

莲心碱对佛波酯所致耳肿胀炎症模型小鼠的抗炎作用及机制研究^Δ

姚茹*,张锐虎,王璐,王晨阳,郭民,宋国华,陈朝阳[#](山西医科大学实验动物中心/实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)17-2364-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.17.14

摘要 目的:考察莲心碱对佛波酯(TPA)所致耳肿胀炎症模型小鼠的抗炎作用,并探讨其作用机制。方法:将40只小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组(地塞米松,2.5 mg/kg)和莲心碱低、高剂量组(5、15 mg/kg),每组8只。除空白组外,其余各组小鼠均于右耳内外侧涂抹TPA建立耳肿胀炎症模型;造模同时,各给药组小鼠均按20 μL/只于右耳内外侧涂抹相应药液(以丙酮为溶剂),空白组和模型组小鼠涂抹等体积丙酮溶液。给药6 h后,测定小鼠耳厚度和耳肿胀度,苏木精-伊红染色后观察小鼠耳组织病理学变化,采用酶联免疫吸附法测定小鼠耳组织中炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、IL-1 β]水平,Western blot法测定小鼠耳组织中核转录因子 κ B信号通路相关蛋白[NF- κ B p65和NF- κ B抑制蛋白(I κ B α)]的磷酸化水平,并采用实时荧光定量-聚合酶链式反应法检测小鼠耳组织中环氧合酶2(COX-2)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)mRNA表达。结果:与空白组比较,模型组小鼠耳厚度、耳肿胀度和耳组织中炎症因子水平、NF- κ B信号通路相关蛋白的磷酸化水平以及COX-2、iNOS mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$);耳组织发生增厚、炎性细胞浸润增多等变化。与模型组比较,各给药组小鼠耳厚度、耳肿胀度及耳组织中上述指标水平均显著降低($P < 0.05$),耳组织增厚和炎性细胞浸润等均得到显著减轻。结论:莲心碱对TPA所致耳肿胀炎症模型小鼠具有较好的抗炎作用,其机制可能与抑制耳组织中NF- κ B p65、NF- κ B蛋白的磷酸化,进而抑制炎症因子COX-2、iNOS mRNA表达有关。

关键词 莲心碱;耳肿胀炎症模型;炎症因子;核转录因子 κ B p65;小鼠

Anti-inflammatory Effects of Liensinine on TPA-induced Ear Edema Inflammatory Model Mice and Its Mechanism Study

YAO Ru, ZHANG Ruihu, WANG Lu, WANG Cheryang, GUO Min, SONG Guohua, CHEN Zhaoyang (Laboratory Animal Center of Shanxi Medical University/Shanxi Key Lab of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Disease, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the anti-inflammatory effects of liensinine on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear edema inflammatory model mice, and to investigate its mechanism. METHODS: The 40 mice were randomly divided into blank group, model group, positive control group (dexamethasone, 2.5 mg/kg) and liensinine low-dose and high-dose groups (5, 15 mg/kg), with 8 mice in each group. Except for blank group, other groups were given TPA for external use on both inner and outer sides of right ear to induce ear edema inflammatory model. During modeling, administration group was given relevant medicine 20 μL/mice for external use on both inner and outer sides of right ear (using acetone as solvent); blank group

[10] 徐雯,王楠,丁浩然,等.广藿香对湿阻中焦证大鼠胃肠功能的影响[J].中国中药杂志,2017,42(23):4649-4655.

[11] 郭渝新,杨鹏,张三印.复方陈香胃片对慢性胃炎大鼠胃黏膜病理形态学的影响[J].中药新药与临床药理,2013,24(3):244-246.

[12] 陈镇,夏泉,黄赵刚,等.白术挥发油对小鼠胃肠功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):66-68.

[13] 李伟,郑天珍,瞿颂义,等.陈皮对小鼠胃排空及肠推进的

影响[J].中药药理与临床,2002,18(2):22-23.

