

## 3-甲基嘌呤对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及其机制研究<sup>Δ</sup>

朱贵贵<sup>1,2\*</sup>, 马晓鹏<sup>3#</sup>, 吴科锋<sup>1</sup>, 陈华玲<sup>1,2</sup> (1. 广东天然药物开发研究实验室, 广东湛江 524023; 2. 广东医学院药理教研室, 广东湛江 524023; 3. 广东医学院附属医院, 广东湛江 524001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0464-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.10

**摘要** 目的: 研究自噬抑制剂3-甲基嘌呤(3-MA)对脂多糖(LPS)诱导小鼠急性肺损伤的保护作用及其机制。方法: 取小鼠随机分为正常对照组、模型(LPS 15 mg/kg)组、药物对照(3-MA 20 mg/kg)组和低、高剂量治疗(LPS 15 mg/kg+3-MA 20、40 mg/kg)组, 每组10只。除正常对照组和药物对照组外, 其余各组小鼠ip LPS复制急性肺损伤模型, 药物对照组和低、高剂量治疗组小鼠分别于建模前1 h ip相应剂量的3-MA。建模6 h后分别测量各组小鼠的肺湿/干质量比(W/D), HE染色观察肺组织病理变化; Western blot法检测肺组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、NF- $\kappa$ B p65、LC3B II/I、激活型半胱氨酸氨基蛋白酶3(Cleaved-caspase-3蛋白)的表达水平。结果: 与正常对照组比较, 模型组小鼠的W/D值和TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、LC3B II/I、Cleaved-caspase-3蛋白表达均增强( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 低剂量治疗组小鼠的W/D值和TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、LC3B II/I、Cleaved-caspase-3蛋白表达均减弱( $P < 0.05$ ), 高剂量治疗组小鼠仅LC3B II/I蛋白表达减弱( $P < 0.01$ )。结论: 在LPS诱导的急性肺损伤小鼠模型中, 过度自噬可能通过激活NF- $\kappa$ B通路参与炎症反应并诱导细胞凋亡; 3-MA适度抑制自噬可减轻炎症反应并起到保护肺组织的作用。

**关键词** 自噬; 3-甲基嘌呤; 急性肺损伤; 脂多糖; 小鼠

### Protective Effects of 3-Methyladenine against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Mice and the Mechanism Study

ZHU Benben<sup>1,2</sup>, MA Xiaoli<sup>3</sup>, WU Kefeng<sup>1</sup>, CHEN Hualing<sup>1,2</sup> (1. Laboratory for Guangdong Natural Drugs Research and Development, Guangdong Zhanjiang 524023, China; 2. Dept. of Pharmacology, Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524023, China; 3. The Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the protective effects of autophagy inhibitor 3-Methyladenine (3-MA) against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice and its mechanism. METHODS: Mice were randomly divided into normal control group, model group (LPS 15 mg/kg), drug control group (3-MA 20 mg/kg), low-dose and high-dose groups (LPS 15 mg/kg+3-MA 20, 40 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for normal control group and drug control group, other groups were given LPS intraperitoneally to induce acute lung injury model, and drug control group and low-dose and high-dose groups were given equivalent dose of 3-MA intraperitoneally 1 h before modeling. 6 h after modeling, lung wet/dry mass ratio (W/D) was determined respectively, and pathology change of lung tissue was observed by HE staining. TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, LC3B II/I and Cleaved-caspase-3 protein expression were detected by Western blot. RESULTS: Compared with normal control group, W/D, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, LC3B II/I and Cleaved-caspase-3 protein expression increased in model group ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, W/D, the expression of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, LC3B II/I and Cleaved-caspase-3 protein decreased in low-dose group ( $P < 0.05$ ), while just only LC3B II/I protein decreased high-dose group ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: In LPS-induced acute lung injury model in mice, the excessive autophagy could activate the NF- $\kappa$ B pathway and involve the inflammatory responses and induce lung cells apoptosis. The moderate autophagy inhibition by 3-MA can ameliorate inflammatory response and protect lung tissue.

