

· 药理 ·

商陆皂苷对脂多糖诱导的小鼠乳腺炎的影响

匡海学, 崔娜, 张雅男, 王知斌, 闫静*

(黑龙江中医药大学 药学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:探究商陆皂苷对脂多糖诱导的小鼠乳腺炎的效果及作用机制。方法:将BALB/c雌性小鼠随机分成正常组、模型组、地塞米松组(DEX, 5.0 mg·kg⁻¹)和商陆皂苷给药组(50, 25, 12.5 mg·kg⁻¹),采用脂多糖(LPS)诱导产后雌小鼠(BALB/c)乳腺炎模型,分析小鼠乳腺组织的病理情况和中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)活性水平;测定乳腺组织中炎症因子的含量及氧化应激水平;通过蛋白免疫印迹法(Western blot)评估商陆皂苷对Toll样受体4(TLR4)/核转录因子-κB(NF-κB)信号通路蛋白的影响。结果:与正常组比较,模型组的乳腺组织中有充血和瘀血等典型的乳腺炎变化,MPO水平升高,肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-1β(IL-1β)和白细胞介素-6(IL-6)的表达水平显著升高($P<0.01$);与LPS模型组比较,各商陆皂苷组能够显著改善小鼠乳腺组织的炎性损伤,降低嗜中性粒细胞的分泌,降低MPO的活性,促炎症因子TNF-α, IL-1β和IL-6的表达水平也明显下调,;升高超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶活力,同时降低丙二醛(MDA)的水平($P<0.05, P<0.01$),降低TLR4/NF-κB信号通路蛋白的表达($P<0.05, P<0.01$)。结论:商陆皂苷对脂多糖诱导的小鼠乳腺炎损伤有保护作用,其可能与抑制TLR4/NF-κB信号通路蛋白的表达有关。

[关键词] 商陆皂苷;乳腺炎;脂多糖(LPS);炎症因子;Toll样受体4(TLR4)/核转录因子-κB(NF-κB)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0065-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201302

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200402.1516.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-2 15:36

Effect of Esculentoside on Lipopolysaccharide-induced Mice Mastitis

KUANG Hai-xue, CUI Na, ZHANG Ya-nan, WANG Zhi-bin, YAN Jing*

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of esculentoside on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. **Method:** Female BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group (DEX, 5.0 mg·kg⁻¹) and esculentoside group (50, 25, 12.5 mg·kg⁻¹). The mastitis model of postpartum female mice (BALB/c) induced by lipopolysaccharide (LPS) was used to analyze the pathological conditions of breast tissue and the activity of recombinant myeloperoxidase (MPO), factor content and oxidative stress level. Western blot was used to evaluate the effect of esculentoside on Toll-like receptor4 (TLR4)/nuclear transcription factor (NF-κB) signaling pathway proteins. **Result:** Compared with the normal group, the breast tissue of the model group had typical mastitis changes, such as hyperemia and congestion, the level of MPO increased, and the expression levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β) and interleukin-6 (IL-6) increased significantly ($P<0.01$). Compared with LPS model group, esculentoside groups could significantly improve the inflammatory damage of mammary gland tissue, reduce the secretion of neutrophils and the activity of MPO, the expression levels of pro-inflammatory factors

[收稿日期] 20191104(033)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531801)

[第一作者] 匡海学,博士,教授,从事中药性味理论和药效物质基础研究, Tel:0451-82197188, E-mail:hxkuang@hljucm.net

[通信作者] *闫静,博士,教授,从事中药开发与分析研究, Tel:0451-87267050, E-mail:yanjing-002@163.com

TNF- α , IL-1 β and IL-6 were also significantly down-regulated, the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were increased, while the level of malondialdehyde (MDA) was decreased, and the activation of TLR4/NF- κ B signaling pathway was inhibited by esculentoside ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Esculentoside have a protective effect on lipopolysaccharide-induced mastitis in mice, which may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signaling pathway protein expression.

