

· 药理 ·

清金化痰汤通过 p38MAPK/NF- κ B 信号通路改善大鼠急性气道炎症的作用和机制

宋洪娟, 黄正桥, 黄笑, 王飞*
(成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] 目的:探讨清金化痰汤治疗急性气道炎症模型大鼠气道炎症性损伤和黏液高分泌的作用和机制。方法:脂多糖(LPS)诱导建立急性气道炎症大鼠模型,随机分为空白组、模型组、地塞米松组、清金化痰汤高、中、低剂量(7.44, 3.72, 1.86 g·kg⁻¹)组,各组大鼠自给药开始计时,第4,7天分批处死。采集肺泡灌洗液(BALF),气管及肺组织,观察各组大鼠BALF中白细胞及细胞分类计数;酶联免疫吸附法(ELISA)检测BALF中白细胞介素(IL)-1 β , IL-8, 肿瘤坏死因子(TNF)- α 以及黏蛋白(MUC5AC);光镜下观察气管和肺组织病理学改变;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肺组织p38丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, p38MAPK),核转录因子- κ B(NF- κ B)抑制蛋白(I κ B α),NF- κ B p65蛋白表达水平。结果:清金化痰汤能抑制BALF中白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞升高,减轻气管和肺组织的病理学炎症积分,减少细胞因子IL-1 β , IL-8, TNF- α 水平及黏蛋白MUC5AC的表达,下调肺组织p38MAPK, NF- κ B p65蛋白表达,增加I κ B α 蛋白表达水平。结论:清金化痰汤具有抑制炎症细胞浸润,减少细胞因子和黏蛋白MUC5AC的表达,抑制气道炎症反应的作用;清金化痰汤通过调控肺组织p38MAPK/NF- κ B信号通路,抑制气道黏蛋白分泌和细胞因子的释放,从而改善气道黏液高分泌状态及其炎症性损伤。

[关键词] 清金化痰汤;急性气道炎症;p38丝裂原活化蛋白激酶;核转录因子- κ B p65

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)13-0104-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1129.070.html>

[网络出版时间] 2017-04-20 11:29

Effect and Mechanism of Qingjin Huatan Tang in Improving Acute Airway Inflammation of Rats Through Signaling Pathways of p38MAPK/NF- κ B

SONG Hong-juan, HUANG Zheng-qiao, HUANG Xiao, WANG Fei*
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Qingjin Huatan Tang in treatment of airway injury and mucus hypersecretion in acute airway inflammation model of rats. **Method:** The model of acute airway inflammation in rats was induced by lipopolysaccharide (LPS), and randomly divided into 6 groups, namely blank group, model group, Dexamethasone group, high-dose, medium-dose and low-dose Qingjin Huatan Tang (7.44, 3.72, 1.86 g·kg⁻¹) groups. Each group of rats was put to death in batches on the 4th day and 7th day after administration. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF), trachea and lung tissues were collected to count the number of white blood cells and other types of cells in BALF of each group of rats. Cell factor of interleukin (IL) -1 β , IL-8, tumor necrosis factor (TNF) - α and MUC5AC in BALF were detected with enzyme-linked immunosorbent assay

[收稿日期] 20170104(008)

[基金项目] 四川省教育厅重点项目(15ZA0095)

[第一作者] 宋洪娟,博士,主治医师,从事中医药防治呼吸病与老年病的临床与实验研究, Tel:15982246386, E-mail:390050986@qq.com

[通讯作者] *王飞,博士生导师,主任医师,从事中医药防治呼吸病与老年病的临床与实验研究, Tel:028-88365886, E-mail:282288067@qq.com

(ELISA). Pathological changes of trachea and lung tissues were observed under light microscope. p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) inhibition protein ($I\kappa$ B α), and NF- κ B p65 in lung tissues were determined with Western blot. **Result:** Qingjin Huatan Tang can inhibit the increasing number of leukocyte, neutrophil, and lymphocyte in BALF, relieve pathological inflammation scores of trachea and lung tissues, reduce the level of cell factors IL-1 β , IL-8, TNF- α and the expression of mucin MUC5AC, down-regulate the expressions of p38MAPK and NF- κ B p65, and up-regulate the expression of $I\kappa$ B α in lung tissues. **Conclusion:** Qingjin Huatan Tang has effects in inhibiting infiltration of inflammatory cells and airway inflammatory response, reducing the expressions of cells and mucin MUC5AC, inhibiting inflammatory reaction of airway. Qingjin Huatan Tang can inhibit mucin secretion and release of cytokines by regulating signaling pathways of p38MAPK/NF- κ B in lung tissues, so as to improve the state of mucus hypersecretion and inflammatory injury in airway.

