

柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路的影响

徐凤, 肖韩艳, 周淑芬, 毛艺纯*

(牡丹江医学院第二附属医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] 目的:观察柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及细胞外信号调节激酶(ERK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路的影响。方法:SD 大鼠随机分为空白组、模型组、柴朴汤低、中、高(0.75, 1.5, 3.0 g·kg⁻¹)组,地塞米松组。采用卵蛋白(OVA)致敏激发建立大鼠哮喘模型。柴朴汤低、中、高剂量组于激发前 0.5 h 给予相应剂量柴朴汤灌胃;地塞米松组于激发前 0.5 h 给予地塞米松(0.005 g·kg⁻¹)灌胃;模型组于激发前 0.5 h 给予等体积生理盐水灌胃;空白组以生理盐水代替 OVA 进行腹腔注射及雾化吸入;隔日 1 次,共激发 28 d。观察各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数及分类细胞计数的变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测肺组织磷酸化 ERK(p-ERK),磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)的活性;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)分析检测 ERK, p38 MAPK mRNA 的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ERK, p-ERK, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白的表达;光镜下观察病理组织形态学变化及进行炎症评分。结果:模型组大鼠 BALF 中细胞总数和分类细胞计数;肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 的活性, ERK, p38 MAPK mRNA 的表达, p-ERK, p-p38 MAPK 的表达, 炎症评分均明显高于空白组($P < 0.01$);柴朴汤低、中、高剂量组和地塞米松组上述指标则明显低于模型组($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:柴朴汤可改善哮喘模型大鼠气道炎症,其机制可能与其抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路有关。

[关键词] 柴朴汤;哮喘;炎症;细胞外信号调节激酶/p38 丝裂原活化蛋白激酶(ERK/p38 MAPK)信号通路

[中图分类号] R285.5; R287; R242; R256.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0104-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1356.020.html>

[网络出版时间] 2017-10-11 13:56

Effect of Chaipu Decoction on Airway Inflammation and ERK/p38 MAPK Signal Pathway in Rats with Asthma

XU Feng, XIAO Han-yan, ZHOU Shu-fen, MAO Yi-chun*

(Second Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Chaipu decoction on airway inflammation and extracellular signal-regulated kinase (ERK) /p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signal pathway in asthmatic rats. **Method:** A total of 60 SD rats were randomly divided into the blank control group, the model group, the low-dose Chaipu decoction group (0.75 g·kg⁻¹), the middle-dose Chaipu decoction group (1.5 g·kg⁻¹), the high-dose Chaipu decoction group (3.0 g·kg⁻¹) and the dexamethasone group (0.005 g·kg⁻¹). The rats were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to establish the asthma model. The blank control group was given saline water; the model group was given saline water by gavage at 0.5 h before being challenged; the low dose group, the middle dose group and the high dose group were given the corresponding doses of Chaipu decoction by gavage at 0.5 h before being challenged; the Dexamethasone group was given

[收稿日期] 20170729(003)

[基金项目] 黑龙江省留学归国科学基金项目(LC2015H162)

[第一作者] 徐凤,副主任医师,从事消化系统疾病的基础与临床治疗研究, Tel:0453-8927662, E-mail:xufeng11261976@163.com

