

芹菜黄素对香烟提取物诱导人支气管上皮NCI-H292细胞黏蛋白5AC高表达的抑制作用

于 韬^{1*}, 乌兰托雅^{2#}, 包萨日娜¹(1.内蒙古自治区人民医院呼吸内科, 呼和浩特 010017; 2.内蒙古自治区人民医院药学处, 呼和浩特 010017)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0936-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.22

摘要 目的:研究芹菜黄素对香烟提取物诱导人支气管上皮细胞(NCI-H292细胞)黏蛋白5AC(MUC5AC)高表达的抑制作用。方法:以香烟提取物(50 mg/ml)培养人支气管上皮NCI-H292细胞6 h以复制细胞黏蛋白高表达模型。NCI-H292细胞随机均分为正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组、芹菜黄素对照(芹菜黄素作用于正常细胞,10 μg/ml)组、芹菜黄素(芹菜黄素作用于模型细胞,10 μg/ml)组、二甲基硫脲(DMTU)对照(DMTU作用于正常细胞,100 ng/ml)组、DMTU(DMTU作用于模型细胞,100 ng/ml)组。各对照组均以相应药物培养细胞30 min,模型组与用药组均以相应药物培养细胞30 min后再以香烟提取物(50 mg/ml)培养6 h。检测细胞氧化应激活性氧(ROS)含量;采用Western blot法检测磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)蛋白表达水平;采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测MUC5AC mRNA表达水平;采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测MUC5AC蛋白表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组细胞ROS含量增加,p-EGFR、p-ERK蛋白表达增强,MUC5AC mRNA、蛋白表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,芹菜黄素组与DMTU组细胞ROS含量减少,p-EGFR、p-ERK蛋白表达减弱,MUC5AC mRNA、蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:芹菜黄素可抑制NCI-H292细胞ROS的生成、EGFR和ERK的磷酸化,进而抑制气道MUC5AC mRNA和蛋白的过表达。

关键词 黏蛋白5AC;香烟提取物;芹菜黄素;活性氧;表皮生长因子;细胞外调节蛋白激酶

Inhibitory Effects of Apigenin on Mucoprotein 5AC in Human Bronchial Epithelial NCI-H292 Cells Overexpression Induced by Tobacco Extracts

YU Tao¹, WU Lan-tuo-ya², BAO Sa-ri-na¹(1.Dept. of Respiratory, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China; 2.Dept. of Pharmacy, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of apigenin on mucoprotein 5AC(MUC5AC) in human bronchial epithelial NCI-H292 cells overexpression induced by tobacco extracts. METHODS: Human bronchial epithelial NCI-H292 cells were treated with tobacco extracts (50 mg/ml) for 6 h to induced overexpression of MUC5AC. Human bronchial epithelial NCI-H292 cells were cultured *in vitro* and randomly divided into normal control group (conventional culture), model group (conventional culture), apigenin control group (apigenin effected on normal cells, 10 μg/ml), apigenin group (apigenin effected on model cells, 10 μg/ml), DMTU control (DMTU effected on normal cells, 100 ng/ml) group and DMTU (DMTU effected on model cells, 100 ng/ml) group. Cells in each control group were treated with corresponding drugs for 30 min while cells in model group and treatment groups were treated with tobacco extracts (50 mg/ml) for 6 h after cultured with drugs for 30 min. Cell oxidative stress reactive oxygen species (ROS) content was detected; phosphorylation epidermal growth factor receptor (p-EGFR) and phosphorylated extracellular protein kinase (p-ERK) protein levels were detected by western blot method; MUC5AC mRNA expression level was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction method (RT-PCR); MUC5AC protein expression level was detected by ELISA method. RESULTS: Compared with normal control group, the ROS content increased, p-EGFR and p-ERK protein expression increased, MUC5AC mRNA and protein were increased in model group. There was statistical significant difference ($P<0.01$). Compared with model group, the ROS content decreased, p-EGFR and p-ERK protein expression decreased, MUC5AC mRNA and protein decreased in apigenin and DMTU groups. There was statistical significant difference ($P<0.01$). CONCLUSIONS: Apigenin can inhibit the ROS production in human bronchial NCI-H292 cells, the phosphorylation of EGFR and ERK, and inhibit the overexpression of MUC5AC mRNA and protein.

