

疏风解毒胶囊对干酵母致大鼠发热模型的解热作用

储小毛¹, 李泽庚^{2,3}, 高雅婷^{2,3}, 王新汝¹, 刘兰婷¹, 尤巧云¹, 张裕¹, 童佳兵^{2,3*}

(1. 安徽中医药大学研究生院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230012)

摘要: 目的 研究疏风解毒胶囊对干酵母致大鼠发热模型的解热作用。方法 将 SPF 级 SD 雄性大鼠适应性喂养 3 d 并测量肛温后, 筛选合格的大鼠随机分为正常组、模型组、布洛芬组 (72 mg/kg) 及疏风解毒胶囊低、中、高剂量组 (1.12、2.25、4.49 g/kg), 采取预防性给药方式, 连续灌胃 3 d, 正常组和模型组给予生理盐水灌胃。造模前禁食不禁水 6 h, 造模当天测量肛温 3 次, 取均值为基础体温, 灌胃给药 0.5 h 后, 皮下注射 20% 干酵母混悬液制备发热大鼠模型, 每间隔 1 h 测量肛温并记录, 造模第 5 小时测量肛温后再次灌胃给药, 造模第 8 小时测量肛温后, 麻醉大鼠并收集血清及下丘脑组织。ELISA 及生化法检测血清及下丘脑 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平, 血清 MIP-1 α 水平及下丘脑 NOS、NO 水平, Western blot 法检测下丘脑 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 及 COX2 蛋白表达, HE 染色观察下丘脑组织病理变化。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血清及下丘脑 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平, 血清 MIP-1 α 水平及下丘脑 NOS、NO 水平均升高 ($P < 0.01$), 下丘脑 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 及 COX2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 疏风解毒胶囊干预后, 上述指标均得到改善 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且中、高剂量效果更优。结论 疏风解毒胶囊有较好的解热作用, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B p65/COX2/PGE₂ 通路有关。

关键词: 疏风解毒胶囊; 解热作用; 干酵母; TLR4; NF- κ B p65

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1961-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.042

发热是临床上常见的症状之一, 可见于普通感冒、流行性感、肺炎等呼吸系统疾病, 是机体的保护性反应, 与机体的反应性密切相关^[1]。发热是由于外源性致热源等因素刺激机体产生和释放内生致热源, 直接作用于体温调控中心下丘脑, 调控中枢介质使体温调定点上移, 升高体温^[2]。疏风解毒胶囊是由湘西土家族名老中医楚贤祖传方剂“祛毒散”发展而成的中成药, 功能疏风清热、解毒利咽, 由虎杖、连翘、板蓝根、败酱草、马鞭草、柴胡、芦根、甘草组成, 以上 8 味药均具有清热解毒之功, 且该复方制剂临床常用于急性上呼吸道感染证见风热犯肺型的治疗, 退热效果好、安全性高^[3]。刘静等^[4]在酵母致热模型大鼠的实验中证实疏风解毒胶囊可通过调节 PGE₂、IL-1、IL-6 等细胞因子水平, 发挥解热作用, 但其解热机制仍需要进一步验证。本实验旨在探讨疏风解毒胶囊解热作用机制, 以期为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体质量 180~220 g, 均由杭州医学院提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (皖)

2019-0002, 动物饲养于安徽中医药大学实验动物中心。

1.2 试剂与药物 疏风解毒胶囊 (批号 Z20090047), 购自安徽济人药业股份有限公司; 布洛芬片 (批号 200509063), 购自天方药业有限公司。大鼠白细胞介素 1 β (IL-1 β)、大鼠白细胞介素 6 (IL-6)、巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 酶联免疫分析试剂盒 (货号 JYM0419Ra、JYM0646Ra、JYM0670Ra、JYM0446Ra、JYM0635Ra), 均购自武汉基因美生物科技有限公司; 一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS) 测定试剂盒 (批号 20210525、20210513), 均购自南京建成生物工程研究所; RIPA 细胞裂解液 (强) (批号 09271919023), 购自上海碧云天生物技术有限公司; TLR4、I κ B α 、COX2 抗体 (批号 AG05125500、AG02243250、A112036357), 均购自北京博奥森生物技术有限公司; NF- κ B p65 抗体 (批号 GR3236344-1), 均购自英国 Abcam 公司。安琪高活性干酵母, 购自安琪酵母股份有限公司。

