

莲花清瘟胶囊对汽车尾气致小鼠肺组织病理损伤 及炎症因子表达的影响

唐思文*, 张彦芬, 刘克剑, 徐登峰, 王海荣, 李正杰
(河北以岭医药研究院, 河北省络病重点实验室, 石家庄 050035)

[摘要] 目的:观察莲花清瘟胶囊(LHQW)对汽车尾气暴露致小鼠肺组织病理损伤及炎症因子表达的干预作用,探讨莲花清瘟胶囊的作用机制。方法:75只健康SPF级雄性昆明种小鼠随机分为LHQW 2,4,8 g·kg⁻¹剂量组,另设溶媒组、模型组,采用汽车尾气染毒柜染毒,同时,每天灌胃给药1次,连续14 d,末次染毒24 h后取肝素抗凝血,流式细胞仪检测白介素-4(IL-4),白介素-6(IL-6)的阳性表达率,取血清检测白介素-12(IL-12)含量,取肺组织苏木精-伊红(HE)染色观察病理改变,Western blot和实时定量PCR法分别检测肺组织里肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白介素-1 β (IL-1 β),IL-4,IL-6,IL-12,IL-13的蛋白及其mRNA表达。结果:HE染色后光镜下,与溶媒组比较,模型组可见支气管上皮肿胀,上皮细胞增生、坏死、脱落,肺泡内可见出血及渗出,血管周围可见水肿;与模型组比较,LHQW 4,8 g·kg⁻¹组小鼠肺组织病理损伤明显减轻;LHQW 2,4,8 g·kg⁻¹组血中IL-6阳性表达率分别为20.1%,17.6%,11.4%,远低于模型组的32.9%;与溶媒组比较,模型组肺组织里TNF- α ,IL-1 β ,IL-4,IL-6,IL-12,IL-13蛋白和mRNA的表达均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,LHQW 2,4,8 g·kg⁻¹组肺组织中的TNF- α ,IL-1 β ,IL-4,IL-6,IL-12,IL-13蛋白和mRNA均有不同程度的降低。结论:莲花清瘟胶囊通过降低血液里炎症因子的含量,降低肺组织炎症因子的蛋白表达和mRNA的表达,从而改善汽车尾气造成肺组织的病理损伤。

[关键词] 莲花清瘟; 汽车尾气; 病理损伤; 炎症因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0139-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130139

Effects of Lianhua Qingwen Capsule on Lung Tissue Injury and Expression of Inflammatory Cytokines in Mice Exposed to Automobile Exhaust TANG Si-wen*, ZHANG Yan-fen, LIU Ke-jian, XU Deng-feng, WANG Hai-rong, LI Zheng-jie (Hebei Yiling Medicine Institute, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects and mechanism of Lianhua Qingwen (LHQW) capsule on lung tissue injury and expression of inflammatory cytokines in mice exposed to automobile exhaust. **Method:** Seventy-five healthy SPF male KM mice were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, LHQW 2, 4, 8 g·kg⁻¹ groups, and exposed to automobile exhaust in homemade cabinet in a noncontinuous way. The experimental animals were euthanatized 24 h later from the last exposure. The blood was used to detect the positive expression ratio of interleukin (IL)-4, IL-6 with flow cytometry. The serum of other animals was adopted to detect the content of IL-12 with ELISA. The pathological changes in lung tissue were determined with hematoxylin and eosin (HE) staining. Western-blot and real-time quantitative PCR were used to analyze the protein and mRNA expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 and IL-13 in lung tissue. **Result:** The visible bronchial epithelium swelling, epithelial cell proliferation, necrosis, alveolar hemorrhage and exudation, perivascular edema could be seen in model group, the injury of lung tissue in LHQW 4, 8 g·kg⁻¹ group was significantly reduced. The positive expression ratio of IL-6 was 20.1%, 17.6%, 11.4% in mice blood of LHQW 2, 4, 8 g·kg⁻¹ group respectively, obviously lower than 32.9% in model group. Compared with normal group, the protein and mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 were

[收稿日期] 20141104(015)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2014227)

[通讯作者] *唐思文, 硕士, 工程师, 从事心血管药理研究与开发, Tel: 0311-85901715, E-mail: tangsiwen@yiling.cn

significantly increased in the lung tissue of model group, and LHQW at the dose of 2, 4, 8 g·kg⁻¹ could inhibit the expression at different extent. **Conclusion:** LHQW capsule could reduce the lung damage in mice exposed to automobile exhaust through reducing the content of inflammatory cytokines in the blood and lung tissues.