[通信作者] *毛艺纯,主任医师,从事消化系统疾病的中医药治疗, Tel:0453-8927662, E-mail:446453871@qq.com

dexamethasone by gavage at 0.5 h before being challenged; the drugs were given once every other day, for 28 days. The changes in the total and differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of different groups were observed. The activity of phosphorylated ERK (p-ERK) and phosphorylated p38 MAPK (p-p38 MAPK) in lung tissues were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). ERK and p38 MAPK mRNA expressions in lung tissues were detected by Real-time PCR; expressions of ERK, p-ERK, p38 MAPK, and p-p38 MAPK in lung tissues were detected by Western blot; the changes in histopathology and inflammation scores were observed under optical microscope. **Result:** Compared with the blank control group, the changes in the total and differential cell counts in BALF, the activity of p-ERK and p-p38 MAPK, the expressions of ERK mRNA and p38 MAPK mRNA, the expressions of p-ERK and p-p38 MAPK in lung tissues were significantly increased in the model group ($P < 0.01$); all of the above indexes in the low-dose group, the middle-dose group, the high-dose group and the dexamethasone group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Chaipu decoction could alleviate airway inflammation in asthmatic rats, and its mechanisms may be correlated with the inhibition of ERK/p38 MAPK signal pathway.

[Key words] Chaipu decoction; asthma; inflammation; extracellular signal-regulated kinase/p38 mitogen-activated protein kinase (ERK/p38 MAPK) signal pathway

支气管哮喘(Bronchial asthma)简称哮喘是一种慢性炎症性呼吸系统疾病,严重影响人类健康^[1]。炎症反应在哮喘发生和进展中发挥着重要作用,被认为是哮喘的可能发病机制之一^[2-3]。目前临床上治疗哮喘主要以糖皮质激素等药物为主,虽然疗效肯定,但是久用可诱发多种严重的不良反应,而中医中药在哮喘防治方面积累了大量经验。柴朴汤是《伤寒论》小柴胡汤和《金匱要略》半夏厚朴汤合方。临床研究发现,柴朴汤能够有效缓解哮喘患者咳嗽等症状,使患者生活质量有所提高^[4-6]。也有动物实验表明,柴朴汤可通过下调哮喘模型小鼠肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达而减轻气道重塑,亦可通过抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)表达而减轻豚鼠哮喘模型气道重塑^[7-8],但是有关于柴朴汤对哮喘模型气道炎症的影响,以及抑制气道炎症作用是否与细胞外信号调节激酶(ERK)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路有关的研究鲜见报道。故此,本研究采用卵蛋白(OVA)建立大鼠哮喘模型,观察柴朴汤对哮喘模型大鼠气道炎症及 ERK/p38 MAPK 信号通路相关蛋白 ERK,磷酸化 ERK(p-ERK),p38 MAPK,磷酸化 p38 MAPK(p-p38 MAPK)的影响,探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康成年雄性 SPF 级 SD 大鼠(体重 150 ~ 200 g)60 只,由哈尔滨医科大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(黑)2015-0001。动物实验符合牡丹江医学院动物伦理委员会标准,编号 MMU2013-16。空调恒温室 22 °C,相对湿度

50%,自由饮水饮食,通风换气 20 次/h,适应性饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 柴朴汤由小柴胡汤和半夏厚朴汤组成,即柴胡、大枣、甘草、苏叶、生姜(安徽亿源中药饮片科技有限公司,批号分别为 160501, 161101, 161001, 160606, 160718),茯苓、黄芩(亳州市兴科中药材种植有限公司,批号分别为 16020230, 16020326),半夏(干燥块茎的炮制加工品,安国市义全中药材有限公司,批号为 Q20161020),厚朴、白参(桓仁东济中药材有限公司,批号分别为 121285-2016303, 121040-201608)由牡丹江医学院第二附属医院中药房提供,经牡丹江医学院第二附属医院中医科商华教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》要求。上述药物经传统水煎法制备质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎液,4 °C 储存,临用前加热至常温。OVA(美国 Sigma 公司,货号 ZY-10652);地塞米松磷酸钠(白云山天星制药股份有限公司,批号 160103);p-ERK 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒和 p38 MAPK ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司,货号分别为 A-PD9086, A-0636R);trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,货号 15596-026);兔抗鼠 ERK 单克隆抗体、兔抗鼠 p-ERK 单克隆抗体、兔抗鼠 p38 MAPK 单克隆抗体,兔抗鼠 p-p38 MAPK 单克隆抗体和兔抗鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号分别为 sc-48685, sc-73283, sc-343810, sc-101759, sc-28240);辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠免疫球蛋白(IgG)二抗(美国 Abbkine 公司,货号 A-08023)。

