

鱼腥草素钠对急性哮喘模型小鼠炎症的影响及机制研究

陈 叶¹, 黄丽娟¹, 胡智立¹, 赵 欣¹, 冯 斌¹, 丁 妞², 许 峰^{3*}

1. 深圳市南山区人民医院 儿科, 深圳 518000

2. 湖南省儿童医院 呼吸一科, 湖南 长沙 410000

3. 重庆医科大学附属儿童医院 重症医学科, 重庆 400000

摘 要: 目的 观察鱼腥草素钠对急性哮喘模型小鼠的抗炎作用, 并探讨作用机制。方法 建立卵白蛋白(OVA)诱导小鼠急性哮喘模型, 将造模小鼠随机分为模型组, 鱼腥草素钠低、高剂量(10、25 mg/kg)组, 每组8只, 另取正常小鼠8只作为对照组, ig给药2周, 对照组与模型组给予等体积生理盐水。采用小鼠肺功能仪器检测小鼠气道高反应性; ELISA法检测血清中特异性OVA-IgE、白细胞介素-4(IL-4)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)浓度; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测肺组织中Toll样受体-4(TLR-4)、髓样分化因子88(MyD88)、转铁蛋白6(TRF6) mRNA的表达水平; HE染色后, 光镜观察肺组织病理变化。结果 与模型组比较, 10、25 mg/kg 鱼腥草素钠组小鼠在乙酰甲胆碱激发浓度气道高反应值、血清OVA-IgE水平、血清IL-4和MCP-1浓度均显著降低, 具有统计学差异($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 10 mg/kg 鱼腥草素钠组肺组织MyD88、TRF6 mRNA表达和25 mg/kg 鱼腥草素钠组肺组织TLR-4、MyD88、TRF6 mRNA表达显著降低, 具有统计学差异($P < 0.05, 0.01$)。HE染色显示, 鱼腥草素钠显著改善模型小鼠的肺组织结构紊乱、肺泡塌陷、支气管周围大量炎症细胞浸润、管腔内有大量分泌物等症状。结论 鱼腥草素钠能显著抑制急性哮喘模型小鼠的炎症, 机制可能与调节TLR4-NF- κ B信号通路有关。

关键词: 鱼腥草素钠; 急性哮喘; 炎症; TLR4; NF- κ B; 卵白蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)06-1105-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.06.009

Inflammation effect and research mechanism about sodium houttuynonate on acute asthma mice model

CHEN Ye¹, HUANG Lijuan¹, HU Zhili¹, ZHAO Xin¹, FENG Bin¹, DING Niu², XU Feng³

1. Department of Pediatrics, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518060, China

2. Department of Respiration, Hunan Children's Hospital, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Changsha 410000, China

3. Department of Intensive Care Unit, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400000, China

Abstract: Objective To observe the anti-inflammatory effects of sodium houttuynonate (SH) on mice with acute asthma and to explore the specific mechanism. **Methods** OVA-induced acute asthma model in mice was established. The model mice were randomly divided into model group, low and high doses of sodium houttuynin (10, 25 mg/kg) group, 8 mice in each group, and 8 normal mice were taken as control group. After 2 weeks of Ig administration, the control group and model group were given normal saline of equal volume. The airway hyperresponsiveness of mice was measured by pulmonary function instrument, the specific concentrations of OVA-IgE, IL-4 and MCP-1 in serum were detected by ELISA, and the mRNA expression levels of Toll-like receptor-4 (TLR-4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and transferrin 6 (TRF6) in lung tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). After HE staining, the pathological changes of lung tissue were observed under light microscope. **Results** Compared with the model group, the airway hyperresponsiveness, serum OVA-IgE level, serum IL-4 and MCP-1 levels of mice in 10 and 25 mg/kg sodium houttuynin group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Compared with the model

收稿日期: 2018-11-30

基金项目: 广东省级科技计划项目(2017A020215129); 广东省中医药管理局项目(20181235); 湖南省卫生计生委科研基金(132015-128); 深圳市科技计划项目基础研究(JCYJ20160429183052202); 深圳市南山区科技项目(2017016)

第一作者: 陈 叶(1981—), 女, 副主任医师, 主要从事过敏性哮喘、儿童重症方面研究。E-mail: tu7a73@163.com

*通信作者: 许 峰(1963—), 男, 主任医师, 主要从事儿童重症方面研究。

group, the expression of MyD88, TRF6 in lung tissue of 10 mg/kg sodium houttuynin group and TLR-4, MyD88, MyD88, and MCP in lung tissue of 25 mg/kg sodium houttuynin group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). HE staining showed that sodium houttuynin significantly improved the symptoms of pulmonary tissue disorder, alveolar collapse, infiltration of inflammatory cells around the bronchi, and a large number of secretions in the lumen of the model mice. **Conclusion** Sodium houttuynin significantly inhibited inflammation in an acute asthma mice model and the mechanism may be related to the regulation of the TLR-4-NF- κ B signaling pathway.