[14] 张慧敏,任虹,何瑶,等.藿香正气制剂中厚朴不同提取工艺对胃肠活动的影响研究[J].中药与临床,2014,5(6):30-32.

[15] 王凤霞,袁捷,谢良友,等.多指标正交优选丹参木耳降脂复方提取工艺[J].广东药学院学报,2014,30(5):564-568.

[16] 郭金秀,刘孟安,王慧凯.中药胃肠舒片对胃肠动力障碍小鼠胃排空及肠推进影响的实验研究[J].辽宁中医杂志,2010,37(4):751-752.

(收稿日期:2017-11-07 修回日期:2018-02-05)

(编辑:林静)

^Δ基金项目:山西省科技厅实验动物专项资金项目(No.2015K02)

* 硕士研究生。研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: m18734116230@163.com

[#] 通信作者:副教授,硕士。研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ccyytcn@163.com

and model group were given constant volume of acetone. 6 h after administration, ear thickness and ear edema degree of mice were determined. The pathological changes of ear tissue were observed by HE staining. The levels of inflammatory factors (TNF- α , IL-6, IL-1 β) in ear tissue were detected by ELISA. The phosphorylation levels of nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway related protein [NF- κ B p65, NF- κ B inhibitory protein (I κ B α)] were detected by Western blot assay. mRNA expressions of COX-2 and iNOS were detected by RT-PCR. RESULTS: Compared with blank group, degree of ear edema, the levels of inflammatory factors in ear tissue, phosphorylation levels of NF- κ B signaling pathway related protein, mRNA expressions of COX-2 and iNOS were increased significantly ($P < 0.05$). There were ear tissue thickening and increase of inflammatory cell infiltration, etc. Compared with model group, ear edema degree and above indexes of ear tissue in administration group were decreased significantly ($P < 0.05$); ear tissue thickening and increase of inflammatory cell infiltration were relieved significantly. CONCLUSIONS: Liensinine shows good anti-inflammatory effects on TPA-induced ear edema inflammatory model mice, the mechanism of which may be associated with inhibiting the phosphorylation levels of NF- κ B p65 and NF- κ B protein and inhibiting the mRNA expressions of inflammatory factors COX-2 and iNOS.

KEYWORDS Liensinine; Ear edema inflammatory model; Inflammatory factor; Nuclear factor κ B p65; Mice

人和啮齿类动物在局部接触外源性刺激物时,可能会发生刺激性接触性皮炎或过敏性接触性皮炎^[1]。长期接触刺激物可引起皮肤屏障破坏和皮肤稳态失调,导致炎性皮肤病^[2]。临床上一些皮肤病治疗药物含有激素,具有一定的副作用,且容易引起药物依赖性皮炎^[3]。因此,筛选一种副作用小的中草药提取物作为皮肤炎症的外用治疗具有重要意义。

莲心碱(Liensinine)是从莲子心中提取的一种双苄基四氢异喹啉类生物碱^[4]。据文献报道,莲心碱可抑制大鼠脑缺血灌注后炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)的表达^[5];另外,其还可增加超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)活性,减少丙二醛(MDA)的含量,改善大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤^[6]。而TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎因子可促进氧自由基的过多累积,致氧化应激反应^[7]。虽然研究报道显示出莲心碱具有一定的抗炎作用,但是其具体的作用机制尚不清楚。核转录因子 κ B(NF- κ B)是一种氧化还原敏感转录因子,参与炎症机制的调控。各种炎性刺激通过促进胞浆中NF- κ B抑制蛋白(I κ B α)的降解和磷酸化,释放NF- κ B入核后,可上调环氧化酶2(COX-2)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)等炎性基因和TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子的表达^[8]。本研究利用佛波酯(TPA)诱导局部炎症模型,观察莲心碱对耳肿胀炎症模型小鼠的抗炎作用,并从NF- κ B通路出发探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

