

引用本文: 申玲君, 张海瑞, 邵伟, 等. 金丝桃苷下调微小RNA-199a对脂多糖诱导的人肺泡上皮细胞的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(2): 217-221. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.002.



◇ 药学研究 ◇

## 金丝桃苷下调微小RNA-199a对脂多糖诱导的人肺泡上皮细胞的影响

申玲君<sup>1</sup>, 张海瑞<sup>1</sup>, 邵伟<sup>1</sup>, 冯振霞<sup>1</sup>, 邬超<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>濮阳市安阳地区医院呼吸与危重症医学科, 河南 安阳 455000;

<sup>2</sup>新疆维吾尔自治区人民医院呼吸内科, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830002

通信作者: 邬超, 男, 主任医师, 研究方向为呼吸与危重症医学, Email: z2c811@163.com

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960005)

**摘要:** **目的** 探讨金丝桃苷对脂多糖(LPS)诱导的人肺泡上皮细胞(HPAEpiC)的影响及分子机制。**方法** 将HPAEpiC分为对照组、模型组、金丝桃苷低、中、高剂量药物组、anti-miR-NC组、anti-miR-199a组、高剂量药物组+miR-NC组、高剂量药物组+miR-199a组。四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )水平;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-199a表达水平;蛋白质印迹(Western blotting)法检测裂解的半胱天冬蛋白酶3(Cleaved-caspase3)、半胱天冬蛋白酶3前体(pro-caspase3)的蛋白表达。**结果** 金丝桃苷处理后, LPS诱导的HPAEpiC中细胞OD值升高, 金丝桃苷低、中、高剂量药物组OD值分别为(0.49 $\pm$ 0.02)、(0.60 $\pm$ 0.03)、(0.72 $\pm$ 0.03), G0/G1期细胞所占比例降低, S期细胞所占比例升高, 细胞凋亡率降低, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低, miR-199a表达水平降低, Cleaved-caspase3表达水平降低, pro-caspase3表达水平升高, 且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );抑制miR-199a表达可抑制LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症因子的释放。且miR-199a过表达逆转了金丝桃苷提取物对LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症因子的作用。**结论** 金丝桃苷可能通过下调miR-199a抑制LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症反应。

**关键词:** 金丝桃属; 金丝桃苷; 微小RNA-199a; 肺泡上皮细胞; 急性肺损伤; 炎症

### Effect of Hypericin on LPS-induced HPAEpiC cells by down-regulating miR-199a

SHEN Lingjun<sup>1</sup>, ZHANG Hairui<sup>1</sup>, SHAO Wei<sup>1</sup>, FENG Zhenxia<sup>1</sup>, WU Chao<sup>2</sup>

*Author Affiliations:*<sup>1</sup>Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Anyang District Hospital, Puyang City, Anyang, Henan 455000 China; <sup>2</sup>Department of Respiratory, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830002, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect and molecular mechanism of hyperoside on HPAEpiC cells induced by LPS. **Methods** Human alveolar epithelial cells (HPAEpiC) were divided into control group, model group, hypericin low, medium and high dose drug group, anti-miR-NC group, anti-miR-199a group, high dose drug group+miR-NC group, high-dose drug group+miR-199a group. Tetramethylazoazole colorimetric method (MTT) was used to detect cell proliferation; flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) level; real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) to detect miR-199a expression; Western blotting method to detect protein expression of cleaved cysteine-containing aspartate-specific proteases 3 (Cleaved-caspase3), caspase 3 precursor (pro-caspase3). **Results** After treatment with low, medium and high doses of hyperoside, the cells OD value in HPAEpiC induced by LPS was increased [(0.49 $\pm$ 0.02), (0.60 $\pm$ 0.03), (0.72 $\pm$ 0.03)], the proportion of cells in G0-G1 phase was decreased, the proportion of cells in S phase was increased, the apoptosis rate was decreased, and the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were decreased, the expression of miR-199a was decreased, the expression of Cleaved-caspase3 was decreased, and the expression of pro-caspase3 was increased, in a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). Inhibition of miR-199a expression can inhibit LPS-induced apoptosis and release of inflammatory factors in HPAEpiC cells. Overexpression of miR-199a reversed the effect of hyperoside extract on LPS-induced apoptosis and inflammatory factors in HPAEpiC cells. **Conclusion** Hypericin may inhibit LPS-induced apoptosis and inflammation of HPAEpiC cells by down-regulating miR-199a.