Key words: sodium houttuynin; acute asthma; inflammation; TLR4; NF- κ B; ovalbumin

哮喘是儿童和成人慢性气道炎症性疾病之一,其特点是气道高反应性、可逆性气流阻塞、气道重塑和反复喘息、胸闷、咳嗽等^[1]。近年世界各国哮喘患病率都呈明显上升趋势,特别是在发展中国家和年幼儿童^[2],而10年间我国城区儿童哮喘上升了53%^[3],该病严重影响儿童的生活和心理健康,给家庭、社会带来严重的影响。目前哮喘治疗主要是改善哮喘症状、减少哮喘发作、减少肺功能受损,吸入糖皮质激素已经被国际和国内各种指南推荐。但激素给儿童带来的副作用以及人们对激素使用的偏见,使激素使用的依从性明显降低,导致哮喘病情得不到控制,因此研究激素的替代疗法是现在研究的热点,也具有重要的社会意义。

鱼腥草为三白草科植物蕺菜的新鲜全草或干燥地上部分,为传统的食药同源中药。鱼腥草具有清热解毒的功效,主治肺痈吐脓、痰热喘咳、热痢、热淋、痈肿疮毒,主要与其抗病原微生物、抗炎、调节免疫功能等药理作用相关^[4],但因其注射剂引起严重的过敏反应,不能得到充分利用。鱼腥草素钠是使用鱼腥草挥发油活性成分鱼腥草素与亚硫酸氢钠盐合成而得,较鱼腥草及鱼腥草素性质更为稳定,鱼腥草素钠同样具有杀菌消炎、抗病毒、抗肿瘤作用,通过核因子- κ B(NF- κ B)炎症通路抑制细胞炎症和调节免疫^[5],但目前用其治疗儿童哮喘方面的研究较少。本研究通过建立急性哮喘动物模型探究鱼腥草素钠的抗炎作用,并对其抗炎作用机制进行进一步探讨。

1 材料

1.1 动物

SPF级雌性BALB/c小鼠32只,6周龄,体重(21 $\pm$ 2)g,购自广东省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2014-0035;饲养于深圳大学医学院SPF动物房,使用许可证号SYXK(粤)2014-0140。按3R原则给予动物实验人道关怀,实验动物饲养及实验处理均严格遵循深圳大学实验动物福利与伦理委员会相关指南要求(伦理审查号2015-082)。

1.2 药物与主要试剂

鱼腥草素钠(上海青平药业有限公司,批号

1306-5,质量分数 $\geq 97\%$);卵白蛋白(OVA,美国sigma公司,批号S7951);氢氧化铝佐剂(美国sigma公司,批号239186);羊抗鼠IgE抗体(美国southern公司,批号1110-05);乙酰甲胆碱(美国sigma公司,批号1396364);小鼠单核细胞趋化因子-1(MCP-1)ELISA试剂盒(美国Abcam公司,批号ab20897);小鼠白细胞介素-4(IL-4)ELISA试剂盒(中国四正柏公司,批号M-1187-100);逆转录试剂盒、实时荧光定量(qRT-PCR)试剂盒(中国全式金公司,批号AT311-02、AS122-01)。

1.3 主要仪器

qRT-PCR仪器(美国ABI公司,ABI7500TaqMan qPCR);酶标仪(美国MRX2)、小鼠无创肺功能仪(美国Buxco公司)。

2 方法

2.1 模型制备、分组及干预方法

小鼠适应环境1周后,按照之前课题组方案造模^[6],第0、3、7天,小鼠背部多点注射OVA与等体积佐剂氢氧化铝完全乳化的乳化剂(100 μ g/只),第14天予OVA(50 μ g/只,1次/d,滴鼻,共7d)激发。将造模的动物随机分为模型组及鱼腥草素钠低、高剂量组,每组各8只,另设对照组8只。鱼腥草素钠组第7天起ip鱼腥草素钠(溶于生理盐水中,10、25 mg/kg,1 d/次,共14 d),模型组及对照组ip等体积的生理盐水。第21天乙醚麻醉处死动物。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 小鼠气道高反应检测^[7] 第21天,麻醉处死小鼠前,雾化吸入乙酰甲胆碱(0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 μ g/mL)激发小鼠后,应用小鼠无创肺功能仪检测各组小鼠气道高反应值。