215-151-10 数字测厚仪(日本 Mitutoyo 公司);Epoch 微孔分光光度计(美国 Bio-Tek 公司);3-18k 高速微量离心机(美国 Sigma 公司);BX51 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);G-Box Chemixx9 化学发光成像仪(英国 Syngene 公司);StepOnePlus 实时荧光定量-聚合酶链式反应(PCR)仪(美国 ABI 公司)。

1.2 药品与试剂

莲心碱标准品(北京中科质检生物技术有限公司,批号:2586-96-1,纯度: $\geq 98\%$);地塞米松原料药(批号:530B052,纯度: $\geq 98\%$);TPA(批号:16561-29-8,纯度: $\geq 98\%$)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;TNF- α 、IL-6、IL-1 β 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司,批号分别为 20161125、20160728、20171018);兔源 NF- κ B p65(NF- κ B p65)、小鼠源 I κ B α 、兔源磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、兔源磷酸化 NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)单克隆抗体和抗小鼠免疫球蛋白 G(IgG)标记的辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗、抗兔 IgG 标记的 HRP 偶联二抗均购自美国 CST 公司; β -肌动蛋白(β -actin)、COX-2、iNOS 引物均由生物工程(上海)有限公司合成;其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 ICR 小鼠 40 只,♀,6~8 周龄,由山西医科大学实验动物中心提供(实验动物生产许可证号:SCXK(晋)2015-001)。动物实验在该中心屏障环境动物实验室中进行(实验动物使用许可证号:SYXK(晋)2015-001)。实验期间小鼠自由饮食,饲养环境的温度为 20~24 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 40%~70%,明暗各 12 h 交替。

2 方法

2.1 小鼠耳肿胀炎症模型的建立与给药

将 40 只小鼠随机分为 5 组,分别为空白组、模型组、阳性对照组(地塞米松,2.5 mg/kg)^[9]和莲心碱低、高剂量组(5、15 mg/kg)^[10],每组 8 只。除空白组外,其余各组小鼠均于右耳内外侧涂抹 20 μL TPA 致炎^[11]。并于造模同时,各给药组小鼠均按 20 μL /只于右耳内外侧涂抹相应药液(以丙酮为溶剂),空白组和模型组小鼠涂抹等体积丙酮溶液。

2.2 耳肿胀情况及组织病理学的观察

给药 6 h 后,用数字测厚仪测量各组小鼠的耳厚度。然后颈椎脱臼处死小鼠,用打孔器($d=6$ mm)打孔取双耳相同部位组织,以右耳质量(mg)/左耳质量(mg)

计算耳肿胀度。并将耳组织用4%中性甲醛固定、脱水、石蜡包埋,切成10 μm薄片,进行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察各组小鼠耳组织病理学变化。

2.3 耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平测定

分别取同一部位耳组织,称质量,按质量(g):体积(mL)=1:9的比例加入生理盐水,在冰浴条件下剪碎组织,制成10%组织匀浆,然后以3 000 r/min离心10 min,收集上清液,采用ELISA法检测各组小鼠耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。

2.4 耳组织中NF-κB信号通路相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法测定各组小鼠耳组织中IκBα、NF-κB p65、p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平。取同一部位耳组织,用液氮研磨成粉末,移入1.5 mL EP管中,加入200 μL含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液,进行充分裂解,然后以1 2000 r/min离心10 min,取上清测总蛋白浓度。加入上样缓冲液,蛋白煮沸变性,上样30 μg进行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白转移到硝酸纤维素膜后,用5%脱脂牛奶封闭1 h,加入相应一抗(1:1 000),4 ℃孵育过夜;然后加入相应二抗(1:100),室温下孵育1 h。TBST缓冲液洗涤后,超敏化学发光液(ECL)发光,化学发光成像仪上检测目的蛋白IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65和内参β-actin蛋白表达,通过Image J软件对各蛋白条带灰度值进行定量,以目的蛋白与内参灰度值的比值来反映目的蛋白的表达水平。

