

• 论著 •

黄连解毒汤有效部位抗弥散性血管内凝血的活性研究

倪梦璐¹ 张剑峰² 柯宇¹ 陈桂荣¹¹ 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; ² 天津天士力现代中药资源有限公司, 天津 300410

通信作者: 陈桂荣, Email: cgr800404@sohu.com

【摘要】 目的 观察黄连解毒汤对脓毒症弥散性血管内凝血(DIC)的作用及其机制。**方法** 利用生物膜干涉技术(BLI)分析黄连解毒汤沉淀醇洗部位与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11(caspase-11)的相互作用。选择 24 只 Balb/c 小鼠,按随机数字表法分为对照组、模型组及给药组。采用尾静脉 2 次注射脂多糖(LPS)的方法复制 DIC 模型,对照组给予相同剂量的生理盐水;给药组于制模前 3 d 连续灌胃黄连解毒汤沉淀醇洗液(含药量 0.031 3 g/kg)每次 0.2 mL/20 g,连续 3 d。于制模后 8 h 麻醉小鼠,心尖取血并取肝和肺组织,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中白细胞介素(IL-18、IL-1 α 、IL-1 β)、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)、凝血酶、凝血酶-抗凝血酶复合物(TAT)、纤溶酶原激活物抑制因子 1(PAI-1)、纤维蛋白原(Fib)和 D-二聚体水平;处死小鼠后取肺和肝组织,光镜下观察肺和肝组织病理学改变;采用荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肝和肺组织中 HMGB1、caspase-11、焦亡相关蛋白 Gasdermin D(GSDMD)、跨膜蛋白 16F 和组织因子(TF)的 mRNA 表达水平;采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺和肝组织中 caspase-11 和 GSDMD-N 端结构域(GSDMD-N)的蛋白表达水平。**结果** BLI 互作分析显示,黄连解毒汤沉淀醇洗部位呈现出与 caspase-11 具有较好的亲和力。光镜下可见,对照组视野内肝细胞数量丰富,排列紧密,胞质饱满;模型组肝组织结构中度异常,可见部分细胞脂肪变性,胞质内可见细小圆形空泡及少量细胞坏死,胞核碎裂固缩深染。给药组上述这些病理改变明显改善。对照组肺组织结构正常,肺泡轮廓清晰,肺泡无明显增厚。模型组肺组织结构重度异常,视野内组织明显出血,肺泡结构萎缩,肺泡腔内可见大量红细胞,肺泡壁可见明显增厚,支气管上皮细胞排列较紊乱,组织内可见炎性细胞浸润。给药组上述病理改变明显改善。ELISA 结果显示,模型组血清中细胞因子(IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、HMGB1)及凝血因子(凝血酶、TAT、PAI-1、Fib 和 D-二聚体)水平均明显高于对照组;给药组血清细胞因子及凝血因子均较模型组显著降低[IL-18 (ng/L): 121.70 $\pm$ 14.96 比 167.79 $\pm$ 12.83, IL-1 α (ng/L): 475.51 $\pm$ 27.31 比 600.30 $\pm$ 50.92, IL-1 β (ng/L): 93.00 $\pm$ 9.88 比 106.07 $\pm$ 6.87, HMGB1 (μ g/L): 87.35 $\pm$ 11.96 比 117.74 $\pm$ 8.72, 凝血酶 (ng/L): 175.32 $\pm$ 11.89 比 245.15 $\pm$ 8.18, TAT (ng/L): 477.85 $\pm$ 37.87 比 722.29 $\pm$ 28.72, PAI-1 (μ g/L): 17.03 $\pm$ 1.39 比 27.04 $\pm$ 0.96, Fib (g/L): 7.51 $\pm$ 0.46 比 12.67 $\pm$ 0.64, D-二聚体 (μ g/L): 661.35 $\pm$ 52.85 比 925.48 $\pm$ 30.64, 均 $P<0.05$]。qRT-PCR 结果显示,模型组肝和肺组织中 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 表达水平均明显高于对照组;给药组肝和肺组织 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 表达水平均较模型组显著降低[肝组织: HMGB1 mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.13 $\pm$ 0.01 比 1.82 $\pm$ 0.45, caspase-11 mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.66 $\pm$ 0.05 比 1.45 $\pm$ 0.09, GSDMD mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 12.86 $\pm$ 2.50 比 21.72 $\pm$ 3.81, 跨膜蛋白 16F mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.61 $\pm$ 0.08 比 3.61 $\pm$ 0.77, TF mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 1.29 $\pm$ 0.33 比 2.54 $\pm$ 0.15; 肺组织: HMGB1 mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.13 $\pm$ 0.03 比 2.13 $\pm$ 0.48, caspase-11 mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.57 $\pm$ 0.08 比 4.48 $\pm$ 0.59, GSDMD mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.26 $\pm$ 0.03 比 1.83 $\pm$ 0.05, 跨膜蛋白 16F mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.69 $\pm$ 0.38 比 2.19 $\pm$ 0.53, TF mRNA 表达($2^{-\Delta\Delta Ct}$)为 0.35 $\pm$ 0.07 比 7.68 $\pm$ 0.32, 均 $P<0.05$]。Western blotting 结果显示,模型组肝和肺组织中 caspase-11 和 GSDMD-N 端的蛋白表达水平均明显高于对照组;给药组肝和肺组织中 caspase-11 和 GSDMD-N 的蛋白表达水平均较模型组显著降低[肝组织: caspase-11 蛋白表达(caspase-11/GAPDH)为 0.79 $\pm$ 0.02 比 1.15 $\pm$ 0.03, GSDMD-N 蛋白表达(GSDMD-N/GAPDH)为 0.77 $\pm$ 0.06 比 1.24 $\pm$ 0.03; 肺组织: caspase-11 表达(caspase-11/GAPDH)为 0.76 $\pm$ 0.01 比 0.96 $\pm$ 0.01, GSDMD-N 蛋白表达(GSDMD-N/GAPDH)为 0.79 $\pm$ 0.01 比 1.03 $\pm$ 0.02, 均 $P<0.05$]。**结论** 黄连解毒汤沉淀醇洗部位通过与 caspase-11 结合可抑制炎症因子和凝血因子的释放,减少 GSDMD 的激活,降低 TF 的表达及凝血级联反应的发生,进而改善 LPS 诱导的 DIC。

