

通解口服液对 MODS 模型大鼠回肠 PPAR- γ 、AP-1、NF- κ B 表达的影响

沈宇清 贾典荣 曹云 顾志林

(南京中医药大学附属姜堰中医院, 江苏姜堰 225500)

摘要 目的: 观察通解口服液对多器官功能障碍综合征 (MODS) 模型大鼠回肠过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR- γ)、激活蛋白-1 (AP-1)、核转录因子 κ B (NF- κ B) 表达的影响。方法: 大鼠随机分为 6 组, 即空白对照组、模型组、阳性药物组 (氨苄西林组) 和通解口服液低、中、高剂量组, 分别给予药物或生理盐水灌胃 5 次。最后 1 次给药后立即静脉注射 8mg/kg 脂多糖 (LPS) 复制 MODS 大鼠模型, 6h 后麻醉, 免疫组化法检测回肠 PPAR- γ 、AP-1、NF- κ B 蛋白表达水平。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠回肠 PPAR- γ 表达显著降低, AP-1 表达显著升高。通解口服液各剂量可显著降低 MODS 模型大鼠回肠 NF- κ B、AP-1 的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 中、高剂量可显著增加回肠 PPAR- γ 的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 通解口服液对 MODS 大鼠炎症反应具有明显的抑制作用, 其对回肠 PPAR- γ 、NF- κ B 和 AP-1 蛋白表达的调控是其缓解 MODS 胃肠损伤的机制之一。

关键词 通解口服液 MODS 大鼠 回肠 PPAR- γ AP-1 NF- κ B 病理学**中图分类号** R590.5**文献标识码** A**文章编号** 1672-397X(2015)04-0078-04

多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 是目前创伤、感染、休克等疾病最重要的死亡原因, 目前医学界普遍认为胃肠道是 MODS 发病过程中受累较早的器官, 胃肠黏膜缺血炎症反应是其重要的病理机制之一。近年有研究报道过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR- γ) 是调节缺血炎症反应的重要作用靶点, 而中药通过干预炎症反应的各个环节发挥着胃肠功能的保护作用。本院研发的通解口服液具有通里攻下、活血化瘀等作用, 临床发现其对 MODS 患者急性胃肠损伤有防治作用^[1]。为进一步研究通解口服液防治 MODS 急性胃肠损伤的机理, 本实验通过建立 MODS 大鼠模型, 观察通解口服液对 MODS 模型大鼠回肠组织 PPAR- γ 、激活蛋白-1 (AP-1)、核转录因子 κ B (NF- κ B) 表达的影响, 探索 MODS 新的防治途径。

1 实验材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性大鼠 48 只, 体重 (190 $\pm$ 20)g, 由浙江省实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (浙)2008-0033。

1.2 药物 通解口服液 (处方: 大黄、蒲黄、败酱草、枳实、茜草各等份, 药物浓度 0.85g/mL) 由泰州市姜

堰中医院药剂科提供, 批号: 20130917, 250mL/瓶。氨苄西林 (珠海联邦制药股份有限公司中山分公司), 0.25g/粒, 批号: 30100304, 以蒸馏水配成药液。兔抗鼠 AP-1 抗体 (aN-20), 美国 Santa Cruz 公司, 批号: sc-12629; 兔抗鼠 NF- κ B p65 抗体, 武汉博士德生物工程有限公司, 批号: bs-0465R; 兔抗鼠 PPAR- γ 抗体, 武汉博士德生物工程有限公司, 批号: bs-0530R; 总蛋白试剂盒, 中生北控生物科技股份有限公司, 批号: 20131117。

1.3 仪器 MP100 型 16 导生理记录仪及其附件, 美国 BIOPAC 公司; Synergy HT 型紫外荧光酶标仪, 美国 Biotek 公司; Olympus 光学显微镜; 瑞典产 LKB-V 超薄切片机; H-600 日立型透射电镜; S-450 型日立扫描电镜; HH 数显恒温水浴锅, 江苏金坛金城国胜实验仪器厂; ALC-MPA2000m 型 4 导生理记录仪及其附件, 上海奥尔科特仪器公司; R-911 型全自动放免计数仪, 中国药科大学实业总公司; 7160 型日本日立全自动生化分析仪。

2 实验方法

2.1 分组与给药 SD 雄性大鼠随机分为 6 组: 空白对照组、模型组 (生理盐水 0.018g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹)、阳性

