

基于斑马鱼炎症模型的凉膈散及其组分甘草不同极性部位的 抗炎活性评价及作用机制

余景滔, 周红玲, 刘俊珊, 许霓珊, 全景羽, 卢子滨, 刘东依, 曹惠慧, 余林中*
(南方医科大学中医药学院, 国家中医药管理局科研三级实验室中药药理实验室, 中药制剂实验室,
广州 510515)

[摘要] 目的:采用脂多糖(LPS)诱导斑马鱼炎症模型,通过浸泡给药方式,评价凉膈散及其组分甘草不同极性部位的抗LPS活性。方法:利用相似相溶原理分离得到凉膈散及其组分甘草的不同极性部位,随机选择受精后3 d的斑马鱼,暴露于不同浓度的药物提取物中,进行为期24、48、72 h的毒性观察;斑马鱼卵黄囊显微注射 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS造模,浸泡给予不同浓度的凉膈散及甘草提取物,统计72 h内斑马鱼的生存数目并在显微镜下观察12 h时斑马鱼卵黄囊中性粒细胞的聚集情况;苏木素-伊红(HE)染色对LPS显微注射斑马鱼卵黄囊进行组织病理学分析;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)进一步探讨凉膈散及甘草体内抗炎作用及其可能的机制。结果:凉膈散及甘草提取物毒性随着极性升高而降低,药物的毒性大小依次为石油醚部位>乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水部位;与LPS模型组比较,各提取物均能提高LPS斑马鱼炎症模型的动物生存率,抑制斑马鱼卵黄囊中性粒细胞的聚集及炎症细胞浸润,其中凉膈散水部位与甘草乙酸乙酯部位的效果最为显著($P<0.01$);此外,与LPS模型组比较,凉膈散水部位与甘草乙酸乙酯部位降低了斑马鱼炎症模型中促炎细胞因子白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的mRNA表达,抑制了LPS诱导的Toll样受体4(TLR4)和核转录因子- κ B(NF- κ B)的上调($P<0.01$)。结论:凉膈散及其组分甘草的不同提取部位对LPS炎症均有保护作用,其机制可能与抑制TLR4和NF- κ B信号通路相关;在斑马鱼模型中,浸泡给药方式适用于中药的抗LPS活性筛选,可用于单味中药、复方及其不同提取部位的抗内毒素活性评价。

[关键词] 凉膈散; 甘草; 斑马鱼; 内毒素; 炎症

[中图分类号] R2-0;R33;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0017-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221938

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220721.1943.004.html>

[网络出版日期] 2022-07-22 17:21

Anti-inflammatory Effect and Mechanism of Lianggesan and Its Component Glycyrrhiza Radix et Rhizoma Based on Zebrafish Inflammation Model

YU Jingtao, ZHOU Hongling, LIU Junshan, XU Nishan, QUAN Jingyu, LU Zibin, LIU Dongyi,
CAO Huihui, YU Linzhong*

(Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Third Level Research Laboratory of
National Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Traditional Chinese Medicine,
Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** Lipopolysaccharide (LPS)-induced zebrafish inflammation model was used to evaluate the anti-inflammatory activity of different extracts from Lianggesan (LGS) and its component Glycyrrhiza Radix et Rhizoma. **Method:** Different polar fractions of LGS and Glycyrrhiza Radix et Rhizoma were obtained by the principle of similar miscibility. For toxicity observation, the zebrafish (3 day-post-fertilization) was exposed to different concentrations of extracts for 24, 48 and 72 h. The yolk sac of the

[收稿日期] 2022-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074317,82141221)

[第一作者] 余景滔,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:smuyjt@163.com

[通信作者] *余林中,博士,教授,博士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:yulzh@smu.edu.cn

zebrafish was microinjected with $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS to establish the inflammation model, and then the embryos were soaked with different concentrations of extracts to observe their survival status at 72 h and the aggregation of neutrophils in yolk sac at 12 h after treatment. Hematoxylin-eosin staining was used to analyze the yolk sac of the zebrafish microinjected with LPS. Quantitative Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was performed to further investigate the anti-inflammatory effects and mechanisms of LGS and Glycyrrhiza Radix et Rhizoma. **Result:** The toxicity of LGS and Glycyrrhiza Radix et Rhizoma was decreased with the increase of polarity, and the descending order was petroleum ether>ethyl acetate>*n*-butanol>water. Compared with model group, the extracts from different fractions of LGS and Glycyrrhiza Radix et Rhizoma prolonged the survival time of the zebrafish, and inhibited the recruitment and aggregation of neutrophils and decreased the infiltration of inflammatory cells in the yolk sac, among which the water fraction of LGS and the ethyl acetate fraction of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma had the most significant effect ($P<0.01$). In addition, compared with model group, the water fraction of LGS and the ethyl acetate fraction of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma down-regulated the mRNA expression of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and suppressed the expression of toll like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor kappa-B (NF- κ B) in LPS-stimulated zebrafish ($P<0.01$). **Conclusion:** The extracts from different fractions of LGS and Glycyrrhiza Radix et Rhizoma exerted protective effects in LPS-induced zebrafish by inhibiting the TLR4 and NF- κ B signaling pathways. Moreover, in zebrafish model, the method of administration by soaking was applicable to the high-throughput screening of anti-inflammatory Chinese medicine, which was suitable for the evaluation of anti-LPS activity of Chinese medicine and the different extracts.

[Keywords] Lianggesan; Glycyrrhiza Radix et Rhizoma; zebrafish; lipopolysaccharide (LPS); inflammation

脂多糖(LPS)是自然界中已知的最有效的免疫刺激化合物之一^[1],可以激活细胞内转导系统,引起广泛而强烈的炎症反应,甚至诱发内毒素性休克、急性肺损伤及多器官功能衰竭等危重症的产生^[2]。现代医学治疗内毒素炎症常用的策略有抗生素、糖皮质激素、炎症介质特异性抑制剂等,但均存在安全性、耐药性及不良反应等方面的问题。中药在抗内毒素炎症方面表现出高安全性、多途径抑菌、低耐药性的优势。因此,从中药中筛选抗内毒素药物具有良好应用前景。

Toll样受体4(TLR4)是LPS胞内信号转导的重要分子,核转录因子- κ B(NF- κ B)是细胞中LPS炎症信号的重要转录调节因子^[3]。研究已证实,LPS诱导炎症发生的过程,首先是激活生物体内细胞的细胞膜上跨膜受体蛋白TLR4,进一步激活NF- κ B通路,释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)等炎症细胞因子,导致了炎症的发生^[4]。

凉膈散(LGS)最早记载于《太平惠民和剂局方》,具有泻火通便,清上泄下功效。本课题组前期研究发现凉膈散对LPS诱导的急性肺损伤具有显著的保护作用^[5],同时,本课题组采用模式生物斑马鱼成功构建了斑马鱼内毒素炎症模型^[6],并基于该

