

基于纳米技术研究葶苈子炭治疗急性肺损伤的物质基础及其机制

赵玉升¹, 李伟洋^{2#}, 曹天佑³, 陈玉民¹, 白雪¹, 张盈¹, 吴同³, 屈会化^{4*}, 赵琰^{1*}

1. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029
2. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
4. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

摘要: **目的** 在葶苈子炭 *Descurainiae Semen Carbonisatum* (DSC) 中发现并分离出新型纳米类成分, 并利用脂多糖致大鼠急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 模型来研究其保护作用及其可能机制。 **方法** 利用马弗炉高温炭化葶苈子, 并对炭化产物进行提取分离和透析得到一种水溶性的纳米类成分, 命名为葶苈子炭纳米类成分 (DSC nano-component, DSC-NCs)。采用透射电子显微镜 (TEM)、X 射线光电子能谱 (XPS) 等对 DSC-NCs 进行表征, 并利用 CCK-8 实验来评价 DSC-NCs 的安全性。同时, 利用脂多糖诱导 ALI 大鼠模型来评价 DSC-NCs 的保护作用, 通过观察肺组织病理学形态, 测定血清中细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量的变化以及肺组织中氧化损伤超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛的变化情况, 研究 DSC-NCs 对大鼠 ALI 的保护作用及其可能机制。 **结果** TEM 结果显示 DSC-NCs 外观形貌近球形, 分散度良好, 主要集中在 2.5~6.5 nm, 晶格间距为 0.224 nm。XPS 分析显示 DSC-NCs 中含有 C、O、N 等元素, 其中 C、O 元素占主导地位, 结合红外光谱可以发现其表面官能团丰富, 含有大量的羟基、羧基等基团。此外, 细胞毒性实验显示 DSC-NCs 的安全剂量在 500 $\mu\text{g/mL}$ 以内。动物实验结果显示, DSC-NCs 治疗组的肺组织破坏程度和炎性细胞浸润状态得到有效缓解, DSC-NCs 能明显降低大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平, 升高 SOD 活性和减少丙二醛含量。 **结论** DSC-NCs 对脂多糖诱导的大鼠 ALI 具有一定的保护作用, 初步探讨其作用机制与抑制炎症细胞因子的分泌和减轻过度的氧化应激水平相关。这不仅为探索炭药的物质基础提供了新的见解, 也为 ALI 疾病治疗药物的研究开发提供了新的途径。

关键词: 葶苈子炭; DSC-NCs; CCK-8; 脂多糖; 急性肺损伤; 炎症因子; 氧化应激

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)20-6188-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.008

Material basis and mechanism of *Descurainiae Semen Carbonisatum* in treatment of acute lung injury based on nanotechnology

ZHAO Yu-sheng¹, LI Wei-yang², CAO Tian-you³, CHEN Yu-min¹, BAI Xue¹, ZHANG Ying¹, WU Tong³, QU Hui-hua⁴, ZHAO Yan¹

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
2. Luohe Medical College, Luohe 462002, China
3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To discover and isolate a new nano-components in *Descurainiae Semen Carbonisatum* (DSC-NCs), and evaluate its protective effect and its possible mechanism through lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) model.

Methods A muffle furnace was used to carbonize Tinglizi (*Descurainiae Semen*), and the carbonized product was extracted, separated

收稿日期: 2021-05-13

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2019-JYB-TD-001)

作者简介: 赵玉升, 男, 博士研究生, 中医临床基础专业, 研究方向为经方现代应用的基础研究。E-mail: 16688091339@163.com

*通信作者: 屈会化 (1966—), 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为经方现代应用的基础研究。

Tel: (010)64286705 E-mail: quhuihuadr@163.com

赵琰 (1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经方现代应用的基础研究。Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@163.com

#共同第一作者: 李伟洋, 男, 硕士, 研究方向为经方现代应用的基础研究。E-mail: 956184165@qq.com

and dialyzed to obtain a water-soluble nano-component, named *Descurainiae Semen Carbonisatum* nano-components (DSC-NCs). Modern instruments such as transmission electron microscope (TEM) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were used to characterize DSC-NCs, and CCK-8 experiments were used to evaluate the safety of DSC-NCs. At the same time, the LPS-induced ALI rat model was used to evaluate the protective effect of DSC-NCs. The pathological morphology of lung tissue and the cytokine content changes of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in oxidative damage of lung tissue were observed to study the protective effect of DSC-NCs on ALI in rats and its possible mechanism. **Results** TEM results showed that the DSC-NCs had a nearly spherical appearance and good dispersion, mainly concentrated in the range of 2.5—6.5 nm, with a lattice spacing of 0.224 nm. XPS analysis showed that DSC-NCs contained C, O, N and other elements, of which C and O were the dominant elements. Combined with infrared spectroscopy, it could be found that the surface functional groups were rich, containing a large number of hydroxyl, carboxyl and other groups. In addition, cytotoxicity experiments showed that the safe dose of DSC-NCs was within 500 $\mu\text{g/mL}$. The results of animal experiments showed that the degree of lung tissue destruction and inflammatory cell infiltration in the DSC-NCs treatment group were effectively alleviated. DSC-NCs could significantly reduce the levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in rat serum, increase the activities of SOD and reduce the content of MDA. **Conclusion** DSC-NCs had a certain protective effect on LPS-induced ALI in rats. The preliminary study of its mechanism was related to inhibiting the secretion of inflammatory cytokines and reducing excessive oxidative stress. This research not only provides new insights for exploring the material basis of charcoal drugs, but also provides a new way for the research and development of therapeutic drugs for ALI diseases.