2.5 耳组织中iNOS、COX-2 mRNA表达水平检测

采用实时荧光定量-PCR法检测各组小鼠耳组织中iNOS、COX-2 mRNA表达水平。取小鼠同一部位耳组织,于液氮中研磨,采用TRizol法提取耳组织中总RNA,微孔板分光光度计检测260 nm和280 nm波长下的吸光度值,进行RNA含量和纯度检测。然后按照10 μL反应体系使用500 ng的总RNA进行逆转录,合成cDNA。将cDNA产物3倍稀释后,进行实时荧光定量-PCR扩增。引物序列:COX-2上游引物序列为5'-CTGGAACATG-GACTC ACTCAGTTTG-3',下游引物序列为5'-AG-GCCTTGCCACTGCTTGTA-3',扩增产物大小为109 bp; iNOS上游引物序列为5'-CAAGCACATTT-GGGAATGGAGA-3',下游引物序列为:5'-CAGAACT-GAGGGTACATGCTGGAG-3',扩增产物大小为136 bp; 内参(β-actin)上游引物序列为5'-ATCTGGCACCA-CACCTTC-3',下游引物序列为5'-AGCCAGGTC-CAGACGCA-3',扩增产物大小为291 bp。反应体系:20 μL。反应条件:采用两步法,即95 ℃、30 s;95 ℃、5 s,60 ℃、30 s,共40个循环。结果以 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 法进行分析,式中 c_t 表示达到设定阈值的循环次数。

2.6 统计学方法

采用SPSS 16.0统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 耳厚度和耳肿胀度测定结果

与空白组比较,模型组小鼠耳厚度和耳肿胀度显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠耳厚度和耳肿胀度均显著降低($P < 0.05$),且莲心碱的作用具有一定的量效关系。各组小鼠耳厚度和耳肿胀度测定结果见表1。

表1 各组小鼠耳厚度和耳肿胀度测定结果($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 1 Determination of ear thickness and ear edema degree of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	耳厚度,mm	耳肿胀度
空白组	0.19±0.01	1.00±0.00
模型组	0.82±1.00*	1.84±0.02*
莲心碱低剂量组	0.67±0.09 [#]	1.56±0.03 [#]
莲心碱高剂量组	0.51±0.08 [#]	1.38±0.02 [#]
地塞米松组	0.34±0.07 [#]	1.25±0.05 [#]

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

Note: vs. blank group,* $P < 0.05$; vs. model group,[#] $P < 0.05$

3.2 耳组织病理学观察结果

与空白组比较,模型组可见耳部明显增厚,鳞状上皮过度角化,细胞间及细胞内水肿,炎性细胞浸润明显,伴有毛细血管扩张充血;与模型组比较,各给药组小鼠耳部鳞状上皮轻度角化,细胞间及细胞内水肿不明显,炎性细胞浸润减少,毛细血管轻度扩张充血。各组小鼠耳组织病理学观察结果见图1。

3.3 耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平测定结果

与空白组比较,模型组小鼠耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平均显著降低($P < 0.05$),且莲心碱的作用具有一定的量效关系。各组小鼠耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平测定结果见表2。

3.4 耳组织中IκBα、NF-κB p65蛋白磷酸化水平测定结果

与空白组比较,模型组小鼠耳组织中IκBα发生降解,IκBα蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组小鼠耳组织中IκBα降解受到抑制,IκBα蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。各组小鼠耳组织中IκBα、NF-κB p65、p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表3。

