

倒心盾翅藤抗炎活性部位对马兜铃酸肾病大鼠肾脏的保护作用

王婉丽¹, 樊 馨¹, 杨亚彬², 李婷婷^{2*}

(1. 西双版纳职业技术学院, 云南 景洪 666100; 2. 西双版纳傣族自治州人民医院, 云南 景洪 666100)

摘要: **目的** 筛选倒心盾翅藤抗炎活性成分, 考察其对马兜铃酸肾病大鼠肾脏的保护作用。**方法** 采用 CCK-8 法评价倒心盾翅藤各个极性部位对 RAW264.7 细胞的毒性, 确定适宜的给药剂量。利用脂多糖 (LPS) 诱导 RAW264.7 细胞复制炎症模型, 给予药物干预后, Griess 法检测 NO 水平, 筛选出具有抗炎活性的部位。采用灌胃关木通水提液的方法复制大鼠马兜铃酸肾病模型, 给予不同剂量倒心盾翅藤提取物 (相当于生药 15、30、60 g/kg) 干预后, BCA 法检测大鼠 24 h 尿蛋白量, ELISA 法检测血清白介素-6 (IL-6)、白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, HE 染色观察肾组织病理变化, Western blot 法检测肾组织 p-p38 MAPK、p-NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 倒心盾翅藤二氯甲烷部位在 12.5~200 μ g/mL 质量浓度范围内对 RAW264.7 未产生细胞毒性。25、50、100 μ g/mL 二氯甲烷部位能抑制 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO ($P<0.05$, $P<0.01$)。倒心盾翅藤二氯甲烷部位各剂量组均降低马兜铃酸肾病大鼠 24 h 尿蛋白量和血清 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平 ($P<0.01$), 减轻肾脏病变程度, 下调 p-p38、p-p65 蛋白表达 ($P<0.01$)。**结论** 倒心盾翅藤二氯甲烷部位具有抗炎作用, 可下调 p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路蛋白表达, 抑制马兜铃酸肾病过程中的炎症反应, 对肾脏发挥保护作用。

关键词: 倒心盾翅藤; 马兜铃酸肾病; RAW264.7 细胞; 炎症; p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3442-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.049

马兜铃酸主要存在于马兜铃科的植物中, 常见于关木通、广防己等药材, 具有抗感染、抗肿瘤、增强细胞免疫等功能^[1-2]。服用含马兜铃酸的中草药或中成药制剂会引起不同程度肾损害, 被称为马兜铃酸肾病^[3-4]。马兜铃酸肾病是一种快速进展的间质性肾炎, 不仅多种炎症细胞在肾脏浸润、聚集和活化, 参与肾小管的损伤过程, 同时伴有多种炎症因子水平上调^[5-6]。因此, 控制过度的炎症反应是对抗马兜铃酸肾毒性的的重要途径。

倒心盾翅藤为傣族常用“解药”, 系金虎尾科植物倒心盾翅藤 *Aspidopterys obcordata* Hemsl. var. *obcordata* 的干燥藤茎, 收载于 2005 年版《云南省中药材标准—傣族药》, 用于治疗急性慢性肾炎, 疗效确切^[7-8]。作为傣医临床用量最大的药材, 倒心盾翅藤受到越来越多的关注, 其化学成分和抗结石、抗肿瘤等生物活性的研究均取得了一定的进展^[9-10]。但是倒心盾翅藤抗炎的活性成分和治疗肾炎的作用尚未完全明确。本研究建立脂多糖 (LPS) 刺激 RAW264.7 细胞炎症反应模型, 对倒心盾翅藤抗炎活性成分进行筛选, 并评价其对马兜铃酸肾病过程中炎症反应的干预作用及机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 220~240 g, 购

自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010], 饲养于中国医学科学院药用植物研究所云南分所 SPF 动物房, 温度 22~28 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水, 经隔离观察、适应环境 5 d 后用于实验。动物实验经云南分所实验动物伦理委员会批准 (伦理号 20190013)。

1.2 细胞 RAW264.7 细胞 (货号 CM0190), 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, 使用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基进行培养, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂^[11]。每 2 d 更换培养基, 细胞融合度达到 80% 以上时进行传代。

