



芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子及受体的干预作用

刘家齐, 赵正晓, 魏颖, 徐飞, 张红英, 李密辉, 陆林玮, 魏凯, 董竞成*

(复旦大学附属华山医院, 上海 200040)

【摘要】 目的 观察芍药苷给药后对小鼠哮喘模型气道炎症趋化因子及受体的影响。方法 用卵蛋白(OVA)致敏和激发建立小鼠哮喘模型; ELISA法检测血清IL-6、TNF- α 水平及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中卵蛋白特异性IgE(OVA-IgE)和趋化因子CCL19、CCL21水平; RT-PCR法检测肺组织中趋化因子受体CCR7mRNA表达; Western blot检测肺组织CCR7及核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白表达。结果 芍药苷干预组小鼠血清IL-6、TNF- α 水平显著下降; BALF中OVA-IgE和CCL19、CCL21水平显著降低; 肺组织CCR7mRNA、CCR7及NF- κ B蛋白表达明显减少。结论 芍药苷对哮喘模型小鼠气道炎症趋化因子CCL19/CCL21及其受体CCR7具有显著的抑制作用。

【关键词】 支气管哮喘; 气道炎症; 趋化因子; NF- κ B; 芍药苷; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0460-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.004

Inhibitory effect of paeoniflorin on inflammatory chemokines and their receptor in a mouse model of asthma

LIU Jia-qi, ZHAO Zheng-xiao, WEI Ying, XU Fei, ZHANG Hong-ying,
LI Mi-hui, LU Lin-wei, WEI Kai, DONG Jing-cheng*

(Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of paeoniflorin on inflammatory chemokines and their receptor in a rat model of ovalbumin-induced asthma. **Methods** Sixty 6-week old SPF female BALB/c mice were used in this study. To establish a mouse model of asthma by sensitizing and challenging with ovalbumin. ELISA was used to analyze the serum IL-6 and TNF- α , and the specific IgE against ovalbumin (OVA-IgE), CCL19 and CCL21 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). RT-PCR was performed to determine CCR7mRNA and protein expression of chemokine receptor CCR7, and the level of NF- κ B was tested by Western blot. **Results** In the paeoniflorin groups, the serum IL-6 and TNF- α levels were significantly lower, and the OVA-IgE, CCL19 and CCL21 levels in BALF were significantly reduced, compared with that in the control group. CCR7mRNA and protein expression of chemokine receptor CCR7 and NF- κ B in the lung were significantly reduced by paeoniflorin. **Conclusions** Paeoniflorin has a remarkably inhibitory effect on the airway inflammatory chemokines CCL19/CCL21 and the receptor CCR7 in the mouse model of asthma.

【Key words】 Bronchial asthma; Airway inflammation; Chemokines; Receptor; NF- κ B; Paeoniflorin; Mouse

Corresponding author: DONG Jing-cheng. E-mail: jcdong2004@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81173390, 81403476, 81302931)。

[作者简介] 刘家齐(1986-)男, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合哮喘研究。E-mail: erick0720@163.com。

[通讯作者] 董竞成, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肺病, 炎症性疾病及肿瘤研究。E-mail: jcdong2004@126.com。

支气管哮喘是免疫球蛋白 E(IgE)介导的以炎症、嗜酸性粒细胞浸润及气道高反应性为重要特征的慢性气道疾病。多种趋化因子、炎性因子及炎症信号通路交织作用,构成了哮喘的庞杂网络。全球约有 3 亿哮喘患者,造成每年约 25 万人死亡以及数十亿美元医疗费用支出。虽然皮质激素吸入一定程度降低了哮喘死亡率,但该病发病率依旧不断攀升^[1]。而当前新的治疗方法匮乏以及治疗效率低下,使得针对哮喘有效的、安全的干预药物的需求日益迫切。芍药苷是赤芍中的主要效应成分,本团队前期研究表明,芍药苷对哮喘气道炎症具有显著的拮抗作用^[2-3]。本实验拟在前期基础之上,利用卵蛋白诱导的哮喘小鼠模型,进一步探讨芍药苷对气道炎症中关键趋化因子及其受体的影响,充分发掘中医药宝库,为当前哮喘防治手段匮乏的局面提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 BALB/c 小鼠 60 只,雌性,6 周龄,体重(16±3)g,购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】。由复旦大学药学院实验动物中心饲养【SYXK(沪)2010-0099】。超声雾化器(402AI 型):江苏鱼跃医疗设备股份有限公司;芍药苷:纯度≥98%,成都曼思特生物科技有限公司;地塞米松片:山东新华制药股份有限公司;卵蛋白(OVA, grade V)、氢氧化铝:Sigma, 美国;卵蛋白特异性 IgE(OVA-IgE)试剂盒:Shibayagi, 日本;CCL19、CCL21、IL-6、TNF-α 试剂盒:Raybiotech, 美国;抗鼠 CCR7、p-IκBα 及 p-p65 抗体:Abcam, 英国。

