

姜黄素固体脂质纳米粒对心肾综合征模型大鼠心、肾、肺功能及细胞自噬相关因子表达的影响[△]

李旭*,郝迪,刘伟伟,王梓,史鹏程,李楠[#](天津市医药科学研究所,天津 300020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2347-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.07



摘要 目的:研究姜黄素固体脂质纳米粒(Cur-SLN)对心肾综合征模型大鼠心、肾、肺功能及细胞自噬相关因子表达的影响。方法:将大鼠分为假手术组、模型组、雷帕霉素组(阳性对照,2 mg/kg)和Cur-SLN低、高剂量组(5、10 mg/kg),除模型组13只大鼠外(其中3只用于判断是否造模成功),其余各组10只。除假手术组外,其余各组大鼠均采用腹主动脉缩窄合并肾急性缺血再灌注损伤法复制心肾综合征模型。造模成功后,各给药组大鼠均尾静脉注射相应药物,假手术组和模型组大鼠注射等体积生理盐水,每天1次,连续4周。末次注射24 h后,检测大鼠血清中血管紧张素转换酶(ACE)、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)及精氨酸加压素(AVP)的含量;观察大鼠心脏、肾、肺组织的病理学形态;检测大鼠心脏、肾、肺组织中LC3、Beclin-1蛋白的分布情况和表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中ACE、FT3含量,心脏、肾指数以及心脏、肾、肺组织中LC3(肾组织中除外)、Beclin-1蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$),AVP含量和肺指数均显著降低($P<0.01$);心脏非梗死区心肌细胞明显肥大、心肌纤维排列紊乱,肾非梗死区肾小管结构紊乱、呈囊性扩张,肺泡可见明显炎症细胞浸润;心脏、肾、肺组织中LC3、Beclin-1蛋白的阳性表达均增多,主要分布于心肌细胞的细胞质、远端肾小管上皮细胞和肺泡巨噬细胞、上皮细胞中。与模型组比较,Cur-SLN各剂量组大鼠上述指标大部分显著逆转;心脏、肾、肺组织的病理改变程度均减轻,炎症细胞浸润减少,且LC3、Beclin-1蛋白的阳性表达均减少,主要分布于心肌细胞细胞质、近端肾小管上皮细胞中,少数分布于远端肾小管上皮细胞和肺泡巨噬细胞、上皮细胞中。结论:Cur-SLN可改善心肾综合征模型大鼠的心、肾、肺功能,其作用机制可能与调控LC3、Beclin-1蛋白在心脏、肾、肺组织的分布或表达有关。

关键词 姜黄素;固体脂质纳米粒;心肾综合征;自噬

Effects of Curcumin Solid Lipid Nanoparticles on Cardiac, Renal and Pulmonary Functions and the Expression of Autophagy Related Factors in Cardiorenal Syndrome Model Rats

LI Xu, HAO Di, LIU Weiwei, WANG Zi, SHI Pengcheng, LI Nan (Tianjin Institute for Medical and Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Curcumin solid lipid nanoparticles (Cur-SLN) on cardiac, renal and pulmonary functions, the expression of autophagy related factors in cardiorenal syndrome model rats. METHODS: The rats were divided into sham operation group, model group, rapamycin group (positive control, 2 mg/kg), Cur-SLN low-dose and high-dose groups (5, 10 mg/kg), except for 13 rats in the model group (3 of which are used to judge whether modeling is successful), 10 rats in the other groups. Except for sham operation group, cardiorenal syndrome of other groups were induced by abdominal aortic coarctation combined with acute renal ischemia-reperfusion injury. After successful modeling, rats in each administration group were injected with corresponding drugs through caudal vein, and rats in sham operation group and model group were injected with equal volume normal saline, once a day for 4 weeks. Twenty-four hours after the last administration, the contents of angiotensin converting enzyme (ACE), free triiodothyronine (FT3) and arginine vasopressin (AVP) in rat serum were detected. The pathological morphology of rat heart, kidney and lung were observed. The distribution and expression of LC3 and Beclin-1 protein in rat heart, kidney and lung were detected. RESULTS: Compared with sham operation group, the contents of ACE and FT3 in serum, the indexes of heart and kidney, the expression of LC3 (except in renal tissue) and Beclin-1 protein in heart, kidney and lung were significantly increased ($P<0.01$), and the contents of AVP and lung index were decreased significantly ($P<0.01$); myocardial cells in the non-infarcted area of the heart were obviously hypertrophic, the arrangement of myocardial fibers was disordered; the structure of renal tubules in the non-infarcted area of the kidney was disordered; and there was cystic expansion and obvious inflammatory cell infiltration in the alveoli; positive expression of LC3 and Beclin-1 protein in heart, kidney and lung increased, mainly distributed in the