1.3 仪器 LDZ5-2型自动平衡离心机(北京京立离心机有限公司);UW820S型电子天平(日本岛津电子天平);402A型超声雾化器(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);BH-2型光学显微镜(日本Olympus公司);ABI-7300型电泳仪(美国ABI公司);Trans-Blot Turbo型蛋白快速转膜仪,ChemiDoc XRS蛋白成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 哮喘模型建立、分组与给药 SD大鼠60只,按随机表分为空白组、模型组、柴朴汤低、中、高剂量组、地塞米松组,每组10只。除空白组外,其余各组于第1,8天腹腔内注射10% OVA + 10% 氢氧化铝生理盐水混合液1 mL致敏,第15天将大鼠依次置于超声雾化器中,用1% OVA生理盐水雾化激发大鼠哮喘发作,以出现口唇发绀、腹肌痉挛、呼吸加快、点头呼吸或站立不稳等表现表示成功激发^[9]。空白组在相应时间点以生理盐水代替OVA进行腹腔注射及雾化吸入;模型组于激发前0.5 h给予等体积生理盐水;柴朴汤低、中、高剂量组于激发前0.5 h给予柴朴汤0.75,1.5,3.0 g·kg⁻¹灌胃;地塞米松组于激发前0.5 h给予地塞米松0.005 g·kg⁻¹灌胃^[2]。隔日1次,1次30 min,共激发28 d。

2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞总数,分类细胞计数及标本制备 各组大鼠用1%巴比妥钠麻醉,剪掉颈部毛发后剪开皮肤,分离气管周围的组织,气管作一横行切口,插入气管插管。结扎右主支气管,经气管插管以生理盐水10 mL分3次灌洗左肺后,回收BALF,2 000 r·min⁻¹离心15 min,弃上清液,取沉渣经生理盐水重悬,吸取少量细胞悬液置血细胞计数板下计数细胞总数。Diff-Quik染色液染色BALF细胞涂片后,作细胞分类细胞计数。切取右支气管平滑肌固定于10%的中性福尔马林中,用于病理组织形态学观察。切取右肺门部位组织用于ELISA,蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测。

2.3 ELISA检测 p-ERK, p-p38 MAPK 活性 取约1/3右肺组织剪碎,加4℃生理盐水1 mL,充分匀浆,于4℃,12 000 r·min⁻¹离心15 min,弃沉渣,取上清。采用ELISA测定肺组织p-ERK, p-p38 MAPK的活性,严格按照ELISA试剂盒的操作说明进行操作。每份样品检测5次。

2.4 Real-time PCR 分析检测 ERK, p38 MAPK mRNA 表达 Trizol试剂提取剩余右肺组织总RNA,检测RNA纯度,按照Real-time PCR试剂盒进

行反转录反应,合成单链的cDNA。cDNA产物保存在-20℃。引物序列由Primer Premier 5.0设计,并由北京博迈德基因技术有限公司合成。Real-time PCR反应体系:体积为25 μL;反应程序:95℃变性30 s,52℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环,最后72℃延伸5 min。每个样本以内参基因β-actin调整。2^{-ΔΔCt}法定量分析。每份样品检测5次。引物序列见表1。

表1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Real-time PCR primer sequence

| 基因 | 引物序列(5'-3') | 引物长度/bp |
|----------|-------------------------|---------|
| ERK | 上游 CTCTGTCATTGCCACCA | 378 |
| | 下游 ATCCACTCTCCATCTCCAT | |
| p38 MAPK | 上游 CAGCCCACGGACCAATA | 212 |
| | 下游 AACGAGCATCTTCTCCAGTA | |
| β-actin | 上游 CACCCCGGAGTACAACCTTC | 207 |
| | 下游 CCCATATCCACCATCACACC | |