**KEYWORDS** Autophagy; 3-Methyladenine; Acute lung injury; Lipopolysaccharide; Mice

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)可由各种因素诱导发病, 表现为肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞损伤, 进而引起弥

散性肺间质及肺泡水肿、急性低氧性呼吸功能不全<sup>[1]</sup>。ALI不仅是肺部疾病, 也是全身系统炎症性疾病的肺部表现。炎症反应和免疫调节失控可导致多形核白细胞、肺泡巨噬细胞等炎

本栏目协办

北京安妮福克斯信息咨询有限公司

地址: 北京市东城区建国门内大街7号光华长安大厦1座301  
电话: 4000008137 邮编: 100005

<sup>Δ</sup> 基金项目: 广东省自然科学基金自由申请重点博士启动项目 (No.S2012010008145)

\* 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 药事管理学、临床药学。  
E-mail: btzhubenben@163.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士生导师。研究方向: 药事管理学、临床药学。E-mail: mxlorczb@163.com

性细胞激活,引起多种促炎细胞因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1(IL-1)等释放,并通过细胞间的信息传导,导致肺损伤加重、免疫系统功能破坏,甚至发展为多器官功能障碍综合征<sup>[1]</sup>。对于ALI治疗,目前有研究表明自噬(Autophagy)在其发病中有着潜在的重要性<sup>[2-4]</sup>。自噬是通过清除错误折叠蛋白质以及受损的细胞器,防止微生物等异物入侵,维持细胞内环境稳定的过程。自噬体的形成需要众多自噬相关蛋白的参与,Ⅲ型磷脂酰肌醇3激酶(PI3K-Ⅲ)和泛素样修饰系统是该过程的两个重要调控者<sup>[5]</sup>。本研究采用PI3K-Ⅲ抑制剂3-甲基嘌呤(3-MA)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠ALI进行干预,探讨是否可以通过抑制自噬减轻炎症反应起到对肺组织的保护作用,并以自噬诱导凋亡为切入点研究其可能机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Nikon Y-FL 荧光显微镜(日本Nikon公司)。

### 1.2 药品与试剂

LPS(型号:B5L2880,批号:#011M4001V)、3-MA(型号:M9281,批号:#022M4027V)均购自美国Sigma公司;微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3B)、激活型半胱氨酸氨基蛋白酶3(Cleaved-caspase-3)抗体购自美国CST公司;兔抗鼠NF- $\kappa$ B p65、TNF- $\alpha$ 、 $\beta$ -actin抗体购自美国SAB公司;HE染色试剂盒购自南京建成试剂公司。

### 1.3 动物

SPF级BALB/c小鼠50只,♂,8周龄,体质量为(20±2)g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号为:SCXK(粤)2013-0002。

## 2 方法

### 2.1 建模、分组与给药

取小鼠随机分为正常对照组、模型(LPS 15 mg/kg)组、药物对照(3-MA 20 mg/kg)组和低、高剂量治疗(LPS 15 mg/kg+3-MA 20、40 mg/kg)组,每组10只。除正常对照组和药物对照组外,其余各组小鼠ip LPS复制ALI模型,药物对照组和低、高剂量治疗组小鼠分别于建模前1 h ip相应剂量的3-MA。

### 2.2 指标检测

2.2.1 肺湿/干质量比 各组小鼠建模6 h后用1%戊巴比妥麻醉,剪刀剪开胸腔取新鲜右肺中下叶相同部位组织,称取肺组织湿质量;放置于80℃烤箱烘烤6 h,再称取干质量。计算两次质量之比即为肺湿/干质量比(W/D值),W/D值=肺湿质量(mg)/肺干质量(mg)<sup>[6]</sup>。

2.2.2 肺组织病理变化 取各组小鼠左上肺叶用10%中性福尔马林溶液固定,HE染色,观察各组小鼠肺组织病理变化<sup>[6]</sup>。

2.2.3 肺组织中TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、LC3B II/I、Cleaved-caspase-3蛋白的表达 采用Western blot法测定各组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65、LC3B II/I、Cleaved-caspase-3表达<sup>[7]</sup>。取各组小鼠右上肺组织,提取总蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶,每孔加样40  $\mu$ g进行电泳,200 mA湿转45 min,将聚偏二氟乙烯(PVDF)膜放入5%脱脂牛奶中室温封闭70 min,分别加入一抗兔抗鼠TNF- $\alpha$ (1:1 000, V/V)、NF- $\kappa$ B p65(1:1 000, V/V)、LC3B II/I(1:1 500, V/V)、Cleaved-caspase-3(1:1 500, V/V)、 $\beta$ -actin(1:2 000, V/V)及其稀释液中4℃过夜;用TBST洗涤3次,每次10 min,然后分别放入二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔)TNF- $\alpha$ (1:2 000, V/V)、NF- $\kappa$ B p65(1:2 000, V/V)、LC3B II/I(1:3 000, V/V)、Cleaved-caspase-3(1:3 000, V/V)、