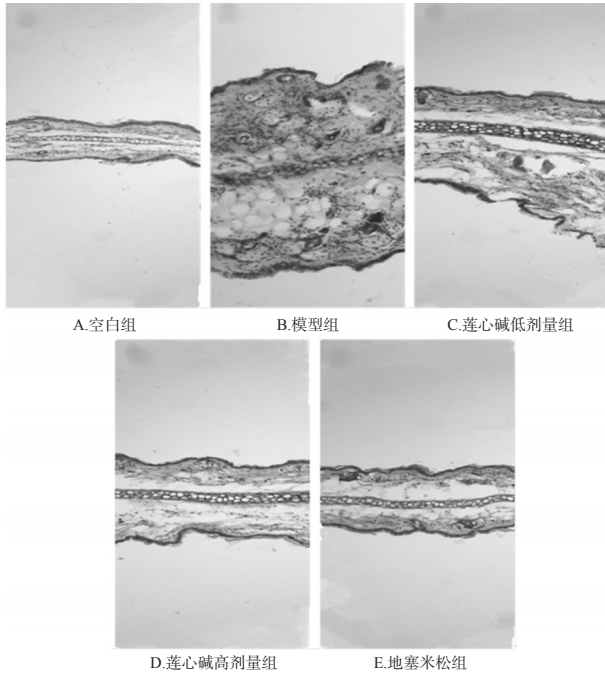


图1 各组小鼠耳组织病理学观察结果(HE, ×200)

Fig 1 The pathological observation of ear tissue of mice in each group(HE, ×200)

表2 各组小鼠耳组织中TNF-α、IL-6、IL-1β水平比较(̄x ± s, n=8, ng/mL)

Tab 2 Levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β in ear tissue of mice in each group(̄x ± s, n=8, ng/mL)

组别	TNF-α	IL-6	IL-1β
空白组	0.16 ± 0.05	0.06 ± 0.02	0.03 ± 0.05
模型组	12.0 ± 0.67*	1.40 ± 0.05*	1.27 ± 0.06*
莲心碱低剂量组	8.00 ± 0.50 [#]	0.60 ± 0.03 [#]	0.85 ± 0.04 [#]
莲心碱高剂量组	5.61 ± 0.44 [#]	0.41 ± 0.02 [#]	0.56 ± 0.05 [#]
地塞米松组	2.80 ± 0.15 [#]	0.32 ± 0.02 [#]	0.20 ± 0.02 [#]

注:与空白组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. blank group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

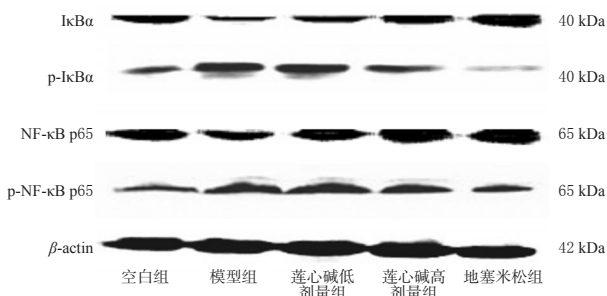


图2 各组小鼠耳组织中IκBα、NF-κB p65、p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electropherograms of IκBα, NF-κB p65, p-IκBα, p-NF-κB p65 protein in ear tissue of mice in each group

3.5 耳组织中iNOS、COX-2 mRNA表达水平测定结果

与空白组比较,模型组小鼠耳组织中iNOS、

表3 各组小鼠耳组织中IκBα、NF-κB p65、p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平测定结果(̄x ± s, n=8)

Tab 3 Protein expression levels of IκBα, NF-κB p65, p-IκBα, p-NF-κB p65 in ear tissue of mice in each group(̄x ± s, n=8)

组别	IκBα/β-actin	p-IκBα/β-actin	NF-κB p65/β-actin	p-NF-κB p65/β-actin
空白组	0.91 ± 0.03	0.03 ± 0.05	0.99 ± 0.03	0.34 ± 0.01
模型组	0.43 ± 0.01*	1.10 ± 0.06*	0.91 ± 0.03	0.72 ± 0.01*
莲心碱低剂量组	0.64 ± 0.02 [#]	0.85 ± 0.04 [#]	0.95 ± 0.02	0.65 ± 0.01 [#]
莲心碱高剂量组	0.78 ± 0.02 [#]	0.56 ± 0.05 [#]	0.97 ± 0.03	0.57 ± 0.01 [#]
地塞米松组	0.97 ± 0.02 [#]	0.20 ± 0.02 [#]	1.00 ± 0.03	0.30 ± 0.01 [#]