[Key words] esculentoside; mastitis; lipopolysaccharide (LPS); inflammatory factors; Toll-like receptor (TLR4)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) pathway

乳腺炎表现为腺体组织炎性细胞浸润、内皮细胞功能受损、促炎症细胞因子大量释放并伴有组织氧化应激状态的一种乳腺疾病^[1]。乳腺炎疾病的发生与发展,大多可归因于乳房内细菌、支原体、藻类或真菌感染^[2]。目前临床上经常采用青霉素、头孢类等抗生素药物进行治疗,疗效虽显著,但患者治疗期间并不能哺乳,抗生素长时间使用产生耐药性的同时^[3],还会对患者的肝、肾及神经系统带来不可逆的伤害,同时少数患者会发生过敏反应。近年来,许多传统的中药提取物已被证明对乳腺炎模型具有抗炎作用^[4]。

商陆为商陆科植物垂序商陆 *Phytolacca americana* 或商陆 *Phytolacca acinosa* 的干燥根。商陆作为中国传统中药,具有逐水、利尿、消肿、抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种功效,《全国中草药汇编》上册商陆项下记载:商陆 60 g(鲜品 120 g)文火炖烂母鸡或猪肉放盐少许,弃渣分 2,3 次吃汤及肉;主治宫颈糜烂、白带、功能性子宫出血。临床使用该方治疗白带 8 例,均获良效^[5]。现代研究发现商陆中皂苷组分是其特征性组分之一,具有明显的抗炎、抗菌、抗病毒和免疫调节作用,常被用来治疗呼吸道炎症、狼疮性肾炎等急性或慢性炎症^[6-7]。但目前没有发现商陆对脂多糖(LPS)诱导的乳腺炎的抗炎活性作用的相关报道。因此笔者使用 LPS 诱导小鼠建立乳腺炎模型,意在探索商陆皂苷治疗小鼠乳腺炎的药理作用和抗炎机制。

1 材料

1.1 动物 108 只 SPF 级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,体质量(20 \pm 2) g,由辽宁长生生物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(辽)2018-0001,此动物实验开展经黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批准号 2018-021)。

1.2 药品及试剂 LPS(美国 Sigma 公司,批号 L-2880);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1120);组织蛋白提取试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶

(GSH-Px),丙二醛(MDA),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A003-1-2, A001-3-2, A005-1-2, W034-1-1, H052, H002, H007);细胞裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒(广州碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013B, P0012);Marker(美国 Thermo Fisher 公司,批号 26619);4 \times 蛋白上样缓冲液(天津阿尔法生物科技有限公司,批号 A1180);甘氨酸,Tris-base,聚山梨酯 20(德国 Biofrox 公司,批号分别为 0003A, 0004A, 0023A);山羊抗兔荧光二抗,兔多抗内参抗体 β -激动蛋白(β -actin),核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65),NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α),髓过氧化物酶(MPO),Toll 样受体 4(TLR4)(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-40295G-IRDye8, bs-0061R, bsm-52305R, bs-10246R, bs-4943R, bs-20594R);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗人免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(美国 Abclonal 公司,批号 AS002)。

1.3 仪器 MIKRO220R 型低温离心机(德国 Hettich 公司);HistoStar 型组织包埋机, HM 340E 型石蜡切片机(美国 Thermo 公司);Mini-PROTEAN 型电泳仪,凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);Victor TMX3 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司);Odyssey CLx 型近红外激光成像分析系统(美国 LI-COR 公司);BX60 型显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 药物的制备 商陆药材购于河南信阳药材市场,经黑龙江中医药大学苏连杰教授鉴定为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* 的干燥根。取药材粉碎,水煎煮法提取 3 次,每次 1.5 h,将溶液过滤,减压浓缩,乙醇沉淀,上清液回收溶剂至无醇味,均匀分散至水层(生药 0.5 g \cdot mL⁻¹),用石油醚萃取进行除杂,将萃取后的水层浓缩,进行 HPD-100 大孔吸附树脂柱色谱,分别用去离子水,10%乙醇,30%乙醇洗脱后,70%乙醇洗脱,收集剩余的 70%乙醇水溶液,减压浓缩得 70%乙醇组分,即商陆辛味拆分

