

川贝母对哮喘模型小鼠气道炎症及ERK/MAPK信号通路的影响^Δ

张羽飞^{1*},徐红纳²,黄伟³,任公平⁴,李厚忠^{2#}(1.牡丹江医学院医药研究中心,黑龙江牡丹江 157011;2.牡丹江医学院药学院,黑龙江牡丹江 157011;3.牡丹江医学院教务处,黑龙江牡丹江 157011;4.牡丹江医学院附属红旗医院康复医学科,黑龙江牡丹江 157011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0343-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.13

摘要 目的:考察川贝母对哮喘模型小鼠气道炎症及细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的影响,探讨其治疗哮喘的可能机制。方法:以卵蛋白致敏小鼠建立哮喘模型。将造模成功的40只小鼠随机分为模型组(灌胃0.5%羧甲基纤维素)、阳性对照组(腹腔注射0.5 mg/kg地塞米松)和川贝母低、高剂量组(灌胃9.0、18.0 mg/kg),每组10只;另选10只正常小鼠作为正常组(灌胃0.5%羧甲基纤维素)。每天给药1次,连续28 d。给药结束后,对小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中总细胞和分类细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞)进行计数;光镜下观察小鼠支气管平滑肌病理组织形态,并进行炎症评分;酶联免疫吸附法测定肺组织中ERK、磷酸化ERK(p-ERK),p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)活性;Western blot法测定肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应法测定肺组织中ERK、p38 MAPK mRNA表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠BALF中总细胞计数、分类细胞计数、炎症评分和肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性均显著升高($P<0.01$),肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK蛋白表达以及ERK、p38 MAPK mRNA表达均显著增强($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠上述指标均显著改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:川贝母可改善哮喘模型小鼠气道炎症,其机制可能与抑制ERK/MAPK信号通路的激活有关。

关键词 川贝母;哮喘;气道炎症;细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶信号通路;小鼠

- [12] 魏新萍,杨耀芳,金蕾.对含毒性中药材的中成药临床应用安全性与管理重要性的探讨[J].中国临床药理学杂志,2015,31(11):1060-1062.
- [13] 李学林,吴庆光.中药处方点评[M].北京:人民卫生出版社,2017:5.
- [14] 金锐,王宇光,薛春苗,等.中成药处方点评的标准与尺度探索(三):十八反、十九畏配伍禁忌[J].中国医院药学杂志,2015,35(11):969-975.
- [15] 李春晓,张业,李学林.从合理用药角度探析中药“十八反”[J].中华中医药杂志,2012,27(9):2282-2286.
- [16] 金锐,孙路路,鄢丹.中成药重复用药的现状、问题和对策(一)[J].中南药学,2016,14(4):337-341.
- [17] 国家中医药管理局.中成药临床应用指导原则[S].2010-07-02.
- [18] 谢丽.浅谈临床常用中成药联用的配伍禁忌[J].北京中医药,2010,29(2):130-131.
- [19] 金锐,王宇光,薛春苗,等.中成药处方点评的标准与尺度探索(二):重复用药[J].中国医院药学杂志,2015,35(7):565-570.
- [20] 唐志芳,梅全喜.临床常用西药与中药的配伍禁忌[J].中国药师,2016,19(10):1946-1949.
- [21] 胡燕,王景霞,张力,等.苍耳子综合评价与风险控制措施的探讨[J].中国中药杂志,2017,42(21):4079-4085.
- [22] 许凯.中成药与西药联合应用的不良反应研究[J].大家健康(学术版),2016,10(11):29-30.
- [23] 郑文科,刘智,雷翔,等.中成药上市后临床安全性评价研究模式的探索建立[J].中国中药杂志,2015,40(18):3693-3696.
- [24] 时琳,薛颖.含毒性成分中成药的应用探讨[J].中成药,2015,37(7):1626-1629.
- [25] 费菲,刘姗姗.张伯礼:以循证医学的方法学推动中医药研究国际化[J].中国医药科学,2015,5(17):1-3.
- [26] 杨星月,刘佳,何丽云,等.病例注册登记研究的应用进展[J].中国循证医学杂志,2016,16(12):1481-1484.
- [27] LI XL, TANG JF, LI WX, et al. Postmarketing safety surveillance and reevaluation of danhong injection: clinical study of 30888 cases[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. DOI: 10.1155/2015/610846.
- [28] 赵军宁,叶祖光.传统中药毒性分级理论的科学内涵与《中国药典》(一部)标注修订建议[J].中国中药杂志,2012,37(15):2193-2198.