2.5 Western blot 分析检测 ERK, p-ERK, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达 取约1/3右肺组织剪碎匀浆后,加入适量RIPA裂解液,冰上裂解10 min,15 000 r·min⁻¹4℃离心15 min,弃沉渣,收集上清液,BCA法测定总蛋白浓度。取蛋白30 μg上样后进行10% SDS-PAGE凝胶电泳。当电泳完成后,电转膜仪转膜,5%脱脂奶粉封闭1 h。分别加入一抗(1:1 000)孵育1 h。PBST洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG(1:2 000)二抗孵育1 h。以β-actin为内参。ECL化学发光试剂显色,Bio-Rad凝胶成像系统对各组条带进行计值及统计分析。每份样品设5个平行孔。

2.6 支气管平滑肌病理组织形态学观察 将右支气管平滑肌组织10%中性甲醛固定后,常规乙醇脱水,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察各组大鼠支气管平滑肌病理组织形态学变化以及按照参考文献[10-11]的方法进行炎症评分。评分标准,没有炎症细胞(0分);有少量炎症细胞(1分);较多分布炎症细胞,且分布不均(2分);大量炎症细胞,少许聚集成团,且分布较均匀(3分);可见大量炎症细胞并且聚集成团(4分)。

2.7 统计学方法 采用SPSS 17.0软件进行描述性统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较,采用one-way ANOVA分析,组间两两比较,采用SNK法,当P < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般情况比较 空白组大鼠活动正常, 正常饮食, 大便成形, 干湿正常, 背毛光亮, 口唇黏膜呈粉红色, 体重增长迅速; 模型组大鼠激发后出现躁动不安、呼吸增快、腹部内凹、抓耳挠鼻的表现, 并随激发次数增多加重, 个别大鼠有打斗现象, 饮水增多, 大便偏干, 毛发缺乏光泽, 口唇黏膜发绀干燥, 体重增长较空白组减慢。柴朴汤低、中、高剂量组大鼠精神好转, 活动灵敏, 呼吸平稳, 大便偏湿, 背毛缺乏光泽, 口唇黏膜呈粉红色; 地塞米松组大鼠精神亢奋, 烦躁不安, 常有打斗, 易激惹,

体型消瘦, 个别大鼠前脚脚趾出现腐烂出血症状, 有抢水现象, 大便呈颗粒状, 背毛缺乏光泽, 口唇黏膜偏红。

3.2 柴朴汤对哮喘模型大鼠 BALF 总细胞数及分类细胞计数的影响 与空白组比较, 模型组大鼠 BALF 总细胞数及中性粒细胞、巨噬细胞, 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴朴汤低、中、高剂量组和地塞米松组大鼠 BALF 总细胞数及中性粒细胞、巨噬细胞, 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞计数均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

表 2 柴朴汤对大鼠 BALF 总细胞及分类细胞计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 总细胞 | 中性粒细胞 | 巨噬细胞 | 淋巴细胞 | 嗜酸性粒细胞 |
|------|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 19.524 ± 2.290 | 1.538 ± 0.170 | 10.915 ± 1.284 | 1.337 ± 0.164 | 0.404 ± 0.051 |
| 模型 | - | 49.436 ± 6.251 ²⁾ | 8.516 ± 0.957 ²⁾ | 24.706 ± 3.104 ²⁾ | 8.145 ± 1.147 ²⁾ | 3.988 ± 0.456 ²⁾ |
| 柴朴汤 | 0.75 | 32.647 ± 3.424 ³⁾ | 5.390 ± 0.664 ³⁾ | 16.041 ± 1.843 ³⁾ | 3.672 ± 0.690 ³⁾ | 2.258 ± 0.277 ³⁾ |
| | 1.5 | 28.683 ± 3.133 ³⁾ | 5.084 ± 0.648 ³⁾ | 14.422 ± 1.836 ³⁾ | 3.283 ± 0.542 ³⁾ | 2.175 ± 0.261 ⁴⁾ |
| | 3.0 | 25.193 ± 2.928 ⁴⁾ | 4.746 ± 0.574 ⁴⁾ | 13.576 ± 1.407 ³⁾ | 2.951 ± 0.457 ⁴⁾ | 1.851 ± 0.243 ⁴⁾ |
| 地塞米松 | 0.005 | 22.298 ± 2.674 ⁴⁾ | 4.462 ± 0.556 ⁴⁾ | 10.860 ± 0.588 ⁴⁾ | 2.793 ± 0.434 ⁴⁾ | 1.718 ± 0.210 ⁴⁾ |