基金项目: 江苏省中医药局科技项目 (LZ13209)

药物组(氨苄西林 $0.4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和通解口服液低($8.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、中($17\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、高($34\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)剂量组,各组间体重无显著性差异。预先分别灌胃生理盐水或药物,连续给药 2d,每日 2 次,最后一次灌胃给药 48h 后开始禁食不禁水,禁食 12h 后再灌胃给药 1 次后造模。

2.2 造模 给药后腹腔注射 10%水合氯醛(3.0mL/kg)麻醉,舌下静脉注射脂多糖(LPS) 8mg/kg 复制 MODS 急性胃肠损伤大鼠模型^[2]。符合临床实际的 MODS 实验模型应具备的标准是:(1)损伤因素与临床 MODS 常见诱因基本一致;(2)发病在致伤 24h 以后;(3)有 SIRS 的临床表现;(4)有 2 个以上器官或系统的功能障碍;(5)有足够的发病率和死亡率。实验动物 MODS 的诊断依据与人类基本一致,即:诱因+SIRS+多器官功能障碍^[3]。我们实验中大鼠出现生命体征变化,严重肝肾功能损伤,符合 MODS 诊断^[4]。

2.3 指标检测 免疫组化法对回肠进行 PPAR- γ 、AP-1、NF- κ B 蛋白表达检测,建模 6h 后,各组大鼠麻醉后予脱颈处死,迅速取出回肠沿系膜缘剖开,去除内容物,PBS 液漂洗,取上段回肠置于 4%多聚甲醛固定,固定后的组织在 PBS 中漂洗 $5\text{min}\times 3$ 次,上行脱水,将组织块放入二甲苯中 $5\sim 30\text{min}$,石蜡包埋,用石蜡切片机切片,厚度为 $5\mu\text{m}$,进行免疫组化染色,显微镜下胞浆呈棕黄色颗粒视为阳性表达。每组取 8 个标本检测,应用 Image-ProPlus6.0 分析软件,每个标本选取肌层区域,计算所选区域的面积(area)和所选区域内免疫组化阳性信号总的灰度值的乘积,最后以每组均值进行比较。

2.4 统计学方法 使用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,采用 t 检验。 $P<0.05$, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

与空白对照组比较,模型组大鼠回肠组织 PPAR- γ 表达显著降低($P<0.01$),AP-1 表达显著升高($P<0.01$),NF- κ B 也

表现增加趋势。与模型组比较,通解口服液低剂量组与阳性药物组大鼠 PPAR- γ 的改变不明显($P>0.05$),通解口服液中、高剂量可显著增加模型大鼠 PPAR- γ 的表达($P<0.05$, $P<0.01$);各给药组均可明显降低 AP-1、NF- κ B 的表达($P<0.05$, $P<0.01$)。与阳性药物组比较,通解口服液中、高剂量对于上述指标的改善更具优势($P<0.05$, $P<0.01$)。通解口服液各剂量组间比较,体现出一定的量效关系。见表 1。

空白对照组大鼠回肠组织可见 PPAR- γ 阳性(呈棕黄色)表达,模型组、阳性药物组、通解口服液低剂量组大鼠 PPAR- γ 表达不显(呈浅黄色),通解口服液中剂量组大鼠 PPAR- γ 表达明显(呈深黄色),高剂量组可见 PPAR- γ 阳性(呈棕黄色)表达。见图 1。

空白对照组大鼠回肠组织未见 AP-1 阳性表达,模型组大鼠见 AP-1 阳性表达(呈棕黄色),阳性药物组和通解口服液低、中剂量组大鼠 AP-1 表达不明显(呈浅黄色),通解口服液高剂量组大鼠回肠组织未见 AP-1 阳性表达。见图 2。