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81903565);天津市自然科学基金资助项目(No.18JCQNJC13500);天津市卫生健康委员会科技项目(No.KJ20082)

* 助理研究员,硕士。研究方向:药理学。电话:022-27236137。E-mail:187391856@qq.com

[#] 通信作者:助理研究员。研究方向:药剂学。E-mail:llittlnows@126.com

cytoplasm of cardiomyocytes, distal renal tubular epithelial cells, alveolar macrophages and epithelial cells. Compared with model group, the above indexes of rats in each dose group of Cur-SLN were mostly significantly reversed; the pathological changes of heart, kidney and lung tissues were reduced, the infiltration of inflammatory cells was reduced; and the positive expression of LC3 and Beclin-1 protein were reduced, which were mainly distributed in the cytoplasm of cardiomyocytes and proximal renal tubular epithelial cells, and a few in distal renal tubular epithelial cells, alveolar macrophages and epithelial cells. CONCLUSIONS: Cur-SLN can improve the heart, kidney and lung functions of rats with cardiorenal syndrome, and its mechanism may be related to regulating the distribution or expression of LC3 and Beclin-1 protein in heart, kidney and lung.

KEYWORDS Curcumin; Solid lipid nanoparticles; Cardiorenal syndrome; Autophagy

心肾综合征是指心脏和肾中的一个器官发生慢性或急性功能损伤,从而导致另一个器官出现慢性或急性功能障碍的一种临床综合征^[1]。随着研究的深入,研究者发现,心肾综合征患者往往存在肺水肿症状,使得肺扩张程度降低,从而加重病情^[2]。细胞自噬是一种分解代谢过程,涉及细胞内长寿命蛋白和受损细胞器的降解,其在肿瘤、心力衰竭、衰老相关性疾病、神经退行性疾病以及传染病等多种生命进程中发挥着重要作用^[3]。本课题组在前期的研究中发现,有效调控心肾综合征模型大鼠心肌组织中自噬相关蛋白LC3的表达,对改善大鼠心肾功能、延缓细胞衰竭具有一定的积极作用^[4]。由此推测,以自噬为靶向治疗策略,可能成为预防和治疗心肾综合征的重要新途径之一。

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄根茎中提取出来的一种多酚类化合物,是中药姜黄的主要活性成分^[5]。研究发现, Cur 具有调节组织细胞凋亡和自噬功能的作用^[6],因此笔者推测其可能具有治疗心肾综合征的作用,但其是否可通过影响心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子的表达来治疗心肾综合征,尚不明确。

由于 Cur 难溶于水,血药浓度和生物利用度较低,很难在病灶区维持有效浓度,使其在临床应用中受到了一定的限制^[5,7]。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是一种针对低生物利用度的活性成分的理想递药系统^[8]。基于此,本课题组在前期研究中采用微乳法制备了姜黄素固体脂质纳米粒(Cur-SLN)^[9]。现以 Cur-SLN 为干预物,探讨其对心肾综合征模型大鼠心、肾、肺功能和细胞自噬相关因子表达的影响,以期 Cur-SLN 的作用机制研究和临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本文所用主要仪器包括 LC-2010 型高效液相色谱(HPLC)仪(日本 Shimadzu 公司), XW-80A 型涡旋混合仪(上海医科大学仪器厂), HWS-24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司), XW-80A 型定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器有限公司), PHS-3C 型精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司), Nikon Ci-L 型显微镜(日本 Nikon 公司), HMIAS-2000 型高清晰度数码显微图像分析系统(北京利金阳科技发展有限公司),

PL203 型精密电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司], EG1150H 型生物组织包埋机、RM 21351 型切片机(德国 Leica 公司), B071 型光学显微镜(日本 Olympus 公司), DNM-9602 型酶标仪(北京普朗有限公司), BR162123 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), LAS-500 型凝胶成像系统(美国 GE 公司)。

1.2 主要药品与试剂

Cur 原料药(批号 TZSW200317-1, 纯度 99.0%)购自西安通泽生物科技有限公司;雷帕霉素(批号 H12J10J79598, 纯度 99%)购自上海源叶生物科技有限公司;大鼠血管紧张素转换酶(ACE)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、精氨酸加压素(AVP)ELISA 试剂盒、游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)ELISA 试剂盒、兔抗大鼠 LC3 单克隆抗体(批号分别为 9J2811、9J2811、9J2811、6N26)均购自美国 SAB 公司;细胞裂解液试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为 P00138、P0010)均购自上海碧云天生物技术有限公司;生物素标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 抗体(二抗)、兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(批号分别为 201806、BM0627)购自武汉博士德生物有限公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号 17122220)购自沈阳万类生物科技有限公司;兔抗大鼠 Beclin-1 单克隆抗体(批号 3507223001)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔 SP 试剂盒(兔链霉卵白素-生物素法检测系统)(批号 K197713D)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为娃哈哈纯净水。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 220~240 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(京)2016-0006。所有动物均正常摄食、饮水。