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

3.3 柴朴汤对哮喘模型大鼠肺组织 ERK/p38 MAPK 信号通路 p-ERK, p-p38 MAPK 活性的影响 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 活性显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴朴汤低、中、高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 活性均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

组大鼠肺组织 ERK, p38 MAPK mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴朴汤低剂量组, 中剂量组, 高剂量组和地塞米松组大鼠肺组织 ERK, p38 MAPK mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 4。

表 3 柴朴汤对大鼠肺组织 ERK/p38 MAPK 信号通路 p-ERK, p-p38 MAPK 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | p-ERK | p-p38 MAPK |
|------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白 | - | 6.32 ± 0.70 | 12.01 ± 1.08 |
| 模型 | - | 23.66 ± 2.43 ²⁾ | 39.26 ± 4.09 ²⁾ |
| 柴朴汤 | 0.75 | 15.68 ± 1.62 ³⁾ | 27.34 ± 2.72 ³⁾ |
| | 1.5 | 12.70 ± 1.31 ⁴⁾ | 25.19 ± 2.52 ³⁾ |
| | 3.0 | 10.36 ± 1.04 ⁴⁾ | 21.96 ± 1.96 ⁴⁾ |
| 地塞米松 | 0.005 | 8.89 ± 0.96 ⁴⁾ | 18.57 ± 1.72 ⁴⁾ |

表 4 柴朴汤对大鼠肺组织 ERK/p38 MAPK 信号通路 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

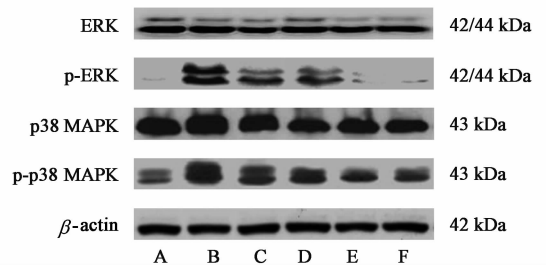
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ERK | p-38 MAPK |
|------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 0.053 ± 0.006 | 0.075 ± 0.006 |
| 模型 | - | 0.384 ± 0.032 ²⁾ | 0.613 ± 0.081 ²⁾ |
| 柴朴汤 | 0.75 | 0.182 ± 0.016 ⁴⁾ | 0.347 ± 0.043 ³⁾ |
| | 1.5 | 0.121 ± 0.013 ⁴⁾ | 0.291 ± 0.032 ⁴⁾ |
| | 3.0 | 0.101 ± 0.009 ⁴⁾ | 0.198 ± 0.018 ⁴⁾ |
| 地塞米松 | 0.005 | 0.098 ± 0.008 ⁴⁾ | 0.181 ± 0.016 ⁴⁾ |

3.4 柴朴汤对哮喘模型大鼠肺组织 ERK/p38 MAPK 信号通路 ERK, p38 MAPK mRNA 表达的影响 Real-time PCR 结果显示, 与空白组比较, 模型

3.5 柴朴汤对哮喘模型大鼠肺组织 ERK/p38 MAPK 信号通路 ERK, p-ERK, p38 MAPK, p-p38 MAPK 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 蛋白相对表达均显著升高 ($P < 0.01$), ERK, p38 MAPK 蛋白相对表达无统计学差异; 与模型组比较, 柴朴汤低、中、高剂量组

