

management of rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(3): 529-535.

[5] 朱洁宜, 吴鑫宇, 周海纯, 等. 中医药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中医药信息*, 2015, 24(1): 115-117.

[6] 徐 晖, 黄 颖. 中药治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *云南中医中药杂志*, 2015, 36(1): 88-90.

[7] 吴金莲. 寒痹方治寒性关节病[J]. *家庭医药*, 2012(5): 26-26.

[8] 王贵霞. 类风湿性关节炎动物模型制备与发病机理的探讨[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.

[9] 陈宁杰. 晚期膝 OA 滑膜炎的 MRI 厚度分级、滑膜病理学评分、膝关节疼痛及功能评分的相关性研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.

[10] Boissier M C, Assier E, Falgarone G, *et al.* Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm [J]. *Joint Bone Spine*, 2008, 75 (4): 373-375.

[11] 高 薇, 鲁 静. 炎性细胞因子与类风湿关节炎[J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 17(4): 450-455.

[12] 张军芳, 蒋飞霞, 张 宜, 等. 细胞因子与类风湿关节炎的研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(4): 735-738.

[13] Pope R M, Shahrara S. Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2013, 9(4): 252-256.

[14] Murdaca G, Spano F, Puppo F. Use of leflunomide plus TNF- α inhibitors in rheumatoid arthritis[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2013, 12(6): 801-804.

[15] Solomon D H, Curtis J R, Saag K G, *et al.* Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: comparing TNF- α blockade with nonbiologic DMARDs [J]. *Am J Med*, 2013, 26 (8): 1154-1168.

[16] Ouyang W, Kolls J K, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation[J]. *Immunity*, 2008, 28(4): 454-467.

[17] 王 振, 周子朋, 郑福增. 马钱子制剂治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *风湿病与关节炎*, 2012, 5(2): 62-64.

[18] 王金凤. 青藤碱治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2014, 10(26): 161-163.

[19] Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, *et al.* Targeting the Fas/FasL system in rheumatoid arthritis therapy: promising or risky? [J]. *Cytokine*, 2014, 153(3): 1711-1732.

[20] Heo R, Park J S, Jang H J, *et al.* Hyaluronan nanoparticles bearing γ -secretase inhibitor: *In vivo* therapeutic effects on rheumatoid arthritis[J]. *J Control Release*, 2014, 192 (1): 2105-2119.

苜蓿素对哮喘小鼠肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路的抑制作用

殷玉婷¹, 刘丽丽², 刘利艳³

(1. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西中医药大学科技学院, 江西 南昌 330004; 3. 江西省肿瘤医院药剂科, 江西 南昌 330029)

摘要: **目的** 观察苜蓿素对低剂量脂多糖 (LPS) 诱导的哮喘小鼠气道炎症的抑制作用。**方法** 采用低剂量 LPS + 卵白蛋白 (OVA) 建立 BALB/c 小鼠哮喘气道炎症反应模型, 随机分为哮喘模型组、苜蓿素组、地塞米松 (阳性药) 组, 另设空白对照组。ELISA 法对小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 炎症介质 NO、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平进行检测; HE 染色观察小鼠肺组织病理情况; RT-PCR 法和 Western blot 法对小鼠肺泡巨噬细胞的 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) mRNA 及蛋白表达进行检测。**结果** 苜蓿素可显著降低哮喘小鼠 BALF 液中 NO、TNF- α 、IL-1 β 水平, 有效改善哮喘小鼠肺部炎症, 显著下调肺泡巨噬细胞的 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白相对表达量。**结论** 苜蓿素对哮喘小鼠气道炎症有抑制作用, 其机制可能与干预 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路有关。

关键词: 苜蓿素; 哮喘; 气道炎症; 抗炎; 肺泡巨噬细胞; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0450-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.002

收稿日期: 2016-09-29

基金项目: 江西省自然 (青年) 科学基金计划 (20142BAB215059); 江西省百人远航工程资助项目 (201501); 江西省普通本科高校中青年教师发展计划访问学者专项资金 (2016)

作者简介: 殷玉婷 (1979—), 女, 博士, 副教授, 从事天然药物有效成分的药理学研究。Tel: 18607917679, E-mail: sandel@163.com

Tricin's inhibitory effects on TLR4/MyD88/NF- κ B pathway of alveolar macrophages in asthma mice

