

芒果苷抑制哮喘小鼠气道炎症的机制

郭宏伟^{1,2}, 邓家刚^{1*}, 运晨霞¹, 侯光菡¹, 杜军¹

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**观察芒果苷对哮喘小鼠气道炎症的影响,探讨芒果苷平喘的作用机制。**方法:**将 72 只 4~5 周 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、地塞米松阳性对照组(0.001 25 g·kg⁻¹)、芒果苷高、中、低剂量组(0.4, 0.2, 0.1 g·kg⁻¹)。采用卵白蛋白(OVA)致敏和激发构建小鼠哮喘模型,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)进行细胞计数及分类;肺组织病理切片 HE 染色观察炎性细胞浸润情况;采用 ELISA 法检测小鼠血清中 OVA 特异性 IgE(OVA-sIgE)和 BALF 中白三烯 C₄(LTC₄),前列腺素 D₂(PGD₂)的含量。**结果:**芒果苷高、中、低剂量组 BALF 中嗜酸性粒细胞(EOS)比例由模型组(6.57±1.44)%降低为(1.63±0.43, 2.72±0.83, 4.11±1.08)%($P<0.01\sim P<0.05$);芒果苷高、中剂量组 BALF 中白细胞总数由模型组(83.25±10.19)×10⁵/mL 减少为(25.66±6.16, 53.38±9.19)×10⁵/mL($P<0.01$);芒果苷各剂量均可不同程度的改善肺组织的病理学改变,减轻气道炎症;芒果苷高、中、低剂量组血清中 OVA-sIgE 含量由模型组(0.26±0.04)ng·mL⁻¹降低为(0.10±0.04, 0.12±0.02, 0.18±0.03)ng·mL⁻¹($P<0.01$);芒果苷高剂量组 BALF 中 PGD₂ 水平由模型组(74.36±22.72)ng·mL⁻¹降低为(60.30±12.19)ng·mL⁻¹($P<0.05$),而芒果苷中、低剂量组对 PGD₂ 的降低无统计学差异;芒果苷各剂量对 LTC₄ 水平有降低趋势。**结论:**芒果苷可通过减少 EOS 浸润、小鼠体内 OVA-sIgE 和 PGD₂ 含量,抑制哮喘小鼠的气道炎症,在治疗哮喘方面有潜在的应用前景。

[关键词] 芒果苷;哮喘;肺泡灌洗液;嗜酸性粒细胞;白三烯 C₄;前列腺素 D₂

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0187-04

Mechanism of Mangiferin Inhibiting the Airway Inflammation in a Murine Model of Asthma

GUO Hong-wei^{1,2}, DENG Jia-gang^{1*}, YUN Chen-xia¹, HOU Guang-han¹, DU Jun¹

(1. Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530001, China;

2. Shandong Traditional Chinese Medicine University, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect and mechanism of mangiferin on the airway inflammation in BALB/c mice model of asthma. **Method:** Seventy-two BALB/c mice, aged 4-5 weeks, were randomly divided into 6 groups: normal control group, model control group, dexamethasone group (0.001 25 g·kg⁻¹), mangiferin high-dose group (0.4 g·kg⁻¹), mangiferin middle-dose group (0.2 g·kg⁻¹) and mangiferin low-dose group (0.1 g·kg⁻¹). The mice were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) to establish a murine model of asthma. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected for total and differential cell count. HE staining was used to observe airway inflammation in lung tissue. Quantification of leukotriene C₄ (LTC₄), prostaglandin D₂ (PGD₂) in BALF and OVA special immunoglobulin E (OVA-sIgE) in serum were detected by ELISA. **Result:** The number of eosinophil (EOS) in BALF, compared with model group (6.57±1.44)%, could obviously be reduced by three mangiferin groups (1.63±0.43, 2.72±0.83, 4.11±1.08)% ($P<0.01\sim P<0.05$). The total number of white cells in BALF, compared with model group (83.25±10.19)×10⁵/mL,

[收稿日期] 20110908(006)

[基金项目] 2009 年广西科技厅自治区重点实验室培育项目(09-007-06)