2 方法

2.1 Cur-SLN 的制备

采用微乳法进行制备^[9]。称取 Cur 原料药 50 mg、硬脂酸 0.5 g,于 65 °C 条件下熔化;再加入 4 倍量(V/V)相同温度的聚山梨酯 80 乙醇溶液和适量水,涡旋 1 min,制成水包油(O/W)型微乳。在电磁搅拌(1 000 r/min)下,将上述微乳以 5 s/滴的速度滴入 2 °C 的水中;当微乳全部

加入后,继续搅拌 15 min,即得 Cur-SLN 混悬液(以 Cur 计,质量浓度为 0.77 mg/mL,载药量为 7.72%)。

2.2 分组、造模与给药

将大鼠适应性喂养 7 d 后,分为假手术组、模型组、雷帕霉素组(阳性对照,2 mg/kg,剂量参考文献[10]设置)和 Cur-SLN 低、高剂量组(5、10 mg/kg,剂量参考文献[11-12]设置),除模型组 13 只外,其余各组均 10 只。除假手术组外,其余各组大鼠均采用腹主动脉缩窄合并肾急性缺血再灌注损伤法复制心肾综合征模型。具体造模方法如下:大鼠腹腔注射 45 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,行腹部正中切开,沿腹白线进入腹腔,暴露分离左、右侧肾蒂,阻断结扎 30 min 后,解除阻断,恢复血流,造成肾急性缺血再灌注损伤;随后,暴露分离后腹膜,沿游离腹主动脉长轴置一折弯的 7 号针头,以 3-0 的丝线绕腹主动脉后与 7 号针头一起结扎,随后立即抽出针头,使腹主动脉残留直径为 0.7 mm 的残腔,造成腹主动脉狭窄^[3]。假手术组只同法分离肌肉、血管,但不阻断。术后,在各组大鼠腹腔内滴入青霉素以预防感染,然后分层关闭腹腔。造模 8 周后,取 3 只模型组大鼠,剖解其心肾组织进行观察,当出现心肌肥厚、肾肿大时,则表明造模成功。造模成功后,各给药组大鼠均尾静脉注射相应药物(注射体积为 1 mL/kg),假手术组和模型组大鼠同法注射等体积生理盐水,每天 1 次,连续 4 周。

2.3 大鼠血清中 ACE、FT3、AVP 的含量测定

末次给药 24 h 后,将大鼠麻醉,于腹主动脉取血。血样静置 30 min 后,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上层血清,按 ELISA 试剂盒说明书相关方法操作,采用酶标仪于 450 nm 波长下测定血清中 ACE、FT3、AVP 的含量。

2.4 大鼠心脏、肾、肺指数的测定

取血完成后,处死大鼠,取其心脏、肾、肺组织;分离心肌组织后,称定心脏湿质量、肾湿质量、肺湿质量,然后计算各脏器指数(脏器指数=脏器湿质量/体质量×100%)。

2.5 大鼠心脏、肾、肺组织病理学形态观察

取“2.4”项下各组大鼠心脏、肾、肺组织适量,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经 70%、80%、90%、95% 乙醇和无水乙醇梯度脱水,再以二甲苯透明替换、浸蜡、包埋、切片(厚度约 5 μm)。各组大鼠均取 2 张相应脏器切片进行苏木精-伊红(HE)染色(另外 3 张切片后续进行免疫组化实验),然后于光学显微镜下观察其心脏、肾、肺组织的病理学形态。

2.6 大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子的表达分布检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.5”项下各组大鼠另外 3 张相应脏器切片,经脱蜡并复水后,以磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 5 min×3 次,滴加 3% H₂O₂,室温静置 10 min;以 PBS 冲洗 5 min×3 次,置于枸橼酸钠溶液中煮沸

10 min 以热修复抗原;冷却后以 PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加山羊血清进行封闭,室温静置 20 min;甩去多余液体,滴加 LC3、Beclin-1 一抗(稀释度均为 1:500)50 μL,室温静置 1 h;以 PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加二抗,室温孵育 15 min;以 PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次,滴加辣根酶标记的链霉卵白素-生物素免疫复合物适量,室温孵育 15 min;以 PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次,加入 DAB 显色液适量,室温孵育 8 min;采用光学显微镜进行观察,并拍照。当切片中呈现明显的棕黄色颗粒则为阳性表达,呈现不着色或浅色则为阴性表达。