【关键词】 黄连解毒汤; 脓毒症; 弥散性血管内凝血; 炎症反应**基金项目:** 国家自然科学基金(82374008); 辽宁省教育厅高校基本科研项目(2024JYTCB073)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.05.014

Study on the against disseminated intravascular coagulation activity of the active fraction of Huanglian Jiedu decoctionNi Menglu¹, Zhang Jianfeng², Ke Yu¹, Chen Guirong¹¹College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, Liaoning, China; ²Tianjin

Tasly Modern Chinese Medicine Resources Co., LTD, Tianjin 300410, China

Corresponding author: Chen Guirong, Email: cgr800404@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanisms of the active fraction of Huanglian Jiedu decoction on sepsis-induced disseminated intravascular coagulation (DIC). **Methods** Using bio-layer interferometry (BLI), the interaction between the ethanol-precipitated fraction of Huanglian Jiedu decoction and caspase-11 was analyzed. A total of 24 Balb/c mice were selected and randomly divided into the control group, model group, and treatment group according to a random number table. The DIC model was established by intravenous caudal injection of lipopolysaccharide (LPS) twice, the control group received an equal volume of normal saline. The treatment group received the ethanol-precipitated fraction of Huanglian Jiedu decoction (0.031 3 g/kg) by oral gavage (0.2 mL/20 g) once daily for 3 consecutive days before modeling. Eight hours after modeling, the mice were anesthetized, and blood was collected via cardiac puncture. Serum levels of interleukins (IL-18, IL-1 α and IL-1 β), high mobility group protein B1 (HMGB1), thrombin, thrombin-antithrombin complex (TAT), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), fibrinogen (Fib), and D-dimer were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). After sacrificing the mice, the liver and lung tissues were removed, histopathological changes in the liver and lung tissues were observed under a light microscope. The mRNA expression levels of HMGB1, caspase-11, pyroptosis-associated protein Gasdermin D (GSDMD), transmembrane protein 16F, and tissue factor (TF) in liver and lung tissues were detected by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). The protein expression levels of caspase-11 and GSDMD-N in lung and liver tissues were detected by Western blotting. **Results** BLI interaction analysis demonstrated that the ethanol-precipitated fraction of Huanglian Jiedu decoction exhibited favorable binding affinity for caspase-11. Under light microscopy, the control group exhibited abundant hepatocytes with compact arrangement and plump cytoplasm within the field of view. In the model group, the liver tissue exhibited moderately abnormal architecture, characterized by partial steatosis, the presence of small round vacuoles within the cytoplasm, as well as focal necrosis with karyopyknosis, karyorrhexis, and hyperchromasia. These pathological alterations were markedly ameliorated in the treatment group. The model group exhibited severely abnormal pulmonary architecture, characterized by marked hemorrhage, alveolar collapse, abundant red blood cells within the alveolar spaces, significant thickening of the alveolar walls, disordered arrangement of bronchial epithelial cells, and inflammatory cell infiltration in the tissue. These pathological changes were markedly ameliorated in the treatment group. ELISA results indicated that, compared with the control group, the model group exhibited significantly elevated serum levels of IL-18, IL-1 α , IL-1 β and HMGB1, as well as the coagulation factors thrombin, TAT, PAI-1, Fib, and D-dimer. Compared with the model group, the treatment group showed a significant reduction in serum levels of both cytokines and coagulation factors [IL-18 (ng/L): 121.70 $\pm$ 14.96 vs. 167.79 $\pm$ 12.83, IL-1 α (ng/L): 475.51 $\pm$ 27.31 vs. 600.30 $\pm$ 50.92, IL-1 β (ng/L): 93.00 $\pm$ 9.88 vs. 106.07 $\pm$ 6.87, HMGB1 (μ g/L): 87.35 $\pm$ 11.96 vs. 117.74 $\pm$ 8.72, thrombin (ng/L): 175.32 $\pm$ 11.89 vs. 245.15 $\pm$ 8.18, TAT (ng/L): 477.85 $\pm$ 37.87 vs. 722.29 $\pm$ 28.72, PAI-1 (μ g/L): 17.03 $\pm$ 1.39 vs. 27.04 $\pm$ 0.96, Fib (g/L): 7.51 $\pm$ 0.46 vs. 12.67 $\pm$ 0.64, D-dimer (μ g/L): 661.35 $\pm$ 52.85 vs. 925.48 $\pm$ 30.64, all $P < 0.05$]. The qRT-PCR results revealed that, compared to the control group, the model group demonstrated significantly increased mRNA expression levels of HMGB1, caspase-11, GSDMD, transmembrane protein 16F, and TF in both liver and lung tissues. Compared to the model group, the treatment group exhibited a significant reduction in the mRNA expression levels of HMGB1, caspase-11, GSDMD, transmembrane protein 16F, and TF in both liver and lung tissues [liver tissue: HMGB1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.13 $\pm$ 0.01 vs. 1.82 $\pm$ 0.45, caspase-11 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.66 $\pm$ 0.05 vs. 1.45 $\pm$ 0.09, GSDMD mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 12.86 $\pm$ 2.50 vs. 21.72 $\pm$ 3.81, transmembrane protein 16F mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.61 $\pm$ 0.08 vs. 3.61 $\pm$ 0.77, TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 1.29 $\pm$ 0.33 vs. 2.54 $\pm$ 0.15; lung tissue: HMGB1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.13 $\pm$ 0.03 vs. 2.13 $\pm$ 0.48, caspase-11 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.57 $\pm$ 0.08 vs. 4.48 $\pm$ 0.59, GSDMD mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.26 $\pm$ 0.03 vs. 1.83 $\pm$ 0.05, transmembrane protein 16F mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.69 $\pm$ 0.38 vs. 2.19 $\pm$ 0.53, TF mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) was 0.35 $\pm$ 0.07 vs. 7.68 $\pm$ 0.32, all $P < 0.05$]. Western blotting analysis showed that, compared to the control group, the model group had significantly increased protein expression levels of caspase-11 and the N-terminal fragment of GSDMD (GSDMD-N) in both liver and lung tissues. Compared to the model group, the treatment group exhibited significantly reduced protein expression levels of caspase-11 and GSDMD-N in both liver and lung tissues [liver tissue: caspase-11 protein expression (caspase-11/GAPDH) was 0.79 $\pm$ 0.02 vs. 1.15 $\pm$ 0.03, GSDMD-N protein expression (GSDMD-N/GAPDH) was 0.77 $\pm$ 0.06 vs. 1.24 $\pm$ 0.03; lung tissue: caspase-11 protein expression (caspase-11/GAPDH) was 0.76 $\pm$ 0.01 vs. 0.96 $\pm$ 0.01, GSDMD-N (GSDMD-N/GAPDH) was 0.79 $\pm$ 0.01 vs. 1.03 $\pm$ 0.02, all $P < 0.05$]. **Conclusions** The ethanol-precipitated fraction of Huanglian Jiedu decoction binds to caspase-11, thereby inhibiting the release of inflammatory and coagulation factors, reducing GSDMD activation, down-regulating TF expression, and suppressing the coagulation cascade. Consequently, it ameliorates LPS-induced DIC.

