

蒙药五味沙棘散对吸烟致小鼠肺部炎症的改善作用及机制研究^Δ

包桂兰^{1*}, 王秀枝^{1,2}, 梁凤娟¹, 刘佳¹, 刘铮¹(1.内蒙古民族大学药物化学与药理学研究所, 内蒙古通辽028000; 2.乌兰察布市中心医院药剂科, 内蒙古乌兰察布012000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4411-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.24

摘要 目的:研究蒙药五味沙棘散(WSP)对吸烟所致小鼠肺部炎症的改善作用及其机制。方法:将30只ICR小鼠随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和WSP组(2 g/kg)。模型组和WSP组小鼠采用被动吸烟法复制肺部炎症损伤模型,并于造模的同时每天ig相应药物1次,连续28 d。给药结束后,采用酶联免疫吸附法检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6和IL-10水平;苏木精-伊红染色后光镜下观察小鼠肺组织病理变化;Western blot法检测小鼠肺组织中细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)和磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)蛋白表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显升高($P < 0.01$),肺组织发生明显炎症病变,肺组织中p-ERK1/2、p-p38 MAPK、p-NF- κ B p65蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,WSP组大鼠BALF中TNF- α 、IL-1 β 水平明显降低($P < 0.05$),肺组织炎症损伤明显改善,肺组织中p-p38 MAPK和p-NF- κ B p65蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。结论:WSP可能通过阻断p38 MAPK、NF- κ B p65蛋白的磷酸化来抑制炎症因子TNF- α 和IL-6的高表达,从而发挥其对吸烟所致小鼠肺部炎症损伤的改善作用。

关键词 蒙药;五味沙棘散;吸烟;炎症;小鼠

Study on the Improvement Effect and Mechanism of Meng Medicine Wuwei Shaji Powder on Smoke-induced Lung Inflammation in Mice

BAO Guilan¹, WANG Xiuzhi^{1,2}, LIANG Fengjuan¹, LIU Jia¹, LIU Zheng¹(1.Medicinal Chemistry and Pharmacology Institute, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Tongliao, 028000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Wulanchabu Central Hospital, Inner Mongolia Wulanchabu 012000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the improvement effect and mechanism of Meng medicine Wuwei Shaji powder (WSP) on smoke-induced lung inflammation injury in mice. **METHODS:** ICR mice were randomly divided into blank group (normal saline), model group (normal saline) and WSP group (2 g/kg). Mice in model group and WSP group received passive smoking to induce model of lung inflammation injury, and intragastrically administrated relevant medicine when modeling, once a day, for 28 d. After administration, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-10 levels in bronchoalveolar lavage fluids (BALF); the pathological changes of lung tissue were observed by optical microscope after hematoxylin-eosin staining; Western blot was adopted to detect the protein expressions of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK), nuclear factor kappaB p65 (NF- κ B p65) and phosphorylated NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) in lung tissue of mice. **RESULTS:** Compared with blank group, TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels in BALF in model group were obviously increased ($P < 0.01$); lung tissue showed significant inflammatory lesions; and the protein expressions of p-ERK1/2, p-p38

- (7):885-888.
- [11] Dai HJ, Li DW, Wang YX, *et al.* Induction of heat shock protein 27 by bicyclol attenuates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791(1):482-490.
- [12] 冯海容, 郑轶, 常海茹, 等. 紫叶李果实总黄酮对大鼠酒精性肝损伤的保护作用机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(10):1332-1337.
- [13] 韦玲, 黄权芳, 林兴. 满天星染料木黄酮对小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4):102-106.
- [14] Yuan K, Zhang X, Lv L, *et al.* Fine-tuning the expression of microRNA-155 controls acetaminophen-induced liver inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40(11):339-346.
- [15] 庄敏之, 王亚平, 郑昕, 等. 护肝解毒方对药物性肝损伤及相关炎症因子作用研究[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2016, 24(1):26-28.

^Δ 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金面上项目(No.2016MS-0813)

* 教授, 硕士生导师, 硕士。研究方向:中蒙药抗炎免疫药理及心血管药理学。E-mail: bgl-6891@163.com

(收稿日期:2017-06-10 修回日期:2017-09-21)
(编辑:林静)

MAPK, p-NF- κ B p65 in lung tissue were obviously increased ($P<0.01$). Compared with model group, TNF- α , IL-1 β levels in BALF in WSP group were obviously decreased ($P<0.05$); inflammation injury in lung tissue was obviously improved; and protein expressions of p-p38 MAPK and p-NF- κ B p65 in lung tissue were obviously decreased ($P<0.05$). CONCLUSIONS: WSP shows improvement effect on smoke-induced lung inflammation injury in mice, which might be by blocking the p38 MAPK, NF- κ B p65 phosphorylation to inhibit the high expression of inflammatory factors as TNF- α and IL-6.

