



中山大學生命科學學院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

# 易康正道（上道）九味水 对机体炎症的调控作用 实验结果报告

完成单位：中山大学生命科學學院

2018 年 5 月 14 日





# 中山大学生命科学学院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

## 实验结果报告

### 易康正道（上道）九味水对机体炎症的调控作用

#### 1. 实验目的

分别从离体与整体水平检测易康正道（上道）九味水对炎症的调控作用。

#### 2. 材料试剂

细胞：上皮 BEAS-2B 细胞

动物：C57 小鼠

实验试剂：

名称	品牌	货号	批号
Phospho-NF- $\kappa$ B P65	CST	3033	2017/6/26
PMSF (100 mM)	碧云天	ST506	2017/10/16
RIPA 裂解液（强）	碧云天	P0013B	67026518
pagerulerprestained protein ladde	赛默飞	26619	#00514853
$\beta$ -Actin 抗体	博士德	BM0627	2017/9/27
GAPDH Antibody	Proteintech	10494-1-AP	00055216
羊抗兔 IgG HRP	博士德	BA1054	BST12J20B54
羊抗小鼠 IgG HRP	博士德	BA1050	BST12J15B50
兔抗羊 IgG HRP	博士德	BA1060	BST10H11BAH
丙烯酰胺(Acrylamide)	BIOSHARPA Amresco	'0341	171011
N,N-亚甲基双丙烯酰胺(BIS- ACRYLAMIDE)	Amresco	110-26-9	0172-100G
Tris Base	BIOFROXX	77-86-1	EZ1609D313
SDS	BIOSHARP Sigma	L-5750	EXP2015/03





# 中山大学生命科学学院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

过硫酸铵(Ammonium peroxodisulfate)	BIOTOPPED	7727-54-0	20171101
Glycine (甘氨酸)	KANG LONG	0167	10/2017
甲醇	Amresco		
Tween-20	广州化学试剂	32058	20170601-2
脱脂奶粉	华其盛 Amresco	0777	2017/2/21
BCA 蛋白定量试剂盒	KANG LONG Difco	232100	EZ2811C273
5*蛋白上样缓冲液	Pierce	23227	#RE232694
TEMED	谷歌生物	G2013	2017/10/20
PBS	Amresco	0761	2017
水合氯醛	博士德生物	AR0030	
高纯总 RNA 快速提取试剂盒 (离心柱型)	阿拉丁		J1516063
Recombinant DNase I(RNase-free)	BIOTEKE	RP1201	
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	TAKARA	2270A	
Oligo d(T)18 Primer	TAKARA	2313A	
Random Primer	TAKARA	3806	
(Hexadeoxyribonucleotide mixture; pd(N)6)	TAKARA	3801	
Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-)	TAKARA	2641A	
dNTP Mixture	TAKARA	T4019	
SYBR GREEN		QPK-201	
无水乙醇	广州化学试剂		
氯仿	广州化学试剂		

### 3. 仪器设备

5840R 低温离心机, eppendorf;

7S-2 脱色摇床, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;





# 中山大学生命科学学院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

DK-450B 电热恒温热水槽, 上海森信实验仪器有限公司;

全波长酶标仪 Multiskan GO, 赛默飞世尔;

5200 凝胶成像系统, Tanon;

百分位电子天平, 上海瑶新电子科技;

千分之一电子天平, 上海瑶新电子科技;

荧光定量 PCR 仪, 博日;

H1850R 低温离心机, 湘仪;

超微量核酸分析仪 Nano-200, 杭州奥盛。

## 4. 操作流程

### 4.1 离体实验

细胞培养→提取蛋白→制备 SDS-PAGE 胶→蛋白样品变性、电泳→电泳转膜→封闭→孵育一抗→TBST 洗涤多余一抗→孵育 HRP 标记的二抗→TBST 洗涤多余二抗→ECL 试剂作用→X-光片曝光、显影→Image-Pro Plus 6 软件分析结果





# 中山大学生命科学学院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

## 4.2 动物实验

小鼠分组→自由饮水（浓水、混合水或淡水）→每 4 天称重一次→饮水第 10 天进行感染造模→24 小时后完成造模→小鼠称重并进行处死→取双侧肺称重记录并计算肺指数→取左肺进行 qPCR 实验（提取总 RNA、RT、qPCR）

