt-C in cardiac tissue were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the activity of Cyt-CO was increased significantly in cardiac tissue ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Mahuang xixin fuzi decoction can improve influenza disease of kidney-yang deficiency in mice, the effect may related to inhibit TLRs response and apoptosis regulation pathway mediated by Cyt-CO.

KEYWORDS Mahuang xixin fuzi decoction; Influenza disease of kidney-yang deficiency; Cytochrome C oxidase; Cytochrome C; Apoptosis; Toll-like receptors; Mice

麻黄细辛附子汤始载于《伤寒论》，是治疗阳虚兼外感的经方，具有助阳解表、温经散寒的功效，用于治疗素体阳虚、复感寒邪、恶寒发热等症，疗效显著^[1]。该方由麻黄、细辛、制附子等3味中药材组成。其中，麻黄辛、温，入太阳散表寒，为君药；附子辛热、温，补少阴之阳，为臣药；细辛辛温，入太阳、少阴，在表可助麻黄发散风寒，在内可助附子扶阳温肾，为佐药^[2-3]。三药合用，补散兼施，使外感风寒得以表散，在内阳气得以温补，阳虚外感可愈^[4-5]。在临床上，该方主治少阴兼太阳表证，即在阳气亏虚状态下感受寒邪出现邪正相争而导致的发热（即太少两感证），是治疗阳虚外感寒邪的经典方剂^[6]。

Toll样受体（TLRs）为I型跨膜蛋白，是先天免疫系统中的关键因子，也是炎症反应通路的重要信号转导受体^[7]。据相关研究报道，甲型H1N1流感病毒感染心肌组织后，心肌细胞中TLRs表达量增加，然后通过激活TLRs先天免疫应答，引发机体炎症反应。在致炎因子的刺激下，炎症介质可诱导线粒体结构功能损伤，使线粒体膜电位降低，并激活胱天蛋白酶（Caspase）信号转导途径，使该途径中作为始动因子的细胞色素C氧化酶（Cyt-CO）活性下降，致使细胞色素C（Cyt-C）被释放到细胞质中，然后激活凋亡执行因子Caspase-3，进而引发Caspase级联反应，诱导心肌细胞凋亡^[8-11]。此外，作为机体能量代谢中心的线粒体，其自身功能障碍也会直接诱导细胞凋亡^[12]。

近年来，对麻黄细辛附子汤干预肾阳虚外感证的研究多集中于药效及物质基础方面，已证实了该方对肾阳虚外感证有效，且存在量效关系^[5]。因流感病毒侵染机体后，首先激活心肌细胞内TLRs先天免疫应答，进而激活Caspase信号转导途径，引起Cyt-CO介导的线粒体调控通路发生变化，从而引发炎症反应或诱导细胞凋

亡^[10]。而麻黄细辛附子汤中的附子生物碱成分能影响心肌细胞的线粒体凋亡途径^[13-16]。由此，笔者推测麻黄细辛附子汤干预肾阳虚外感证的机制可能与缓解炎症损伤及调节心肌细胞凋亡有关。因此，本研究拟建立病理证结合的肾阳虚外感复合小鼠模型，并从TLRs应答和Cyt-CO介导的凋亡调控作用出发，通过对其病毒载量、炎症因子、凋亡基因表达等指标进行测定和评价，探讨麻黄细辛附子汤改善肾阳虚外感证模型小鼠的作用机制。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有BX53型光学显微镜（日本Olympus公司）、CPA225D型十万分之一分析天平（德国Sartorius公司）、NJ 08818型涡旋仪（美国SI公司）、SCI-ENTZ-50型高通量组织研磨器（宁波新芝生物科技股份有限公司）、ZIL-2型小鼠自主活动仪（北京医科院药研究所）、1510型酶标仪[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]、TDZ5-WS型医用离心机（湖南平凡科技有限公司）、XP型基因扩增仪（杭州博日科技有限公司）、CFX Connect Real-Time System荧光定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Bio-Rad公司）和UV-1780型紫外-可见分光光度计（日本Shimadzu公司）等。