组分,用水饱和正丁醇进行3次皂苷的富集,减压浓缩备用。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 准备108只6~8周龄SPF级BALB/c小鼠,其中雌鼠72只,雄鼠36只。小鼠在饲养3 d适应环境后,按雌和雄比例为2:1进行合笼饲养,使其交配受孕。雌鼠分娩后3~9 d将其随机分成6组,每组10只,分别为正常组,模型组(LPS刺激,50 μL 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),阳性药组(地塞米松5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),商陆皂苷低、中、高剂量组(12.5, 25, 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),实验大鼠给药用量方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算。乳房灌注前的24 h将仔鼠与母鼠分离单独饲养,并在乳导管灌注LPS和磷酸盐缓冲液(PBS)之前1 h和灌注之后12 h腹腔注射给药,随后腹腔注射乌拉坦将母鼠麻醉、固定。用70%乙醇擦拭小鼠的第3,4对乳腺周围,使用灭菌的小镊子轻轻夹起小鼠乳头,剪去乳头尖端约1 mm暴露小鼠乳导管,除对照组给予等量的PBS外,将质量浓度为0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的LPS 50 μL 通过乳导管缓缓注入小鼠双侧乳腺中,24 h后,将其颈椎脱臼处死,模型的建立参考文献方法^[8]。将第3,4对乳腺剥离下来,第4对左侧乳腺在体积分数10%甲醛溶液中进行组织固定,用作后期免疫组织化学切片和病理组织学切片。其他乳腺组织放置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存,用于各种炎症因子的检测。

2.2 HE染色观察乳腺组织病理学变化 将采集并固定于10%甲醛溶液的各組雌鼠乳腺组织按照常规的方法制备成组织学切片,然后进行HE染色,观察对比各組乳腺的组织学变化。

2.3 免疫组化检测乳腺组织MPO的表达 采用即用型一步法,按照一抗的需要,选择相应的抗原修复液(pH 6.0)对乳腺组织切片进行预处理,使用3% H_2O_2 去离子水浸泡切片15 min, PBS进行冲洗。加MPO一抗(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS浸洗后加入IgG抗体-Fab段-HRP多聚体(1:1 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, PBS浸洗5次,每次3 min。用DAB溶液显色,蒸馏水反复冲洗,加苏木素染液复染,再进行梯度乙醇脱水(浓度由低到高),二甲苯透明等过程,最终使用中性的树脂封片。在显微镜下可以观察到阳性目标呈现棕黄色,细胞核呈蓝色,于200倍下摄片,每组随机拍下5个视野。使用Image J图像分析软件对各组像片中阳性表达进行半定量分析。

2.4 ELISA检测炎症因子及氧化应激指标 取各

组乳腺组织与PBS按照1:9制备成组织蛋白匀浆,2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心2 min收集上清液,按照ELISA试剂盒说明书的操作步骤,测定进行TNF- α , IL-1 β , IL-6水平及SOD, GSH-Px, MDA水平。每组3个重复样本,每个样本检测3次,数值取平均值。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测乳腺组织NF- κB , TLR4蛋白的表达 乳腺组织中I κB , p65, TLR4蛋白的表达通过Western blot进行评价,取乳腺组织与预冷的RIPA裂解液1:9加入冰上研磨裂解,13 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心30 min,取上清液采用BCA法计算样品蛋白浓度,将样品变性后,通过SDS-PAGE凝胶电泳法分离蛋白,采用湿转法转至NC膜,封闭后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗I κB (1:1 000), NF- κB p65(1:1 000), TLR4(1:1 000),加入荧光二抗(1:1万,注意避光)孵育2 h, Odyssey CLx红外成像仪扫描转印膜,得到图像,保存图片后对采用Image J软件对各组条带的灰度值进行分析。

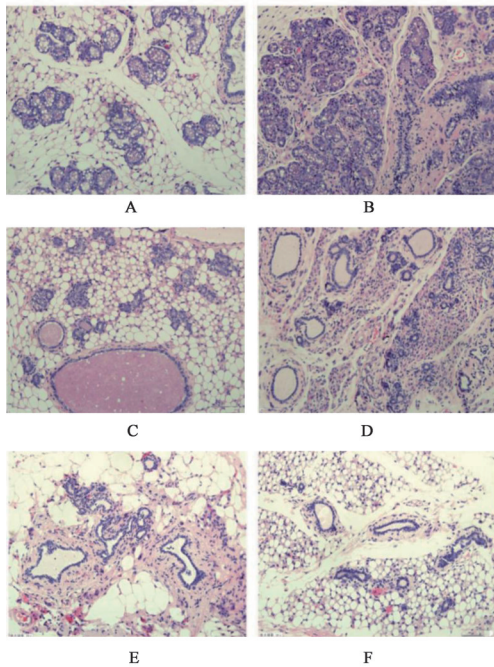
2.6 统计学分析 采用SPSS 20.0统计软件进行统计分析, GraphPrism 6.0软件做图,以上所有数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对乳腺炎小鼠乳腺组织病理学的影响 正常组能够观察到乳腺腺泡的结构完整,腺泡腔内可见乳汁着色;与正常组比较,模型组的乳腺组织腺泡壁可见明显间质水肿和增生,乳腺泡腔中充满许多嗜中性粒细胞和巨噬细胞,并且可清楚观察到乳腺组织中有充血和瘀血等典型的乳腺炎变化;地塞米松组中有较少的中性粒细胞,乳腺腺泡壁厚度减少,水肿消失;商陆皂苷呈剂量依赖性改善LPS刺激的炎症反应,商陆皂苷高剂量给药组尤其显著,乳腺状态接近正常,明显缓解了LPS诱导的乳腺组织病理变化。见图1。