2.2.2 小鼠血清OVA-IgE水平检测 小鼠眼球摘除取血,4 $^{\circ}$ C静置30 min,离心收集血清。将20 μ g/mL OVA包被于96孔板中4 $^{\circ}$ C过夜,用3% BSA/PBS于37 $^{\circ}$ C封闭2 h;加入1% BSA/PBST稀释小鼠血清(1:20),37 $^{\circ}$ C孵育2 h,洗板3次,加入HRP-羊抗小鼠IgE,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,洗板3次后,加入TMB显色后,加入2 mol/L硫酸终止反应。采用全波长酶标仪检

测 450 nm 处吸光度(A_{450})值。

2.2.3 小鼠血清 IL-4、MCP-1 浓度检测 采用 ELISA 法检测各组小鼠血清 IL-4、MCP-1 水平,具体操作根据试剂盒说明书进行。采用全波长酶标仪检测 450 nm 处吸光度(A_{450})值,绘制标准化曲线,计算 IL-4、MCP-1 浓度。

2.2.4 肺组织 Toll 样受体-4(TLR-4)、髓样分化因子

88(MyD88)、转铁蛋白 6(TRF6)的 mRNA 检测 设计并合成 TLR-4、MyD88、TRF6 引物,序列见表 1。取各组小鼠左上肺组织,放入液氮中充分研磨,收集组织,提取 RNA,检测 RNA 浓度,应用逆转录试剂盒进行逆转录 cDNA,应用 qRT-PCR 试剂盒检测 TLR-4、MyD88、TRF6 的 mRNA 含量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
TLR4	GGGAACAAACAGCTGAGACA	AGAATTCTGTGACCCTTTTAAAGTAGAG
MyD88	GATGCGGAGCCAGATTCTCT	TCATCATTGAACACGGGTGTA
TRF6	GCTTGCCAACTGCTGAGTGTTAC	AACCGGCTGTGGAAACCA
β -actin	TGTCCACCTTCCAGCAGATGT	AGCTCAGTAACAGTCCGCCTAG

2.2.5 肺组织形态学观察 取小鼠右上肺的肺组织,修整约 0.3 cm×0.3 cm×0.3 cm 的组织块放入 4% 多聚甲醛过夜,之后进行常规脱水、包埋、切片、HE 染色,封片,显微镜下观察肺组织病理改变

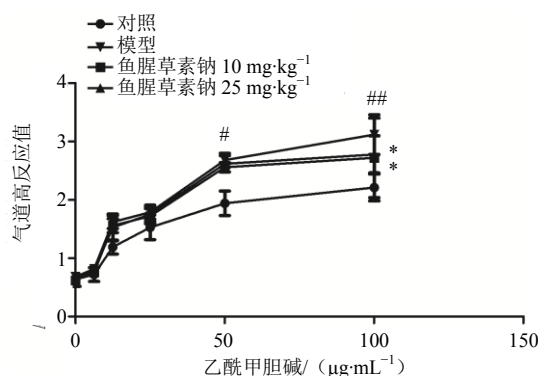
2.3 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用单因素方差分析。组间两两比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett T 检验。

3 结果

3.1 小鼠气道高反应检测

与对照组比较,模型组小鼠的气道高反应值显著增加($P < 0.05, 0.01$);与模型组比较,10、25 mg/kg 鱼腥草素钠组小鼠在乙酰甲胆碱激发浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)气道高反应值显著降低,具有统计学差异($P < 0.05$)。见图 1。



