

## 小儿止咳颗粒对急性肺损伤小鼠 高迁移率族蛋白 B-1 含量的影响

温丽娜, 孙建宁\*, 张硕峰

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

**[摘要]** 目的: 观察小儿止咳颗粒对急性肺损伤小鼠晚期炎症介质高迁移率族蛋白 B-1 (high mobility group box-1 protein, HMGB-1) 含量的影响。方法: 将 ICR 小鼠随机分成 6 组, 分别测定空白组和脂多糖 (LPS) 尾 iv 致小鼠急性肺损伤后 24, 36, 48, 72, 96 h 血清中 HMGB-1 的含量, 确定其含量最高的时间点。将 ICR 小鼠随机分为空白对照组、模型组、小儿止咳颗粒高、中、低剂量组、醋酸地塞米松组; 除空白组外, 各组尾 iv LPS 造成急性肺损伤模型, 给药组分别 ig 给予小儿止咳颗粒 5.4, 2.7, 1.35 g·kg<sup>-1</sup> 及醋酸地塞米松 0.5 mg·kg<sup>-1</sup>, 空白组 ig 给予等量生理盐水, 在 iv LPS 72 h 测定各组小鼠血清中 HMGB-1 的含量。结果: iv LPS 后 72 h, 小鼠血清中 HMGB-1 的含量最高, 在该时间点, 与模型组相比小儿止咳颗粒高、中、低剂量均能够抑制 HMGB-1 含量的增高 ( $P < 0.05$ )。结论: 小儿止咳颗粒对晚期炎症介质 HMGB-1 含量的增高具有一定的抑制作用, 这可能是其发挥治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽作用的机制之一。

**[关键词]** 小儿止咳颗粒; 高迁移率族蛋白 B-1; 急性肺损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0202-03

## Effect of Xiaoer Zhike Granule on Serum High Mobility Group Box-1 Protein Level of Acute Lung Injury in Mice

WEN Li-na, SUN Jian-ning\*, ZHANG Shuo-feng

(Department of Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Xiaoer Zhike Granule on serum high mobility group box-1 protein (HMGB-1) level in lung tissues of mice with endotoxin shock. **Method:** ICR mice were divided into six groups, except the blank group, all other groups were injected with LPS by the tails vein to establish the lung tissue injury model. The blank group was only received an injection of same volume of saline. The serum HMGB-1 level at 24, 36, 48, 72 and 96 h was investigated respectively to explore the time of the highest content. ICR mice were divided into six groups as follows: blank, model, Xiaoer Zhike Granule high, middle, low group, dexamethasone acetate tablets. The effect of Xiaoer Zhike Granule on serum HMGB-1 content of sepsis mice was studied at the point of 72 h. **Result:** Serum HMGB-1 got to the highest level at 72 h after injection of LPS. Xiaoer Zhike Granule could inhibit the content's increase in HMGB-1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Xiaoer Zhike Granule can decrease serum HMGB-1 content, which maybe related to its function.

**[Key words]** Xiaoer Zhike Granule; high mobility group box-1 protein; acute lung injury

小儿上呼吸道感染后咳嗽是儿科常见疾病, 治疗不当, 可发展为慢性咳嗽。一般认为上呼吸道感染后咳嗽的致病机制为气道高反应性 (AHR)。AHR 与气道炎症密切相关。高迁移率族蛋白 B-1 (HMGB-1) 作为一种晚期炎症介质, 是在内毒素血

**[收稿日期]** 20100603(001)

**[第一作者]** 温丽娜, 硕士研究生, E-mail: can858@163.com

**[通讯作者]** \* 孙建宁, 教授, 博士生导师, 国家药典委员, Tel: 010-84738627, E-mail: jn\_sun@sina.com

症和脓毒血症中发现的。近年来研究表明 HMGB-1 在呼吸系统疾病中亦发挥着重要作用,如促进气道炎症介质的释放,加速肺损伤等<sup>[1]</sup>。HMGB-1 与炎症细胞具有相互作用,可能间接诱导 AHR 的发生。因此,特异性的干预晚期炎症介质 HMGB-1,可能成为治疗上呼吸道感染后咳嗽的新策略。