[第一作者] 郭宏伟,在读博士,从事中药药效筛选研究, Tel:13407734666, E-mail:105360336@qq.com

[通讯作者] * 邓家刚,教授,博士研究生导师,从事新药开发与中药药效筛选研究, Tel:13877158896

could be cut down by mangiferin high-dose and middle-dose group ($25.66 \pm 6.16, 53.38 \pm 9.19$) $\times 10^5/\text{mL}$ ($P < 0.01$); HE staining showed that three mangiferin groups could improve, to some extent, the histological changes of lung and bronchus and reduce airway inflammation. The level of OVA-sIgE in serum, compared with the model group (0.26 ± 0.04) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, could significantly be decreased by three mangiferin groups ($0.10 \pm 0.04, 0.12 \pm 0.02, 0.18 \pm 0.03$) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.01$). And the level of PGD_2 in BALF, compared with model group (74.36 ± 22.72) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, could be reduced by mangiferin high-dose group (60.30 ± 12.19) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.05$). For the level of LTC_4 , there was a reduce tendency in every mangiferin group, but no statistical significance. **Conclusion:** Mangiferin, through reducing the number of EOS, decreasing the level of OVA-sIgE and PGD_2 in mice, could obviously inhibit the airway inflammation in mice model of asthma, which promises to be a potential drug in the treatment of allergic asthma.

[**Key words**] mangiferin; asthma; bronchoalveolar lavage fluid; eosinophil; leukotriene C_4 ; prostaglandin D_2

芒果苷 (mangiferin) 是漆树科植物芒果叶 (*Mangifera indica* L.) 中的主要活性成分, 又名芒果素、知母宁, 是一种天然多酚类化合物, 分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$, 相对分子质量 422, 具有解热、抗炎、抗病毒、免疫调节、止咳平喘等多种药理活性^[1-2]。本课题组前期研究表明芒果苷及芒果苷单钠盐均可显著延长乙酰胆碱-组胺诱发豚鼠喘息的引喘潜伏期时间^[3-4], 古巴学者最近也报道了芒果苷具有抑制哮喘小鼠气道炎症及 Th2 型细胞因子的作用^[5], 但对芒果苷抑制气道炎症的机制缺乏系统研究。本实验利用卵白蛋白 (OVA) 诱导的 BALB/c 小鼠哮喘模型, 通过观察芒果苷对哮喘小鼠气道炎症细胞及炎症介质的影响, 进一步探讨了芒果苷平喘的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 芒果苷 (由广西中医学院中药药效筛选研究中心提供, 纯度 98.5%); OVA (Grade V, Sigma 公司, 批号 118K7002); $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶 ($13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, Sigma 公司, 批号 MKBC0623); 地塞米松 (浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 090754); OVA-sIgE 酶联免疫分析试剂盒 (GBD 公司, 批号 0035-52); 白三烯 C_4 (LTC_4) 酶联免疫分析试剂盒 (R&D 公司, 批号 CK-E20358M); 前列腺素 D_2 (PGD_2) 酶联免疫分析试剂盒 (R&D 公司, 批号 CK-E30441M)。

1.2 动物 4~5 周 SPF 级、健康 BALB/c 雌性小鼠 72 只, 体重 (18 ± 2) g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (桂) 2009-0002。

1.3 仪器 EL204 1/万电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), PARI TurBOY N 型空气压缩雾化器 ($0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 德国百瑞公司), 5810R 型低温超速离心机 (德国 Eppendorf 公司), Elx800 型全自动

酶标仪 (奥地利 DIALAB 公司), BX60 型光学显微镜 (日本 Olympus 株式会社), Nikon D700 型数码相机 (1210 万像素, 日本尼康株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 BALB/c 雌性小鼠 72 只, 随机分为 6 组, 分别为正常对照组, 模型对照组, 地塞米松阳性对照组, 芒果苷高、中、低剂量组, 每组 12 只。各组于实验第 16~29 天 ig, 芒果苷治疗组给药剂量分别为 $0.4, 0.2, 0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 地塞米松组给药剂量为 $0.00125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig 体积 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 空白和模型对照组 ig 给予等量生理盐水。