空白对照组大鼠回肠组织未见 NF- κ B 阳性表达,模型组大鼠见 NF- κ B 阳性表达(呈棕黄色);阳

表 1 各组大鼠回肠组织 PPAR- γ 、AP-1、NF- κ B 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	剂量 (mg/kg)	PPAR- γ	AP-1	NF- κ B
空白对照组	8	—	$2.50\pm 0.53^{**}$	$0.94\pm 0.18^{**}$	1.31 ± 0.59
模型组	8	—	1.63 ± 0.52	2.00 ± 0.53	2.00 ± 0.76
阳性药物组	8	0.4	1.63 ± 0.74	$1.06\pm 0.42^{**}$	$1.25\pm 0.46^{*}$
通解口服液低剂量组	8	8.5	1.75 ± 0.71	$1.50\pm 0.53^{*}$	$1.13\pm 0.58^{*}$
通解口服液中剂量组	8	17	$2.25\pm 0.71^{*\Delta}$	$0.94\pm 0.56^{**\Delta\Delta}$	$0.81\pm 0.26^{**\Delta\Delta}$
通解口服液高剂量组	8	34	$2.50\pm 0.53^{**\Delta\Delta\Delta}$	$0.88\pm 0.52^{**\Delta\Delta\Delta}$	$0.69\pm 0.26^{**\Delta\Delta\Delta}$

注:与模型组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与阳性药物组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与通解口服液低剂量组比较, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

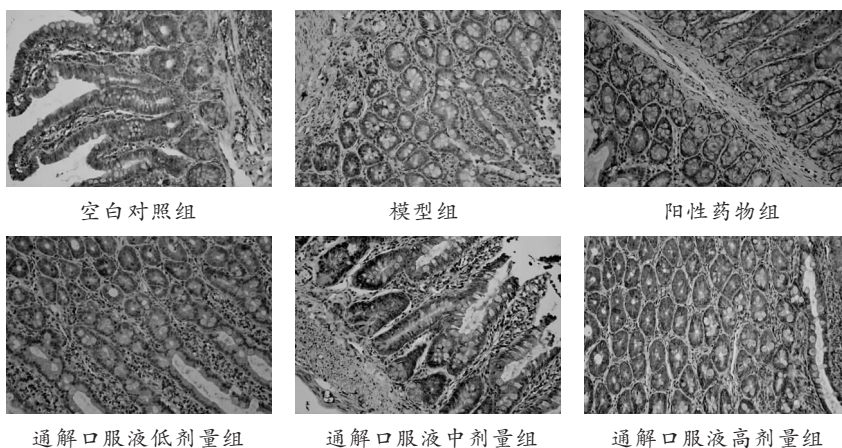


图 1 各组大鼠回肠组织 PPAR- γ 表达的病理图片(HE, $\times 400$)

性药物组和通解口服液低、中剂量组大鼠 NF- κ B 阳性表达不明显(呈浅黄色),通解口服液高剂量组大鼠回肠组织未见 NF- κ B 阳性表达。见图 3。

4 讨论

MODS 是指机体遭受严重急性损伤后,由于失控的全身炎症反应,使机体在短时间内(>24h)同时或序贯出现两个或两个以上系统器官功能障碍的临床综合征,而医学界普遍认为胃肠道是促发 MODS 的始动器官和靶部位。胃肠功能状态被认为是判断危重病人预后的一项重要指标。胃肠运动功能的恢复有助于有效阻断 MODS 的进一步发展。目前针对 MODS 胃肠功能损伤尚无特效药,临床上主要采用肠内营养、抑酸、改善肠动力等治疗,但疗效并不理想,因此采用中医药干预成为当前研究的热点。我们既往研究发现,通瘀解毒法有助于改善 MODS 患者胃肠功能,因此设计本实验做一次机理探索。

PPAR- γ 是一类依赖配体激活的核转录因子,参与许多生理反应的调节,其生物学功能复杂多样,包括调控脂肪和糖代谢、脂肪细胞终末分化、抗肝纤维化作用,减轻细胞氧化应激损伤,保护脏器功能等。近年来研究发现,PPAR- γ 及其激动剂在抗缺血再灌注损伤方面起着重要作用,是细胞炎症及缺血反应的重要调节因子^[9]。PPAR- γ 被其天然与合成配体激活后,可抑制炎症细胞因子白介素-1(IL-1)、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的分泌,抑制黏附因子 ICAM-1 及 P-选择素、E-选择素等的表达,同时也能减少诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,从而发挥抑制炎症反应、改善血管内皮功能的作用。上述炎症因子的表达均依赖于转录因子:激活蛋白-1(AP-1)、核转录因子 κ B(NF- κ B)的活性而发挥作用,而活化的 PPAR- γ 可以抑制二者的活性。临床研究表明,MODS 患者 PPAR- γ 活性明显下调^[6]。脓毒血症及肠炎患者体内 PPAR- γ 表达减少,IL-1、IL-6 及 TNF- α 表达水平较高^[7-8],特别是 MODS