模型通过浸泡给药对凉膈散的抗炎活性进行验证,说明了斑马鱼浸泡给药的可行性^[7]。甘草在凉膈散中起缓硝、黄之峻下之力,在中药复方中应用极为广泛,有“十方九草”之说。现代药理研究表明甘草也具有显著的抗炎作用^[8],甘草水煎液可显著抑制小鼠二甲苯性耳肿胀、大鼠蛋清性足肿胀及抑制棉球肉芽肿的增生^[9]。甘草的抗炎机制研究显示,甘草及其活性成分不仅可通过影响炎症相关细胞发挥抗炎作用,而且又可对多种炎症因子产生影响从而抑制炎症反应。与此同时,甘草及其活性成分还可对与炎症相关的肝药酶发生作用^[10-11]。但凉膈散各部位的抗炎活性尚不清楚,甘草各部位对LPS所致炎症斑马鱼的保护作用及机制也尚不明确。因此,本研究将基于斑马鱼炎症模型对凉膈散及其组分甘草不同极性部位的抗LPS活性进行评价,并针对其中发挥抗炎作用的机制进行探索。

1 材料

1.1 动物 斑马鱼 Tg(*mpo:GFP*)转基因品系,由华南理工大学医学院提供,按照已发表的方法饲养与繁殖^[12]。该转基因品系斑马鱼的中性粒细胞表达绿色荧光蛋白。

1.2 药物与试剂 凉膈散由连翘 24 g、大黄 12 g、

芒硝 12 g、甘草 12 g、栀子 6 g、黄芩 6 g 和薄荷 6 g 组成(广州康美药业有限公司,批号分别为 211201101、211100199、210902001、210902241、211002521、211002401、211000191),并由南方医科大学中医药学院药用植物鉴定学教研室张宏伟副教授鉴定均为正品;LPS(美国 Sigma 公司,货号 L2880);石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(天津市津东天正精细化学试剂厂,批号分别为 20170410、20190516、20180420);地塞米松(DEX,广州白云山天心制药股份有限公司,批号 50022);苏木素(上海化学试剂采购供应站试剂厂,批号 171110);曙红 Y(广东光华化学厂有限公司,批号 20120728)。

1.3 仪器 MVX10 型体视荧光显微镜、BX 53 型正置显微镜(日本奥林巴斯株式会社);PM1000 型显微注射仪(美国微滴仪器);PMP-102 型可编程微针拉制器(美国 MDI 公司);YP10002 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司);N-1200B 型旋转蒸发仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);LightCycler[®]96 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 凉膈散及甘草不同提取部位的制备 凉膈散生药依据文献中煎煮方法^[13],按照原方比例,先称取连翘 24 g、栀子 6 g、黄芩 6 g、甘草 12 g,加 10 倍体积蒸馏水浸泡 30 min 后加热,煮沸 20 min,然后加入大黄 12 g、薄荷 6 g,继续煎煮,煮沸 10 min 倒出煎煮液,药渣中加入 6 倍体积蒸馏水继续煮沸 10 min,合并两次煎液后三层纱布过滤,趁热加入芒硝 12 g,搅拌溶解后用滤纸抽滤得到凉膈散水煎液。200 g 甘草依次用 90%、70%、50% 乙醇浸泡 2 h,后超声(40 kHz)提取 30 min,合并提取液,旋转蒸发浓缩得到甘草提取液^[14]。凉膈散及甘草提取液依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,后经旋转蒸发挥发去溶剂,冷冻干燥得到相应的凉膈散及甘草的石油醚冻干粉、乙酸乙酯冻干粉、正丁醇冻干粉及水部位冻干粉。使用前用 DMSO 将冻干粉溶解为液体。

2.2 不同提取物的非毒浓度筛选 随机选取状态良好的受精后 3 d(dpf)斑马鱼幼鱼放于 24 孔板中,每组 20 条幼鱼,不同浓度的凉膈散或甘草提取物浸泡给药。给药完成后,将 24 孔板置于 28.5 °C 恒温箱中培养。观察并统计斑马鱼 0~72 h 内的存活状态,当斑马鱼出现卵黄囊坏死、心包肿大、心膜出血、脊柱弯曲、死亡等均认为药物有毒。

2.3 不同提取物对 LPS 显微注射斑马鱼的生存分

析 选择状态良好的 3 dpf 斑马鱼幼鱼,随机分为若干组,每组 30 条;幼鱼用 0.02% 三卡因麻醉后,以卵黄囊注射 2 nL 的磷酸盐缓冲液(PBS)为正常组(Control),卵黄囊注射 2 nL 的 LPS(5 g·L⁻¹)作为模型及药物处理组。随后,将其分别放入 12 孔板中,药物处理组再浸泡给予 10 mg·L⁻¹ 的 DEX 及不同浓度的凉膈散或甘草提取物,于 28.5 °C 培养箱中培养,体视镜下观察统计 0~72 h 内幼鱼的死亡数目。

2.4 不同提取物对 LPS 显微注射斑马鱼的炎症行为观察 斑马鱼分组、卵黄囊显微注射及给药等方法与 2.3 项相同,于 28.5 °C 培养箱培养 12 h 后,在体视荧光显微镜下观察斑马鱼卵黄囊内中性粒细胞的迁移聚集情况,采用直接计数方法统计斑马鱼卵黄囊内中性粒细胞的数量并进行统计学分析。

2.5 凉膈散及甘草提取物对 LPS 显微注射斑马鱼的组织病理学分析 斑马鱼分组、卵黄囊显微注射及给药等方法与 2.3 项相同,于 28.5 °C 培养箱培养 12 h 后,对收集的各组斑马鱼进行苏木素-伊红(HE)染色。将斑马鱼转移到 1.5 mL 离心管中,PBS 清洗 2 次,后在 4% 多聚甲醛中固定过夜。固定斑马鱼先用乙醇逐级脱水,然后用分级二甲苯透明,再用石蜡包埋。取 4 μm 厚的切片进行 HE 染色,在正置显微镜下观察卵黄囊的病理变化。

2.6 Real-time PCR 检测斑马鱼 TLR4/NF-κB 信号通路中 mRNA 表达水平 斑马鱼分组、卵黄囊显微注射及给药等方法与 2.3 项相同,用 RNAiso Plus 从收集的各组斑马鱼中提取总 RNA。总 RNA 提取按照 TaKaRa 试剂盒 PrimeScript[™] RT Master Mix 去除基因组 DNA 及蛋白后进行逆转录反应,合成互补脱氧核糖核酸。逆转录参数设置如下:37 °C 启动反应 15 min,85 °C 灭活 5 s,4 °C 保存。Real-time PCR 采用 TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II 在 Real-time PCR 仪上进行。PCR 扩增程序设定:第 1 步预变性 95 °C 30 s,循环 1 次;第 2 步 PCR 反应定量分析 95 °C 5 s,之后 60 °C 30 s,循环 50 次;第 3 步融解曲线 95 °C 5 s,之后 65 °C,60 s,之后 95 °C 1 s,循环 1 次,4 °C 放置。采用 2^{-ΔΔC_t} 法,与内参 β-肌动蛋白(β-actin)表达水平进行相对定量分析。PCR 引物序列由北京六合华大基因科技有限公司合成。序列见表 1。