KEYWORDS Mucoprotein 5AC; Tobacco extracts; Apigenin; Reactive oxygen species; Epidermal growth factor receptor; Extracellular protein kinase

气道黏液高分泌是慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、支气管扩张症和肺囊性纤维化等慢性气道炎症性疾病突出的病理

* 主治医师。研究方向:慢性阻塞性肺疾病。电话:0471-6620362。
E-mail: yutao1972858@sina.com

通信作者:副主任药师。研究方向:呼吸药理学。电话:0471-6619158。E-mail: fishhuhu8@gmail.com

生理特征表现之一,临床以反复的慢性咳嗽、咳痰为主要症状。黏蛋白5AC(Mucin5AC, MUC5AC)是气道中最主要的分泌型蛋白^[1-2]。过多的黏稠黏液滞留于气道形成黏液栓,可阻塞气道并为致病菌的定植和繁殖提供温床,造成顽固的缺氧和持续感染,使病情恶化。芹菜黄素(Apigenin, Api, 4',5'-7-三羟基黄酮)又称芹菜素或芹黄苷,是一类广泛存在于芹菜、苹果

等植物中的黄酮类化合物。目前已证实芹黄素具有抗氧化、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物活性^[3-5],但关于芹黄素对气道黏液高分泌的抑制作用尚无相关报道。本研究旨在对芹黄素对香烟提取物诱导的气道黏液高分泌的抑制作用及相关机制进行初步探讨,以期对气道黏液高分泌的药物治疗提供新的研究方向。

1 材料

1.1 仪器

聚合酶链反应(PCR)扩增仪与凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);F200型酶标仪(德国Tecan公司);CP100MX型超速冷冻离心机(美国Sigma公司)。

1.2 药品与试剂

芹黄素(纯度:≥98%)、二甲基硫脲(DMTU)、MTT均购自美国Sigma公司;RPMI-1640培养基、胎牛血清(美国HyClone公司);PCR相关试剂(大连宝生物工程有限公司);磷酸化表皮生长因子受体(p-EGFR)单克隆抗体、EGFR单克隆抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)单克隆抗体、ERK单克隆抗体、抗MUC5AC单克隆抗体、抗β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体及相应二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);MUC5AC酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒与活性氧(ROS)检测试剂盒(武汉博士德生物工程公司);全蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE试剂盒(南京凯基科技发展有限公司);MUC5AC特异性引物(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 细胞

人支气管上皮细胞(NCI-H292细胞)购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 香烟提取物的制备

参考文献[6]进行提取。宏声牌香烟经注射器驱动装置连续抽吸,每支香烟抽提10喷,每喷50 ml。吸入的香烟经三通管缓慢注入50 ml氯仿中制成悬液并充分溶解。经0.22 μm微孔过滤器滤过除菌,-20 °C贮藏,备用。使用时以无血清RPMI-1640将质量浓度调整为50 mg/ml并尽快用于试验。

2.2 细胞培养与分组、给药

NCI-H292细胞以 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 的细胞密度接种于6孔板(每孔2 ml细胞悬液,用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液培养),置于37 °C、5%CO₂培养箱中培养。待细胞融合达80%~90%时传代并随即分为5组^[7],即正常对照(常规培养液)组、模型(常规培养液)组、芹黄素对照(芹黄素作用于正常细胞,10 μg/ml)组、芹黄素(芹黄素作用于模型细胞,10 μg/ml)组、DMTU对照(DMTU作用于正常细胞,100 ng/ml)组、DMTU(DMTU作用于模型细胞,100 ng/ml)组。各对照组均以相应药物培养细胞30 min;模型组与用药组均以相应药物培养细胞30 min后再以香烟提取物(50 mg/ml)培养细胞6 h。

2.3 各组细胞ROS含量的检测

去掉各组培养液,每孔按1 000:1(V/V)比例加入适量新鲜培养液和溶液A,将培养板重新置于培养箱中继续培养30 min后去除培养上清液,每孔加入1 ml溶液B于室温下孵育5 min后,在650 nm波长处读取吸光度。

2.4 各组细胞p-EGFR、p-ERK蛋白表达的检测

提取各组细胞总蛋白并调节各组蛋白总量,8% SDS-PAGE电泳分离并电转PVDF膜,室温下5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗(1:1 000,V/V)4 °C孵育过夜,辣根过氧化物酶标记

的二抗(1:5 000,V/V)37 °C孵育2 h后以显像剂(ECL)显像,以分别与总EGFR或总ERK的比值作为相对含量。

2.5 各组细胞MUC5AC mRNA表达的检测

提取各组细胞总RNA,2 μg RNA合成cDNA后取20 ng cDNA进行扩增。MUC5AC上游引物:5'-TCCCTTATCCTC-GGCCCT-3',下游引物:5'-GTCGTGGTCCGATGGATC-3'。95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C退火30 s,循环40次。以MUC5AC与内参GAPDH的比值作为相对表达量。