Key words: *Descurainiae Semen Carbonisatum*; DSC-NCs; CCK-8; lipopolysaccharide; acute lung injury; inflammatory factors; oxidative stress

葶苈子系十字花科播娘蒿属植物播娘蒿 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 或独行菜 *Lepidium apetalum* Willd. 的干燥成熟种子。性辛、苦，大寒。归肺、膀胱经，具有泻肺平喘、利水消肿之功效^[1]。《伤寒杂病论》中更是将葶苈子用于治疗肺病、结胸、支饮等肺系疾病。

碳量子点是一类新兴的以碳为骨架的纳米材料，具有光稳定性好、毒性小、生物相容性好、水分散性好等优点^[2-3]。由于这些优势，碳量子点在生物成像^[4]、药物传递^[5]、纳米医学^[6]等多个领域引起了广泛关注。值得注意的是，由于碳量子点具有显著的优势，其相关应用开发为发现有效控制或治疗某些疾病的新一代药物提供了许多策略。碳量子点的相关生物活性如止血^[7]、抗炎^[8]、抗菌^[9]和抗肿瘤^[10]等已经得到广泛研究，引起了国内外科学家的广泛关注，以期研究碳量子点的其他医药和生物医学应用。

本研究从纳米材料学角度出发，发现葶苈子经过高温炮制后产生了一种新的物质，将其命名为葶苈子炭纳米类成分 (*Descurainiae Semen Carbonisatum* nano-components, DSC-NCs)，利用低分辨透射电镜 (TEM)、高分辨透射电镜 (HR-TEM) 和 X 射线衍射仪 (XRD) 对 DSC-NCs 的微观结构进行表征，进一步利用 HPLC 排除小分子存在的干扰性，利用紫外光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱 (FTIR)、

X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 等方法来获取 DSC-NCs 的化学基团信息。经过分析发现该成分符合纳米材料中碳量子点的基本特征，且有报道表明碳量子点治疗急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 具有广泛的应用前景。因此，本研究利用脂多糖诱导大鼠 ALI，探究 DSC-NCs 对 ALI 的保护作用及其保护机制，以期为临床治疗 ALI 提供新的药物和策略。

1 仪器与材料

1.1 仪器

PXR-9 马弗炉，北京中科澳博科技股份有限公司；JEN-1230 高分辨透射电子显微镜，日本电子株式会社；F-4500 荧光分光光度计，日本 Hitachi 公司；D8-Advanced X 射线衍射仪，德国 Bruker AXS 公司；CECIL 紫外分光光度计，英国 Cambridge 公司；Agilent 1260 系列高效液相色谱仪，美国 Agilent Technologies 公司；TecnaiG220 透射电子显微镜 (TEM)，美国 FEI 公司；JEN-1230 傅立叶变换红外光谱仪和 Escalab 250Xi X 射线光电子能谱分析仪，美国 Thermo 公司。

1.2 药品和试剂

葶苈子，产地河北，批号 200723002，经北京中医药大学赵琰教授鉴定，为十字花科播娘蒿属植物播娘蒿 *D. sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 的干燥成熟种子，采购于北京仟草中药饮片有限公司；地塞米松，

规格 0.75 mg/片, 批号 H33020822, 购于浙江仙琚制药股份有限公司; 脂多糖与 10% 组织固定液购于北京拜尔迪生物技术有限公司; 相对分子质量 (M_w) 1000 透析膜购于北京瑞达恒辉科技发展有限公司; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒、IL-1 β ELISA 试剂盒、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒均购于武汉云克隆科技股份有限公司; 考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、丙二醛试剂盒等均购买于南京建成生物工程研究所; 乙醇和其他分析级化学试剂均购于北京化学试剂公司; 双蒸水与蒸馏水购买于北京拜尔迪生物技术有限公司, 去离子水由北京中医药大学科研逸夫楼提供。

1.3 动物和细胞

SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只, 体质量 (200.0 $\pm$ 10.0) g, 质量合格证编号为 110324201102996362。实验动物均购于北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司。实验环境为北京中医药大学西校区动物房屏障系统, 保持室温 (24.0 $\pm$ 1.0) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 55%~65%, 12 h 明暗交替, 通风良好, 饲养期间内自由进水、进食, 实验前 12 h 小鼠禁食不禁水。本实验相关动物实验遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。人肺泡腺癌基底上皮 A549 细胞购自国家实验细胞资源共享平台。

2 方法与结果

2.1 DSC-NCs 的制备

称取葶苈子干燥药材 480 g, 放于坩埚中, 铝箔纸密封并加盖于马弗炉中烧制。马弗炉程序升温: 第 1 阶段 5 min 升温至 70 $^{\circ}\text{C}$, 保温 25 min; 第 2 阶段 25 min 升温至 350 $^{\circ}\text{C}$, 保温 1 h。将烧制好的葶苈子炭置于中药粉碎机中粉碎。称取炭粉末 100 g, 加入 1800 mL 去离子水中煎煮 3 次, 温度为 100 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 1 h。然后使用 0.22 μm 微孔滤膜将煎煮液进行滤过, 合并 3 次滤液, 浓缩并选用 M_w 1000 的透析膜透析 7 d, 烘干后获取粉末 20 mg, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 留置待用。

2.2 HPLC 分析

利用 HPLC 比较所获得的 DSC-NCs 和葶苈子生药在成分上的区别。称取葶苈子生药 2 g, 加入 40 mL 甲醇超声处理 30 min, 获得甲醇提取液。将上述制备的 DSC-NCs 用水稀释至 2 g/mL (按炭药量计算), 获得 DSC-NCs 稀释液。所有样品使用 0.22

μm 微孔滤膜滤过后再进样。

色谱条件^[11]: 高效液相色谱仪采用四元泵-二极管阵列检测器, 自动进样器; 色谱柱为 Reliasil-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 1% 磷酸水溶液-乙腈, 等度洗脱程序: 0~12 min, 10% 乙腈; 12~18 min, 10%~14% 乙腈; 18~30 min, 14%~19% 乙腈; 30~35 min, 19% 乙腈; 35~40 min, 19%~25% 乙腈; 40~50 min, 25% 乙腈; 进样量 10.0 μL ; 体积流量为 1 mL/min; 检测波长设定为 330 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