1.3 试剂与药物 DMEM 高糖培养基、PBS (美国 HyClone 公司, 批号 AD2496722、AE29431651); 胰酶 (美国 Gibco 公司, 批号 2085646); 胎牛血清 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司, 批号 1919401); LPS (美国 Sigma 公司, 批号 L2880); CCK-8 试剂、NO 检测试剂盒、弗氏完全佐剂 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 C0043、S0021S、P2036); 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、电发光试剂盒、制胶试剂盒、电泳液、转膜液、TBST、二抗 goat anti-mouse、goat anti-rabbit (江苏康为世纪生物科技股份有限公司, 批号 01364、30333、20405、

收稿日期: 2022-05-17

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金 (2018JS666); 云南省高层次卫生计生技术人才培养专项 (H-2017052)

作者简介: 王婉丽 (1986—), 女, 硕士, 讲师, 从事药理学研究。Tel: (0691) 2161858, E-mail: 331533727@qq.com

* 通信作者: 李婷婷, 女, 博士, 副主任药师, 从事生药学研究。Tel: (0691) 2139187, E-mail: xsbnltt@163.com

60447、50439、01438、50451、40427、20426)；大鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α ELISA 检测试剂盒（美国 Invitrogen 公司，批号 KMC0061、BMS6002、BMS607-3）；脱脂奶粉（美国 BD 公司，批号 4239539）；p-p38、p-p65、 β -actin 抗体（美国 OriGene 公司，货号 RC206605、TA325803、TA81100S）；硝酸纤维素膜（德国 Millipore 公司）；多聚甲醛（合肥白鲨生物科技有限公司，批号 BL539A）。醋酸泼尼松片（津药药业股份有限公司，批号 181019）。倒心盾翅藤、关木通均由西双版纳傣族自治州人民医院提供，经西双版纳傣族自治州人民医院李婷婷副研究员分别鉴定为金虎尾科植物倒心盾翅藤 *Aspidopterys obcordata* Hemsl. var. *obcordata*、马兜铃科植物木通马兜铃 *Aristolochia manshuriensis* Kom.。

1.4 仪器 SW-CJ-1F 超净工作台（江苏苏净集团有限公司）；CKX41 型倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；Spectra Max i3 酶标仪（美国 Molecular 公司）；DV 215CD 十万分之一天平（美国 OHAUS 公司）；5200 Multi 全自动荧光图像分析系统、EPS300 电源（天能集团）；脱水机、包埋机、切片机、染色剂（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 倒心盾翅藤不同部位提取物和关木通水提物的制备 倒心盾翅藤饮片粉碎后，加 6 倍量 50% 乙醇回流提取，减压浓缩至稠膏，依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、水萃取，减压干燥获得不同极性提取物，准确称取适量，加二甲基亚砜超声溶解，调整质量浓度为 20 mg/mL。关木通饮片加 8 倍量水回流提取 2 次，每次 2 h，合并药液，减压浓缩至生药量为 2 g/mL。

2.2 RAW264.7 细胞毒性检测 收集对数生长期 RAW264.7 细胞，计数并调整密度为 5.0×10^4 /mL，每孔 200 μ L，接种到 96 孔板中，待细胞贴壁后加入倒心盾翅藤不同部位提取物，质量浓度分别为 12.5、25、50、100、200 μ g/mL，空白孔加入含 1% 二甲基亚砜（DMSO）的 DMEM 培养基，LPS 对照孔加入含 1 μ g/mL LPS 的 DMEM 培养基，各组均设置 3 个复孔，孵育 24 h 后，弃去含药培养基，每孔加入 DMEM 培养基 100 μ L、CCK-8 试剂 10 μ L，继续培养 4 h，于酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度（A），计算细胞存活率。