【Key words】 Huanglian Jiedu decoction; Sepsis; Disseminated intravascular coagulation; Inflammatory response

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82374008); Basic Scientific Research Projects of Higher Education Institutions of Liaoning Provincial Department of Education (2024JYTCB073)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2025.05.014

脓毒症并发弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 是脓毒症死亡的重要原因之一,已成为脓毒症临床治疗的热点和难点问题。近年来有研究显示,中医药对脓毒症 DIC 有较好的疗效,脓毒症 DIC 属于中医温热病范畴,清热解毒是温病祛邪的重要方法,是防止温病传变的关键^[1]。黄连解毒汤是清热泻火解毒的中药名方,由黄连、黄芩、黄柏和栀子四味药组成,其中黄连为君,可清心火、清中焦火热;黄芩为臣,清泄上焦之火;黄柏泄下焦之火,与能宣泄三焦之火的栀子配伍作为佐药,共清上、中、下三焦热毒,具有泻火除烦,清热利湿,凉血解毒之功效。已有临床经验显示,黄连解毒汤治疗脓毒症的疗效确切,但其化学成分十分复杂,药效物质目前尚不清楚和作用机制尚不明确。本课题组前期的研究结果显示,黄连解毒汤能与脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 结合,通过抑制 LPS/Toll 样受体 4-髓样分化蛋白-2 (toll-like receptor 4-myeloid differentiation protein-2, TLR4-MD-2)/核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路发挥治疗脓毒症的作用^[2-3]。还有研究表明, LPS 可激活天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11 (cysteiny aspartate specific proteinase, caspase-11) 及其下游的焦亡相关蛋白 Gasdermin D (GSDMD),激活组织因子 (tissue factor, TF) 活性启动凝血反应,诱发脓毒症 DIC^[4]。陈桂荣等^[5]研究发现,黄连解毒汤沉淀醇洗部位体外可抑制 caspase-11 的表达^[5],因此选取黄连解毒汤沉淀醇洗部位,对其进行抗脓毒症 DIC 的研究。生物膜干涉技术 (bio-layer interferometry, BLI) 可用于对生物分子相互作用进行检测和分析,且检测结果误差小,操作简单,检测快速,无需对样品进行处理,对寻找和确认中药活性成分靶点具有较大优势^[6-8]。因此本实验采用 BLI 技术对黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 进行互作分析,进一步进行体内活性研究,探讨黄连解毒汤有效部位改善 DIC 的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 黄连解毒汤沉淀醇洗部位的制备: 药材的提取及各组分群的制备参照文献^[5]。黄连解毒汤按黄连:黄芩:黄柏:栀子=3:2:2:3 的比例称取 1 kg,将药材粉碎,加入 10 L 水,在常温下浸泡 1 h,水煎煮回流提取 1 h,趁热过滤,获得第 1 次滤液;再将药渣中加入 8 L 水,水煎煮回流提取 1 h,趁热过滤,获得第 2 次滤液;合并 2 次滤液,静置,沉降