$\beta$ -actin(1:4 000, V/V)及其稀释液,室温孵育1 h;TBST洗涤3次,每次10 min。电化学发光(ECL)法检测蛋白表达水平,所得条带使用Image-J分析光密度(OD),以 $\beta$ -actin为内参,按公式(相对值=目标蛋白产物的OD/ $\beta$ -actin的OD)计算相对值。

### 2.3 统计学方法

应用SPSS 22.0统计软件进行统计分析。数据用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 W/D值变化

与正常对照组比较,模型组小鼠的W/D值升高( $P<0.01$ ),药物对照组小鼠的W/D值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,低剂量治疗组小鼠的W/D值降低( $P<0.05$ ),高剂量治疗组小鼠的W/D值差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组小鼠W/D值的测定结果见表1。

表1 各组小鼠W/D值的测定结果( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Tab 1 W/D of mice in each group ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	W/D值
正常对照组	3.91±0.56
模型组	5.10±0.75*
药物对照组	4.01±0.81
低剂量治疗组	4.43±0.70#
高剂量治疗组	4.92±0.72

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

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

### 3.2 肺组织病理变化

镜下,正常对照组小鼠肺组织肺泡壁薄,细胞结构清楚、边缘完整,且腔内无炎性细胞和液体,肺间质也无炎性渗出。与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织肺间隔增厚、肺间质水肿及肺泡腔出血、肺泡塌陷,大量炎性细胞浸润明显;药物对照组小鼠肺泡结构完整,肺间隔未见明显增厚。与模型组比较,低、高剂量治疗组小鼠肺组织的病理变化均有不同程度的改善,其中低剂量治疗组小鼠的肺间隔增厚较轻、炎症细胞较少、出血现象较轻,由LPS引起的肺组织弹性变化部分恢复;高剂量治疗组小鼠肺组织的病理变化改善不及低剂量治疗组。各组小鼠肺组织的病理切片图见图1。

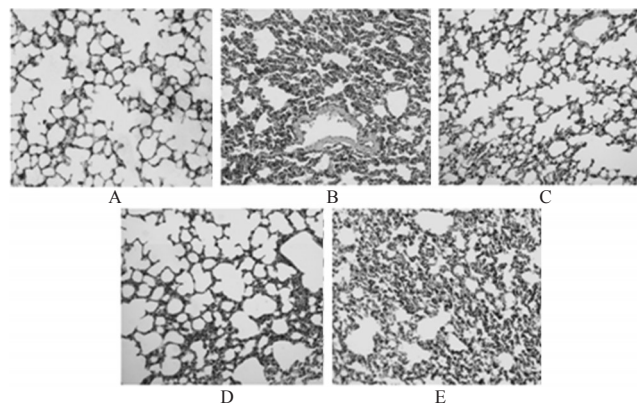


图1 各组小鼠肺组织的病理切片图(×200)

A.正常对照组;B.模型组;C.药物对照组;D.低剂量治疗组;E.高剂量治疗组

Fig 1 Pathological section of lung tissue of mice in each group(×200)

A. normal control group; B. model group; C. drug control group; D. low-dose group; E. high-dose group

### 3.3 肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白表达变化

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白表达增强( $P<0.01$ ),药物对照组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,低剂量治疗组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白表达减弱( $P<0.05$ ),高剂量治疗组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白的表达见图2。

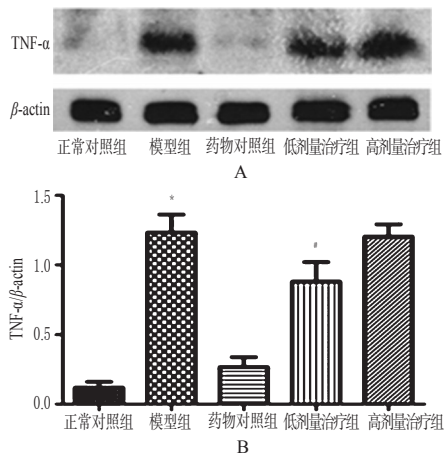


图2 各组小鼠肺组织中TNF- $\alpha$ 蛋白的表达

A.电泳图;B.柱状图

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

Fig 2 The expression of TNF- $\alpha$  protein in lung tissue of mice in each group