2.3 RAW264.7 细胞 NO 水平检测 收集对数生长期 RAW264.7 细胞，计数并调整密度为 5.0×10^4 /mL，每孔 200 μ L，接种到 24 孔板中，培养 24 h 后加药进行刺激。给药组细胞加入不同质量浓度倒心盾翅藤提取物（以不影响 RAW264.7 细胞增殖为宜），空白组、LPS 组加入 DMEM 培养基，各组设置 3 个复孔，孵育 6 h 后弃去培养基。除空白组外各孔加入含 1 μ g/mL LPS 的 DMEM 培养基，孵育 24 h，每孔取细胞培养液 50 μ L 于 96 孔板中，加入 Griess Reagent I、II 各 50 μ L，于 540 nm 波长处检测 A，以亚硝酸钠为对照绘制标准曲线，计算 NO 水平。

2.4 动物分组、给药及取材 大鼠随机分为空白组、模型组、阳性组和倒心盾翅藤高、中、低剂量组，每组 10 只。

除空白组外，其余各组大鼠每天灌胃关木通水提液（60 g/kg），连续 5 d^[12]，第 6 天将大鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿液，次日各组分别给药。倒心盾翅藤低、中、高剂量组分别灌胃给予 15、30、60 g/kg 倒心盾翅藤二氯甲烷部位的羧甲基纤维素钠（CMC-Na）混悬液，阳性组灌胃给予 2.7 mg/kg 醋酸泼尼松，空白组、模型组灌胃给予等量 CMC-Na，连续 7 d，末次给药后再次收集 24 h 尿液。大鼠麻醉后腹主动脉取血，全血静置 30 min，3 500 r/min 离心 15 min，取上层血清于-20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测；处死大鼠，取双肾，左肾于 4% 多聚甲醛中固定，右肾经液氮冷冻后于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待测。

2.5 大鼠 24 h 尿蛋白量、血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平检测及肾组织 HE 染色 BCA 法检测大鼠尿液蛋白浓度后，根据尿液体积计算 24 h 尿蛋白量。按照 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 水平。大鼠肾组织经多聚甲醛固定 72 h，按常规程序脱水后包埋于石蜡中，连续失状切片后进行 HE 染色。每个切片随机选取 3 个视野，观察肾脏损伤情况，并参考文献 [13] 报道方法进行 0~4 半定量评分，标准为 0 分，未发生病变；1 分，病变部分 $\leq 20\%$ ；2 分，病变部分 20%~40%；3 分，病变部分 40%~80%；4 分，病变部分 $\geq 80\%$ 。

2.6 Western blot 法检测大鼠肾组织 p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路蛋白表达 提取大鼠肾组织蛋白，BCA 法定量后稀释至同一浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，湿法转膜，根据 Marker 剪取目标条带，经脱脂奶粉溶液封闭后，一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，TBST 清洗 3 次后二抗室温孵育 2 h，TBST 清洗，ECL 试剂孵育 3 min，凝胶成像系统显影，使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值，以内参 β -actin 灰度值进行归一化处理，计算 p-p38、p-p65 蛋白表达。

2.7 统计学分析 通过 Graphpad Prism 6.01 软件进行处理，服从正态分布、方差齐性的数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，组间比较采用单因素方差分析，病理切片评分采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 倒心盾翅藤对 RAW264.7 细胞增殖的影响 如表 1 所示，与空白组比较，100、200 μ g/mL 倒心盾翅藤石油醚部位，200 μ g/mL 二氯甲烷部位，25~200 μ g/mL 正丁醇部位，100、200 μ g/mL 水提部位组细胞存活率降低（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），故将未明显影响 RAW264.7 细胞生长的质量浓度用于后续实验。

3.2 倒心盾翅藤二氯甲烷部位对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞释放 NO 的影响 如表 2 所示，RAW264.7 细胞在正常状态下，释放 NO 水平较低。与空白组比较，LPS 组 RAW264.7 细胞 NO 水平升高（ $P < 0.01$ ），表明细胞炎症反应模型建立成功；与 LPS 组比较，25、50、100 μ g/mL 倒心盾翅藤二氯甲烷部位组 NO 释放量降低（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），表明它可在该浓度范围内剂量依赖性地抑制 LPS 诱导的 NO 释放。