2.6 各组细胞MUC5AC蛋白表达的检测

各组吸取50 μl总蛋白于96孔酶标反应板,40 °C过夜,加入MUC5AC单克隆抗体(1:1 000,V/V)孵育1 h后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000,V/V)继续孵育1 h,四甲基联苯胺过氧化物酶溶液显色,1 mol/L硫酸终止反应后于450 nm波长处读取吸光度。

2.7 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞ROS含量的检测结果

与正常对照组比较,模型组细胞ROS含量增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示香烟提取物可诱导细胞ROS的生成;DMTU组与芹黄素组细胞ROS含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示芹黄素和DMTU一样,具有强大的ROS清除功能。各组细胞ROS含量的检测结果见表1。

表1 各组细胞ROS含量的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of ROS content of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | ROS相对含量 |
|---------|--------------|
| 正常对照组 | 0.37 ± 0.04 |
| 模型组 | 1.12 ± 0.13* |
| 芹黄素对照组 | 0.44 ± 0.05 |
| 芹黄素组 | 0.51 ± 0.07* |
| DMTU对照组 | 0.41 ± 0.06 |
| DMTU组 | 0.53 ± 0.08* |

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, # $P < 0.01$

0.01

3.2 各组细胞MUC5AC mRNA、蛋白表达与p-EGFR、p-ERK蛋白表达的检测

与正常对照组比较,模型组细胞MUC5AC mRNA、蛋白表达增强,p-EGFR、p-ERK蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示香烟提取物可分别诱导MUC5AC mRNA、蛋白高表达,以及EGFR和ERK磷酸化。与模型组比较,DMTU组与芹黄素组细胞MUC5AC mRNA、蛋白表达减弱,p-EGFR、p-ERK蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$),提示芹黄素和ROS清除剂DMTU一样,可阻滞大部分香烟提取物诱导的MUC5AC mRNA和蛋白高表达以及EGFR和ERK磷酸化,但不排除其他信号分子参与其中。可知,芹黄素可通过抑制ROS的生成,从而抑制香烟提取物诱导的EGFR和ERK活化,以及MUC5AC mRNA和蛋白高表达。各组细胞MUC5AC mRNA、蛋白表达与p-EGFR、p-ERK蛋白表达的检测结果见表2。

4 讨论

气道黏液高分泌不仅是慢性气道炎症性疾病一种常见的临床症状及病理改变,更是影响慢性气道炎症性疾病患者病情

表2 各组细胞 MUC5AC mRNA、蛋白表达与 p-EGFR、p-ERK 蛋白表达的检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of expressions of MUC5AC mRNA and protein, p-EGFR and p-ERK protein of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | MUC5AC mRNA | MUC5AC蛋白 | p-EGFR蛋白 | p-ERK蛋白 |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 正常对照组 | 0.37±0.03 | 0.18±0.05 | 0.49±0.04 | 0.38±0.03 |
| 模型组 | 1.05±0.06* | 0.66±0.05* | 1.44±0.11* | 1.27±0.11* |
| 芹黄素对照组 | 0.34±0.02 | 0.21±0.03 | 0.46±0.05 | 0.35±0.04 |
| 芹黄素组 | 0.45±0.05 [#] | 0.26±0.03 [#] | 0.62±0.05 [#] | 0.59±0.07 [#] |
| DMTU对照组 | 0.36±0.04 | 0.19±0.02 | 0.45±0.07 | 0.40±0.06 |
| DMTU组 | 0.43±0.05 [#] | 0.30±0.03 [#] | 0.61±0.06 [#] | 0.54±0.06 [#] |

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$

Note: vs. normal control group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$

变化及预后的独立危险因素^[8-9]。因此,慢性气道炎症性疾病伴随的气道黏液高分泌已成为目前研究的热点^[10-11]。吸烟对机体各个系统,尤其是呼吸道的不良影响已成不争事实。长期大量吸烟,可引起慢性气道炎症并增加肺癌的发病率^[12-13]。目前普遍认为,香烟提取物也是炎症反应时气道黏液高分泌形成过程的主要诱导因素^[14-15]。香烟烟雾中至少含有4 500种化学物质,其中最主要的包括大量的毒性氧自由基。有研究表明,吸烟者的气道黏液高分泌病理特征性改变较不吸烟者高出2~8倍,且吸烟指数越高,危险系数越高。既往研究显示,ROS-EGFR-ERK信号通路在香烟所诱导的气道黏蛋白过合成中起着重要的作用。在本研究中,笔者证实了芹黄素可和ROS清除剂一样通过抑制ROS的生成及EGFR和ERK的磷酸化进而抑制MUC5AC的高表达。这为芹黄素抑制气道黏液高分泌的临床应用提供了依据。