3.2 对乳腺炎小鼠乳腺组织中MPO蛋白表达的影响 MPO蛋白阳性目标呈棕黄色,阳性部位是胞浆。MPO在正常组内呈明显阴性表达。与正常组比较,模型组的小鼠乳腺组织中的MPO蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组及商陆皂苷低、中、高剂量组明显降低MPO蛋白表达($P<0.05, P<0.01$)。见图2,表1。

3.3 对乳腺炎小鼠乳腺组织氧化应激水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠乳腺组织中SOD及GSH-Px的活性显著降低($P<0.01$),MDA水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,商陆皂苷低、中、高



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D. 商陆皂苷低剂量组; E. 商陆皂苷中剂量组; F. 商陆皂苷高剂量组(图2,3同)

图1 商陆皂苷对乳腺炎小鼠乳腺组织的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of esculentoside on mammary gland tissue in mastitis mice (HE, ×200)

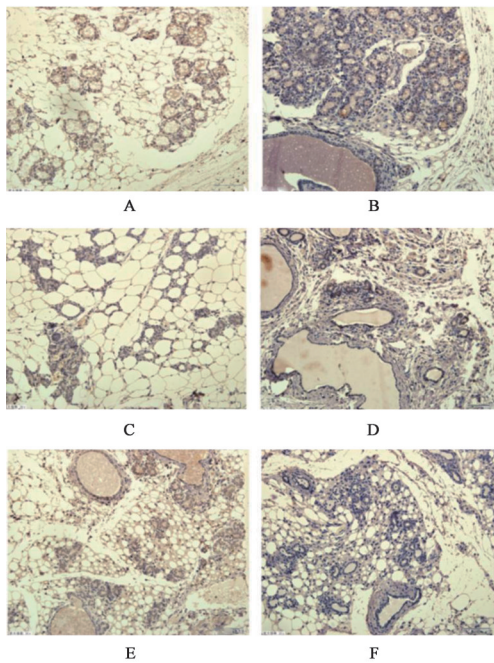


图2 商陆皂苷对乳腺炎小鼠乳腺组织MPO蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of esculentoside on expression of MPO protein in mammary tissue of mastitis mice(IHC, ×200)

剂量组明显升高SOD和GSH-Px活性,降低MDA的水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表2。

3.4 对乳腺炎小鼠TNF- α , IL-6和IL-1 β 含量的影

表1 商陆皂苷对乳腺炎小鼠乳腺组织MPO蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of esculentoside on expression of MPO protein in mammary tissue of mastitis mice($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MPO
正常	-	0.803±0.165
模型	-	2.736±0.442 ¹⁾
地塞米松	5.0	1.220±0.196 ³⁾
商陆皂苷	12.5	2.004±0.155 ²⁾
	25	1.607±0.359 ²⁾
	50	1.457±0.302 ³⁾

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

响 与正常组比较,模型组小鼠乳腺组织在LPS的刺激下,促炎症细胞因子TNF- α , IL-6, IL-1 β 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组、商陆皂苷低、中、高剂量组明显降低炎症因子TNF- α , IL-6, IL-1 β 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表3。

3.5 对乳腺炎小鼠乳腺组织中TLR4, p-I κ B α , p-NF- κ B p65蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠乳腺组织p-NF- κ B p65, p-I κ B α 和TLR4蛋白显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组、商陆皂苷低、中、高剂量组p-NF- κ B p65, p-I κ B α 和TLR4蛋白明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图3,表4。