经过高温炭化、煎煮、滤过、浓缩、透析后获得 DSC-NCs 溶液, 利用 HPLC 比较 350 $^{\circ}\text{C}$ 下制备的 DSC-NCs 溶液和葶苈子生药乙醇提取液的成分差异。如图 1 所示, 葶苈子乙醇提取液中可以观察到一系列峰, 说明含有苷类化合物等小分子化合物。而与之形成鲜明对比的是, 经过透析后的 DSC-NCs 溶液中观察不到小分子的存在, 说明 DSC-NCs 溶液在经过透析过程后的小分子成分已经不存在了。经过 HPLC 的观察对比, 在一定程度上排除了小分子化合物的干扰。

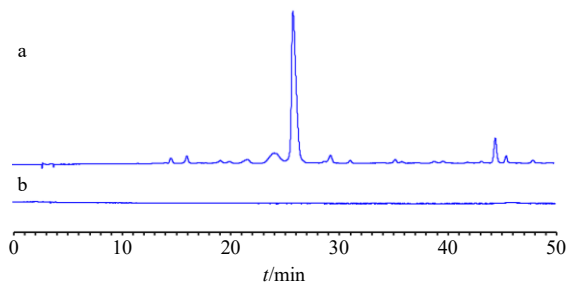


图 1 葶苈子 (a) 和 DSC-NCs (b) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC profile of *Descurainiae Semen* (a) and DSC-NCs (b)

2.3 DSC-NCs 的表征

利用 TEM、HR-TEM 和 XRD 来获取 DSC-NCs 的形貌大小、粒径分布和晶格间距等微观结构信息; 利用紫外光谱和荧光光谱来获取 DSC-NCs 的光学特征信息; 利用 FTIR 来获取 DSC-NCs 表面的官能团信息; 利用 XPS 来分析 DSC-NCs 中所含有元素及其可能连接方式。

图 2-a 为 DSC-NCs 低分辨电镜表征结果, 可以看出, DSC-NCs 外观形貌近球形, 用 Image J 软件对 200 个颗粒进行统计分析, 结果为该纳米类成分的粒径分布在 2.5~6.5 nm, 符合正态分布。图 2-c 为 DSC-NCs 的高分辨透射电镜表征结果, DSC-NCs 晶格分布明显, 晶格间距为 0.224 nm。利用 XRD 进

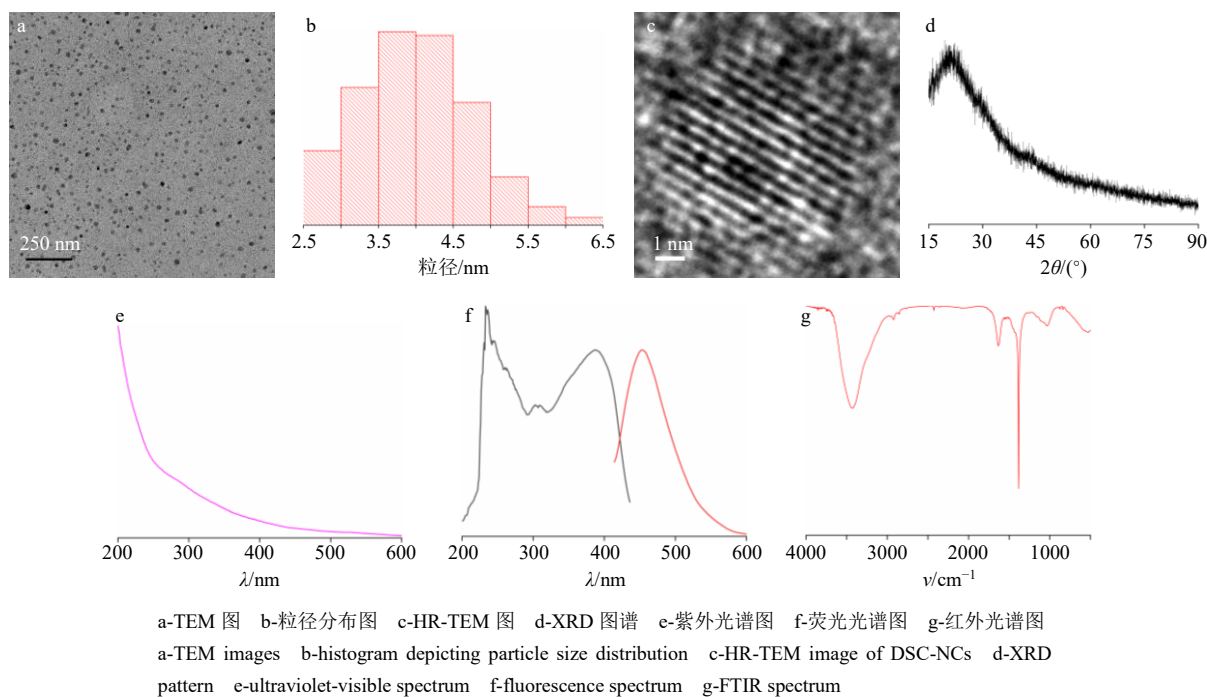


图 2 DSC-NCs 的表征组图

Fig. 2 Characterization of DSC-NCs

一步分析 DSC-NCs 内部原子在空间分布的状态, 从图 2-d 中可以观察到 1 个典型的非晶体衍射峰, 这与自下而上法倾向于产生含无定形碳核的纳米类成分有关^[15]。

DSC-NCs 的紫外光谱如图 2-e 所示, DSC-NCs 在 260~280 nm 处可以观察到有一处微弱的吸收峰, 这可能是由于含有杂原子的不饱和基团引起的 $n-\pi^*$ 跃迁所导致^[16]。DSC-NCs 的荧光光谱分析结果如图 2-f 所示, DSC-NCs 的最大激发波长为 388 nm, 最大发射波长为 453 nm。