**Key words:** Hypericum; Hyperoside; MiR-199a; Alveolar epithelial cells; Acute lung injury; Inflammation

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是肺部损伤引起的全身炎症反应,其严重时可发展为急性呼吸

窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),严重威胁患者生命健康<sup>[1]</sup>。研究发现一些中药

和中药单体防治急性肺损伤效果显著<sup>[2-3]</sup>。金丝桃苷是一种重要的天然产物,在各种植物中分布广泛,金丝桃苷具有抗氧化、抗肿瘤、保护心/脑缺血、保肝、免疫调节等作用<sup>[4]</sup>。研究发现金丝桃苷具有改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化作用,且其机制可能与抑制胶原分泌、抑制炎症反应有关<sup>[5]</sup>。金丝桃苷能够抑制肺炎支原体肺炎小鼠的损伤<sup>[6]</sup>。金丝桃苷可能通过抑制 Toll 样受体 4 (toll-like receptors 4, TLR4) 和 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 通路减轻脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 所致的急性肾损伤<sup>[7]</sup>。然而金丝桃苷对急性肺损伤的影响及机制尚不清楚。研究表明肺泡上皮细胞损伤、炎性细胞浸润是 ALI 的病理特点,炎性细胞、肺泡上皮细胞和血管内皮细胞在 ALI 中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。本研究自 2020 年 1—5 月以人肺泡上皮细胞 (HPAEPiC) 为研究对象,探讨金丝桃苷对 LPS 诱导的 HPAEPiC 细胞的凋亡和炎症因子影响及可能的机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** HPAEPiC 购自上海康朗生物科技有限公司;胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;金丝桃苷购自上海源叶生物科技有限公司;四甲基偶氮唑盐比色法 (methyl thiazolyl tetrazolium assay, MTT) 试剂盒购自上海晶抗生物工程有限公司;细胞周期检测试剂盒购自上海贝博生物公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自北京冬歌博业生物科技有限公司;酶联免疫吸附试验 (ELISA) 购自上海钰博生物科技有限公司;荧光定量试剂盒购自上海经科化学科技有限公司;RIPA 蛋白裂解液、二辛可宁酸 (BCA) 试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司。

**1.2 细胞处理与分组** 人肺泡上皮细胞 HPAEPiC 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 37 °C、5% 二氧化碳培养箱培养,在细胞生长至汇合度为 80% 左右时,用 1 μg/mL LPS 处理,作为模型组,正常培养的细胞作为对照组;分别用 2.5 μmol/L、5.0 μmol/L、10.0 μmol/L 金丝桃苷和 1 μg/mL LPS 处理 HPAEPiC,分别为低、中、高剂量药物组。

将 anti-miR-NC、anti-miR-199a 转染至 HPAEPiC 中,分别为 anti-miR-NC 组、anti-miR-199a 组;将 miR-NC、miR-199a 转染至 HPAEPiC 后再用 10.0 μmol/L 金丝桃苷和 1 μg/mL LPS 处理,分别作为高剂量药物组+miR-NC 组、高剂量药物组+miR-199a 组。

**1.3 MTT 检测细胞增殖** 在各组细胞培养至 48 h 时,每孔分别加入 20 μL 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h

后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡反应 10 min 使沉淀溶解,用酶标仪于波长 570 nm 处检测吸光度 (OD) 值。