2.7 大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子的表达水平检测

采用 Western blot 法进行检测。取“2.4”项下各组大鼠心脏、肾、肺组织适量,经剪碎、裂解后,以 12 000 r/min 离心 5 min;取上清液,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白经变性后,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE),然后转膜 70 min,以 5% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 2 h;以 TBST 洗膜 5 min×3 次,加入 LC3、Beclin-1、β-actin 一抗(稀释度均为 1:500),4 ℃ 孵育过夜;以 TBST 洗膜 5 min×3 次,加入二抗(稀释度为 1:2 000),室温孵育 1 h;以 TBST 洗膜 5 min×3 次,经 ECL 试剂显色后,置于凝胶成像系统中曝光成像。采用 Image J 1.8.0 软件对蛋白条带的灰度值进行分析,以 LC3、Beclin-1 分别与内参 β-actin 灰度值的比值表示相应蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较,若数据符合正态分布且方差齐性,则采用单因素方差分析;若方差不齐,则采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 大鼠血清中 ACE、FT3、AVP 含量的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 ACE、FT3 含量均显著升高($P<0.01$),AVP 含量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,雷帕霉素组和 Cur-SLN 各剂量组大鼠血清中 ACE、FT3 含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),AVP 含量(雷帕霉素组除外)均显著升高($P<0.05$)。结果见表 1。

3.2 大鼠心脏、肾、肺指数的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠心脏指数、肾指数均显著升高($P<0.01$),肺指数显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,雷帕霉素组和 Cur-SLN 各剂量组大鼠心脏指数、肾指数均显著降低($P<0.01$),肺指数(Cur-SLN 高剂量组除外)均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 2。

表1 各组大鼠血清中ACE、FT3、AVP含量的测定结果
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Contents of ACE, FT3 and AVP in serum of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ACE,ng/mL	FT3,pg/mL	AVP,ng/mL
假手术组	0.127±0.065	1.212±0.512	1 965.368±804.326
模型组	0.415±0.118**	3.066±2.062**	549.768±214.025**
雷帕霉素组	0.178±0.072 ^{##}	1.488±0.517 ^{##}	665.908±274.691
Cur-SLN高剂量组	0.223±0.106 ^{##}	1.310±0.676 ^{##}	1 051.651±308.226 [#]
Cur-SLN低剂量组	0.280±0.150 [#]	1.958±0.810 [#]	1 018.007±367.674 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

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

表2 各组大鼠心脏、肾、肺指数的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Heart, kidney and lung indexes of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	心脏指数	肾指数	肺指数
假手术组	0.232±0.032	0.229±0.026	0.272±0.022
模型组	0.433±0.075**	0.363±0.031**	0.221±0.027**
雷帕霉素组	0.349±0.024 ^{##}	0.294±0.021 ^{##}	0.268±0.014 ^{##}
Cur-SLN高剂量组	0.281±0.033 ^{##}	0.267±0.018 ^{##}	0.239±0.021
Cur-SLN低剂量组	0.342±0.024 ^{##}	0.306±0.033 ^{##}	0.252±0.027 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

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

3.3 大鼠心脏、肾、肺组织病理学形态观察结果

假手术组大鼠心肌细胞排列正常、间质均一;肾小管结构完整,肾小球形态正常,无扩张萎缩现象;肺泡形

态大小正常,无充血及炎性细胞浸润。模型组大鼠心非梗死区心肌细胞明显肥大,心肌纤维排列紊乱,细胞间质可见局灶性纤维化及炎性细胞浸润;肾非梗死区肾小管结构紊乱、呈囊性扩张、上皮萎缩,肾小球增大、结构模糊;肺泡可见明显炎性细胞浸润。雷帕霉素组和Cur-SLN各剂量组大鼠心脏、肾、肺组织的病理改变程度均较模型组减轻,炎性细胞浸润减少。结果见图1。

3.4 大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子的表达分布检测结果

在大鼠心脏组织中,假手术组LC3、Beclin1蛋白的阳性表达较低,少数分布于心肌细胞的细胞质中;模型组上述蛋白的阳性表达相较于假手术组增多,主要分布于心肌细胞的细胞质中;各给药组上述蛋白的阳性表达相较于模型组减少,主要分布于心肌细胞的细胞质中。在大鼠肾组织中,假手术组上述蛋白的阳性表达较少,主要分布于肾小管和肾小球细胞中;模型组上述蛋白的阳性表达相较于假手术组增多,主要分布于远端肾小管上皮细胞中;各给药组上述蛋白的阳性表达相较于模型组减少,主要分布于近端肾小管上皮细胞中,少数分布于远端肾小管上皮细胞中。在大鼠肺组织中,假手术组上述蛋白的阳性表达较少,主要分布于上皮细胞;模型组上述蛋白的阳性表达相较于假手术组增多,主要分布于肺泡巨噬细胞和上皮细胞中;各给药组上述蛋白阳性表达相较于模型组减少,少数分布于肺泡巨噬细胞和上皮细胞中。结果见图2。

3.5 大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子的表达水平检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠心脏、肾、肺组织中