YIN Yu-ting¹, LIU Li-li², LIU Li-yan³

(1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. College of Science and Technology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3. Department of Pharmacy, Jiangxi Tumor Hospital, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the inhibitory effects of tricin on the airway inflammation in low concentration LPS induced asthma mice. **METHODS** The model of asthma mice with airway inflammation was induced by low concentration LPS plus OVA. There were four groups: blank control group, asthma model group, tricin treatment group and dexamethasone (positive drug) treatment group. The levels of inflammatory factors, including NO, TNF- α and IL-1 β , in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA; the pathology of lung tissue was observed by HE staining; the mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65 in alveolar macrophages were detected using real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blot. **RESULTS** Tricin could significantly decrease the levels of NO, TNF- α and IL-1 β in BALF of asthma mice and improve lung inflammation. It could also down-regulate the relative mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65. **CONCLUSION** Tricin has inhibitory effects on airway inflammation in asthma mice, whose mechanism may be related to the intervention of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway.

KEY WORDS: tricin; asthma; airway inflammation; anti-inflammation; alveolar macrophages; TLR4/MyD88/NF- κ B pathway

肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophages, AM) 是一类重要的抗原提呈细胞, 其表面的 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 作为脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的模式识别受体, 与 LPS 模式结合后引起 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路激活, 导致 AM 活化, 引起炎症介质释放, 加重肺组织炎症损伤, 放大炎症反应^[1-2], 这一过程在哮喘气道炎症、气道高反应性和气道重塑的发生与发展过程中起着重要作用。苜蓿素 (tricin, 4', 5, 7-三羟基 3', 5'-二甲氧基黄酮) 属于天然黄酮类化合物, 广泛分布于禾本科植物中, 现代药理研究表明, 苜蓿素具有广泛的生物活性, 如抗炎、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤及免疫调节等, 尤其抗炎作用明显^[3-5]。临床竹茹、竹根和淡竹叶等禾本类中草药对哮喘的疗效已被肯定, 实验证实它们均含有苜蓿素, 文献报道和本课题组前期研究成果表明, 苜蓿素可能是这些药物的主要活性成分之一^[6-9], 但其是否通过干预 AM TLR4/MyD88/NF- κ B 通路对气道炎症产生抑制作用, 从而具有治疗哮喘的功效, 尚未有深入探讨。故本实验采用低剂量 LPS + 卵白蛋白建立 BALB/c 小鼠哮喘气道炎症反应模型, 基于 AM TLR4/MyD88/NF- κ B 通路, 研究苜蓿素对哮喘气道炎症的抑制作用及分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级健康雌性 BALB/c 小鼠, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (湘) 2011-0003。在清洁级动物房适应性喂养 3 d 后开始实验, 实验期间小鼠自由摄食饮水, 饲养室光照 12 h, 黑暗 12 h, 室温 22 ~ 24 $^{\circ}$ C, 湿度 45% ~ 65%。

1.2 试药 苜蓿素 (美国 ChromaDex 公司, 批号 00020640-109, 含量 > 98%); 地塞米松磷酸钠注射液 (天津金耀集团湖北天药药业股份有限公司, 批号 51501271); 脂多糖 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 818E037); 卵白蛋白 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 709B051); NO、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) (上海西唐生物科技有限公司, 批号 L150925149) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 酶联免疫检测试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司, 批号 L150907143); Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司, 批号 15596-026); cDNA 第一链合成试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); Real time PCR Master Mix (SYBR Green) 试剂盒 (日本 TOYOBO 公司); TLR4、MyD88、NF- κ B p65 引物合成 (南京金斯瑞科技有限公司); TLR4 一抗 (江苏凯基生物科技发展有限公司, KG22755-2); GAPDH 一抗

(江苏凯基生物科技发展有限公司, KGAA002); 羊抗兔 HRP-IgG (江苏凯基生物科技发展有限公司, KGAA35); MyD88 一抗 (武汉博士德生物工程有限公司, BA2321); NF-κB p65 一抗 (北京博奥森生物科技发展有限公司, bs-0465r)。

1.3 仪器 402AI 超声雾化器 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); LEICA DMI3000 B 显微镜 (德国 Leica 公司); Molecular Device SPECTERAmix 190 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 自动细胞计数仪 (美国 Nexcelom 公司); Adventurer Ohaus AR1140/C 型电子分析天平 (美国奥豪斯公司); Sonics 超声细胞破碎仪 (美国 SONICS&M ATERIA LS 公司); 高速冷冻离心机 (德国 EPENDORF 公司); 荧光定量 PCR 循环仪 (美国 ABI 公司); PowerPac 基础电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像分析系统 (英国 SYNGENE 公司)。