**1.4 流式细胞仪检测细胞周期** 收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,离心沉淀细胞,弃上清;然后重悬细胞,加入预冷的 80% 乙醇固定;用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入核糖核酸酶 A (RNase A),37 °C 孵育 30 min,加入碘化啉 (PI) 染色液,4 °C 染色 15 min,上机检测激发波长 488 nm 处红色荧光,用流式细胞仪和 DNA 细胞周期分析软件对细胞周期进行分析。

**1.5 流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞培养 48 h 后用预冷的 PBS 漂洗 2 次,然后加入 10 μL 的 Annexin V-FITC,再加入 5 μL 的 PI,混匀后避光孵育 10 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.6 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、白细胞介素-1β (IL-1β) 水平** 各组细胞培养 48 h 后取上清,具体按照试剂盒操作进行检测。

**1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 miR-199a 表达水平** 各组细胞培养 48 h 后提取细胞总 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA,进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 30 s,55 °C 30 s;72 °C 45 s,共 40 个循环;60 °C 延长 5 min。相对表达量采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。miR-199a 以 U6 为内参,miR-199a 正向引物序列:5'-ACACTCCAGCTGGGCCAGTGTTCAGACTAC-3',反向引物序列:5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3';U6 正向引物序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向引物序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

**1.8 蛋白质印迹 (Western blotting) 法检测半胱天冬蛋白酶 3 (Cleaved-caspase3)、半胱天冬蛋白酶 3 前体 (pro-caspase3) 蛋白表达** 提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒进行定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min,加入相应的一抗,4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次;再加入二抗室温孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次,在暗室中曝光显影,定影,将胶片用 Quantity One 凝胶分析软件处理,测定各组蛋白条带的灰度值,以目的条带和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 条带的比值作为蛋白表达水平。

**1.9 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 金丝桃苷对 LPS 诱导的 HPAEPiC 细胞活力的影响** 与对照组 (0.81±0.04) 相比,模型组细胞 OD

值(0.35±0.02)降低( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组细胞OD值[(0.49±0.02)、(0.60±0.03)、(0.72±0.03)]升高,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组(0.36±0.02)相比,anti-miR-199a组细胞OD值(0.64±0.03)升高( $P<0.05$ );与高剂量药物组+miR-NC(0.72±0.03)相比,高剂量药物组+miR-199a组细胞OD值(0.42±0.02)降低( $P<0.05$ )。

**2.2 金丝桃苷对LPS诱导的HPAEpiC细胞周期的影响** 与对照组相比,模型组G0-G1期细胞所占比例升高,S期细胞所占比例降低( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组G0-G1期细胞所占比例降低,S期细胞所占比例升高,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组相比,anti-miR-199a组G0-G1期细胞所占比例降低,S期细胞所占比例升高( $P<0.05$ );与高剂量药物组+miR-NC相比,高剂量药物组+miR-199a组G0-G1期细胞所占比例升高,S期细胞所占比例降低( $P<0.05$ );各组G2-M期细胞所占比例无明显变化( $P>0.05$ )。见表1。

表1 金丝桃苷对HPAEpiC细胞周期的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	G0-G1	S	G2-M
对照组	3	33.17±1.10	33.30±1.27	33.53±1.00
模型组	3	49.20±1.13 <sup>①</sup>	17.57±0.44 <sup>①</sup>	33.23±0.72
低剂量药物组	3	46.15±0.80 <sup>②</sup>	20.55±0.68 <sup>②</sup>	33.30±0.70
中剂量药物组	3	42.81±0.64 <sup>②③</sup>	23.50±0.47 <sup>②③</sup>	33.69±0.43
高剂量药物组	3	38.41±0.54 <sup>②③④</sup>	28.48±0.50 <sup>②③④</sup>	33.11±0.73
anti-miR-NC	3	49.21±1.19	17.54±0.45	33.25±0.69
anti-miR-199a	3	40.79±0.63 <sup>⑤</sup>	26.11±0.61 <sup>⑤</sup>	33.10±0.76
高剂量药物组+miR-NC	3	38.44±0.51	28.50±0.52	33.06±0.77
高剂量药物组+miR-199a	3	48.29±0.73 <sup>⑤⑥</sup>	19.38±0.42 <sup>⑤⑥</sup>	32.33±0.65
F值		135.49	222.27	0.81
P值		0.000	0.000	0.602