Δ 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.H201490);牡丹江医学院科学技术研究项目(No.ZS201516)

* 讲师,博士研究生。研究方向:呼吸系统疾病机制。电话:0453-6984647。E-mail: yufeizhang@foxmail.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:药理学、毒理学。电话:0453-6984682。E-mail: lihonzhong79@foxmail.com

(收稿日期:2017-09-06 修回日期:2017-11-10)

(编辑:林 静)

Effects of Fritillariae Cirrhosae Bulbus on Airway Inflammation and ERK/MAPK Signal Pathway in Asthma Model Mice

ZHANG Yufei¹, XU Hongna², HUANG Wei³, REN Gongping⁴, LI Houzhong² (1. Medical Research Center, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 2. College of Pharmacy, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 3. Office of Academic Affairs, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 4. Dept. of Rehabilitation Medicine, the Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effects of Fritillariae cirrhosae bulbus on airway inflammation and ERK/MAPK signal pathway of asthma model mice, and to explore its possible mechanism of the treatment of asthma. **METHODS:** The asthma model was induced by egg albumin. A total of 40 model mice were randomly divided into model group (0.5% carboxymethyl cellulose, intragastric administration), positive control group (0.5 mg/kg dexamethasone, intraperitoneal injection), Fritillariae cirrhosae bulbus low-dose and high-dose groups (9.0, 18.0 mg/kg, intragastric administration), with 10 mice in each group. Other 10 normal mice were included in normal group (0.5% carboxymethyl cellulose, intragastric administration). They were given medicine once a day for consecutive 28 d. After medication, the number of total cells and differential cells (neutrophils, macrophages, lymphocytes and eosinophils) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice were counted. The pathological morphology of bronchial smooth muscle in mice was observed under light microscope, and the inflammatory score was scored; the activities of ERK, phosphorylated ERK (p-ERK), p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) were measured by ELISA. The protein expression of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissue were determined by Western blot assay. mRNA expression of ERK and p38 MAPK were determined by real time fluorescent quantitative PCR. **RESULTS:** Compared with normal group, the number of total cells and differential cells in BALF of mice, inflammation score, the activities of p-ERK and p-p38 MAPK in lung tissues were increased significantly of mice in model group ($P<0.01$); the protein expression of p-ERK and p-p38 MAPK, mRNA expression of ERK and p38 MAPK were increased significantly in lung tissue of mice in model group ($P<0.01$). Compared with model group, above indexes of treatment groups were all improved significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS:** Fritillariae Cirrhosae Bulbus can improve airway inflammation in asthma model mice, the mechanisms of which may be related to inhibiting the activation of ERK/MAPK signal pathway.

KEYWORDS Fritillariae cirrhosae bulbus; Asthma; Airway inflammation; ERK/MAPK signal pathway; Mice

