

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.10.016

朝医麻黄定喘汤对支气管哮喘模型小鼠 p38MAPK/Nrf2/HO-1 信号通路的影响

延光海¹, 孙天一¹, 咸哲民², 姜京植¹, 金香¹, 池禹潼¹, 李良昌¹, 郑明昱^{1*}

(1. 延边大学医学院, 吉林省延吉市公园路 977 号, 133002; 2. 延边大学附属医院)

摘要 探讨朝医麻黄定喘汤治疗支气管哮喘的可能作用机制。 **方法** 将 40 只 BALB/c 小鼠随机分成空白组、模型组、麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组用卵清蛋白致敏、激发制备小鼠哮喘模型。麻黄定喘汤低剂量组每日给予 4 ml/100 g 麻黄定喘汤 (浓度 20 mg/ml) 灌胃, 麻黄定喘汤高剂量组每日给予 12 ml/100 g 麻黄定喘汤灌胃, 空白组和模型组每日给予 12 ml 0.9% 氯化钠溶液灌胃, 共计 8 周。在末次激发 24 h 后取肺泡灌洗液 (BALF) 及肺组织。观察肺组织病理学变化; 检测 BALF 中炎症细胞计数, 活性氧 (ROS) 及丙二醛 (MDA) 含量, 抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性; Western Blot 法检测肺组织中磷酸化 p38 核丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1) 蛋白水平; 肺组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 水平。 **结果** 与空白组比较, 模型组 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞及 ROS、MDA 含量, 肺组织中 p-p38 MAPK、Nrf2、HO-1 蛋白水平及 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平明显升高, SOD、CAT 活性明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药高、低剂量组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞显著降低, BALF 中 ROS、MDA 含量, 肺组织中 p-p38 MAPK 蛋白水平降低, BALF 中 SOD、CAT 的活性及肺组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达, Nrf2、HO-1 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。与麻黄定喘汤低剂量组比较, 麻黄定喘汤高剂量组 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞数及 ROS、MDA 含量, 肺组织 p-p38 MAPK 水平明显减少, SOD、CAT 活性及 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 朝医麻黄定喘汤可抑制支气管哮喘小鼠气道炎症反应, 通过抗氧化机制影响 p38 MAPK/Nrf2/HO-1 信号通路可能是其机制之一。

关键词 支气管哮喘; 麻黄定喘汤; p38 核丝裂原活化蛋白激酶; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 1

支气管哮喘 (简称哮喘) 是一种气道炎症性疾病^[1]。朝医麻黄定喘汤出自《东医寿世保元》, 具有补肺泻肝、化痰定喘之功。本课题组前期研究发现, 麻黄定喘汤可减少炎症细胞浸润, 通过 MAPKs/NF- κ B/VEGF 信号通路改善肺组织的损伤^[2-3]。研究报道, 哮喘的发生、发展与氧化应激反应密切相关^[4]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid2-related factor 2, Nrf2) 调节编码抗氧化蛋白表达, 抑制氧化应激反应^[5]。血红素加氧酶 1 (hemeoxygenase1, HO-1) 基因是 Nrf2 的依赖基因^[6]。本研究将从抗氧化等方面探究朝医麻

黄定喘汤对哮喘的治疗作用, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

雄性清洁级 BALB/c 小鼠 40 只, 鼠龄 4 ~ 6 周, 体重 (18 ± 5) g, 由延边大学医学部实验动物中心提供, 实验动物合格证号为 SCXK (吉) 2017-0003。本研究得到延边大学医学院伦理委员会批准 (批号: IACUC-20170105039), 在整个实验中遵守《实验动物管理条例》, 做到减轻小鼠痛苦, 增加其舒适度。

1.2 药物与试剂

麻黄定喘汤组成: 麻黄 15 g, 苦杏仁 7.5 g, 黄芩 5 g, 桑白皮 5 g, 麦冬 5 g, 桔梗 5 g, 款冬花

基金项目: 国家自然科学基金 (81560810)