注:①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与低剂量药物组相比, $P<0.05$ ;④与中剂量药物组相比, $P<0.05$ 。⑤与anti-miR-NC组相比, $P<0.05$ 。⑥与高剂量药物组+miR-NC相比, $P<0.05$ 。

**2.3 金丝桃苷对LPS诱导的HPAEpiC凋亡的影响** 与对照组(8.02±0.32)%相比,模型组细胞凋亡率(24.20±0.43)%升高( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组细胞凋亡率[(20.51±0.40)%、(17.67±0.37)%、(12.63±0.32)%]降低,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组(24.26±0.35)%相比,anti-miR-199a组细胞凋亡率(14.36±0.29)%降低

( $P<0.05$ );与高剂量药物组+miR-NC(12.65±0.32)%相比,高剂量药物组+miR-199a组细胞凋亡率(22.09±0.34)%升高( $P<0.05$ )。

**2.4 各分组处理对LPS诱导的HPAEpiC炎症因子的影响** 与对照组相比,模型组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平升高( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组相比,anti-miR-199a组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低( $P<0.05$ );与高剂量药物组+miR-NC相比,高剂量药物组+miR-199a组TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平升高( $P<0.05$ )。见表2。

表2 各分组处理HPAEpiC中炎症因子影响/(ng/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	重复次数	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$
对照组	3	69.43±4.26	101.70±3.77
模型组	3	411.49±10.02 <sup>①</sup>	474.90±6.54 <sup>①</sup>
低剂量药物组	3	343.26±5.69 <sup>②</sup>	377.49±4.47 <sup>②</sup>
中剂量药物组	3	286.83±4.32 <sup>②③</sup>	329.49±2.30 <sup>②③</sup>
高剂量药物组	3	171.55±5.76 <sup>②③④</sup>	242.51±3.85 <sup>②③④</sup>
anti-miR-NC	3	413.17±7.13	478.18±5.66
anti-miR-199a	3	222.58±3.25 <sup>⑤</sup>	274.44±2.39 <sup>⑤</sup>
高剂量药物组+miR-NC	3	172.36±4.96	242.03±2.61
高剂量药物组+miR-199a	3	381.13±3.41 <sup>⑤⑥</sup>	427.83±4.78 <sup>⑤⑥</sup>
F值		1348.53	2622.50
P值		0.000	0.000

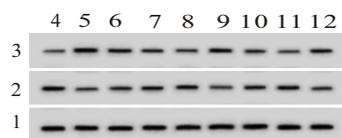
注:TNF- $\alpha$ 为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ 为白细胞介素-1 $\beta$ 。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组相比, $P<0.05$ 。③与低剂量药物组相比, $P<0.05$ 。④与中剂量药物组相比, $P<0.05$ 。⑤与anti-miR-NC组相比, $P<0.05$ 。⑥与高剂量药物组+miR-NC相比, $P<0.05$ 。

**2.5 各分组处理对LPS诱导的HPAEpiC中miR-199a的影响** 与对照组(0.96±0.07)相比,模型组miR-199a表达水平(2.63±0.13)升高( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组miR-199a表达水平降低[(2.06±0.09)、(1.63±0.08)、(1.28±0.08)],且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组(2.62±0.12)相比,anti-miR-199a组miR-199a表达水平(1.19±0.08)降低( $P<0.05$ );与高剂量药物组+miR-NC(1.30±0.09)相比,高剂量药物组+miR-199a组miR-199a表达水平(2.21±0.12)升高( $P<0.05$ )。