3 d,沉淀干燥,得到沉淀部位。使用预处理完毕的聚酰胺分离沉淀,以 50% 乙醇洗脱聚酰胺柱,洗脱液颜色浅至无色,收集洗脱液,减压浓缩,冷冻干燥得到黄连解毒汤沉淀醇洗部位粉末。

1.2 黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 的亲和力检测: 用氨基酸传感器 APS 特异性捕获 caspase-11 蛋白后与黄连解毒汤沉淀醇洗部位结合,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 稀释 caspase-11 蛋白至 2 mg/L,固化 600 s,用样本稀释缓冲液 buffer+5% 二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 稀释 0.9 mg 黄连解毒汤沉淀醇洗部位,配制成 1.000 0、0.500 0、0.250 0、0.125 0、0.062 5 mmol/L 5 个浓度。使用 ForteBio Data analysis 12.0 对数据进行分析。

1.3 实验动物分组及给药: 选择雄性 Balb/c 小鼠,体重 18~22 g,由辽宁长生生物技术有限公司实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK (辽) 2010-0001。动物在 SDF 级实验室饲养 1 周后,按随机数字表法分为对照组、模型组及给药组。通过尾静脉注射 LPS 复制 DIC 模型,第 1 次注射剂量为 0.4 mg/kg,间隔 7 h 第 2 次注射剂量为 10 mg/kg。对照组给予相同剂量的生理盐水;给药组于制模前 3 d 连续灌胃黄连解毒汤沉淀醇洗液 (含药量 0.031 3 g/kg) 每次 0.2 mL/20 g,连续 3 d。

1.4 检测指标及方法: 制模后 8 h 麻醉小鼠,心尖取血,处死小鼠后取肝和肺组织用于后续实验。

1.4.1 组织病理观察: 肝和肺组织固定于 4% 多聚甲醛中,石蜡包埋,制备 4 μ m 的病理切片,经苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,在光学显微镜下观察肝和肺组织的病理学改变。

1.4.2 血清细胞因子和凝血指标测定: 将全血于 3 000 g (离心半径 8 cm) 4 $^{\circ}$ C 下离心 10 min 取血清,采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血清白细胞介素 (interleukins, IL-18、IL-1 α 和 IL-1 β)、高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1)、凝血酶、凝血酶-抗凝血酶复合物 (thrombin-antithrombin complex, TAT)、纤溶酶原激活物抑制因子 1 (plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1)、纤维蛋白原 (fibrinogen, Fib) 和 D-二聚体水平,操作严格按试剂盒说明书进行。

1.4.3 肝和肺组织 RNA 表达水平测定: 取冻存的肝和肺组织用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,计算各

组浓度,并用逆转录试剂盒逆转录和合成 cDNA,将逆转录得到的 cDNA 用 PCR 仪进行荧光定量反转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)分析。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF mRNA 表达水平。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting) 检测肝和肺组织中的蛋白:取冻存的肝和肺组织,加入裂解液裂解 20 min,离心收集上清液,测定上清液蛋白浓度。在 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶中进行电泳、转膜、封闭、孵育、洗膜后,于室温下与二抗孵育,加入电化学发光显影液进行曝光,用凝胶成像分析系统完成显色成像,获取清晰的蛋白条带图像。使用 Image J 图像分析软件对蛋白条带灰度值定量分析 caspase-11 和 GSDMD-N 端结构域(GSDMD-N)的蛋白表达水平,以目的蛋白与内参蛋白 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

1.5 统计学分析:使用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,采用 Graphpad. Prism 9.5 软件绘制图表。符合正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 的互作分析(图 1):结果显示,黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 的平衡解离常数为 6.18×10^{-5} ,说明黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 有较好的亲和力。

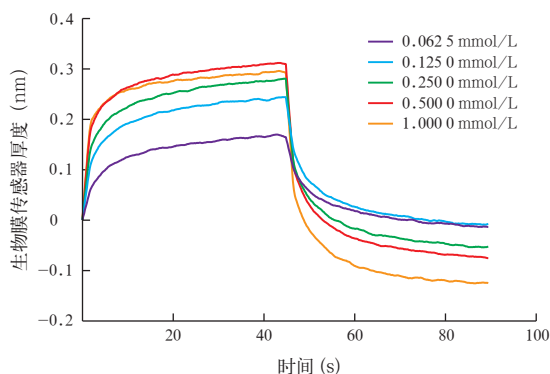


图 1 黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 的互作分析

2.2 黄连解毒汤沉淀醇洗部位对 DIC 小鼠肝和肺组织病理学的影响(图 2):HE 染色结果显示,对照组肝细胞数量丰富,排列紧密,胞质饱满,未见病理学改变;模型组肝组织结构中度异常,可见部分细胞脂肪变性,胞质内可见细小圆形空泡及少量细胞坏死,胞核碎裂固缩深染;给药组上述病理改变均明显改善。对照组肺组织结构正常,肺泡轮廓清晰,肺泡无明显增厚,未见病理学改变;模型组肺组织结构重度异常,视野内组织明显出血,肺泡结构萎缩,肺泡腔内可见大量红细胞,肺泡壁可见明显增厚,支气管上皮细胞排列较紊乱,组织内可见炎性细胞浸润;给药组上述病理改变均明显改善。