支气管哮喘(简称哮喘)是一种高发病率的慢性炎症性疾病。炎症反应在哮喘的发生发展中发挥着重要作用,被认为是哮喘发病的可能机制之一^[1-2]。如果能够有效控制炎症反应,将对哮喘患者大为有利。中药大多为天然植物,不良反应相对较小,可作为新药开发的很好选择。川贝母(*Fritillaria cirrhosa* bulbus)是百合科植物川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母或瓦布贝母的干燥鳞茎,为临床常用中药,其性苦、甘,微寒,有化痰止咳、清热散结、润肺之功效,多用于热痰、燥痰、肺虚劳嗽、久嗽、痰少咽燥、痰中带血等的治疗^[3]。临床研究证实,温开水调服川贝母粉可有效防治哮喘的发作^[4]。本研究前期实验也表明,川贝母对哮喘模型小鼠具有很好的保护作用^[5-7]。另有研究证实,细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路可介导炎症反应,在哮喘的发生发展中发挥重要作用^[8]。本研究旨在前期研究基础上,继续观察川贝母对哮喘模型小鼠气道炎症及ERK/MAPK信号通路相关蛋白ERK、磷酸化ERK(p-ERK)、p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)的影响,探讨其治疗哮喘的可能作用机制。

1 材料

1.1 仪器

ABI-7300 聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司);3112微量加样器(德国Eppendorf公司);LDZ5-2自动平衡离心机(北京京立离心机有限公司);UW820S电子天平(日本岛津公司);402A超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);BH-2光学显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

川贝母(安徽亿源中药饮片科技有限公司,批号:160429),由牡丹江医学院附属红旗医院中药房提供,经牡丹江医学院医药研究中心初彦辉教授鉴定符合2015年版《中国药典》(一部)相关要求,采用超高效液相色谱-蒸发光散射检测法检测西贝母碱含量为0.061%;卵蛋白(OVA)冻干粉(美国Sigma公司,批号:A5253,规格:10 mg/支);地塞米松磷酸钠注射液(白云山天星制药股份有限公司,批号:160103,规格:1 mL:5 mg);ERK、p-ERK、p38MAP、p-p38MAP酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国ADL公司,批号:A-10876-09、A-10772-09、A-10963-09、A-20908-09);鼠源ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Abbkine公司)。

1.3 动物

健康清洁级BALB/c小鼠60只,♀,6~8周龄,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供,实验动物生产合格证号:SCXK(黑)2015-001,实验动物使用许可证号:SYXK-(黑)2015-007。动物购入后,饲养于恒温(22℃)、相对湿度为50%的动物房中,饲养期间自由饮食,通风换气为20次/h,适应性饲养1周后用于实验。

2 方法

2.1 药物制备

参照唐德才等^[9]主编的《中药学》所载,川贝母成人用剂量为3~6 g/d,根据动物体表面积等效剂量计算方法,计算小鼠给药剂量为9.0~18.0 mg/kg。称取川贝母粉9、18 mg,分别溶于5%羧甲基纤维素(CMC)5 mL中,现用现配。

2.2 哮喘模型建立

取50只小鼠,于实验第1、8天腹腔注射0.2 mg OVA+1 mg 氢氧化铝粉末制成的混悬液0.2 mL,作为首次致敏;于实验第15天将小鼠依次置于超声雾化器中,用1%OVA生理盐水喷雾激发小鼠哮喘发作,隔日1次,每次20 min,共激发10次。以小鼠出现口唇发绀、腹肌痉挛、呼吸加快、点头呼吸或站立不稳等表现表示激发成功。

2.3 分组与给药

将造模成功的40只哮喘模型小鼠随机分为模型组、阳性对照组和川贝母低、高剂量组,每组10只;另取10只正常小鼠作为正常组(以生理盐水代替OVA进行腹腔注射及雾化吸入)。阳性对照组小鼠腹腔注射0.5 mg/kg地塞米松^[10],川贝母低、高剂量组小鼠按“2.1”项下剂量ig给药,正常组和模型组小鼠灌胃等体积CMC溶液,各组小鼠均每天给药1次,连续给药28 d。

