

· 药理与临床 ·

甘草黄酮对肺部炎症小鼠细胞因子表达和氧化反应的调节作用

管 燕^{1,2}, 谢强敏^{2*}(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学 国家食品药品监督管理局
浙江呼吸药物研究实验室, 浙江 杭州 310058)

摘要:目的 研究甘草黄酮对抗内毒素脂多糖 (LPS) 诱导小鼠肺部炎症的作用机制。方法 小鼠气管内滴入 LPS 或生理盐水, 6 或 24 h 后取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织, 测定 BALF 中的白细胞总数和中性粒细胞以及超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 测定肺组织的含水量和病理变化, 测定肺组织匀浆和 BALF 中的髓过氧化物酶 (MPO) 活性、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 (IL-1) 的 mRNA 表达以及 TNF- α 蛋白水平。结果 白细胞计数、肺含水量测定和肺组织病理检查等指标显示, 小鼠气管内滴入 LPS 引起严重的肺部炎症。甘草黄酮给药后能预防 LPS 引起的这些变化。甘草黄酮能明显减少 BALF 中的总白细胞和中性粒细胞的数目, 升高 SOD 活性。甘草黄酮能明显降低肺组织中的 MPO 活性, 抑制 TNF- α 和 IL-1 mRNA 的表达, 抑制 TNF- α 蛋白水平。结论 甘草黄酮能改善 LPS 引起的小鼠肺部炎症, 其抗炎作用可能与抑制细胞因子的表达和调节氧化/抗氧化反应有关。

关键词:甘草黄酮; 抗炎; 抗氧化; 脂多糖; 肺损伤; 细胞因子

中图分类号: R286.4 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)08-1254-06

Regulation of licorice flavonoids on cytokines mRNA expression and oxidation reaction in mice with lung inflammation

GUAN Yan^{1,2}, XIE Qiang-min²

(1. Affiliated Sir Run Run Shaw Hospital of Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China; 2. Zhejiang Respiratory Drugs Research Laboratory of SFDA China, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Objective To study the mechanism of anti-inflammatory effects of licorice flavonoids (LF) isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* (licorice) on lipopolysaccharide (LPS)-induced lung inflammation in mice. **Methods** Mice were intratracheally instilled with either LPS (4 mg/kg) or saline. At 6 or 24 h after LPS intratracheal instillation, pathological examination and bronchoalveolar lavage were performed and the lung wet/dry weight ratio as an index of acute lung injury was assessed. Then, the numbers of total leukocytes, neutrophils and the activity of superoxide dismutase (SOD) and TNF- α protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured. LPS-induced myeloperoxidase (MPO) activity and expressions of TNF- α and IL-1 at the mRNA levels and TNF- α at the protein level in lung tissues were determined by RT-PCR and ELISA. **Results** LPS caused a severe lung inflammation, as indicated by the pathological findings and the lung wet/dry weight ratio. However, oral LF could attenuate these LPS-induced abnormalities. LF could decrease the numbers of total leukocyte cells and neutrophils, and increase the levels of SOD and TNF- α BALF. In addition, LF significantly suppressed the MPO activity, TNF- α and IL-1 mRNA expression levels, and TNF- α protein level in the lung tissues. **Conclusion** Inhibition of inflammatory cytokines expressions and regulation of oxidation/antioxidation of LF may be its anti-inflammatory mechanism in LPS-induced lung inflammation in mice.

Key words: licorice flavonoids (LF); anti-inflammation; antioxidation; lipopolysaccharide (LPS); lung injury; cytokine

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 系豆科多 年生草本植物, 主要含有甘草酸、甘草次酸、黄酮、生

* 收稿日期: 2009-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671919, 30772581); 浙江省科技厅重点科研项目 (2006C23009)

作者简介: 管 燕 (1973—), 女, 浙江大学药学院药学专业硕士生, 主管药师, 研究方向为呼吸药理学和抗炎免疫药理学。

* 通讯作者 谢强敏 Tel/Fax: (0571) 88208231 E-mail: xieqm@zju.edu.cn

物碱和氨基酸等成分。甘草黄酮具有广泛的药理活性,包括抗氧化、抗肿瘤、抗 HIV、抗溃疡、保肝等作用^[1]。前期的研究表明甘草黄酮对辣椒素引起的豚鼠咳嗽反射有很强的抑制作用^[2],推测其镇咳作用机制与抗炎效应有关。甘草黄酮对肺部炎症的实验研究至今未见报道,本研究采用内毒素脂多糖(LPS)诱导的小鼠肺部炎症模型探讨甘草黄酮的抗炎作用,并初步研究其抗炎作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物:健康 ICR 小鼠,雌雄各半,体质量 22~25 g,由浙江省实验动物中心提供,合格证号:2003-0001。所有的操作和实验流程均遵守《实验动物管理条例》,动物在实验过程中自由进食和进水。