A. electrophoretogram; B. histogram

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

### 3.4 肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达变化

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达增强( $P<0.01$ ),药物对照组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,低剂量治疗组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达减弱( $P<0.05$ ),高剂量治疗组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达见图3。

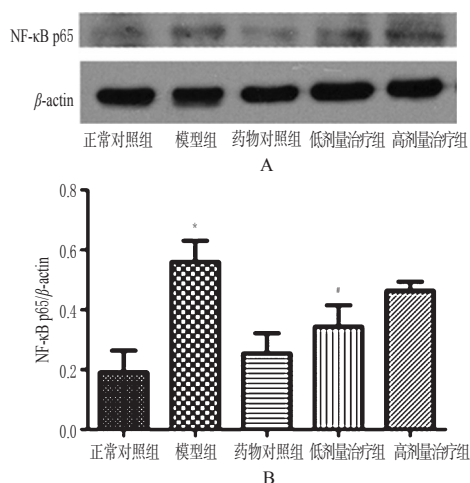


图3 各组小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达

A.电泳图;B.柱状图

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

Fig 3 The expression of NF- $\kappa$ B p65 protein in lung tissue of mice in each group

A. electrophoretogram; B. histogram

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

### 3.5 肺组织中LC3B II/I蛋白的表达变化

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中LC3B II/I蛋白表达增强( $P<0.01$ ),药物对照组小鼠肺组织中LC3B II/I蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,低、高剂量治疗组小鼠肺组织中LC3B II/I蛋白表达减弱( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ),且高剂量治疗组效果更明显。各组小鼠肺组织中LC3B II/I蛋白的表达见图4。

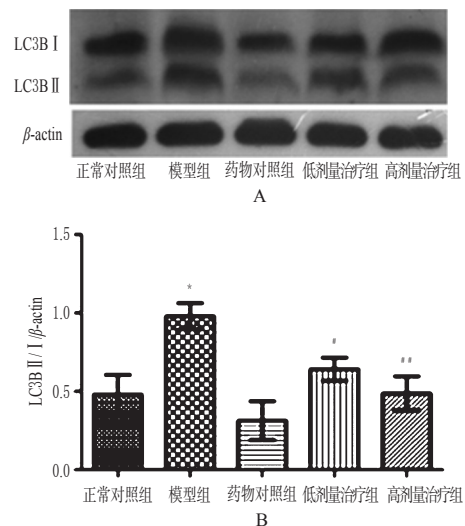


图4 各组小鼠肺组织中LC3B II/I蛋白的表达

A.电泳图;B.柱状图

注:与正常对照组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

Fig 4 The expression of LC3B II/I protein in lung tissue of mice in each group

A. electrophoretogram; B. histogram

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

### 3.6 肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白表达变化

与正常对照组比较,模型组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白表达增强( $P<0.01$ ),药物对照组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。与模型组比较,低剂量治疗组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白表达减弱( $P<0.05$ ),高剂量治疗组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。各组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白的表达见图5。

## 4 讨论

ALI是以肺组织内皮细胞及上皮细胞功能失调、肺泡-毛细血管膜损伤、通透性增加、大量白细胞迁移并释放促炎细胞因子,从而诱发炎症反应为特点<sup>[8]</sup>。本实验采用ip LPS 6 h后,小鼠肺组织出现明显肿胀,W/D值明显升高,HE染色后可见肺间隔增厚、肺泡腔出血、肺泡塌陷、大量炎性细胞浸润,Western blot法检测TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平增强,与文献报道<sup>[9]</sup>一致,证明ALI模型复制成功。