4 讨论

经过实验检测小鼠乳腺组织,证实LPS模型组小鼠产生了大量的促炎症细胞因子,如TNF- α , IL-1 β 和IL-6。实验结果显示,与正常组比较,小鼠在LPS的刺激下,乳腺组织的腺泡壁可以看到明显间质水肿和增生,乳腺泡腔中充满了许多的嗜中性粒细胞和巨噬细胞,并且可以清楚的看到乳腺组织中有充血和瘀血。笔者观察到地塞米松组中有较少的中性粒细胞,乳腺腺泡壁厚度减少,水肿消失,此外,商陆皂苷以剂量依赖性方式改善LPS刺激的炎症反应,尤其是商陆皂苷高剂量组的乳腺状态接近正常,显著缓解了LPS诱导的乳腺组织病理变化。这些结果表明了商陆皂苷治疗小鼠乳腺炎的作用。

乳腺炎最初定义为细菌入侵引起的乳腺组织的炎症反应,是人类和动物的一种严重疾病^[9]。脂多糖是革兰氏阴性菌的主要细胞壁的一种成分,习惯上将其称为细菌内毒素,被认为是感染一系列宿主的主要病原体,在以前的研究中被用于微生物诱

表 2 商陆皂苷对乳腺炎小鼠乳腺组织氧化应激水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of esculentoside on oxidative stress level of mammary gland in mice($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹
正常	-	205.91±7.37	2.37±0.07	161.70±12.42
模型	-	151.04±16.24 ¹⁾	4.54±1.67 ¹⁾	105.17±39.05 ¹⁾
地塞米松	5.0	195.25±7.80 ³⁾	3.04±0.21 ³⁾	157.44±19.04 ³⁾
商陆皂苷	12.5	167.43±15.36 ²⁾	4.29±0.23 ²⁾	121.09±22.67
	25	187.48±9.22 ²⁾	3.58±0.52 ²⁾	140.52±14.52 ²⁾
	50	190.99±11.05 ³⁾	3.23±0.22 ³⁾	152.80±12.80 ³⁾

表 3 商陆皂苷对乳腺炎小鼠的 TNF-α, IL-6 和 IL-1β 的含量影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of esculentoside on content of TNF-α, IL-6 and IL-1β in mice with mastitis($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF-α	IL-6	IL-1β
正常	-	32.62±1.46	34.03±8.80	25.47±7.81
模型	-	145.52±5.93 ¹⁾	156.69±21.16 ¹⁾	167.19±21.77 ¹⁾
地塞米松	5.0	43.83±3.26 ³⁾	44.63±6.29 ³⁾	32.47±10.95 ³⁾
商陆皂苷	12.5	99.38±5.70 ²⁾	71.97±14.32 ²⁾	72.28±12.82 ²⁾
	25	70.04±2.78 ²⁾	50.02±9.41 ²⁾	52.34±11.96 ²⁾
	50	47.99±1.71 ³⁾	44.70±8.69 ³⁾	41.03±4.27 ³⁾

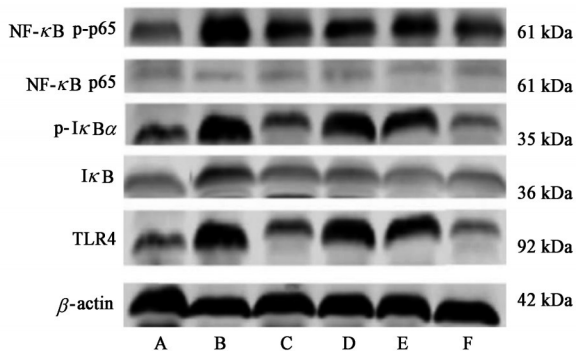


图 3 小鼠 p65 和 IκBα 和 TLR4 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of p65 and IκBα and TLR4 protein expression in mice

表 4 商陆皂苷对乳腺炎小鼠乳腺组织中 TLR4, p-IκBα, p-NF-κB p65 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of esculentoside on TLR4, p-IκBα, p-NF-κB p65 protein expression in breast tissue of mice with mastitis($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TLR4/ β-actin	p-IκBα/ β-actin	p-NF-κB p65/ β-actin
正常	-	0.31±0.13	0.30±0.14	0.23±0.13
模型	-	1.07±0.22 ¹⁾	1.11±0.25 ¹⁾	1.07±0.21 ¹⁾
地塞米松	5.0	0.38±0.17 ³⁾	0.42±0.19 ³⁾	0.46±0.11 ³⁾
商陆皂苷	12.5	0.88±0.14 ²⁾	0.73±0.12 ²⁾	0.76±0.13 ²⁾
	25	0.72±0.15 ²⁾	0.69±0.13 ²⁾	0.54±0.18 ²⁾
	50	0.46±0.17 ³⁾	0.53±0.11 ³⁾	0.46±0.15 ³⁾