* 通讯作者: myzheng@ybu.edu.cn, (0433) 2436025

5 g, 莱菔子 5 g, 白果 20 枚, 由延边保健药房购买, 麻黄定喘汤提取物由延边大学药学院提供。药物制备参照文献 [2]: 所有药物粉碎成粗粉后采用 75% 乙醇为提取溶媒, 8 倍乙醇, 经热回流提取 3 次, 每次 120 min, 合并提取液, 回收乙醇得干燥粉末, 取 400 mg 提取物溶解于 20 ml 0.9% 氯化钠溶液配制成浓度为 20 mg/ml 的供试液。卵清蛋白 (OVA, 美国 Sigma 公司, 批号: 9006-59-1); 氢氧化铝粉 (美国 Sigma 公司, 批号: 24623-77-6); 活性氧 (ROS) 试剂盒 (批号: 68310389)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: 9054-89-1)、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒 (批号: 9001-05-2)、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: XF03124B)、HO-1 抗体 (批号: 82206)、Nrf2 抗体 (批号: 12721) 均购自长春百奥生物科技有限公司; p38 核丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK, 批号: 8690, Cell Signaling Technology Beverly, MAUSA) 磷酸化 p38 核丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK, Cell Signaling Technology, 批号: 4092S); 逆转录试剂盒 (Promega 公司, 批号: A5001); SYBR green containing PCR 试剂盒 (Gibco 公司, 批号: 204143); HE 染色剂 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C0105); Masson 染色剂 (批号: G1340)、Trizol 试剂 (批号: 15596-018)、Diff-Quick 染色液 (批号: G1541-2), 均为北京索莱宝科技有限公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 批号: 4970, CST (Shanghai) Biological Reagents Company Limited; ECL 试剂 (上海慧颖科技有限公司, 批号: NCI4106); 双氢罗丹明 (DHR) -123 (AAT Bioquest Inc, USA, 批号: AAT-15206)。

1.3 仪器

欧姆龙压缩式雾化吸入器 (NE-C29 型, 大连医疗器械厂); 酶联免疫检测仪 (RT-2100C 型, 上海攸茜实业有限公司); 伯乐小型垂直电泳仪及电泳槽 (1658003 型, 美国 Bio-Rad 公司); 伯乐蛋白快速转膜仪 (全能型, 美国 Bio-Rad 公司); 伯乐核酸/蛋白质含量测定仪 (SmartSpec Plus 型, 美国 Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机 (3K15 型, 美国 Sigma 公司); 扫描仪 (Epson V19 型, 爱普生)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

将 40 只 BALB/c 小鼠随机分为空白组、模型

组、麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组, 每组 10 只。采用随机数字表法, 从随机数字表的任意一个位置查起, 从左到右, 把查到的第一个数字除以 40, 得到余数为 1~10 为空白组, 11~20 为模型组, 21~30 为麻黄定喘汤低剂量组, 31~40 为麻黄定喘汤高剂量组。模型组及中药高、低剂量组参照文献 [2] 用 OVA 致敏、激发制备支气管哮喘模型: 于第 1、14 天腹腔注射 1 ml 致敏液 (OVA 10 μ g + 氢氧化铝 1 mg), 从第 21 天开始为激发阶段, 将小鼠置于雾化吸入箱中, 通过雾化器雾化吸入 25 g/L OVA 溶液 5 ml, 每次 30 min, 每周雾化 3 次, 连续 8 周。空白组小鼠在致敏阶段腹腔注射 0.9% 氯化钠溶液 1 ml, 激发阶段每次给予 0.9% 氯化钠溶液 5 ml 雾化吸入 30 min。麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组在每次雾化激发哮喘前 1 h 灌胃给药, 麻黄定喘汤低剂量组每次给予 2 ml/100 g 麻黄定喘汤灌胃, 每日 2 次 (相当于 70 kg 成人用量的 20 倍), 麻黄定喘汤高剂量组每次灌胃 6 ml/100 g 麻黄定喘汤, 每日 2 次 (相当于 70 kg 成人用量的 60 倍), 空白组与模型组每日给予 0.9% 氯化钠溶液 12 ml 灌胃, 每日 1 次, 共计 8 周。