[**Key words**] Qingjin Huatan Tang; acute airway inflammation; p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK); nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65

气道炎症是各种呼吸系统疾病的共同特征,也是其治疗的主要目标^[1],从病变轻微的各种急性感染到致命不可逆的闭塞性细支气管炎,轻者多咳嗽、胸痛、呼吸受影响,重者呼吸困难、缺氧,甚至呼吸衰竭而致死。呼吸系统疾病在城市的死亡率中占第 3 位,在农村占首位。随着大气污染、吸烟、人口老龄化及其他因素,慢性阻塞性肺病(简称慢阻肺,包括慢性支气管炎、肺气肿、肺心病)、支气管哮喘、肺癌、肺部弥散性间质纤维化,以及肺部感染等疾病的发病率、死亡率有增无减。西医学在控制急性炎症及感染方面有着较好的疗效,但局限于对症处理,患者反复使用抗生素及糖皮质激素类药物,有诸多不良反应。

近年来,在西医治疗基础上运用“清热化痰”法治疗此病的临床研究越来越多,结果显示“清热化痰”法能够提高气道炎症疾病的临床疗效。清金化痰汤出自叶文龄撰《医学统旨》,临床广泛用于急性气道炎症疾病(痰热阻肺证),已显示出良好疗效,尤其在改善咳嗽咳痰、减少痰量、平喘等方面效果显著^[2],而其作用机制尚不明确。急性气道炎症性反应包括炎症细胞活化、细胞因子高表达、炎症信号通路激活等重要环节,其中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路在炎症参与的气道和肺组织损伤中发挥着关键作用^[3-5],本课题以 p38MAPK/NF- κ B 信号通路探讨清金化痰汤治疗急性气道炎症性疾病的作用和机制。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠,10 ~ 12 周龄,体重(220 \pm 250) g,由成都达硕动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2015-0030。实验动物

的开展取得了成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 ACCDU-2015-116)。

1.2 药物 清金化痰汤由黄芩、栀子、桔梗、麦冬、桑白皮、浙贝母、知母、炒瓜蒌子、橘红、茯苓、桑白皮、甘草组成,饮片由成都吉安康药业有限公司提供,由成都中医药大学中药鉴定教研室张廷模教授鉴定为正品;地塞米松磷酸钠注射液(国药集团容生制药有限公司,批号 150201,5 mg/支)。

1.3 试剂 脂多糖(美国 Sigma 公司,批号 025 m4040v);大鼠黏蛋白 MUC5AC,白细胞介素(IL)-1 β ,IL-8,肿瘤坏死因子(TNF)- α 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号分别为 F16199, F15810, F15880, F16960);p38MAPK 兔多克隆抗体(美国 CST 公司,批号 8690S);核转录因子- κ B (NF- κ B) 抑制蛋白($I\kappa$ B α)兔多克隆抗体(美国 Origene 公司,批号 TA327876S);NF- κ B p65 兔多克隆抗体(武汉 Proteintech 公司,批号 10745-1-AP)。

1.4 仪器 2016 型转轮式切片机(德国 Leica 公司);Wellscan MK 3 型多功能酶标仪,Wellwash 4 MK2 型洗板机(芬兰 Therm 公司);TGL-168 型离心机(上海安亭科学仪器厂);PYX-DHS 型数字显示隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂);XW-80A 型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);DHG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);微量电动组织匀浆器(美国 Kimble 公司);MK200-2 型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司);EPS-600 型电泳仪,VE186 型转移电泳槽(上海天能科技有限公司);ClixChemiScope 系列荧光及化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 造模和分组 健康雄性SD大鼠96只,适应性喂养1周后,随机分为空白组,模型组,清金化痰汤高、中、低剂量组,地塞米松组,每组16只。大鼠腹腔注射20%乌拉坦,麻醉后仰位固定于鼠板。用剪刀和镊子纵向剪开其颈部1~2 cm,分离筋膜、肌肉并暴露气管。进行气管滴注^[6],滴注脂多糖(LPS,200 μg/只,LPS 200 μg溶于100 μL生理盐水),滴注5~6 min。三棱针5.0号丝线缝合皮肤切口后解开固定绳,将大鼠小心翻转30~40 min,使LPS在肺内分布均匀,待其苏醒后放入鼠笼。本课题组在预实验中发现,气道炎症指标在LPS刺激后第2天急剧上升达高峰,因此于造模开始后48 h从6组中每组各取1只大鼠进行肺组织病理学检测,出现肺组织红细胞渗出及大量炎细胞浸润(中性粒细胞为主),说明造模成功。