1.2 主要药品与试剂

麻黄饮片（批号130315）购自泰山中药有限公司，细辛饮片（批号16050202）购自安徽协和成药业饮片有限公司，制附子饮片（批号151008）购自四川江油中坝附子科技发展有限公司，以上饮片经山东中医药大学药学院李峰教授鉴定均为真品；AB-8大孔树脂（粒径0.3~1.25 mm，批号20190311）购自东鸿化工有限公司； β -环糊精（批号181029）购自曲阜市天利药用辅料有限公司；鸡胚

(批号20190123)购自济南斯派福瑞禽业科技有限公司;苯甲酸雌二醇(批号151102)购自宁波第二激素厂;磷酸奥司他韦胶囊(批号J20140121,规格75 mg)购自上海罗氏制药有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号120219200908)购自上海碧云天生物技术有限公司;动物组织总RNA提取试剂盒(批号R6927)、FastQuant cDNA第一链合成试剂盒(批号S7806)、SuperReal荧光定量预混试剂-增强版试剂盒(批号S7918)均购自天根生化科技有限公司;小鼠Cyt-C酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(批号20191130)、Cyt-CO活性测定试剂盒(批号20191202)均购自南京建成生物工程研究所;PCR扩增引物由北京六合华大基因科技有限公司设计、合成;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 动物

健康SPF级雄性Balb/c小鼠共48只,体质量为 (18 ± 2) g,由山东朋悦实验动物繁育有限公司提供,生产许可证号为SCXK(鲁)2014-0007。动物饲养环境温度为 (22 ± 2) °C、相对湿度为40%~60%,饲以普通饲料和无菌水。本研究中的动物实验方案均符合山东中医药大学动物伦理委员会标准。

1.4 病毒

甲型H1N1流感病毒鼠肺适应株FM1由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供。

2 方法

2.1 麻黄细辛附子汤的制备

参照本课题组前期建立的提取方法制备麻黄细辛附子汤^[17-18]。称取细辛30 g(最粗粉),加水240 mL浸泡30 min后,进行回流提取,提取液经八层纱布滤过,收集滤液,记为细辛单煎液;同时收集蒸馏馏分,将馏分上样到AB-8大孔树脂柱上进行富集纯化,以50%乙醇洗脱,洗脱液经浓缩后,加入等体积乙醚萃取,收集萃取部位,然后用 β -环糊精包合(每1 mL挥发油用 β -环糊精6 g包合)得到细辛挥发油环糊精包合物0.72 g。取麻黄30 g、附子60 g,加水360 mL浸泡30 min,然后与细辛单煎液合并,煎煮3次,3次煎煮的加水量分别为360、300、300 mL,煎煮时间分别为60、30、30 min,分别以八层纱布滤过,收集滤液。合并3次滤液,减压浓缩至340 mL,冻干成粉末13.77 g。将冻干粉末13.77 g与细辛挥发油环糊精包合物0.72 g溶于水24 mL中,即得麻黄细辛附子汤,4 °C保存,备用。

2.2 分组与造模

将小鼠随机分为正常组(12只)和造模组(36只)。造模组小鼠先腹腔注射苯甲酸雌二醇溶液(8 mg/kg)7天(每天1次)以复制肾虚模型^[19]。于造模第7天时,从造模的36只小鼠中随机选择12只检测其自主活动次数和5%负重游泳时间,以判断肾虚造模是否成功^[20]。然后,参照文献[21]中滴鼻方法并结合实际调整剂量后,对造模组小鼠按20 μ L/只滴鼻接种甲型H1N1

流感病毒鸡胚尿囊液(血凝滴1:640)以建立肾虚外感复合模型,并以其出现精神萎靡、畏寒肢冷、形体消瘦、体质量和肛温明显降低以及呼吸短促、打喷嚏等症状为造模成功的外在表现。将造模成功的小鼠按体质量和肾虚外感程度均分为3组,即模型组、阳性药组和麻黄细辛附子汤组,每组12只。

2.3 给药

肾虚外感复合模型建立24 h后,进行给药干预。阳性药组小鼠给予磷酸奥司他韦胶囊0.195 g/kg(人临床等效剂量,以水为溶剂溶解),麻黄细辛附子汤组小鼠给予麻黄细辛附子汤1.802 g/kg(以生药总量计,人临床等效剂量),正常组和模型组小鼠给予等体积生理盐水。各组小鼠均灌胃相应药液或生理盐水,灌胃体积均为20 mL/kg,每天1次,连续6天。