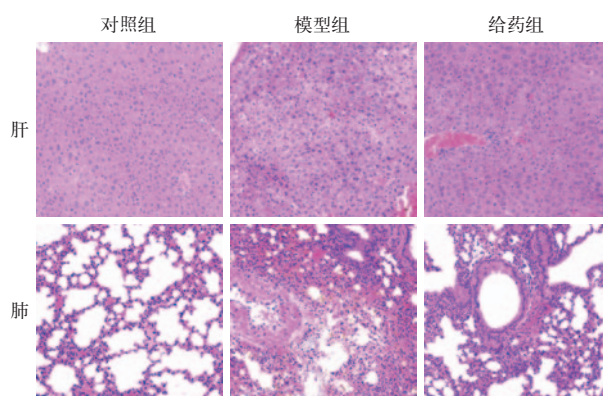


图 2 光镜下观察各组小鼠肝和肺组织的病理学改变
HE 染色 中倍放大

2.3 黄连解毒汤沉淀醇洗部位对 DIC 小鼠细胞因子及凝血功能的抑制作用(表 1~2):与对照组比较,模型组血清细胞因子 IL-18、IL-1 α 和 IL-1 β 、HMGB1,以及凝血指标凝血酶、TAT、PAI-1、Fib 和 D-二聚体水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,给药组血清细胞因子 IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、HMGB1、凝血酶、TAT、PAI-1、Fib 和 D-二聚体水平均明显降低(均 $P < 0.05$)。说明黄连解毒汤沉淀醇洗部位能明显抑制细胞因子及凝血相关因子的释放,改善炎症反应和凝血状况。

表 1 各组小鼠血清细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IL-18 (ng/L)	IL-1 α (ng/L)
对照组	8	79.01 $\pm$ 12.44	384.59 $\pm$ 41.76
模型组	8	167.79 $\pm$ 12.83 ^a	600.30 $\pm$ 50.92 ^a
给药组	8	121.70 $\pm$ 14.96 ^b	475.51 $\pm$ 27.31 ^b
组别	动物数(只)	IL-1 β (ng/L)	HMGB1 (μ g/L)
对照组	8	61.30 $\pm$ 9.18	60.82 $\pm$ 9.04
模型组	8	106.07 $\pm$ 6.87 ^a	117.74 $\pm$ 8.72 ^a
给药组	8	93.00 $\pm$ 9.88 ^b	87.35 $\pm$ 11.96 ^b

注:与对照组比较, ^a $P < 0.05$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.4 黄连解毒汤沉淀醇洗部位对 DIC 小鼠肝肺组织焦亡水平的影响: qRT-PCR 结果显示(表 3~4), 与对照组比较, 模型组肝和肺组织中 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF mRNA 表达水平均明显增加(均 $P<0.05$)。与模型组比较, 给药组肝和肺组织中 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 表达水平均显著减少(均 $P<0.05$)。Western blotting 结果显示(图 3; 表 5~6), 与对照比较, 模型组肝和肺组织中 caspase-11 和 GSDMD-N 的蛋白表达水平均显著增加(均 $P<0.05$); 与模型组比较, 给药组肝和肺组织中 caspase-11 和 GSDMD-N 的蛋白表达水平均显著减少(均 $P<0.05$)。

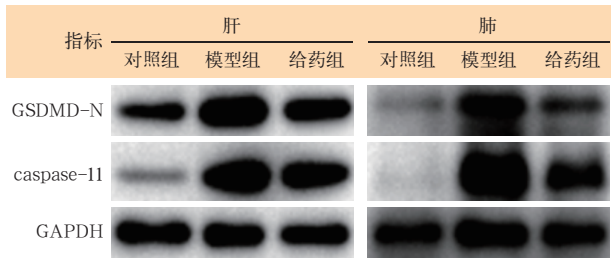


图 3 Western blotting 检测各组小鼠肝和肺组织中 GSDMD-N 和 caspase-11 的蛋白表达

表 5 各组小鼠肝组织 caspase-11 和 GSDMD-N 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数 (只)	caspase-11 蛋白表达 (caspase-11/GAPDH)	GSDMD-N 蛋白表达 (GSDMD-N/GAPDH)
对照组	3	0.23 ± 0.01	0.60 ± 0.01
模型组	3	1.15 ± 0.03 ^a	1.24 ± 0.03 ^a
给药组	3	0.79 ± 0.02 ^b	0.77 ± 0.06 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

表 6 各组小鼠肺组织 caspase-11 和 GSDMD-N 的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	动物数 (只)	caspase-11 蛋白表达 (caspase-11/GAPDH)	GSDMD-N 蛋白表达 (GSDMD-N/GAPDH)
对照组	3	0.18 ± 0.01	0.43 ± 0.01
模型组	3	0.96 ± 0.01 ^a	1.03 ± 0.02 ^a
给药组	3	0.76 ± 0.01 ^b	0.79 ± 0.01 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

3 讨论

中医学认为脓毒症 DIC 是热毒之邪侵袭深入营血, 毒热内蕴, 络脉损伤, 迫血妄行, 因毒致瘀, 毒邪内蕴是导致脓毒症出现血瘀的重要原因^[9-10]。研究显示, 脓毒症早期凝血激活有助于感染的局限, 但凝血活化与炎症反应相互作用, 一旦超过机体的调控能力甚至转化为失控的 DIC 形成可导致器官损