DSC-NCs 红外光谱结果如图 2-g 所示, 在 3426、2922、1634、1034 cm^{-1} 处出现了特征峰, 其中 3426 cm^{-1} 的吸收峰提示可能存在 -O-H 键, 2922 cm^{-1} 处的吸收峰提示为 -CH₂- 的伸缩振动峰, 这是亚甲基的特征峰, 1634 cm^{-1} 的强吸收峰为 -C=O 键的伸缩振动峰, 1384 cm^{-1} 的强而尖锐的吸收峰提示可能为 -OH 的面内弯曲振动峰, 1034 cm^{-1} 处的吸收峰提示可能含有 -C-O-C- 键。这表明经过炭化产生的 DSC-NCs 表面存在羟基、羧基和氨基等功能基团^[17]。

通过 XPS 对 DSC-NCs 的元素组成和基团连接方式进行了表征。具体测定结果如图 3 所示, 图 3-a 中 284.85、399.99、531.98 eV 的位置有明显的峰, 表明 DSC-NCs 主要由 C (72.84%)、O (22.3%) 元素和少量的 N (4.86%) 元素共同组成, 从图中峰值

可以看出, C 和 O 的元素含量最多, 高达 95.14%。在 DSC-NCs 高分辨 XPS 图谱中, 图 3-b C1s 谱带中, 显示出 284.71、285.77、288.23 eV 3 个峰, 与之相对应的键分别是 C-N、C=O、C-O。在图 3-c 的 N1s 谱带中, 显示出 399.62、400.32 eV 2 个峰, 与之相对应的键分别是 C-N、N-H。在图 3-d 的 O1s 谱带中, 显示出 531.51、532.85 eV 2 个峰, 与之相对应的键分别是 C-O、C=O^[18]。

从以上图谱特征数据的结果来看, 分析解读了 DSC-NCs 的主要元素组成和含量, 得知其配位情况, 证实了 DSC-NCs 除了 C、O 元素外, 还被 N 与其他元素少量掺杂, 并且推测有多种官能团共同存在于 DSC-NCs 的表面。

2.4 荧光量子产率 (fluorescence quantum yield, FQY) 测定

FQY 也称荧光量子效率, 它是表示一种物质荧光特性的重要参数^[12]。本实验中测定的结果为 DSC-NCs 的相对 FQY, 参比物质选择硫酸奎宁。荧光光谱扫描时激发波长与发射波长的狭缝宽度皆为 10 nm。根据公式 $FQY_{\text{NCs}} = FQY_{\text{R}} I_{\text{NCs}} A_{\text{R}} \eta_{\text{NCs}}^2 / (I_{\text{R}} A_{\text{NCs}} \eta_{\text{R}}^2)$ 对 DSC-NCs 的 FQY 进行计算, 公式中 I 为发射光谱下的峰面积, A 为 365 nm 时的吸光度值, η 为溶剂的折射率, 下标 NCs 和 R 代表 DSC-NCs 和参照物。为了使重吸收效应最小化, A_{R} 和 A_{NCs} 的吸光度

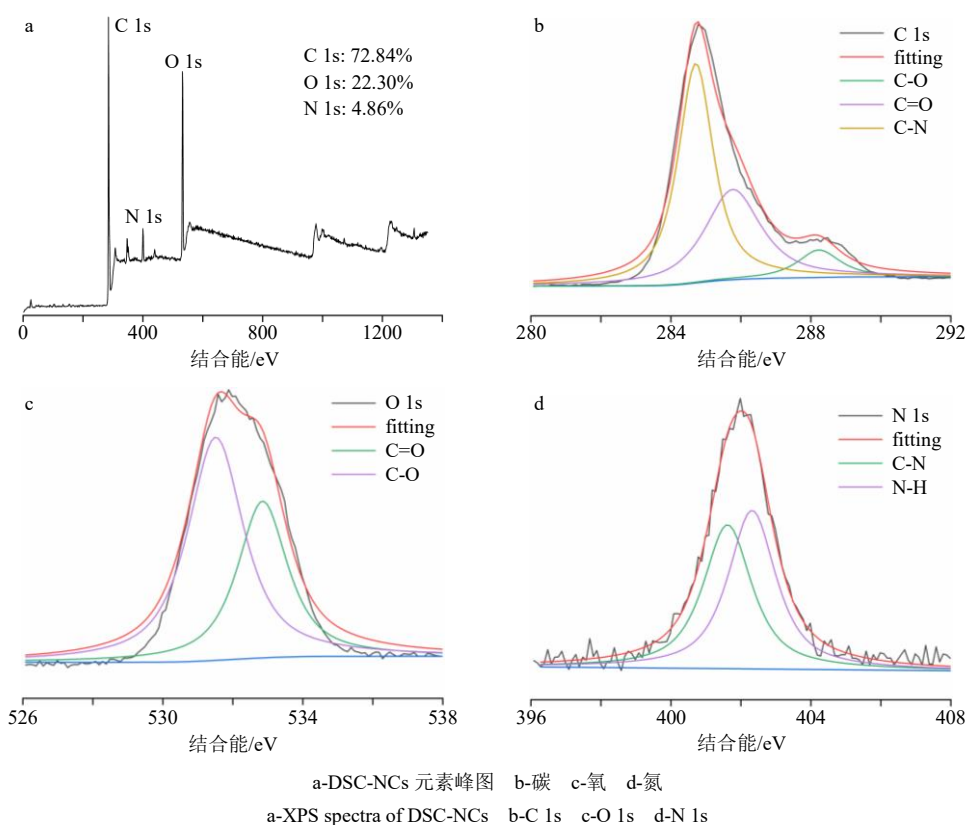


图 3 利用 XPS 分析技术对 DSC-NCs 的表面基团和元素组成信息进行分析

Fig. 3 Surface composition and elemental analysis of DSC-NCs by XPS

值应该保证在 0.05 以下^[13]。以硫酸奎宁作为标准物进行 DSC-NCs 的荧光量子产率测, 最终计算得出 DSC-NCs 的荧光量子产率为 17.31%。