2.7 统计学分析 本实验中数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Graph Pad Prism 8.0 软件进行单因素方差分析,运用 Tukey: Compare all pairs of columns 检验方法, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 ATGGATGAGGAAATCGCTG	140
	下游 ATGCCAACCATCACTCCCTG	
IL-6	上游 AGACCGCTGCCTGTCTAAAA	136
	下游 TTTGATGTCGTTACCAGGA	
TNF-α	上游 GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA	138
	下游 TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC	
NF-κB	上游 GAGCCCTTTGTGCAAGAGAC	154
	下游 TGGGATACGTCCTCCTGTTCT	
TLR4	上游 TGGTGATGAAGAGTCCCTTTCCTA	495
	下游 TCTGCGTGCCAGTAAAAGATCTCA	

3 结果

3.1 凉膈散及甘草不同极性提取物对斑马鱼的非毒浓度影响 为进一步应用斑马鱼炎症模型评价凉膈散及甘草的抗内毒素活性,先检测药物不同时间点的非毒浓度,以评价药物对斑马鱼的毒性。根据药物的非毒浓度,选择72 h斑马鱼100%存活的浓度作为药物最高浓度进行后续实验。在同一浓度检测药物非毒浓度时,发现极性越大,药物的毒性越小。药物的毒性大小依次为石油醚部位>乙酸乙酯部位>正丁醇部位>水部位。其中,凉膈散水部位24 h对斑马鱼的非毒浓度为500 mg·L⁻¹,而石油醚部位仅为10 mg·L⁻¹,两者之间相差50倍。同样的,单味中药甘草的不同提取部位也表现出相同的规律,极性增大,药物毒性减小,其水部位与石油醚部位24 h对斑马鱼的非毒浓度相差了500倍。见表2。

表2 凉膈散及甘草不同提取部位在不同时间点对斑马鱼的非毒浓度影响

Table 2 Effect of non-toxic doses of different parts of LGS and Glycyrrhiza at different times

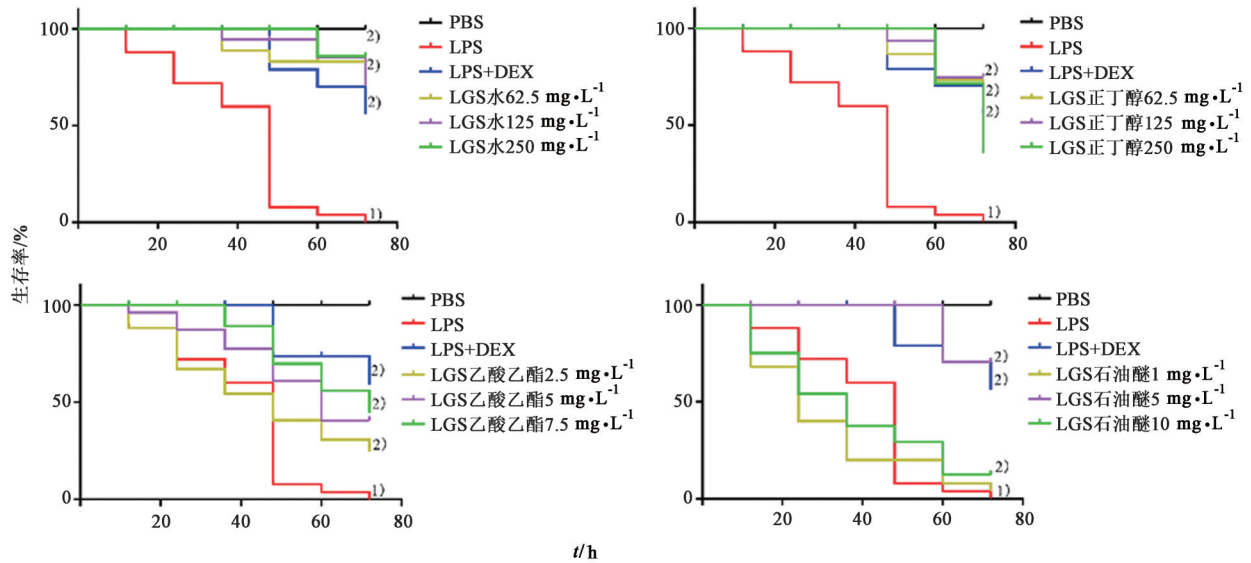
药物	提取部位	mg·L ⁻¹		
		24 h非毒浓度	48 h非毒浓度	72 h非毒浓度
凉膈散	水部位	500	500	250
	正丁醇	500	300	250
	乙酸乙酯	50	20	7.5
	石油醚	10	10	10
甘草	水部位	500	500	500
	正丁醇	250	100	75
	乙酸乙酯	10	5	2.5
	石油醚	1	1	1

3.2 凉膈散及甘草提取物对LPS显微注射斑马鱼生存率的影响 3 dpf幼鱼经卵黄囊显微注射LPS后浸泡给药。在72 h内,注射PBS不会引起幼鱼的死亡,LPS注射组中发现斑马鱼的大量死亡,而给予阳性药物DEX干预则能减少LPS诱导的斑马鱼死亡,延长其生存时间,提高其存活率。注射LPS后再给予非毒浓度的凉膈散或甘草提取部位,发现与LPS注射组比较,斑马鱼的死亡数量减少,生存状况有所改善,其中250 mg·L⁻¹的凉膈散水部位、甘草乙酸乙酯部位的抗内毒素效果与DEX相当。这表明凉膈散及其组分甘草的不同提取部位均能在一定程度上延长斑马鱼生存时间,提高斑马鱼幼鱼的生存率,对内毒素诱导的炎症损伤具有一定的保护作用,其中以凉膈散水部位与甘草乙酸乙酯部位的效果最为显著。见图1和图2。