1.2 主要试剂和设备:甘草黄酮由浙江大学国家食品药品监督管理局浙江呼吸药物研究实验室提取^[2],经 HPLC 测定主要成分为甘草黄酮,含总黄酮 50% 以上。LPS (Esherichia coli O127:B8, Sigma 公司,批号 056k5602);地塞米松磷酸钠注射液(湖北天药药业股份有限公司,批号 20070810);髓过氧化物酶(MPO)和超氧化物歧化酶(SOD)均购自南京建成生物工程研究所;Oligod(T)18,核糖核酸分解酶抑制剂,逆转录酶 M-MLV,5'-逆转录酶 M-MLV 缓冲液,dNTP Mixture, Taq, 100 bp DNA marker 均购于 Takara 公司;肿瘤坏死因子(TNF-)和白细胞介素-1(IL-1)以及 β -actin PCR 引物购于上海生物工程有限公司;Trizol 试剂购于 Sigma 公司;琼脂糖,Biowest AGAROSE;聚山梨酯 20,AMRESLO;溴化乙锭(EB),上海华美公司;小鼠 TNF- ELISA 试剂盒(E025809,eBio-science);其余试剂,国产分析级。冰冻离心机(Eppendorf,德国);低温超速离心机(Beckman,美国);Elx800 酶标仪(Bio-Tek Instrument INC,美国);PCR 仪(Eppendorf,德国);显微镜(Olympus BX51,日本);核酸紫外分析仪(Eppendorf,德国);凝胶成像系统(UVP Company Limited,英国);水平电泳仪(CLP,美国)。

1.3 实验设计:将实验动物随机分为 6 组,即对照组、模型组(LPS)、甘草黄酮(3、10、30 mg/kg)组和地塞米松(1 mg/kg)组。小鼠乙醚麻醉后,将 LPS 直接气管内滴入(4 mg/kg,20 μ L/10 g),对照组滴入相同容积的生理盐水,甘草黄酮组和地塞米松组分别于造模前 ig 给药 5 次(间隔 6 h)和造模后给药 2 次(间隔 8 h),共 7 次。对照组给予相同容积的生理盐水。以上设计共使用了 2 批动物,一

批用于造模后 24 h 的肺含水量与肺组织学检查,另一批用于造模 24 h 的支气管泡灌洗液(BALF)中的白细胞总数计数、分类计数,MPO 及 SOD 活性,TNF- mRNA 和 IL-1 mRNA 表达的测定。此外,还另设一批动物用于造模 6 h 后的 TNF- mRNA、IL-1 mRNA 和 TNF- 蛋白水平表达的测定。造模 6 h 后的小鼠,甘草黄酮组和地塞米松组分别于造模前 ig 给药 5 次(间隔 6 h),造模后不再给药。

1.4 肺水含量与肺组织学检查:造模 24 h 后将小鼠麻醉,股动脉放血处死,暴露气管,结扎左肺,用 10% 中性福尔马林固定,HE 染色后进行肺组织学检查;取右肺称质量(湿质量),置 60 $^{\circ}$ C 烘箱 48 h 后称干质量,计算肺含水量[肺含水量=(湿质量-干质量)/湿质量 \times 100%]。

1.5 BALF 中白细胞计数和分类计数:造模 24 h 将小鼠麻醉,股动脉放血处死,打开胸腔,暴露气管,行气管插管,结扎右肺,左肺用 PBS 液 1.5 mL 分 3 次进行支气管肺泡灌洗,收集灌洗液,4 $^{\circ}$ C、1 500 r/min 离心 10 min,取细胞沉淀涂片,Wright 染色,细胞分类计数;上清液储存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。右肺取下后置液氮罐备用。实验时肺组织制成 10% 组织匀浆,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,分装吸取上清,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.6 MPO 和 SOD 活性测定:取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 BALF 上清,测定 SOD 的活性,取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 10% 右肺组织匀浆上清测定 MPO 活性。BALF 上清和右肺组织匀浆上清在 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,取其上清液,用试剂盒测定 MPO 和 SOD 的活性,测定方法参照试剂盒生产商提供的使用说明书。