2.2 观察指标及方法

末次给药 24 h 后处死小鼠, 即刻打开胸腔, 暴露气管, 行气管插管, 气管上剪一小切口插入软管, 缓慢注射 4 $^{\circ}$ C 生理盐水 1 ml 后缓慢回抽, 且连续反复 3 次, 保证回抽量在 80% 以上。将已收集的肺泡灌洗液 (BALF) 3000 r/min 离心半径 15 cm, 离心 5 min, 并取上清液置于 -80 $^{\circ}$ C 冻存, 剩余的沉淀物用于细胞涂片。之后取出右肺置于 -80 $^{\circ}$ C 冻存, 左肺置于 4% 甲醛中固定。

2.2.1 BALF 中炎症细胞计数 BALF 经 3000 r/min, 离心半径 15 cm, 离心 10 min 后的细胞沉淀中, 加入生理盐水定容至 600 μ l, 混匀后, 取 200 μ l 置入细胞涂片离心机机制备细胞涂片。经 Diff-Quick 染色法, 在光学显微镜下进行细胞分类及计数。

2.2.2 肺组织病理学检查 将固定后的小鼠左肺依次进行脱水、浸蜡、包埋, 将所得蜡块切成厚度为 4 μ m 的薄片, 并分别进行 HE、Masson 染色。

2.2.3 BALF 细胞中 ROS、MDA 含量及 SOD、CAT 活性 使用双氢罗丹明 (DHR) -123 试剂盒检测小鼠 BALF 细胞中 ROS 水平, 荧光强度可代表 ROS 水平, 具体方法依照试剂盒说明书进行。将保存在 -80 $^{\circ}$ C 的 BALF 取出, 冰上复融后, 4 $^{\circ}$ C、

3000 r/min, 离心半径 15 cm, 离心 10 min, 使用试剂盒检测 SOD、CAT、MDA 水平。

2.2.4 Western blot 法检测肺组织中 p-p38 MAPK、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 依照各试剂盒说明书要求, 提取小鼠肺组织的总蛋白和核蛋白, 将等量的蛋白 (30 μ g) 在 10% 的 SDS-PAGE 中以 90 V 恒压电泳切取目的条带。300 mA 低温条件下转膜。在脱脂奶粉封闭液中常温封闭 2 h。分别用小鼠 HO-1、Nrf2、 β -actin、p38 核丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK)、p-p38 MAPK 抗体 4℃ 孵育过夜, 将膜取出, 在 TBST 中充分洗涤。洗膜后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 常温孵育 1 h。将膜取出, 在 TBST 中洗涤后, 使用 ECL 试剂曝光。底片经扫描仪扫描后, 确定目的条带的相对吸光度值。

2.2.5 Real-time PCR 法检测肺组织 HO-1、Nrf2 mRNA 表达 使用 Trizol 试剂提取总 RNA, 一步法逆转录扩增, 实验方法按逆转录试剂盒说明书操作。按说明书, 用 SYBR green containing PCR 试剂盒进行 Real-time PCR。引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成, HO-1: 正向 5'-GATAGAGCGCAA-CAAGCAGAA-3', 反向 5'-CAGTGAGGCCCATAC-CAGAAG-3', 扩增片段 107 BP, 扩增片段 250 bp; β -actin 引物, 正向 5'-AACAGTCCTAAGCAC-3'; 反向 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'; Nrf2: 正向 5'-GGGCAAGCGACTCATGGTCAT-3', 反向 5'-AAGCTGCATACAGTCTTCAAA-3'。实验结果分析使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件包进行统计学处理。计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验, 多组间比较采用 K-W 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠 BALF 中炎症细胞计数比较