2.4 细胞计数与标本采集

给药结束后,各组小鼠均用1%巴比妥钠麻醉,剪掉颈部毛发后剪开皮肤,分离气管周围组织,气管作一横行切口,插入气管插管。结扎右主支气管,经气管插管以10 mL生理盐水分3次灌洗左肺,回收的支气管肺泡灌洗液(BALF)经2 000 r/min(离心半径14 cm)离心15 min,弃上清液;取沉渣用生理盐水重悬,吸取少量细胞悬液置血细胞计数板下计数细胞总数。Diff-Quik染色液染色BALF细胞涂片后,作分类细胞(中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞)计数。切取右支气管平滑肌,固定于10%中性福尔马林中,用于病理组织形态学观察。切取右肺门部位组织用于ELISA检测、Western blot分析和实时荧光定量PCR(Real time-PCR, RT-PCR)分析。

2.5 支气管平滑肌病理组织形态学观察及炎症评分

取出固定于10%中性福尔马林中的支气管平滑肌,常规乙醇脱水,石蜡包埋,切片(5 μm),行苏木精-伊红

(HE)染色,光镜下观察各组小鼠支气管平滑肌病理组织形态学变化,并按照文献[11-12]的方法进行炎症评分。评分标准:没有炎症细胞,计0分;有少量炎症细胞,计1分;炎症细胞形成环状,层厚1个细胞,计2分;炎症细胞形成环状,层厚2~4个细胞,计3分;炎症细胞形成环状,层厚4~5个细胞,计4分。

2.6 ELISA法检测肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK活性

取约1/3右肺组织,剪碎匀浆,按照相应试剂盒说明书操作,检测肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK的活性,每份样品检测5次。

2.7 Western blot法检测肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达

取约1/3右肺组织,剪碎匀浆后,加入适量RIPA裂解液,冰上溶胀10 min,然后在4℃条件下15 000 r/min(离心半径9.5 cm)离心15 min,收集上清液,二喹啉甲酸(BCA)法测定总蛋白浓度。取30 μg蛋白上样后行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。电泳完成后,电转至0.45 μm的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h。分别加入相应一抗(1:1 000)孵育1 h。PBST洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG二抗(1:2 000)孵育1 h。ECL化学发光试剂显色,以β-actin为内参,采用Bio-Rad凝胶成像系统对各组条带灰度值进行分析,以目标蛋白条带灰度值与内参条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。每份样品设5个平行孔。

2.8 RT-PCR法检测肺组织中ERK、p38 MAPK mRNA表达

Trizol试剂提取剩余右肺组织总RNA,检测RNA纯度,反转录合成单链的cDNA,将cDNA产物保存在-20℃冰箱中。利用PubMed查找相关基因序列,并利用引物合成软件Primer Premier 5.0设计引物。反应体系总体积为25 μL。反应程序:95℃预变性2 min;95℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环;最后72℃延伸5 min结束反应。每个样本均以内参基因β-actin调整,采用2^{-ΔΔCt}法定量分析ERK、p38 MAPK mRNA表达(Ct值表示目标基因达到设定阈值所需的循环次数),每份样品检测5次。引物序列及扩增长度见表1。

表1 引物序列及扩增长度

Tab 1 Primer sequence and amplification length			
基因	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')	扩增长度, bp
ERK	CTCTGTCATTGCCACCA	ATCCACTCTCCATCTCCAT	387
p38 MAPK	CAGCCCACGGACCAATA	AACGAGCATCTTCTCCAGTA	212
β-actin	CACCCGCGAGTACAACCTTC	CCCATACCCACCATCACACC	207

2.9 统计学方法

采用SPSS 13.0统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行组间比较,方

差齐时组间两两比较采用LDS检验,方差不齐时采用Games-Howell检验;等级资料采用秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠BALF总细胞和分类细胞计数结果

与正常组比较,模型组小鼠BALF总细胞和分类细胞计数均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照组和川贝母低、高剂量组小鼠BALF总细胞和分类细胞计数均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表2。