2.2 药物制备 清金化痰汤按《医学统旨》原方药物剂量:黄芩4.5 g,栀子4.5 g,桔梗6 g,麦冬(去心)3 g,浙贝母3 g,橘红3 g,茯苓3 g,桑白皮3 g,知母3 g,炒瓜蒌子3 g,甘草1.2 g,常规水煎成600 mL,浓缩至含生药2.98 g·mL⁻¹(高剂量),加水稀释2倍后含生药1.49 g·mL⁻¹(中剂量);稀释4倍后含生药0.74 g·mL⁻¹(低剂量),待常温冷却后,至4℃冰箱保存备用。

2.3 给药 造模成功后24 h开始,每日给药1次。按大鼠用药量与人的倍数换算为等效剂量,中剂量相当于人用药量6倍,清金化痰汤高、中、低剂量组分别灌胃清金化痰汤7.44,3.72,1.86 g·kg⁻¹,地塞米松组腹腔注射地塞米松0.001 g·kg⁻¹,空白组、模型组给予相同体积的生理盐水灌胃。

2.4 标本采集与处理 分别于给药后第4,7天行股动脉放血处死大鼠,钝性分离并充分暴露气管、主支气管并插管。用生理盐水4 mL分2次左肺灌洗,收集肺泡灌洗液(BALF),4℃,2 000 r·min⁻¹离心5 min,将上清液置于-20℃保存备用;取沉淀细胞加白细胞稀释液轻轻混匀并取1滴滴入细胞计数板的计数池内,静置2 min后行白细胞计数;余下沉淀细胞涂片,用瑞氏染液染色,冲洗干净,自然干燥后进行白细胞分类计数。剪取靠近中心气道的右下肺组织放在4%多聚甲醛缓冲液中固定、石蜡包埋,切片,行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察病理形态学变化;剪取右上肺置于-80℃液氮中冻存备用。

2.5 白细胞计数与分类 在低倍镜下,计数白细胞数,根据公式算出白细胞总数;在显微镜油镜下每张

涂片计数100个白细胞,并按细胞形态特征进行分类,最后求出各类细胞所占比例。

2.6 炎症评分分级标准 根据炎细胞浸润程度(中性粒细胞为主),出血程度(红细胞漏出),渗出物程度,肺间隔断裂程度分为5级,分别为0级(无),1级(>25%),2级(26%~50%),3级(51%~75%),4级(>75%)。

2.7 BALF细胞因子检测 ELISA法检测细胞因子IL-1β,IL-8,TNF-α,黏蛋白MUC5AC的浓度,严格按照试剂盒说明书操作。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肺组织p38MAPK,IκBα,NF-κB p65蛋白表达 取肺组织,用苯甲基磺酰氟提取蛋白质,用BCA法测定蛋白浓度。余下的蛋白样品行10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转移至PVDF膜上,封闭,加入一抗(1:1 000),4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,10 min/次,转入与辣根过氧化物酶(HRP)耦联的抗体(1:1 000)和与HRP耦联的抗生物素抗体中(1:2 000)1 h,TBST洗膜3次,10 min/次,于ECL化学发光检测试剂反应2 min,取出膜,甩去多余液体,用保鲜膜包好PVDF膜,暗室中用X胶片感光、显影、定影,IMAGE J软件分析相关条带灰度值。