表 1 示, 模型组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞较空白组明显增多 ($P < 0.05$); 中药高、低剂量组小鼠 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞较模型组显著减少 ($P < 0.05$)。与麻黄定喘汤低剂量组比较, 麻黄定喘汤高剂量组 BALF 中炎症细胞总数、中性粒细胞及嗜酸性粒细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺泡灌洗液中细胞计数比较 ($\times 10^4$ 个/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	炎症细胞总数	中性粒细胞	嗜酸性粒细胞
空白组	10	206.4 $\pm$ 101.6	3.6 $\pm$ 1.9	0.5 $\pm$ 0.5
模型组	10	1253.3 $\pm$ 302.4*	57.5 $\pm$ 6.8*	76.5 $\pm$ 2.8*
麻黄定喘汤低剂量组	10	1068.2 $\pm$ 302.0 Δ	34.1 $\pm$ 9.3 Δ	58.3 $\pm$ 1.6 Δ
麻黄定喘汤高剂量组	10	689.4 $\pm$ 253.0 $\Delta\Delta$	20.3 $\pm$ 7.6 $\Delta\Delta$	25.7 $\pm$ 0.9 $\Delta\Delta$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与麻黄定喘汤低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

3.2 各组小鼠肺组织病理结果

图 1 示, HE 染色结果显示, 模型组与空白组比较, 气道壁及气道平滑肌明显增厚, 管腔被黏液堵塞; 麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组上述改变较模型组明显减轻。与麻黄定喘汤低剂量组相比, 麻黄定喘汤高剂量组可明显改善支气管周围的炎症细胞浸润。Masson 染色结果显示, 与空白组比较, 模型组小鼠气道周围胶原纤维沉积显著; 麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组较模型组气道周围胶原纤维沉积减少。与麻黄定喘汤低剂量组相比, 麻黄定喘汤高剂量组可明显抑制小鼠肺组织气道周围胶原蛋白沉积的产生。

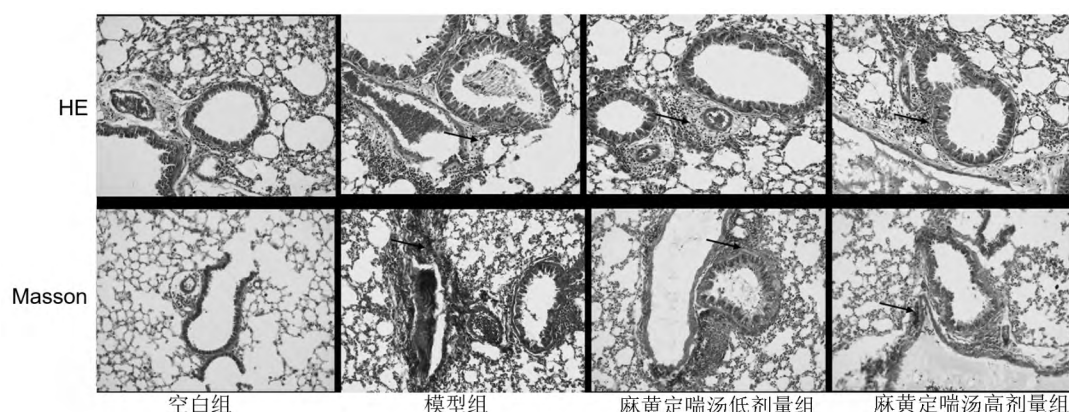


图 1 各组小鼠肺组织病理 HE 和 Masson 染色图 ($\times 200$)

表 2 各组小鼠肺泡灌洗液中 ROS、SOD、CAT 和 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ROS (荧光强度)	SOD (kU/L)	CAT (kU/L)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)
空白组	10	50.24 $\pm$ 5.52	31.56 $\pm$ 1.72	60.25 $\pm$ 5.21	6.98 $\pm$ 0.62
模型组	10	136.85 $\pm$ 12.45*	25.36 $\pm$ 2.47*	51.26 $\pm$ 5.18*	18.75 $\pm$ 1.57*
麻黄定喘汤低剂量组	10	85.36 $\pm$ 7.49 Δ	39.85 $\pm$ 4.63 Δ	72.95 $\pm$ 6.49 Δ	15.32 $\pm$ 2.06 Δ
麻黄定喘汤高剂量组	10	82.78 $\pm$ 7.25 $\Delta\Delta$	42.59 $\pm$ 4.12 $\Delta\Delta$	84.56 $\pm$ 7.53 $\Delta\Delta$	11.04 $\pm$ 1.95 $\Delta\Delta$