表2 各组小鼠BALF中总细胞和分类细胞计数结果($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 2 Results of total cells and differential cells counts in BALF of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	总细胞 ($\times 10^6/\text{mL}$)	中性粒细胞 ($\times 10^6/\text{mL}$)	巨噬细胞 ($\times 10^6/\text{mL}$)	淋巴细胞 ($\times 10^6/\text{mL}$)	嗜酸性粒细胞 ($\times 10^6/\text{mL}$)
正常组	19.54±2.35	3.12±0.57	10.70±1.76	4.10±0.51	0.06±0.01
模型组	59.66±4.93**	12.71±2.43**	25.01±4.38**	15.74±2.93**	3.50±0.53**
阳性对照组	28.50±2.95##	4.69±0.58##	13.24±1.48##	8.14±0.71##	1.03±0.19##
川贝母低剂量组	36.54±3.69#	8.09±0.44#	14.85±0.91#	9.12±0.96#	2.22±0.26#
川贝母高剂量组	31.51±4.54##	5.78±0.57##	13.38±1.25##	8.45±0.77##	1.63±0.21##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$
Note: vs. normal group group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$,## $P<0.01$

3.2 各组小鼠支气管平滑肌病理组织形态学观察结果

正常组小鼠支气管管腔内无上皮细胞脱落,管壁完整,无明显炎症细胞浸润,支气管黏膜平整,平滑肌呈正常厚度;模型组小鼠支气管壁中有大量炎细胞浸润,主要是嗜酸性粒细胞和淋巴细胞,支气管黏膜上皮脱落,水肿,管腔内有明显分泌物,平滑肌增厚,提示哮喘模型复制成功;阳性对照组及川贝母低、高剂量组小鼠支气管管腔内少量黏液和脱落细胞,支气管嗜酸性粒细胞和其他炎性细胞浸润有所减少,几近消失,黏膜平整规则,平滑肌厚度几乎接近正常组,病理切片图见图1。

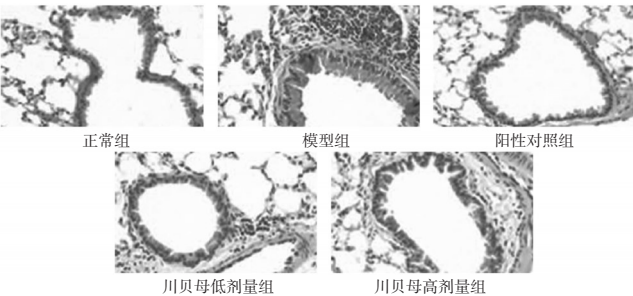


图1 各组小鼠支气管平滑肌病理组织形态学观察结果(HE染色,×200)

Fig 1 Results of pathological morphology observation of bronchial smooth muscle in mice of each group (HE staining, ×200)

半定量分析结果表明,与正常组比较,模型组小鼠炎症评分显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性对照

组及川贝母低、高剂量组小鼠炎症评分均显著降低($P<0.01$),结果见表3。

表3 各组小鼠炎症评分结果(例数)

Tab 3 Results of inflammation scores of mice in each group (case)

组别	炎症评分				
	0	1	2	3	4
正常组	10	0	0	0	0
模型组	0	0	1	2	7
阳性对照组	0	8	1	1	0
川贝母低剂量组	0	4	3	2	1
川贝母高剂量组	0	6	2	1	1

3.3 各组小鼠肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK、p-p38 MAPK活性测定结果

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性均显著升高($P<0.01$),ERK、p38 MAPK活性差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),ERK、p38 MAPK活性差异无统计学意义($P>0.05$),结果见表4。

表4 各组小鼠肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK和p-p38 MAPK活性测定结果($\bar{x}\pm s, n=10, \text{U/L}$)

Tab 4 The activities of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissues of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{U/L}$)

组别	ERK	p-ERK	p38 MAPK	p-p38 MAPK
正常组	31.661±2.398	6.286±0.847	67.418±6.850	12.497±1.530
模型组	44.761±4.895	23.490±2.780**	76.852±8.374**	40.629±4.400**
阳性对照组	35.714±3.209	8.824±0.859##	62.859±5.245	18.396±1.469##
川贝母低剂量组	38.921±3.628	12.461±1.666#	64.551±6.469	28.557±2.827#
川贝母高剂量组	38.753±3.343	10.348±1.123##	63.341±5.484	22.493±2.244##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$
Note: vs. normal group group, ** $P<0.01$; vs. model group, # $P<0.05$,## $P<0.01$