1.2 动物分组、建模及药物干预

将 60 只 BALB/c 小鼠随机编成 6 组:NC(正常对照组,10 只)、A(哮喘模型组)、P 10(芍药苷 10 mg/kg 组,10 只)、P 25(芍药苷 25 mg/kg 组,10 只)、P 50(芍药苷 50 mg/kg 组,10 只)及 DXM(地塞米松 0.085 mg/kg 组,10 只)。参照文献^[4],第 0 天起予 BALB/c 小鼠腹腔注射 0.2 mL 生理盐水混悬液(20 μg OVA + 2 mg 氢氧化铝),小鼠处于致敏状态。第 7、14 和 21 天分别以相同方法加强致敏三次。第 25 天起利用超声雾化器将 3% OVA 直接作用于小鼠肺部,连续 7 d,每天 1 次,每次持续 30 min。小鼠出现口唇发绀、呼吸加快、腹肌痉挛、点头呼吸及站立不稳等,表明哮喘模型建立成功。第 24

天起,予对应干预组小鼠分别进行芍药苷低、中、高剂量及地塞米松溶液灌胃,连续灌服 8 d,每天 1 次,每次 0.3 mL;对照组小鼠灌服等量的生理盐水。

1.3 标本检测

1.3.1 BALF 中 OVA-IgE、趋化因子及血清 IL-6、TNF-α 检测

气道高反应性测试后^[3],将气管灌洗针插入左支气管处,开胸结扎右主支气管和右肺,一次性注射器抽取 PBS 0.3 mL 缓慢推入左肺并迅速回抽灌洗液,灌洗 2~3 次。回收的 BALF 离心后取上清,用 ELISA 检测 BALF 中 OVA-IgE、趋化因子及血清 IL-6、TNF-α 水平。

1.3.2 肺组织中 CCR7mRNA 表达检测

取下结扎的右侧肺组织,液氮迅速固定。采用 RT-PCR 检测肺组织中 CCR7mRNA 表达水平。依照说明书进行抽提组织 RNA,经逆转录合成 cDNA,最后使用 PCR 进行扩增产物。引物序列,CCR7 上游引物:5'-CGCAACTTTGAGCGGAACAA-3',下游引物:5'-TTCGCAGCTGCTATTTGGTGA-3'; GAPDH 上游引物:5'-TGGCCTTCCGTGTTCTAC-3',下游引物:5'-GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'。内参为 GAPDH,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.3.3 肺组织 CCR7、p-IκBα 及 p-p65 蛋白含量检测

用 Western-Blot 检测,方法如下:冻存的肺组织剪碎、匀浆、裂解,提取上清液并测定蛋白浓度;先后加 10% 分离胶及 5% 的浓缩胶;经蛋白上样、电泳后转 PVDF 膜,5% BSA 室温封闭 2 h;随后 TBST 洗膜,分别经封闭稀释的 CCR7(1:2000)、p-IκBα(1:1000)及 p-p65(1:1000)和 GAPDH(1:2000)及二抗。

1.4 统计方法

数据通过 SPSS Statistics 19.0 进行分析,数据以均数 ± 标准误表示。数据满足方差齐性,应用单因素方差分析(One-Way ANOVA);方差不齐,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IL-6、TNF-α 水平