和地塞米松组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 蛋白相对表达均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), ERK, p38 MAPK 蛋白相对表达无统计学差异。见图 1, 表 5。

3.6 病理组织形态学改变及炎症评分的影响 空白组大鼠支气管管腔内无上皮细胞脱落, 管壁完整, 无明显炎症细胞浸润; 支气管黏膜平整; 平滑肌呈正常厚度。模型组大鼠支气管壁中有大量炎细胞浸润, 主要是嗜酸性粒细胞和淋巴细胞; 支气管黏膜上皮脱落, 水肿, 管腔内有明显分泌物; 平滑肌增厚。柴朴汤低剂量组, 中剂量组, 高剂量组和地塞米松组大鼠支气管管腔内少量黏液和脱落细胞, 支气管噬



A. 空白组; B. 模型组; C. 柴朴汤 0.75 g·kg⁻¹ 组; D. 柴朴汤 1.5 g·kg⁻¹ 组; E. 柴朴汤 3.0 g·kg⁻¹ 组; F. 地塞米松组 (图 2 同)

图 1 柴朴汤对各组大鼠肺组织 ERK, p-ERK, p38 MAPK, p-p38 MAPK 表达的影响

Fig.1 Effect of Chaipu decoction on expressions of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissues of different groups

表 5 柴朴汤对大鼠肺组织 ERK, p-ERK, p38 MAPK, p-p38 MAPK 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Relative expressions of ERK, p-ERK, p38 MAPK and p-p38 MAPK in lung tissues of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ERK/ β -actin | p-ERK/ β -actin | p38 MAPK/ β -actin | p-p38 MAPK/ β -actin |
|------|-----------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 1.768 ± 0.174 | 0.021 ± 0.001 | 2.406 ± 0.259 | 0.479 ± 0.050 |
| 模型 | - | 1.983 ± 0.182 | 1.139 ± 0.099 ²⁾ | 2.585 ± 0.364 | 1.772 ± 0.178 ²⁾ |
| 柴朴汤 | 0.75 | 1.166 ± 0.108 | 0.489 ± 0.037 ⁴⁾ | 2.258 ± 0.215 | 1.189 ± 0.122 ³⁾ |
| | 1.5 | 1.536 ± 0.152 | 0.480 ± 0.037 ⁴⁾ | 2.142 ± 0.212 | 0.784 ± 0.091 ⁴⁾ |
| | 3.0 | 1.345 ± 0.129 | 0.071 ± 0.005 ⁴⁾ | 2.207 ± 0.203 | 0.676 ± 0.062 ⁴⁾ |
| 地塞米松 | 0.005 | 1.477 ± 0.137 | 0.027 ± 0.001 ⁴⁾ | 2.189 ± 0.198 | 0.635 ± 0.058 ⁴⁾ |

酸性粒细胞和其他炎性细胞浸润有所减少, 几近消失; 黏膜平整规则; 平滑肌厚度几乎接近空白组。半定量分析结果表明, 与空白组比较, 模型组大鼠炎症评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 柴朴汤低、中、高剂量组和地塞米松组大鼠炎症评分均显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 2, 表 6。

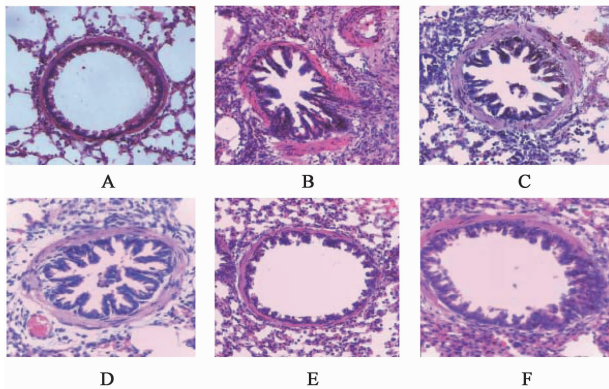


图 2 柴朴汤对大鼠肺组织病理组织形态学改变的影响 (HE, ×200)
Fig.2 Variations of histopathology in lung tissues of different groups (HE, ×200)