表 2 各组小鼠血清凝血功能指标比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	动物数 (只)	凝血酶 (ng/L)	TAT (ng/L)	PAI-1 (μg/L)	Fib (g/L)	D- 二聚体 (μg/L)
对照组	5	77.54 ± 8.86	213.10 ± 26.27	9.41 ± 1.08	4.68 ± 0.48	332.96 ± 33.96
模型组	5	245.15 ± 8.18 ^a	722.29 ± 28.72 ^a	27.04 ± 0.96 ^a	12.67 ± 0.64 ^a	925.48 ± 30.64 ^a
给药组	5	175.32 ± 11.89 ^b	477.85 ± 37.87 ^b	17.03 ± 1.39 ^b	7.51 ± 0.46 ^b	661.35 ± 52.85 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

表 3 各组小鼠肝组织 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	动物数 (只)	HMGB1 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	caspase-11 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	GSDMD mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	跨膜蛋白 16F mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TF mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
对照组	3	1.01 ± 0.21	1.01 ± 0.16	1.01 ± 0.13	1.03 ± 0.31	1.00 ± 0.11
模型组	3	1.82 ± 0.45 ^a	1.45 ± 0.09 ^a	21.72 ± 3.81 ^a	3.61 ± 0.77 ^a	2.54 ± 0.15 ^a
给药组	3	0.13 ± 0.01 ^b	0.66 ± 0.05 ^b	12.86 ± 2.50 ^b	0.61 ± 0.08 ^b	1.29 ± 0.33 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

表 4 各组小鼠肺组织 HMGB1、caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	动物数 (只)	HMGB1 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	caspase-11 mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	GSDMD mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	跨膜蛋白 16F mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	TF mRNA 表达 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
对照组	3	1.02 ± 0.30	1.01 ± 0.17	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.05 ± 0.40
模型组	3	2.13 ± 0.48 ^a	4.48 ± 0.59 ^a	1.83 ± 0.05 ^a	2.19 ± 0.53 ^a	7.68 ± 0.32 ^a
给药组	3	0.13 ± 0.03 ^b	0.57 ± 0.08 ^b	0.26 ± 0.03 ^b	0.69 ± 0.38 ^b	0.35 ± 0.07 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

害^[11]。通过前期研究表明,黄连解毒汤可能与胞内 LPS 结合,通过清热解毒法发挥清热解毒、凉血化瘀,进而改善脓毒症 DIC 的作用^[12]。

胞内 LPS 是活化 caspase-11 的关键。非经典炎性体是指依赖 caspase-11 的炎性体,小鼠 caspase-11 与人细胞的炎性体 caspase-4 和 caspase-5 是同源蛋白,可被胞内 LPS 的活性中心脂质 A 识别活化并介导细胞焦亡,即 caspase-11 活化,炎性小体激活介导亮氨酸重复序列和含 Pyrin 结构域 3 (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeat and pyrin domain- containing 3, NLRP3)/ 细胞凋亡相关含 CARD 结构域斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC1)/caspase-1 及下游 GSDMD 蛋白剪切,诱导细胞焦亡,进而导致炎症风暴的发生^[13]。脓毒症初期主要引起全身炎症反应综合征,炎症因子风暴在脓毒症的早期阶段起着重要作用。炎症反应和凝血系统激活是机体抗感染的两大防御机制,二者相互作用组成复杂的网络系统^[14-15]。当免疫系统被脓毒症中的细胞因子刺激后,凝血级联反应必然会被启动,以应答脓毒症对于机体所造成的损伤^[16]。IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 是促炎细胞因子,IL-18 的过量产生会导致炎症负担加重并导致组织损伤^[17]; IL-1 α 和 IL-1 β 的合成和分泌是诱发全身炎症的关键,也是机体清除病原微生物的重要途径。适度的炎症对身体是有益,过度则会引起脓毒症。有研究表明, GSDMD 的激活能使 IL-1 α 释放增加,且能促进 IL-1 β 的前体成熟,转变为 IL-1 β ^[18]。还有研究显示,脓毒症死亡患者血清中 IL-1 β 和 IL-1 α 的水平显著高于脓毒症存活患者,进一步说明 IL-1 α 和 IL-1 β 与脓毒症严重程度有关^[19]。HMGB1 是一种普遍存在的核蛋白,存在于几乎所有细胞当中,并且 HMGB1 可以作为受损的宿主细胞释放的损伤相关分子模式,活化血小板,进一步促进血栓形成^[20]。HMGB1 的分泌除了可活化血小板外,还可使白细胞募集和清除细菌^[21]。HMGB1 可以从活化的先天免疫细胞或坏死的细胞中释放出来,使炎症反应加剧,对器官造成损伤,最近有证据表明,在细菌感染诱导的 DIC 时,血中 HMGB1 增加,在血液中 HMGB1 结合 LPS,并将 LPS 递送到宿主细胞的细胞质中,从而激活 caspase-11 依赖性免疫反应和内皮细胞功能障碍^[22-23]。