导乳腺炎的小鼠模型^[10-12],其主要通过活化单核/巨噬细胞内 NF-κB,丝裂原激活的蛋白激酶(MAPKs)

等多条信号转导通路,促进了 IL-6, IL-12, IL-1β, TNF-α 等炎性细胞因子的释放^[13],引起局部或全身炎症反应,然而这些细胞因子还可以刺激内皮细胞和白细胞释放一系列炎症介质[如诱导型一氧化氮合酶(iNOS),环氧合酶-2(COX-2),氧自由基等]^[14],导致组织损伤和弥散性血管内凝血。MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志,如果中性粒细胞缺少 MPO,直接能够造成炎症部位组织细胞损伤^[15]。LI 等^[16]研究表明,商陆皂苷甲可有效拮抗由 LPS 引起的支气管上皮细胞中促炎因子的增加,逆转录 PCR(RT-PCR)结果显示,商陆皂苷甲还可降低 COX-2, iNOS mRNA 水平,体现了商陆作为传统中药具有多效性,双向调节,安全低毒的特点^[17]。

活化的 NF-κB 进入细胞核许多参与先天和适应性免疫调节,并诱导细胞粘附,炎症反应和抗细胞凋亡基因的表达^[18]。因此,抑制 NF-κB 的通路的激活能够消除炎症反应和促进细胞凋亡。众所周知,各种天然草药通过抑制 NF-κB 信号传导来影响抗炎反应^[19]。为了探讨商陆皂苷是否抑制 NF-κB 通路而发挥治疗乳腺炎的作用,笔者首先检测了 NF-κB p65 和 IκBα 磷酸化和非磷酸化蛋白的表达,结果发现,LPS 处理后 NF-κB p65 和 IκBα 磷酸化的程度显著增加,而商陆皂苷能够通过剂量依赖性方式抑制 LPS 诱导的 NF-κB p65 磷酸化和 IκBα 降解。由此可见,商陆皂苷对 LPS 诱导的乳腺炎小鼠模型

抗炎作用的机制可能是通过抑制NF- κ B通路的激活来抑制IL-1 β , IL-6和TNF- α 的产生。

TLR是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子,是存在于细胞表面的模式识别受体。目前,在哺乳动物及人类中已经发现的人TLRs家族成员有11个。其中TLR2, TLR4, TLR5和TLR9是目前研究较多的。TLR在先天免疫反应中有着至关重要的作用;受体识别许多病原体及其致病成分,同时启动先天免疫反应^[20]。TLR4作为LPS的主要受体,可以识别革兰氏阴性菌LPS^[21],还可识别病原体坏死细胞释放的热休克蛋白,体内类肝素硫酸盐和透明质酸盐降解的多糖部分以及局部的内源性酶的级联活化反应也可激活TLR4^[22]。活化的TLR受体能够有效的防御入侵的病原体,并且TLR4被看做是炎症反应中的决定性识别受体。LPS首先介导激活TLR4受体后,激活下游NF- κ B信号通路,使大量细胞基因被活化,介导炎症因子的释放^[23]。商陆皂苷显著下调促炎因子IL-1 β , IL-6, TNF- α 的水平,这可归因于NF- κ B和TLR4信号转导途径的失活^[24-25]。因此本实验接下来通过Western blot验证商陆辛味拆分组对TLR的影响。结果显示,商陆皂苷以剂量依赖性方式抑制TLR4表达。因此,商陆皂苷通过弱化炎症因子,抑制TLR4/NF- κ B信号通路激活实现对小鼠乳腺炎的治疗作用。

综上所述,研究表明,商陆皂苷可以明显减轻LPS诱导的小鼠乳腺炎的组织病理学变化,下调促炎症细胞因子TNF- α , IL-1 β 和IL-6的水平,该作用的潜在抗炎机制可能由于抑制TLR4受体的表达和并影响下游NF- κ B的活化。商陆皂苷是乳腺炎治疗的潜在药物,但仍需要进一步的综合研究。

[参考文献]

- [1] LAAS E, TOUBOUL C, KERDRAON O, et al. Inflammatory and infectious breast mastitis outside of pregnancy and lactation: guidelines [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2015, 44(10):996-1016.
- [2] ZADOKS R N, MIDDLETON J R, MCDUGALL S, et al. Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2011, 16(4):357-372.
- [3] 王鹏程,王秋红,赵珊,等. 商陆化学成分及药理作用和临床应用研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(18):2722-2731.