1.3 仪器 RT-6000 酶标仪, 购自深圳雷杜生命科学股份

收稿日期: 2021-07-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81874431); 中国中医药循证医学中心流感循证能力建设项目 (2019XZZX-LG001); 安徽省教育厅重点项目 (KJ2019A0468)

作者简介: 储小毛 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中医药防治呼吸系统疾病。Tel: 15256549294, E-mail: 2420763409@qq.com

* 通信作者: 童佳兵 (1975—), 男, 博士, 主任医师, 研究方向为中医药防治呼吸系统疾病。Tel: 13063495956, E-mail: tjbahzy@sina.com

有限公司; UV-1800 紫外可见分光光度计, 购自上海菁华科技仪器有限公司; JW3021HR 离心机, 购自安徽嘉文仪器装备有限公司; GL-88B 漩涡混合器, 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; DNP-9052BS-III 电热恒温箱, 购自上海三发科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组及给药 适应性喂养大鼠 3 d, 每天用电子数字体温计测量 2 次大鼠肛温, 使大鼠适应肛温测量操作; 选择体温在 36~38.4 °C, 且变化不超过 0.4 °C 的大鼠供实验用。大鼠随机分为正常组、模型组、布洛芬组 (72 mg/kg) 及疏风解毒胶囊低、中、高剂量组 (1.12、2.25、4.49 g/kg), 每组 10 只。采取预防给药方式, 第 4 天各给药组按 10 mL/kg 灌胃给药, 正常组、模型组同法给予等容量生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 3 d。实验当天禁食不禁水 6 h 后测量肛温 3 次, 取均值为基础体温。灌胃给药 0.5 h 后开始造模, 模型组和各给药组大鼠皮下注射 10 mL/kg 20% 干酵母混悬液 (由生理盐水配制), 正常组皮下注射等容量生理盐水。每间隔 1 h 测量肛温 1 次, 记录数据, 并于造模 5 h 后再次灌胃给药, 造模 8 h 后测量肛温后采集标本。

2.2 标本采集 最后 1 次测量肛温后, 大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (0.1 mL/kg) 进行麻醉, 腹主动脉取血, 37 °C 静置 1 h, 3 500 r/min 离心 10 min 得血清。随后迅速取出全脑, 冰浴下取大鼠下丘脑, 分别于 -80 °C 冰箱及 10% 甲醛固定液中保存备用。

2.3 ELISA 检测血清及下丘脑中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平 取“2.2”项下血清及 -80 °C 保存的下丘脑组

织, 依次按标准品稀释、加样、温浴洗涤、显色终止的步骤进行操作, 以标准品孔为实验参照, 使用酶标仪在 450 nm 波长处检测各样品孔的吸光度值, 计算 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平。

2.4 Western blot 检测下丘脑中 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 、COX2 蛋白表达 取“2.2”项下 -80 °C 保存的下丘脑组织样本, 裂解后于 12 000 r/min 条件下离心并收集上清, 提取总蛋白, 随后进行电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育, 使用 ECL 发光试剂盒进行显影, 通过分析条带灰度值计算 TLR4、NF- κ B p65、I κ B α 、COX2 蛋白相对表达。