表 1 倒心盾翅藤对 RAW264.7 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
空白组	—	100.00±0.00
倒心盾翅藤石油醚部位组	12.5	101.27±4.56
	25	104.51±5.61
	50	101.80±4.31
	100	79.41±4.79**
	200	52.62±4.64**
倒心盾翅藤二氯甲烷部位组	12.5	103.44±3.54
	25	103.23±4.18
	50	102.27±3.55
	100	104.33±4.02
	200	84.48±6.20**
倒心盾翅藤乙酸乙酯部位组	12.5	102.50±2.46
	25	102.41±4.01
	50	102.97±3.76
	100	100.54±5.01
	200	103.51±5.76
倒心盾翅藤正丁醇部位组	12.5	102.74±3.54
	25	93.04±2.05*
	50	77.99±5.28**
	100	23.58±1.84**
	200	27.91±2.38**
倒心盾翅藤水部位组	12.5	101.12±2.57
	25	103.91±5.78
	50	101.88±4.47
	100	73.04±4.28**
	200	56.37±5.49**

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠 24 h 尿蛋白量、血清炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	24 h 尿蛋白量/mg	IL-1 β / $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	IL-6/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	TNF- α / $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
空白组	0.98±0.23	21.25±4.08	71.60±11.58	22.45±3.08
模型组	5.60±1.31 ^{##}	91.61±9.57 ^{##}	259.91±16.01 ^{##}	119.89±9.24 ^{##}
阳性组	2.56±1.00**	45.24±7.56**	111.94±13.15**	37.98±6.07**
倒心盾翅藤高剂量组	2.64±0.68**	44.59±4.76**	151.71±16.12**	42.83±5.70**
倒心盾翅藤中剂量组	3.29±0.86**	48.16±6.13**	167.50±19.11**	66.08±6.14**
倒心盾翅藤低剂量组	3.39±0.71**	68.09±4.75**	205.64±15.40**	89.38±5.96**

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

3.4 倒心盾翅藤二氯甲烷部位对马兜铃酸肾病大鼠肾组织病理形态的影响 如图 1、表 4 所示，空白组大鼠肾组织无炎性细胞浸润、肾小管上皮结构完整，间质血管无充血、扩张，未见组织纤维化等病理改变；模型组可见肾小管上皮细胞刷毛缘脱落、管腔扩张、水变性、空泡变性、完全坏死，部分肾小球发生萎缩，球囊腔上皮脱落，肾间质存在充血、出血、炎细胞浸润的现象，病理评分高于空白组 ($P<0.01$)；与模型组比较，阳性组、倒心盾翅藤各剂量组大鼠肾小管损伤、变性，肾小球萎缩、间质充血、炎细胞浸润等病理改变有不同程度的减轻，病理评分低于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

3.5 倒心盾翅藤二氯甲烷部位对马兜铃酸肾病大鼠肾组织 p38 MAPK/NF- κ B p65 信号通路蛋白表达的影响 如图 2、

表 2 倒心盾翅藤对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 NO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	NO/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
空白组	—	7.28±2.27
LPS 组	—	71.50±5.27 ^{##}
倒心盾翅藤石油醚部位组	12.5	72.56±5.27
	25	66.77±5.26
	50	63.11±2.57
倒心盾翅藤二氯甲烷部位组	12.5	61.75±6.40
	25	55.25±5.45*
	50	39.52±5.24**
倒心盾翅藤乙酸乙酯部位组	100	23.89±3.49**
	12.5	69.25±3.28
	25	67.84±2.79
倒心盾翅藤正丁醇部位组	50	70.84±2.47
	100	74.88±5.70
	200	64.35±3.12
倒心盾翅藤水部位组	12.5	67.13±6.79
	12.5	66.15±3.60
	25	72.40±6.52
	50	69.21±3.55

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.3 倒心盾翅藤二氯甲烷部位对马兜铃酸肾病大鼠 24 h 尿蛋白量、血清炎症因子水平的影响 如表 3 所示，与空白组比较，模型组大鼠 24 h 尿蛋白量和血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，倒心盾翅藤二氯甲烷部位各剂量组和阳性组 24 h 尿蛋白量、血清炎症因子水平降低 ($P<0.01$)，提示倒心盾翅藤二氯甲烷部位可减轻马兜铃酸引起的肾脏损伤。