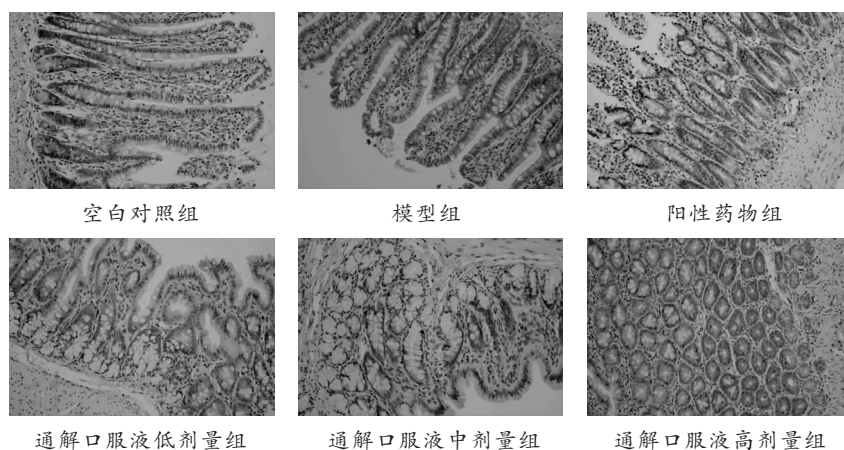


图2 各组大鼠回肠组织 AP-1 表达的病理图片(HE, $\times 400$)

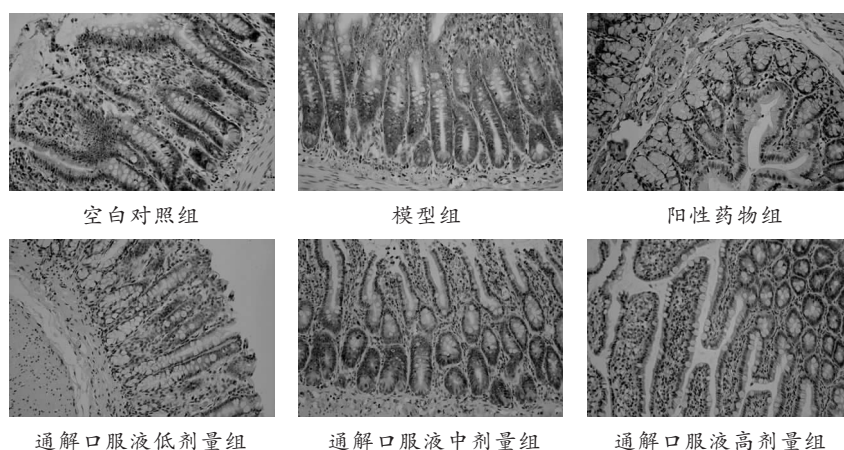


图3 各组大鼠回肠组织 NF- κ B 表达的病理图片(HE, $\times 400$)

患者。因此上调 PPAR- γ 的表达在 MODS 急性胃肠损伤的防治中有重要的意义。

我们经过长期临床观察,发现 MODS 起病急骤,病情重笃,发生变证时多有毒,伤血动血败血甚者必有毒,病情顽固缠绵者常蕴毒,症见秽浊者则有毒。MODS 的临床特点和病理演变符合中医学“毒”的特性,而急性胃肠功能损伤则是“热从毒化,变从毒起,瘀从毒结”的结果之一。我们抓住 MODS 急性胃肠损伤“毒瘀互结”的病理中心,以“六腑以通为用”之要义,确立了通瘀解毒的治疗大法,并研制出通解口服液应用于临床。通解口服液中大黄、败酱草解毒通瘀,既能清解热毒,又能化瘀通腑,共为君药;配伍枳实、蒲公英、茜草,达到疏与通合,清与散配,化瘀而不动血,止血而不留瘀的效果。既往研究发现通解口服液可改善 MODS 患者胃肠功能^[9],对 MODS 大鼠炎症反应具有明显的抑制作用^[4]。本研究以回肠 PPAR- γ 、NF- κ B 和 AP-1 蛋白的表达为观察指标,评估通解口服液对 PPAR- γ 、NF- κ B 和 AP-1 调控作用。结果显示,各剂量的通解口服液均