1.7 细胞因子 mRNA 表达的测定:造模 6 h 或 24 h 后将小鼠麻醉,股动脉放血处死,暴露肺,取肺组织置液氮罐备用。实验时肺组织制成 10% 组织匀浆,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,分装吸取的上清置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。采用半定量 RT-PCR 技术检测。TNF- 和 IL-1 引物序列见表 1。

表 1 TNF-, IL-1 和 β -actin 引物序列

细胞因子	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
TNF- (NM_013693)	正向:AGCCGATGGGTTGTA	266
	反向:ACTTGGGCA GATTGA	
IL-1 (NM_008361)	正向:GCTTCAGGCA GGCA GTAT	475
	反向:ACAAACCGCTTTTCCA TCT	
β -actin (NM_007393)	正向:CTGCCCTGTA TGCCCTCTG	218
	反向:ATGTACCGCACGATTTCC	

1.7.1 肺组织总 RNA 抽提:按照 Trizol 说明书操作提取 cDNA。取 100 mg 肺组织加 1 mL Trizol 于冰浴下制作匀浆,经氯仿处理,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤后,略干燥,溶于 DEPC 100 μ L 处理水。经核酸紫外分析仪检测,根据 A_{260}/A_{280} 值,确定样品中 RNA 纯度和含量。

1.7.2 逆转录步骤:应用 M-MLV 逆转录酶,20 μ L 反应体系。置 PCR 仪中 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min,72 $^{\circ}$ C 变性 10 min。

1.7.3 PCR 条件:TNF- α 和 IL-1 (按以下 35 循环):94 $^{\circ}$ C、3 min,94 $^{\circ}$ C、45 s,51.8 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C、5 min;-actin (按以下 35 循环):94 $^{\circ}$ C、3 min,94 $^{\circ}$ C、45 s,52 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C、45 s,72 $^{\circ}$ C、5 min。PCR 产物检测采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,以 -actin 为阳性对照,经凝胶成像分析系统成像、条带密度扫描,以目的条带与参比基因条带积分吸光度的比值进行半定量分析。

1.8 TNF- α 蛋白水平的测定:造模 6 h 后将小鼠麻醉,股动脉放血处死,打开胸腔,暴露气管行气管插管,结扎右肺,左肺用 PBS 液 1.5 mL 分 3 次进行支气管肺灌注,收集灌洗液,4 $^{\circ}$ C、1 500 r/min 离心 10 min,上清液,储存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。右肺取下后置液氮罐备用。实验时肺组织制成 10% 的组织匀浆,4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 15 min,分装吸取

的上清置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。取 BALF 灌洗液和 10% 肺组织匀浆测定;采用酶联免疫吸附法测定各组小鼠 BALF 和肺组织匀浆中的 TNF- α 蛋白水平。测定步骤按照试剂盒说明书。

1.9 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Sigma Stat 3.0 统计,方法采用 Student-Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 对肺含水量的影响:对照组肺含水量为 (32.95 \pm 3.27)% ($n=8$),模型组为 (39.48 \pm 2.06)% ($n=8$),与对照组比较显著升高 ($P<0.01$);甘草黄酮 3 mg/kg 组为 (36.25 \pm 2.74)% ($n=8$),与模型组比较显著降低 ($P<0.05$);甘草黄酮 10 mg/kg 组为 (36.77 \pm 1.83)% ($P<0.05$, $n=8$);30 mg/kg 组为 (35.06 \pm 4.61)% ($P<0.05$, $n=8$);地塞米松 1 mg/kg 为 (33.47 \pm 4.51)% ($P<0.01$, $n=8$)。结果表明药物可以改善炎症引起的肺水肿程度。

2.2 对肺组织病理改变的影响:气道内滴入 LPS 24 h 后,模型组小鼠气管周围和肺组织间隙可见大量中性粒细胞浸润和红细胞渗出,肺泡间隙结构增宽,有透明膜存在,水肿现象明显。甘草黄酮 10、30 mg/kg 和地塞米松 1 mg/kg 能明显改善这些病理变化,甘草黄酮 1 mg/kg 作用不明显,结果见图 1。