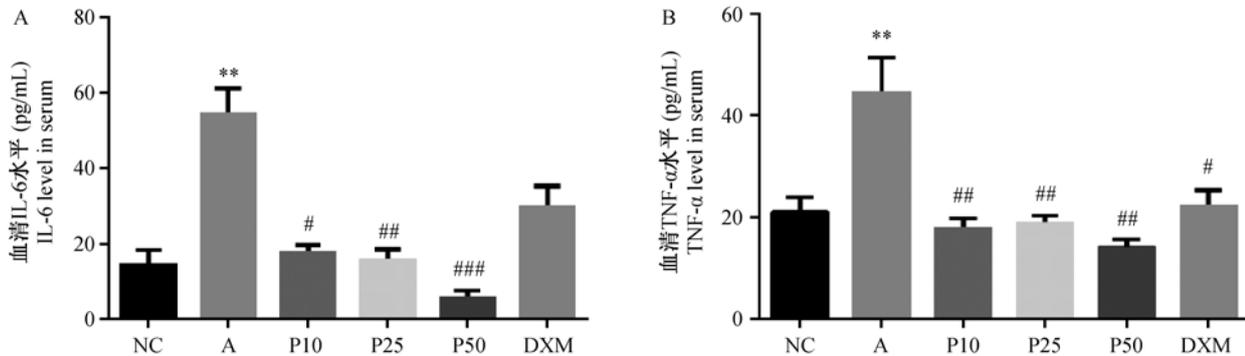
对比正常组,模型组血清 IL-6、TNF-α 水平明显升高($P < 0.01$)。芍药苷低、中、高剂量对 IL-6 和 TNF-α 水平均具有显著下调作用,疗效明显优于地塞米松,且 P 50 效果最优($P < 0.001$)。(见图 1)。

2.2 BALF 中 OVA-IgE 及趋化因子水平

较之正常小鼠,哮喘小鼠 BALF 中 OVA-IgE(P

<0.05)、CCL19($P < 0.001$)和 CCL21($P < 0.01$)水平升高显著。地塞米松能显著降低 CCL21 水平($P < 0.05$),但对 OVA-IgE 及 CCL19 水平有降低趋势但无显著性。芍药苷低剂量组的 CCL19 和 CCL21 明显下降,且有显著性($P < 0.05$);芍药苷中剂量组

对 OVA-IgE ($P < 0.05$)、CCL19 ($P < 0.001$) 和 CCL21 ($P < 0.01$) 水平均有显著抑制作用;芍药苷高剂量组对三者有降低趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。(见图 2)。

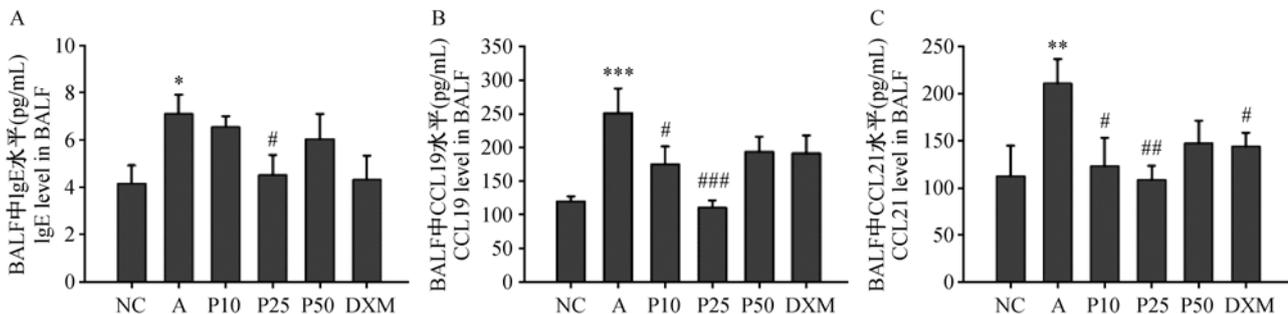


注:NC. 正常组;A. 哮喘模型组;P10, P25, P50. 芍药苷低、中、高剂量组;DXM. 地塞米松组。与正常组对比**: $P < 0.01$;***: $P < 0.001$;与与模型组对比#: $P < 0.05$;#: $P < 0.01$;###: $P < 0.001$ 。

图 1 芍药苷对血清 IL-6 和 TNF- α 水平的影响

Note. NC. Normal control group; A. Asthma group; P10, P25, P50. Low, medium and high doses paeoniflorin groups; DXM. Dexamethasone group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. the asthma group.