注: ROS, 活性氧; SOD, 超氧化物歧化酶; CAT, 过氧化氢酶; MDA, 丙二醛; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与麻黄定喘汤低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

3.3 各组小鼠 BALF 中 ROS、MDA 含量及 SOD、CAT 活性比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠 BALF 中的 ROS、MDA 含量明显升高, SOD、CAT 活性明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组中 ROS 及 MDA 含量降低, 而 SOD、CAT 的活性升高 ($P < 0.05$)。与麻黄定喘汤低剂量组比较, 麻黄定喘汤高剂量组小鼠 BALF 中 ROS 及 MDA 的含量减少更明显 ($P < 0.05$), 且 SOD 及 CAT 活性升高更明显 ($P < 0.05$)。

3.4 各组小鼠肺组织中 p-p38 MAPK、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中 p-p38 MAPK、Nrf2 及 HO-1 蛋白水平显著上升 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组 p-p38 MAPK 蛋白水平下降, Nrf2 及 HO-1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与麻黄定喘汤低剂量组比较, 麻黄定喘汤高剂量组小鼠肺组织 p-p38 MAPK 水平降低, Nrf2 及 HO-1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肺组织中 p-p38 MAPK、Nrf2 及 HO-1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p-p38 MAPK / p38 MAPK	Nrf2 / β -actin	HO-1 / β -actin
空白组	10	0.18 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.02
模型组	10	0.72 $\pm$ 0.12*	0.39 $\pm$ 0.05*	0.42 $\pm$ 0.03*
麻黄定喘汤低剂量组	10	0.56 $\pm$ 0.08 Δ	0.79 $\pm$ 0.09 Δ	0.75 $\pm$ 0.11 Δ
麻黄定喘汤高剂量组	10	0.48 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta$	0.89 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.91 $\pm$ 0.18 $\Delta\Delta$

注: p-p38 MAPK, 磷酸化 p38 核丝裂原活化蛋白激酶; p38 MAPK, p38 核丝裂原活化蛋白激酶; Nrf2, 核因子 E2 相关因子; HO-1, 血红素加氧酶 1; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与麻黄定喘汤低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

3.5 各组小鼠肺组织中 HO-1、Nrf2 mRNA 表达比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 麻黄定喘汤低剂量组、麻黄定喘汤高剂量组小鼠肺组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达明显升高

($P < 0.05$), 且麻黄定喘汤高剂量组较麻黄定喘汤低剂量组小鼠肺组织中 Nrf2、HO-1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。

表 4 各组小鼠肺组织中 Nrf2 和 HO-1 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Nrf2	HO-1
空白组	10	0.18 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.04
模型组	10	0.38 $\pm$ 0.01*	0.45 $\pm$ 0.03*
麻黄定喘汤低剂量组	10	0.81 $\pm$ 0.07 Δ	0.78 $\pm$ 0.06 Δ
麻黄定喘汤高剂量组	10	0.90 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	0.80 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$

注: Nrf2, 核因子 E2 相关因子; HO-1, 血红素加氧酶 1; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与麻黄定喘汤低剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