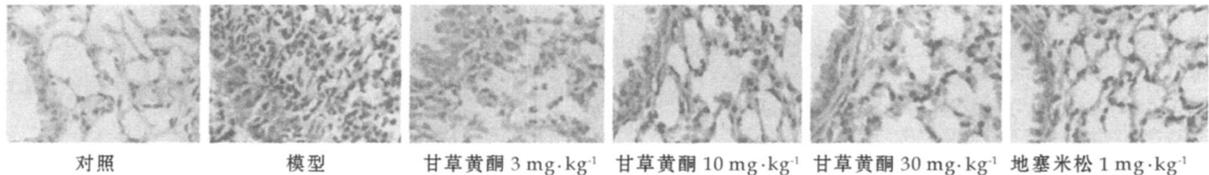


图 1 甘草黄酮对 LPS 诱导肺部炎症小鼠肺组织病理改变的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effects of LF on pathological changes of lung tissues in mice with lung inflammation induced by LPS (HE stain)

2.3 对 BALF 中白细胞总数和中性粒细胞数的影响:小鼠气道内滴入 LPS 24 h 后,模型组 BALF 中的白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数目显著上升,白细胞总数、中性粒细胞与对照组比较分别增加了 8.6 倍和 515 倍 ($P<0.01$)。与模型组比较,甘草黄酮 3、10、30 mg/kg 组和地塞米松 1 mg/kg 组均能显著抑制 BALF 中的白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞数目的增加,结果见表 2。

2.4 对 BALF 中 MPO 和 SOD 活性的影响:小鼠气道内滴入 LPS 24 h 后,模型组 BALF 中的 SOD 活性明显下降,肺组织中的 MPO 活性明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较,甘草黄酮 3、10、30

mg/kg 组和地塞米松 1 mg/kg 组均能显著提高 BALF 中的 SOD 活性,显著减少肺组织中 MPO 活性,结果见表 3。

2.5 对肺组织匀浆中 TNF- α mRNA 和 IL-1 mRNA 表达的影响:小鼠气道内滴入 LPS 6 h 或 24 h 后取肺组织,匀浆后测定 TNF- α mRNA 和 IL-1 mRNA 表达。结果见图 2 和表 4。滴入 LPS 6 h 后小鼠肺组织中 TNF- α mRNA 和 IL-1 mRNA 水平高于造模后 24 h 肺组织中的表达水平。滴入 LPS 6 h 的 TNF- α mRNA 与对照组比较明显升高 ($P<0.01$),24 h 的 TNF- α mRNA 与对照组比较无明显差异 ($P>0.05$)。滴入 LPS 6 h 或 24 h 的 IL-1 mRNA 表达与对照组比较均明显升

表 2 甘草黄酮对 LPS 诱导肺部炎症小鼠 BALF 中炎症细胞聚集的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

Table 2 Effects of LF on inflammatory cell accumulation in BALF of mice with lung inflammation induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	白细胞总数/ (1 × 10 ⁸ · L ⁻¹)	中性粒细胞/ (1 × 10 ⁸ · L ⁻¹)	淋巴细胞/ (1 × 10 ⁸ · L ⁻¹)	巨噬细胞/ (1 × 10 ⁸ · L ⁻¹)
对照	-	2.08 ± 0.64	0.32 ± 0.64	1.06 ± 0.21	0.70 ± 0.61
模型	-	22.04 ± 3.10 ^{##}	16.83 ± 1.99 ^{##}	4.19 ± 2.17 ^{##}	1.02 ± 0.57 ^{##}
甘草黄酮	3	5.94 ± 2.84 ^{***}	2.03 ± 0.73 ^{***}	3.35 ± 2.98	0.56 ± 0.07 ^{**}
	10	5.38 ± 2.60 ^{***}	2.75 ± 1.74 ^{***}	2.34 ± 1.09 [*]	0.29 ± 0.19 ^{**}
	30	3.61 ± 0.28 ^{***}	0.52 ± 0.58 ^{***}	2.82 ± 0.99 [*]	0.27 ± 0.11 ^{**}
地塞米松	1	4.13 ± 0.67 ^{***}	1.00 ± 0.01 ^{***}	2.63 ± 0.53 [*]	0.45 ± 0.46 [*]