3.3 凉膈散及甘草提取物对斑马鱼中性粒细胞在LPS注射部位的招募和聚集的影响 *Tg(mpo:GFP)*斑马鱼的中性粒细胞标记有绿色荧光,可对中性粒细胞进行示踪。在炎症反应中,中性粒细胞能快速对病原菌做出反应,迁移到炎症部位。对于正常斑马鱼幼鱼,中性粒细胞主要出现在尾部血岛区域,头部和表皮也有少量分布。在斑马鱼显微注射LPS并给药12 h后,可观察斑马鱼卵黄囊部位的荧光分布情况。PBS正常组在卵黄囊部位几乎看不到荧光分布,而LPS模型组卵黄囊部位可观察到大量中性粒细胞聚集。给予凉膈散或甘草不同提取部位后,能减少斑马鱼中性粒细胞在卵黄囊部位的聚集,其中凉膈散水部位和正丁醇部位的效果优于石油醚部位及乙酸乙酯部位,甘草正丁醇部位和乙酸乙酯部位的效果优于石油醚部位及水部位,且保护效果呈浓度依赖性。见图3、表3、图4、表4。

3.4 凉膈散及甘草提取物对LPS显微注射斑马鱼卵黄囊炎症细胞浸润的影响 基于3.3项中凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位减少斑马鱼中性粒细胞在卵黄囊部位聚集的效果更优,为更直观观察上述两提取部位对LPS注射斑马鱼后卵黄囊的病理情况,作者对收集的各组斑马鱼进行HE染色。PBS正常组在卵黄囊部位几乎看不到免疫细胞分布,而LPS模型组卵黄囊部位可观察到大量免疫细胞聚集。给予凉膈散水部位或甘草乙酸乙酯部位后,能显著减少斑马鱼免疫细胞在卵黄囊部位的聚集,且抑制效果呈浓度依赖性。见图5和图6。

3.5 凉膈散及甘草提取物对斑马鱼TLR4/NF-κB信号通路的影响 为了探讨凉膈散水部位及甘草



注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与LPS模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图2同)

图1 凉膈散不同极性部位对LPS显微注射斑马鱼生存率的影响($n=30$)

Fig. 1 Effect of different polar parts of LGS on survival rate of zebrafish after LPS microinjection ($n=30$)

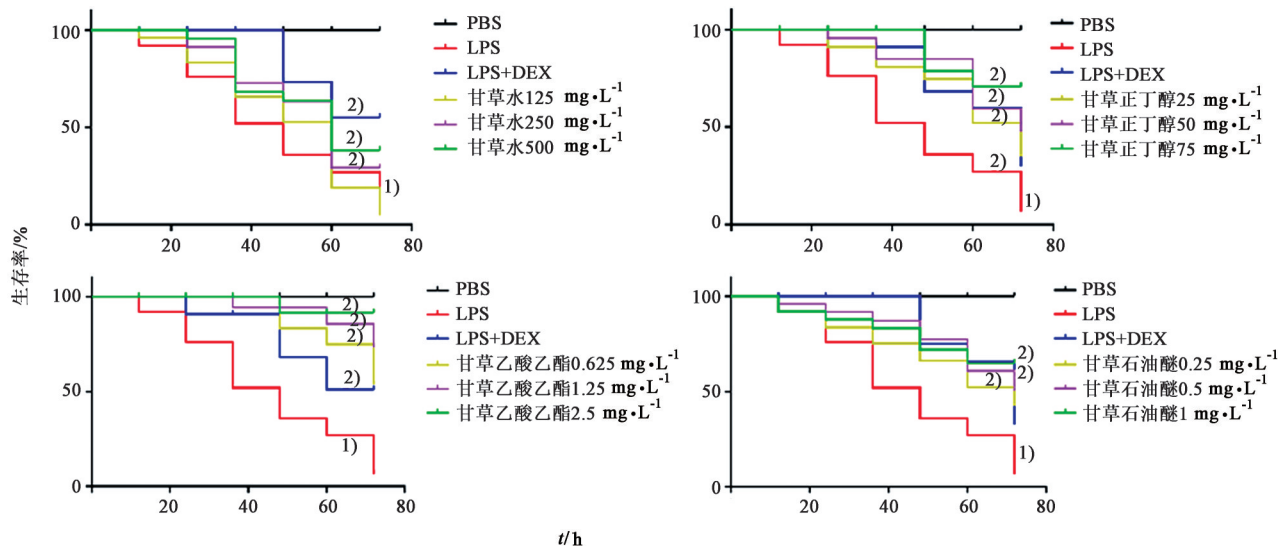


图2 甘草不同极性部位对LPS显微注射斑马鱼生存率的影响($n=30$)

Fig. 2 Effect of different polar parts of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma on survival rate of zebrafish after LPS microinjection ($n=30$)

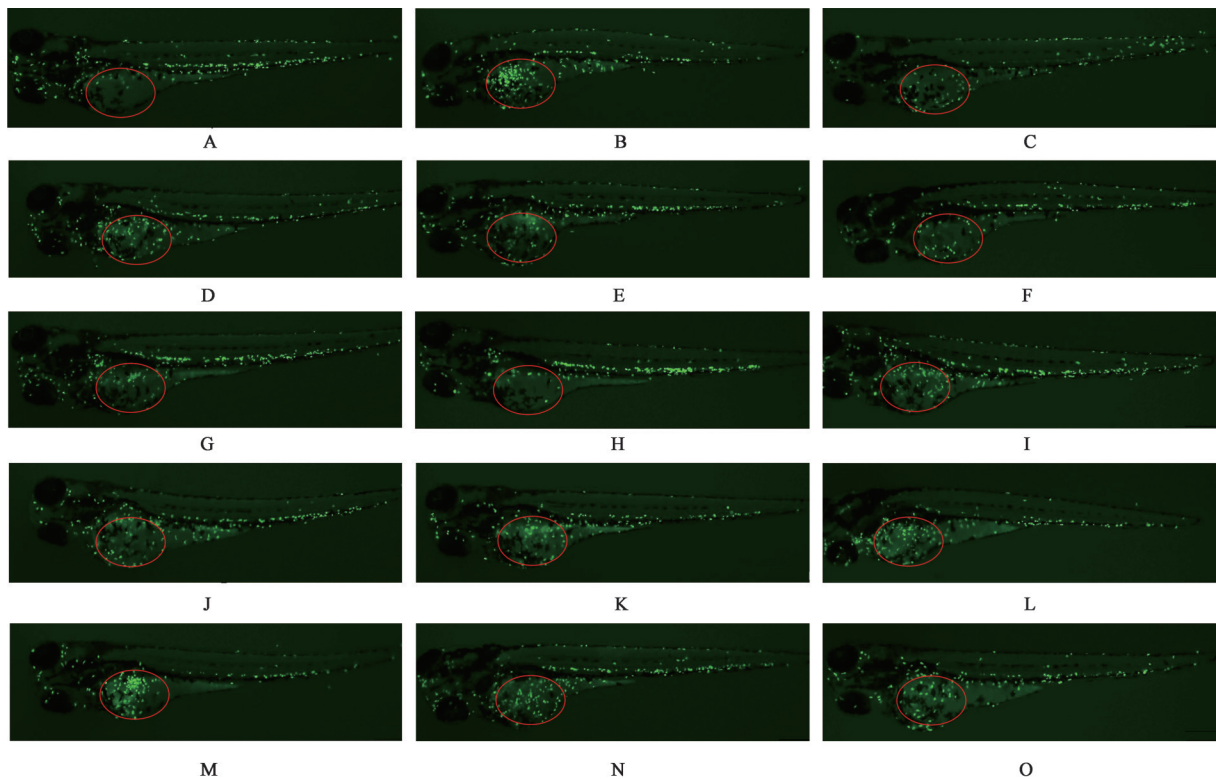
乙酸乙酯部位体内抗炎作用的机制,作者首先通过 Real-time PCR 检测了 LPS 诱导斑马鱼炎症后 3、6、9、12 h 4 个时间点的 TLR4 和 NF- κ B mRNA 表达水平的变化(表 5 和表 6),结果表明 LPS 组 TLR4 和 NF- κ B mRNA 的表达在 3 h 达高峰。