[**Key words**] Lianhua Qingwen capsule; automobile exhaust; tissue injury; inflammatory cytokines

近几十年来,我国城市汽车数量急剧增长,汽车尾气污染日益严重,已经成为我国城市大气污染的主要来源^[1]。研究表明,汽车尾气中的颗粒物是大气动力学直径小于 2.5 μm 的细颗粒物(fine particulate matter, PM_{2.5})的一个主要来源^[2],汽车尾气中的细颗粒物和有害气体不仅对人体的心血管系统、神经系统、免疫功能和生殖功能等造成一定的危害,还可损害人体呼吸系统^[3]。莲花清瘟胶囊是由银翘散与麻杏石甘汤组合而成的中药复方制剂,已有研究表明,莲花清瘟胶囊在控制肺部感染方面具有良好的效果^[4],但对其作用机制研究较少,本实验采用反复多次染毒的方式,观察莲花清瘟胶囊对汽车尾气暴露致小鼠肺组织病理损伤及炎症因子表达的干预作用,探索莲花清瘟胶囊的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级雄性昆明种小鼠 75 只,体重 18~22 g,北京大学医学部实验动物科学部,合格证号 SCXK(京)2011-0012。

1.2 药品与试剂 莲花清瘟胶囊(LHQW,石家庄以岭药业股份有限公司,批号 121113),白介素 12(interleukin-12, IL-12)试剂盒(eBioscience,批号 80417014),肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白介素 1β(interleukin-1β, IL-1β)(Cell Signaling Technology),白介素 4(IL-4), IL-12, IL-13(Santa Cruz 提供), IL-6, Mouse anti GAPDH(Proteintech 提供)。

1.3 仪器 XL 型流式细胞仪(Beckman Coulter), ABI 7300 型 Real-Time PCR System(美国 ABI 公司),桑塔纳 3000 型机动车(桑塔纳,排量 1.8 L)。

2 方法

2.1 模型与给药 动物随机分为 5 组,即溶媒组,模型组, LHQW 低、中、高剂量组(分别给予 2, 4, 8 g·kg⁻¹),每组 15 只,连续 ig 给药 14 d;参考文献[5]自制汽车尾气染毒柜(90 cm×55 cm×40 cm)进行染毒,染毒柜分上下两层,上端无顶盖,下层侧壁左右各有一个通气口,一边通汽车尾气,一边通入新鲜空气,染毒时染毒柜下层放入冰块,以控制温度在常温状态,将机动车排气管连接到染毒柜一侧通气口上,燃烧 93 号汽油,将尾气排入染毒柜,由对侧

通气口同时通入新鲜空气,20 min 后温度计测定染毒柜内部温度,以南通华鹏生产的 HPC518 便携式汽车尾气分析仪检测一氧化碳、碳氢化合物等气体浓度,稳定后将动物放入染毒柜进行染毒,给药第 1 天开始,除了溶媒组外的其余动物分批放入染毒柜染毒,连续 14 d,于末次染毒 24 h 后取材进行指标检测。

2.2 动物处置及标本采集 每组取 9 只小鼠血清按 ELISA 说明书检测 IL-12 含量;每组取 3 只小鼠肺脏,气管注入中性福尔马林,固定后常规切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下进行病理检查。

2.3 血液中 IL-4, IL-6 的表达 流式细胞仪检测^[6],每组取 6 只小鼠全血各 1 mL,肝素抗凝,分离单个核细胞,加入(12-)十四酸佛波酯(-13-)乙酸盐和离子霉素刺激淋巴细胞,采用流式细胞仪检测细胞,Exp32 软件获取分析细胞,每个检测获取 10 000 个细胞,采用前向角和侧向角散射光散点图设门区分淋巴细胞,分析胞内 IL-4, IL-6 的表达。