2.5 CCK-8 实验

2.5.1 实验设计 安全性是其生物应用过程中需要考虑的问题之一, 本实验以人肺癌 A549 细胞为研究对象, 利用 CCK-8 实验来评价 DSC-NCs 对 A549 细胞的毒性大小^[14]。将培养好的 A549 细胞悬液稀释至 1×10^5 个/mL, 置于 96 孔板上。在四周边缘缓慢加入 PBS 缓冲液 (100 μ L/mL), 将其放入 CO₂ 细胞培养箱进行孵育, 条件设置为 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C, 时间为 24 h。之后弃去上清液, 在对照组加入 McCoy's 5A 培养基, 在给药组依次加入已配制好的 8 种不同质量浓度 (1000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25、15.63、7.81 μ g/mL) 的 DSC-NCs 溶液, 每孔 100 μ L, 再次放入 CO₂ 培养箱孵育 24 h。取出上述 96 孔细胞培养板, 加入 CCK-8 试剂 (10 μ L/孔), 继而放入 CO₂ 培养箱, 4 h 后取出。将其放于酶标仪中进行检测, 波长 450 nm, 记录吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_c - A_b) / (A_c - A_0)$$

A_0 为给药组的吸光度, A_c 为对照组吸光度, A_b 为空白组吸光度

2.5.2 统计学分析 实验数据采用 SPSS 25.0 统计软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理采用方差分析。单因素 ANOVA 分析方法用于实验数据服从正态分布, 同时方差齐。组间差异则运用 LSD 方法统计。

2.5.3 实验结果 结果如表 1 所示, 当 DSC-NCs 的表 1 不同质量浓度的 DSC-NCs 对 A549 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of different concentrations of DSC-NCs on viability of A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.00 $\pm$ 10.37
DSC-NCs	1 000.00	53.97 $\pm$ 3.29
	500.00	103.57 $\pm$ 7.21
	250.00	130.95 $\pm$ 11.14
	125.00	144.58 $\pm$ 7.58
	62.50	133.99 $\pm$ 11.85
	31.25	112.64 $\pm$ 7.20
	15.63	118.39 $\pm$ 9.50
	7.81	100.33 $\pm$ 7.34

质量浓度为 500.00 $\mu\text{g/mL}$ 和 7.81 $\mu\text{g/mL}$ 时,其细胞存活率和对照组近似。当 DSC-NCs 的质量浓度大于 500.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率降低,说明 DSC-NCs 在给药质量浓度高于 500.00 $\mu\text{g/mL}$ 对 A549 细胞存在一定的毒性。当 DSC-NCs 的质量浓度在 7.81~500.00 $\mu\text{g/mL}$,对 A549 细胞具有一定的促进增殖作用,而质量浓度在 7.81~125.00 $\mu\text{g/mL}$,随着 DSC-NCs 质量浓度的升高,增殖作用逐渐增强,质量浓度在 125.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,增殖作用达到最强,其后在 125.00~500.00 $\mu\text{g/mL}$,随着质量浓度的升高,增殖作用反而逐渐降低。以上实验结果为今后 DSC-NCs 在临床上的应用剂量提供了一定的参考。

2.6 DSC-NCs 对脂多糖致大鼠 ALI 的作用研究

2.6.1 实验分组、给药和造模 将 48 只 SD 大鼠,随机分为 6 组,每组 8 只,分别为对照组、模型组、阳性对照组(地塞米松,5 mg/kg)和 DSC-NCs 高剂量组(3.33 mg/kg)、中剂量组(1.67 mg/kg)、低剂量组(0.84 mg/kg)。适应饲养环境后,DSC-NCs 高、中、低剂量组连续 10 d ip 给药,其他组均 ip 相同体积的生理盐水。阳性对照组在造模前 1 h ip 地塞米松溶液,1 h 后,除对照组 ip 等体积生理盐水外,其余各组均 ip 制备的脂多糖溶液(5 mg/kg)进行造模。

2.6.2 病理切片观察 造模 8 h 后,用 4%水合氯醛(0.40 g/kg)麻醉大鼠后进行解剖,将大鼠左肺组织

取出置于 10%组织固定液中固定 48 h 以上,脱水,石蜡包埋,切片,苏木精和伊红(H&E)染色。比较对照组,模型组,地塞米松组和 DSC-NCs 高、中、低剂量组肺部的形态学变化。各组肺组织的病理形态结果如图 4 所示,图 4-a 显示对照组的肺组织结构正常,肺泡的形态完整,肺间质结构清晰,肺泡内无炎性细胞浸润;与对照组比较,模型组的肺组织结构破坏较为严重,明显可见肺泡壁增厚、肺间质充血,肺泡腔内有大量炎症细胞浸润(图 4-b);与模型组比较,地塞米松组中肺泡形态较为完整,肺泡腔及肺间质炎性细胞浸润状态较模型组明显减轻(图 4-c);与模型组比较,给予不同剂量的 DSC-NCs 治疗后,肺组织破坏程度、炎性细胞浸润和充血程度得到有效的缓解和不同程度的改善(图 4-d~f),其中高剂量组的效果最为明显,具有一定的量效关系。

2.6.3 血清中细胞因子水平 造模 8 h 后,用 4%水合氯醛(0.40 g/kg)麻醉大鼠。使用采血针和真空采血管,经腹主动脉采集大鼠血液。将采集好的大鼠血液置于室温环境下,静置 60 min,然后放入高速冰冻离心机中以 3000 r/min 的转速离心 15 min,获取上清液,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,留置待用。按照试剂盒的指导说明进行操作,分别测定血清中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平。IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 是急性炎症的重要炎症因子,各组大鼠血清中 IL-1 β 的含