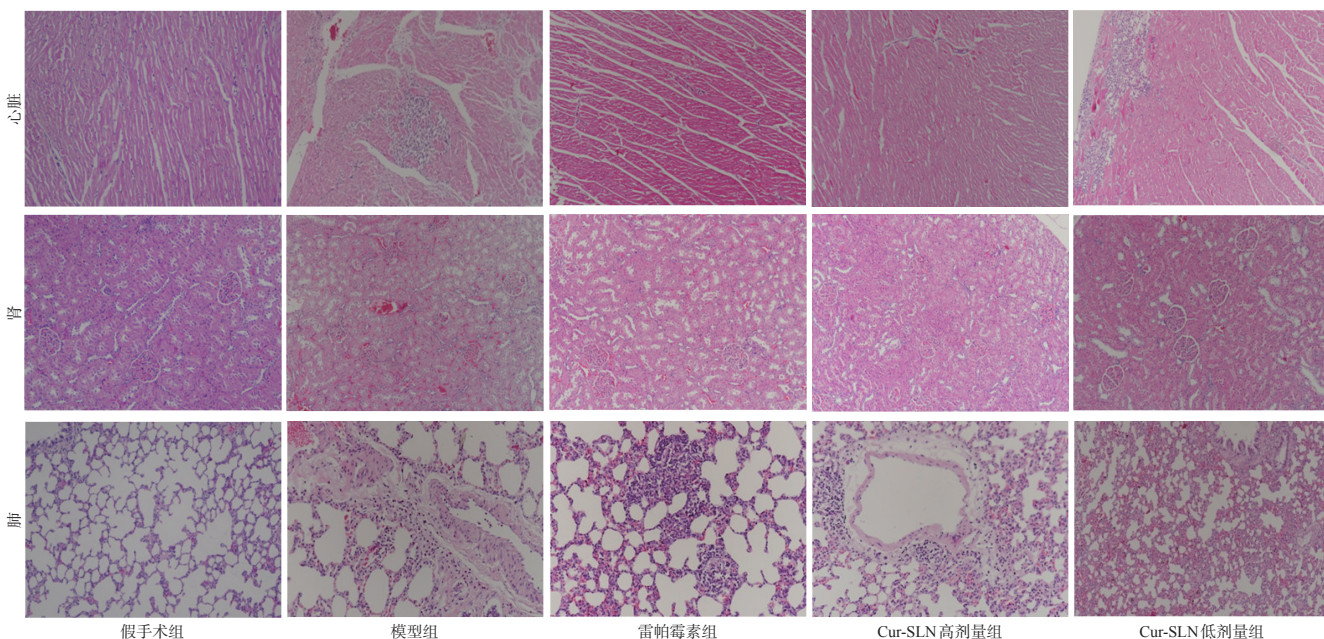


图1 各组大鼠心脏、肾、肺组织的病理学形态显微图(HE染色,×100)

Fig 1 Histopathological micrograph of heart, kidney and lung tissues of rats in each group(HE staining, × 100)