2.4 小鼠一般情况观察

造模期间,每天观察小鼠的精神状况、活动状态,并测定其自主活动次数和5%负重游泳时间^[9]。给药期间,每日测量小鼠体质量、肛温,记录其一般体征变化。将给药前小鼠的体质量定义为初始体质量,计算初始体质量百分率:初始体质量百分率(%)=体质量(g)/初始体质量(g) \times 100%。

2.5 小鼠脏器指数测定

末次给药24 h后,脱颈椎处死小鼠,取其脾、胸腺、肺组织,称定质量,计算各脏器指数:脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(10 g)。

2.6 小鼠肺组织病理学观察

取小鼠肺组织适量于4%多聚甲醛溶液中固定24 h,常规石蜡包埋、切片(约4 μ m),进行常规苏木精-伊红(HE)染色,然后在光学显微镜下观察小鼠肺组织病理学变化。

2.7 小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平测定

采用实时荧光定量PCR法进行测定。取小鼠肺组织和心脏组织各15~20 mg,分别按动物组织总RNA提取试剂盒说明书方法进行总RNA提取。采用紫外-可见分光光度计测定RNA的浓度和纯度后,取光密度比值($OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$)在1.8~2.1之间的样品,根据FastQuant cDNA第一链合成试剂盒说明书进行操作,在基因扩增仪中(42 °C孵育15 min;95 °C孵育3 min;4 °C冷却)逆转录得到cDNA。以cDNA为模板采用两步法进行PCR扩增。反应体系(共20 μ L)包括2 \times SuperReal PreMix Plus(含SYBR Green I)10 μ L,cDNA模板2 μ L,上、下游引物各0.6 μ L,RNase-free ddH₂O 6.8 μ L。反应条件为95 °C预变性15 min;95 °C变性10 s,60 °C延伸32 s,共40个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算各组小鼠肺组织中甲型H1N1流感病毒M基因mRNA表达水平以及心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平。以甲型H1N1流感病毒感染小鼠后其肺组织中M基因mRNA的表达水平

反映各组小鼠肺组织中的病毒载量。各基因的引物序列及产物长度见表1。

表1 各基因的引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and amplification length of each gene

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度, bp
GAPDH	上游: TGCACCACCACTGCTTAG	140
	下游: GGATGCAGGATGATGTTTC	
M基因	上游: CTTCTAACCCAGGTCGAAC	189
	下游: CGTCTACGCTGCAGTCTCTC	
TLR3	上游: TTGTCTTCTGCACGAACCTG	204
	下游: CGCAACGCAAGGATTTTATT	
TLR7	上游: GGTGGCAAATGGAAGATCC	111
	下游: AGCTGTATGCTCTGGGAAAGGTT	
MyD88	上游: CAGCGAGGTTTGATCTTCTT	106
	下游: TCACTTCTTGGGACTCAGG	
Caspase-3	上游: GTGTCCATGCTCAGAAAGA	143
	下游: CCAGGAGGACCGTCAGATTA	

2.8 小鼠心脏组织中Cyt-CO活性和Cyt-C含量测定

2.8.1 Cyt-CO活性 取小鼠心脏组织10 mg,加入60 μL清理液(Reagent A)清洗1次,移入液氮罐过夜,次日取出并研磨,然后加入预冷的500 μL裂解液(Reagent B),在4℃下以13 000 r/min离心5 min,吸取上清液。采用BCA法测定蛋白浓度后,按照Cyt-CO活性测定试剂盒方法以紫外-可见分光光度计检测小鼠心脏组织中Cyt-CO的活性。

2.8.2 Cyt-C含量 按每10 mg心脏组织加入磷酸盐缓冲液(PBS)90 μL的量制备组织匀浆,充分研磨后,以3 000 r/min离心30 min,取上清液。按照Cyt-C ELISA试剂盒说明书方法以酶标仪检测小鼠心脏组织中Cyt-C的含量。

2.9 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,造模期间正常组和造模组大鼠的自主活动次数和5%负重游泳时间的组间比较采用独立样本t检验;给药后各指标的组间比较采用单因素方差分析和LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般情况观察结果