1.4 动物分组、造模与给药方法 按体质量将小鼠随机分为空白对照组、哮喘模型组、苜蓿素组、地塞米松 (阳性药) 组。

致敏阶段: 除空白对照组外, 其余 3 组于第 1、8 天分别腹腔注射 OVA/Al (OH)₃ 混悬液, 0.2 mL/只, 以及于第 1、4、7、10、13 天分别腹腔注射 1 mL 含 0.1 μg (0.1 mg/L) *E. coli* (大肠杆菌) LPS。激发阶段: 实验第 15 天给予小鼠雾化吸入 OVA (10 g/L, OVA/PBS), 每组 30 min, 连续 1 周。每次雾化前 1 h, 除空白对照组外, 其余 3 组腹腔注射相同剂量 *E. coli* LPS。空白对照组在致敏阶段与激发阶段均以生理盐水代替 OVA。

从实验第 1 天开始, 各组小鼠腹腔注射相应药物。苜蓿素组小鼠给药剂量为 3 mg/kg 体质量, 地塞米松 (阳性药) 组小鼠给药剂量为 0.625 mg/kg 体质量, 空白对照组和哮喘模型组注射相同体积的生理盐水。每日 1 次, 连续给药 21 d。

1.5 BALF 标本收集及炎症介质检测 各组小鼠在末次激发 24 h 后, 直接摘眼球处死。处死后, 打开胸腔, 于小鼠左主支气管处结扎左肺, 用密闭式留置针对小鼠行气管插管, 用 3 mL PBS 缓冲液分 3 次灌洗右肺, 回收液量 >80% 为合格, 回收液放于离心管中, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清保存于 -80 ℃ 冰箱。BALF 上清液的 NO、TNF-α 和 IL-1β 检测严格按照小鼠 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.6 肺组织病理学观察 小鼠处死后, 取未行支气管肺泡灌洗的左肺, 10% 福尔马林中固定 24 h,

常规石蜡包埋, 苏木素伊红 (HE) 染色, 观察小鼠肺组织和气道上皮的炎症浸润。

1.7 AM 的分离与培养 BALF 离心后沉淀用生理盐水 3 mL 重悬、再离心, 反复洗涤 3 次, RPMI1640 培养液 (含 2 mmol/L 谷胺酰氨, 100 mL/L 胎牛血清, 100 U/L 青霉素, 100 U/L 链霉素) 4 mL 混悬细胞, 于孵箱中 37 ℃、50 mL/L CO₂ 孵育 2 h 后, 轻轻吸出上清, 去除非贴壁细胞。用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬, 调整细胞密度为 108/L, 培养 24 h, 以 Giemsa 染色法鉴定 AM, 台盼蓝染色检测其活性。

1.8 RT-PCR 检测 细胞样本完全弃去培养基, 用 Trizol 法提取总 RNA, 定量后按 cDNA 第一链合成试剂盒说明书步骤合成 cDNA。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min 起始模板; 95 ℃ 15 s, PCR 循环中模板变性, 60 ℃ 退火 20 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 进行 40 个循环。每份标本重复 3 次, 取其循环阈值 (cycle threshold, Ct) 均值, 以 2^{-ΔΔCt} 表示实验结果。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Sequences of primers

引物名称		序列(5'→3')
<i>Gapdh</i>	正向	TATGTCGTGGAGTCTACTGGT
	反向	GAGTTGTCATATTTCTCGTGG
<i>Tlr4</i>	正向	AAATGCACTGAGCTTTAGTGTT
	反向	TGGCACTCATAATGATGGCAC
<i>Myd88</i>	正向	GACCGTGAGGATATACTGAAGGA
	反向	GGCCACCTGTAAGGCTTCTC
<i>Nfkb p65</i>	正向	ACTGCCGGGATGGCTACTAT
	反向	TCTGGATTGCTGGCTAATGG