2.2 模型制备 除正常组外, 其余各组小鼠分别于实验第 1, 8, 15 天 ip OVA 致敏液 (含 OVA $20 \mu\text{g}$ + 氢氧化铝佐剂 $150 \mu\text{L}$) $0.2 \text{ mL}/\text{只}$ 。于第 25~29 天将小鼠置于特制的密闭玻璃容器中, 以 1% OVA 进行雾化吸入激发, $20 \text{ min}/\text{次}$, $1 \text{ 次}/\text{日}$ 。正常组采用 PBS 液 (pH 7.4, 高压灭菌) 代替。

2.3 行为学观察 激发时观察小鼠有无头面部瘙痒、喷嚏或呛咳、呼吸急促、躁动不安、紫绀、腹肌抽搐、俯卧不动、大小便失禁等变化。

2.4 血清 OVA-sIgE 及 BALF 中 LTC_4 , PGD_2 含量测定和细胞分类计数 各组于末次激发 24 h 后, 摘眼球取血, 静置后, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10 \text{ min}$), 取血清。小鼠取仰卧位固定, 分离颈部皮肤暴露气管, 结扎右肺, 左肺用预冷无菌 PBS 行支气管肺泡灌洗, 灌洗体积为 0.6 mL , 分两次进行, 回收支气管肺泡灌洗液约 1.0 mL (回收率 80%) 于无菌 EP 管中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 ($3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1} \times 10 \text{ min}$), 分别收集上清液及沉淀。用 ELISA 法检测血清中 OVA-sIgE、BALF 上清中 LTC_4 和 PGD_2 的含量, 具体步骤按试剂盒说明书进行。BALF 沉淀用 0.5 mL 预冷

无菌 PBS 重悬,取 0.1 mL 于血细胞计数板测定细胞总数,取 0.2 mL 涂片,瑞氏染色,计数 300 个细胞作细胞分类计数。

2.5 肺组织标本制备 肺泡灌洗结束后,取小鼠右肺置于 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋切片,HE 染色观察炎性细胞浸润情况。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 行为学表现 模型组小鼠于激发时出现烦躁不安、抓耳挠腮、喷嚏或呛咳、呼吸急促,收腹明显,并随着激发次数的增加不断加重,口鼻、耳朵及脚趾

部紫绀严重,食欲降低,粪便增多稀溏,多数激发时小鼠弓背或俯卧不动,反应迟钝,毛色较差且无光泽。各给药组小鼠亦出现抓耳挠腮、喷嚏或呛咳、呼吸急促,呼吸幅度加深等症状,但与模型组相比较轻,且症状从出现至消失的时间比模型组短。正常组激发过程中只出现轻微的抓耳挠腮、喷嚏或呛咳现象,说明模型激发成功。

3.2 对哮喘小鼠 BALF 中白细胞总数及分类的影响 与正常组相比,模型组小鼠 BALF 中白细胞总数及 EOS 比例均明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,地塞米松组及芒果苷高、中剂量组均能减少白细胞总数及 EOS 比例($P < 0.01$)。芒果苷低剂量组可降低 EOS 比例($P < 0.05$),但对白细胞总数影响不大。见表 1。