3.1.1 一般体征 正常组小鼠活泼好动,皮毛光亮顺滑,反应灵敏,精神状态良好。造模组小鼠行动迟缓,精神倦怠,皮毛湿软,形体消瘦。与正常组比较,造模组小鼠自主活动次数显著减少($P < 0.05$),5%负重游泳时间显著缩短($P < 0.05$),详见表2。接种病毒后,造模组小鼠初期表现为呼吸短促、偶尔打喷嚏,后期出现静卧少动、呼吸困难等现象。

3.1.2 初始体质量百分率和肛温 给药期间,与正常组比较,模型组小鼠初始体质量百分率及肛温持续降低($P < 0.05$),直至解剖时均未见回升的趋势。自给药第4天起,各给药组小鼠的初始体质量百分率、肛温均出现回升的趋势;与模型组比较,阳性药组和麻黄细辛附子

汤组小鼠初始体质量百分率和肛温均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。给药期间各组小鼠的初始体质量百分率、肛温变化趋势见图1。

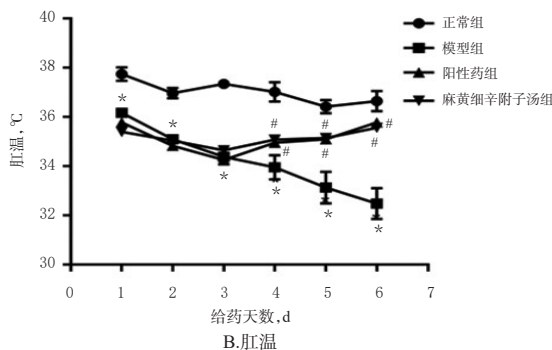
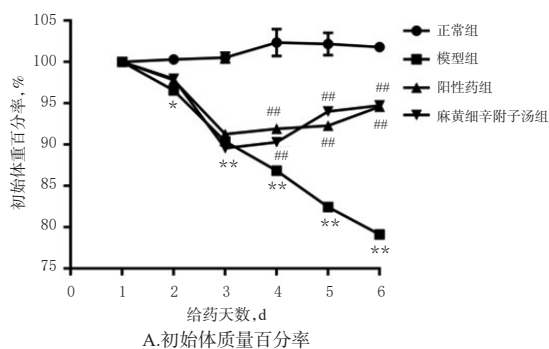
表2 正常组和模型组小鼠自主活动次数和5%负重游泳时间比较结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 2 Comparison of the times of independent activities and 5% weight-bearing swimming time between normal group and model group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

分组	自主活动,次/10 min	5%负重游泳时间,min
正常组	354.25 ± 69.15	58.75 ± 1.58
造模组	292.88 ± 38.58*	31.26 ± 3.03*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. normal group, * $P < 0.05$



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

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

图1 给药期间各组小鼠的初始体质量百分率、肛温变化趋势($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig 1 The changes trend of the percentage of initial body weight and anal temperature of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.2 小鼠脏器指数测定结果

与正常组比较,模型组小鼠的脾指数、胸腺指数均显著降低($P < 0.05$),肺指数显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,阳性药组、麻黄细辛附子汤组小鼠的脾指数、胸腺指数均显著升高($P < 0.05$),肺指数均显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠的体质量和脾指数、肺指数、胸腺指数测定结果见表3。

表3 各组小鼠的体质量和脾指数、胸腺指数、肺指数测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 3 Measurement results of body weight, spleen index, lung index and thymus index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	体质量, g	脾指数, mg/10 g	胸腺指数, mg/10 g	肺指数, mg/10g
正常组	24.74±1.27	0.37±0.03	0.19±0.02	0.63±0.05
模型组	15.30±1.42	0.27±0.07*	0.04±0.01*	1.54±0.25*
阳性药组	18.00±2.73	0.33±0.09 [#]	0.10±0.03 [#]	0.95±0.05 [#]
麻黄细辛附子汤组	16.81±1.42	0.36±0.07 [#]	0.08±0.01 [#]	1.15±0.12 [#]