表 4 各组大鼠肾组织病理评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	病理评分/分
空白组	1.00±0.00
模型组	3.73±0.45 ^{##}
阳性组	2.17±0.46**
倒心盾翅藤高剂量组	2.13±0.51**
倒心盾翅藤中剂量组	2.73±0.52*
倒心盾翅藤低剂量组	2.73±0.69*

注：与空白组比较，^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

表 5 所示，与空白组比较，模型组大鼠肾组织 p-p38、p-p65 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，倒心盾翅藤二氯甲烷部位各剂量组 p-p38、p-p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，提示倒心盾翅藤抗炎作用与抑制 p38 MAPK/NF- κ B

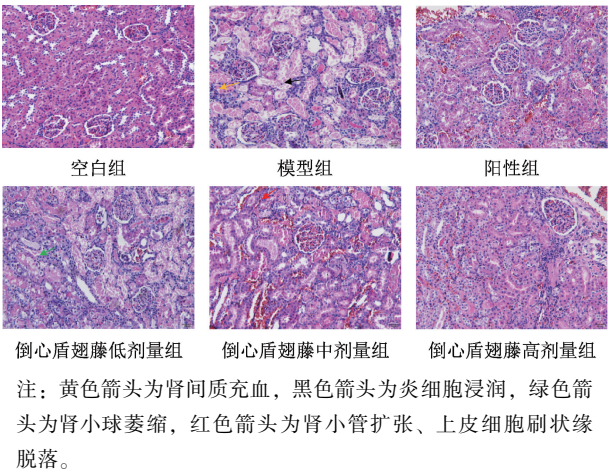
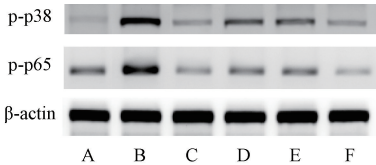


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色 (×200)

p65 信号通路活化、炎症因子产生有关。



注：A 为空白组，B 为模型组，C 为阳性组，D~F 为倒心盾翅藤高、中、低剂量组。

图 2 各组大鼠肾组织 p-p38、p-p65 蛋白条带

表 5 各组大鼠肾组织 p-p38、p-p65 蛋白表达比较 (x̄±s, n=3)

组别	p-p38/β-actin	p-p65/β-actin
空白组	2.55±0.15	31.88±1.79
模型组	55.68±2.03 ^{##}	42.04±2.71 ^{##}
阳性组	11.03±0.46 ^{**}	12.99±1.44 ^{**}
倒心盾翅藤高剂量组	14.08±0.92 ^{**}	10.61±1.38 ^{**}
倒心盾翅藤中剂量组	20.02±1.88 ^{**}	18.49±1.99 ^{**}
倒心盾翅藤低剂量组	23.60±1.88 ^{**}	19.64±2.23 ^{**}

注：与空白组比较，^{##}P<0.01；与模型组比较，^{**}P<0.01。

4 讨论

马兜铃酸肾病是由马兜铃酸引起的肾损伤，主要损伤部位在肾小管，根据病程进展和病变程度可以分为急性型、慢性型和肾小管功能障碍型^[14]。在多种急性型马兜铃肾病的动物模型中，有多个炎症信号转导通路被激活，说明炎症参与了马兜铃酸损伤肾脏过程^[15-17]。本研究利用 LPS 诱导小鼠巨噬细胞 RAW264.7 建立了体外炎症模型^[18]。在活化的 RAW264.7 细胞中 NO 的合成和释放增加，过量 NO 导致细胞损伤、组织坏死，进而促进炎症的发生和发展。经过体外的筛选，倒心盾翅藤二氯甲烷部位可以抑制巨噬细胞的活化，减少 NO 的释放，因此进一步通过体内动物实验研究其对马兜铃酸肾病的肾保护作用。

本研究利用关木通水提物灌胃复制了大鼠急性马兜铃肾病模型，造模 7 d 后，大鼠 24 h 尿蛋白量增加，血清中炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平升高，说明肾脏出现损伤的同时伴有体内的炎症反应。模型组大鼠肾脏病理表现