## 5. 实验结果与分析

### 5.1 易康正道（上道）九味水对离体细胞炎症的调控作用

细胞共分为 7 组，分别为对照组、阴性对照组（纯水+甘露醇）、LPS 炎症模型组、3 种水产品处理组，以及阳性对照组（地塞米松组）。如图 1 所示，经促炎刺激物 LPS 处理后，细胞 Phospho-NF- $\kappa$ B P65 增强，说明细胞发生炎症反应。而经易康正道（上道）九味水、混合水（浓水：淡水为 1:1）或淡水预处理后，细胞内 Phospho-NF- $\kappa$ B P65 增强现象被有效抑制，初步提示了易康正道（上道）九味水具有抗炎的作用。

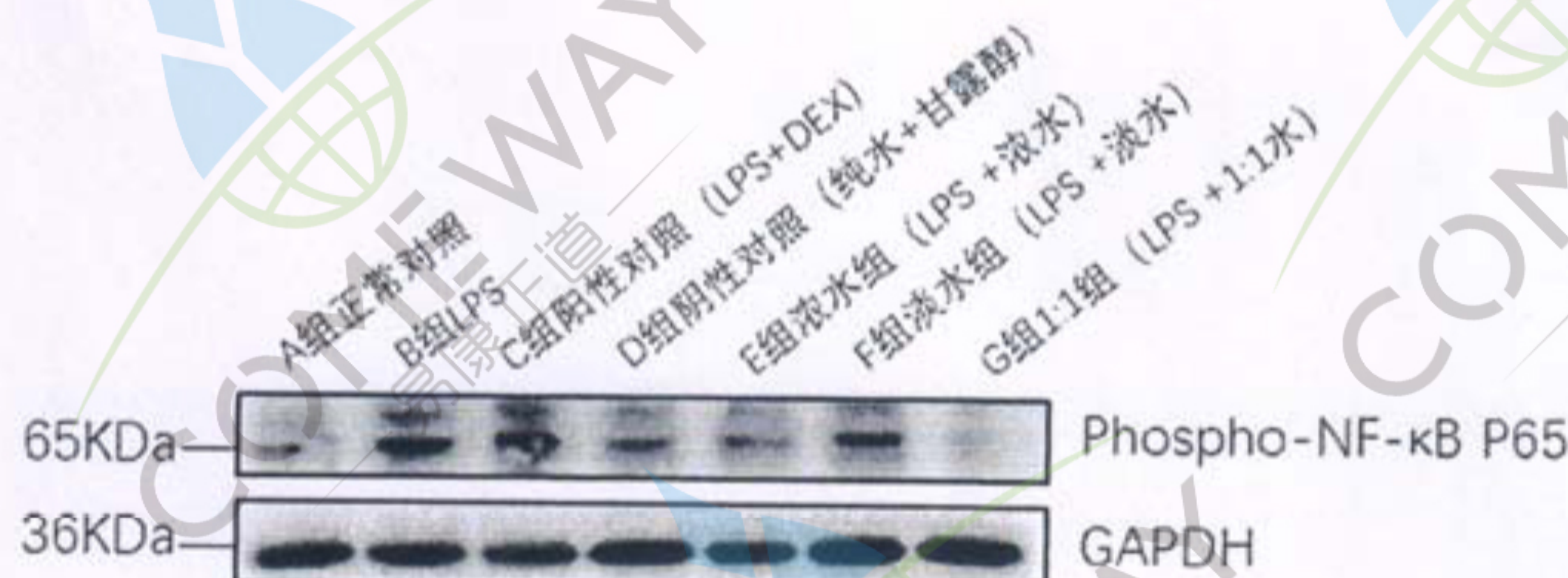


图 1 易康正道（上道）九味水对 BEAS-2B 细胞 Phospho-NF- $\kappa$ B P65 的影响





# 中山大學生命科學學院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

## 5.2 易康正道（上道）九味水对小鼠肺炎的调控作用

通过整体动物实验进一步考察易康正道（上道）九味水对小鼠肺炎的调控作用。小鼠共分为 5 组，分别为对照组、LPS 炎症模型组，以及 3 种水产品饮用组。造模完成后，首先对各组小鼠肺指数进行计算，结果如图 2 所示，LPS 炎症模型组小鼠肺指数升高，说明肺部出现水肿，提示了炎症的发生，而饮用了 3 种易康正道（上道）九味水产品的小鼠，其肺指数出现不同程度的下降，提示了易康正道（上道）九味水可能具有抗炎作用。