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

Note: vs. normal group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

3.3 小鼠肺组织病理学观察结果

正常组小鼠肺组织形态正常,肺间质未见炎性细胞浸润及明显的病理实变区;模型组小鼠肺组织病变较严重,泡腔变小,肺泡数量明显减少,肺泡间隔出现不同程度增宽,肺间质内有大量炎性细胞浸润;给药治疗后,阳性药组和麻黄细辛附子汤组小鼠的肺组织病变程度均有所改善,其泡腔较模型组均增大,间质内均可见少量炎性细胞,管腔内仅有少量渗出物,肺泡数量增多,且已接近正常形态。各组小鼠肺组织病理切片图见图2(图中箭头所指为肺组织病变部位)。

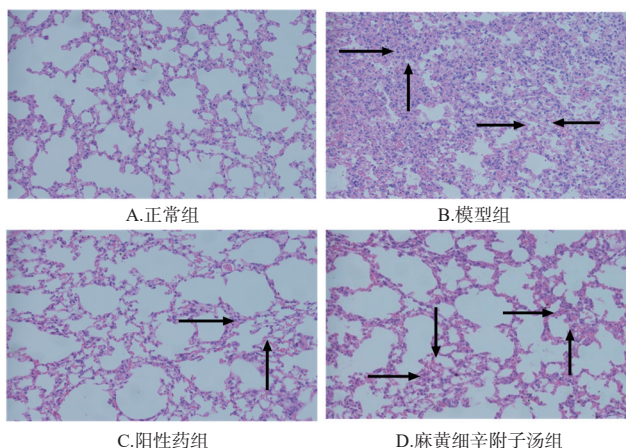


图2 各组小鼠肺组织病理切片图(HE染色, ×200)

Fig 2 Pathological sections of lung tissue of mice in each group (HE staining, ×200)

3.4 小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平测定结果

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,阳性药组小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平以及麻黄细辛附子汤组小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、Caspase-3 mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$)。各组小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平测定结果见表4。

表4 各组小鼠肺组织中病毒载量和心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88、Caspase-3 mRNA表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 4 Measurement results of viral load in lung tissue and mRNA expressions of TLR3, TLR7, MyD88 and Caspase-3 in cardiac tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	病毒载量	TLR3	TLR7	MyD88	Caspase-3
正常组	0	0.64±0.29	0.88±0.22	0.85±0.05	0.71±0.05
模型组	1.10±0.52**	1.45±0.08*	1.40±0.24*	1.38±0.21*	1.45±0.38**
阳性药组	0.19±0.11 [#]	0.82±0.31 [#]	0.98±0.35 [#]	0.97±0.16 [#]	1.00±0.34 [#]
麻黄细辛附子汤组	0.33±0.13 [#]	0.97±0.15 [#]	1.09±0.08	1.11±0.32	1.13±0.44 [#]

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

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

3.5 小鼠心脏组织中Cyt-CO活性和Cyt-C含量测定结果

与正常组比较,模型组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性显著降低($P<0.01$),Cyt-C含量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组和麻黄细辛附子汤组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性均显著升高($P<0.01$),Cyt-C含量均显著降低($P<0.01$)。各组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性和Cyt-C含量测定结果见表5。

表5 各组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性和Cyt-C含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=12$)

Tab 5 Measurement results of the activity of Cyt-CO and the content of Cyt-C in cardiac tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	Cyt-CO, $\mu\text{mol/L Cyt-C}/\text{min}$	Cyt-C, ng/mL
正常组	0.37±0.07	13.63±0.23
模型组	0.13±0.03**	17.78±1.27**
阳性药组	0.37±0.03 [#]	13.44±0.62 [#]
麻黄细辛附子汤组	0.38±0.07 [#]	13.96±2.12 [#]