Fig. 1 Effect of paeoniflorin on the serum levels of IL-6 and TNF- α



注:NC. 正常组;A. 哮喘模型组;P10, P25, P50. 芍药苷低、中、高剂量组;DXM. 地塞米松组。与正常组对比*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$;与模型组对比#: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$ 。

图 2 芍药苷对 BALF 中 OVA-IgE 及 CCL19、CCL21 水平的影响

Note. NC. Normal control group; A. Asthma group; P10, P25, P50. Low, medium and high doses paeoniflorin groups; DXM. dexamethasone group.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs. control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs. the asthma group.

Fig. 2 Effect of paeoniflorin on OVA-IgE and CCL19, CCL21 levels in the BALF

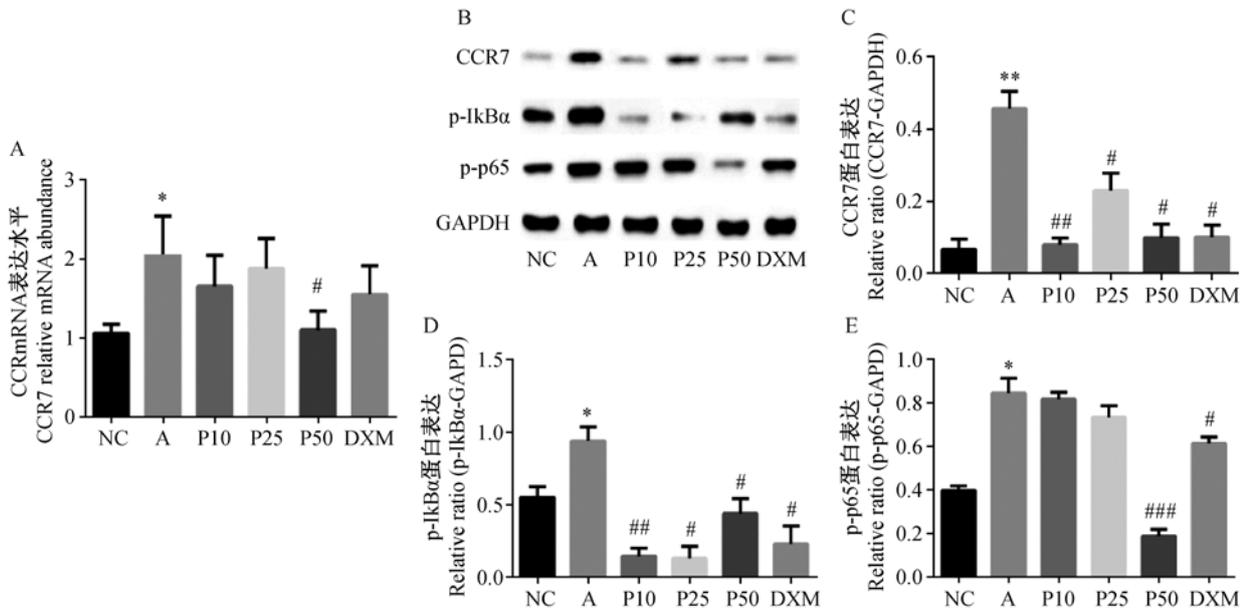
2.3 肺组织 CCR7、NF- κ B 蛋白及 CCR7mRNA 含量变化

相比对照组,哮喘小鼠肺组织 CCR7 ($P < 0.01$)、p-I κ B α ($P < 0.05$) 和 p-p65 ($P < 0.05$) 蛋白表达明显增加;CCR7mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。相比模型组,地塞米松对 CCR7、p-I κ B α 和 p-p65 均可显著抑制 ($P < 0.05$),而对 CCR7mRNA 水平的抑制作用未显示出差异性 ($P > 0.05$)。芍药苷低剂量组下调 CCR7 和 p-I κ B α 蛋白水平最优 (P

