

白杨素对哮喘模型小鼠肺组织核因子- κ B 表达的影响

朱成华,姚 静,杜 强*

(南京医科大学第二附属医院呼吸科,江苏 南京 210011)

[摘要] **目的:**观察白杨素对急性哮喘模型小鼠肺组织核因子(nuclear factor, NF)- κ B 表达的影响。**方法:**24 只雌性 BALB/c 小鼠随机分成 4 组:正常对照组、哮喘组、白杨素组、布地奈德组,每组 6 只。使用卵白蛋白腹腔注射致敏,气道激发制备哮喘模型,白杨素组小鼠给予白杨素 50 mg/kg 灌胃,布地奈德组小鼠给予布地奈德雾化液雾化吸入。肺功能测定评价小鼠气道阻力,HE 染色评价小鼠气道炎症,酶联免疫吸附(ELISA)法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白介素(IL)-4、IL-13 和血清总 IgE 的水平,Western blot 检测肺组织 NF- κ B 蛋白表达。**结果:**哮喘组小鼠气道炎症和气道高反应性明显加重,白杨素能够显著抑制哮喘模型小鼠的气道炎症和气道高反应性,白杨素能够抑制哮喘小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 水平。哮喘组小鼠肺组织高表达的 NF- κ B 水平,经白杨素治疗后显著降低。**结论:**白杨素能够抑制哮喘小鼠的气道炎症和气道高反应性,其机制可能与抑制肺组织 NF- κ B 的表达有关。

[关键词] 白杨素;哮喘;气道炎症;核因子- κ B

[中图分类号] R562.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)07-798-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20160707

Effects of chrysin on the expression of nuclear factor- κ B in a murine model of asthma

Zhu Chenghua, Yao Jing, Du Qiang*

(Department of Respiration Medicine, the No.2 Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of chrysin on the expression of nuclear factor(NF)- κ B in lung tissues in a murine model of asthma. **Methods:** Twenty-four female BALB/c mice were randomly divided into 4 groups, including control group, asthma group, chrysin group and budesonide group. BALB/c mice were sensitized by intraperitoneal injection and challenged *via* the airway with ovalbumin (OVA). Mice in the chrysin group were intragastrically administered with chrysin (50 mg/kg). Mice in the budesonide group were exposed to aerosolized budesonide. Pulmonary functions were measured to evaluate the resistance of expiration. The sections were stained with either hematoxylin & eosin to assess the inflammatory cell infiltrates. The levels of interleukin IL-4 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and total immunoglobulin E (IgE) levels in serum were measured by ELISA. The protein expression of NF- κ B in lung tissues was determined by Western blotting assay. **Results:** Airway inflammation and airway hyperresponsiveness(AHR) were increased in the asthma group. Chrysin significantly inhibited the airway inflammation and AHR, and decreased the levels of IL-4 and IL-13 in BLAF and total IgE levels in serum. In addition, chrysin significantly attenuated the increased protein expression of NF- κ B in lung tissues of asthmatic mice. **Conclusion:** This study demonstrated that chrysin could suppress the progression of airway inflammation and AHR in a murine model of asthma. The effect may be due to inhibition of NF- κ B expression.

[Key words] chrysin; asthma; airway inflammation; NF- κ B

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07):798-801, 829]

支气管哮喘是一种常见的慢性气道炎症性疾病,以气道高反应性、嗜酸性粒细胞浸润和血清高 IgE 为其主要特征^[1]。核因子(nuclear factor, NF)- κ B

是体内一种重要的核转录因子,调控多种炎性基因的转录过程,在哮喘发病中具有重要作用^[2]。白杨素是一种天然多酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、免疫调节等多种生物学特性^[3-5]。本研究应用白杨素干预急性哮喘小鼠模型,观察其对气道炎症和高反应性的影响,进一步探讨这种抑制效果是否与调节肺组

[基金项目] 江苏省自然科学基金面上项目(BK20131436)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:jingshuyue@163.com

织 NF- κ B 表达有关。

1 材料与方法

1.1 材料

白杨素(纯度>97%,Sigma 公司,美国),小鼠白细胞介素(interleukin,IL)-4、IL-13 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海晶美生物工程有限公司),鸡血清卵白蛋白(OVA, V 级)(Sigma 公司,美国);血清总 IgE 试剂盒(Bionewtrans Pharmaceutical Biotechnology 公司,美国);NF- κ B 抗体(Santa Cruz 公司,美国);Histone 3 核抗体(Abcam 公司,美国);核蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);布地奈德雾化液(1 mg/2 mL, Astra Zeneca 公司,英国)。6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 纯系小鼠购自上海斯莱克实验动物中心,动物许可证号:SCXK(沪)2003-0003。