2.4 检测肺组织中炎症因子蛋白表达 每组取 3 只小鼠肺脏,加裂解液提取蛋白,加 TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 抗体,化学发光法显色, Labworks 软件下对条带进行吸光度积分扫描,以 GAPDH 作为内参照,用目的基因的胶片灰度值/GAPDH 灰度值为目的蛋白的相对表达量,进行统计分析。

2.5 检测炎症因子基因表达 每组取 3 只小鼠肺脏,常规方法提取 RNA,鉴定,按 TNF-α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,以 GAPDH 为内参照基因,与对照组相比,得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值),将 RQ 值用于统计分析。各指标引物见表 1。

2.6 统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行 ANOVA 分析处理和 Dunnett 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

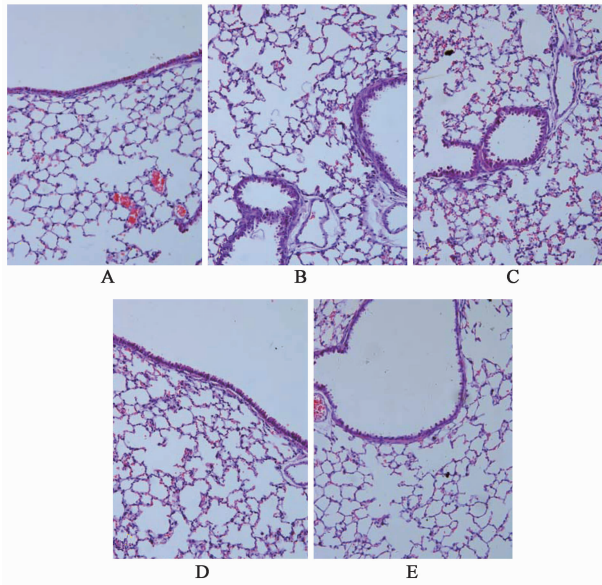
3.1 肺组织 HE 染色 光镜下,模型组支气管上皮肿胀,上皮细胞增生、坏死、脱落,肺泡内可见出血及渗出,血管周围可见水肿,肺泡及间质可见以巨噬细胞为主的炎细胞增多;LHQW 2 g·kg⁻¹ 肺组织病理变

表 1 PCR 检测指标引物

Table 1 Primers of testing items

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增片段长度/bp
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTG	GCTTCACCACCTTCTTGATG	121
TNF- α	GAATCGGCAGAAGAGGCACT	AGAAGAGGCTGAGACATAGGC	79
IL1- β	AGCCCATCTCTGTGACTCA	TTTGTGTTTCATCTCGGAGCC	99
IL-4	AACGAGGTCACAGGAGAAGG	TTGGAAGCCCTACAGACGA	107
IL-6	TACCACTCCCAACAGACCTG	TCTCATTTCCACGATTTCCACG	85
IL-12	CGTTTATGTTGTAGAGGTGGACTG	TGTCATCTTCTTCAGGCCTG	86
IL-13	GTTTCTGTGTAGCCCTGGAT	TGGGTCTGTAGATGGCAT	64

化与模型组无明显差异, LHQW 4, 8 g·kg⁻¹肺组织明显改善, 肺泡内仅可见少量出血。见图 1。



A. 溶媒组; B. 模型组; C. LHQW 2 g·kg⁻¹组; D. LHQW 4 g·kg⁻¹组; E. LHQW 8 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 连花清瘟胶囊(LHQW)对汽车尾气暴露致小鼠肺组织病理损伤的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effects of Lianhua Qingwen (LHQW) capsule on lung tissue pathological changes in mouse exposed to automobile exhaust (HE, ×200)