小儿止咳颗粒由黄芪、金荞麦等中药组成,具有清肺化痰,止咳利咽的功能。方中黄芪补气固表,金荞麦清肺解毒,全方扶正祛邪,化痰止咳,用于小儿上呼吸道感染后咳嗽的治疗。鉴于 HMGB-1 与上呼吸道感染后咳嗽的致病机理 AHR 相关,本文在前期工作的基础上,借助于 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠模型,研究肺损伤时 HMGB-1 的含量随时间的变化情况,以及小儿止咳颗粒对其含量的影响,以期进一步探讨小儿止咳颗粒治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽的作用机制。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 小儿止咳颗粒:由北京创立科创医药技术开发有限公司提供,批号 20090329;规格 0.21 g 膏粉/g 生药;醋酸地塞米松片:天津太平洋制药有限公司产品,批号 070404;脂多糖(LPS):美国 Sigma 公司,批号 082012;HMGB-1 Elisa 试剂盒:美国 EVER 公司,批号 090401;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号 20091110。

**1.2 动物** ICR 小鼠,雄性,体重 12~14 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

**1.3 仪器** DENLEY DRAGON Wellscan MK 酶标仪及 Wellwash 4 MK2 洗板机;Thermo 公司产品(芬兰);TGL-168 型离心机:上海安亭科学仪器厂品。

## 2 方法

**2.1 LPS iv 致急性肺损伤小鼠不同时段血清中 HMGB-1 含量的测定** 小鼠随机分成 6 组,即空白对照组,24,36,48,72,96 h 组,每组 8 只,除空白对照组外,尾静脉 iv LPS  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,造成急性肺损伤模型,分别于造模后 24,36,48,72,96 h 摘眼球取血,室温静置 2 h 后离心,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心 20 min,分离血清,以 ELISA 法测定血清中 HMGB-1 的含量。同时测定血清中蛋白含量,具体步骤按照考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒说明书操作。结果以每毫克蛋白所含细胞因子表示( $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。做出造模后不同时间点 HMGB-1 含量的直方图。

**2.2 小儿止咳颗粒对 LPS 致急性肺损伤小鼠血清 HMGB-1 含量的影响**

**2.2.1 分组及给药** 小鼠随机分成 6 组,每组 12 只。分别为空白对照组、模型组、小儿止咳颗粒  $5.4, 2.7, 1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组;醋酸地塞米松  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  阳性对照组。分别按剂量 ig 给药,空白对照组 ig 给予饮用水。每日 1 次,连续给药 3 d。

**2.2.2 造模及取材** 第 3 次给药后 24 h,小鼠尾静脉 iv 内毒素  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,同时每天如前法给药。小鼠尾静脉 iv 内毒素 72 h 后,摘眼球取血,血液样品室温放置 2 h 后,  $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min。取上清,将血清样品于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下冻存,备用。以 ELISA 法测定血清中 HMGB-1 的含量。测定血清中蛋白含量,具体步骤按照考马斯亮蓝法蛋白定量试剂盒说明书操作。结果以每毫克蛋白所含细胞因子皮克数表示( $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ )。

**2.3 统计学处理** 实验数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,各组数据进行单因素方差分析,组间比较方差齐者用 LSD 检验,不齐者用 Dunnett's T3 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 LPS iv 致急性肺损伤小鼠不同时点血清中 HMGB-1 含量** 结果见图 1。在小鼠尾静脉 iv LPS 致急性肺损伤后 72 h,血清中 HMGB-1 的含量最高,故可以此为依据选取合适的时间点进行药物对 HMGB-1 含量的干预作用的研究。

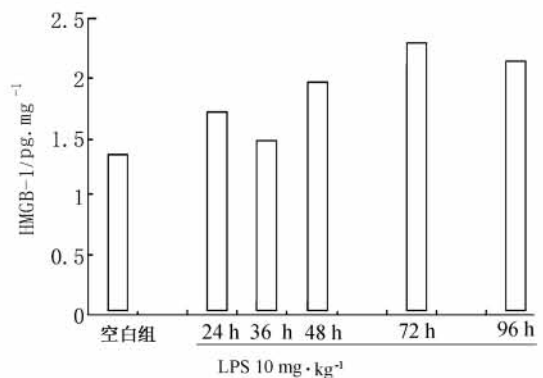


图 1 LPS iv 致急性肺损伤小鼠不同时点血清中 HMGB-1 的含量变化

**3.2 小儿止咳颗粒对 LPS 致急性肺损伤小鼠血清 HMGB-1 含量的影响** 结果见表 1。小儿止咳颗粒大、中、小剂量均能抑制 LPS 致小鼠急性肺损伤后 72 h 血清中晚期炎症介质 HMGB-1 含量的增加(与模型组比  $P < 0.05$ )。

表 1 小儿止咳颗粒对 LPS 致急性肺损伤 72 h  
小鼠血清中 HMGB-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	HMGB-1
模型	-	1.68 ± 0.24
空白	-	1.34 ± 0.13 <sup>2)</sup>
小儿止咳颗粒	5.4	1.48 ± 0.21 <sup>1)</sup>
	2.7	1.45 ± 0.22 <sup>1)</sup>
	1.35	1.40 ± 0.34 <sup>1)</sup>
醋酸地塞米松	0.0005	1.35 ± 0.17 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