3.4 各组小鼠肺组织ERK、p38 MAPK、p-ERK和p-p38 MAPK蛋白表达测定结果

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),ERK、p38 MAPK蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),ERK、p38 MAPK蛋白水平表达差异无统计学意义($P>0.05$)。电泳图见图2,测定结果见表5。

3.5 各组小鼠肺组织ERK、p38 MAPK mRNA表达测定结果

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中ERK、p38 MAPK mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肺组织中ERK、p38 MAPK mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表6。

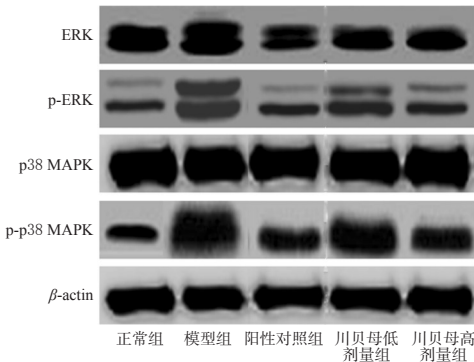


图2 各组小鼠肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK和p-p38 MAPK蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophorograms of protein expression of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissue of mice in each group

表5 各组小鼠肺组织中ERK、p-ERK、p38 MAPK和p-p38 MAPK蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Protein expression of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ERK/ β -actin	p-ERK/ β -actin	p38 MAPK/ β -actin	p-p38 MAPK/ β -actin
正常组	0.976 $\pm$ 0.101	0.154 $\pm$ 0.017	1.489 $\pm$ 0.161	0.416 $\pm$ 0.048
模型组	1.029 $\pm$ 0.103	0.306 $\pm$ 0.031**	1.435 $\pm$ 0.157	1.232 $\pm$ 0.130**
阳性对照组	0.865 $\pm$ 0.092	0.153 $\pm$ 0.013 ^{##}	1.476 $\pm$ 0.158	0.757 $\pm$ 0.068 ^{##}
川贝母低剂量组	0.863 $\pm$ 0.092	0.187 $\pm$ 0.018 [#]	1.516 $\pm$ 0.162	0.872 $\pm$ 0.073 [#]
川贝母高剂量组	0.871 $\pm$ 0.093	0.165 $\pm$ 0.013 ^{##}	1.527 $\pm$ 0.175	0.844 $\pm$ 0.071 [#]

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$
 Note: vs. normal group group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

表6 各组小鼠肺组织中ERK、p38 MAPK mRNA表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 mRNA expression of ERK and p38 MAPK in lung tissues of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ERK	p-38 MAPK
正常组	0.023 $\pm$ 0.002	0.076 $\pm$ 0.008
模型组	0.417 $\pm$ 0.039**	0.709 $\pm$ 0.088**
阳性对照组	0.157 $\pm$ 0.013 ^{##}	0.185 $\pm$ 0.016 ^{##}
川贝母低剂量组	0.281 $\pm$ 0.023 [#]	0.355 $\pm$ 0.043 ^{##}
川贝母高剂量组	0.161 $\pm$ 0.013 ^{##}	0.186 $\pm$ 0.017 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$
 Note: vs. normal group group, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

4 讨论

哮喘是由多种炎症细胞、细胞因子和炎症介质共同参与的气道慢性炎症性疾病^[13]。气道炎症在哮喘的发生发展中发挥重要作用,而目前国内外通用的哮喘诊治方案均强调对气道炎症的控制^[14]。气道炎症包括多种炎症细胞参与,如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等^[15]。动物实验研究表明,BALF中存在大