注:与空白组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. blank group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

COX-2 mRNA的表达水平显著升高(P<0.05);与模型组比较,各给药组小鼠耳组织中iNOS、COX-2 mRNA的表达水平均显著降低(P<0.05)。各组小鼠耳组织中iNOS、COX-2 mRNA表达水平测定结果见表4。

表4 各组小鼠耳组织中iNOS、COX-2 mRNA表达水平测定结果(̄x ± s, n=8)

Tab 4 Determination results of mRNA expressions of iNOS and COX-2 in ear tissue of mice in each group(̄x ± s, n=8)

组别	iNOS mRNA	COX-2 mRNA
空白组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	4.20 ± 0.20*	12.09 ± 1.00*
莲心碱低剂量组	2.40 ± 0.16 [#]	9.82 ± 0.71 [#]
莲心碱高剂量组	1.85 ± 0.14 [#]	5.84 ± 0.50 [#]
地塞米松组	1.62 ± 0.10 [#]	3.02 ± 0.42 [#]

注:与空白组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. blank group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

4 讨论

采用简便易行的外用涂抹方法对皮肤炎症进行局部治疗,能够避免口服静脉途径带来的全身副作用^[12]。TPA诱导小鼠耳肿胀炎症模型是化学接触性皮肤炎症的经典动物模型,表现为小鼠耳组织角质形成细胞增生,产生TNF-α、IL-6、IL-1β等炎性细胞因子,炎性细胞浸润增多,角质层明显增厚,耳组织增厚和耳质量增加等^[13]。本研究采用TPA诱导小鼠耳肿胀炎症小鼠模型,并以一种抗炎效果较好的强效类固醇激素——地塞米松为阳性对照,来验证莲心碱的抗炎作用。结果显示,涂抹TPA后,小鼠耳厚度和耳肿胀度明显增加,而莲心碱和地塞米松涂抹给药后均可显著降低小鼠耳厚度和耳肿胀度。进一步的组织病理学检查结果显示,与空白组比较,模型组小鼠耳组织中炎性细胞浸润增加,耳组织肿胀;而莲心碱和地塞米松给药组小鼠耳组织炎性细胞浸润减少,耳组织肿胀减轻。

TNF-α是一种自分泌刺激因子,可由角质形成细胞中的巨噬细胞产生,是皮肤炎症中的关键细胞因子和细胞介质^[14]。IL-6作为炎症反应介质,在皮肤感染过程中

通过增加血管通透性,对皮肤水肿的形成起促进作用^[15]。IL-1 β 是炎症性和免疫性皮肤病的主要介质,炎症和免疫刺激均可诱导角质形成细胞中的IL-1 β 产生和分泌^[16]。本研究检测了小鼠耳组织中炎性细胞因子的分泌水平。结果显示,与空白组比较,模型组TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量明显升高;而莲心碱和地塞米松处理后降低了TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的分泌水平,证实了莲心碱对皮肤炎症的局部抗炎作用。

NF- κ B是一种核转录因子,通过调节炎性细胞因子的表达在免疫和炎症反应中发挥重要作用^[17]。静息状态下,NF- κ B的亚基p50和p65通常以异二聚体的形式存在于细胞质中。当促炎刺激物(如TNF- α)作用于细胞时,会通过I κ B α 的降解和磷酸化来活化NF- κ B,活化的NF- κ B p65进入细胞核内与DNA结合,上调炎症基因COX-2、iNOS的转录^[18]。NF- κ B被激活并启动促炎症基因的转录和表达,导致TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等多种促炎因子的过度分泌^[19],从而加重炎症损伤。在本研究中,涂抹TPA后,可促进小鼠耳组织中I κ B α 、NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平,从而上调炎症基因iNOS和COX-2 mRNA的表达;莲心碱给药后可明显抑制I κ B α 、NF- κ B p65蛋白磷酸化的发生,抑制炎症基因iNOS和COX-2 mRNA的表达,从而减轻炎症反应。