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$

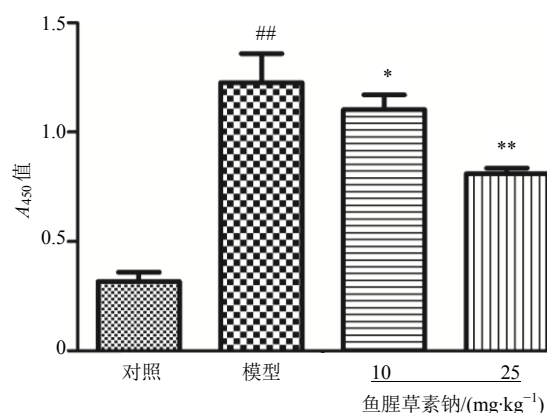
$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ vs model group

图 1 小鼠气道高反应检测($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Detection of airway hyperresponsiveness in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2 小鼠血清 OVA-IgE 水平

如图 2 所示,与对照组比较,模型组能提高血清 OVA-IgE 水平,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,10、25 mg/kg 鱼腥草素钠能显著降低血清 OVA-IgE 水平,差异具有统计学意义($P < 0.05, 0.01$)。



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

图 2 小鼠血清 OVA-IgE 检测($\bar{x} \pm s, n = 8$)

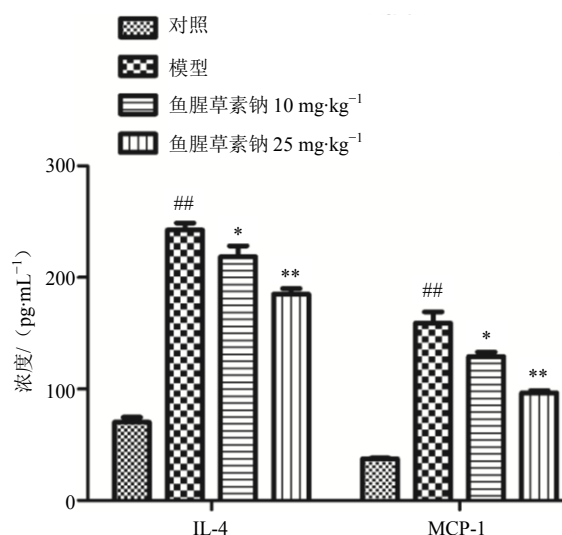
Fig. 2 Detection of serum OVA-IgE in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3 小鼠血清 IL-4、MCP-1 浓度检测

与对照组比较,模型组血清中 IL-4、MCP 浓度显著升高,具有统计差异($P < 0.01$);与模型组比较,10、25 mg/kg 鱼腥草素钠显著降低 IL-4、MCP 浓度,具有统计学差异($P < 0.05, 0.01$)。见图 3。

3.4 肺组织 TLR-4、MyD88、TRF6 的 mRNA 检测

与对照组比较,模型组血清中 TLR-4、MyD88、TRF6 的 mRNA 表达显著升高,具有统计差异($P < 0.01$);与模型组比较,10 mg/kg 鱼腥草素钠组



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

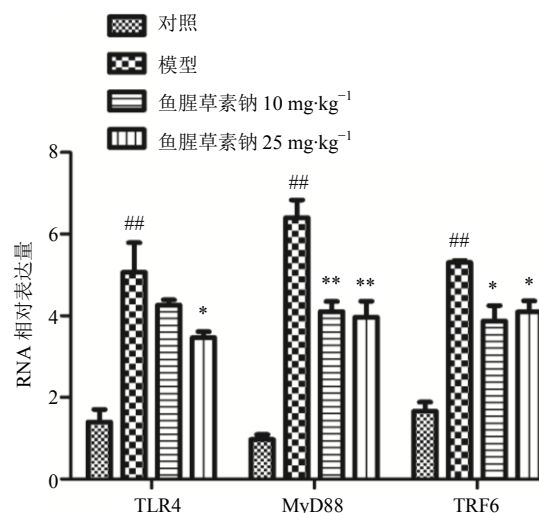
图3 小鼠血清IL-4、MCP-1浓度检测($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Determination of serum IL-4 and MCP-1 concentration in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

MyD88、TRF6 mRNA表达显著降低,具有统计学差异($P < 0.05, 0.01$);25 mg/kg鱼腥草素钠组TLR-4、MyD88、TRF6 mRNA表达显著降低,具有统计学差异($P < 0.05, 0.01$)。见图4。

3.5 肺组织形态学观察

通过显微镜观察,对照组肺组织结构清晰,无明显肺泡塌陷,支气管周围未见明显炎症细胞浸润。模型组肺组织结构紊乱,可见肺泡塌陷,支气管周围大量炎症细胞浸润,小鼠支气



与对照组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图4 肺组织TLR-4、MyD88和TRF6的mRNA水平检测($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 4 Detection of mRNA expression of TLR-4, MyD88, and TRF6 in lung tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