进一步在 3 h 时检测给药组中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 表达水平,凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位显著抑制了 LPS 诱导的斑马鱼炎症中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 的表达,抑制作用呈浓度依赖性。作为 TLR4/NF- κ B 信号通路下游因子, TNF- α 和 IL-6 是炎症反应中关键的促炎细胞因子。为了进一步探讨凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位如何通过

TLR4 和 NF- κ B 信号通路参与了体内抗炎作用,作者通过 Real-time PCR 检测了 LPS 诱导斑马鱼炎症后 IL-6 和 TNF- α mRNA 表达水平的变化,结果显示 IL-6 和 TNF- α 的表达均不同程度下降。上述实验结果见表 7 和表 8,由此说明,凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位至少部分通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路的激活,抑制促炎细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的表达,从而发挥抗炎调节作用。

4 讨论

目前,中药抗内毒素的体内筛选研究主要采用哺乳动物诱导内毒素血症模型。然而,哺乳动物对 LPS 的耐受性和敏感性易受到物种、实验条件等因



注:A.正常组;B.LPS模型组;C.DEX组;D.凉膈散水(62.5 mg·L⁻¹)组;E.凉膈散水(125 mg·L⁻¹)组;F.凉膈散水(250 mg·L⁻¹)组;G.凉膈散正丁醇(62.5 mg·L⁻¹)组;H.凉膈散正丁醇(125 mg·L⁻¹)组;I.凉膈散正丁醇(250 mg·L⁻¹)组;J.凉膈散乙酸乙酯(5 mg·L⁻¹)组;K.凉膈散乙酸乙酯(10 mg·L⁻¹)组;L.凉膈散乙酸乙酯(20 mg·L⁻¹)组;M.凉膈散石油醚(1 mg·L⁻¹)组;N.凉膈散石油醚(5 mg·L⁻¹)组;O.凉膈散石油醚(10 mg·L⁻¹)组
图3 凉膈散对斑马鱼卵黄囊部位中性粒细胞的招募和聚集的影响(显微注射,×20)

Fig. 3 Effect of LGS on neutrophil recruitment and aggregation in yolk sac of zebrafish (microinjection, ×20)

表3 凉膈散对中性粒细胞的聚集数量的影响($\bar{x} \pm s, n=30$)

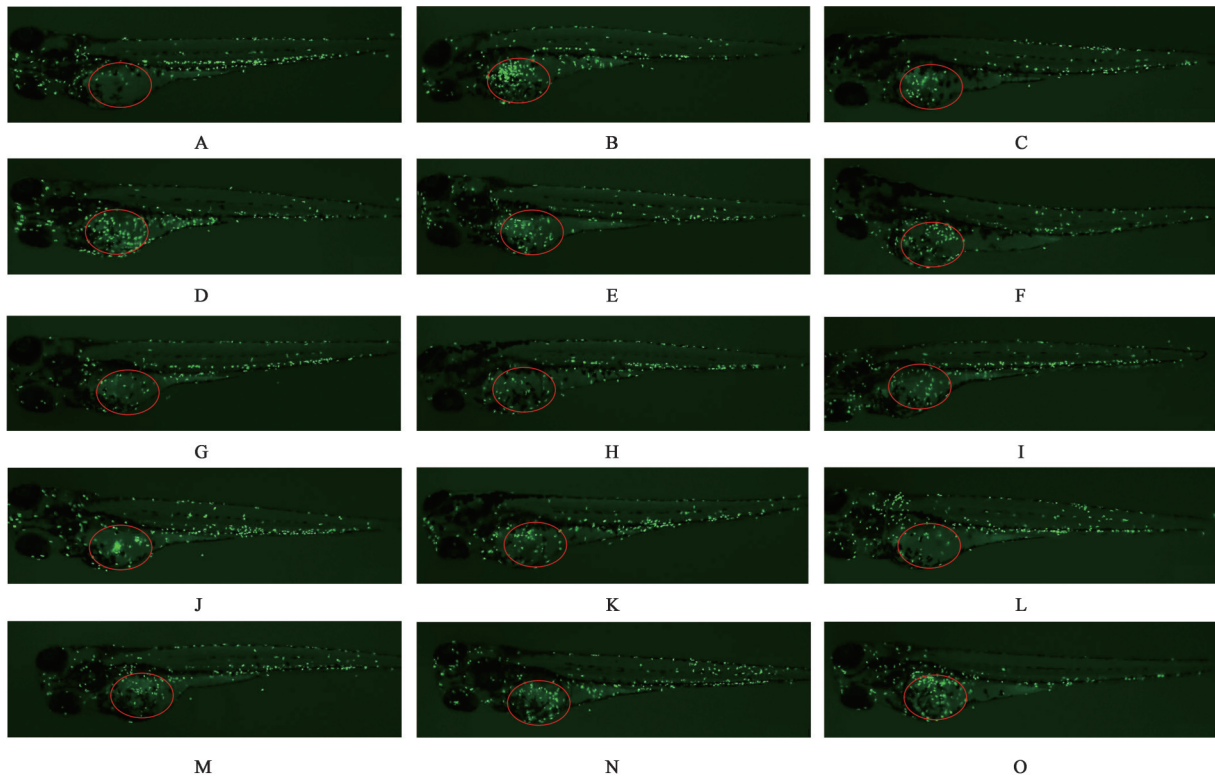
Table 3 Effect of LGS on number of neutrophils ($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	红圈内中性粒细胞数/个
正常组		6.50±2.12
LPS模型组		34.50±2.12 ¹⁾
DEX组	10	16.00±1.41 ³⁾
LGS水低浓度组	62.5	17.50±2.12 ³⁾
LGS水中浓度组	125	11.00±1.41 ³⁾
LGS水高浓度组	250	9.50±0.71 ³⁾
LGS正丁醇低浓度组	62.5	16.50±3.57 ³⁾
LGS正丁醇中浓度组	125	11.50±0.71 ³⁾
LGS正丁醇高浓度组	250	12.50±3.54 ³⁾
LGS乙酸乙酯低浓度组	5	19.50±2.12 ³⁾
LGS乙酸乙酯中浓度组	10	18.50±0.71 ³⁾
LGS乙酸乙酯高浓度组	20	26.50±2.12 ²⁾
LGS石油醚低浓度组	1	29.50±0.71
LGS石油醚中浓度组	5	25.50±2.12 ²⁾
LGS石油醚高浓度组	10	18.00±1.41 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.01;与LPS模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表4-表8同)