2.9 统计方法 采用SPSS 17.0统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,组间差异比较采用one-way ANOVA方差分析,两两比较采用Student-Newman-Keuls test(SNK)检验方法;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 清金化痰汤对BALF中白细胞总数和细胞分类的影响 与同时相空白组比较,模型组BALF中白细胞总数,中性粒细胞,淋巴细胞均有明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),与同时相模型组比较,清金化痰汤高、中剂量组和地塞米松组白细胞总数、中性粒细胞和淋巴细胞均降低,巨噬细胞升高($P < 0.05, P < 0.01$),以高剂量组第7天降低明显。见表1。

3.2 清金化痰汤对急性气道炎症气管和肺组织病理改变的影响 空白组大鼠支气管黏膜上假复层纤毛柱状上皮排列整齐,肺泡结构清晰完整,肺间隔未见增厚,肺泡腔未见炎性细胞浸润,肺间质无水肿。模型组可见气管管壁、肺血管及部分肺泡腔内有炎性细胞浸润(以中性粒细胞、淋巴细胞为主)和大量红细胞渗出,气管腔内可见上皮细胞脱落,肺泡间隔明显增厚,肺间质充血、水肿。给予清金化痰汤后炎症程度减轻,其中以第7天高剂量组最

表 1 清金化痰汤对 BALF 中白细胞总数和细胞分类的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Qingjin Huatan Tang on total number of leukocytes and cell classification in BALF ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	时间/d	白细胞总数/×10 ⁷ 个/L	中性粒细胞/%	淋巴细胞/%	巨噬细胞/%
空白	-	8	4	1.76 ± 1.09	1.72 ± 1.06	6.37 ± 2.65	91.91 ± 4.69
		8	7	1.87 ± 1.01	1.52 ± 1.03	5.83 ± 2.78	92.65 ± 4.51
模型	-	7	4	10.81 ± 3.45 ²⁾	23.33 ± 6.34 ²⁾	9.12 ± 2.34	67.55 ± 8.76 ¹⁾
		6	7	10.15 ± 4.61 ²⁾	22.14 ± 5.12 ²⁾	8.13 ± 2.45	69.73 ± 10.43 ¹⁾
清金化痰汤	7.44	8	4	4.51 ± 2.57 ^{2,4)}	8.78 ± 3.87 ^{2,4)}	4.34 ± 1.67 ³⁾	86.88 ± 3.23 ³⁾
		8	7	2.18 ± 1.23 ⁴⁾	1.89 ± 1.02 ⁴⁾	3.12 ± 1.19 ³⁾	94.99 ± 4.04 ³⁾
	3.72	8	4	5.89 ± 2.17 ^{2,4)}	10.64 ± 3.15 ⁴⁾	5.97 ± 2.04 ³⁾	83.39 ± 3.01 ³⁾
		7	7	3.29 ± 1.35 ^{1,4)}	5.34 ± 1.38 ⁴⁾	4.25 ± 1.27 ³⁾	90.41 ± 3.91 ⁴⁾
	1.86	8	4	7.26 ± 3.14 ²⁾	15.68 ± 3.24	7.31 ± 2.12	77.01 ± 5.64
		7	7	5.19 ± 2.32 ^{2,3)}	9.45 ± 2.18 ³⁾	5.17 ± 1.86 ³⁾	85.38 ± 4.32 ³⁾
地塞米松	0.001	8	4	6.74 ± 2.03 ^{2,3)}	9.17 ± 1.12 ⁴⁾	5.46 ± 2.32 ³⁾	85.37 ± 3.58 ³⁾
		7	7	5.13 ± 2.47 ^{2,3)}	8.96 ± 2.01 ⁴⁾	4.38 ± 1.93 ³⁾	86.66 ± 3.19 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

为明显。经炎症分级统计, LPS 诱导急性气道炎症大鼠各组与同时相空白组比较, 支气管及肺组织炎症积分均升高 ($P < 0.01$); 与同时相模型组比较, 清金化痰汤高、中、低剂量组和地塞米松组病理学炎症积分均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 以清金化痰汤高剂量组第 7 天降低尤为明显。说明清金化痰汤和地塞米松均能明显降低支气管及肺组织炎症积分, 使上皮损害减轻, 炎性细胞浸润减少。见图 1, 表 2。