自噬是细胞高度自我调控的过程。在饥饿、生长因子匮乏、内质网压力或病原菌感染等内外压力下,自噬会从基础水平上调以应对这些刺激。如果自噬上调受阻,细胞内物质不能及时地被降解,就会使细胞或机体内发生相应的病变;相反的,如果自噬上调过多,细胞则可能出现自噬性死亡,即过度自噬造成细胞死亡,从而导致细胞受到不可逆的损伤<sup>[10]</sup>。在哺乳动物中,LC3B的LC3- I(未结合胞浆形式)向LC3- II(自噬体膜相关的磷脂酰乙醇胺结合形式)的转化,即LC3B II/I的比值升高是自噬体形成的标志。笔者观察到自噬标志蛋白

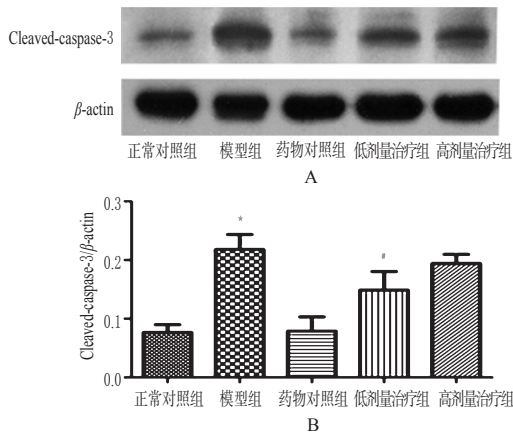


图5 各组小鼠肺组织中Cleaved-caspase-3蛋白的表达

A.电泳图;B.柱状图

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$

Fig 5 The expression of Cleaved-caspase-3 protein in lung tissue of mice

A. electrophoretogram; B. histogram

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

LC3B II / I 在模型组小鼠肺组织中高表达,说明LPS诱导的ALI模型中细胞自噬激活。给予3-MA干预后,小鼠肺组织细胞自噬水平降低,且随着3-MA剂量加大,抑制自噬作用增强。同时还观察到,与模型组比较,药物对照组小鼠 $W/D$ 值下降,肺组织切片可见部分恢复,炎症因子TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平降低;但随着3-MA剂量的增加,肺损伤程度并没有减轻。据此推测,LPS诱导小鼠ALI中发生过度的自噬反应,即细胞自噬性死亡使肺组织受到了严重的损伤。这表明通过药物干预适度抑制自噬激活可以有效减轻肺损伤,起到保护肺组织的作用,但是过度抑制自噬并没有发挥相应的保护作用。据此推测,当细胞内自噬活性被控制在一定水平时,自噬并没有加重肺损伤。本实验结果表明,药物对照组能抑制小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65的活化,从而减少NF- $\kappa$ B p65蛋白的合成,有效控制炎症的级联反应,防止肺组织进一步损伤。这证实了在LPS诱导的模型小鼠肺组织中NF- $\kappa$ B信号通路的激活对促炎细胞因子和趋化因子的分泌是必要的。这与H5N1诱导的ALI中,自噬与NF- $\kappa$ B信号通路之间反复循环作用加剧了肺部炎症,而3-MA可以显著减少促炎细胞因子和趋化因子释放相一致<sup>[11]</sup>。Copetti T等<sup>[12]</sup>研究表明,NF- $\kappa$ B p65能结合到Beclin1的启动子区域上,直接促进Beclin1的表达。此外,自噬的诱导和NF- $\kappa$ B的激活都需要激活核因子 $\kappa$ B抑制物激酶(IKK)<sup>[13]</sup>。这些证据说明NF- $\kappa$ B的激活和自噬是正反馈作用,这将进一步加速由LPS引起的下游炎症反应。NF- $\kappa$ B信号通路与自噬之间的关联可能是LPS诱导的肺部炎症反应的重要机制,所以控制自噬可能成为治疗LPS引起肺部炎症的一种手段。

NF- $\kappa$ B信号通路激活往往参与细胞凋亡的死亡信号途径,并会导致肺组织凋亡细胞增多,且肺细胞凋亡也被认为是ALI重要的发病机制之一<sup>[14]</sup>。不同凋亡信号的刺激可激活多种caspase,但最终都能导致caspase-3的激活<sup>[15]</sup>。caspase-3是凋亡通路关键蛋白,其活性形式Cleaved-caspase-3的蛋白量间接反映了细胞凋亡水平<sup>[16]</sup>。例如有研究发现在高氧条件下诱导的ALI中,干扰LC3B基因的转录可以使Cleaved-caspase-3表达下降<sup>[17]</sup>。与之类似,本实验发现模型组小鼠肺细胞自噬过度激活,且自噬激活伴随着细胞凋亡水平升高,而药物干预后抑制自噬激活,同时能够有效地抑制细胞凋亡,这提示ALI中肺细胞凋亡可能部分与细胞自噬过度激活有关。尽管本实验发