主要为急性肾小管坏死，肾小管上皮细胞崩解脱落，基底膜形成，细胞碎屑充填肾小管腔，肾间质水肿，细胞浸润。经过阳性药或者倒心盾翅藤二氯甲烷部位干预后，24 h 尿蛋白量和血清中炎症因子水平降低，病理损伤有所减轻，提示倒心盾翅藤二氯甲烷部位的保护作用与抗炎存在一定关联。

p38 MAPK/NF-κB p65 信号通路是炎症反应中重要的信号通路，MAPK 激活后可以通过活化 NF-κB，促进其转位到核内，从而调控靶基因的转录，促使下游多种炎症因子如 IL-1β、IL-6、TNF-α 等表达，诱导炎症反应的发生^[19-20]。本研究结果表明，醋酸泼尼松和倒心盾翅藤二氯甲烷部位干预后，均能下调马兜铃酸肾病大鼠肾组织 p38 和 p65 蛋白的磷酸化水平，从而抑制炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 的合成和释放。

综上所述，倒心盾翅藤二氯甲烷部位能减轻马兜铃酸引起的急性肾脏损伤，该作用与调控 p38 MAPK/NF-κB p65 信号通路，抑制炎症因子的产生相关。

参考文献：

[1] 褚春晓, 朱国福. 马兜铃酸肾病研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2407-2412.

[2] 戴媛媛, 马明华, 汪晓河, 等. 马兜铃酸肾不良反应及质量控制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(10): 1304-1310.

[3] Lord G M, Tagore R, Cook T, et al. Nephropathy caused by Chinese herbs in the UK[J]. Lancet, 1999, 354(9177): 481-482.

[4] 吴艳蓉, 贾凌云, 高福坤, 等. 不同产地辽细辛中马兜铃酸的痕量检测[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(1): 9-10.

[5] 陆红, 陈必成, 胡丽萍, 等. 垂盆草提取物对马兜铃酸致大鼠肾小管上皮细胞损伤的改善作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(6): 988-994.

[6] 刘丹, 徐香山, 周秀华. 马兜铃酸肾病患者 36 例血中炎症介质水平分析[J]. 中国美容医学, 2011, 20(4): 387; 389.

[7] 李海涛, 彭朝忠, 管燕红, 等. 傣药倒心盾翅藤资源调查[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2999-3000.

[8] 宋美芳, 李宜航, 张忠廉, 等. 傣药倒心盾翅藤抗肾结石活性研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(9): 1047-1052.

[9] 雷玉, 梁津豪, 田怡婧, 等. 倒心盾翅藤中的 1 个新鼠李糖苷[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1039-1042.

[10] Li Y H, Ma G X, Lv Y N, et al. Efficacy of obcordata A from *Aspidopterys obcordata* on kidney stones by inhibiting NOX4 expression[J]. Molecules, 2019, 24(10): 1957.

[11] Choi R J, Shin E M, Jung H A, et al. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages[J]. Phytomedicine, 2011, 18(8-9): 677-682.

[12] 裴奇, 刘志红, 陈惠萍, 等. 木通所致大鼠急性肾损伤的实验观察[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999(1): 15-18; 102.

[13] Lee D H, Park M H, Hwang C J, *et al.* CCR5 deficiency increased susceptibility to lipopolysaccharide-induced acute renal injury[J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(5): 1151-1162.

[14] Lebeau C, Arlt V M, Schmeiser H H, *et al.* Aristolochic acid impedes endocytosis and induces DNA adducts in proximal tubule cells[J]. *Kidney Int*, 2001, 60(4): 1332-1342.

[15] 羊红玉, 谭 云, 李 璐, 等. 马兜铃酸经由上调 mGST3 致肾近端小管上皮细胞炎症介质 Cys-LTs 生成[C] //中国毒理学会第五次全国学术大会论文集. 贵阳: 中国毒理学会, 2009: 33.

[16] 杨召聪, 陆 茵, 顾亚琴, 等. 马兜铃酸 I 对大鼠体内 PI3K/Akt/NF-κB 通路的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(3): 250-253.

[17] 金 珂, 李 彤, 郑雪花, 等. 马兜铃酸-I 致 Beagle 犬肝损伤激活 IL-6/STAT3 炎症通路[C] // 中国毒理学会第六届全国毒理学大会论文摘要. 广州: 中国毒理学会, 广东省疾病预防控制中心, 2013: 289.