<0.01);高剂量组下调 p-p65 蛋白水平最优 ($P < 0.001$);且 CCR7mRNA 水平能够被高剂量芍药苷有效抑制 ($P < 0.05$) (见图 3)。

3 讨论

哮喘有着十分复杂的发病机制,在哮喘的不同病理阶段,趋化因子及其受体、IgE、炎性因子及炎症信号通路等各自扮演着不同的重要角色。芍药苷是一种单萜类糖苷化合物,来自于传统的清热活血中



注:NC. 正常组;A. 哮喘模型组;P 10、P 25、P 50. 芍药苷低、中、高剂量组;DXM. 地塞米松组。与正常组对比*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; 与模型组相比,与模型组对比#: $P < 0.05$; ##: $P < 0.01$; ###: $P < 0.001$ 。

图3 芍药苷对 CCR7、NF-κB 蛋白及 CCR7mRNA 含量的影响

Note. NC. Normal control group; A; Asthma group; P10, P25, P50. Low, medium and high doses paeoniflorin groups; DXM. Dexamethasone group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, vs. the asthma group.

Fig. 3 Effect of paeoniflorin on CCR7 and NF-κB proteins and CCR7mRNA

药芍药,具有抗炎、抗氧化应激等功效,且毒副作用小。我课题组近期研究已证实芍药苷可明显降低哮喘小鼠气道高反应性及嗜酸性粒细胞浸润^[2-3]。

IgE 可介导 I 型超敏反应,在哮喘的免疫过程中具有关键作用。当接触变应原时,IgE 交联使嗜碱性粒细胞和肥大细胞脱颗粒,释放多种炎症介质加重哮喘炎症反应^[5]。本研究结果显示,哮喘模型小鼠 BALF 中 IgE 水平明显升高,而在芍药苷治疗后显著降低,且效果优于地塞米松。表明芍药苷能有效减轻 IgE 介导的变态反应。

IL-6 和 TNF-α 是机体内重要的促炎症因子,在哮喘的发病过程中起重要作用。TNF-α 是炎症启动因子,能够激活中性粒细胞,增加内皮细胞和上皮细胞通透性,并与 IL-6 交互而放大炎症信号^[6]。且研究也已证实哮喘患者症状的严重程度与血清 IL-6 和 TNF-α 水平呈正相关^[7-8]。本研究结果显示,哮喘模型小鼠血清 IL-6 和 TNF-α 水平明显升高,芍药苷干预组 IL-6 和 TNF-α 水平显著降低,且远优于地塞米松干预组。

趋化因子是一种低分子量分泌蛋白,其中 CCL19(MIP-3β)和 CCL21(6Ckine)通过与其共同的功能性受体 CCR7 结合而驱动免疫细胞定向迁移。早期研究发现 CCL19、CCL21 及 CCR7 能够调控树

突状细胞或巨噬细胞活性,提呈抗原及激活初始 T 细胞^[9-12]。T 淋巴细胞在受到树突状细胞调节时分泌大量炎症因子,直接或间接参与诱发或加重哮喘炎症免疫反应^[13]。也有研究发现,过敏性哮喘患者 BALF 中 CCR7⁺ T 细胞比例显著升高,CCR7 的表达与过敏性哮喘的病理过程密切相关^[14]。因而抑制这些趋化因子及其受体活性可能有助于减轻哮喘炎症反应。本研究结果显示,哮喘模型小鼠 BALF 中 CCL19 和 CCL21 水平明显升高,肺组织 CCR7mRNA 及 CCR7 蛋白表达量显著增加。经芍药苷治疗后,CCL19 和 CCL21 水平、CCR7mRNA 含量以及 CCR7 蛋白表达量显著降低。说明抑制 CCL19/CCL21/CCR7 活性可能是芍药苷拮抗哮喘气道炎症的重要机制之一。