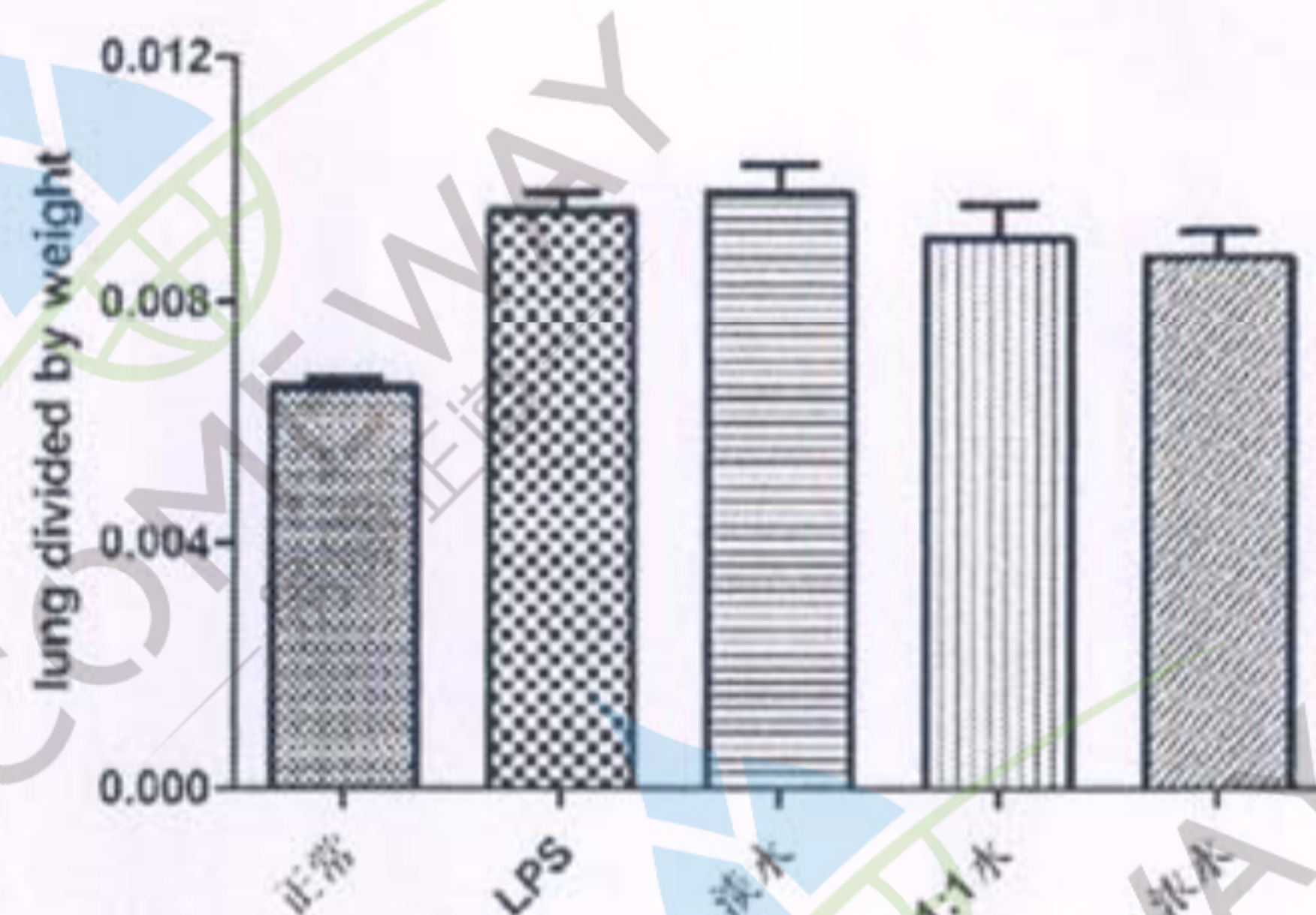


图 2 易康正道（上道）九味水对小鼠肺指数的影响 ( $n=8$ )

随后，取各组小鼠左肺提取 RNA 并检测其促炎细胞因子表达情况。结果如图 3 所示，LPS 炎症模型组小鼠 IL-6 与 IL-1 $\beta$  两种促炎细胞因子表达水平均显著升高，说明炎症小鼠肺部发生炎症，而饮用了 3 种易康正道（上道）九味水产品的小鼠，其促炎细胞因子表达均出现不同程度的下降，说明饮用易康正道（上道）九味水可能具有抗炎效果。