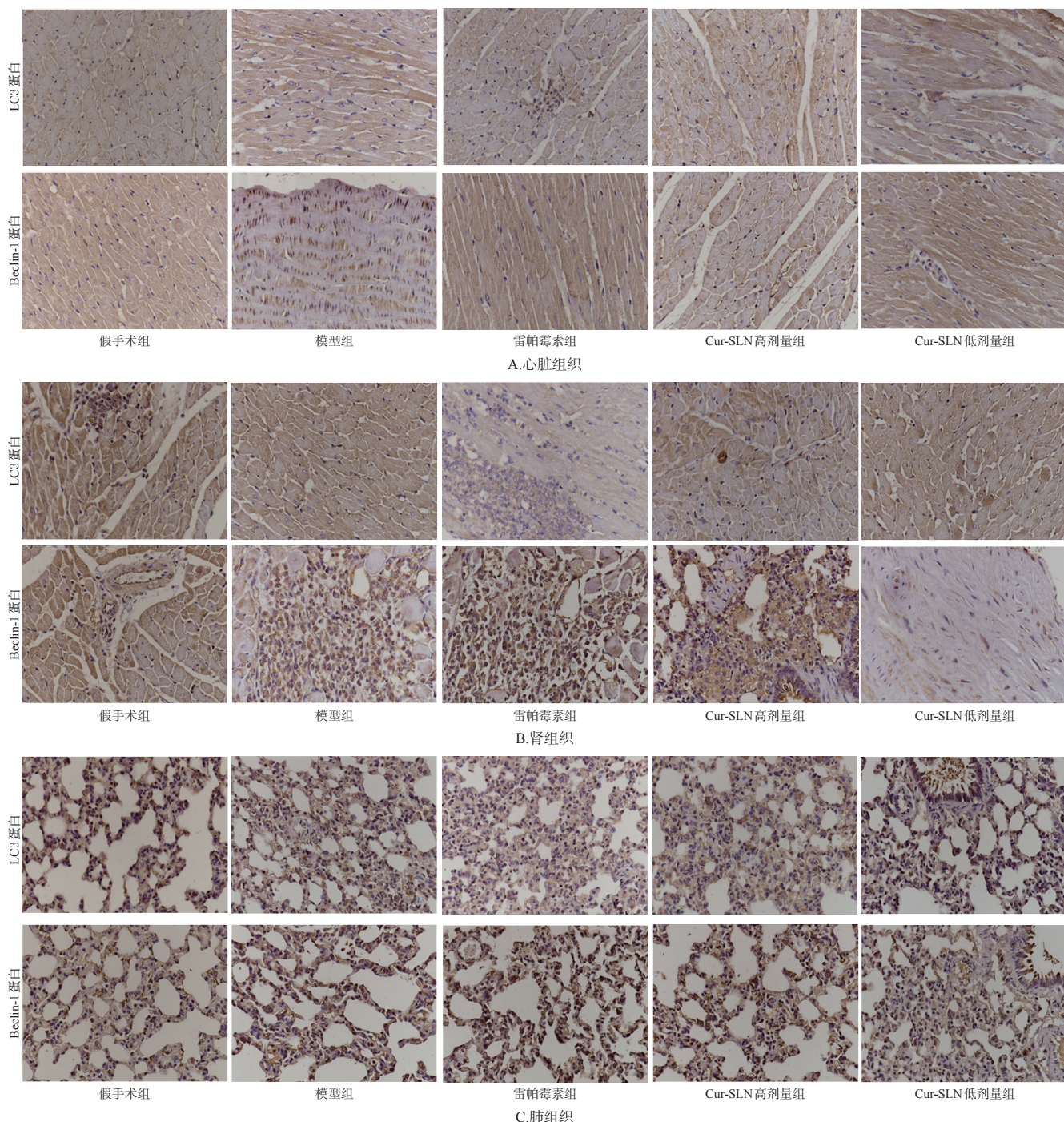


图2 各组大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子表达分布的显微图(免疫组化染色,×100)

Fig 2 Micrograph of autophagy related factors distribution in heart, kidney and lung tissues of rats in each group (immunohistochemical staining, ×100)

LC3(肾组织中除外)、Beclin-1蛋白的表达水平均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,雷帕霉素组和Cur-SLN各剂量组大鼠心、肾、肺组织中LC3(肾组织中除外)、Beclin-1(Cur-SLN低剂量组肾组织中除外)蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图3、表3。

4 讨论

心肾综合征是临床常见的心肾交集或复合型疾病,因其发病率高、病死率高、治疗费用昂贵,已成为全球公

共健康的重要问题^[14]。心肾纤维化是心肾综合征疾病进展到终末期的重要途径和主要病理改变基础^[13]。相关研究发现,姜黄素具有调节组织细胞凋亡和自噬功能的作用,还可减轻血管紧张素Ⅱ诱导的心肌纤维化和肾间质纤维化^[15],但其是否能通过调控细胞自噬来治疗心肾综合征,尚不明确。因此,本研究在制备Cur-SLN的基础上,初步探讨其对心肾综合征模型大鼠心、肾、肺功能及细胞自噬相关因子表达的影响。

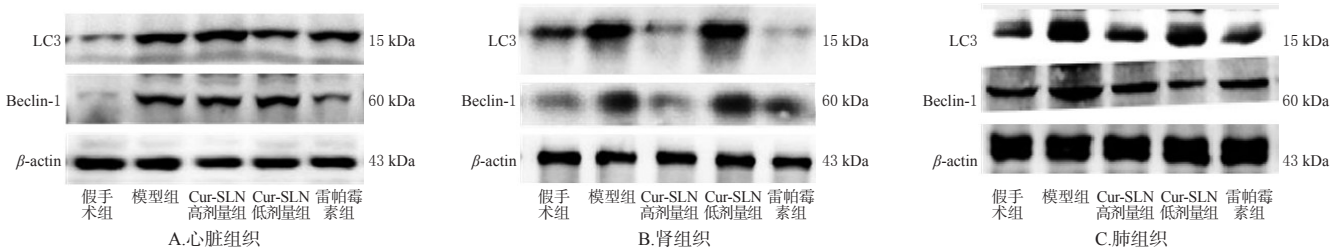


图3 各组大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretic map of autophagy related factors in heart, kidney and lung tissues of rats in each group