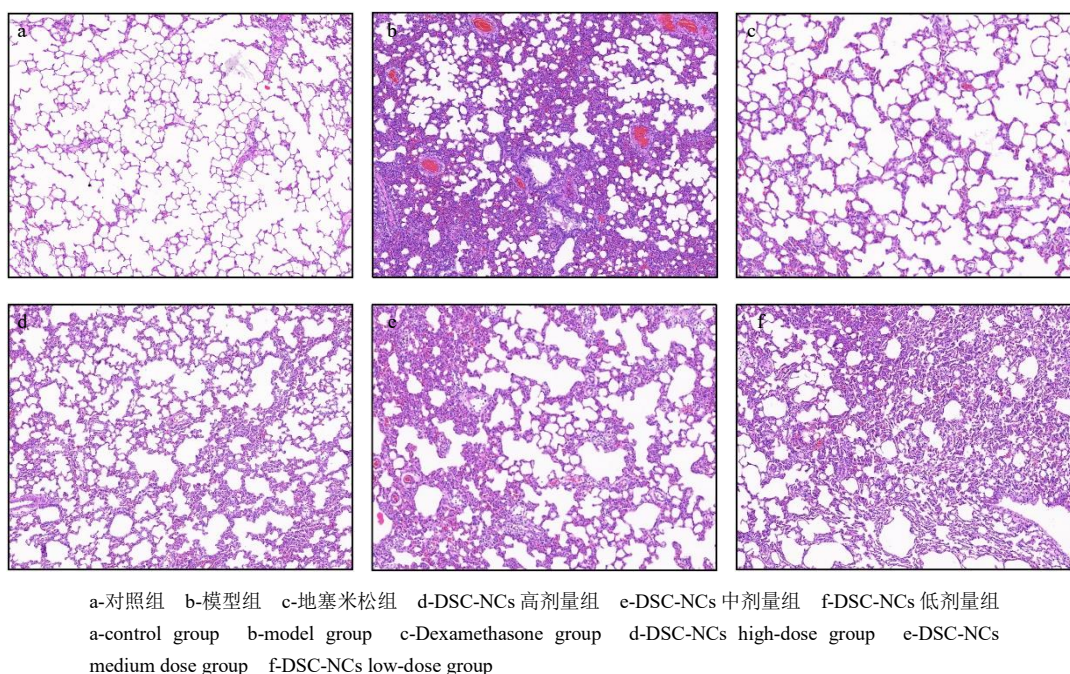


图 4 DSC-NCs 对 LPS 致大鼠 ALI 肺组织病理改变的影响 ($\times 50$)

Fig. 4 Effect of DSC-NCs on pathological changes of lung tissue in rats with ALI induced by LPS ($\times 50$)

量比较如表 2 所示,与对照组比较,模型组血清中 IL-1 β 水平明显升高 ($P<0.01$)。与模型组相比较,地塞米松组和 DSC-NCs 高、中、低剂量组均可以明显降低大鼠血清中 IL-1 β 的水平,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。其中 DSC-NCs 高剂量组低于地塞米松组,说明 DSC-NCs 高剂量组的治疗作用强于阳性药。而随着 DSC-NCs 的剂量降低,血清中 IL-1 β 水平升高,存在明显量效差异。DSC-NCs 对大鼠血清中 IL-6 的含量与 IL-1 β 类似,与对照组相比,模型组血清中 IL-6 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组相比,地塞米松组和 DSC-NCs 高、中、低剂量组均能明显降低血清中 IL-6 水平 ($P<0.01$),其中以地塞米松组和 DSC-NCs 高剂量组的治疗效果较优。

表 2 DSC-NCs 对 LPS 致大鼠 ALI 血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of DSC-NCs on IL-1 β , IL-6 and TNF- α in serum of rats with acute lung injury induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	IL-1 β / (pg·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)	TNF- α / (pg·mL ⁻¹)
对照	—	4.35 $\pm$ 0.58	2.94 $\pm$ 0.62	23.17 $\pm$ 1.31
模型	5	21.07 $\pm$ 2.26 ^{###}	20.29 $\pm$ 1.27 ^{###}	66.61 $\pm$ 8.26 ^{###}
地塞米松	5	9.49 $\pm$ 0.86 ^{**}	6.30 $\pm$ 1.06 ^{**}	27.39 $\pm$ 2.70 ^{**}
DSC-NCs	3.33	8.98 $\pm$ 1.31 ^{**}	8.75 $\pm$ 1.15 ^{**}	28.14 $\pm$ 5.17 ^{**}
	1.67	11.57 $\pm$ 1.21 ^{**}	13.98 $\pm$ 1.36 ^{**}	29.24 $\pm$ 4.57 ^{**}
	0.84	16.81 $\pm$ 0.53 ^{**}	14.47 $\pm$ 1.26 ^{**}	29.39 $\pm$ 5.85 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

各组大鼠血清中 TNF- α 的含量比较如表 2 所示,与对照组相比,模型组血清中 TNF- α 水平明显升高,具有显著的差异性 ($P<0.01$)。与模型组相比,地塞米松组和 DSC-NCs 高、中、低剂量组均能明显降低大鼠血清 TNF- α 水平 ($P<0.01$),4 者之间的差异并不明显。

综上所述,DSC-NCs 高、中、低剂量组均能明显降低大鼠血清中的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平,表明 DSC-NCs 能够抑制炎症细胞因子的分泌,而起到减轻肺损伤的作用。

2.6.4 抗氧化水平 取出小鼠的右肺,用滤纸将分离出的肺组织水分吸干,取一部分后使用电子天平进行精确称定,将称好的肺组织放入 10 mL EP 管中,按照质量体积比为 1:9 加入生理盐水制备成

10%的组织匀浆,然后加入研磨球,使用冷冻混合球磨仪进行研磨,最后使用高速冷冻离心机(3000 r/min, 10 min)进行离心,获取肺组织匀浆上清液,按照试剂盒的说明,测定 SOD 活性和丙二醛的水平。

氧化应激是 ALI 炎症发生发展的重要机制之一,通过进一步评估 SOD 活性和丙二醛的水平来表征氧化还原状态的变化。各组肺组织中 SOD 活性比较如表 3 所示,与对照组相比,模型组中 SOD 的活性明显降低 ($P<0.01$),说明脂多糖诱导的 ALI 大鼠的肺组织发生了严重的氧化损伤。与模型组相比,地塞米松组和 DSC-NCs 高剂量组均能明显升高肺组织中 SOD 的活性 ($P<0.01$),明显提高了机体的抗氧化能力,DSC-NCs 中剂量组也能提高肺组织中 SOD 的活性,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),而 DSC-NCs 低剂量组与模型组比较没有明显差异。