与对照组比较: ^{##} P<0.01 ^{###} P<0.001

与模型组比较: ^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001

^{##} P<0.01 ^{###} P<0.001 vs control group

^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001 vs model group

表 3 甘草黄酮对 LPS 诱导肺部炎症小鼠 BALF 中 SOD 活性和肺组织中 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of LF on SOD activity in BALF and MPO activity in lung tissue of mice with lung inflammation induced by LPS ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	SOD/ (U · mL ⁻¹)	MPO/ (U · g ⁻¹)
对照	-	8	3.47 ± 0.39	0.89 ± 0.13
模型	-	8	2.41 ± 0.70 [#]	1.30 ± 0.30 ^{##}
甘草黄酮	3	8	3.88 ± 0.56 ^{**}	0.95 ± 0.10 ^{**}
	10	8	3.77 ± 0.27 ^{**}	0.77 ± 0.33 ^{***}
	30	7	3.80 ± 0.23 ^{**}	0.63 ± 0.11 ^{***}
地塞米松	1	7	3.43 ± 0.51 ^{**}	0.74 ± 0.10 ^{***}

与对照组比较: [#] P<0.05 ^{###} P<0.001

与模型组比较: ^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001

[#] P<0.05 ^{##} P<0.001 vs control group

^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001 vs model group

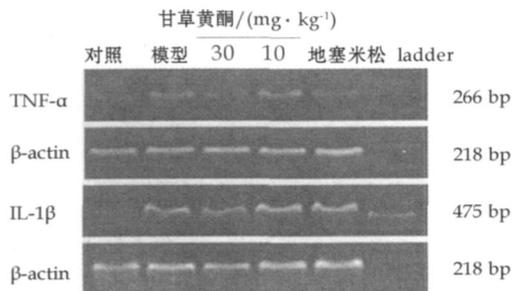


图 2 甘草黄酮对 LPS 诱导肺部炎症小鼠肺组织 TNF-α mRNA 和 IL-1 mRNA 表达的影响 (造模后 6 h)

Fig. 2 Effects of LF on expressions of TNF-α and IL-1 in lung tissue of mice with lung inflammation induced by LPS (6 h after model was made)

高 (P<0.05)。甘草黄酮 30 mg/kg 能明显抑制滴入 LPS 6 h 或 24 h 的 IL-1 mRNA 表达 (P<0.05),也能明显抑制滴入 LPS 6 h 的 TNF-α mRNA 表达 (P<0.01),但对 24 h 的 TNF-α mRNA 表达无作用。地塞米松 1 mg/kg 仅对 6 h 的 TNF-α mRNA 和 IL-1 mRNA 表达有明显作用 (P<0.05),对 24 h 的两个细胞因子表达均无作用。

2.6 对 LPS 气管内滴入 6 h 后的肺组织和 BALF 中 TNF-α 水平抑制作用:滴入 LPS 6 h 后 BALF 和肺组织中的 TNF-α 蛋白水平与对照组比较有明显升高 (P<0.001)。甘草黄酮 10、30 mg/kg 明显抑制 TNF-α 蛋白水平的升高,地塞米松 1 mg/kg 也有明显抑制作用,结果见表 5。

表 4 甘草黄酮对 LPS 诱导肺部炎症小鼠肺组织 TNF-α 和 IL-1 mRNA 表达影响的半定量分析 ($\bar{x} \pm s$, n=5 或 6)

Table 4 Effects of LF on mRNA expressions of TNF-α and IL-1 in lung tissue of mice with lung inflammation induced by LPS ($\bar{x} \pm s$, n=5 or 6)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	TNF-α / -actin		IL-1 / -actin	
		6 h	24 h	6 h	24 h
对照	-	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.40 ± 0.19	0.36 ± 0.20
模型	-	0.31 ± 0.02 ^{##}	0.24 ± 0.03	0.78 ± 0.28 [#]	0.54 ± 0.21 ^{##}
甘草黄酮	10	0.39 ± 0.10	0.24 ± 0.08	0.79 ± 0.15	0.60 ± 0.16
	30	0.24 ± 0.04 ^{**}	0.23 ± 0.03	0.45 ± 0.06 [*]	0.30 ± 0.08 [*]
地塞米松	1	0.24 ± 0.05 [*]	0.28 ± 0.04	0.57 ± 0.19 [*]	0.56 ± 0.18