[18] Sawle P, Foresti R, Mann B E, *et al.* Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264. 7 murine macrophages[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145(6): 800-810.

[19] O'Dea E, Hoffmann A. NF-κB signaling[J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2009, 1(1): 107-115.

[20] 柳亦松, 唐昭山, 刘兆颖, 等. 血根碱对大鼠结肠炎及炎症通路中相关因子的影响[J]. 中国现代中药, 2017, 19(10): 1391-1396.

基于肠道菌-神经递质-脑轴探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对大鼠抑郁症的改善作用

王亚楠^{1,2}, 孙 宏², 王秀珍², 梁国英³, 蔡国锋², 刘 凯², 裴思颖², 张金朋^{1,2*}
(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学附属第二医院, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 基于肠道菌-神经递质-脑轴探讨柴胡加龙骨牡蛎汤对大鼠抑郁症的改善作用。**方法** 将大鼠随机分为正常组、模型组、西药组(盐酸氟西汀 2.06 mg/kg)和中药低、中、高剂量组(柴胡加龙骨牡蛎汤颗粒剂 2.89、5.78、11.56 g/kg)。除正常组外,其他各组大鼠采用慢性不可预见性温和应激(CUMS)建立抑郁模型,持续刺激 49 d,第 29 天开始灌胃给予相应剂量药物。造模、给药结束后,评估大鼠抑郁症相关行为学表现,ELISA 法检测大鼠海马组织神经递质 5-羟色胺(5-HT)、去甲肾上腺素(NE)、乙酰胆碱(Ach)水平。采用 16S rRNA 测序对大鼠粪便菌群结构、组成进行全面表征分析。**结果** 与模型组比较,中药各剂量组大鼠强迫游泳不动时间减少($P<0.05$),水平运动总距离、中央区进入次数、中央区停留时间增加($P<0.05$),海马组织神经递质 5-HT、NE、Ach 水平升高($P<0.05$),肠道菌群 α 多样性降低($P<0.05$),菌群结构向正常组回调,益生菌乳酸杆菌丰度增加($P<0.05$),有害菌大肠埃希氏菌丰度减少($P<0.05$)。肠道菌群与多种行为学指标和神经递质呈一定相关性。**结论** 柴胡加龙骨牡蛎汤可调节肠道菌群,增加乳酸杆菌丰度,减少大肠埃希氏菌,调节抑郁症大鼠脑组织神经递质水平,改善抑郁症状。肠道菌群及其相关的神经递质可能是柴胡加龙骨牡蛎汤治疗抑郁的重要机制。

关键词: 柴胡加龙骨牡蛎汤; 抑郁症; 肠脑轴; 肠道菌群; 神经递质

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)10-3446-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.10.050

抑郁症是现代社会一种普遍的、危及生命的、高度复发的精神疾病,主要表现为快感缺乏、情绪抑郁,导致抑郁症患者的复发率、死亡率和自杀率较高^[1-2],可能成为世界范围内残疾的主要来源^[3]。目前抑郁症的机制研究主要

集中在神经递质减少、下丘脑-垂体-肾上腺轴改变和免疫系统异常等方面^[4-5]。新的证据表明肠道菌群不仅影响胃肠功能,还可通过微生物-肠道-脑轴调节中枢神经系统的生理功能和行为^[6-9]。研究者通过 16S rRNA 基因测序方法发

收稿日期: 2023-06-07

基金项目: 全国中医临床特色技术传承骨干人才培养项目(国中医药人教函[2019]36号); 黑龙江省中医药经典普及化专项课题(ZYW2022-028, ZYW2022-029); 黑龙江省中医药科研项目(ZHY2022-163); 黑龙江省博士后科研启动基金项目(LBH-Q20184); 孙申田青年人才基金项目(2021KY-10)

作者简介: 王亚楠(1989—),女,硕士,主治医师,从事中西医结合防治心脑血管疾病研究。E-mail: wangyamunan1989@126.com

* 通信作者: 张金朋(1987—),男,博士生,主治医师,从事针灸康复防治神经系统疾病研究。E-mail: zhangjinpeng198706@126.com