各组肺组织中的丙二醛水平比较如表 3 所示,与对照组相比,模型组肺组织中丙二醛含量明显升高,说明肺组织受损严重。与模型组相比,地塞米松组和 DSC-NCs 高、中、低剂量组肺组织中丙二醛的含量均明显降低,差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。以上实验结果表明,DSC-NCs 能够通过提高抗氧化能力和降低氧自由基的产生来减轻过度氧化应激对肺脏的损伤作用。

3 讨论

本实验通过一系列成熟的制备工艺来获取葶苈子炭化物纯化后的透析液,经 TEM、HR-TEM、荧光光谱、FTIR、XPS 等仪器鉴定并命名为 DSC-NCs。DSC-NCs 外观形貌近球形,分散度良好,粒径大小均一,主要集中在 2.5~6.5 nm,晶格间距为 0.224 nm。

表 3 DSC-NCs 对 LPS 致大鼠 ALI 肺组织中 SOD 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of DSC-NCs on SOD activity and level of MDA in lung tissue of rats with ALI induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
对照	—	149.33 $\pm$ 18.32	3.83 $\pm$ 0.14
模型	5	71.98 $\pm$ 9.15 ^{###}	6.39 $\pm$ 0.12 ^{###}
地塞米松	5	139.33 $\pm$ 11.61 ^{**}	4.59 $\pm$ 0.27 ^{**}
DSC-NCs	3.33	128.83 $\pm$ 9.37 ^{**}	4.81 $\pm$ 0.75 ^{**}
	1.67	95.21 $\pm$ 11.72 [*]	4.95 $\pm$ 0.61 ^{**}
	0.84	85.16 $\pm$ 29.71	5.17 $\pm$ 0.63 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{###} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

XPS 分析显示 DSC-NCs 中含有 C、O、N 等元素,其中 C、O 元素占主导地位,结合红外光谱可以发现葶苈子炭纳米类成分表面官能团丰富,含有大量的羟基、羧基等基团。

经过 HPLC 的观察对比,经过透析后的 DSC-NCs 溶液中观察不到小分子的存在,在一定程度上排除了小分子化合物的干扰。此外,本实验利用 CCK-8 法测定了 DSC-NCs 的安全性范围在 500 $\mu\text{g/mL}$ 以内,生物安全性高。

ALI 是一系列炎症反应和继发性弥漫性肺实质损伤,涉及多种炎症介质和效应细胞,其发病原因多样,其中由脂多糖引起的占大多数,可引起炎症反应和氧化应激导致肺损伤,是用于评价药物对 ALI 作用的经典模型^[19]。从本实验的肺组织切片来看,模型大鼠在给予不同剂量的 DSC-NCs 治疗后,肺组织破坏程度和炎性细胞浸润状态得到有效的缓解和不同程度的改善,说明 DSC-NCs 具有治疗 ALI 的作用。

在 ALI 的形成过程中涉及到多方面的作用结果,单核-巨噬细胞和嗜中性粒细胞在受到外界刺激后聚集到肺泡腔,产生大量细胞因子,传递炎症信号,通过级联放大反应促进炎症的发展,导致肺部损伤^[20]。TNF- α 是最早参与 ALI 发病过程的炎症因子,主要是由 LPS 刺激肺泡-巨噬细胞后生成,除了直接破坏内皮细胞,还能刺激邻近细胞释放更多的炎症因子,进而介导中性粒细胞和巨噬细胞的招募^[21]。此外, TNF- α 还能诱导免疫细胞转移、增加血管通透性以及影响肺水肿的形成,导致低氧血症,从而进一步加重肺损伤。IL-1 β 是固有免疫和炎症反应的主要调节因子,诱导中性粒细胞迅速聚集到肺部,引起炎症介质释放,加重炎症损伤,因此 IL-1 β 的表达水平也是反映 ALI 严重程度的经典指标^[22]。IL-6 主要来源于单核-巨噬细胞,其能促进炎症发展,影响巨噬细胞的生长和分化,大量的 IL-6 还会促进血管活性物质和中性粒细胞的释放,脂多糖作用于机体后,能够检测到 IL-6 的水平有所升高,是检测 ALI 的指标之一^[23]。本实验研究结果显示, DSC-NCs 高、中、低剂量组均能明显降低大鼠血清中的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,表明 DSC-NCs 能够在一定程度上抑制炎症细胞因子的分泌,从而起到减轻肺损伤的作用。

大量研究^[24]表明,氧化应激损伤是 ALI 发病的重要机制,能够使细胞内活性氧显著增加,引发脂

质过氧化,就会不断大量形成新的自由基,造成肺组织损伤。SOD 是一种重要的抗氧化酶,对机体的氧化和抗氧化系统平衡起重要作用,其活性高低反映了机体抗氧化能力的大小^[25]。过量的活性氧会诱导脂质过氧化,从而产生丙二醛,因而能够作为反映脂质过氧化严重程度的标志物^[26]。相关研究^[27]表明葶苈子生药能有效改善 ALI 引起的肺淤血、肺水肿以及炎细胞浸润程度,其机制可能与发挥药效的小分子物质能够调节水通道蛋白 5 的含量有关;本实验证明了从葶苈子炭中提取分离的 DSC-NCs 也能有效缓解 ALI 大鼠肺泡腔及肺间质中的炎性细胞浸润程度,改善肺水肿,尤其以高剂量组的作用更显著,其机制可能与升高 SOD 的活性、减少丙二醛的含量有关,能够通过提高抗氧化能力和降低氧自由基的产生来减轻过度氧化应激对肺脏的损伤作用。但本实验尚未从相关信号通路的水平上去研究 DSC-NCs 发挥药效的内在机制,仍是今后重点研究的方向之一。因此,本实验中 DSC-NCs 的发现及其治疗脂多糖致 ALI 的证明,不仅为葶苈子炭的活性成分提供了一个新的研究方向,也为 DSC-NCs 作为一种治疗 ALI 的新型药物研发奠定了坚实的实验基础。