3.2 血液里的 IL-4, IL-6 表达和 IL-12 的含量 与溶媒组比较, 模型 IL-4, IL-6 阳性表达率均明显升高

($P < 0.05, P < 0.01$), 与模型组比较, LHQW 8 g·kg⁻¹可明显降低 IL-4 的阳性表达率($P < 0.05$), LHQW 2, 4, 8 g·kg⁻¹均可显著降低 IL-6 阳性表达率($P < 0.01$), 同时 4, 8 g·kg⁻¹可不同程度的降低血清中 IL-12 含量($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 LHQW 对汽车尾气造成肺损伤小鼠血液中炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effects of LHQW on inflammatory factor in blood in mouse exposed to automobile exhaust ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-4 /%	IL-6 /%	IL-12 /ng·L ⁻¹
溶媒	-	16.6 ± 4.1	20.8 ± 6.0	868.0 ± 313.5
模型	-	22.3 ± 2.9 ¹⁾	32.9 ± 7.3 ²⁾	1 045.4 ± 194.1
LHQW	2	19.8 ± 5.4	20.1 ± 6.5 ⁴⁾	897.2 ± 279.2
	4	18.4 ± 2.2	17.6 ± 5.7 ⁴⁾	794.8 ± 272.7 ³⁾
	8	16.8 ± 3.2 ³⁾	11.4 ± 3.5 ⁴⁾	694.9 ± 234.1 ⁴⁾

注: 与溶媒组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

3.3 肺组织里炎症因子的蛋白表达 与溶媒比较, 模型组 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 的表达量都显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, LHQW 2, 4, 8 g·kg⁻¹可不同程度降低 TNF- α 的蛋白表达量($P < 0.05, P < 0.01$), LHQW 4, 8 g·kg⁻¹可不同程度的降低 IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12 的蛋白表达量($P < 0.01, P < 0.05$), 见表 3, 图 2。

表 3 LHQW 对汽车尾气造成肺损伤小鼠肺组织中炎症因子蛋白的相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of LHQW on protein expression of inflammatory factor of lung tissue in mouse exposed to automobile exhaust ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α /GAPDH	IL-1 β /GAPDH	IL-4 /GAPDH	IL-6 /GAPDH	IL-12 /GAPDH	IL-13 /GAPDH
溶媒	-	0.23 ± 0.05	0.41 ± 0.10	0.32 ± 0.10	0.37 ± 0.06	0.48 ± 0.06	0.42 ± 0.10
模型	-	1.13 ± 0.33 ²⁾	1.06 ± 0.16 ²⁾	1.10 ± 0.18 ²⁾	1.17 ± 0.23 ²⁾	1.24 ± 0.32 ²⁾	1.40 ± 0.27 ²⁾
LHQW	2	0.64 ± 0.02 ³⁾	0.96 ± 0.18	0.93 ± 0.04	0.96 ± 0.03	1.00 ± 0.34	1.29 ± 0.52
	4	0.50 ± 0.06 ⁴⁾	0.66 ± 0.14 ³⁾	0.77 ± 0.09 ³⁾	0.77 ± 0.08 ³⁾	0.70 ± 0.12 ³⁾	0.96 ± 0.29
	8	0.37 ± 0.08 ⁴⁾	0.55 ± 0.09 ⁴⁾	0.54 ± 0.13 ⁴⁾	0.61 ± 0.11 ⁴⁾	0.62 ± 0.15 ³⁾	0.73 ± 0.08

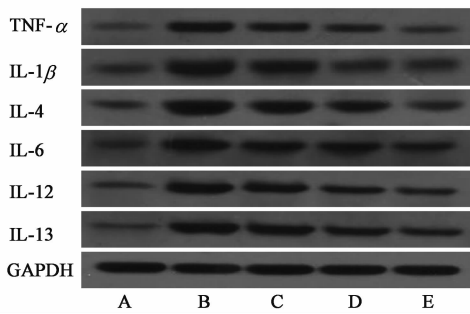


图 2 对肺组织里炎症因子蛋白的相对表达量的影响
Fig. 2 Effect of LHQW on protein expression of inflammatory factor of lung tissue in mouse exposed to automobile exhaust