# 中山大学生命科学学院

School of Life Sciences, Sun Yat-sen University

中国广州新港西路 135 号

邮编: 510275

传真: 86-20-84036215

<http://lifesci.sysu.edu.cn>

No.135, Xingangxi Road, Guangzhou, People's Republic of China

Zip: 510275

Fax: 86-20-84036215

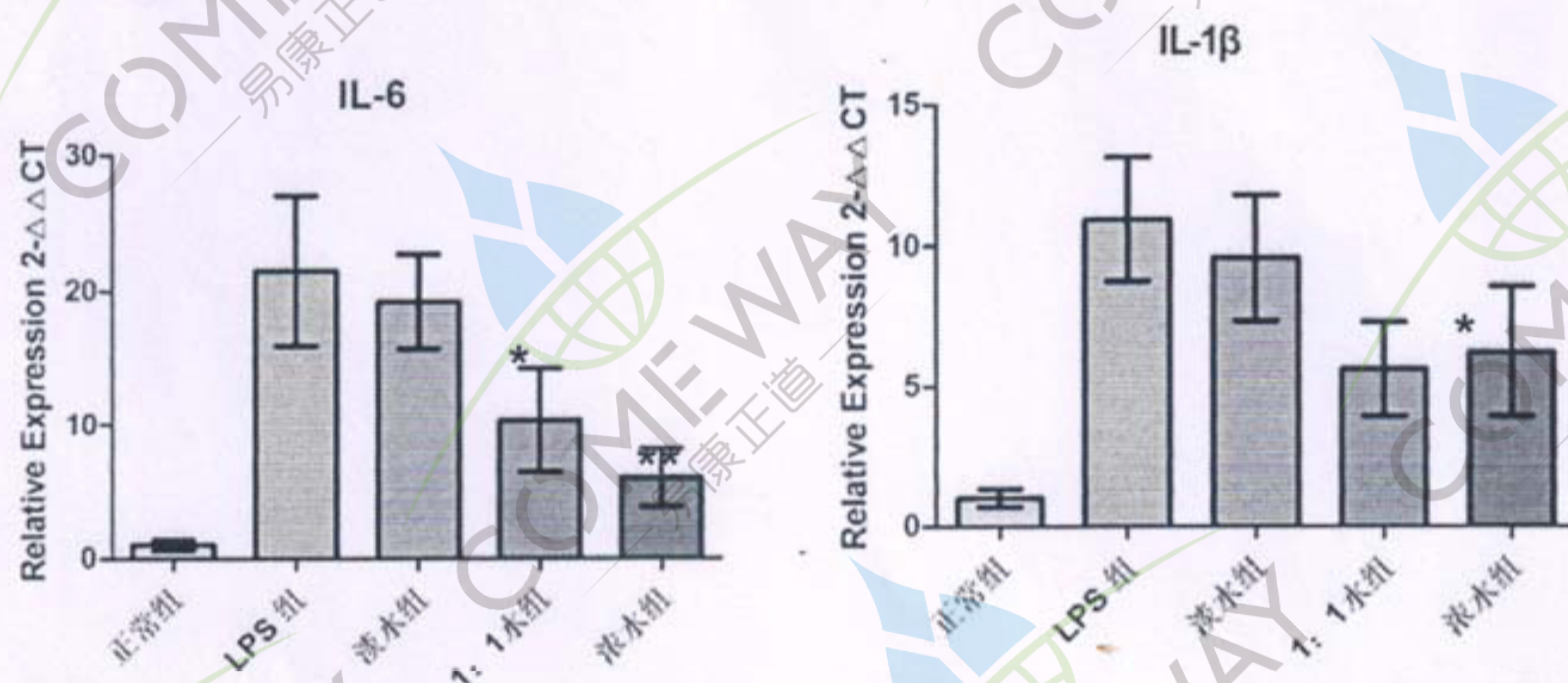


图 3 易康正道（上道）九味水对小鼠肺组织促炎细胞因子表达的影响 ( $n=4$ )

## 6. 实验结论

LPS 是细菌脂多糖, 常用于模拟细菌感染所引起的炎症。在本实验中, 使用铜绿假单胞菌 (一种临床上常见的呼吸道病原菌) LPS 刺激可以在离体与整体水平引起炎症。在离体实验中, 经易康正道 (上道) 九味水、混合水 (浓水: 淡水为 1:1) 或淡水预处理后, 细胞内介导炎症的转录因子 NF-κB P65 磷酸化被有效抑制, 其中以混合水抑制效果最佳, 且总体抗炎效果优于阳性对照药物地塞米松。在整体动物实验中, 饮用易康正道 (上道) 九味水、混合水 (浓水: 淡水为 1:1) 或淡水后, 小鼠肺炎各指标均出现不同程度的下降, 其中以九味水与混合水抑制效果最佳。综上, 易康正道 (上道) 九味水、混合水 (浓水: 淡水为 1:1) 与淡水产品具有一定的抗炎效果, 其中九味水与混合水抗炎效果较为突出。