与对照组比较: [#] P<0.05 ^{##} P<0.01

与模型组比较: ^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01

[#] P<0.05 ^{##} P<0.01 vs control group

^{*} P<0.05 ^{**} P<0.01 vs model group

表 5 甘草黄酮造模 6 h 后小鼠肺组织和 BALF 中 TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of LF on TNF-α level in lung tissue or BALF in mice induced by LPS after 6 h ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	动物/ 只	TNF-α	
			肺组织/(pg · mg ⁻¹)	BALF/(pg · mL ⁻¹)
对照	-	7	3.628 8 ± 0.270 4	13.02 ± 2.56
模型	-	8	14.617 1 ± 2.377 5 ^{##}	405.92 ± 43.75 ^{##}
甘草黄酮	10	7	7.630 4 ± 4.255 2 ^{**}	251.47 ± 121.43 ^{**}
	30	8	6.761 1 ± 3.2531 ^{**}	249.50 ± 82.91 ^{***}
地塞米松	1	7	6.903 4 ± 2.339 3 ^{**}	198.81 ± 76.69 ^{***}

与对照组比较: ^{##} P<0.001

与模型组比较: ^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001

^{##} P<0.001 vs control group

^{**} P<0.01 ^{***} P<0.001 vs model group

3 讨论

小鼠气管内直接滴入 LPS 可诱导免疫细胞诱导的炎症反应,引起一系列的前炎因子释放,最终导

致肺部急性炎症反应^[3]。本研究应用 LPS 气管内直接滴入法诱导小鼠肺部炎症反应,结果显示滴入 LPS (4 mg/kg) 24 h 后 BALF 中的白细胞总数和中性粒细胞数目明显增加;肺水肿明显,表现为含水量增加,病理检查肺组织间隙水肿现象明显;BALF 中的 SOD 活性下降,肺组织中的 MPO 活性增高,IL-1 mRNA 表达水平上升,但 TNF- α mRNA 表达变化不明显。相反,LPS 滴入 6 h 后 BALF 中的白细胞总数和中性粒细胞数目和肺干/湿质量指数变化不明显(数据未列出),而 TNF- α mRNA 和蛋白表达则明显增高。提示在 LPS 气道内滴入后首先诱导 TNF- α 上升,这与 Remick 等报道^[4]的结果一致。有些报道显示 LPS 气道内滴入后或静脉注射后诱导 TNF- α 快速上升,肺灌洗液或血液中的 TNF- α mRNA 表达在 0.5~2 h 达到高峰^[5]。LPS 首先激活单核吞噬细胞,导致不同的细胞因子和趋化因子释放,其中包括 TNF- α ,TNF- α 在 LPS 诱导的炎症反应起着重要的作用,可诱导中性粒细胞黏着于内皮细胞,促进中性粒细胞的移动和渗入肺组织,而中性粒细胞活化后释放活性氧代谢产物和蛋白酶,损害靶细胞和靶器官^[6]。IL-1 晚于 TNF- α 表达和释放。IL-1 与 TNF- α 一样,也是急性肺损伤病理过程中的一个主要前炎因子,单独应用也可以诱导急性肺损伤,IL-1 诱导的急性肺损伤主要表现为血管渗透性的增强和形成肺水肿,其诱导机制与黏附分子 α 5 β 1 整联蛋白 (α 5 β 1 integrin) 和转移生长因子- β (TGF- β) 有关,抑制 α 5 β 1 integrin 和/或 TGF- β 可减轻 IL-1 诱导的急性肺损伤^[7]。IL-1 受体阻断剂可阻断急性肺损伤病人肺水肿液体诱导的肺泡上皮细胞的修复作用,提示在急性肺损伤后 IL-1 有修复损伤肺泡上皮细胞的作用^[8]。此外,TNF- α 与 IL-1 也都能通过刺激 NF- κ B 信号传导途径放大炎症介质对靶细胞的作用。