1.2 方法

1.2.1 小鼠哮喘模型的制备和分组

24 只雌性 BALB/c 小鼠,按随机原则分成 4 组:分别为正常组、哮喘组、白杨素组和布地奈德组,每组 6 只。哮喘组、白杨素组和布地奈德组于第 1 天和第 15 天,给予小鼠腹腔注射致敏液 0.2 mL(含 OVA 100 μ g, 氢氧化铝凝胶 1 mg),第 23~25 天连续 3 d 以 1% OVA 溶液经气道雾化吸入激发,1 次/d,30 min/次。白杨素组在第 16~25 天分别给予白杨素 50 mg/kg 灌胃^[6-7],1 次/d,布地奈德组在第 23~25 天,于每次雾化前 1 h 给予布地奈德雾化液 2 mg 雾化 30 min。正常对照组以生理盐水代替 OVA 处理。

1.2.2 小鼠气道反应性激发检测

末次气道激发 24 h 后,使用 3%戊巴比妥钠(70 mg/kg)给予小鼠腹腔注射麻醉,分离气管后切开插管,同时小鼠尾静脉穿刺置管给予氯化乙酰胆碱,连接 AniRes2005 动物肺功能分析系统(北京贝兰博科技有限公司),小动物呼吸机参数设置为:潮气量为 6 mL/kg,呼吸频率 90 次/min,吸呼比为 1:1.5。每只小鼠分别给予逐渐递增的氯化乙酰胆碱剂量 0、10、30、90 和 270 μ g/kg,然后测定气道阻力^[8-9]。

1.2.3 支气管内肺泡灌洗液 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 检测

小鼠眼眶静脉采血,1 000 g 低温离心 15 min 备用,收集血清后行支气管肺泡灌洗,分 3 次缓慢注入生理盐水,每次注入量为 0.4 mL,每次灌洗后立即回收置于离心管中计量,1 000 g 离心 10 min,取细胞沉渣做瑞氏染色,支气管肺泡灌洗液以及血

清行 IL-4、IL-13 和总 IgE 水平检测。具体操作参照 ELISA 检测试剂盒使用说明书进行。

1.2.4 小鼠肺组织病理改变

支气管肺泡灌洗后各组小鼠取左上叶肺组织,10%中性福尔马林固定过夜,石蜡切片后进行 HE 染色,观察肺组织炎性细胞浸润情况。

1.2.5 肺组织 NF- κ B 蛋白水平

使用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白,二喹啉甲酸法测定浓度。按试剂盒说明书进行操作,取上清液置于-70℃保存备用。BCA 法测定组织蛋白浓度。Western blot 蛋白印迹法检测肺组织 NF- κ B 蛋白表达水平。Histone 3 作为内参,使用 10%SDS-PAGE 凝胶电泳,电转印将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉封闭;加入稀释度为 1:1 000 的抗 NF- κ B 单克隆抗体 4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记二抗常温孵育 90 min。TBST 洗涤,ECL 发光显影,Bio-Rad Quantity One 软件分析数据。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS19 进行单因素方差分析,组间比较 Dunnett-*t* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白杨素抑制哮喘小鼠气道高反应性

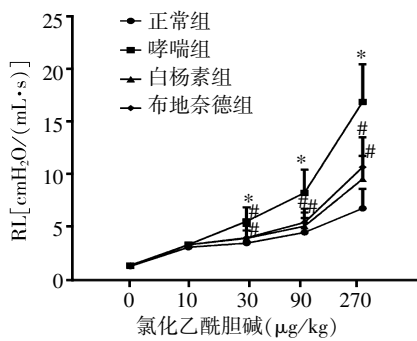
给予小鼠不同浓度的氯化乙酰胆碱后,气道阻力(RL)变化见图 1。在氯化乙酰胆碱浓度为 10 μ g/kg 时,各组小鼠 RL 差异无统计学意义($P > 0.05$)。当氯化乙酰胆碱浓度在 30~270 μ g/kg 范围内,与正常对照组小鼠比较,其余 3 组小鼠 RL 随剂量增加而显著升高;白杨素和布地奈德治疗后能够显著抑制哮喘组小鼠 RL 的升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 白杨素抑制哮喘小鼠肺组织炎性细胞浸润

HE 染色结果显示,正常对照组小鼠肺组织中气道上皮平整,支气管周围未见炎性细胞浸润。哮喘组小鼠气道上皮细胞脱落,支气管腔周围以及黏膜下可见嗜酸性粒细胞等炎性细胞浸润显著。白杨素和布地奈德治疗后,支气管周围和血管周围炎性细胞浸润显著减轻(图 2)。