2.5 HE 染色观察下丘脑组织病理形态 取“2.2”项下 10% 甲醛固定液中保存的下丘脑组织样本, 常规石蜡包埋切片, 经脱蜡、苏木素染细胞核、伊红染细胞质、脱水封片后在光学显微镜下观察。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 23.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠体温的影响 如表 1 所示, 与正常组比较, 模型组大鼠造模后 6、7、8 h 体温升高 (P<0.01), 表明造模成功; 与模型组比较, 布洛芬组大鼠造模后 6、7、8 h 体温均降低 (P<0.01), 疏风解毒胶囊低剂量组大鼠造模后 7、8 h 体温有降低, 但差异无统计学意义 (P>0.05), 疏风解毒胶囊中、高剂量组大鼠造模后 7、8 h 体温均降低, (P<0.01)。结果表明, 疏风解毒胶囊具有一定的解热作用。

表 1 疏风解毒胶囊对发热大鼠体温的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	基础体温/°C	造模后不同时间点大鼠体温/°C		
		6 h	7 h	8 h
正常组	37.17 $\pm$ 0.60	37.26 $\pm$ 0.55	37.20 $\pm$ 0.44	37.24 $\pm$ 0.49
模型组	37.15 $\pm$ 0.50	38.68 $\pm$ 0.18 ^{##}	39.79 $\pm$ 0.18 ^{##}	39.62 $\pm$ 0.26 ^{##}
布洛芬组	37.42 $\pm$ 0.44	37.52 $\pm$ 0.45 ^{**}	37.50 $\pm$ 0.28 ^{**}	37.65 $\pm$ 0.30 ^{**}
疏风解毒胶囊低剂量组	37.30 $\pm$ 0.60	39.12 $\pm$ 0.24 [*]	39.46 $\pm$ 0.15	39.16 $\pm$ 0.28 [*]
疏风解毒胶囊中剂量组	37.16 $\pm$ 0.65	38.97 $\pm$ 0.26	39.18 $\pm$ 0.16 ^{**}	38.57 $\pm$ 0.24 ^{**}
疏风解毒胶囊高剂量组	37.34 $\pm$ 0.69	38.83 $\pm$ 0.23	38.76 $\pm$ 0.22 ^{**}	38.19 $\pm$ 0.23 ^{**}

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

3.2 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠下丘脑组织病理变化的影响 正常组大鼠下丘脑神经元呈圆形, 胞浆染色均匀, 细胞核呈圆形, 位于细胞中央, 神经胶质细胞较神经元体积小, 核染色质较深, 少量神经元胞浆出现空泡; 模型组大鼠下丘脑神经元出现核固缩, 胞质呈深伊红色, 部分神经元胞浆出现空泡、水肿, 细胞外间隙增大, 可见炎性细胞浸润及小胶质细胞聚集; 与模型组比较, 布洛芬组和疏风解毒胶囊各剂量组大鼠下丘脑神经元空泡变性、核固缩程度浅, 可见少量的炎性细胞浸润, 见图 1。

3.3 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠血清及下丘脑 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清和下丘脑中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平升高 (P<0.01); 与模型组比较, 布洛芬组和疏风解毒胶

囊各剂量组大鼠血清和下丘脑中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂ 水平均降低 (P<0.01)。结果表明, 疏风解毒胶囊能抑制致热性细胞因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的生成, 进而抑制炎症因子 PGE₂ 的生成, 见表 2。

3.4 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠血清 MIP-1 α 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 MIP-1 α 水平升高 (P<0.01); 与模型组比较, 布洛芬组和疏风解毒胶囊各剂量组大鼠血清中 MIP-1 α 水平均降低 (P<0.01)。结果表明, 疏风解毒胶囊能抑制大鼠血清中 MIP-1 α 水平, 且呈剂量依赖性, 见图 2。

3.5 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠下丘脑 NOS、NO 水平的影响 与正常组比较, 模型组大鼠下丘脑中 NOS、NO 水平升高 (P<0.01); 与模型组比较, 布洛芬组和疏风