1.9 Western blot 检测 提取 AM 细胞总蛋白, 采用考马斯亮蓝法定量。灌胶、上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 参照 Marker 位置, 待目的条带进入凝胶最佳分离区后停止电泳, 取出电泳凝胶进行转膜。转膜结束后, 取出 NC 膜 (硝酸纤维素膜) 并作好标记, 洗膜 3 次, 10 min/次。将 NC 膜放入平皿中, 加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液, 摇床振荡 1.5 h, 进行封闭。封闭结束后, 洗膜 3 次, 10 min/次。将膜放入已按说明书稀释过的含一抗溶液的平皿中, 4 ℃ 摇床振荡孵育过夜。第 2 天取出, 室温振荡 30 min, 吸弃一抗, 洗膜 3 次, 10 min/次。用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗, 室温摇床振荡反应 1 h。二抗反应结束后, 洗膜 3 次, 5 min/次。按照 ECL 试剂盒的说明进行显影, 使

用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

1.10 数据处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理。实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对小鼠 BALF 炎症介质的影响 从表 2 可以看出, 与空白对照组相比, 哮喘模型组小鼠 NO、TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 苜蓿素组和地塞米松组小鼠炎症介质水平显著下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组 BALF 中 NO、TNF- α 及 IL-1 β 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Tab. 2 NO, TNF- α and IL-1 β levels in BALF in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	NO/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TNF- α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-1 β / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照组	0.700 $\pm$ 0.102	57.870 $\pm$ 4.443	7.337 $\pm$ 1.449
哮喘模型组	2.676 $\pm$ 0.382 **	234.848 $\pm$ 14.205 **	83.601 $\pm$ 7.432 **
苜蓿素组	1.482 $\pm$ 0.132 * $\blacktriangle\blacktriangle$	107.451 $\pm$ 3.762 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	28.319 $\pm$ 4.014 ** $\blacktriangle\blacktriangle$
地塞米松组	1.166 $\pm$ 0.096 $\blacktriangle\blacktriangle$	130.153 $\pm$ 3.593 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	16.123 $\pm$ 1.850 $\blacktriangle\blacktriangle$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与哮喘模型组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

2.2 对小鼠肺组织病理学改变的影响 空白对照组肺泡腔清晰, 肺泡壁正常, 支气管黏膜无明显炎细胞浸润, 柱状上皮细胞排列整齐; 哮喘模型组肺间质大量炎细胞浸润, 肺泡壁增厚, 伴部分肺泡融合, 柱状上皮细胞排列紊乱且增多; 苜蓿素组和地塞米松组肺间质有少量炎细胞浸润, 肺泡腔、肺泡壁均较正常, 柱状上皮细胞排列整齐。见图 1。

2.3 对 AM Tlr4、Myd88、Nfkb p65 mRNA 表达的影响 从表 3 可以看出, 与空白对照组相比, 其余 3 组小鼠 AM Tlr4、Myd88、Nfkb p65 mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与哮喘模型组相比, 苜蓿素组和地塞米松组 AM Tlr4、Myd88、Nfkb p65 mRNA 相对表达量显著下降 ($P < 0.01$)。

2.4 对 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达的影响 从图 2 和表 4 可以看出, 与空白对照组相比, 哮喘模型组小鼠 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达增强, 有显著性差异 ($P < 0.01$); 与哮喘模型组相比, 苜蓿素组和地塞米松组 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白表达减弱 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

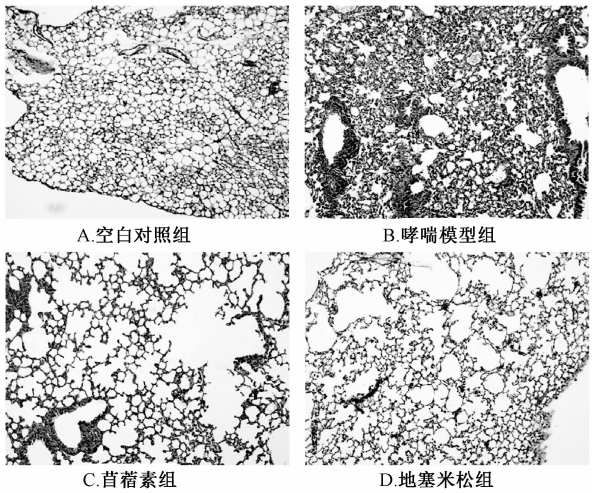


图 1 小鼠肺组织病理学变化 (HE, $\times 100$)

Fig. 1 Pathological changes of lung tissue in mice (HE, $\times 100$)