NF-κB 是一种多效的转录调节因子,在机体炎症及免疫反应中起重要调控作用。p65 和 p50 是 NF-κB 家族的重要成员,静息细胞中以无活性形式与其抑制蛋白 IκB 结合,趋化因子、细胞因子、氧化应激等刺激可使其活化及磷酸化,激活转录及介导炎症反应^[15]。本研究发现,哮喘模型组小鼠肺组织 p-IκB 和 p-p65 蛋白表达明显增加,而芍药苷治疗后 p-IκB 和 p-p65 蛋白表达被显著抑制。表明芍药苷可通过部分阻断 NF-κB 通路而起到抗炎功效。此

外,有报道显示,CCL19/CCR7 与 NF- κ B 的交互作用能活化 p-I κ B,导致 NF- κ B 入核并增强其 DNA 结合能力^[16]。此外,也有报道称 CCL19 或 CCL21 刺激树突状细胞也导致 NF- κ B 活化^[17]。

综上所述,本研究进一步证实了芍药苷能够显著降低哮喘小鼠模型血清炎症因子 IL-6 和 TNF- α 水平,下调 BALF 中 IgE、CCL19 和 CCL21 水平,降低肺组织中 CCR7 mRNA 以及 CCR7、p-I κ B 和 p-p65 蛋白表达,因而可能为哮喘防治提供新的有效途径。

参 考 文 献

- [1] Olin J T, Wechsler ME. Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment[J]. *BMJ*, 2014,349(8):5517.
- [2] Sun J, Wu J, Xu C, et al. Paeoniflorin attenuates allergic inflammation in asthmatic mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 24(1):88-94.
- [3] 刘家齐,魏颖,杜鑫,等. 芍药苷对卵蛋白诱导的哮喘小鼠气道炎症的影响[J]. *老年医学与保健*, 2015,21(3):178-180.
- [4] 刘佳,郑健,于涛. 小鼠过敏性哮喘模型的研究进展及评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(02):65-68.
- [5] Fahy JV. Reducing IgE levels as a strategy for the treatment of asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2000,30(1):16-21.
- [6] 赵晓巍,刘又宁,解立新,等. 急性呼吸窘迫综合征家兔机械通气时肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的变化与意义[J]. *中国比较医学杂志*, 2006,16(12):723-726.
- [7] 杨璐瑜. 哮喘患者血清 IL-6、TNF- α 、IL-10 表达变化与气道炎症的关系探讨[J]. *临床肺科杂志*, 2013,18(8):1389-1391.
- [8] 黄海萍,吴俊,殷焯军. 支气管哮喘患者血清 IL-6、TNF- α 、IgE 检测的临床分析[J]. *放射免疫学杂志*, 2010,23(01):64-66.
- [9] Li J, Sun R, Tao K, et al. The CCL21/CCR7 pathway plays a key role in human colon cancer metastasis through regulation of matrix metalloproteinase-9[J]. *Dig Liver Dis*, 2011,43(1):40-47.
- [10] Oppenheim JJ, Yang D, Biragyn A, et al. Chemokine receptors on dendritic cells promote autoimmune reactions[J]. *Arthritis Res*, 2002,4(3):S183-S188.
- [11] Choi B, Lim H C, Lee ES, et al. CCL21 attenuates HSV-induced inflammation through up-regulation of CD8⁺ memory cells[J]. *Immunobiology*, 2013,218(4):579-590.
- [12] Yamashita N, Tashimo H, Matsuo Y, et al. Role of CCL21 and CCL19 in allergic inflammation in the ovalbumin-specific murine asthmatic model[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006,117(5):1040-1046.
- [13] Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression[J]. *Immunol Rev*, 2000,177:134-140.
- [14] Kallinich T, Schmidt S, Hamelmann E, et al. Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients[J]. *Clin Exp Allergy*, 2005,35(1):26-33.
- [15] 崔雯雯,金鑫,王宏涛. NF- κ B 信号通路和肺部炎症疾病[J]. *中国急救医学*, 2015,35(3):283-286, 287.
- [16] Liu F Y, Zhao Z J, Li P, et al. NF-kappaB participates in chemokine receptor 7-mediated cell survival in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Oncol Rep*, 2011,25(2):383-391.
- [17] Sanchez-Sanchez N. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells[J]. *Blood*, 2004,104(3):619-625.

[收稿日期] 2016-01-04