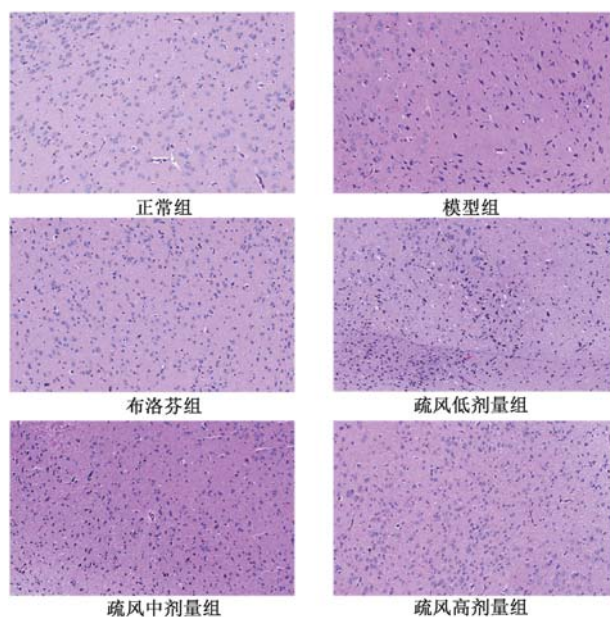
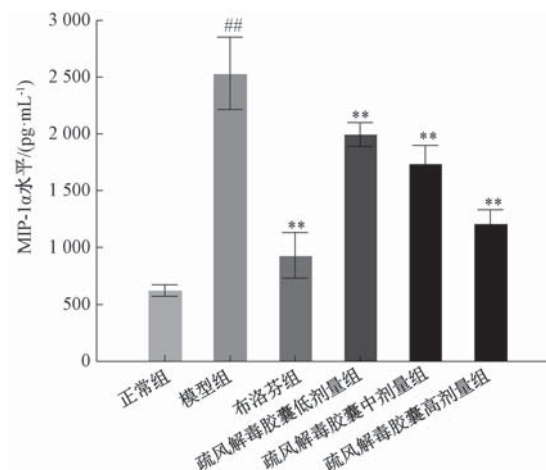


图1 各组大鼠下丘脑组织病理变化 (HE, ×200)



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

图2 各组大鼠血清 MIP-1α 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

解毒胶囊中、高剂量组大鼠下丘脑中 NOS、NO 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 疏风解毒胶囊低剂量组大鼠下丘脑中

表2 疏风解毒胶囊对发热大鼠血清及下丘脑 IL-1β、IL-6、TNF-α、PGE₂ 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)		IL-6/(pg·mL ⁻¹)		TNF-α/(pg·mL ⁻¹)		PGE ₂ /(pg·mL ⁻¹)	
	血清	下丘脑	血清	下丘脑	血清	下丘脑	血清	下丘脑
正常组	21.58±2.60	21.32±7.62	25.83±5.37	34.61±8.64	45.63±11.20	42.59±14.78	16.04±6.03	13.35±2.59
模型组	91.51±11.79 ^{##}	111.11±22.86 ^{##}	193.81±22.19 ^{##}	155.52±42.38 ^{##}	326.82±62.52 ^{##}	308.89±70.84 ^{##}	97.84±19.92 ^{##}	112.23±8.30 ^{##}
布洛芬组	33.39±2.56 ^{**}	32.38±4.59 ^{**}	54.20±3.56 ^{**}	55.67±4.73 ^{**}	95.70±10.88	99.40±19.58	26.69±11.14 ^{**}	28.67±3.77 ^{**}
疏风解毒胶囊低剂量组	63.68±3.28 ^{**}	60.82±3.38 ^{**}	108.38±5.92 ^{**}	109.93±15.13 ^{**}	194.42±20.44 ^{**}	192.44±32.98 ^{**}	56.52±3.47 ^{**}	72.65±2.23 ^{**}
疏风解毒胶囊中剂量组	52.56±3.22 ^{**}	51.05±2.26 ^{**}	91.64±7.94 ^{**}	86.66±5.59 ^{**}	189.64±18.03 ^{**}	169.14±13.10 ^{**}	51.24±4.99 ^{**}	57.61±3.05 ^{**}
疏风解毒胶囊高剂量组	48.55±3.24 ^{**}	62.21±3.05 ^{**}	62.41±6.36 ^{**}	70.29±9.03 ^{**}	138.34±16.24 ^{**}	125.91±13.49 ^{**}	48.55±3.24 ^{**}	46.14±1.42 ^{**}