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, [#] $P<0.01$

4 讨论

本研究综合中医病证模型(肾阳虚)和西医致病因素(甲型H1N1流感病毒感染)建立了病证结合的肾阳虚外感复合小鼠模型。造模组小鼠出现了皮毛湿软、精神倦怠、形体消瘦等肾阳虚症状,表现出体质量、肛温持续下降和呼吸短促等外感症状,脾指数和胸腺指数显著降低,肺指数显著升高,以上免疫功能低下的表现均提示肾阳虚外感复合模型复制成功^[22]。磷酸奥司他韦可与甲型H1N1流感病毒神经氨酸酶活性位点结合,在体内转化成对甲型H1N1流感病毒有抑制作用的活性代谢物,从而抑制病毒释放^[23],且可在一定程度上改善体温下降、体质量降低、精神倦怠等肾阳虚症状^[24],最终达到治疗肾阳虚外感的目的,故本研究以其作为阳性药。前期已有多项研究证实,麻黄细辛附子汤干预肾阳虚外感证具有良好的药效作用,且存在量效关系^[5,19]。因此,本研究不再设置麻黄细辛附子汤多剂量组,而是重点探讨

其在临床等效剂量下干预肾虚外感证可能的作用机制。经给药治疗后,肾虚外感复合模型小鼠的体质量、肛温均出现明显的回升趋势;其脾指数和胸腺指数均显著上升,肺指数均明显降低;同时其肺组织病理切片显示,肺泡形态明显改善且趋近正常。以上结果表明,麻黄细辛附子汤对肾虚外感复合病证模型小鼠具有良好的改善作用,能够有效改善小鼠的机能状态,减轻其组织病理损伤。

TLRs是天然免疫系统中特异性的病原识别模式受体。其中,TLR3能够特异性识别病毒双链RNA,激活MyD88依赖的信号转导通路,介导免疫应答和炎症反应^[25];TLR7能够识别病毒单链RNA,直接与下游的MyD88作用,从而激活天然免疫反应,介导急性炎症反应^[26-27]。甲型H1N1流感病毒感染小鼠后,存在于病毒第7节段编码的M基因为特征基因,故本研究通过检测肺组织中M基因mRNA表达水平来反映病毒载量。本研究发现,模型组小鼠肺组织中病毒载量以及心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88 mRNA表达水平均较正常组显著升高,说明模型小鼠体内炎症反应强烈,TLRs信号通路被激活。给药后,与模型组比较,麻黄细辛附子汤组小鼠肺组织中的病毒载量以及心脏组织中TLR3、TLR7、MyD88 mRNA表达水平均不同程度降低,表明麻黄细辛附子汤可通过抑制TLRs先天免疫应答信号通路而减轻炎症反应。

线粒体途径作为细胞凋亡中最主要的传导途径,不仅受TLRs信号通路的调控,而且线粒体自身的功能障碍也可诱导细胞凋亡^[28-30]。Cyt-CO是线粒体电子传递链末端的氧化酶,其活性下降可导致线粒体内跨膜电位下降,从而打开通透性转换孔,释放Cyt-C,进而激活凋亡执行者Caspase-3,最终促进细胞凋亡^[31-32]。本研究发现,与正常组比较,模型组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性显著降低,Cyt-C含量显著升高,且心脏组织中Caspase-3 mRNA表达水平亦显著升高,表明造模小鼠出现了明显的心肌细胞凋亡现象。给药后,麻黄细辛附子汤组小鼠心脏组织中Cyt-CO活性显著升高,Cyt-C含量显著降低,且心脏组织中Caspase-3 mRNA表达水平亦显著降低,表明麻黄细辛附子汤能够通过有效调控线粒体凋亡信号通路而抑制心肌细胞凋亡。

综上所述,麻黄细辛附子汤可通过抑制TLRs先天免疫应答信号通路中TLR3、TLR7、MyD88 mRNA的表达来抑制炎症反应,从而减轻炎症反应所致的脏器损伤,并通过下调Cyt-CO介导的心肌细胞凋亡相关信号转导因子Caspase-3及Cyt-C的表达,进而抑制心肌细胞凋亡,这可能是麻黄细辛附子汤对肾虚外感病证模型小鼠具有良好的干预作用的机制之一。

参考文献

[1] 钱超尘.《伤寒论》版本表解[J].中医文献杂志,2011,29(5):1-4.
[2] 刘春红,裴云芳,侯媛媛.麻黄附子细辛汤研究进展[J].山

东中医杂志,2016,35(3):270-273.