表3 各组大鼠心脏、肾、肺组织中细胞自噬相关因子表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Expression of autophagy related factors in heart, kidney and lung tissues of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	LC3			Beclin-1		
	心脏	肾	肺	心脏	肾	肺
假手术组	0.282 ± 0.082	0.412 ± 0.096	0.480 ± 0.074	0.232 ± 0.053	0.538 ± 0.154	0.384 ± 0.115
模型组	0.650 ± 0.072**	0.813 ± 0.530	0.747 ± 0.121**	0.628 ± 0.134**	1.236 ± 0.288**	0.910 ± 0.157**
雷帕霉素组	0.341 ± 0.051 [#]	0.617 ± 0.160	0.506 ± 0.221 [#]	0.345 ± 0.064 [#]	0.864 ± 0.100 [#]	0.634 ± 0.136 [#]
Cur-SLN 高剂量组	0.345 ± 0.073 [#]	0.503 ± 0.137	0.456 ± 0.047 [#]	0.456 ± 0.050 [#]	0.678 ± 0.081 [#]	0.300 ± 0.101 [#]
Cur-SLN 低剂量组	0.577 ± 0.049 [#]	0.828 ± 0.152	0.444 ± 0.062 [#]	0.483 ± 0.072 [#]	1.001 ± 0.229	0.372 ± 0.132 [#]

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

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

有研究提示,FT3水平升高可以间接激活肾素-ACE-醛固酮系统,加重水钠潴留的状态,进一步影响心肌肥大的病理程度,使得肺氧浓度降低、动脉血管收缩、AVP含量降低,进而导致病情加重^[16-18]。本研究结果显示,经Cur-SLN干预后,心肾综合征模型大鼠血清中ACE、FT3含量和心脏指数、肾指数均显著降低,AVP含量和肺指数均显著升高,心脏、肾、肺组织病理改变程度均较模型组减轻、炎性细胞浸润减少,表明Cur-SLN能有效改善心肾综合征模型大鼠的心肌肥大、肾功能以及肺组织损伤。

Beclin-1的表达与自噬体数目相关,其表达水平越高,则细胞内自噬体的数目就越多^[19]。研究表明,Beclin-1在抑制肿瘤和预防心血管疾病、退行性疾病等方面均具有重要作用^[20-21]。LC3是哺乳动物自噬相关基因8(*Atg8*)的同源物,LC3靶向定位于自噬体膜,参与自噬体的形成^[22]。本研究结果显示,经Cur-SLN干预后,大鼠心脏、肾、肺组织中LC3、Beclin-1的阳性表达均较模型组减少,主要分布于心肌细胞细胞质中、近端肾小管上皮细胞中,少数分布于远端肾小管上皮细胞和肺泡巨噬细胞、上皮细胞中。进一步研究显示,经Cur-SLN干预后,模型大鼠心脏、肾、肺组织中LC3(肾组织中除外)、Beclin-1(Cur-SLN低剂量组肾组织中除外)蛋白表达水平均显著降低,表明Cur-SLN可通过调控细胞自噬相关因子表达水平,改善模型大鼠的心肌肥大、肾功能以及肺组织损伤。

综上所述,Cur-SLN可改善心肾综合征模型大鼠的心、肾、肺功能,其作用机制可能与调控LC3、Beclin-1蛋白在心脏、肾、肺组织中的分布或表达有关。

参考文献

- [1] CLEMENTI A, VIRZÌ G M, BATTAGLIA G G, et al. Neurohormonal, endocrine, and immune dysregulation and inflammation in cardiorenal syndrome[J]. *Cardiorenal Med*, 2019, 9(5): 265-273.
- [2] 刘高仁, 李鲜. 温阳利水汤对急性心力衰竭合并1型心肾综合征患者心肾功能保护效应[J]. *陕西中医*, 2019, 40(4): 462-465.
- [3] 李宜醒, 姚伟静, 易聪. 细胞自噬研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(2): 192-201.
- [4] 李旭, 王梓, 郝迪, 等. 参附强心丸对心肾综合征模型大鼠心肌细胞中LC3b、Bax表达的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(19): 2602-2605.
- [5] HASSANZADEH S, READ M I, Bland A R, et al. Curcumin: an inflammasome silencer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104921.
- [6] YAO Q, KE Z, GUO S, et al. Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 124: 26-34.
- [7] MEHTA P, BOTHIRAJA C, MAHADIK K, et al. Phyto-constituent based dry powder inhalers as biomedicine for the management of pulmonary diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 828-837.
- [8] MU H, HOLM R. Solid lipid nanocarriers in drug delivery: characterisation and design[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2018, 15(8): 771-785.
- [9] 李楠, 李旭, 刘伟伟, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的体外释药、体内急性毒性及对哮喘模型小鼠炎症反应的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(3): 332-338.
- [10] 谢阳, 张淑江, 刘梦兰, 等. 雷帕霉素保护实验性自身免疫

大黄廔虫丸中17种质量标志物的含量测定^Δ

付传奎^{1*}, 许珂嘉¹, 张子蒙¹, 黄艳², 陈志鹏¹, 李伟东¹, 吴丽^{1#}(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 安徽医科大学炎症免疫性疾病安徽省实验室, 合肥 230032)