现过度诱导细胞自噬可以激活肺组织中的细胞凋亡,但是普遍认为凋亡在肺损伤中并不是细胞死亡的主要类型,坏死和其他细胞死亡可能在肺损伤中扮演更为重要的作用。本研究仅初步探讨了过度自噬诱发细胞凋亡加重肺损伤的证据及可能性,具体机制还有待进一步研究。

综上所述,在LPS诱导的急性肺损伤小鼠模型中,过度自噬可能通过激活NF- $\kappa$ B通路参与炎症反应并诱导细胞凋亡,3-MA适度抑制自噬可减轻炎症反应并起到保护肺组织的作用。

## 参考文献

- [1] Standiford TJ, Ward PA. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. *Transl Res*, 2016, 167(1):183.
- [2] Tanaka A, Jin Y, Lee S, et al. Hyperoxia-induced LC3B interacts with the fas apoptotic pathway in epithelial cell death[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(4):507.
- [3] Ryter SW, Choi AMK. Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics[J]. *Redox Biology*, 2015, doi: 10.1016/j.redox.2014.12.010.
- [4] Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, et al. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases[J]. *Chest*, 2012, 142(5):1289.
- [5] Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense[J]. *Cell*, 2005, 120(2):159.
- [6] 向红,王雅莉,邱桐.红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(15):1352.
- [7] 王岑立,陈淑梅,李晓雯,等.七叶皂苷钠对急性肺损伤模型大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2014, 25(15):1368.
- [8] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2731.
- [9] Bao S, Zou Y, Wang B, et al. Ginsenoside rg1 improves lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting inflammatory responses and modulating infiltration of M2 macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1):429.
- [10] Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, et al. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):474.
- [11] Pan H, Zhang Y, Luo Z, et al. Autophagy mediates avian influenza H5N1 pseudotyped particle-induced lung inflammation through NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014, 306(2):183.
- [12] Copetti T, Bertoli C, Dalla E, et al. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10):2594.
- [13] Criollo A, Senovilla L, Authier H, et al. The IKK complex contributes to the induction of autophagy[J]. *EMBO J*, 2010, 29(3):619.
- [14] Xie K, Yu Y, Huang Y, et al. Molecular hydrogen ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through reducing inflammation and apoptosis[J]. *Shock*, 2012, 37(5):548.
- [15] 董雯雯.自噬在小鼠脑出血后脑损伤中的作用及机制研究[D].苏州:苏州大学,2014.

# HPLC-荧光法测定大鼠微量血浆中酒石酸唑吡坦的含量<sup>Δ</sup>

苗彩云<sup>1\*</sup>, 陈江飞<sup>2</sup>, 朱素燕<sup>2</sup>, 徐萍<sup>2</sup>(1.宁波市妇女儿童医院药剂科, 浙江宁波 315012; 2.宁波市第一医院药剂科, 浙江宁波 315010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)04-0468-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.04.11

**摘要** 目的:建立微量血浆中酒石酸唑吡坦的含量测定方法。方法:取大鼠,ig酒石酸唑吡坦溶液3 mg/kg,给药后取血0.2 ml,分离后取血浆50 μl经甲醇沉淀蛋白,取上清液采用高效液相色谱-荧光法测定,以外标法进行定量。色谱柱为Agilent HC-C<sub>18</sub>,流动相为0.03 mol/L磷酸二氢钾溶液(含0.2%三乙胺)-甲醇(33:67, V/V),流速为1.0 ml/min,激发波长为254 nm,发射波长为390 nm,进样量为20 μl。结果:酒石酸唑吡坦检测质量浓度的线性范围为2~200 μg/L( $r=0.9997$ ),定量下限为2 μg/L;方法回收率为(96.96±1.35)%~(105.0±5.36)% (RSD为2.20%~4.88%,  $n=5$ );提取回收率为(79.72±0.01)%~(80.77±0.02)% (RSD为1.34%~3.90%,  $n=5$ );日内RSD为1.40%~5.10%,日间RSD为3.22%~9.25% ( $n=5$ )。结论:本法简便、灵敏,可用于微量血浆中唑吡坦的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法;酒石酸唑吡坦;微量血浆;血药浓度;大鼠