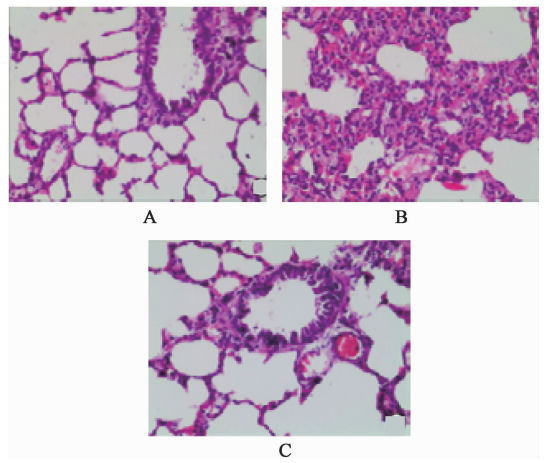
表 2 清金化痰汤对大鼠炎症积分分级水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 2 Effect of Qingjin Huatan Tang on level of inflammation score classification ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4 d	7 d
空白	-	0.500 ± 0.577	0.250 ± 0.500
模型	-	6.000 ± 0.816 ²⁾	6.500 ± 0.577 ²⁾
清金化痰汤	7.44	2.000 ± 0.816 ^{1,4)}	1.500 ± 1.291 ⁴⁾
	3.72	3.250 ± 0.500 ^{2,4)}	2.750 ± 1.893 ^{1,4)}
	1.86	3.250 ± 0.957 ^{2,4)}	3.500 ± 1.732 ^{1,3)}
地塞米松	0.001	4.000 ± 1.414 ^{2,3)}	3.500 ± 1.000 ^{2,4)}

3.3 清金化痰汤对 BALF 中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 水平的影响 与同时相空白组比较, 模型组 BALF 中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 均有明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与同时相模型组比较, 清金化痰汤高、中、低剂量组 (除第 4 天外) 和地塞米松组 (第 4 天) BALF 中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 以高剂量组第 7 天降低明显。见表 3。

3.4 清金化痰汤对 BALF 中黏蛋白 MUC5AC 水平



A. 正常组; B. 模型组; C. 清金化痰汤高剂量组

图 1 清金化痰汤对大鼠肺部炎症病理学的影响 (HE, ×200)

Fig.1 Effect of Qingjin Huatan Tang on pathology of pulmonary inflammation (HE, ×200)

的影响 与同时相空白组比较, 模型组 BALF 中 MUC5AC 的含量均有升高 ($P < 0.05$), 与同时相模型组比较, 清金化痰汤高、中剂量组和地塞米松组 BALF 中 MUC5AC 的含量均降低 ($P < 0.05$), 其中以第 7 天最为明显, 基本接近于空白组。见表 4。

3.5 清金化痰汤对肺组织 p38MAPK, NF- κ B p65, I κ B α 表达的影响 与同时相空白组比较, 模型组肺组织中 p38MAPK, NF- κ B p65 蛋白的表达均显著升高 ($P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 与同时相模型组比较, 清金化痰汤高、中、低剂量及地塞米松组大鼠肺组织 p38MAPK, NF- κ B p65 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), I κ B α 蛋白表达有升高趋势。见表 5, 图 2。

表 3 清金化痰汤对大鼠 BALF 中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Qingjin Huatan Tang on levels of IL-1 β , IL-8, TNF- α in BALF ($\bar{x} \pm s$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	时间/d	IL-1 β	IL-8	TNF- α
空白	-	8	4	0.139 ± 0.013	0.835 ± 0.200	0.269 ± 0.043
		8	7	0.137 ± 0.026	0.798 ± 0.238	0.185 ± 0.053
模型	-	7	4	0.280 ± 0.034 ²⁾	1.761 ± 0.580 ¹⁾	0.652 ± 0.117 ²⁾
		6	7	0.238 ± 0.060 ¹⁾	1.848 ± 0.520 ¹⁾	0.625 ± 0.366 ²⁾
清金化痰汤	7.44	8	4	0.142 ± 0.045 ⁴⁾	1.063 ± 0.798	0.278 ± 0.113 ⁴⁾
		8	7	0.158 ± 0.019 ³⁾	0.845 ± 0.214 ³⁾	0.183 ± 0.133 ⁴⁾
	3.72	8	4	0.199 ± 0.047 ³⁾	1.158 ± 0.258	0.337 ± 0.155 ³⁾
		7	7	0.166 ± 0.073	0.877 ± 0.262 ³⁾	0.234 ± 0.198 ³⁾
	1.86	8	4	0.219 ± 0.059 ^{1,3)}	1.121 ± 0.501	0.582 ± 0.257
		7	7	0.171 ± 0.051 ¹⁾	0.857 ± 0.338 ³⁾	0.349 ± 0.031 ³⁾
地塞米松	0.001	8	4	0.161 ± 0.068 ³⁾	0.830 ± 0.164 ³⁾	0.273 ± 0.087 ⁴⁾
		7	7	0.173 ± 0.039	1.041 ± 0.520	0.241 ± 0.056 ⁴⁾