**2.6 各分组处理对LPS诱导的HPAEpiC中Cleaved-caspase3和pro-caspase3蛋白表达的影响** 与对照组相比,模型组Cleaved-caspase3表达水平升高,pro-caspase3表达水平降低( $P<0.05$ );与模型组相比,低、中、高剂量药物组Cleaved-caspase3表达水平降低,pro-caspase3表达水平升高,且呈剂量依赖性( $P<0.05$ );与anti-miR-NC组相比,anti-miR-199a组Cleaved-caspase3表达水平降低,pro-cas-

pase3 表达水平升高 ( $P<0.05$ ); 与高剂量药物组 + miR-NC 相比, 高剂量药物组 + miR-199a 组 Cleaved-caspase3 表达水平升高, pro-caspase3 表达水平降低 ( $P<0.05$ )。见图 1, 表 3。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—半胱天冬蛋白酶3前体(pro-caspase3); 3—半胱天冬蛋白酶3(Cleaved-caspase3); 4—对照组; 5—模型组; 6—低剂量药物组; 7—中剂量药物组; 8—高剂量药物组; 9—anti-miR-NC; 10—anti-miR-199a; 11—高剂量药物组+miR-NC; 12—高剂量药物组+miR-199a。

图1 Cleaved-caspase3和pro-caspase3蛋白的表达

表3 各分组处理HPAEpiC中半胱天冬蛋白酶3(Cleaved-caspase3)和半胱天冬蛋白酶3前体(pro-caspase3)蛋白表达 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Cleaved-caspase3	pro-caspase3
对照组	3	0.13±0.01	0.82±0.05
模型组	3	0.79±0.05 <sup>①</sup>	0.21±0.02 <sup>①</sup>
低剂量药物组	3	0.52±0.04 <sup>②</sup>	0.36±0.02 <sup>②</sup>
中剂量药物组	3	0.38±0.03 <sup>②③</sup>	0.49±0.03 <sup>②③</sup>
高剂量药物组	3	0.24±0.02 <sup>②③④</sup>	0.64±0.03 <sup>②③④</sup>
anti-miR-NC	3	0.78±0.05	0.22±0.02
anti-miR-199a	3	0.33±0.02 <sup>⑤</sup>	0.55±0.03 <sup>⑤</sup>
高剂量药物组+miR-NC	3	0.25±0.02	0.64±0.04
高剂量药物组+miR-199a	3	0.63±0.03 <sup>⑤⑥</sup>	0.28±0.02 <sup>⑤⑥</sup>
F值		162.70	146.80
P值		0.000	0.000

注: ①与对照组相比,  $P<0.05$ 。②与模型组相比,  $P<0.05$ 。③与低剂量药物组相比,  $P<0.05$ ; ④与中剂量药物组相比,  $P<0.05$ 。⑤与anti-miR-NC组相比,  $P<0.05$ 。⑥与高剂量药物组+miR-NC相比,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

急性肺损伤是临床重大呼吸系统疾病之一, 其发病机制复杂, 肺泡炎性细胞浸润是其重要病理改变; 研究发现中医药可防治急性肺损伤, 研究其发病机制可为急性肺损伤临床治疗及药物研发提供方向和参考<sup>[9-10]</sup>。研究报道金丝桃苷能够保护过氧化氢诱导的A549细胞氧化损伤<sup>[11]</sup>。金丝桃苷可保护肾脏免于衰老和损伤<sup>[12]</sup>。金丝桃苷可抑制LPS诱导的人脐静脉内皮细胞炎症和细胞凋亡<sup>[13]</sup>。金丝桃苷通过激活PPAR- $\gamma$ 可减轻急性肝损伤小鼠和LPS诱导的RAW264.7细胞中的炎症<sup>[14]</sup>。本实验结果显示, 低中、高剂量金丝桃苷处理后, LPS诱导的HPAEpiC中细胞OD值升高, G0-G1期细胞所占比例降低, S期细胞所占比例升高, 细胞凋亡率降低, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平降低, Cleaved-caspase3表达水平