EGFR是一类具有广泛生物学活性的信号分子,可通过配体依赖和非配体依赖两种途径完成磷酸化,激活下游信号蛋白,其中最主要是激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号家族,启动MUC5AC合成。尽管MUC5AC的合成途径交错繁多,但目前普遍认为无论是何种信号途径,EGFR都是处于中心地位的信号分子,具有“限速信号蛋白”的作用^[16-18]。当香烟提取物刺激气道并释放大量炎性介质,可导致氧爆发性释放大量毒性ROS。ROS可通过促进EGFR的配体EGF和TGF- α 的释放直接激活EGFR,从而进一步激活下游MAPKs信号分子,还可通过非配体的方式反向激活EGFR。鉴于EGFR在MUC5AC蛋白过表达中的核心地位,通过抑制EGFR的磷酸化来抑制MUC5AC蛋白的合成是治疗气道黏液高分泌的有效靶点和热点。而ROS因兼具上述双重激活EGFR的作用,目前已成为抑制EGFR活性的关键靶蛋白。

芹黄素是一类广泛存在于多种蔬菜、水果及茶叶中的黄酮类化合物,其中以芹菜中的含量最高。芹黄素在抗炎、抗病毒、抗肿瘤和免疫调节方面具有广泛的生物学活性^[19-20]。本研究通过离体细胞试验进一步证实,在无明显毒副作用的情况下,芹黄素可通过抑制ROS的生成、EGFR-ERK的活化,进而抑制MUC5AC基因和蛋白过度表达,提示芹黄素体外实验的安全性和有效性。后续的动物在体实验正在紧张进行中,以期作为芹黄素的临床应用提供更多的理论依据。

综上所述,芹黄素可显著改善香烟烟雾所致的气道黏液高分泌状态。作为一种分布广泛的天然植物成分,芹黄素具有易得、低廉、有效的特点,具有广阔的开发前景。

参考文献

- [1] Davis CW, Dickey B. Regulated airway goblet cell mucin secretion[J]. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70:487.
- [2] Burgel PR, Martin C. Mucus hypersecretion in COPD: should we only rely on symptoms?[J]. *Eur Respir Rev*, 2010, 19(116):94.
- [3] Benavente-García O, Castillo J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15):6 185.
- [4] Asif M. Phytochemical study of polyphenols in Perilla Frutescens as an antioxidant[J]. *Avicenna J Phytomed*, 2012, 2(4):169.
- [5] Li A, Sun A, Liu R, et al. An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of Trichosanthes kirilowii Maxim. using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 965:150.
- [6] Bowen NJ, Fujita N, Kajita M, et al. Mi-2/NuRD: multiple complexes for many purposes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677(1/2/3):52.
- [7] Kim JO, Sikder MA, Lee HJ, et al. Phorbol ester or epidermal growth-factor-induced MUC5AC mucin gene expression and production from airway epithelial cells are inhibited by apigenin and wogonin[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(12):1 784.
- [8] Morcillo EJ, Cortijo J. Mucus and MUC in asthma[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2006, 12(1):1.
- [9] Vestbo J, Hogg JC. Convergence of the epidemiology and pathology of COPD[J]. *Thorax*, 2006, 61(1):86.
- [10] Rogers DF, Barnes PJ. Treatment of airway mucus hypersecretion[J]. *Ann Med*, 2006, 38(2):116.
- [11] Lai H, Rogers DF. New pharmacotherapy for airway mucus hypersecretion in asthma and COPD: targeting intracellular signaling pathways[J]. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2010, 23(4):219.
- [12] Rab A, Rowe SM, Raju SV, et al. Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(8):530.
- [13] Vermaelen K, Brusselle G. Exposing a deadly alliance: novel insights into the biological links between COPD and lung cancer[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2013, 26(5):544.
- [14] Baginski TK, Dabbagh K, Satjawatcharaphong C, et al. Cigarette smoke synergistically enhances respiratory mucin induction by proinflammatory stimuli[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(2):165.
- [15] Montalbano AM, Albano GD, Anzalone G, et al. Cigarette smoke alters non-neuronal cholinergic system components inducing MUC5AC production in the H292 cell line [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 15(1):35.
- [16] Kim S, Lewis C, Nadel JA. CCL20/CCR6 feedback exaggerates epidermal growth factor receptor-dependent

间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学研究

杨瑞玲^{1,2*}, 刘宏^{1#}, 陈丹³, 曹金发^{1,2}, 沈晶晶^{1,2}(1.广州军区武汉总医院药剂科, 武汉 430070; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 3.解放军第161医院药剂科, 武汉 430010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0939-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.23