KEYWORDS Meng medicine; Wuwei Shaji powder; Smoke; Inflammation; Mice

五味沙棘散(WSP)又名沕其日甘-5,是由梔子、甘草、白葡萄干、木香、沙棘膏等5味蒙药制成的一种蒙古族验方,该方性平,为清肺祛痰之主方^[1]。该方以沙棘为君药,其味酸,性温,具有止咳、祛痰、除巴达干(体液)功效;以具有排脓、祛痰功效的木香为辅,配以清肺热、止咳、平喘的白葡萄干,清热、止咳、祛痰的甘草,以及清血热的梔子为佐使,具有清陈久性、潜伏性肺热,止咳定喘和清热祛痰之功效。其在临床主要用于肺热久嗽、喘促痰多、胸中满闷、胸胁作痛和急、慢性支气管炎见上述证候者^[2-3]。本课题组前期研究发现,WSP可显著改善慢性支气管炎小鼠的炎性病变^[4]。有研究表明,吸烟诱发的肺部损伤的本质是诱发了炎症反应,而丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPKs)和核因子- κ B(Nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路在炎症反应中发挥着重要的信号转导作用^[5-6],故若能降低MAPKs/NF- κ B家族蛋白的磷酸化水平便可抑制促炎细胞因子和炎症介质的分泌,就可以缓解炎症^[7]。但目前有关WPS对肺部炎症的改善作用及其作用机制的相关研究甚少。鉴于此,本研究采用被动吸烟法建立小鼠肺部损伤模型^[8],同时ig给予WSP,观察WSP对肺损伤小鼠肺组织病理改变、炎性因子和MAPKs/NF- κ B信号通路相关蛋白表达及磷酸化的影响,探索WSP对吸烟刺激导致的小鼠肺部损伤的改善作用及可能的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Mini-Protean3垂直电泳槽、半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);Multiskan FC酶标仪(美国Thermo Fisher科技公司);ChemiScope 3300 Mini化学发光成像分析系统(上海勤翔科学仪器有限公司);IX53倒置显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

WSP(由内蒙古民族大学附属医院提供,批号:071213,规格:3 g/袋);小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-10酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国Biolegend公司,批号:B192414、B198667、B183449、B183152);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(天津碧云天公司);兔源细胞外信号调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、p38 MAPK,磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)、NF- κ B p65、磷酸化

NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)一抗(美国CST公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

ICR小鼠30只,♂,8周龄,体质量(20 \pm 2)g,购于长春亿斯实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(吉)-2016-0003。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将30只ICR小鼠随机分为3组,每组10只,分别为空白组、模型组和WSP组(2.0 g/kg)^[9]。WSP组小鼠ig 2.0 g/kg的WSP生理盐水溶液,空白组和模型组给ig等体积的生理盐水,每天给药1次,连续给药28 d。同时,于每天给药2 h后,将模型组和WSP组小鼠放入烟室中进行烟熏,每天3次,每次30 min,每次间隔30 min,每次3支烟(每支烟含1 mg尼古丁、13 mg焦油),用以诱导小鼠肺损伤^[8]。

2.2 标本取材

末次吸烟24 h后,小鼠经乙醚处死后取肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluids, BALF)进行炎症因子检测;对未取BALF的小鼠,将左肺置于4%多聚甲醛固定制备病理切片(0.2 mm),右肺置于-80℃条件下保存进行后续的蛋白检测。

2.3 ELISA法检测BALF中炎症因子水平

取BALF,分别按照ELISA试剂盒说明书操作,检测BALF中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-10的水平。

2.4 肺组织病理学观察

取用4%多聚甲醛固定的左肺组织,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色后,置于倒置显微镜下观察肺组织病理学改变。

2.5 Western blot法检测小鼠肺组织中MAPKs/NF- κ B信号通路相关蛋白的表达

将在肺组织加入混合裂解液中充分裂解,离心后取上清,采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,随后加入上样缓冲液在100℃沸水中变性,即得到总蛋白。按30 g蛋白每孔上样,配制10%分离胶和5%浓缩胶,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳结束后转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,然后分别加入相应一抗(1:1 000),4℃孵育过夜。TBST洗膜3次,加入HRP标记的山羊抗小鼠

二抗(1:5 000),室温孵育1 h, TBST洗膜3次。采用全自动化学发光成像分析系统进行扫膜,用凝胶图像分析软件对条带进行相对定量分析,以目标蛋白条带的积分光密度值与内参 β -actin条带的积分光密度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠BALF中炎症因子水平的检测结果

与空白组比较,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平显著升高($P < 0.01$),IL-10水平差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组相比,WSP组小鼠BALF中TNF- α 、IL-6水平显著降低($P < 0.05$),IL-1 β 、IL-10水平差异无统计学意义($P > 0.05$),结果见表1。