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

NOS、NO 水平也有下降趋势,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结果表明,疏风解毒胶囊能抑制干酵母致发热大鼠下丘脑 NOS、NO 水平,且呈剂量依赖性,见表3。

表3 疏风解毒胶囊对发热大鼠下丘脑 NOS、NO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	NOS/(pg·mL ⁻¹)	NO/(pg·mL ⁻¹)
正常组	1.17±0.24	1.18±0.14
模型组	2.79±0.73 ^{##}	2.52±0.69 ^{##}
布洛芬组	1.45±0.18 ^{**}	1.23±0.10 ^{**}
疏风解毒胶囊低剂量组	2.43±0.31	2.29±0.32
疏风解毒胶囊中剂量组	1.96±0.39 ^{**}	2.08±0.41 [*]
疏风解毒胶囊高剂量组	1.93±0.30 ^{**}	1.70±0.29 ^{**}

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

表4 疏风解毒胶囊对发热大鼠下丘脑 TLR4、NF-κB p65、IκBα、COX2 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

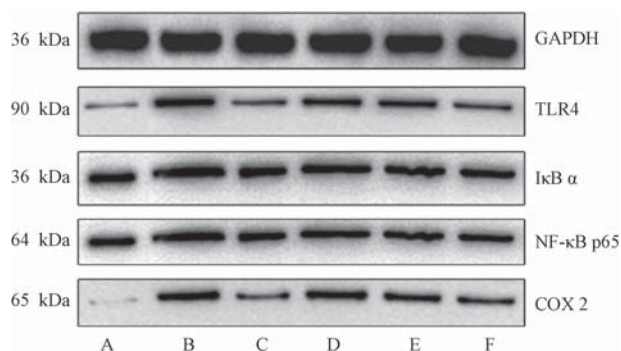
组别	TLR4	NF-κB p65	IκBα	COX-2
正常组	0.16±0.07	0.08±0.01	0.28±0.031	0.07±0.02
模型组	0.57±0.09 ^{##}	0.65±0.04 ^{##}	0.81±0.06 ^{##}	0.43±0.03 ^{##}
布洛芬组	0.22±0.03 ^{**}	0.19±0.02 ^{**}	0.44±0.02 ^{**}	0.14±0.02 ^{**}
疏风解毒胶囊低剂量组	0.46±0.05 [*]	0.56±0.08	0.68±0.03 [*]	0.33±0.04 ^{**}
疏风解毒胶囊中剂量组	0.32±0.03 ^{**}	0.42±0.08 [*]	0.59±0.03 ^{**}	0.28±0.01 ^{**}
疏风解毒胶囊高剂量组	0.28±0.03 ^{**}	0.25±0.07 ^{**}	0.50±0.03 ^{**}	0.25±0.01 ^{**}

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

3.6 疏风解毒胶囊对干酵母致发热大鼠下丘脑 TLR4、NF-κB p65、IκBα、COX2 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠下丘脑中 TLR4、NF-κB p65、IκBα、COX2 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,布洛芬组和疏风解毒各剂量组大鼠下丘脑中 TLR4、NF-κB p65、IκBα、COX2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结果表明,疏风解毒胶囊能抑制干酵母致发热大鼠下丘脑中 TLR4、NF-κB p65、IκBα 及 COX2 蛋白表达,且呈剂量依赖性,见表4、图3。