4 讨论

支气管哮喘属于朝医学“哮喘”范畴。太阴人因先天禀赋因素、疾病、外邪或接触异物, 肺党与之皮毛受之, 肺局之阳气为阴邪所抑, 肺直而伸之功减弱, 水谷温气上升消减, 髓海生成不足, 髓海之清汁滋肺元之力弱, 破坏了肝大肺小相对平衡的统一体, 形成痰浊。肺功能减弱, 则肝宽而缓之力增强, 血海之清汁滋肝元之力上升, 加重痰浊形成。且太阴人形体多肥胖, 喜食厚味, 欲静而不欲动, 易使血浊气涩。亦可气滞津停, 形成痰浊。太阴人由于肺弱肝强的脏腑先天格局, 外邪通过肌表侵及素体, 可使肺气更虚, 肺失宣降, 触动伏痰, 从而发为本病^[2-3]。在朝医“药乃局限于人”的药性观指导下, 课题组依据治疗原则选用临床疗效肯定、未见毒副作用的朝医太阴人方麻黄定喘汤。方中麻黄为主药, 止咳平喘; 杏仁配麻黄助止咳平喘; 黄芩收敛肺元, 清热解毒; 配桑白皮清肺止咳; 款冬花和肺、止咳化痰, 诸药合用解肺之表邪, 麦冬、桔梗、白果泻肝补肺祛痰、清热润燥、壮肺而有外攘之力; 莱菔子开肺之胃气而进食消食, 除生痰之源, 胃乃脾之党与, 故健脾补脾。共奏补肺脾泻肝, 化痰平喘, 达到标本兼顾之功效。

研究发现, 哮喘本质是气道炎症, 气道内炎症

细胞浸润及增多是其主要的病理变化所在,尤其是嗜酸性粒细胞的增殖是其特征性表现^[8]。本研究结果显示, BALF 中炎症细胞总数和各分类细胞数在麻黄定喘汤的治疗下均有所下降, HE 染色及 Masson 染色可见麻黄定喘汤抑制了 OVA 诱导的气道周围炎症细胞浸润,并明显减少气道周围的胶原沉积,且麻黄定喘汤高剂量组较麻黄定喘汤低剂量组疗效更明显。以上结果提示麻黄定喘汤通过抑制炎症细胞总数和各分类细胞数、炎性细胞因子,并同时减少哮喘小鼠气道周围的炎症细胞浸润和胶原沉积来抑制小鼠哮喘模型的气道内炎症,且以高剂量效果更好。

近年来研究表明, ROS 在不同种类的肺损伤中发挥重要作用,大量 ROS 爆发破坏了体内氧化-抗氧化平衡,使机体失去正常调节功能^[9]。本研究结果显示,朝医麻黄定喘汤减少了小鼠 BALF 中 ROS 含量,抑制了 MDA 水平增加,同时增加了抗氧化酶 SOD 和 CAT 的活性,从而减轻气道反应性,缓解过敏性炎症反应。以上结果表明了麻黄定喘汤能减少气道损伤,并且其减轻气道炎症的作用可能是通过减少氧化应激实现的。

p38MAPK 是参与诱发哮喘发作的一条重要信号转导通路^[10]。不同的刺激因子活化不同的信号通路从而直接或间接激发 p38MAPK 活性,使其产生三级激酶活化反应,并将信号传递到细胞核中,从而参与炎症和免疫反应等^[11]。另外, Nrf2 是调控细胞对抗外来异物和氧化损伤的关键转录因子^[12]。静息状态时 Nrf2 的抑制物 Keap1 通常与其结合游离在细胞浆中^[13-15]。当被细胞因子、肿瘤坏死因子、病毒、紫外线等细胞外信号刺激时,刺激因子直接作用于靶细胞,使结合体解离, Nrf2 产生核位移并被激活,从而调节炎症和免疫等基因转录^[16]。HO-1 是对抗应激反应和抗氧化损伤的重要组成部分,其相关表达受 Nrf2 的调控^[17]。血管内皮细胞 ERK 或 p38MAPK 抑制因子可以阻止 Nrf2 发生核转移,用 MAPK 的选择性抑制剂能够降低 Nrf2 的核转位,从而可以说明 Nrf2 的核转移需要 MAPK 的激活^[18]。活化的 Nrf2 和 AP-1 移动到胞核,诱导多种基因发挥抗氧化作用,进而调控炎症细胞因子,增加气道高反应性,并进一步放大炎症^[19]。