2.3 白杨素抑制哮喘小鼠 BALF 中炎性细胞

正常组小鼠 BALF 中炎性细胞极少,其中以肺泡巨噬细胞为主,哮喘组小鼠 BALF 中炎性细胞总数显著增加,其中以嗜酸性粒细胞升高为主,与正常组小鼠相比差异均有统计学意义($P < 0.01$);白



与正常组相比, * $P < 0.01$; 与哮喘组相比, # $P < 0.05$ (n=6)。

图 1 白杨素抑制哮喘模型小鼠气道高反应性

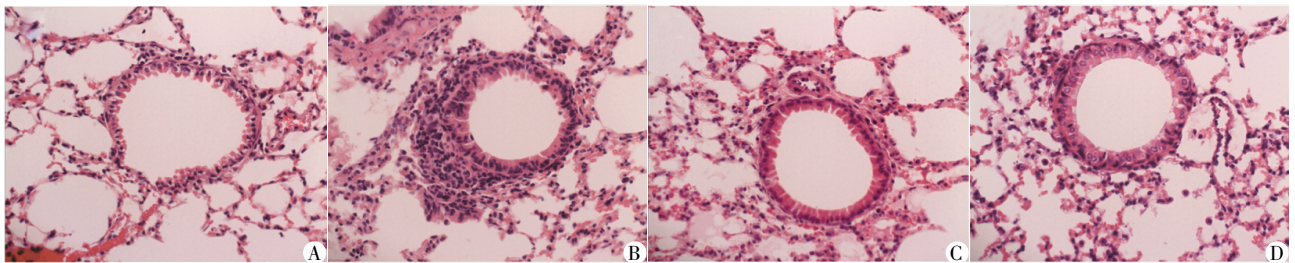
Figure 1 Chrysin inhibits airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma

杨素组和布地奈德组小鼠 BALF 中炎性细胞总数和嗜酸性粒细胞数百分比均明显降低, 与哮喘组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 白杨素抑制哮喘小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 水平

与正常组小鼠相比, 哮喘组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 明显升高 ($P < 0.01$), 与哮喘组相比, 白杨素组和布地奈德组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

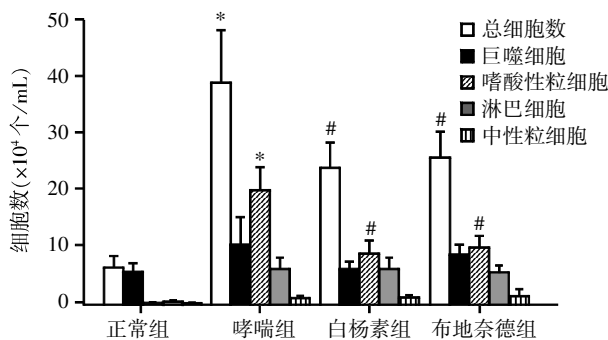
2.5 白杨素抑制哮喘模型小鼠肺组织 NF-κB 蛋白表达



A: 正常组; B: 哮喘组; C: 白杨素组; D: 布地奈德组。

图 2 HE 染色结果比较 (×100)

Figure 2 Chrysin inhibits airway inflammation in a murine model of asthma (HE, ×100)



与正常组相比, * $P < 0.01$; 与哮喘组相比, # $P < 0.05$ (n=6)。

图 3 4 组小鼠 BALF 总细胞数及细胞分类

Figure 3 Total cell count and cell classification of BALF mice of each group

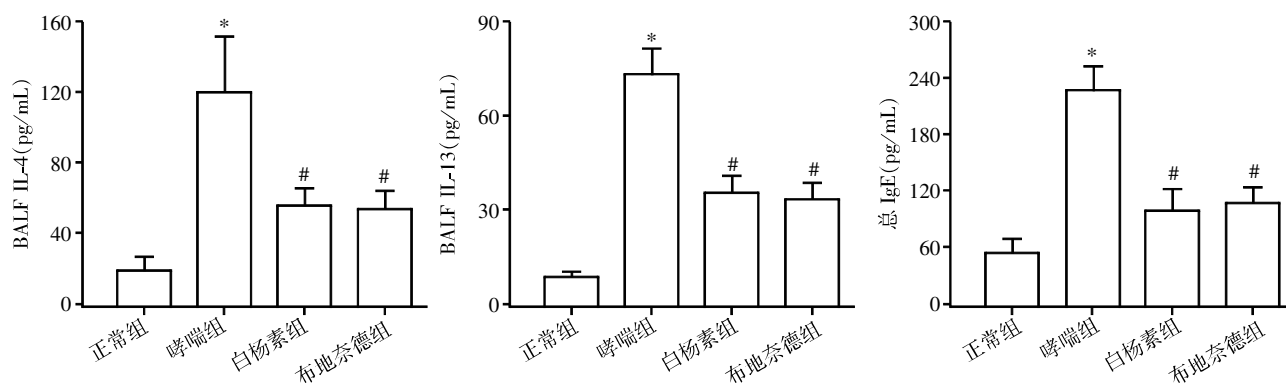
与正常组小鼠相比, 哮喘组小鼠肺组织 NF-κB 蛋白表达明显升高, 与哮喘组相比, 白杨素和布地奈德能够明显抑制哮喘小鼠肺组织高表达的 NF-κB 蛋白水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