4 讨论

发热可见于诸多疾病,是临床常见症状之一。目前制备动物发热模型的方法有很多种,如大鼠皮下注射脂多糖、2,4-二硝基苯酚诱导大鼠发热,大鼠皮下注射干酵母混悬液,大鼠细菌滴鼻,家兔耳缘静脉注射速尿,



注：A~F 分别为正常组、模型组、布洛芬组和疏风解毒胶囊低、中、高剂量组。

图 3 各组大鼠下丘脑 TLR4、NF-κB p65、IκBα、COX2 蛋白表达

大鼠饮食失节，大鼠游泳实验联合腹腔注射脂多糖等^[5-9]。有研究表明，皮下注射干酵母致大鼠发热模型中，大鼠的体温表现为先下降后上升，于造模后 7 h 达到高温平台期后持续相当长时间，这与中医学上的卫表证及气分热证病理机制相符合，且全身炎症反应及临床表现与里热证类似，因此酵母致大鼠发热模型常用于考察清热类中药的解热作用^[10-11]。

发热由发热激活物（本文中为酵母）作用于血液中白细胞（中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及单核巨噬细胞）、内皮细胞及肿瘤细胞等释放内生致热原，后者进一步作用于体温调节中枢下丘脑，引起发热中枢介质的释放，使体温失衡^[2]。目前已经证实 IL-1β、TNF-α、IL-6 是重要的内生致热原，可直接或间接引起发热中枢介质 PGE₂ 的释放，升高体温^[12-13]。发热过程涉及的主要通路有 EP3 信号转导通路、Toll 样信号通路及特征性感染反应信号通路，PGE₂ 的释放增加是上述通路发生的关键环节，其中 Toll 样信号通路是通过内源性致热原刺激引起 TLR4 受体活化，使 TLR4 影响巨噬细胞和其他免疫细胞的变化导致核因子 κB（NF-κB）表达升高，进而使 COX2 的合成增加，使 PGE₂ 释放增多，导致发热^[14-15]。

MIP-1α 是趋化因子亚家族成员之一，通过与受体的结合干扰 TLR4、NF-κB 信号转导系统，参与机体的炎症损伤，促进 IL-6 等释放^[16]。NOS 高表达可在炎症反应过程中催化机体合成大量 NO，进一步导致 IκBα 表达增加，进而抑制 NF-κB 通路上介导的 COX2 活性^[17-18]。NF-κB 是调控免疫炎症相关基因的重要转录因子，当细胞受外界炎症因子刺激后，NF-κB 的抑制蛋白（IκBα）可发生磷酸化并降解，使 NF-κB 活化并入核，诱导相关炎症基因的表达导致发热^[19]。有研究表明，干酵母皮下注射引起大鼠发热后可激活 NF-κB p65 并入核起到转录作用，促进下丘脑 COX2 mRNA 表达增加^[20]。

本实验结果表明，在造模 8 h 后模型组大鼠体温，血清及下丘脑中 IL-1β、TNF-α、IL-6 及 PGE₂ 水平均升高；进一步实验结果表明，疏风解毒胶囊抑制干酵母致发热大鼠