[3] 游俊梅.浅谈细辛在仲景方中的作用[J].湖南中医杂志,2015,31(10):122-123.
[4] 范建夏,于文霞,张丽蕊.麻黄细辛附子汤合圣愈汤化裁治疗阴阳两虚夹瘀型糖尿病周围神经病变经验[J].中国中医药现代远程教育,2020,18(9):72-75.
[5] 李荣荣,杨勇,容蓉,等.麻黄细辛附子汤对肾虚外感模型小鼠的干预作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):226-230.
[6] 郭喜利,刁银强,刘康宏.麻黄细辛附子汤临床应用验案浅析[J].光明中医,2018,33(3):421-423.
[7] 杨源. Mo感染诱导不同品种羊TLRs及其通路因子表达差异性研究[D].贵阳:贵州大学,2019.
[8] 刘婧. Toll样受体3信号通路在人类病毒性心肌炎心肌细胞的凋亡及炎症反应中的作用[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2013.
[9] BURKE PJ. Mitochondria, bioenergetics and apoptosis in cancer[J]. Trends Cancer, 2017, 3(12):857-870.
[10] 张天奇,王齐齐,吴涛,等.甲型H1N1流感患者心肌损害的研究[J].心脑血管病防治,2014,14(2):135-136.
[11] 赵静,韩晴晴,朱玉蕊,等.四逆汤对慢性心力衰竭小鼠心功能及心肌细胞色素C、Caspase 9、Caspase 3的影响[J].环球中医药,2019,12(5):681-686.
[12] 李兴太,刘德文,张新,等.线粒体通透性转换与细胞凋亡[J].中国公共卫生,2015,31(4):529-532.
[13] 雷怀成,宋道江,易建华,等.大鼠乌头碱中毒心肌细胞凋亡的研究[J].中国工业医学杂志,2004,17(6):373-374.
[14] 熊亮,彭成,缪璐琳,等.基于“毒-效整合分析思路”探讨有毒中药附子的物质基础[J].世界中医药,2017,12(11):2568-2578.
[15] 刘甜甜.基于“有故无殒”思想的附子量-效-毒关系研究[D].成都:成都中医药大学,2014.
[16] 范颖,于彩娜,徐丹,等.人参、黄芪、附子、干姜对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J].辽宁中医杂志,2011,38(6):1030-1032.
[17] 马学梅,王玉真,高爽,等.多指标综合加权评价优选麻黄附子细辛汤的提取纯化工艺[J].辽宁中医杂志,2019,46(11):2391-2396.
[18] 郭诚诚,高爽,王玉真,等.细辛挥发油环糊精包合物制备工艺的正交试验研究[J].山东科学,2019,32(2):15-21.
[19] 孙启慧,李灿,付业佩,等.基于血清代谢组学的利巴韦林干预肾虚外感小鼠的药效或毒性作用机制研究[J].中国药理学杂志,2017,52(16):1409-1414.
[20] 杨勇.肾虚外感小鼠模型建立及麻黄细辛附子汤干预研究[D].济南:山东中医药大学,2012.
[21] 尹翠翠,杨勇,李静,等.肾虚外感小鼠模型的建立及评价[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):253-256.
[22] 孙嫣,范新,王刚,等.灵芝多糖粗提物对雌二醇诱导小鼠胸腺萎缩的改善作用研究[J].中国药房,2020,31(17):2135-2140.
[23] 符晓四,姚学峰.达菲药物对H1N1病毒作用研究[J].生物信息学,2010,8(4):371-377.
[24] 付业佩,孙启慧,容蓉,等.达菲干预肾虚外感小鼠的血

采用UHPLC-MS和质量亏损过滤技术分析二苯乙烯苷在大鼠体内的代谢产物和代谢途径^Δ

梁幼玲^{1*}, 史旭华¹, 白俊其¹, 黄志海¹, 徐文¹, 黄娟¹, 丘小惠^{1,2#} (1.广东省中医院/广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2.广州市中药活性成分手性研究重点实验室, 广州 510006)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)06-0675-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.06.06