脓毒症时炎症因子的大量释放会激活凝血级

联反应,失控的凝血反应将发展为危及生命的 DIC。LPS 激活 caspase-11 及其下游的 GSDMD,进而激活 TF 活性启动凝血反应,诱发脓毒症 DIC。Shi 等^[24]研究发现,用 LPS 刺激 caspase-11 基因敲除小鼠后,小鼠的凝血情况有所改善,TF 表达降低。跨膜蛋白 16F 是一种 Ca²⁺ 依赖性磷脂重组酶,可在质膜小叶间双向转运磷脂^[25]。有研究显示,脓毒症时 LPS 与 HMGB1 结合形成复合体,通过细胞膜在细胞内激活 caspase-11,活化的 caspase-11 剪切 GSDMD 通过跨膜蛋白 16F 使 Ca²⁺ 内流,导致细胞膜上的磷脂酰丝氨酸外化,进而促使 TF 释放,诱发出 DIC^[19, 26]。目前普遍认为,脓毒症发生时 TF 的过度表达是引发凝血酶过度生成最主要的因素^[27]。凝血酶是凝血系统中的关键酶,对维持循环系统的完整性和防止过度出血至关重要^[28]。TAT 是凝血酶的生物标志物, DIC 时患者体内 TAT 增加,并促进凝血酶生成,凝血酶的过量产生能抑制纤维蛋白溶解。PAI-1 被认为是 DIC 中纤维蛋白溶解的主要抑制剂^[29],可使纤维蛋白沉积,促进血栓形成。纤维蛋白裂解能产生 D-二聚体, D-二聚体是循环中发现的最小的纤维蛋白溶解特异性降解产物^[30],可提示凝血系统被激活,其对血管内血栓非常敏感,在 DIC 时可能显著升高。有研究显示,预后较差的脓症患者 D-二聚体水平较高,可能诱发出 DIC^[31]。

在总结前期研究基础之上,结合本研究结果,表明黄连解毒汤沉淀醇洗部位对 LPS 诱导的动物模型具有保护作用。本研究中,通过 BLI 技术进行互作分析,发现黄连解毒汤沉淀醇洗部位与 caspase-11 有较好的亲和力,说明可用黄连解毒汤沉淀醇洗部位进行后续研究。制模后小鼠肝和肺组织发生了明显病理改变,给药后得到明显改善,且模型组小鼠炎症因子 IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 和 HMGB1 以及凝血因子凝血酶、TAT、PAI-1、Fib 和 D-二聚体明显增加,说明发生了炎症反应及凝血系统被激活,并且与凝血相关的 caspase-11、GSDMD、跨膜蛋白 16F 和 TF 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显增加。在使用黄连解毒汤沉淀醇洗部位干预以后,与之相关的炎症因子、凝血因子和相关的蛋白表达水平均显著减少,降低了 DIC 发生的风险。

4 结 论

黄连解毒汤的沉淀醇洗部位能与 caspase-11 结合,降低 caspase-11/GSDMD 活化,减少炎症风暴的发生和凝血系统的激活,进而改善脓毒症 DIC。本