血清中 MIP-1α 水平，下丘脑 NOS、NO 水平，下丘脑 TLR4、NF-κB p65、IκBα 及 COX2 蛋白表达，且呈剂量依赖性。

综上所述，疏风解毒胶囊能降低酵母致热模型大鼠体温，其机制可能与抑制 MIP-1α/TLR4/NF-κB p65/COX2/PGE₂ 通路有关。

参考文献：

- [1] 朱沁泉, 陈 创, 刘微艳, 等. 荆防汤对于酵母所致发热大鼠体温影响的比较研究[J]. 内蒙古中医药, 2016, 35(15): 146-147.
- [2] Ogoina D. Fever, fever patterns and diseases called 'fever' — a review[J]. *J Infect Public Health*, 2011, 4(3): 108-124.
- [3] 张铁军, 朱 强, 许 凌, 等. 疏风解毒胶囊二次开发的系统研究[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3517-3525.
- [4] 刘 静, 马 莉, 陆 洁, 等. 疏风解毒胶囊解热作用机制研究[J]. 中草药, 2016, 47(12): 2040-2043.
- [5] 王 翰, 杨 薇, 吴 瑕, 等. 内毒素缓释大鼠的持续发热模型研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(2): 129-132.
- [6] 吴忠泽. 中医汗法的理论解构及实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [7] 刘进娜, 谢 鸣. 补中益气汤及其不同配伍对脾虚发热模型的退热作用比较[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(6): 1814-1818.
- [8] 赵先锋. 甘寒攻下法治疗家兔土燥水竭证的实验研究[D]. 福州: 福建中医学院, 2004.
- [9] 刘微艳, 陈 创, 张 涤, 等. 发热动物模型的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(8): 214-216.
- [10] Zhang F S, Wang D Q, Li X W, et al. Metabolomic study of the fever model induced by baker's yeast and the antipyretic effects of aspirin in rats using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 81-82: 168-177.
- [11] 吴丽丽. 张氏石膏粳米汤对于酵母致热大鼠解热机制研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [12] 庞淑婉, 李 宏, 穆 轶, 等. 清热消炎颗粒解热作用及对血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 和 PGE₂ 影响的初步研究[J]. 天津医科大学学报, 2015, 21(6): 488-490.
- [13] 李 洁, 杨 萍, 李绍强, 等. 复方柴芩退热颗粒对发热大鼠模型退热作用的研究[J]. 新中医, 2017, 49(10): 20-24.
- [14] 孙晓芹. 柴胡皂苷 A 降温作用与 AC、cAMP、PKA、NF-κB 关系的实验研究[D]. 沈阳: 沈阳医学院, 2018.
- [15] 满晓华, 李兆申, 屠振兴, 等. 大黄素对急性胰腺炎大鼠胰腺核因子-κB 活化的影响[J]. 中华消化杂志, 2005, 25(10): 586-589.
- [16] Ahmad R, Akhter N, Al-Roub A, et al. MIP-1α induction by palmitate in the human monocytic cells implicates TLR4 signaling mechanism[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2019, 52(2): 212-224.
- [17] 宋洋洋, 任 弋, 季 晖, 等. 发热的分子机制研究进展

- [J]. 药学研究, 2017, 36(2): 99-103.
- [18] 李 红, 张 艳, 于宜平, 等. 大黄解热作用与降低血浆一氧化氮作用的 PK-PD 研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1231-1236.
- [19] Charalambous M, Lightfoot T, Speirs V, et al. Expression of COX-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 and IKK α in malignant and adjacent normal human colorectal tissue [J]. *Br J Cancer*, 2009, 101(1): 106-115.
- [20] 周 蓓, 陈誉丹, 冯莉婷, 等. 石膏粳米汤对干酵母致热大鼠解热抗炎及核因子- κ Bp65、环氧合酶-2 表达的影响 [J]. 科学技术与工程, 2018, 18(26): 165-170.

委陵菜酸调控 PI3K/Akt/mTOR 通路对肝星状细胞活化增殖的影响

李 艳¹, 张晓琳¹, 韦园园¹, 温淑娟¹, 林 兴¹, 黄权芳^{2*}

(1. 广西医科大学, 广西南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023)