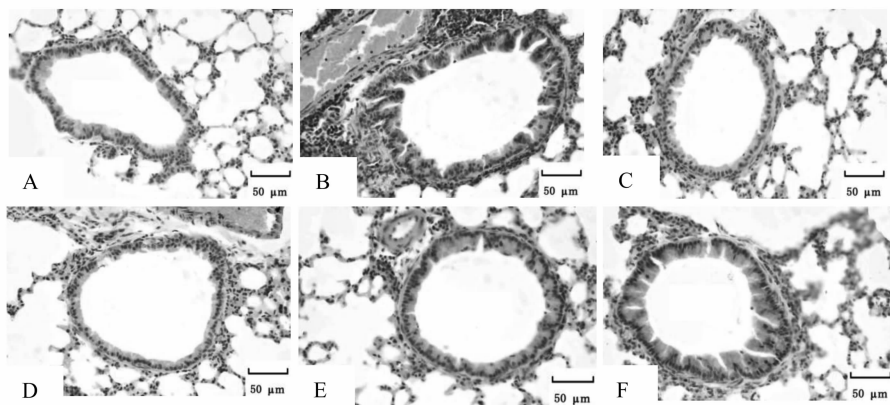
表 1 BALF 中白细胞总数及细胞分类($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	白细胞总数 /×10 ⁵ /mL	细胞分类 /%			
			嗜酸粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	单核细胞
正常	-	8.10 ± 0.78 ²⁾	0.96 ± 0.10 ²⁾	13.26 ± 1.35 ²⁾	25.00 ± 2.41 ²⁾	60.57 ± 6.02 ²⁾
模型	-	83.25 ± 10.19	6.57 ± 1.44	50.02 ± 8.54	34.92 ± 3.15	8.26 ± 1.09
地塞米松	1.25 × 10 ⁻³	22.51 ± 5.95 ²⁾	1.03 ± 0.05 ²⁾	42.94 ± 4.19 ¹⁾	32.20 ± 5.99	23.21 ± 2.46 ²⁾
芒果苷	0.4	25.66 ± 6.16 ²⁾	1.63 ± 0.43 ²⁾	45.96 ± 9.94	35.01 ± 4.11	17.02 ± 1.23 ²⁾
	0.2	53.38 ± 9.19 ²⁾	2.72 ± 0.83 ²⁾	47.27 ± 5.16	42.31 ± 4.67 ¹⁾	7.42 ± 0.93
	0.1	79.37 ± 13.40	4.11 ± 1.08 ¹⁾	53.84 ± 8.20	32.38 ± 3.7 ¹⁾	9.60 ± 1.89

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 芒果苷对哮喘小鼠肺组织病理改变的影响 由图 1 可以看到,模型组支气管壁增厚,气道黏膜皱襞增多,管腔狭窄,上皮细胞肿胀脱落。肺泡壁明显增厚充血、水肿及炎细胞浸润。肺间隔细胞成分增

多,黏膜下和支气管周围组织有大量以 EOS 为主的炎性细胞浸润。与模型组比较,芒果苷各个剂量组和地塞米松组肺组织上述病变明显减轻,其中芒果苷高剂量组效果尤为明显。



A. 正常组;B. 模型组;C. 地塞米松组(1.25 mg·kg⁻¹);D. 芒果苷高剂量组(0.4 g·kg⁻¹);

E. 芒果苷中剂量组(0.2 g·kg⁻¹);F. 芒果苷低剂量组(0.1 g·kg⁻¹)

图 1 芒果对哮喘小鼠肺组织病理改变的影响(HE 染色 × 400)

3.4 对哮喘小鼠血清 OVA-sIgE 及 BALF 中 LTC₄、PGD₂ 含量的影响 模型组小鼠血清中 OVA-sIgE 和

BALF 中 LTC₄、PGD₂ 水平均较正常组明显升高($P < 0.01 \sim 0.05$)。与模型组比较,芒果苷各剂量

组和地塞米松组均可显著降低血清中 OVA-sIgE 含量 ($P < 0.01$); 芒果苷高剂量组和地塞米松组可降低 BALF 中 PGD₂ 水平 ($P < 0.01 \sim 0.05$), 而芒果苷

中、低剂量组对 PGD₂ 的降低无统计学差异; 芒果苷各剂量组对 LTC₄ 水平均有降低趋势, 但无统计学意义。见表 2。

表 2 血清 OVA-sIgE 及 BALF 中 LTC₄、PGD₂ 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	OVA-sIgE /μg·L ⁻¹	BALF /μg·L ⁻¹	
			LTC ₄	PGD ₂
正常	-	0.03 ± 0.01 ²⁾	52.57 ± 19.06 ¹⁾	47.56 ± 12.61 ²⁾
模型	-	0.26 ± 0.04	75.27 ± 22.18	74.36 ± 22.72
地塞米松	1.25 × 10 ⁻³	0.05 ± 0.03 ²⁾	56.07 ± 16.76 ¹⁾	54.25 ± 13.37 ²⁾
芒果苷	0.4	0.10 ± 0.04 ²⁾	63.63 ± 19.54	60.30 ± 12.19 ¹⁾
	0.2	0.12 ± 0.02 ²⁾	67.90 ± 21.12	62.90 ± 14.58
	0.1	0.18 ± 0.03 ²⁾	66.25 ± 29.49	69.58 ± 13.30