## Content Determination of Zolpidem Tartrate in Microsamples of Rat Plasma by HPLC-fluorescence Method

MIAO Caiyun<sup>1</sup>, CHEN Jiangfei<sup>2</sup>, ZHU Suyan<sup>2</sup>, XU Ping<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Ningbo Women and Children's Hospital, Zhejiang Ningbo 315012, China; 2.Dept. of Pharmacy, Ningbo Municipal First Hospital, Zhejiang Ningbo 315010, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of zolpidem tartrate in microsamples of rat plasma. METHODS: Rats were given zolpidem tartrate solution 3 mg/kg intragastrically, and 0.2 ml blood sample were collected and isolated. 50 μl plasma was precipitated by methanol, and the supernatant was determined by HPLC-fluorescence combined with external method. Agilent HC-C<sub>18</sub> column was used with mobile phase consisted of 0.03 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution (containing 0.2% triethylamine)-methanol (33:67, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min. The excitation and emission wavelengths were 254 nm and 390 nm, respectively. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear ranges of zolpidem tartrate in plasma was 2-200 μg/L ( $r=0.9997$ ), and the limit of quantification was 2 μg/L. The method recoveries of zolpidem were (96.96±1.35)%-(105.0±5.36)% (RSD=2.20%-4.88%,  $n=5$ ), and extraction recoveries were (79.72±0.01)%-(80.77±0.02)% (RSD=1.34%-3.90%,  $n=5$ ). The intra-day and inter-day RSDs were 1.40%-5.10% and 3.22%-9.25% ( $n=5$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and suitable for the content determination of zolpidem tartrate in microsamples of plasma.

**KEYWORDS** HPLC; Zolpidem tartrate; Microsamples of plasma; Plasma concentration; Rat

唑吡坦(Zolpidem)为咪唑吡啶类催眠药,能选择性地与中枢神经系统γ-氨基丁酸A(GABA<sub>A</sub>)受体ω<sub>1</sub>亚型结合,具有较强的镇静、催眠作用,但抗惊厥、抗焦虑和肌肉松弛作用较弱。唑吡坦具有起效快、半衰期短的特点,不良反应轻微,临床主要用于短暂性、偶发性失眠症的治疗或慢性失眠症的短期治疗。

采用气相或液相色谱法测定生物样本中唑吡坦浓度国内外已有较多文献报道<sup>[1-3]</sup>。对于高效液相色谱法,采用荧光检测器比紫外检测器具有更高的灵敏度<sup>[2-3]</sup>。由于一般人体生物样本分析可采用0.5~1 ml,但对于小体型动物(如大鼠)需多次采血试验时,有必要考虑每次的采血量小于0.5 ml,因为采血量大会对动物体内的药物浓度产生影响,甚至导致动物死亡。对此,笔者建立了高效液相色谱-荧光法测定大鼠微量血浆中酒石酸唑吡坦含量的方法,结果表明,该方法快速、简便、灵敏度高,可用于体内药动学的研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HP-1100 高效液相色谱仪,包括 G1322A 脱气装置、G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1321A 荧光检测器、HP 化学工作站(美国 Agilent 公司);FA2004 电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:6 cm);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

酒石酸唑吡坦片[赛诺菲(杭州)制药有限公司,批号:2T066,规格:每片10 mg];酒石酸唑吡坦对照品(江苏豪森药业股份有限公司,批号:40246RS111019,纯度:99.5%);甲醇为色谱纯,磷酸二氢钾、三乙胺为分析纯,水为灭菌注射用水。

### 1.3 动物

[16] 张俊.自噬在肺缺血再灌注损伤中的作用及其机制研究[D].武汉:华中科技大学,2013.

Δ 基金项目:2013年浙江省医学会临床科研基金项目(No.2013ZYC-A68)

\* 副主任药师,硕士。研究方向:临床药学。E-mail: miaocy1979@163.com

[17] Lee SJ, Ryter SW, Xu JF, *et al.* Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45 (4):867.

(收稿日期:2015-09-14 修回日期:2015-11-09)

(编辑:邹丽娟)