摘要:目的 探讨委陵菜酸对人肝星状细胞 (LX-2) 细胞增殖、活化以及对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响, 分析其抗肝纤维化的作用机制。方法 用人血小板衍生生长因子-BB (PDGF-BB) 刺激 LX-2 构建细胞模型。试剂盒检测细胞中 LDH 水平, MTT 法检测 LX-2 细胞增殖, 细胞划痕和集落生成实验观察 LX-2 细胞迁移和增殖情况, RT-qPCR 检测 Col-I、Col-III mRNA 表达, Western blot 检测 Col-I、PI3K、AKT、mTOR 等信号通路相关蛋白表达。结果 与正常组比较, PDGF-BB 促进 LX-2 细胞增殖, 增加 Col-I mRNA 和蛋白表达, 提高 PI3K、Akt、p70S6K、mTOR 蛋白的磷酸化水平; 与刺激组比较, 委陵菜酸和 LY294002 均能抑制细胞增殖和迁移, 减少 Col-I 蛋白表达、降低 Col-I 和 Col-III mRNA 表达, 抑制细胞内 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的磷酸化水平。结论 委陵菜酸能抑制 LX-2 细胞的活化、增殖, 减少纤维化胶原的表达, 其机制可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

关键词: 委陵菜酸; 人肝星状细胞 (LX-2); PI3K/Akt/mTOR 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1965-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.043

肝纤维化是肝脏对各种慢性刺激进行的损伤修复反应, 也是以胶原为主的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在肝内大量沉积的病理过程^[1-2]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 是 ECM 的主要来源, 在肝纤维化的发展进程中发挥着关键的作用^[3]。活化的 HSCs 可通过在肝损伤部位移行、增殖, 表达各种信号传导蛋白, 并产生大量细胞因子和以胶原为主的细胞外基质成分, 是肝纤维化形成的始动环节^[4]。PI3K/Akt/mTOR 通路是参与肝纤维化发生发展的重要信号传导通路之一^[5], 可调节 HSCs 增殖、活化和凋亡, 是目前治疗肝纤维化较有效的干预靶点^[3]。

中药具有多成分、多环节、多靶点的作用特点, 对病理复杂的肝纤维化可发挥综合优势^[6]。委陵菜是蔷薇科植物委陵菜 *Potentilla chinensis* Ser. 的全草, 在前期对委陵菜进行化学成分提取、分离及其活性成分筛选研究中, 得到委陵菜酸, 并在 LPS/D-GalN 诱导的小鼠肝损伤模型中发现, 委陵菜酸可降低炎症相关因子的表达, 抑制 NF- κ B 活性, 减轻肝组织病理的损伤程度^[7]。本研究以 PI3K/Akt/mTOR 信号通路为切入点, 探讨委陵菜酸对血小板衍生因

子-BB (platelet derived growth factor-BB, PDGF-BB) 诱导活化的肝星状细胞 LX-2 的抗纤维化作用机制, 为其治疗肝纤维化提供依据。

1 材料

1.1 细胞 人肝星状细胞株 LX-2 购自上海美轩生物科技有限公司。

1.2 试剂与药物 人 PDGF-BB (美国 PeproTech 公司, 批号 0507CY420); PI3K 抑制剂 LY294002 (美国 Medchemexpress 公司); DMEM 高糖培养基 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (澳大利亚 AusGeneX 公司); 兔抗 Collagen-I 多克隆抗体、鼠抗 PI3K 多克隆抗体、兔抗 mTOR 多克隆抗体 (美国 Proterntech 公司); 兔抗磷酸化 PI3K 多克隆抗体 (美国 Signalway Antibody 公司, 批号 5602); 兔抗 Akt 多克隆抗体、兔抗磷酸化 Akt 多克隆抗体、兔抗磷酸化 mTOR 多克隆抗体、兔抗 P70S6K 多克隆抗体、兔抗磷酸化 P70S6K 多克隆抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); PCR 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); BCA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); Western 转膜液、封闭液

收稿日期: 2020-09-03

基金项目: 国家自然科学基金 (81660686)

作者简介: 李 艳 (1994—), 女, 硕士生, 从事肝纤维化研究。Tel: (0771) 5358129, E-mail: liyan260@163.com

*通信作者: 黄权芳 (1973—), 女, 硕士, 主任药师, 从事中药靶向治疗肝脏疾病研究。E-mail: hqf00@126.com