本实验利用高温热解法成功从葶苈子炭中提取分离出新型纳米类成分 DSC-NCs。在脂多糖致大鼠 ALI 模型中,表面携带丰富基团的 DSC-NCs 起到了明显的保护作用,其发挥作用的机制初步证明是与减少 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症细胞因子水平有关,也可以在一定程度上减少肺部的炎症,增强机体的抗氧化活性。本研究为 DSC-NCs 在临床抗肺炎中的应用提供了重要依据,为 DSC-NCs 的研发奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 375.
- [2] Miao P, Han K, Tang Y G, *et al.* Recent advances in carbon nanodots: Synthesis, properties and biomedical applications [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(5): 1586-1595.
- [3] Mishra V, Patil A, Thakur S, *et al.* Carbon dots: Emerging theranostic nanoarchitectures [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(6): 1219-1232.
- [4] Song Y B, Zhu S J, Yang B. Bioimaging based on fluorescent carbon dots [J]. *RSC Adv*, 2014, 4(52): 27184.
- [5] Jia X, Pei M L, Zhao X B, *et al.* PEGylated oxidized

- alginate-DOX prodrug conjugate nanoparticles cross-linked with fluorescent carbon dots for tumor theranostics [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2016, 2(9): 1641-1648.
- [6] Mezziani M J, Dong X L, Zhu L, *et al.* Visible-light-activated bactericidal functions of carbon “quantum” dots [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2016, 8(17): 10761-10766.
- [7] Zhao Y S, Zhang Y, Kong H, *et al.* Haemostatic nanoparticles-derived bioactivity of from *Selaginella Tamariscina Carbonisata* [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): E446.
- [8] Wu J, Zhang M, Cheng J, *et al.* Effect of *Lonicerae Japonicae Flos Carbonisata*-derived carbon dots on rat models of fever and hypothermia induced by lipopolysaccharide [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 4139-4149.
- [9] Yang J J, Gao G, Zhang X D, *et al.* One-step synthesis of carbon dots with bacterial contact-enhanced fluorescence emission: Fast Gram-type identification and selective Gram-positive bacterial inactivation [J]. *Carbon*, 2019, 146: 827-839.
- [10] Bajpai V K, Khan I, Shukla S, *et al.* Multifunctional N-P-doped carbon dots for regulation of apoptosis and autophagy in B16F10 melanoma cancer cells and *in vitro* imaging applications [J]. *Theranostics*, 2020, 10(17): 7841-7856.
- [11] Yang L, Jiang W H, Qiu L P, *et al.* One pot synthesis of highly luminescent polyethylene glycol anchored carbon dots functionalized with a nuclear localization signal peptide for cell nucleus imaging [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(14): 6104-6113.
- [12] 周喜丹, 唐力英, 周国洪, 等. HPLC 指纹图谱鉴别葶苈子与车前子 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 275-279.
- [13] Zhang M L, Cheng J J, Zhang Y, *et al.* Green synthesis of *Zingiberis Rhizoma*-based carbon dots attenuates chemical and thermal stimulus pain in mice [J]. *Nanomedicine*, 2020, 15(9): 851-869.
- [14] Zhao G D, Hu C B, Xue Y. *In vitro* evaluation of chitosan-coated liposome containing both coenzyme Q10 and alpha-lipoic acid: Cytotoxicity, antioxidant activity, and antimicrobial activity [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2018, 17(2): 258-262.
- [15] 刘艳红, 张东旭, 毛宝东, 等. 从量子点的角度审视碳点的研究进展 [J]. 化学学报, 2020, 78(12): 1349-1365.
- [16] Yang Y Y, Wang X F, Liao G C, *et al.* iRGD-decorated red shift emissive carbon nanodots for tumor targeting fluorescence imaging [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2018, 509: 515-521.
- [17] Kumar A, Chowdhuri A R, Laha D, *et al.* Green synthesis of carbon dots from *Ocimum sanctum* for effective fluorescent sensing of Pb²⁺ ions and live cell imaging [J]. *Sensor Actuat B: Chem*, 2017, 242: 679-686.
- [18] Li Y, Li S, Wang Y M, *et al.* Electrochemical synthesis of phosphorus-doped graphene quantum dots for free radical scavenging [J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19(18): 11631-11638.
- [19] Xiao Q, Cui Y, Zhao Y, *et al.* Orientin relieves lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice: The involvement of its anti-inflammatory and anti-oxidant properties [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107189.
- [20] Ye R S, Liu Z W. ACE2 exhibits protective effects against LPS-induced acute lung injury in mice by inhibiting the LPS-TLR4 pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 113: 104350.
- [21] 杨芬, 方志源. 七氟醚对脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的保护效应 [J]. 江苏大学学报: 医学版, 2010, 20(3): 223-225.
- [22] 龚睿, 蒋磊, 宋宁, 等. 胆绿素对脂多糖诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞 NLRP3 炎性体激活的作用 [J]. 医学研究杂志, 2017, 46(10): 35-39.
- [23] He Y, Zhao Y, Feng Y, *et al.* Therapeutic effect and mechanism study of L-cysteine derivative 5P39 on LPS-induced acute lung injury in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 869: 172893.
- [24] Zhang C, Ning D, Pan J, *et al.* Anti-inflammatory effect fraction of *Bletilla striata* and its protective effect on LPS-induced acute lung injury [J]. *Mediators Inflamm*, 2021, 2021: 6684120.
- [25] Fathy S M, Drees E A. Protective effects of Egyptian cloudy apple juice and apple peel extract on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and inflammatory status in diabetic rat pancreas [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 8.
- [26] Jia R, Cao L P, Du J L, *et al.* Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2014, 152: 11-19.
- [27] 张朝晖, 徐小云, 瞿星光, 等. 葶苈子水提液对内毒素致急性肺损伤大鼠肺泡 II 型上皮细胞水通道蛋白 5 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2016, 25(4): 606-608.

[责任编辑 郑礼胜]