中图分类号 R286.0;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)19-2353-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.19.08



摘要 目的:建立同时测定大黄廔虫丸中17种质量标志物含量的方法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)法测定10批市售大黄廔虫丸中尿囊素、次黄嘌呤、红景天苷、羟基芍药苷、甘草苷、异甘草苷、黄芩苷、对甲氧基苯乙酸、汉黄芩苷、肉桂酸、芹菜素、柚皮素、去甲汉黄芩素、芦荟大黄素、大黄酸、白杨素、大黄素等17种质量标志物的含量。色谱柱为Kromasil 100-5-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%磷酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为210 nm,进样量为20 μL。结果:上述17种质量标志物的质量浓度依次在5.74~183.53、6.51~208.24、4.30~137.65、4.60~147.06、4.12~131.76、4.25~135.88、6.31~201.76、4.60~147.06、1.94~62.06、4.47~142.94、0.69~22.06、2.29~73.24、2.33~74.41、1.42~45.29、6.65~212.94、1.11~35.44、1.47~47.06 μg/mL范围内与各自峰面积呈良好的线性关系(R^2 均不小于0.999 0)。该方法精密度、重复性、稳定性、耐用性的RSD均小于2%($n=6$);17种质量标志物的平均加样回收率范围为96.31%~101.73%,RSD均小于3%($n=6$)。结论:本方法简便、快速,专属性、精密度、重复性、稳定性、准确度和耐用性均良好,可用于完善大黄廔虫丸的质量标准。

关键词 大黄廔虫丸;质量标志物;高效液相色谱法;质量标准;含量测定

Content Determination of 17 Quality Markers in Dahuang Zhechong Pills

FU Chuankui¹, XU Kejia¹, ZHANG Zimeng¹, HUANG Yan², CHEN Zhipeng¹, LI Weidong¹, WU Li¹(1. School of Pharmacy, Nanjing University of TCM, Nanjing 210023, China; 2. Anhui Province Laboratory of Inflammation and Immune Mediated Diseases, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

- 性脑脊髓炎小鼠脊髓神经元的的作用途径[J].中国组织工程研究,2021,25(5):695-700.
- [11] 吴鹏波,宋琪,俞媛洁,等.姜黄素激活自噬干预非酒精性脂肪肝病模型大鼠氧化应激及炎症反应[J].中国组织工程研究,2020,24(11):1720-1725.
- [12] 宋莉平,王宇.姜黄素药理作用及机制研究进展[J].中国医药导报,2020,17(20):29-34.
- [13] 吴英智,杭丽玮,傅强,等.新型心肾综合征大鼠动物模型建立与评价[J].中华高血压杂志,2018,26(5):435-442.
- [14] DI LULLO L, BELLASI A, RUSSO D, et al. Cardiorenal acute kidney injury: epidemiology, presentation, causes, pathophysiology and treatment[J]. Int J Cardiol, 2017, 227:143-150.
- [15] 范沐霞,赵塔娜,王丽敏,等.姜黄素抗纤维化研究进展[J].中医学报,2019,34(11):2343-2348.
- [16] 郑甲林,张新金,郭涛,等.甲亢源性心房颤动与肾素-血管紧张素系统相关发病机制的研究[J].现代生物医学进展,2021,21(2):228-232.
- [17] 黄钰.甲状腺激素与肾脏病理生理在肾脏疾病中的作用[J].临床内科杂志,2021,38(2):139-141.
- [18] 杜晓敏,翟磊.血液超滤对心肾综合征病人心肺功能及相关指标的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2019,17(11):1744-1747.
- [19] 孙大伟,索艳荣,冯丽莎,等.基于自噬基因 Beclin-1 与 LC3 探讨丹参素对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌 ATP5G1 的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(6):2421-2425.
- [20] YUAN B, SUN M, BAO C, et al. Dynamic expression of autophagy-related factors in autoimmune encephalomyelitis and exploration of curcumin therapy[J]. J Neuroimmunol, 2019, 337:577067.
- [21] DENG Q, LIANG L, LIU Q, et al. Autophagy is a major mechanism for the dual effects of curcumin on renal cell carcinoma cells[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 826:24-30.
- [22] 郜然然,周慧,吴也可,等.中药通过mTOR途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):218-224.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873287);江苏省高等学校自然科学研究重大项目(No.18KJA360009);安徽医科大学炎症免疫性疾病安徽省实验室开放课题(No.IMMDL202009)

* 学士。研究方向:中药质量标准。电话:025-85811625。E-mail:041319317@njucm.edu.cn

通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药复方治疗慢性肝病的机制及物质基础。电话:025-85811625。E-mail:wuli@njucm.edu.cn

(收稿日期:2021-04-02 修回日期:2021-08-09)
(编辑:唐晓莲)