表1 各组小鼠BALF中炎症因子水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

Tab 1 Determination results of inflammatory factor-levels in BALF of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{pg/mL}$)

组别	TNF- α	IL-6	IL-1 β	IL-10
空白组	46.480 \pm 4.618	141.490 \pm 17.221	430.605 \pm 30.417	1.784 \pm 0.076
模型组	199.745 \pm 31.853**	464.196 \pm 53.135**	1 558.250 \pm 215.788**	1.700 \pm 0.040
WSP组	133.762 \pm 18.815*	387.365 \pm 16.003*	1 330.340 \pm 195.754	1.857 \pm 0.112

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. blank group,** $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$

3.2 小鼠肺组织病理学改变的观察结果

空白组小鼠肺组织中可见完整、清晰的肺泡及细小支气管结构;而模型组小鼠因吸烟刺激导致肺组织结构发生了明显的病理学改变,包括肺泡壁毛细血管及细小支气管壁血管扩张、充血,组织疏松水肿,有慢性炎症细胞浸润(主要为淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞),肺泡间隔明显增宽;与模型组比较,WSP组小鼠肺组织的病理学改变明显改善,肺泡内炎症细胞的浸润、组织水肿及

表2 各组小鼠肺组织中MAPK/NF- κ B信号通路相关蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination results of MAPK/NF- κ B pathway related proteins in lung tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	p-NF- κ B p65/ β -actin	NF- κ B p65/ β -actin	p-ERK1/2/ β -actin	ERK1/2/ β -actin	p-p38 MAPK/ β -actin	p38 MAPK/ β -actin
空白组	2.940 \pm 0.136	1.013 \pm 0.023	1.856 \pm 0.052	0.978 \pm 0.153	0.205 \pm 0.037	0.842 \pm 0.109
模型组	4.341 \pm 0.095**	1.256 \pm 0.059	2.752 \pm 0.024**	1.189 \pm 0.094	0.483 \pm 0.057**	1.209 \pm 0.153
WSP组	3.788 \pm 0.090*	1.157 \pm 0.031	2.641 \pm 0.008	1.216 \pm 0.079	0.389 \pm 0.687*	1.153 \pm 0.097

注:与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. blank group,** $P < 0.01$; vs. model group,* $P < 0.05$

4 讨论

目前,由于环境因素外加生活规律的改变及其他因素所导致的慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、支气管哮喘、肺癌等疾病的发病率、病死率呈全球性增加^[9]。研究证实,COPD的主要致

炎症程度等均减轻,结果见图1。

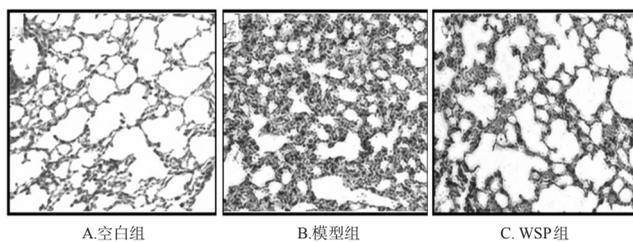


图1 各组小鼠肺组织病理学改变的观察结果(HE染色, $\times 200$)

Fig 1 Observation results of pathological changes in lung tissue of mice in each group(HE staining, $\times 200$)

3.3 小鼠肺组织中MAPK/NF- κ B信号通路相关蛋白表达水平的检测结果

与空白组比较,模型组小鼠肺组织中ERK1/2、p38 MAPK和NF- κ B p65蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),而p-ERK1/2、p-p38 MAPK和p-NF- κ B p65蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,WSP组小鼠肺组织中p-NF- κ B p65、p-p38 MAPK蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),其余指标差异均无统计学意义,结果见图2、表2。

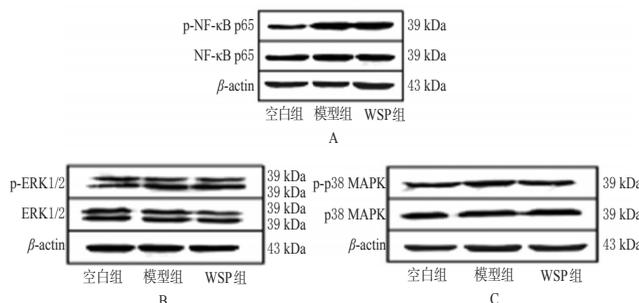


图2 各组小鼠肺组织中MAPK、NF- κ B信号通路相关蛋白表达测定的电泳图

Fig 2 Electrophoresis charts of MAPK/NF- κ B pathway related proteins in lung tissue of mice in each group