- [4] 杜琳,王洁雪,陈聪地,等. 商陆中皂苷类化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12):2552-2556.
- [5] 赵国栋,王立宽,段静,等. 商陆不同极性、根和茎提取物的抑菌性能分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(4):717-20.
- [6] 马华林,张祥贵,杨丹,等. 商陆皂苷甲对BXSB小鼠狼疮肾炎凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24(9):927-929.
- [7] 祁晓鸣,马俊楠,孟祥龙,等. 商陆及其不同炮制品对阿霉素肾病大鼠的作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21):90-94.
- [8] 阙兴池. 杨梅素对LPS诱导的小鼠乳腺炎的影响及其机制[D]. 长春:吉林大学, 2019.
- [9] GUO Y F, XU N N, SUN W, et al. Luteolin reduces inflammation in staphylococcus aureus-induced mastitis by inhibiting NF- κ B activation and MMPs expression[J]. Oncotarget, 2017, 8(17):28481-28493.
- [10] 抗晶晶,刘晓宁. 商陆皂苷甲治疗炎症性疾病机制的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(42):111-113.
- [11] 孟金丽,初建国,张丽娜,等. 不同类型乳腺炎性疾病的MRI研究进展[J]. 临床放射学杂志, 2017, 36(11):1726-1729.
- [12] BABRA C, TIWARI J, PIER G, et al. The persistence of biofilm-associated antibiotic resistance of Staphylococcus aureus isolated from clinical bovine mastitis cases in Australia [J]. Folia Microbiol, 2013, 58(6):469-474.
- [13] ZHANG X, WANG Y, XIAO C, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced mice mastitis through attenuating the MAPK and NF- κ B signaling pathway [J]. Microb Pathog, 2017, 107:462-467.
- [14] 展俊平,孟庆良,孟婉婷,等. 补阳还五汤对类风湿关节炎小鼠MPO, NE mRNA表达及TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-17的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24):158-163.
- [15] YANG Z, YIN R, CONG Y, et al. Oxymatrine lightened the inflammatory response of LPS-induced mastitis in mice through affecting NF- κ B and MAPKs signaling pathways [J]. Inflammation, 2014, 37(6):2047-2055.
- [16] LI Y, CAO Y, XU J, et al. Esculentoside A suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory molecule production partially by casein kinase 2 [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198:15-23.
- [17] 李一飞,姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):248-251.
- [18] FENGYANG L, DEJIE L, ZHENGTAO Y, et al. Astragaloside suppresses inflammatory responses via

- down-regulation of NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2):478-482.
- [19] 詹妮, 卢丹, 李平亚. 中草药的抗炎作用成分及其机制[J]. *中国医药指南*, 2010, 8(20):224-226.
- [20] RUIFENG G, YUNHE F, ZHENGKAI W, et al. Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 729:54-58.
- [21] 王爱华, 何兰娟, 朱向东. 四神丸对脾肾阳虚型溃疡性结肠炎模型大鼠结肠组织 Toll 样受体 4 及其负性调控因子 IRAK-M 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(14):70-76.
- [22] SONG X, ZHANG W, WANG T, et al. Geniposide plays an anti-inflammatory role via regulating TLR4 and downstream signaling pathways in lipopolysaccharide -induced mastitis in mice [J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1588-1598.
- [23] ZHONG W T, JIANG L X, WEI J Y, et al. Protective effect of esculentoside A on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1):364-372.
- [24] LAI J L, LIU Y H, LIU C, et al. Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF- κ B and MAPK signaling pathways [J]. *Inflammation*, 2017, 40(1): 1-12.
- [25] 曹中伟, 王潇, 尤广宁, 等. 浆细胞性乳腺炎分期与相关炎症因子及其信号通路的机制研究 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2019, 7(12):84-85.
- [责任编辑 周冰冰]