素的影响^[15]。此外,小鼠、大鼠等哺乳类动物筛选模型耗时长、花费大,对多种药物的前期筛选而言难度较大。相对而言,斑马鱼胚胎发育迅速,且其在基因组学、生理学及疾病信号转导通路等方面与哺乳动物极其类似,斑马鱼可作为一种既快速又经济的药物筛选模式动物^[16-17]。近年来随着基因编辑技术在斑马鱼研究中的广泛应用,使许多人类已知疾病得以在斑马鱼身上复制。因此,斑马鱼已被广泛用作肿瘤、炎症等人类疾病研究的动物模型。

中药活性筛选为中药的开发提供药理学依据,对于中药的研究具有重要意义。而在中药活性筛选工作中,给药方式对于筛选的结果亦具有深远的影响。前期工作中,本课题组采用了斑马鱼显微注射给药方式,但仍存在诸多问题:如给药浓度有所限制,注射给药溶剂选择不多及黏稠性药物不易注射等。此外,显微注射给药与传统中药给药方式之间存在较大差异。传统中药以水煎剂为主,多采用口服的方式;口服之后,其中组分一般先经由肠道菌群分解,在由肠道吸收入血进而发挥作用。因此,本实验据此改进了给药方式,采用斑马鱼浸泡



注: A. 正常组; B. LPS 模型组; C. DEX 组; D. 甘草水 ($125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; E. 甘草水 ($250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; F. 甘草水 ($500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; G. 甘草正丁醇 ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; H. 甘草正丁醇 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; I. 甘草正丁醇 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; J. 甘草乙酸乙酯 ($1.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; K. 甘草乙酸乙酯 ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; L. 甘草乙酸乙酯 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; M. 甘草石油醚 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; N. 甘草石油醚 ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; O. 甘草石油醚 ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组
图4 甘草对斑马鱼卵黄囊部位中性粒细胞的招募和聚集的影响 (显微注射, $\times 20$)

Fig. 4 Effect of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma on neutrophil recruitment and aggregation in yolk sac of zebrafish (microinjection, $\times 20$)

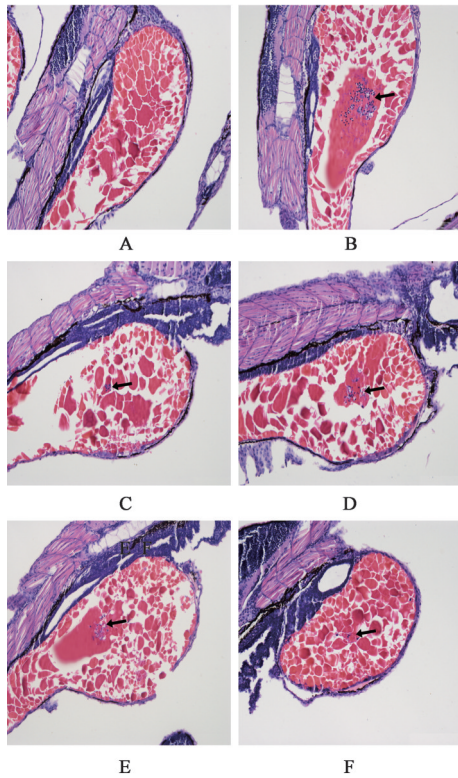
表4 甘草对中性粒细胞的聚集数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 4 Effect of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma on number of neutrophils ($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	质量浓度 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	红圈内中性 粒细胞数/个
正常组		7.00 ± 1.41
LPS 模型组		$34.50 \pm 2.12^{1)}$
DEX 组	10	14.50 ± 0.71
甘草水低浓度组	62.5	28.50 ± 4.95
甘草水中浓度组	125	$22.00 \pm 2.83^{2)}$
甘草水高浓度组	250	26.50 ± 2.12
甘草正丁醇低浓度组	62.5	$10.00 \pm 1.41^{3)}$
甘草正丁醇中浓度组	125	$11.50 \pm 0.71^{3)}$
甘草正丁醇高浓度组	250	$8.50 \pm 0.71^{3)}$
甘草乙酸乙酯低浓度组	5	$19.00 \pm 2.83^{3)}$
甘草乙酸乙酯中浓度组	10	$15.50 \pm 2.12^{3)}$
甘草乙酸乙酯高浓度组	20	$9.50 \pm 0.71^{3)}$
甘草石油醚低浓度组	1	$19.00 \pm 2.83^{3)}$
甘草石油醚中浓度组	5	$22.50 \pm 2.12^{3)}$
甘草石油醚高浓度组	10	29.00 ± 1.41

给药方式,将显微注射 LPS 的斑马鱼放入 12 孔板中,浸泡给予不同浓度的凉膈散或甘草提取物及 DEX 药物,进而对凉膈散复方及方中单味药甘草的抗内毒素活性进行评价。该浸泡给药方式使实验操作更加方便高效,在不改变胃肠道吸收条件下更能反映中药给药特点及给药途径,且药物吸收过程同人体内吸收亦存在类似之处,为单味中药及复方的抗炎高通量筛选提供一个介于体外初筛与哺乳动物验证之间的快速、低成本和活体筛选的新方法,具有良好的应用前景。

凉膈散方主要分为清上与泻下组分,清上泻下并举,使积热从前后分消,充分体现了“以泻代清”之法。本研究利用相似相溶原理依次分离得到了凉膈散及其组分甘草的石油醚部位、乙酸乙酯部位、正丁醇部位和水部位。生存分析及病理学切片染色结果表明凉膈散水部位在 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的抗 LPS 活性和阳性药 DEX 都相当好。Real-time PCR 结果中,通过检测关键炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达水平,结果表明凉膈散水部位可显著抑制 LPS 诱导的斑马鱼卵黄囊中下游炎症因子 TNF- α 和 IL-6