表 4 清金化痰汤对大鼠 BALF 中黏蛋白 MUC5AC 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 4 Effect of Qingjin Huatan Tang on level of MUC5AC in BALF ($\bar{x} \pm s, n=7$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4 d	7 d
空白	-	0.633 ± 0.211	0.544 ± 0.199
模型	-	1.173 ± 0.162 ¹⁾	1.155 ± 0.208 ¹⁾
清金化痰汤	7.44	0.665 ± 0.192 ³⁾	0.528 ± 0.121 ³⁾
	3.72	0.762 ± 0.216 ³⁾	0.738 ± 0.139 ³⁾
	1.86	0.975 ± 0.183	0.881 ± 0.185
地塞米松	0.001	0.755 ± 0.240 ³⁾	0.728 ± 0.170 ³⁾

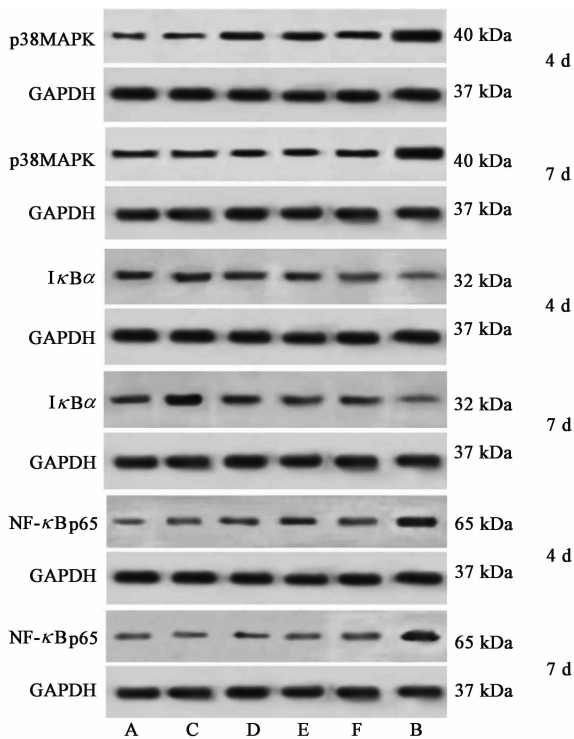
4 讨论

气道是直接与外界相通的开放性系统,是呼吸系统对有害刺激的第一道防线,机体抵抗力降低时各种有害因子(如 LPS,香烟烟雾,甲醛)均可引起气道和肺组织损伤。气道损伤后,机体会通过炎症反应及再生进行修复,修复完成后细胞增殖及炎症反应被抑制。急性气道炎症是最常见的感染性疾病,包括气管炎、支气管炎、肺炎、支气管扩张等。急性气道炎症反复发作后转变成慢性,慢性气道炎症与支气管哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)的发病密切相关,因此早期治疗急性气道炎症性疾病有着重要的意义。