管上皮损伤,杯状细胞增殖,平滑肌痉挛,管腔内有大量分泌物,可见黏液栓。10 mg/kg鱼腥草素钠组与模型组比较,肺组织结构清晰,部分肺泡塌陷,支气管周围大量炎症细胞浸润,少量杯状细胞增殖,部分管腔可见分泌物。25 mg/kg鱼腥草素钠组与模型组比较,肺组织结构清晰,肺泡无明显塌陷,支气管周围少量炎症细胞浸润,极少数杯状细胞增殖,未见明显的管腔分泌物。结果见图5。

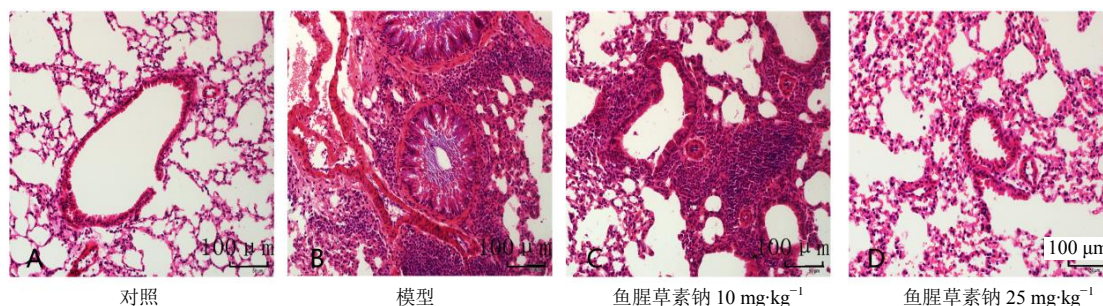


图5 肺组织的病理观察(HE染色)

Fig. 5 Pathological observation of lung tissue (HE staining)

4 讨论

鱼腥草是一种传统中药,现代研究证明鱼腥草具有较好的抗炎、抗菌活性。鱼腥草素钠是鱼腥草素与亚硫酸氢钠盐合成,具有很好的抗菌、抗炎作用,研究发现鱼腥草素钠可以抑制膜性肾小球肾炎的NF- κ B活化和MCP-1的表达^[8]。哮喘是以肺组织炎症、间歇性气道阻塞、气道重塑和气道高反应性为特征的最常见的慢性肺部疾病^[9]。哮喘导致气

道高反应性、阻塞、黏液分泌异常和气道壁重塑。气道炎症通常是由病原体或暴露于毒素、污染物、刺激物和过敏原诱发引起^[10-11]。通过实验发现,高、低剂量的鱼腥草素钠降低高浓度乙酰甲胆碱激发小鼠的气道高反应。哮喘中气道上皮细胞通过激活上皮TLRs识别过敏性疾病的炎症刺激模式,抗原提呈细胞内吞过敏原进行分解,然后将它们呈现给原始T细胞,并通过交联表面结合的IgE分子激

活肥大细胞,释放支气管炎症及趋化因子,如CCL17和CCL22等^[12],它们作用于CCR4吸引Th2细胞,导致T细胞调节异常,特别是IL-4、IL-5和IL-13释放,嗜酸性粒细胞分泌大量的细胞毒性和促炎介质导致免疫球蛋白IgE生成^[13]。进一步检测了鱼腥草素钠治疗急性哮喘小鼠模型血清中特异性IgE和炎症因子IL-4、MCP-1浓度,不同浓度的鱼腥草素钠能减少特异性IgE和TNF- α 、MCP-1的浓度,且高剂量的鱼腥草素钠的效果较强。同时观察到鱼腥草素钠治疗后,高剂量的鱼腥草素钠改善肺组织的炎症明显,与上述实验结果相符。