表 4 LHQW 对汽车尾气造成肺损伤小鼠肺组织中炎症因子 mRNA 的相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	TNF- α /GAPDH	IL-1 β /GAPDH	IL-4 /GAPDH	IL-6 /GAPDH	IL-12 /GAPDH	IL-13 /GAPDH
溶媒	-	1.03 \pm 0.30	1.08 \pm 0.31	1.05 \pm 0.25	1.12 \pm 0.18	1.34 \pm 0.27	1.30 \pm 0.30
模型	-	3.25 \pm 0.36 ²⁾	3.26 \pm 0.56 ²⁾	4.39 \pm 0.82 ²⁾	4.87 \pm 0.66 ²⁾	5.12 \pm 0.66 ²⁾	3.54 \pm 0.82 ²⁾
LHQW	2	2.43 \pm 0.53 ⁴⁾	2.40 \pm 0.74 ³⁾	2.12 \pm 0.55 ⁴⁾	3.23 \pm 0.74 ⁴⁾	3.13 \pm 0.61 ⁴⁾	3.12 \pm 0.65
	4	2.39 \pm 0.27 ⁴⁾	2.55 \pm 0.35	1.67 \pm 0.30 ⁴⁾	2.48 \pm 0.56 ⁴⁾	1.81 \pm 0.94 ⁴⁾	1.99 \pm 0.51 ⁴⁾
	8	1.42 \pm 0.18 ⁴⁾	1.65 \pm 0.33 ⁴⁾	2.34 \pm 0.60 ⁴⁾	1.74 \pm 0.30 ⁴⁾	1.69 \pm 0.31 ⁴⁾	1.91 \pm 0.22 ⁴⁾

4 讨论

汽车尾气的成分含有多孔状的颗粒物,颗粒物进入肺内后,肺泡巨噬细胞将整个颗粒物吞噬,在颗粒物的刺激下肺泡巨噬细胞会释放出系列细胞因子和前炎症因子,而前炎症因子及细胞因子可以使各种炎症细胞聚集,从而导致炎症发生^[7-8],肺泡内大量炎细胞浸润,在炎细胞的参与下,各种细胞因子和炎性介质大量释放,引起肺组织损伤^[9]。因此,本实验拟采用汽车尾气暴露复制小鼠肺部炎症模型,本研究结果显示,小鼠暴露于汽车尾气后,血液里 IL-4, IL-6, IL-12 等炎性因子阳性表达增加;肺组织里 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等炎症因子的蛋白表达升高,肺组织里 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等炎症因子的 mRNA 表达也升高,不管是从全身循环到局部肺组织,还是从蛋白水平到 mRNA 水平,均可发现汽车尾气暴露后,肺部有炎症发生;HE 染色可观察到模型组小鼠肺组织可见局灶性支气管炎及局灶性巨噬细胞聚集;有研究^[10]证明 BALB/c 小鼠暴露于城市环境的颗粒物之后也能引起肺泡巨噬细胞聚集;可见多个细胞炎症因子表达增高参与了汽车尾气导致动物的肺部损伤。

蒙菁菁等^[11]研究发现,烟雾暴露可导致气道炎症模型大鼠的 IL-6 分泌增多,大量分泌的 IL-6 则可

3.4 实时定量 PCR 法检测肺组织里炎症因子 mRNA 的表达 与溶媒比较,模型组 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13 的表达量都显著升高 ($P < 0.01$),提示汽车尾气暴露后动物肺部具有大量炎症因子产生;给予药物干预后, LHQW 2, 4, 8 $g \cdot kg^{-1}$ 也可显著降低 TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12 的 mRNA 的表达 ($P < 0.01$), LHQW 2, 8 $g \cdot kg^{-1}$ 可不同程度降低 IL-1 β 的 mRNA 的表达 ($P < 0.01, P < 0.05$), LHQW 4, 8 $g \cdot kg^{-1}$ 也可显著降低 IL-13 的 mRNA 的表达 ($P < 0.01$);在 mRNA 水平来看, LHQW 对汽车尾气暴露导致的肺部炎症也有抑制作用。见表 4。