降低, pro-caspase3表达水平升高, 且呈剂量依赖性。表明金丝桃苷可剂量依赖地抑制LPS诱导的HPAEpiC凋亡和炎症反应。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一种非编码RNA, miRNA可能参与其发病过程, 为早期诊断和预后判断提供新的思路<sup>[15]</sup>。miR-199a是一种新型基因调节剂, 在炎症和肺损伤中具有重要作用, 研究报道LPS可以上调肺泡巨噬细胞中miR-199a的表达, miR-199a的下调可能通过抑制过度的炎症反应和抑制肺组织中细胞凋亡, 减轻败血症诱导的急性肺损伤<sup>[16]</sup>。SNHG12过表达通过靶向miR-199a抑制了氧葡萄糖剥夺/复氧后脑微血管内皮细胞的凋亡和炎症反应<sup>[17]</sup>。本实验结果显示, LPS诱导的HPAEpiC中miR-199a高表达, 抑制miR-199a表达可抑制LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症因子的释放。与前人研究结果相符。且本实验还发现低中、高剂量金丝桃苷处理后, LPS诱导的HPAEpiC中miR-199a表达水平降低, 且miR-199a过表达逆转了金丝桃苷提取物对LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症因子的作用。

综上所述, 金丝桃苷可能通过下调miR-199a抑制LPS诱导的HPAEpiC细胞凋亡和炎症反应。

### 参考文献

- [1] 朱凯锐, 赵航. 急性肺损伤机制研究进展[J]. 医学理论与实践, 2018, 31(19): 2872-2874, 2925.
- [2] 李开瑞, 宋岚, 刘洁. 中药防治急性肺损伤实验研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, 15(6): 175-177.
- [3] 苏景深, 刘恩顺, 赵鑫民. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医药治疗研究进展[J]. 吉林中医药, 2019, 39(5): 696-700.
- [4] 杨诗婷, 王晓倩, 廖广辉. 金丝桃苷的药理作用机制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 947-951.
- [5] 韩云雪, 李丽梅, 石洁琼. 金丝桃苷对博来霉素诱导肺纤维化小鼠作用及机制[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(9): 1237-1241.
- [6] 申冬冬, 侯江红, 袁飞. 金丝桃苷抑制肺炎支原体肺炎模型小鼠的损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(5): 884-889.
- [7] 巩春智. 金丝桃苷对脂多糖所致小鼠急性肾损伤的保护作用及其机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2019.
- [8] 瞿利花, 陈超, 陈阳晔, 等. 自噬在急性肺损伤炎症中的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(6): 14-17.
- [9] 李小茜, 杨爱东. 急性肺损伤发病机制及中医辨证治疗的思考[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2018, 25(1): 9-14.
- [10] 凌亚豪, 张飘飘, 王爱平, 等. 天然产物对急性肺损伤保护的药理作用及研究进展[J]. 食品与药品, 2018, 20(1): 53-60.
- [11] 高健美, 李德芬, 牛爽, 等. 金丝桃苷对过氧化氢诱导的A549细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 128-133.
- [12] LIU B, TU Y, HE W, et al. Hyperoside attenuates renal aging and injury induced by D-galactose via inhibiting AMPK-ULK1 signaling-mediated autophagy [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(12): 4197-4212.

- [13] ZHOU YQ, ZHAO YT, ZHAO XY, et al. Hyperoside suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Curr Med Sci*, 2018, 38(2): 222-228.
- [14] HUANG C, YANG Y, LI WX, et al. Hyperin attenuates inflammation by activating PPAR- $\gamma$  in mice with acute liver injury (ALI) and LPS-induced RAW264.7 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 29(2): 440-447.
- [15] 蒋勇,王康安,朱邦晖,等.微小RNA对急性肺损伤或急性呼吸窘迫综合征病理作用的研究进展[J/OL]. *中华重症医学电子杂志(网络版)*, 2018,4(1):69-74.DOI:10.3877/cma.j.issn.2096-1537.2018.01.015.
- [16] LIU Y, GUAN H, ZHANG JL, et al. Acute downregulation of miR-199a attenuates sepsis-induced acute lung injury by targeting SIRT1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4): C449-C455.
- [17] LONG FQ, SU QJ, ZHOU JX, et al. LncRNA SNHG12 ameliorates brain microvascular endothelial cell injury by targeting miR-199a[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(11): 1919-1926.