综上所述,莲心碱对TPA诱导的小鼠耳肿胀具有抗炎作用,其作用机制可能为抑制I κ B α 和NF- κ B p65蛋白的磷酸化水平,进而抑制炎症基因iNOS、COX-2 mRNA的表达有关。

参考文献

[1] CORSINI E, GALLI CL. Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis[J]. *Toxicology*, 2000, 142(3): 203-211.

[2] NODA S, KRUEGER JG, GUTTMAN Y, et al. The translational revolution and use of biologics in patients with inflammatory skin diseases[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(2): 324-336.

[3] SLOMINSKI AT, ZMILEWSKI MA, ZBYTEK B, et al. Key role of CRF in the skin stress response system[J]. *Endocrine Reviews*, 2013, 34(6): 827-884.

[4] 罗顺德, 王辉. 莲心碱的研究概况和进展[J]. *中国药房*, 2001, 12(10): 624-625.

[5] 余万桂, 邓德明, 张恒文, 等. 莲心碱对大鼠脑缺血再灌注损伤血清中IL-1、TNF- α 的影响[J]. *长江大学学报*, 2008, 5(4): 1-5.

[6] 余万桂, 张恒文, 杨涛, 等. 莲心碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(3): 23-25.

[7] KIM YW, WEST XZ, BYZOVA TV. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease[J]. *J*

Mol Med, 2013, 91(3): 323-328.

[8] LAPPAS M, PERMEZEL M, GEORGIU HM, et al. Nuclear factor kappa B regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro[J]. *Biol Reprod*, 2002, 67(2): 668-673.

[9] WU X, SONG M, MRAKARIYATHA K, et al. Inhibitory effects of 4'-demethylnobiletin, a metabolite of nobiletin, on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mouse ears[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(51): 10921-10927.

[10] 王辉, 刘刚, 罗顺德. 莲心碱对血小板聚集、凝血功能和血栓形成的影响[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(6): 722-768.

[11] 周娟, 张梦军, 郭嘉伟, 等. TPA致小鼠耳肿胀模型的中性粒细胞聚集及IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IL-17A的表达水平研究[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(10): 872-876.

[12] 季蔚青, 李惠仙. 氯地松乳膏治疗皮炎湿疹类皮肤病的临床疗效评价[J]. *中国药房*, 2013, 24(6): 532-533.

[13] XU XT, MOU XQ, XI QM, et al. Anti-inflammatory activity effect of 2-substituted-1, 4, 5, 6-tetrahydrocyclopenta[b]pyrrole on TPA-induced skin inflammation in mice[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(21): 5334-5339.

[14] POSTAL M, APPENZELLER S. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. *Cytokine*, 2011, 56(3): 537-543.

[15] LIU G, YANG H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(3): 502-512.

[16] JUNG YJ, ISAACS JS, LEE S, et al. IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF- κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis[J]. *FASEB J*, 2003, 17(14): 2115-2117.

[17] XIANG P, CHEN T, MOU Y, et al. NZ suppresses TLR4/NF- κ B signalings and NLRP3 inflammasome activation in LPS-induced RAW264.7 macrophages[J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(10): 799-808.

[18] SURH YJ, CHUN KS, CHA HH, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation[J]. *Mutat Res*, 2001, 480(3): 243-268.

[19] KULKARNI NM, MULEY MM, JAJI MS. Topical atorvastatin ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced skin inflammation by reducing cutaneous cytokine levels and NF- κ B activation[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(6): 1238-1247.

(收稿日期:2018-02-01 修回日期:2018-07-01)

(编辑:林 静)