量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒,上述细胞活化是哮喘的典型特征^[16-17]。哮喘诱发了机体的免疫反应,引起中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞活化,并向炎症部位趋化、聚集,从而释放炎性介质(如内皮素、血小板活化因子、白三烯、组胺等),直接或间接损伤了气道上皮细胞,引发气道炎症^[18]。因此,中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞也称为哮喘的主要炎症效应细胞,与哮喘的严重程度呈正相关,是哮喘临床诊断最为重要的指标。本研究显示,正常组小鼠BALF中总细胞计数和分类细胞计数较少,而模型组小鼠BALF中存在大量的中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞,该结果与以往研究相一致^[19-20]。给予川贝母干预以后,川贝母低、高剂量组小鼠BALF中总细胞计数和分类细胞计数均较模型组降低。以上结果提示,川贝母可有效抑制哮喘模型小鼠气道炎症反应,改善哮喘症状。同时,本研究支气管平滑肌病理组织形态学观察显示,正常组小鼠炎症评分较低,而模型组炎症评分较高,给予川贝母干预以后,川贝母低、高剂量组小鼠炎症评分均较模型组降低,这进一步提示川贝母可有效抑制哮喘模型小鼠气道炎症反应,改善哮喘症状。

为了进一步阐明川贝母抑制哮喘模型小鼠气道炎症反应的可能机制,本研究从ERK/MAPK信号通路角度进行了分析。MAPK是连接细胞膜表面受体与决定基因表达之间的重要信号调节酶,因此MAPK信号转导通路是将细胞外信号传导入胞内的重要信号转导途径^[20]。MAPK信号通路在炎症反应中发挥重要作用,主要包括分别由ERK、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38 MAPK介导的三条级联反应,该通路的激活可促进炎症细胞因子的生成而加剧炎症反应^[21-22]。研究表明,ERK受上游特异性刺激分子双磷酸化激活,活化的p-ERK形成二聚体,从细胞质移位到细胞核,通过调控一系列转录因子,而引起炎症反应;p38 MAPK是信号从细胞表面传导至细胞核内部的重要传递者,通过对转录因子磷酸化来调节参与细胞反应基因的转录表达。p38 MAPK介导基因表达和炎症因子产生,调控炎症细胞的增殖、分化和凋亡等,参与慢性气道疾病的气道炎症机制^[23]。因此,可以认为ERK和p38 MAPK发生磷酸化后可激活ERK/MAPK信号转导通路。另有研究表明,在哮喘模型中,ERK/MAPK信号通路相关蛋白的活性增强^[7]。本研究显示,正常组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性和表达及ERK、p38 MAPK mRNA表达均较低,而模型组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性和表达及ERK、p38 MAPK mRNA表达均较正常组明显增加,表明ERK/MAPK信号通路被激活;给予川贝母干预以后,

川贝母低、高剂量组小鼠肺组织中p-ERK、p-p38 MAPK活性和表达及ERK、p38 MAPK mRNA表达均较模型组降低。

综上所述,中药川贝母可有效抑制哮喘模型小鼠的炎症反应,其机制可能与抑制ERK/MAPK信号通路激活有关。至于是否存在其他机制,如是否还与JNK信号通路有关,本课题组将继续探讨。

参考文献

[1] LICCARDI G, SALZILLO A, PICCOLO A, et al. Dysfunction of small airways and prevalence, airway responsiveness and inflammation in asthma: much more than small particle size of pet animal allergens[J]. *Ups J Med Sci*, 2016, 121(3): 196-197.

[2] FARAH CS, KEULERS LA, HARDAKER KM, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma[J]. *Respirology*, 2015, 20(6): 975-981.

[3] 邱彦, 刘静, 段靖, 等. 川贝水煎物对大鼠肺气肿治疗作用研究[J]. *解放军药学学报*, 2014, 30(4): 317-320.

[4] 李德益. 治疗支气管哮喘验方[J]. *中医临床与保健*, 1993, 5(3): 58.