4 讨论

哮喘是一种呼吸系统的常见的慢性炎症性疾病, 其病理特点表现为气道炎症导致持续性气道高

表 6 柴朴汤对大鼠肺组织炎症评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Results of inflammation scores in lung tissues of different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 炎症评分/分 |
|------|-----------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 0.427 ± 0.049 |
| 模型 | - | 3.876 ± 0.397 ²⁾ |
| 柴朴汤 | 0.75 | 2.629 ± 0.266 ³⁾ |
| | 1.5 | 2.426 ± 0.258 ³⁾ |
| | 3.0 | 1.217 ± 0.134 ⁴⁾ |
| 地塞米松 | 0.005 | 1.140 ± 0.113 ⁴⁾ |

反应性及可逆性气流阻塞。气道的炎症是哮喘的特征性病理改变, 包括多种炎性细胞参与, 如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞等^[12]。实验研究表明, BALF 中存在大量的中性粒细胞、巨噬细胞, 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞是哮喘的典型特征^[13]。当哮喘发作时, 诱发了机体的免疫反应, 引起中性粒细胞、巨噬细胞, 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞活化、向炎症部位趋化、聚集, 从而释放炎性介质 (如内皮素、血小板活化因子、白三烯、组胺等) 间接或者直接损伤气道上皮细胞, 引发气道炎症^[14]。故此, 中性粒细胞、巨噬细胞, 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞也称为哮喘的主要炎症效应细胞, 与哮喘的严重程度呈正相关, 是哮喘临床诊断最为重要的指标。

本研究显示,模型组大鼠 BALF 中存在大量的中性粒细胞、巨噬细胞,淋巴细胞和嗜酸性粒细胞;空白组大鼠 BALF 中细胞总数和中性粒细胞、巨噬细胞,淋巴细胞和嗜酸性粒细胞较少;柴朴汤低、中、高剂量组大鼠 BALF 中细胞总数和中性粒细胞、巨噬细胞,淋巴细胞和嗜酸性粒细胞均较模型组降低。同时,本研究病理组织形态学观察也证实柴朴汤低剂量组,中剂量组和高剂量组可降低哮喘模型大鼠炎症和炎症评分。提示柴朴汤可有效抑制哮喘模型大鼠气道炎症反应,改善哮喘症状。

为了进一步阐明柴朴汤抑制哮喘模型大鼠气道炎症反应的可能机制,本研究从 ERK/p38 MAPK 信号通路角度进行了分析。MAPK 是连接细胞膜表面受体与决定基因表达之间的重要信号调节酶,因此 MAPK 信号转导通路是将细胞外信号传导入胞内的重要信号转导途径^[15]。MAPK 信号通路在炎症反应中发挥重要作用,主要包括分别由 ERK, JNK, p38 MAPK 介导的 3 条级联反应,该通路的激活可促进炎症细胞因子的生成而加剧炎症反应^[16]。研究表明,ERK 受上游特异性刺激分子 MEK 双磷酸化激活,活化的 p-ERK 形成二聚体,从细胞质移位到细胞核,通过调控一系列转录因子,而引起炎症反应,而 p38 MAPK 主要调节炎症与细胞凋亡等应激反应^[17]。另有研究表明,在哮喘模型中,ERK/p38 MAPK 信号通路活性增强^[16]。本研究也证实,模型组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 活性,ERK, p38 MAPK mRNA 表达及 p-ERK 和 p-p38 MAPK 表达均较正常组明显增加,与文献报道相一致^[18]。柴朴汤低、中、高剂量组大鼠肺组织 p-ERK, p-p38 MAPK 活性,ERK, p38 MAPK mRNA 表达及 p-ERK 和 p-p38 MAPK 表达均较模型组降低。提示柴朴汤抑制哮喘模型大鼠气道炎症反应的机制可能与其抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路有关。