摘要 目的:建立间苯三酚血药浓度的测定方法,并研究间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学特征。方法:取6只健康家兔ig给予间苯三酚颗粒(80 mg/kg)溶液,于给药前和给药后0.083、0.17、0.25、0.3、0.33、0.42、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6 h分别自耳动脉采血1.5 ml。采用高效液相色谱法检测其血药浓度,色谱柱为Welchrom C₁₈,流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(3.5:96.5),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为267 nm,进样量为20 μl,内标为对苯二酚。采用DAS 2.1.1药动学软件计算其药动学参数。结果:间苯三酚在0.12~3.0 μg/ml质量浓度范围内与其峰面积与内标峰面积的比值呈良好的线性关系($r=0.999\ 3$),提取回收率为86.02%~91.33%,RSD为4.9%~5.3% ($n=3$),日内RSD为4.5%~5.6% ($n=3$),日间RSD为4.9%~5.8% ($n=3$);间苯三酚在家兔体内的药动学参数 $t_{1/2\beta}$ 、 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0-6\ h}$ 分别为(1.05±0.16) h、(0.25±0.05) h、(1 076.01±19.62) μg/L、(919.02±34.00) μg·h/L。结论:该法专属性强、精密度高,符合血浆样品测定要求,可用于间苯三酚家兔体内的药动学研究。间苯三酚颗粒在家兔体内代谢过程符合一室模型。

关键词 间苯三酚;颗粒剂;高效液相色谱法;药动学;兔

Pharmacokinetic Study of Phloroglucinol Granules in Rabbits *in vivo*

YANG Rui-ling^{1,2}, LIU Hong¹, CHEN Dan³, CAO Jin-fa^{1,2}, SHEN Jing-jing^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuhan 430070, China; 2.College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3.Dept. of Pharmacy, No. 161 Hospital of PLA, Wuhan 430010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC method to determine the plasma concentration of phloroglucinol granules in rabbits *in vivo*. METHODS: In total of 1.5 ml ear arterial blood of 6 healthy rabbits was collected before and 0.083, 0.17, 0.25, 0.3, 0.33, 0.42, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 6 h after phloroglucinol granules (80 mg/kg) solution. HPLC was conducted to determine the drug concentration with chromatographic column of Welchrom C₁₈ column, mobile phase was acetonitrile-phosphate buffer (3.5:96.5) with the flow speed of 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃, detection wavelength was 267 nm, injection volume was 20 μl. The pharmacokinetics parameters were calculated by DAS 2.1.1. RESULTS: There was a good linear relationship between phloroglucinol and the ratio of peak area and internal standard peak area in the range of 0.12-3.0 μg/ml ($r=0.999\ 3$); extraction recovery was in the range of 86.02%-91.33%, RSD was in 4.9%-5.3% ($n=3$); intra-day RSD was 4.5%-5.6% ($n=3$), inter-day RSD was 4.9%-5.8% ($n=3$). The pharmacokinetic parameters of phloroglucinol $t_{1/2\beta}$, t_{max} , C_{max} , $AUC_{0-6\ h}$ were (1.05±0.16) h, (0.25±0.05) h, (1 076.01±19.62) μg/L, (919.02±34.00) μg·h/L. CONCLUSIONS: This method has advantages in strong specificity, good precision. It is in line with the requirements of plasma samples determination, which can be used for studying the pharmacokinetic of phloroglucinol in rabbits. Phloroglucinol granules consistent with single model in rabbits *in vivo* metabolism process.

KEYWORDS Phloroglucinol; Granules; HPLC; Pharmacokinetic; Rabbits

MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186(6): 3 392.

- [17] Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna Jde J, Meza-Cervantes P, *et al*. Naegleria fowleri induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation[J]. *Microbiology*, 2009, 155(11): 3 739.
- [18] Wang J, Liu YT, Xiao L, *et al*. Anti-inflammatory ef-

fects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(6): 2 085.

- [19] Wang E, Chen F, Hu X, *et al*. Protective effects of apigenin against furan-induced toxicity in mice[J]. *Food Funct*, 2014, 5(8): 1 804.

- [20] Lee Y, Sung B, Kang YJ, *et al*. Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1 599.

* 硕士研究生。研究方向:药物制剂新技术与新剂型。E-mail: ling19880611@126.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:药物制剂新技术与新剂型。电话:027-50772871。E-mail:honguil@163.com

(收稿日期:2014-08-11 修回日期:2014-11-25)

(编辑:张静)