近年来,对 HMGB-1 的研究日益深入。作为一种存在于细胞核和细胞浆中的 DNA 结合蛋白, HMGB-1 可被受刺激的单核巨噬细胞主动分泌或由坏死的细胞被动释放到细胞外,在诸多炎症性疾病中发挥“晚期”炎症介质的作用。不同于早期炎症介质,在炎症发生 12 ~ 18 h 后血清中 HMGB-1 的活性升高并维持在较高水平<sup>[2]</sup>,因此特异地抑制 HMGB-1 的释放和活性可能为治疗晚期炎症介质介导的疾病提供一种新思路。

目前研究发现诸多炎症性疾病都与 HMGB-1 相关。在肺组织中, HMGB-1 亦具有促炎细胞因子样作用,是介导急性肺部炎症反应的重要介质<sup>[1]</sup>。人体试验研究显示, HMGB-1 能够激活肺中性粒细胞,并通过 MAPK/ERK1/2 信号转导通路促进生物活性分子的表达<sup>[3]</sup>。气管内滴注 HMGB-1 24 h 后,小鼠肺中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 巨噬细胞炎症蛋白 2 (MIP-2) 的表达明显增强,引起中性粒细胞活化并向肺泡聚集,同时肺间质水肿,导致肺组织的急性损伤;内毒素处理前后使用抗 HMGB-1 抗体治疗均可显著减轻内毒素所致的肺损伤,而 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  等早期炎症介质的表达则不受影响,说明 HMGB-1 是内毒素致急性肺损伤的晚期炎症介质<sup>[1]</sup>。

肺损伤是一个复杂的病理生理过程,中性粒细胞的集聚、肺间质水肿等炎症反应是肺损伤的重要机制<sup>[3]</sup>。中性粒细胞集聚于肺脏可能是通过具有诱导和激活效应的趋化因子所引起的,使用特异性 6 肽阻断 I 和 II 型 2c 趋化因子能显著抑制中性粒细胞浸润并减轻 HMGB-1 诱导的肺损伤<sup>[4]</sup>。离体研究表明,重组 HMGB-1 能促进炎症介质释放和中性粒

细胞的活化聚集,从而加重肺损伤<sup>[3]</sup>。

在不同的疾病中, HMGB-1 的峰值表达时间不同。故本文设立了造模后 24, 36, 48, 72, 96 h 5 个时间点,探索不同时段 LPS iv 致急性肺损伤小鼠血清中 HMGB-1 的含量,结果表明在 iv LPS 后 72 h 小鼠血清中 HMGB-1 的含量最高,证实了 HMGB-1 是区别于 TNF- $\alpha$  等早期炎症因子的晚期炎症介质。

HMGB-1 与炎性细胞的作用是相互的。如巨噬细胞、单核细胞、垂体细胞受内毒素, IL-2, TNF- $\alpha$  刺激后均能释放 HMGB-1, HMGB-1 也可刺激单核细胞释放致炎因子,如 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  等<sup>[5]</sup>。引起小儿上呼吸道感染后咳嗽的气道高反应性是众多炎性细胞、炎性介质共同作用的结果,这期间可能包括了 HMGB-1 与其他炎性细胞、炎性介质的相互作用。本文以 HMGB-1 含量的达峰时间为依据选取时间点,研究了小儿止咳颗粒对小鼠急性肺损伤后 72 h 血清 HMGB-1 含量的干预作用。结果表明小儿止咳颗粒高、中、低剂量均能抑制 LPS 致急性肺损伤小鼠血清中晚期炎症介质 HMGB-1 含量的增加,这可能是小儿止咳颗粒治疗小儿上呼吸道感染后咳嗽的作用机制之一。

#### [参考文献]

- [1] Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, et al. Cutting edge: HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation [J]. J Immunol, 2000, 165(6): 2950.
- [2] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. J Exp Med, 2000, 192(4): 565.
- [3] 孟志艳, 李军, 曹红. HMGB-1 在呼吸系统疾病中的作用 [J]. 山东医药, 2009, 49(8): 107.
- [4] Lin X, Yang H, Sakuragi T, et al. Alpha-chemokine receptor blockade reduces high mobility group box 1 protein-induced lung inflammation and injury and improves survival in sepsis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(4): L583.
- [5] 姚咏明, 盛志勇. 高迁移率族蛋白-1 在脓毒症发病中的作用和意义 [J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(9): 752.

[责任编辑 聂淑琴]