表 5 清金化痰汤对大鼠 p38MAPK, NF- κ B p65, I κ B α 蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of Qingjin Huatan Tang on protein levels of p38MAPK, NF- κ B p65, I κ B α ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	时间/d	p38MAPK/GAPDH	I κ B α /GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH
空白	-	8	4	0.583 ± 0.136	0.858 ± 0.168	0.495 ± 0.177
		8	7	0.695 ± 0.095	1.018 ± 0.309	0.495 ± 0.110
模型	-	7	4	1.313 ± 0.246 ²⁾	0.465 ± 0.095 ²⁾	1.063 ± 0.192 ²⁾
		6	7	1.250 ± 0.254 ²⁾	0.493 ± 0.130 ¹⁾	1.043 ± 0.099 ²⁾
清金化痰汤	7.44	8	4	0.638 ± 0.221 ⁴⁾	0.695 ± 0.216	0.573 ± 0.128 ⁴⁾
		8	7	0.518 ± 0.175 ⁴⁾	0.598 ± 0.118 ¹⁾	0.508 ± 0.078 ⁴⁾
	3.72	8	4	0.653 ± 0.126 ⁴⁾	0.665 ± 0.037 ⁴⁾	0.643 ± 0.156 ³⁾
		7	7	0.583 ± 0.121 ⁴⁾	0.635 ± 0.135	0.575 ± 0.094 ⁴⁾
	1.86	8	4	0.845 ± 0.112 ^{1,3)}	0.590 ± 0.135 ¹⁾	0.665 ± 0.105 ³⁾
		7	7	0.765 ± 0.144 ³⁾	0.608 ± 0.198	0.620 ± 0.117 ⁴⁾
地塞米松	0.001	8	4	0.735 ± 0.156 ⁴⁾	0.520 ± 0.074 ¹⁾	0.515 ± 0.049 ⁴⁾
		7	7	0.768 ± 0.153 ³⁾	0.593 ± 0.110 ¹⁾	0.568 ± 0.054 ⁴⁾



A. 空白组; B. 模型组; C. 清金化痰汤高剂量组; D. 清金化痰汤中剂量组; E. 清金化痰汤低剂量组; F. 地塞米松组

图 2 清金化痰汤对大鼠 p38MAPK, NF-κB p65, IκBα 水平的影响
Fig. 2 Effect of Qingjin Huatan Tang on levels of p38MAPK, NF-κB p65, IκBα

MAPK 是细胞内广泛存在的丝/苏氨酸蛋白激酶超家族,是将细胞质的信号传递至细胞核并引起细胞核发生变化的重要物质。目前在人类已鉴定了 4 条 MAPK 途径,其中包括 p38MAPK 传导途径,各种细胞外信号包括紫外线照射、活性氧、高渗状态、细胞因子等均能使其激活并通过对下游大量转录因子的调控,广泛参与了组织细胞生长、存活、分化、凋亡及炎症反应等病理生理过程^[7]。早期研究在观察静息前 B 细胞时发现细胞核内存在 NF-κB 抑制蛋白,即 IκB^[8-9],而 IκBα 是 IκB 家族中最早克隆出来的蛋白, IκBα 的降解使 NF-κB 的核定位信号区(NLS)暴露,促进 NF-κB 磷酸化、核转录,进入细胞核,介导特异基因的转录表达及细胞因子释放^[10]; NF-κB 是 p38MAPK 下游的重要分子,研究证实, NF-κB 可介导多种免疫细胞的增殖、分化和炎症因子的产生^[11], p38MAPK 是 NF-κB 的上游信号分子,是急性气道炎症发生的始动信号之一,三者之间的关系见图 3。此外,气道发生急性炎症后,释放大细胞因子(IL-1β, IL-8, TNF-α 等)、炎症介质,这些物质可刺激气道上皮杯状细胞化生、脱颗粒,从而促使黏液分泌亢进,其中黏蛋白 MUC5AC 是气道黏液

主要成分之一,气道分泌物中 MUC5AC 的含量可反映气道黏液产生分泌的强度^[12]。因此有效干预 p38MAPK/NF-κB 通路成为治疗急性气道炎症和黏液高分泌的重要手段。本研究证实脂多糖诱导的急性气道炎症大鼠 BALF 中炎性细胞、细胞因子 IL-1β, IL-8, TNF-α, 黏蛋白 MUC5AC 和肺组织中 p38MAPK, NF-κB p65 表达增多, IκBα 表达则降低。