TLR4-NF- κ B信号通路在哮喘大鼠气道重塑过程起重要作用,TLR4激活介导肺泡巨噬细胞产生基质金属蛋白酶,进而裂解结构蛋白如胶原和弹性蛋白,参与气道结构重塑^[14];TLRs能特异性地识别病原相关分子模式(PAMP),通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号转导入细胞内,产生复杂的级联信号反应,导致NF- κ B等转录因子活化^[15]。PAMP激活TLR-MyD88信号增强NF- κ B信号^[16],而既往研究发现鱼腥草素钠对TLR4-NF- κ B具有抑制作用。Wang等^[17]发现鱼腥草素钠能通过TLR4/NF- κ B信号通路抑制LPS刺激原代牛乳腺上皮细胞的炎症作用。赵春贞等^[18]研究发现鱼腥草素钠能减少LPS诱导肺炎模型炎症的浸润,抑制TLR4的表达。本实验通过检测急性哮喘模型中MyD88依赖的TLR-4的信号通路,发现鱼腥草素钠组TLR4、MyD88、TRF6的表达不同程度下降,高、低剂量的鱼腥草素钠都能通TLR4途径抑制哮喘的炎症,两者无明显差异。而上述高剂量的鱼腥草素钠抑制炎症因子表达作用更强,可能与激活其他抑制炎症通路有关。

鱼腥草素钠能抑制急性哮喘模型气道高反应及肺部的炎症,抑制IL-4、MCP-1的表达,可能与抑制MyD88介导的TLR4/NF- κ B信号通路有关。

参考文献

- [1] Mathew J, Aronow W S, Chandy D. Therapeutic options for severe asthma [J]. Arch Med Sci, 2012, 8(4): 589-597.
- [2] 儿童哮喘组, 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所. 第三次中国城市儿童哮喘流行病学调查 [J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 729-735.
- [3] Guilbert T W, Morgan W J, Zeiger R S, et al. Long-term inhaled corticosteroids in preschool children at high risk for asthma [J]. N Engl J Med, 2006, 354(19): 1985-1997.
- [4] 陈 婧, 方建国, 吴方建, 等. 鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 284-289.
- [5] Murray C S, Woodcock A, Langley S J, et al. Secondary prevention of asthma by the use of Inhaled Fluticasone propionate in Wheezy Infants (IFWIN): double-blind, randomised, controlled study [J]. Lancet, 2006, 368 (9537): 754-762.
- [6] 陈 叶, 贺守第, 胡智立, 等. 香菇多糖对卵白蛋白诱导小鼠哮喘模型树突细胞TIM4表达及炎症影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(9): 998-1002.
- [7] 李斌恺, 赖克方, 洪燕华, 等. 支气管哮喘小鼠气道反应性无创检测方法的建立 [J]. 中华哮喘杂志: 电子版, 2009, 3(4): 243-247.
- [8] Pan P, Wang Y J, Han L, et al. Effects of sodium houttuynfonate on expression of NF- κ B and MCP-1 in membranous glomerulonephritis [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(1): 203-209.
- [9] Hamid Q, Tulic M. Immunobiology of asthma [J]. Annu Rev Physiol, 2009, 71: 489-507.
- [10] Lumb, Andrew B. Nunn's Applied Respiratory Physiology [M]. Churchill Livingstone: Elsevier, 2010.
- [11] Chung K F. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma [J]. Lancet, 2015, 386(9998): 1086-1096.
- [12] Sugita K, Steer C A, Martinez-Gonzalez I, et al. Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients [J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141 (1): 300-310, e11.
- [13] Murdoch J R, Lloyd C M. Chronic inflammation and asthma [J]. Mutat Res, 2010, 690(1/2): 24-39.
- [14] Matsushita H, Ohta S, Shiraishi H, et al. Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells [J]. Int Immunol, 2010, 22(9): 739-747.
- [15] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388 (6640): 394-397.
- [16] Chirico V, Lacquaniti A, Leonardi S, et al. Acute pulmonary exacerbation and lung function decline in patients with cystic fibrosis: high-mobility group box 1 (HMGB1) between inflammation and infection [J]. Clin Microbiol Infect, 2015, 21(4): 368.e1-e9.
- [17] Wang W Q, Hu X Y, Shen P, et al. Sodium houttuynfonate inhibits LPS-induced inflammatory response via suppressing TLR4/NF- κ B signaling pathway in bovine mammary epithelial cells [J]. Microb Pathog, 2017, 107: 12-16.
- [18] 赵春贞, 姚红伊, 王 砚, 等. TLR4在LPS所致小鼠肺部炎症中的表达及鱼腥草素钠的影响 [A]. 中国药理学学会. 第九次全国会员代表大会暨全国药理学术会议论文集 [C]. 北京: 医药导报杂志社, 2007.