研究为可为黄连解毒汤抗 DIC 的药效物质和作用机制研究奠定基础,为脓毒症 DIC 的预防提供研究方法和技术支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 于洋. 清热解毒法防治脓毒症作用机制探讨[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2016, 33 (5): 512–513. DOI: 10.13586/j.cnki.yjyx1984.2016.05.010.
- [2] Chen GR, Zhang G, Li MY, et al. The effective components of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis evaluated by a lipid A-based affinity biosensor [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 186: 369–376. DOI: 10.1016/j.jep.2016.03.064.
- [3] 刘雨浓, 张晓敏, 崔晓英, 等. 黄连解毒汤有效组分通过抑制 Caspase-11 靶点抗脓毒症的研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35 (1): 7–11. DOI: 10.7501/j.issn.1674–5515.2020.01.002.
- [4] Ryan TAJ, Preston RJS, O'Neill LAJ. Immunothrombosis and the molecular control of tissue factor by pyroptosis: prospects for new anticoagulants [J]. Biochem J, 2022, 479 (6): 731–750. DOI: 10.1042/BCJ20210522.
- [5] 陈桂荣, 荆婧, 李明玉, 等. 应用生物传感器筛选黄连解毒汤抗内毒素的有效组分[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34 (5): 1043–1045. DOI: 10.13193/j.issn.1673–7717.2016.05.005.
- [6] Do T, Ho F, Heidecker B, et al. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins [J]. Protein Expr Purif, 2008, 60 (2): 147–150. DOI: 10.1016/j.pep.2008.04.009.
- [7] 张晟, 罗弟祥, 刘怡, 等. 生物膜干涉技术、HPLC 及 ELISA 在抗体定量检测中的比较分析[J]. 免疫学杂志, 2014, 30 (4): 338–341. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20140073.
- [8] 吴雪芬, 卫晓红, 武玉卓, 等. 中药活性成分靶点确定及作用机制研究方法进展[J]. 中国中药杂志, 2022, 47 (17): 4565–4573. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20220330.201.
- [9] 刘清泉. 对脓毒症中医病机特点及治法的认识[J]. 北京中医, 2007, 26 (4): 198–200. DOI: 10.3969/j.issn.1674–1307.2007.04.003.
- [10] 王宜艳, 陈伟. 从“毒”“瘀”“虚”谈脓毒症的中医治疗进展[J]. 中国中医急症, 2017, 26 (9): 1609–1612. DOI: 10.3969/j.issn.1004–745X.2017.09.032.
- [11] Iba T, Levy JH. Sepsis-induced coagulopathy and disseminated intravascular coagulation [J]. Anesthesiology, 2020, 132 (5): 1238–1245. DOI: 10.1097/ALN.0000000000003122.
- [12] 王为, 高紫丹, 刘雨浓, 等. 黄连解毒汤有效成分抗内毒素血症的活性研究[J]. 广州化工, 2017, 45 (20): 68–70. DOI: 10.3969/j.issn.1001–9677.2017.20.024.
- [13] Liu X, Zhang ZB, Ruan JB, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. Nature, 2016, 535 (7610): 153–158. DOI: 10.1038/nature18629.
- [14] Xu YB, Dou DQ, Ran XK, et al. Integrative analysis of proteomics and metabolomics of anaphylactoid reaction induced by Xuesaitong injection [J]. J Chromatogr A, 2015, 1416: 103–111. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.09.019.
- [15] Gu M, Mei XL, Zhao YN. Sepsis and cerebral dysfunction: BBB damage, neuroinflammation, oxidative stress, apoptosis and autophagy as key mediators and the potential therapeutic approaches [J]. Neurotox Res, 2021, 39 (2): 489–503. DOI: 10.1007/s12640–020–00270–5.
- [16] Giustozzi M, Ehrlicher H, Bongiovanni D, et al. Coagulopathy and sepsis: pathophysiology, clinical manifestations and treatment [J]. Blood Rev, 2021, 50: 100864. DOI: 10.1016/j.blre.2021.100864.
- [17] Vecchié A, Bonaventura A, Toldo S, et al. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? [J]. J Cell Physiol, 2021, 236 (3): 1638–1657. DOI: 10.1002/jcp.30008.
- [18] Banerjee I, Behl B, Mendonca M, et al. Gasdermin D restrains type I interferon response to cytosolic DNA by disrupting ionic homeostasis [J]. Immunity, 2018, 49 (3): 413–426. e5. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.07.006.
- [19] Yang XY, Cheng XY, Tang YT, et al. Bacterial endotoxin activates the coagulation cascade through gasdermin D-dependent phosphatidylserine exposure [J]. Immunity, 2019, 51 (6): 983–996. e6. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.11.005.
- [20] 刘一娜, 马晓春. 脓毒症与凝血功能紊乱[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38 (11): 993–997. DOI: 10.19538/j.nk.2018110120.
- [21] Zhou H, Deng MH, Liu YJ, et al. Platelet HMGB1 is required for efficient bacterial clearance in intra-abdominal bacterial sepsis in mice [J]. Blood Adv, 2018, 2 (6): 638–648. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017011817.
- [22] Yang XY, Cheng XY, Tang YT, et al. The role of type I interferons in coagulation induced by gram-negative bacteria [J]. Blood, 2020, 135 (14): 1087–1100. DOI: 10.1182/blood.2019002282.
- [23] Deng C, Zhao L, Yang Z, et al. Targeting HMGB1 for the treatment of sepsis and sepsis-induced organ injury [J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43 (3): 520–528. DOI: 10.1038/s41401–021–00676–7.
- [24] Shi J, Tang YT, Liang F, et al. NLRP3 inflammasome contributes to endotoxin-induced coagulation [J]. Thromb Res, 2022, 214: 8–15. DOI: 10.1016/j.thromres.2022.04.001.
- [25] Watanabe R, Sakuragi T, Noji H, et al. Single-molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115 (12): 3066–3071. DOI: 10.1073/pnas.1717956115.
- [26] Chen VM. Tissue factor de-encryption, thrombus formation, and thiol-disulfide exchange [J]. Semin Thromb Hemost, 2013, 39 (1): 40–47. DOI: 10.1055/s-0032-1333311.
- [27] Iba T, Gando S, Thachil J. Anticoagulant therapy for sepsis-associated disseminated intravascular coagulation: the view from Japan [J]. J Thromb Haemost, 2014, 12 (7): 1010–1019. DOI: 10.1111/jth.12596.
- [28] Wu DZ, Prem A, Xiao JJ, et al. Thrombin—a molecular dynamics perspective [J]. Mini Rev Med Chem, 2024, 24 (11): 1112–1124. DOI: 10.2174/1389557523666230821102655.
- [29] Zeerleder S, Schroeder V, Hack CE, et al. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis [J]. Thromb Res, 2006, 118 (2): 205–212. DOI: 10.1016/j.thromres.2005.06.007.
- [30] Olson JD. D-dimer: an overview of hemostasis and fibrinolysis, assays, and clinical applications [J]. Adv Clin Chem, 2015, 69: 1–46. DOI: 10.1016/bs.acc.2014.12.001.
- [31] Moreno G, Carbonell R, Bodí M, et al. Systematic review of the prognostic utility of D-dimer, disseminated intravascular coagulation, and anticoagulant therapy in COVID-19 critically ill patients [J]. Med Intensiva (Engl Ed), 2021, 45 (1): 42–55. DOI: 10.1016/j.medint.2020.06.006.

(收稿日期: 2025–04–03)

(责任编辑: 邸美仙)

关于杜绝和抵制第三方机构代写代投稿件的通知

近期本刊编辑部监测到部分用户使用虚假的手机号和 Email 地址注册账号, 这些账号的投稿 IP 地址与作者所在单位所属行政区域严重偏离, 涉嫌第三方机构代写代投。此类行为属于严重的学术不端, 我们已将排查到的稿件信息通报编辑部各位编审人员, 杂志社处理收稿的编务部门也将对此类账号做封禁处理, 相关稿件一律做退稿处理。

为弘扬科学精神, 加强科学道德和学风建设, 抵制学术不端行为, 端正学风, 维护风清气正的良好学术生态环境, 请广大读者和作者务必提高认识, 规范行为, 以免给作者的学术诚信、职业发展和所在单位的声誉带来不良影响。

本刊编辑部