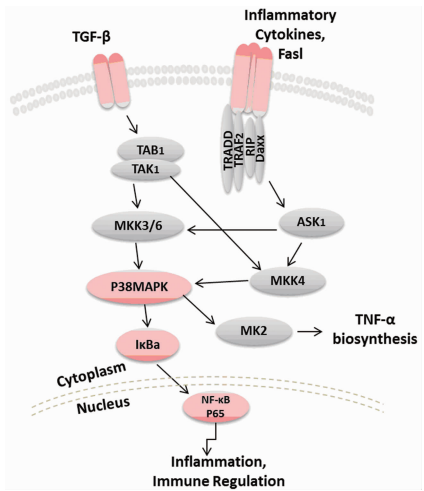


图 3 p38MAPK/NF-κB 信号通路
Fig. 3 p38MAPK/NF-κB signal pathways

清金化痰汤功能清肺化痰。方中橘红理气化痰,使气顺则痰降;茯苓健脾利湿,湿去则痰自消;更以瓜蒌子、浙贝母、桔梗清热涤痰,宽胸开结;麦冬、知母养阴清热,润肺止咳;黄芩、栀子、桑白皮清泻肺火,甘草补土而和中。故全方有化痰止咳,清热润肺之功。适用于痰浊不化,蕴而化热之证。现多用于上呼吸道感染,急慢性支气管炎等属痰热证者。本研究探讨了清金化痰汤对急性气道炎症性疾病的保护作用机制,结果显示清金化痰汤能抑制 BALF 中白细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞升高,减轻气管和肺组织的病理学炎症积分,减少细胞因子 IL-1β, IL-8, TNF-α 水平及黏蛋白 MUC5AC 的表达,下调肺组织 p38MAPK, NF-κB p65, 抑制 IκBα 蛋白降解,炎症反应随着给药时间的延长而减轻(第 7 天时基本接近空白组),其中尤以高剂量组改善最为明显,说明具有量效依赖性。

综上所述,清金化痰汤能通过抑制 p38MAPK, NF-κB p65 和增加 IκBα 来减少炎性细胞、细胞因子 IL-1β, IL-8, TNF-α 和黏蛋白 MUC5AC 表达,改善气道炎症性损伤和黏液高分泌状态的作用;清金化痰汤通过下调肺组织 p38MAPK/NF-κB 信号通路,抑制炎症信号通路活性,进而减少气道炎症反应,发挥

抗黏液高分泌,从而产生对气道的保护作用。

[参考文献]

- [1] Sethi S. Infection as a comorbidity of COPD [J]. *Eur Respir J*, 2010, 35 (6) : 1209-1215.
- [2] 岳爱霞. 清金化痰汤联合左氧氟沙星治疗老年肺部感染的临床体会 [J]. *中医临床研究*, 2011, 3 (18) : 59-60.
- [3] 延光海,金光玉,李良昌,等. 桦褐孔菌乙醇提取物在小鼠哮喘模型中对 p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36 (8) : 1067-1070.
- [4] Neuder L E, Keener J M, Eckert R E, et al. Role of p38 MAPK in LPS induced pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in equine leukocytes [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 129 (3) : 192-199.
- [5] Kadam R U, Garg D, Paul A T, et al. Evaluation of proinflammatory cytokine pathway inhibitors for p38 MAPK inhibitory potential [J]. *Med Chem*, 2007, 50 (25) : 6337-6342.
- [6] LU X Q, TANG F D, WANG Y, et al. Effect of Eucalyptus globulus oil on lipopolysaccharide-induced chronic bronchitis and mucin hypersecretion in rats [J]. *China J Chin Mat Med*, 2004, 29 (2) : 168-171.
- [7] Zarubin T, HAN J H. Activation and signaling of the p38MAP kinase pathway [J]. *Cell Res*, 2005, 15 (1) : 11-18.
- [8] Yadav V R, Prasad S, Sung B, et al. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (3) : 295-309.
- [9] Ghosh S, Hayden M S. Celebrating 25 years of NF- κ B research [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246 (1) : 5-13.
- [10] Lee H J, Seo H S, Kim G J. *Houttuynia cordata* thunb inhibits the production of pro + inflammatory cytokines through inhibition of the NF- κ B signaling pathway in HMC⁺1 human mast cells [J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8 (3) : 731-736.
- [11] Hayden M S, Ghosh S. NF- κ B in immunobiology [J]. *Cell Res*, 2011, 21 (2) : 223-244.
- [12] Zuhdi A M, Piazza F M, Selby D M, et al. Muc-5/5ac mucin messenger RNA and protein expression is a marker of goblet cell metaplasia in murine airways [J]. *Am J Respir Cell Mol Bio*, 2000, 22 (3) : 253-260.

[责任编辑 张丰丰]