4 讨论

支气管哮喘是一种由多种细胞(如肥大细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、T 淋巴细胞、气道上皮细胞)和细胞组分参与的气道慢性变应性疾病^[6]。研究表明哮喘患者的气道炎症与体内高水平的 IgE 及 Th1/Th2 细胞因子失衡有关, 当机体遇到诱发因素时, IgE 与肥大细胞膜上的受体结合促使它们释放各种介质如组胺、前列腺素(PG)、白三烯(LTs)等, 这些炎症介质直接参与哮喘气道炎症、气道高反应性(AHR)、平滑肌痉挛和气道重塑, 并和其他细胞因子相互影响构成哮喘的病理生理基础^[7]。IL-4、IL-5 等 Th2 型细胞因子可促进体内 IgE 的合成以及 EOS 的增生活化, 诱导 EOS 向气道炎症部位聚集并释放嗜酸性粒细胞阳离子蛋白(ECP)、主要碱性蛋白(MBP)和过氧化物酶(EPO)等毒性蛋白颗粒, 引起气道慢性炎症的持续发生及 AHR^[8]。

芒果苷的前期研究结果已证实芒果苷及芒果苷单钠盐均可显著延长乙酰胆碱-组胺诱发豚鼠喘息的引喘潜伏期时间。本研究是利用不同的哮喘模型进一步探讨了芒果苷平喘的作用及其机制。实验结果显示芒果苷可明显减轻哮喘小鼠肺组织病理学改变、抑制 EOS 的数量及其在气道的浸润, 减轻气道炎症。对于引起气道炎症的主要炎症介质检测, 我们发现芒果苷可以减少哮喘小鼠 BALF 中 PGD₂ 的含量, 但对 LTC₄ 的抑制作用不明显, 说明芒果苷可通过环氧化酶途径抑制花生四烯酸的代谢, 从而发挥抗炎作用, 与此前芒果苷的相关研究结果一致^[9]。另外, 本研究结果亦显示, 芒果苷干预后, 可明显降低血清中 OVA-sIgE 水平, 说明芒果苷可以调节哮喘小鼠体内免疫的类型, 其原因可能与芒果

苷纠正 Th1/Th2 细胞因子失衡从而发挥免疫调节作用有关。本实验为芒果苷治疗哮喘提供了新的理论依据, 其作用机制可能是多方面的, 值得进一步深入探讨。

[参考文献]

[1] 任晓光, 李东伟, 何彩梅, 等. 芒果苷药理活性研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(5): 860.

[2] 邓家刚, 郑作文, 杨柯. 芒果苷对内毒素致热家兔体温的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(2): 72.

[3] 邓家刚, 郑作文, 曾春晖. 芒果苷的药效学实验研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(6): 802.

[4] 袁叶飞, 邓家刚, 余昕, 等. 芒果苷单钠盐的药效学实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 816.

[5] Rivera D G, Hernández I, Merino N, et al. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin reduce the airway inflammation and Th2 cytokines in murine model of allergic asthma[J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(10): 1336.

[6] 卓进盛. 补肺汤治疗支气管哮喘慢性持续期的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 256.

[7] 南云蓉, 刘东芹. 孟鲁司特钠治疗小儿轻、中度持续性哮喘[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14): 313.

[8] 冯里, 徐立, 范欣生, 等. 三拗汤及类方挥发油对卵蛋白致敏哮喘豚鼠模型的效应评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(5): 35.

[9] 邓家刚, 阎莉, 郭力城. 芒果苷对花生四烯酸代谢产物的影响[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 8(8): 62.

[责任编辑 聂淑琴]