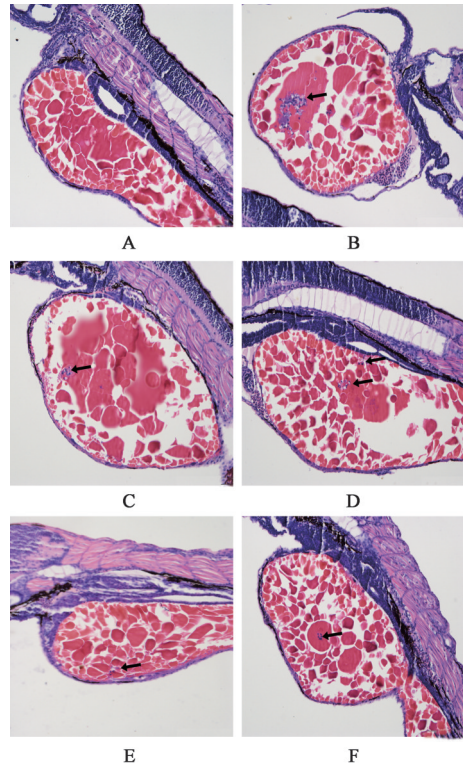


注:A.正常组;B.LPS模型组;C.DEX组;D.凉膈散(62.5 mg·L⁻¹)组;E.凉膈散(125 mg·L⁻¹)组;F.凉膈散(250 mg·L⁻¹)组
图5 凉膈散水部位对LPS诱导的斑马鱼炎症细胞浸润的影响(HE,×200)

Fig. 5 Effect of water part of LGS on LPS-induced inflammatory cell infiltration in zebrafish(HE,×200)

的表达,抑制作用呈浓度依赖性且凉膈散水部位在250 mg·L⁻¹时的抑制作用较阳性药DEX更强。DEX主要在治疗初期发挥疗效,当时间逐渐延长时,效果降低。地塞米松广泛应用于关节炎、慢性阻塞性肺和哮喘等炎症性疾病,然而,长期或高浓度的地塞米松可能导致严重的不良反应,如股骨头坏死、肾上腺功能不全、高血糖、骨质疏松、关节病等^[18-19],而凉膈散水部位的毒性最低,抗内毒素活性也更长效持久。因此,凉膈散在急性炎症疾病上有巨大潜力。同时,本研究对凉膈散复方中的单味药甘草也进行了评价。实验结果表明甘草抗内毒素的主要有效部位在乙酸乙酯提取部位中,甘草的乙酸乙酯部位可呈浓度依赖性抑制LPS诱导的斑马鱼卵黄囊中下游炎症因子TNF-α和IL-6的表达。

基于上述结果及研究发现,本研究进一步探讨凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位发挥抗炎作用的机制。现代研究表明,TLR4/NF-κB信号转导与炎症的调节密切相关。其中,TLR4作为机体固有免疫中起重要作用的模式识别受体之一,可介导LPS信号转导,进而通过依赖性髓样分化因子88



注:A.正常组;B.LPS模型组;C.DEX组;D.甘草(1.25 mg·L⁻¹)组;E.甘草(2.5 mg·L⁻¹)组;F.甘草(5 mg·L⁻¹)组
图6 甘草乙酸乙酯部位对LPS诱导的斑马鱼炎症细胞浸润的影响(HE,×200)

Fig. 6 Effect of ethyl acetate part of glycyrrhiza on LPS-induced inflammatory cell infiltration in zebrafish (HE,×200)

表5 LPS对诱导斑马鱼卵黄囊炎症后不同时间内TLR4 mRNA表达的影响(̄x±s,n=3)

Table 5 Effect of LPS on TLR4 mRNA expression in zebrafish at different time after inducing inflammation in yolk sac (̄x±s,n=3)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	TLR4 mRNA			
		3 h	6 h	9 h	12 h
正常组		1.01±0.21	1.00±0.02	1.00±0.13	1.00±0.11
LPS模型组	5	2.10±0.17 ¹⁾	2.03±0.02 ¹⁾	0.81±0.12	0.39±0.03

(MyD88)或非依赖性MyD88两条传导途径^[20],激活下游NF-κB核转录调节因子,NF-κB的活化可增加促炎细胞因子的分泌,上调下游炎症介质的表达,导致炎症的发生与加重^[21]。TLR4的过表达增强了LPS诱导的急性炎症作用,促使中性粒细胞的激活和炎症因子TNF-α的表达上调^[22]。以上研究表明,TLR4/NF-κB在炎症信号转导中发挥着重要作用,以TLR4/NF-κB为靶点阻断LPS信号转导途径,可成为临床抗内毒素炎症的一个有效靶点。

本研究作者探讨了TLR4和NF-κB在LPS诱导的斑马鱼卵黄囊炎症的作用,Real-time PCR结果发现,LPS刺激后,TLR4和NF-κB在斑马鱼卵黄囊的

表6 LPS对诱导斑马鱼卵黄囊炎症后不同时间内NF-κB mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of LPS on NF-κB mRNA expression in zebrafish at different time after inducing inflammation in yolk sac ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	NF-κB mRNA			
		3 h	6 h	9 h	12 h
正常组		1.01±0.20	1.01±0.15	1.02±0.30	1.00±0.01
LPS模型组	5	3.84±0.59 ¹⁾	2.78±0.53 ¹⁾	2.91±0.57 ¹⁾	2.42±0.083 ¹⁾

表7 凉膈散水部位对斑马鱼卵黄囊炎症中4个炎症因子表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 7 Effect of water part of LGS on expression levels of four inflammatory factors in yolk sac of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TLR4	NF-κB	IL-6	TNF-α
正常组		1.01±0.12	1.00±0.12	1.00±0.03	1.01±0.11
LPS模型组		3.73±0.56 ¹⁾	2.75±0.35 ¹⁾	4.36±0.23 ¹⁾	12.38±1.46 ¹⁾
LGS水部位低浓度组	62.5	2.36±1.19 ²⁾	2.37±0.35	2.78±0.37 ³⁾	8.19±0.71 ³⁾
LGS水部位中浓度组	125	1.98±0.94 ³⁾	1.89±0.32 ²⁾	1.86±0.47 ³⁾	2.57±0.43 ³⁾
LGS水部位高浓度组	250	1.00±0.20 ³⁾	1.49±0.11 ³⁾	1.06±0.16 ³⁾	2.31±0.31 ³⁾
DEX组	10	1.24±0.40 ³⁾	1.94±0.28 ²⁾	2.28±0.59 ³⁾	3.50±0.82 ³⁾

表8 甘草乙酸乙酯部位对斑马鱼卵黄囊炎症中4个炎症因子表达量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

Table 8 Effect of ethyl acetate part of glycyrrhiza on expression levels of four inflammatory factors in yolk sac of zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=30$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TLR4	NF-κB	IL-6	TNF-α
正常组		1.01±0.12	1.00±0.08	1.00±0.08	1.00±0.10
LPS模型组		3.73±0.56 ¹⁾	2.57±0.31 ¹⁾	6.45±2.11 ¹⁾	14.03±2.33 ¹⁾
甘草乙酸乙酯低浓度组	1.25	1.92±1.04 ³⁾	2.29±0.07	4.30±1.98	5.62±2.12 ³⁾
甘草乙酸乙酯中浓度组	2.5	1.81±0.91 ³⁾	2.13±0.20 ²⁾	3.85±1.61 ²⁾	4.82±1.78 ³⁾
甘草乙酸乙酯高浓度组	5	1.63±0.19 ³⁾	1.63±0.30 ³⁾	3.56±1.89 ²⁾	5.69±0.98 ³⁾
DEX组	10	1.24±0.40 ³⁾	1.74±0.18 ³⁾	2.69±0.62 ³⁾	4.16±1.19 ³⁾