[5] 李厚忠, 齐敏, 张羽飞. 中药川贝对哮喘大鼠NO、TNF- α 、MDA浓度和SOD活力及支气管平滑肌炎症反应的影响[J]. *中医药学报*, 2013, 41(4): 64-67.

[6] 李厚忠, 任公平, 张羽飞. 中药川贝对哮喘模型小鼠肺水肿和支气管炎症的影响[J]. *中医药信息*, 2014, 31(6): 19-22.

[7] 李厚忠, 任公平, 张羽飞. 中药川贝对哮喘模型小鼠VEGF和HIF-1 α 表达的影响[J]. *中医药信息*, 2014, 31(4): 23-26.

[8] CHU X, CI X, HE J, et al. A novel anti-inflammatory role for ginkgolide B in asthma via inhibition of the ERK/MAPK signaling pathway[J]. *Molecules*, 2011, 16(9): 7634-7648.

[9] 唐德才, 吴庆光. 中药学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2016: 253-254.

[10] 张於, 戴爱国. 柴朴汤对支气管哮喘豚鼠支气管肺组织中Bcl-2表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(10): 275-279.

[11] 周玉波, 扶招弟, 周丽芬, 等. 硫化氢对臭氧致小鼠气道炎症的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(10): 1837-1842.

[12] 金华良, 王利民, 王娇莉, 等. 雷帕霉素对哮喘缓解期小鼠模型气道炎症的作用[J]. *浙江医学*, 2017, 39(11): 860-

864, 870.

[13] 毛艳, 贺金华, 铁偲, 等. 维药神香草聚酰胺树脂柱40%乙醇洗脱物的成分分析及其对哮喘小鼠炎症的改善作用[J]. *中国药房*, 2017, 28(25): 3532-3535.

[14] 王爱华, 姚俊, 董盈妹, 等. 固本防哮饮对支气管哮喘模型小鼠肺组织炎症因子及STAT1蛋白表达的影响[J]. *中医杂志*, 2015, 56(23): 2049-2053.

[15] BARNIG C, LEVY BD. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma[J]. *Eur Respir Rev*, 2015, 24(135): 141-143.

[16] CHOI J, CHOI BK, KIM JS, et al. Picroside II attenuates airway inflammation by downregulating the transcription factor GATA3 and Th2-related cytokines in a mouse model of HDM-induced allergic asthma[J]. *PLoS One*, 2016, 21(11): e0167098.

[17] VERHEIJDEN KA, WILLEMSSEN LE, BRABER S, et al. The development of allergic inflammation in a murine house dust mite asthma model is suppressed by synbiotic mixtures of non-digestible oligosaccharides and Bifidobacterium breve M-16V[J]. *Eur J Nutr*, 2016, 55(3): 1141-1151.

[18] KURAI J, WATANABE M, TOMITA K, et al. Influence of Asian dust particles on immune adjuvant effects and airway inflammation in asthma model mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e114879.

[19] 高建, 郗文, 成亮, 等. 银杏内酯吸入剂对哮喘模型豚鼠气管嗜酸性粒细胞浸润的影响[J]. *中国药房*, 2007, 18(15): 1132-1133.

[20] 刘玉晖, 严雪梅, 佟阳, 等. 参苓白术散通过MAPK信号通路对炎症性肠炎小鼠的作用[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(4): 793-795.

[21] 王金磊, 李承德, 孙宏伟, 等. 黄芪多糖抑制NF- κ B/MAPK信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(4): 489-493.

[22] 卫智权, 阎莉, 邓家刚, 等. 芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠MAPK通路及血清细胞因子的影响[J]. *中草药*, 2013, 44(1): 52-58.

[23] XIONG Y, WANG J, YU H, et al. Anti-asthma potential of crocin and its effect on MAPK signaling pathway in a murine model of allergic airway disease[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015, 37(3): 236-243.

(收稿日期: 2017-06-20 修回日期: 2017-10-09)

(编辑: 林 静)