(收稿日期:2020-07-01,修回日期:2020-08-16)

引用本文:何瑞婷,朱华,黎理,等.瑶药材犁头草质量标准研究[J].安徽医药,2022,26(2):221-224.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.02.003.



◇ 药学研究 ◇

## 瑶药材犁头草质量标准研究

何瑞婷,朱华,黎理,张淼,谢凤凤,黄飘玲,杨雯琪,董雪静

作者单位:广西中医药大学、广西壮瑶药重点实验室,广西壮族自治区 南宁 530200

通信作者:朱华,男,教授,博士生导师,研究方向为中药及民族药的鉴定与开发,Email: zhuhuagx@163.com

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260620、81460587);广西壮瑶药重点实验室(桂科基字[2014]32号);壮瑶药协同创新中心(桂教科研[2013]20号);广西一流学科中药学(民族药学)(桂教科研[2018]12号);广西重点学科(壮药学)(桂教科研[2013]16号);第八批广西壮族自治区特聘专家项目(桂人才通字[2019]13号);第一批“港澳台英才”入桂计划项目(桂科智字[2019]42号);广食品药品监督管理局瑶药材质量标准第二卷(YJJ17007、YJJ17008、YJJ17014);广西中医药大学硕士研究生科研创新项目(YCSY20190038)

**摘要:** 目的 建立瑶药材犁头草的质量标准。方法 从性状、显微、薄层色谱(TLC)方面对12个批次犁头草进行定性鉴别,按照药典方法测定药材水分、总灰分及酸不溶性灰分、浸出物。结果 各鉴别方法专属性强,12批犁头草药材色谱与对照品色谱在相同位置,显相同颜色的荧光斑点;药材水分为8.72%~11.61%,总灰分为10.03%~18.31%,酸不溶性灰分为1.17%~5.91%,纯水浸出物含量为29.06%~37.16%。结论 该研究建立的质量标准可用于瑶药材犁头草的质量评价。

**关键词:** 堇菜属; 医学,传统; 瑶药材; 犁头草; 显微鉴别; 薄层鉴别; 质量标准; 瑶族

### Study on quality standard of *Violae inconspicuae herba*

HE Ruiting, ZHU Hua, LI Li, ZHANG Miao, XIE Fengfeng, HUANG Piaoling, YANG Wenqi, DONG Xuejing

Author Affiliation: Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530200, China

**Abstract:** **Objective** To establish the quality standard of Yao medicine *Violae inconspicuae herba*. **Methods** Twelve batches of *Viola inconspicua* Blume were identified in respects of properties, microscopic characteristics and TLC. According to the Pharmacopoeia method, moisture, total ash, acid insoluble ash and extractives were determined. **Results** Identification methods were highly specific. The chromatogram of 12 batches of *Viola inconspicua* Blume. presented the fluorescence spots of the same colors as the control at the corresponding position. The contents of moisture, total ash, acid-insoluble ash, water-soluble extract were 8.72%-11.61%, 10.03%-18.31%, 1.17%-5.91%, and 29.06%-37.16%, respectively. **Conclusion** The established standard can be used for quality evaluation of Yao medicine *Violae inconspicuae herba*.

**Key words:** Viola; Medicine, traditional; Yao medicine; *Violae inconspicuae herba*; Microscopic identification; TLC; Quality standard; Yao zu

犁头草为堇菜科堇菜属植物长萼堇菜 *Viola inconspicua* Blume. 的新鲜或干燥全草,其药用始载于《履巉岩本草》<sup>[1]</sup>,生于林缘、山坡草地、田边及溪旁

等处,主要分布在浙江、江西、湖北、湖南、广东、广西等地<sup>[2]</sup>。瑶药名音译为“穷雷随咪”,瑶医认为其具有清热解毒、散瘀消肿的功效,用于治疗淋浊、黄