综上所述,柴朴汤可有效改善哮喘模型大鼠的炎症反应,其机制可能与其抑制 ERK/p38 MAPK 信号通路有关。至于是否存在其他机制,如是否与 JNK 有关,本研究将继续探讨。

[参考文献]

[1] 王金磊,李承德,孙宏伟,等. 黄芪多糖抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用[J]. 中国药理学通报,2016,32(4):489-493.
[2] 张於,戴爱国. 柴朴汤对支气管哮喘豚鼠支气管肺组织中 Bel-2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):275-279.

[3] Farah C S, Keulers L A, Hardaker K M, et al. Association between peripheral airway function and neutrophilic inflammation in asthma [J]. *Respirology*, 2015,20(6):975-981.
[4] 张立山,周绍忠,张顺利,等. 柴朴汤治疗 191 例慢性咳嗽临床研究[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(4):29-31.
[5] 张立山,陈英,张筱雯,等. 柴朴汤与其减味方治疗咳嗽的对比研究[J]. 中国中医药现代远程教育,2016,14(16):72-74.
[6] 张芬兰,刘春梅. 柴朴汤加味治疗咳嗽变异性哮喘[J]. 长春中医药大学学报,2003,19(4):23.
[7] 刘鑫,张恒平,彭光耀,等. 柴朴汤对支气管哮喘大鼠气道重塑及肺组织中 α -平滑肌肌动蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):220-224.
[8] 黄艳,刘鑫,戴爱国,等. 柴朴汤对卵蛋白诱导豚鼠哮喘的干预作用与对核因子- κ B 的影响[J]. 中医药导报,2007,13(6):1-3.
[9] 金华良,王利民,罗清莉,等. 淫羊藿对哮喘大鼠气道高反应性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):169-173.
[10] 周玉波,扶招弟,周丽芬,等. 硫化氢对臭氧致小鼠气道炎症的影响[J]. 中国病理生理杂志,2016,32(10):1837-1842.
[11] Triantaphyllopoulos K, Hussain F, Pinart M, et al. A model of chronic inflammation and pulmonary emphysema after multiple ozone exposures in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011,300(7):L691-L700.
[12] Barnig C, Levy B D. Innate immunity is a key factor for the resolution of inflammation in asthma [J]. *Eur Respir Rev*, 2015,24(135):141-143.
[13] Choi J, Choi B K, Kim J S, et al. Picoside II attenuates airway inflammation by downregulating the transcription factor GATA3 and Th2-related cytokines in a mouse model of HDM-induced allergic asthma [J]. *PLoS One*, 2016,21(11):e0167098.
[14] Kurai J, Watanabe M, Tomita K, et al. Influence of Asian dust particles on immune adjuvant effects and airway inflammation in asthma model mice [J]. *PLoS One*, 2014,9(11):e114879.
[15] 多玥荷,孙莉娜,应森林,等. 西黄丸通过 ERK/MAPK 信号通路对人结肠癌裸鼠移植瘤的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(10):3055-3058.
[16] 卫智权,阎莉,邓家刚,等. 芒果苷对脂多糖诱导的慢性炎症大鼠 MAPK 通路及血清细胞因子的影响[J]. 中草药,2013,44(1):52-58.
[17] XIONG Y, WANG J, YU H, et al. Anti-asthma potential of crocin and its effect on MAPK signaling pathway in a murine model of allergic airway disease [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2015,37(3):236-243.
[18] CHU X, CI X, He J, WEI M, et al. A novel anti-inflammatory role for ginkgolide B in asthma via inhibition of the ERK/MAPK signaling pathway [J]. *Molecules*, 2011,16(9):7634-7648.

[责任编辑 邹晓翠]