本实验检测了 p38MAPK 的磷酸化水平,并从 mRNA 及蛋白水平检测了 Nrf2 及 HO-1 的表达。我们观察到小鼠肺组织中 p38MAPK 的磷酸化受到麻黄定喘汤的抑制,而 Nrf2 及其下游的 HO-1 的表达明显增加,进而发挥抗氧化作用减轻炎症反应。麻

黄定喘汤干预后小鼠炎症细胞计数水平下降,说明麻黄定喘汤缓解了哮喘小鼠气道炎症反应。故推测麻黄定喘汤是通过抑制 p38MAPK/Nrf2/HO-1 信号通路的表达,进而减轻哮喘小鼠气道炎症,从而达到治疗哮喘的目的。

参考文献

- [1] LI Z, WANG H, LIU L, et al. Interleukin-25 Enhances allergic inflammation through p38MAPK and NF-kappaB pathways in mouse models of allergic rhinitis [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2014, 13(6): 412-419.
- [2] LI LC, PIAO HM, ZHENG MY, et al. Ginsenoside Rh2 attenuates allergic airway inflammation by modulating nuclear factor κ B activation in a murine model of asthma [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 6946-6954.
- [3] 秦钰,郝华,洪天一,等. 麻黄定喘汤对咳嗽变异性哮喘模型小鼠 Th1/Th2 类细胞因子水平的影响 [J]. 延边大学医学学报, 2011, 34(4): 262-264.
- [4] 李京玉,冯晓纯,金京丽,等. 朝医加味麻黄定喘汤在小鼠哮喘模型中对 ERK 信号通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(12): 3744-3747.
- [5] 张鑫,朴宇,郑明显. 鹿茸大补汤对太阴人哮喘缓解期的疗效 [J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(5): 871-872.
- [6] 周鑫,王志强. Nrf2-ARE 信号通路与哮喘的关系 [J]. 广东医学, 2011, 32(17): 2348-2349.
- [7] 谢建林,林明宝,侯琦. 核转录因子 Nrf2 与肺部炎症疾病研究进展 [J]. 药学报, 2015, 50(9): 1080-1087.
- [8] 宋冬梅,牛英豪,于磊,等. 王宝山乌司他丁通过 Nrf2/HO-1 抗氧化途径在 OVA 诱导的支气管哮喘小鼠中发挥治疗作用 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1713-1720.
- [9] 阮晓琳,周星星,彭来君,等. 气阴双补中药对哮喘大鼠肺组织 TGF- β 1 及 Smad2/3 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1271-1275.
- [10] NADEEM A, MASOOD A, SIDDIQUI N. Oxidant-antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options [J]. Ther Adv Respir Dis, 2008, 2(4): 215-235.
- [11] 王金磊,李承德,孙宏伟,等. 黄芪多糖抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路和改善哮喘大鼠气道炎症的作用 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4): 489-493.
- [12] DONOVAN CE, MARK DA, HE HZ, et al. NF- κ B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation [J]. J Immunol, 1999, 163(12): 6827-6833.
- [13] KASPAR JW, NITURE SK, JAISWAL AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(9): 1304-1309.