病因素是吸烟和大气污染^[10],90%的肺癌均与吸烟有关^[11]。研究发现,吸烟可导致全身性炎症反应,进而导致体内TNF- α 、IL-6等炎症因子的表达水平增高^[12-13]。本研究发现,被动吸烟28 d后,模型组小鼠BALF中TNF- α 、IL-6、IL-1 β 表达水平与空白组比较显著升高

($P < 0.01$); WSP能有效抑制肺损伤小鼠BALF中TNF- α 、IL-6炎症因子的释放($P < 0.05$),而对IL-1 β 、IL-10无明显作用($P > 0.05$),这提示WSP对小鼠肺损伤的保护作用可能是通过抑制炎症因子的表达实现的。

MAPK主要有3个亚族:ERK1/2、JNK和p38 MAPK^[14]。研究发现,MAPK信号通路在许多生理病理过程中(如细胞增殖、分化、凋亡等)都发挥着非常重要的作用^[15];而NF- κ B是在炎症、细胞分化、免疫应答以及肿瘤中起关键作用的转录因子^[16]。研究证实,MAPKs/NF- κ B通路在吸烟诱导的肺损伤病变过程中发挥着重要的作用。为阐明WSP是否会通过作用于这两条通路的关键蛋白而发挥其抑制炎症因子TNF- α 、IL-6的作用,本研究采用Western blot法对ERK1/2、p38 MAPK和NF- κ B p65蛋白及其磷酸化水平进行了考察。结果表明,WSP能明显抑制p38 MAPK和NF- κ B p65的磷酸化,但对ERK的磷酸化无明显作用,这提示WSP发挥抗炎作用的机制可能是通过阻断MAPKs/NF- κ B通路的激活。

综上所述,WSP对吸烟诱导的小鼠肺部损伤具有改善作用,其机制可能是通过抑制p38 MAPK和NF- κ B p65的磷酸化,进而阻断MAPK/NF- κ B通路的激活、抑制炎症因子TNF- α 、IL-6的表达;但其更多的作用机制有待进一步阐明。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:616.

[2] 包桂兰,杜智敏,赵中华,等. 五味沙棘散止咳祛痰平喘作用的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(3):243-244.

[3] 包桂兰,杜智敏,赵中华,等. 五味沙棘散对慢性支气管炎动物模型的作用及急性毒性的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(5):482-483.

[4] 包桂兰,于丽君,翟景波,等. 五味沙棘散对慢性支气管炎模型抗炎和免疫作用的研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(5):172-175.

[5] Ehling C, Ronkina N, Böhmer O, et al. Distinct functions of the mitogen-activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) kinases MK2 and MK3; MK2 mediates lipopolysaccharide-induced signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation by preventing negative regulatory effects of MK3 [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(27):24113-24124.

[6] Wang Y, Lu P, Zhang W, et al. GEN-27, a newly synthetic

isoflavonoid, inhibits the proliferation of colon cancer cells in inflammation microenvironment by suppressing NF- κ B pathway[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, doi: 10.1155/2016/2853040.

[7] Dai JN, Zong Y, Zhong LM, et al. Gastrodin inhibits expression of inducible NO synthase, cyclooxygenase-2 and proinflammatory cytokines in cultured LPS-stimulated microglia via MAPK pathways [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21891.

[8] Lee H, Yu SR, Lim D, et al. Galla Chinensis attenuates cigarette smoke-associated lung injury by inhibiting recruitment of inflammatory cells into the lung[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 116(3):222-228.

[9] Scichilone N, Benfante A, Bocchino M, et al. Which factors affect the choice of the inhaler in chronic obstructive respiratory diseases[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 31(1):63-67.

[10] Cheng L, Li F, Ma R, et al. Forsythiaside inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by activation of Nrf2 and inhibition of NF- κ B[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1):494-499.

[11] Trédanec J. Epidemiology of lung cancer[J]. *Chest*, 2003, 123(1):103.

[12] Bozinovski S, Seow HJ, Chan SP, et al. Innate cellular sources of interleukin-17A regulate macrophage accumulation in cigarette-smoke-induced lung inflammation in mice [J]. *Clin Sci: Lond*, 2015, 129(9):785-796.

[13] 冯英凯. 糖尿病肾病微炎症及其抗炎药物的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(1):85-88.

[14] Moens U, Kostenko S, Sveinbjörnsson B. The role of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinases (MAPKAPKs) in inflammation[J]. *Genes: Basel*, 2013, 4(2):101-133.

[15] Neacsu P, Mazare A, Schmuki P, et al. Attenuation of the macrophage inflammatory activity by TiO₂ nanotubes via inhibition of MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10(8):6455-6467.

[16] Meng XE, Zhang Y, Li N, et al. Hyperbaric oxygen alleviates secondary brain injury after trauma through inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2016, doi: 10.12659/MSM.894148.

(收稿日期:2017-05-02 修回日期:2017-08-10)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