直接加重炎症反应, IL-12 可诱导粒-巨噬细胞集落刺激因子的分泌,从而刺激炎症反应的发生。本研究结果显示,汽车尾气暴露小鼠后,血液里 IL-6, IL-12 等炎症因子含量升高,肺组织的蛋白和 mRNA 表达也显著升高,给予连花清瘟胶囊后,血液里 IL-6 的阳性表达率显著降低,肺组织里 IL-6 的蛋白和 mRNA 表达也显著降低,此外,给予连花清瘟胶囊后,肺组织里 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-12, IL-13 等炎性因子的蛋白和 mRNA 表达也明显降低,提示连花清瘟胶囊对汽车尾气暴露的炎症因子升高有抑制作用。

连花清瘟胶囊由连翘、金银花、炙麻黄、大黄等中药组成,从中药组方来看符合中医治疗炎症性疾病的特点,既往研究发现它除了具有明确的抗病毒作用,对急性肺部感染效果显著,研究发现处方中麻黄、甘草能抑制大鼠肺组织 TNF- α , IL-1 β 含量升高,具有较强抗炎作用^[12], 大黄游离蒽醌也可抑制 TNF- α 等炎性介质的释放,减轻机体炎症反应^[13];此外,还有大量文献报道连花清瘟胶囊方中中药可以降低炎症模型动物体内炎症因子的含量,提示连花清瘟胶囊从组方的角度来看具备抗炎的物质基础。本研究结果显示,连花清瘟胶囊通过降低血液里炎性因子的含量,降低肺部炎性因子的蛋白表达

和 mRNA 的表达,从而改善汽车尾气造成肺组织的病理损伤,推测莲花清瘟胶囊对炎症引起肺损伤的抑制作用是其对抗汽车尾气损伤的重要机制。

[参考文献]

[1] 邓芙蓉,郭新彪.我国机动车尾气污染及其健康影响研究进展[J].环境与健康杂志,2008,25(2):174-176.

[2] 杨新兴,冯丽华,尉鹏.汽车尾气污染及其危害[J].前沿科学(季刊),2012,6(23):10-21.

[3] Chen B, Hong C H, Kan H. Exposures and health outcomes from outdoor air pollutants in China [J]. Toxicology, 2004, 198(1/3):291-300.

[4] 王卫红.莲花清瘟胶囊在100例上呼吸道感染伴肺炎患者中应用疗效观察[J].泰山医学院学报,2013,34(2):128-130.

[5] 朱立海.汽车尾气对小鼠血清 SOD 及 MDA 的影响[J].包头医学院学报,2005,21(3):229-231.

[6] 王超,邢邯英,王杏,等.通心络胶囊对糖尿病视网膜病变 KK/Upj-Ay 小鼠血液及视网膜炎症因子表达的影响[J].中国全科医学,2014,17(27):3264-3268.

[7] Finkelstein J N, Johnston C, Barrett T, et al. Particulate-cell interactions and pulmonary cytokine

expression [J]. Environ Health Perspect, 1997, 105 (suppl5):1179-1182.

[8] Driscoll K E, Carter J M, Hassenbein D G, et al. Cytokines and particle-induced inflammatory cell Recruitment [J]. Environ Health Perspect, 1997, 105 (suppl5):1159-1164.

[9] 郭海,吉福志,魏凯峰,等.养肺活血方对平阳霉素所致肺纤维化大鼠肺部炎症的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):179-184.

[10] Mauad T, Rivero D H, de Oliveira R C, et al. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178(7):721-728.

[11] 蒙菁菁,钟小宁,白晶,等.烟草烟雾暴露大鼠中 CD₄⁺ 白细胞介素-17⁺ T 细胞与 CD₄⁺ Foxp3⁺ 调节性 T 细胞的变化及意义 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35 (1):55-60.

[12] 赵杰,余林中,方芳,等.麻黄-甘草药对的抗炎作用及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (15): 163-166.

[13] 张燕,王平,杨永茂,等.大黄游离蒽醌对犬重症急性胰腺炎早期肠损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (5): 172-176.

[责任编辑 聂淑琴]