超高效液相色谱在中药及其复方研究中的应用进展

盈竞男 韩新民

(南京中医药大学, 江苏南京 210029)

摘 要 超高效液相色谱(UPLC)是近年来发展的以超高速、超高分离度、超高灵敏度为特点的新型液相色谱技术。中药及其复方是一个复杂的未知体系,不仅化合物种类繁多,数目不明确,而且含量差异大,已知化合物少。目前越来越多研究者将 UPLC 应用于中药及其复方的复杂体系研究中,发现 UPLC 能够快速、精确的对中药及复方提取工艺进行优化,测定有效成分及含量,分析药物体内代谢产物,制定指纹图谱。但因目前单体对照物有限,故在实验中对于某些不明的单体或新化合物不能马上明确其成分,故在实际研究中经常将 UPLC 与质谱联用测定化合物成分。

关键词 超高效液相色谱 中药 复方 综述

中图分类号 R284.2

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2015)04-0081-04

超高效液相色谱 (ultra performance liquid chromatography, UPLC)法是指一种采用小颗粒填料色谱柱(粒径小于 $2\mu\text{m}$)和超高压系数(压力大于 105kPa)的新型液相色谱技术,能显著改善色谱峰的分离度和检测灵敏度,同时大大缩短分析周期,因此特别适用于微量复杂混合物的分离和高通量研究^[1]。中药及其复方作为中医临床用药的主要形式,体现了中医整体观和辨证论治的特色,具有多

成分、多途径、多靶点发挥药效的特点。且作为一个高度复杂的化学物质体系,其复杂性不仅表现在组成方剂的化学成分复杂性及各组分相互关系的复杂性,也体现在方剂与人体相互关系的复杂性^[2]。现对近几年来超高效液相色谱在中药及其复方研究中的应用综述如下。

1 UPLC 法评价中药及其复方提取工艺

邓少东等^[3]以 UPLC 法测定酸水解前后化橘红

可上调 MODS 模型大鼠回肠组织 PPAR- γ 的表达,降低 NF- κB 和 AP-1 的表达,且以中、高剂量组改善程度更明显,认为通解口服液对 MODS 模型大鼠回肠组织 PPAR- γ 、AP-1、NF- κB 表达的影响与其剂量有一定的相关性。通解口服液可能是通过激活抗氧化系统、抗炎、保护血管内皮等作用防治 MODS。下一步我们将更深入地研究 PPAR- γ 、炎症因子与肠平滑肌细胞之间的相关性,从微观角度探讨通解口服液防治 MODS 胃肠损伤的作用靶点。

参考文献

- [1] 郑小丹,沈宇清,曹云,等.通瘀解毒法防治 MODS 急性胃肠损伤的临床研究.中医药临床杂志,2014,26(4):356
- [2] 乔万海,屈莉,师猛,等.MODS 大鼠外周血中 PPAR- γ 与 TNF- α 和 IL-10 动态变化的研究.第四军医大学学报,2009,30(8):690
- [3] 胡森,盛志勇,周宝桐.MODS 动物模型研究进展.中国危重病急救医学,1999,11(8):504
- [4] 郑小丹,沈宇清,曹云,等.通瘀口服液对多器官功能障碍综合征大鼠模型 IL-6、TNF- α 的影响.上海中医药杂志,

2015,49(1):87

- [5] Kapadia R, Yi JH, Vemuganti R. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR- γ agonists. Front Biosci, 2008, 13:1813
 - [6] 汤石林,赵正亮,王桥生,等.脓毒症大鼠 PPAR- γ 与脂联素表达水平的相关性研究.海南医学,2012,23(3):317
 - [7] 黄晓梅,曾勉,卢桂芳,等.脓毒症大鼠有核细胞 PPAR- γ 活性变化对 TNF- α 及 IL-4 的影响.中山大学学报(医学科学版),2010,31(5):630
 - [8] 吴钱红,刘喆.过氧化物酶体增殖物激活受体 V 在炎症过程中调控作用的研究进展.广西中医学院学报,2011,14(2):79
 - [9] 席峰,曹云,沈宇清.通瘀解毒法“治未病”干预 MODS 的临床疗效评价.中医药临床杂志,2014,26(12):1224
- 第一作者:沈宇清(1966-),男,医学硕士,教授,主任中医师,从事急危重症诊疗研究。
jiadianrong-1111@163.com

收稿日期:2015-01-14

编辑:吴 宁