本研究的结果证明甘草黄酮 3、10、30 mg/kg 呈剂量依赖性抑制气道内滴入 LPS 诱导炎症细胞在支气管肺组织中的聚集反应,表现为 BALF 中的白细胞总数、中性粒细胞和巨噬细胞聚集,高剂量的作用强度与阳性对照药地塞米松 1 mg/kg 相似,表明甘草黄酮对 LPS 诱导的小鼠肺部急性炎症有很强的保护作用。地塞米松 10 mg/kg 单次大剂量气道内直接滴入给药可显著地抑制内毒素 LPS 诱导的急性肺部炎症反应^[9],而本实验采用小剂量多次 ig 给药同样取得明显的抗炎作用。甘草黄酮也呈剂量依赖性抑制 LPS 诱导的肺组织 MPO 活性升

高;甘草黄酮 3 mg/kg 即能非常显著地增加 BALF 中 SOD 活性,剂量增加到 10、30 mg/kg 并没有继续增加 SOD 活性,没有显示明显的量效关系。MPO 由中性粒细胞释放,有很强的氧化作用,氧化反应也是急性肺损伤病理过程中一个重要环节^[10]。SOD 是抗氧化防御体系中重要的金属酶类,能够清除超氧阴离子,保护细胞免疫损伤,细胞外 SOD 具有抗氧化作用^[11]。体外研究证明,甘草总黄酮对氧自由基的羟自由基有清除和抑制作用,且作用强于维生素 E 和甘露醇^[12]。但整体试验是否有抗氧化作用未见报道,本研究结果表明甘草黄酮能下调 MPO 活性,上调 SOD 活性,对氧化/抗氧化反应有调节作用。甘草黄酮能明显抑制 TNF- α 、IL-1 mRNA 和 TNF- α 蛋白表达,这与其抑制中性粒细胞的肺内聚集有密切关系。中性粒细胞在急性肺损伤中是一个主要效应细胞^[13],中性粒细胞释放许多化学介质和细胞因子以及蛋白酶,可增加肺毛细血管的通透性,导致肺水肿。甘草黄酮在抑制 BALF 和肺组织中的中性粒细胞方面表现出很强的作用,因此,在病理组织检查中可见甘草黄酮对炎症细胞浸润、出血、肺泡结构破坏和水肿现象均有明显的改善作用。

本研究首次发现甘草黄酮对 LPS 气管内滴入诱导的肺部炎症反应有明显的保护作用,其抗炎作用可能与抑制肺组织 TNF- α mRNA、IL-1 mRNA 和 TNF- α 蛋白表达水平,调节氧化/抗氧化反应有关。

参考文献:

- [1] 季宇彬,姜薇,范玉玲,等.甘草黄酮的研究进展[J].中草药,2004,35(9):S5-S6.
- [2] 朱一亮,谢强敏,陈季强,等.甘草黄酮对辣椒素诱导的豚鼠咳嗽反射的抑制作用[J].中草药,2006,37(7):1048-1051.
- [3] Faffe D S, Seidl V R, Chagas P S, et al. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory injury in mice [J]. *Eur Respir J*, 2000, 15(1): 85-91.
- [4] Remick D G, Strieter R M, Eskandari M K, et al. Role of tumor necrosis factor- α in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations [J]. *Am J Pathol*, 1990, 136(1): 49-60.
- [5] Remick D G, Strieter R M, Lynch J P, et al. *In vivo* dynamics of murine tumor necrosis factor- α gene expression. Kinetics of dexamethasone-induced suppression [J]. *Lab Invest*, 1989, 60(6): 766-771.
- [6] Matthay M A, Zimmerman G A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(4): 319-327.
- [7] Ganter M T, Roux J, Miyazawa B, et al. Interleukin-1 causes acute lung injury via α 5 β 1 and α 6 β 1 integrin-dependent mechanisms [J]. *Circ Res*, 2008, 102(7): 804-812.
- [8] Geiser T, Atabai K, Jarreau P H, et al. Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments *in vitro* alveolar epithelial repair by an IL-1 dependent mechanism [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(6): 1384-

- 1388.
- [9] Rocks D, Lilliehook B, Larsson R, et al. Differential anti-inflammatory and anti-oxidative effects of dexamethasone and N-acetylcysteine in endotoxin-induced lung inflammation [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 122(2): 249-256.
- [10] Guo R F, Ward P A. Role of oxidants in lung injury during sepsis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(11): 1991-2002.
- [11] Salvemini D, Muscoli C, Riley D P, et al. Superoxide dismutase mimetics [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2002, 15(5): 439-447.
- [12] 吴碧华, 杨得本, 龙存国, 等. 甘草总黄酮的体外抗氧化作用 [J]. *中国临床康复*, 2004, 8(36): 8262-8263.
- [13] Moraes T J, Zurawska J H, Downey G P. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury [J]. *Curr Opin Hematol*, 2006, 13(1): 21-27.