摘要 目的:分析二苯乙烯苷在大鼠体内的代谢产物并推测代谢途径。方法:将雄性SD大鼠随机分为血浆组($n=3$)、尿液组($n=3$)、胆汁组($n=3$)和组织组($n=9$),各组大鼠均单次灌胃二苯乙烯苷200 mg/kg,分别收集给药后10、30 min和1、1.5、2、4 h的血浆,给药后0~6 h的尿液,给药后0~4 h的胆汁以及给药后30 min和1、2 h(每个时间点3只)的心、肝、脾、肺、肾、胃组织样品,经甲醇沉淀蛋白后,采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术和质量亏损过滤技术联合分析、鉴定各样本中的代谢产物,推测代谢途径。结果:从血浆、尿液、胆汁、心、肝、脾、肺、肾、胃样品中分别检出6、7、11、1、5、1、3、4、4个代谢产物,包括I相代谢(如水解、加氢、羟化)产物2个、II相代谢(如葡萄糖醛酸结合和硫酸化)产物18个,其中葡萄糖醛酸结合产物有12个。结论:二苯乙烯苷在胆汁中的代谢产物种类居多,以II相代谢产物二苯乙烯苷的葡萄糖醛酸结合产物为主;代谢途径主要涉及葡萄糖水解、加氢、羟化、葡萄糖醛酸结合、硫酸化反应等。

关键词 二苯乙烯苷;超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术;质量亏损过滤技术;代谢产物;大鼠

Analysis of Metabolites and Metabolism Pathway of Tetrahydroxystilbene Glucoside in Rats with UHPLC-MS and Mass Defect Filter Method

LIANG Youling¹, SHI Xuhua¹, BAI Junqi¹, HUANG Zhihai¹, XU Wen¹, HUANG Juan¹, QIU Xiaohui^{1, 2} (1. Guangdong Province Hospital of TCM/Second College of Clinical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. Guangzhou Key Laboratory of Chirality Research on Active Components of TCM, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To analyze the metabolites of tetrahydroxystilbene glucoside (THSG) and speculate its metabolism pathway in rats. METHODS: Male SD rats were randomly divided into plasma group ($n=3$), urine group ($n=3$), bile group ($n=3$), and tissue group ($n=9$). Each group was given single dose of THSG 200 mg/kg intragastrically. Plasma samples 10, 30 min and 1, 1.5, 2, 4 h after medication, the urine 0-6 h after medication, the bile 0-4 h after medication, the tissue of heart, liver, spleen, lung, kidney and stomach 30 min and 1, 2 h after medication (3 at each time point) were collected respectively.

- 清代代谢组学研究[J].药物分析杂志,2019,39(5):821-829.
- [25] PARK H, KIM S, PARK S, et al. Phenethyl isothiocyanate regulates inflammation through suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of Toll-like receptors[J]. Life Sci, 2013, 92(13): 793-798.
- [26] 潘燕蝶, 潘小丹, 李洁, 等. 慢性阻塞性肺疾病继发肺部感染的炎性因子及TLR7/IL-23/IL-17信号通路作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(7): 994-998.
- [27] 马思慧, 杨欢, 吴天成, 等. Toll样受体信号传导通路的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(8): 160-164.
- [28] 朱祎婧. TRIF-NF- κ B炎症信号通路在TLR3介导胰岛 β 细胞损伤中的作用[D]. 泸州: 西南医科大学, 2020.
- [29] CLOONAN SM, CHOI AM. Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling[J]. Curr Opin Microbiol, 2013, 16(3): 327-338.
- [30] DJAFARZADEH S, VUDA M, TAKALA J, et al. Toll-like receptor-3-induced mitochondrial dysfunction in cultured human hepatocytes[J]. Mitochondrion, 2011, 11(1): 83-88.
- [31] 王苏华, 张薇, 邢光伟, 等. 细胞色素C氧化酶活力测定方法概况[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(5): 412-414.
- [32] ODKOR CA, ACHILEFU S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009, 27(4): 417-429.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373967);广州市科技计划项目(No.201806010048, No.202002010004);广东省中医院中医药科学技术研究专项课题(No.YN2019QJ14)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂及药效物质基础。电话:020-39318571。E-mail:1753903762@qq.com

通信作者:研究员,硕士。研究方向:中药制剂及药效物质基础。电话:020-39318571。E-mail:qiuxiaohui@gzucm.edu.cn

(收稿日期:2020-12-07 修回日期:2021-01-30)

(编辑:林静)