- [4] MANEECHOTESUWAN K, XIN Y, ITO K, et al. Regulation of Th2 cytokine genes by p38 MAPK-mediated phosphorylation of GATA-3 [J]. J Immunol, 2007, 178(4): 2491-2498.
- [5] 万晓红, 王雁, 赵国良, 等. 转导血红素氧合酶-1 蛋白减轻脑缺血/再灌注沙土鼠海马神经元的损伤 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(5): 628-632.
- [6] SONG DM, LIU G, NIU YH, et al. Anti-oxidative effect of Ulinastatin and potential role of heme oxygenase-1 in an ovalbumin-induced murine asthma model [J]. Chin J Tuberc Respir Dis, 2013, 36(3): 225-226.
- [7] KARNAD DR, BHADADE R, VERMA PK, et al. Intravenous administration of ulinastatin (human urinary trypsin inhibitor) in severe sepsis: a multicenter randomized controlled study [J]. Intensive Care Med, 2014, 40(6): 830-835.
- [8] 袁红艳, 张晔, 王丹, 等. 柞树皮对脂多糖和 D-氨基半乳糖诱导败血症休克小鼠的保护作用 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2886-2887.
- [9] WANG Z, ZHANG H, SUN X, et al. The protective role of vitamin D3 in a murine model of asthma via the suppression of TGF-beta/Smad signaling and activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3): 2389-2396.
- [10] 宋冬梅, 刘刚, 牛英豪, 等. 乌司他丁对支气管哮喘小鼠氧化应激及血红素加氧酶-1 的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(3): 225-226.
- [11] JAISWAL AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(10): 1199-1207.

Effects of Traditional Korean Medicine *Mahuang Dingchuan Decoction* (麻黄定喘汤) on p38 MAPK/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Bronchial Asthma Model Mice

YAN Guanghai¹, SUN Tianyi¹, XIAN Zhemin², JIANG Jingzhi¹, JIN Xiang¹, CHI Yutong¹, LI Liangchang¹, ZHENG Mingyu¹

(1. College of Medicine, Yanbian University, Yanji 133002; 2. Yanbian University Affiliated Hospital)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of traditional Korean medicine *Mahuang Dingchuan Decoction* (麻黄定喘汤) in treating bronchial asthma. **Methods** A total of 40 BABL/c mice were randomly divided into blank group, model group, *Mahuang Dingchuan Decoction* low dose group and high dose group, with 10 mice in each group. Except the blank group, asthma models were established by sensitization and challenge with ovalbumin (OVA). The low dose group was given 4 ml/100 g *Mahuang Dingchuan Decoction* (concentration 20 mg/ml) daily by gavage, and the high dose group was given 12 ml/100 g *Mahuang Dingchuan Decoction* daily by gavage. The mice in the blank group and the model group were given intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride solution for a total of 8 weeks. The broncho-alveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue were collected 24 h after the last challenge. The pathological changes were observed. The contents of inflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity in the BALF were detected. The phosphorylation of p38 nuclear mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK), nuclear factor E2 related factor (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1) levels in the lung tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the blank group, the inflammatory cells count, neutrophils and eosinophils, ROS and MDA in the BALF, p-p38 MAPK, Nrf2, HO-1 protein levels and the expression level of Nrf2, HO-1 mRNA in lung tissue of the model group were significantly increased, and SOD and CAT activities were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the inflammatory cells count, neutrophils and eosinophils in BALF of the high- and low-dose group were significantly decreased. The levels of ROS, MDA in the BALF, the level of p-p38 MAPK protein in lung tissue decreased. The activity of SOD and CAT in BALF and the expression of Nrf2 and HO-1 protein in lung tissue, and the expression of Nrf2 and HO-1 mRNA increased ($P < 0.05$). Compared with the low dose group of *Mahuang Dingchuan Decoction*, the inflammatory cells count, neutrophils, eosinophils, ROS and MDA in BALF, p-p38 MAPK level in lung tissue of high dose group of *Mahuang Dingchuan Decoction* group was significantly reduced, and SOD CAT activity and Nrf2, HO-1 protein and mRNA expression were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Traditional Korean medicine *Mahuang Dingchuan Decoction* can inhibit the airway inflammation in mice with bronchial asthma, of which affecting p38 MAPK/Nrf2/HO-1 signaling pathways by anti-oxidation might be one of the mechanisms.

Keywords bronchial asthma; *Mahuang Dingchuan Decoction* (麻黄定喘汤); p38 nuclear mitogen-activated protein kinase; nuclear factor E2 related factor; heme oxygenase 1

(收稿日期: 2018-05-15; 修回日期: 2019-02-22)

编辑: 王利芬