苦瓜蛋白酶抑制剂对苦瓜降糖多肽活性的保护作用

付中平, 刘红雨, 鲁 岚, 陈子君, 周吉燕, 王富军*

(上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要:目的 探讨苦瓜蛋白酶抑制剂对苦瓜降糖多肽口服降糖活性的保护作用。方法 单次 iv 四氧嘧啶 80 mg/kg 给药建立糖尿病小鼠模型。以降糖多肽 (20、10、5 mg/kg) iv 给药, 于 0.5、2、4、6、8 h 尾静脉取血测定空腹血糖; 测定在不同降糖多肽与蛋白酶抑制剂配伍剂量下, ig 给药 21 d 后的空腹血糖值; 以降糖作用显著的配伍比例, ig 给药 7、14、21 d 和停止给药 7 d 后测定血糖。结果 降糖多肽于 iv 给药 4 h 后, 高、中、低 3 个剂量均表现出显著降血糖效应 ($P < 0.05, 0.01$); 降糖多肽与抑制剂 (300+300)、(100+100)、(100+50)、(100+25) mg/kg 4 个配伍剂量组 ig 给药 21 d 后表现出显著降血糖效应, 且以后两个剂量组 ig 给药的降血糖作用为更佳, 停药 7 d 后给药组血糖值与模型组无显著差异。结论 苦瓜蛋白酶抑制剂在 ig 给药过程中能够使苦瓜降糖多肽免遭消化系统的蛋白水解酶破坏而起保护作用, 维持其降血糖药效, 该作用与两者间的配伍剂量有关。

关键词: 苦瓜; 降糖多肽; 蛋白酶抑制剂; 糖尿病

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)08-1259-04

Protection of protease inhibitor of *Momordica charantia* on activity of hypoglycemic peptides from *M. charantia*

FU Zhong-ping, LIU Hong-yu, LU Lan, CHEN Zi-jun, ZHOU Ji-yan, WANG Fu-jun

(Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Objective** To study the protection of protease inhibitor of *Momordica charantia* on activity of hypoglycemic peptides from *M. charantia* by ig administration. **Methods** An experimental diabetic mouse model was successfully induced by once iv injection of alloxan at a dose of 80 mg/kg. Diabetic mice were administered with the hypoglycemic peptides (20, 10, and 5 mg/kg) by iv injection and blood glucose level was tested at 0.5, 2, 4, 6, and 8 h. Different ratios of hypoglycemic peptides and protease inhibitor were given to diabetic mice for 21 d and then the blood glucose level was determined. The blood glucose level in the drug administration group, which showed significant hypoglycemic effect after 21 d ig administration, at different time points of 7, 14, and 21 d after ig administration and 7 d after administration withdraw, was measured. **Results** The hypoglycemic peptides showed significant hypoglycemic effect after 4 h iv injection ($P < 0.05$ and 0.01). Four mixtures of hypoglycemic peptides and inhibitors [(300+300), (100+100), (100+50), and (100+25) mg/kg] showed significant hypoglycemic effect after 21 d ig administration ($P < 0.05$ and 0.01), and the hypoglycemic effects of the last two groups are better. The blood glucose level had no statistical difference between the test group and the control group after 7 d administration withdraw. **Conclusion** The protease inhibitors of *M. charantia* could protect the activity of the hypoglycemic peptide during ig administration, which relates to the ratio of hypoglycemic peptide and inhibitors.

Key words: *Momordica charantia* L.; hypoglycemic peptide; protease inhibitor; diabetes

* 收稿日期: 2008-12-22

基金项目: 国家“十一五”科技攻关资助项目 (2006BAI06A16); 上海市科委资助项目 (04DZ19818)

作者简介: 付中平 (1982—), 男, 江西上高县人, 硕士研究生, 主要从事生物活性物质分离纯化与性质研究。

Tel: 15950470592 E-mail: fzping2003@hotmail.com

* 通讯作者 王富军 Tel: (021) 51322515 E-mail: wfj@shutcm.edu.cn