表达显著升高,给药组凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位显著抑制TLR4和NF-κB mRNA表达,作用呈浓度依赖性。此外,作者在前期试验中发现,LPS刺激诱导斑马鱼炎症过程中,Real-time PCR检测LPS组斑马鱼IL-6、TNF-α、TLR4和NF-κB 4个mRNA表达水平的变化规律较为一致,在一定时间范围内,均表现出先升高到最大值后,再降低,随着处理时间延长最终恢复正常水平;TLR4和NF-κB高表达峰值出现在3 h,相比之下,12 h的TLR4和NF-κB表达与PBS组差异并不明显,IL-6和TNF-α两个基因高表达峰值则出现在12 h,由此验证LPS诱导斑马鱼炎症后炎症细胞因子IL-6和TNF-α的表达依赖于TLR4/NF-κB信号通路,LPS诱导炎症的信号传导首先激活TLR4和NF-κB,从而促进下游IL-6和TNF-α等炎症因子高表达。现代研究表明,涉及药物作用机制的生物学过程通常是动态的,基因表达数据的收集不应只局限于一个时间点^[23]。根据机体需要,相应基因会按照一定时间顺序表达,即分子生物学中所说的基因表达的时间特

异性。如斑马鱼中胰岛素样生长因子酸不稳定亚基(IGFALS)转录的mRNA表达水平会随时间发生较大变化^[24]。因此,作者在不同时间点进行检测了TLR4、NF-κB、IL-6和TNF-α基因的表达,结果与上述研究一致,TLR4和NF-κB基因高表达峰值出现时间与IL-6和TNF-α不同。

综上所述,本研究发现凉膈散及其组分甘草的不同提取部位可以保护斑马鱼因内毒素引起的死亡,抑制斑马鱼卵黄囊中性粒细胞的聚集,表明凉膈散及甘草具有一定的抗内毒素作用;凉膈散水部位及甘草乙酸乙酯部位可通过抑制TLR4信号通路和NF-κB的激活,抑制促炎细胞因子IL-6和TNF-α的表达,从而发挥抗炎调节作用。甘草在凉膈散中非君、臣之药,其缓和硝、黄峻泻之力,调和诸药,但同凉膈散整方在抗炎中起一致作用,本研究对复方中的单味药研究亦提供了有益参考。最后本研究亦证明了斑马鱼浸泡给药方式的有效性和广泛适用性,可为单味中药及复方的抗内毒素活性筛选提供平台,对于中药的研究具有重要意义。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PFALZGRAFF A, WEINDL G. Intracellular lipopolysaccharide sensing as a potential therapeutic target for sepsis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(3):187-197.
- [2] BEUTLER B, RIETSCHEL E T. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2):169-176.
- [3] 贺小举. 转录因子NF- κ B、AP-1在清肺培元颗粒干预免疫低下肺部感染BALB/c小鼠模型免疫与炎症进程中的作用研究[D]. 郑州:河南中医学院, 2014.
- [4] 张亚萌, 张月英, 相宏杰, 等. TLR4/NF- κ B通路在Hp诱导胃癌发生中的作用[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(12):1691-1694.
- [5] 余林中, 刘建新, 胡孔友, 等. 凉膈散对内毒素致急性肺损伤大鼠信号转导与转录激活子1表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(1):43-46.
- [6] 杨丽玲. 斑马鱼内毒素炎症模型建立及中药抗内毒素炎症活性筛选研究[D]. 广州:南方医科大学, 2013.
- [7] ZHOU H, CAO H, ZHENG Y, et al. Liang-Ge-San, a classic traditional Chinese medicine formula, attenuates acute inflammation in zebrafish and RAW 264.7 cells [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249: 112427.
- [8] 张利. 甘草的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 2014, 6(10):147-148.
- [9] 曲晓梅, 金钟太, 尚艳华, 等. 甘草水煎液抗炎作用的实验研究[J]. 实用药物与临床, 2005, 8(5):14-16.
- [10] 于鲁志. 中药甘草抗炎作用药理和临床研究进展[J]. 光明中医, 2017, 32(19):2895-2898.
- [11] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其活性成分抗炎与抗炎机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 261-268.
- [12] JIN Q, LIU H G, MENG Y, et al. Effects of nitidine chloride on angiogenesis in zebrafish embryos development [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2013, 29(11):1602-1605.
- [13] 胡建兰, 邵萌, 余林中. 凉膈散汤剂HPLC-DAD指纹图谱研究[J]. 中草药, 2014, 45(1):50-54.
- [14] 梁军. 刺果甘草的提取及化学成分的研究[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2009, 30(8):978-979.
- [15] TSAO C M, CHEN S J, TSOU M Y, et al. Effect of propofol on vascular reactivity in thoracic aortas from rats with endotoxemia[J]. J Chin Med Assoc, 2012, 75(6):262-268.
- [16] RISSONE A, BURGESS S M. Rare genetic blood disease modeling in zebrafish [J]. Front Genet, 2018, 9:348.
- [17] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446):498-503.
- [18] LEE Y C, WANG T H, CHEN S Y, et al. Management of viral oral ulcers in children using Chinese herbal medicine: A report of two cases [J]. Complement Ther Med, 2017, 32:61-65.
- [19] LEE Y K, KIM S W, PARK J Y, et al. Suppression of human arthritis synovial fibroblasts inflammation using dexamethasone-carbon nanotubes via increasing caveolin-dependent endocytosis and recovering mitochondrial membrane potential [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12:5761-5779.
- [20] 鲍璐璐, 崔立红. TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2019, 28(5): 568-572.
- [21] 王包晟, 吴本升, 蒋峰, 等. 中医药干预TLR4/MyD88/NF- κ B通路治疗溃疡性结肠炎研究综述[J]. 山东中医药大学学报, 2021, 45(4):559-565.
- [22] 余林中, 刘建新, 胡孔友, 等. 凉膈散对内毒素诱导大鼠急性肺损伤模型Toll样受体4表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(4):334-337.
- [23] QIAN C, EMAD A, SIDIROPOULOS N D. A recursive framework for predicting the time-course of drug sensitivity[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):17682.
- [24] 郑凯迪. 斑马鱼Igfals的表达、转录调控及功能研究[D]. 重庆:西南大学, 2010.

[责任编辑 孙丛丛]