表 3 各组 AM Tlr4、Myd88、Nfkb p65 mRNA 的相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 3 Relative expressions of Tlr4, Myd88 and Nfkb p65 mRNA of AM in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	Tlr4	Myd88	Nfkb p65
空白对照组	1.045 $\pm$ 0.046	1.049 $\pm$ 0.034	1.027 $\pm$ 0.055
哮喘模型组	2.535 $\pm$ 0.030 **	3.064 $\pm$ 0.045 **	4.040 $\pm$ 0.041 **
苜蓿素组	1.505 $\pm$ 0.023 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	2.032 $\pm$ 0.039 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.598 $\pm$ 0.019 ** $\blacktriangle\blacktriangle$
地塞米松组	1.808 $\pm$ 0.019 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.519 $\pm$ 0.040 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	2.021 $\pm$ 0.041 ** $\blacktriangle\blacktriangle$

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与哮喘模型组比较, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

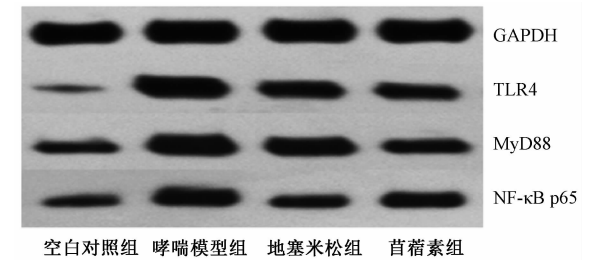


图 2 各组 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白的表达

Fig. 2 Expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65 protein of AM in each group

表 4 各组 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 蛋白的相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 4 Relative expressions of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65 protein of AM in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	TLR4/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF- κ B p65/GAPDH
空白对照组	0.310 $\pm$ 0.014	0.275 $\pm$ 0.020	0.088 $\pm$ 0.014
哮喘模型组	0.750 $\pm$ 0.047 **	0.589 $\pm$ 0.042 **	0.811 $\pm$ 0.020 **
苜蓿素组	0.454 $\pm$ 0.021 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.460 $\pm$ 0.017 ** $\blacktriangle$	0.366 $\pm$ 0.050 ** $\blacktriangle\blacktriangle$
地塞米松组	0.587 $\pm$ 0.022 ** $\blacktriangle\blacktriangle$	0.340 $\pm$ 0.013 $\blacktriangle\blacktriangle$	0.480 $\pm$ 0.031 ** $\blacktriangle\blacktriangle$

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与哮喘模型组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

哮喘是一种常见的以气道慢性变态反应性炎症和气道高反应性为特征的呼吸系统疾病,世界卫生组织估计,目前全球有 2.35 亿人罹患支气管哮喘,半数在 12 岁以前发病,是儿童中最常见的慢性病。周期性哮喘症状往往导致患者失眠、日间疲劳、减少活动量,不能上学和工作,严重影响健康。临床治疗以抗炎解痉为主,多使用皮质类固醇、 β 受体激动剂和茶碱类等药物,效果不甚理想,且副作用较多。在中医理论指导下,以天然药物去预防和治疗哮喘,疗效肯定、使用安全,越来越得到人们的认可。

LPS 是革兰氏阴性细菌一类重要的病原体微生物成分,是一种强烈的免疫调节物质。研究发现,低水平 LPS 可使哮喘气道炎症症状加重,肺部以嗜酸性粒细胞和中性粒细胞浸润为主,黏液分泌增加,IL-4、IL-5 和 IL-13 等炎症因子明显增加^[10-12]。在哮喘气道炎症过程中,NO 生成增多,加剧气道炎症反应,同时也反映出炎症程度;TNF- α 和 IL-1 β 参与放大炎症过程。本实验通过低剂量 LPS + OVA 建立 BALB/c 小鼠哮喘气道炎症模型,以此观察苜蓿素对气道炎症的抑制作用。结果表明,哮喘模型组小鼠 BALF 炎症介质 NO、TNF- α 及 IL-1 β 水平均显著高于空白对照组,肺部病理改变明显,这与文献报道一致。分别经过苜蓿素或地塞米松治疗后的 BALF 中上述炎症介质水平明显下降;肺间质仅有少许的炎症浸润,肺泡腔、肺泡壁结构均较正常,肺部炎症得以改善,说明苜蓿素对哮喘小鼠气道炎症有明显的抑制作用。

肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路在哮喘气道炎症的发生与发展过程中起着重要作用。TLR4 是 Toll-like 受体 (TLR) 家族中第一个被克隆的人类天然免疫受体,广泛分布于肺和肠道内表面的上皮细胞,以及接触抗原第一线的吞噬细胞的细胞表面,如巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞。作为识别 LPS 的主要受体,TLR4 介导天然免疫,并连接获得性免疫,与哮喘密切相关^[1-2,13-14]。MyD88 是 TLR4 通路中的一个关键衔接分子,而 NF- κ B 作为重要的、多向性的核转录因子,位于 TLR4 下游通路的枢纽位置参与免疫反应及细胞增殖与分化等过程。

在低剂量 LPS + OVA 的诱导下,哮喘组小鼠 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 表达显著上调。而苜蓿素与地塞米松均能明显下调哮喘小鼠 AM TLR4、MyD88、NF- κ B p65 表达,这与治疗后小鼠 BALF 炎症介质水平下降、肺部炎症改善结果一

致,提示苜蓿素可能通过干预 AM TLR4/MyD88/NF- κ B 通路来抑制哮喘气道炎症。

苜蓿素广泛存在于人们生活不可或缺的大麦、稻米、小麦和玉米等谷物类里,而且在临床常用于治疗哮喘的竹茹、竹根和淡竹叶等禾本类中草药里含有量也十分丰富,被认为是一种健康无害的营养物质。目前苜蓿素还未开发为药品,尚无直接用于临床治疗哮喘的报道。研究结果显示,苜蓿素具有抑制低剂量 LPS 诱导的哮喘小鼠气道炎症的作用,具有开发成新的治疗哮喘药物的潜力。

参考文献:

[1] Bruce A. 细胞的分子生物学:下册[M]. 张新跃,钱万强译. 北京:科学出版社. 2008:1573-1575.

[2] Werner M, Tepp R, Wimmer K. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(2): 323-330.

[3] Zhou J, Ibrahim R K. Tricin—a potential multifunctional nutraceutical[J]. *Phytochem Rev*, 2010, 9(3): 413-424.

[4] Moheb A, Grondin M, Ibrahim R K, et al. Winter wheat hull (husk) is a valuable source for tricin, a potential selective cytotoxic agent[J]. *Food Chem*, 2013, 138(2-3): 931-937.

[5] Yazawa K, Kurokawa M, Obuchi M, et al. Anti-influenza virus activity of tricin, 4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone[J]. *Antivir Chem Chemother*, 2011, 22(1): 1-11.

[6] 龚金炎,毛建卫,黄伟素,等. 竹茹中苜蓿素对照品的高效液相半制备色谱制备研究[J]. *中草药*, 2012, 43(5): 919-921.

[7] 孙武兴,李 铤,李 宁,等. 毛金竹叶提取物化学成分分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学报*, 2008, 25(1): 39-43.

[8] 张慧艳,汤 锋,王春梅,等. 淡竹叶化学成分研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(4): 540-542.

[9] 张 锐,刘建群,刘丽艳,等. 制备高效液相色谱从竹根中制备苜蓿素的研究[J]. *中草药*, 2010, 41(12): 1985-1987.

[10] Hollingsworth J W, Whitehead G S, Lin K L, et al. TLR4s signaling attenuates ongoing allergic inflammation[J]. *Immunol*, 2006, 176(10): 5856-5862.

[11] 李鸿佳,王淑娟,李艳丽,等. 不同剂量脂多糖预处理对哮喘小鼠肺部炎症的影响的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008, 24(10): 1008-1010.

[12] Dong L, Li H, Wang S, et al. Different doses of lipopolysaccharides regulate the lung inflammation of asthmatic mice via TLR4 pathway in alveolar macrophages[J]. *J Asthma*, 2009, 46(3): 229-233.

[13] Gu X Y, Zhou L F, Zhang M S, et al. Targeted NF-kappaB inhibition of asthmatic serum-mediated human monocyte-derived dendritic cell differentiation in a transendothelial trafficking model[J]. *Cell Immunol*, 2009, 260(1): 14-20.

[14] 莫碧文,苏海英,韦江红,等. TLR4、p-Akt 在哮喘大鼠气道平滑肌迁移的作用及小青龙汤对其影响[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(5): 723-728.