哮喘是一种常见的以嗜酸性粒细胞浸润为主的慢性气道炎症性疾病, 哮喘患者机体存在 Th1/Th2 免疫失衡, 其中 Th2 功能亢进是致哮喘发病的重要免疫学基础^[1]。

白杨素 (chrysin) 是一种天然多酚类化合物, 属于多酚类中的黄酮类, 广泛存在于蔬菜、水果和茶叶中, 具有抗炎、抗氧化、免疫调节等多种生物学特性^[3-5]。既往有研究表明白杨素能够抑制烟雾暴露诱导小鼠的气道炎症^[10], 在本研究中, 白杨素能够显著抑制哮喘模型小鼠气道炎症与气道高反应性; 同时研究发现白杨素能够减少哮喘模型小鼠 BALF 中 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-13 的表达, 下调血清总 IgE 水平, 说明白杨素对于过敏性气道炎症性疾病具有一定的治疗作用。

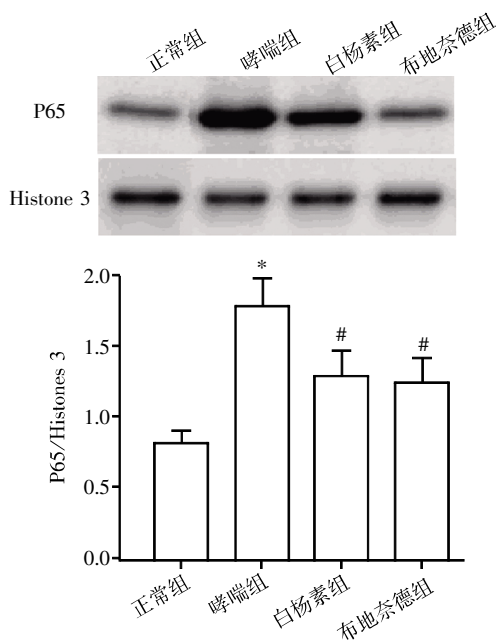
NF-κB 是体内一种重要的转录因子, 参与机体免疫反应和炎症过程。在哮喘发病过程中, 肺组织 NF-κB 持续激活, 调控多种促炎基因的表达与活化, 如细胞间黏附分子 1 (ICAM-1), 胸腺基质淋巴细胞 (TSLP) 和嗜酸性粒细胞趋化因子 (eotaxin)^[11], 从而导致慢性嗜酸性气道炎症的持续存在并进展。既往研究表明 NF-κB 能够调控 CD4⁺ T 细胞分化以及 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-13 的转录过程^[12]。通过抑制 NF-κB 的表达能够显著抑制哮喘 Th2 型气道炎症与气道高反应性^[13-14]。白杨素是一种重要的 NF-κB 抑制物, 实验表明白杨素能够抑制多种动物模型以及细胞的 NF-κB 活化及表达^[15-18]。本研究结果显



与正常组相比, * $P < 0.01$; 与哮喘组相比, # $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 4 4 组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 水平比较

Figure 4 Comparison of the levels of IL-4 and IL-13 in BLAF and total IgE in serum in each group



与正常组相比, * $P < 0.01$; 与哮喘组相比, # $P < 0.05$ ($n=6$)。

图 5 4 组小鼠肺组织 NF- κ B 表达比较

Figure 5 Comparison of protein expression of NF- κ B in lung tissues of each group

示,哮喘模型小鼠肺组织 NF- κ B 表达量明显增多,经白杨素治疗后,哮喘肺组织高表达的 NF- κ B 受到显著抑制,且与对照药物布地奈德相比,疗效相当,说明白杨素抗过敏性气道炎症的作用可能与抑制肺组织高表达的 NF- κ B 密切相关。

本研究揭示,白杨素对急性哮喘模型具有一定的治疗作用,其部分机制可能通过抑制哮喘模型肺组织 NF- κ B 的表达而实现,白杨素调节 NF- κ B 表达的具体分子机制有赖于今后实验进一步阐明。

[参考文献]

[1] Elias JA, Lee CG, Zheng T, et al. New insights into the pathogenesis of asthma[J]. J Clin Invest, 2003, 111(3):

291-297
[2] Hart LA, Krishnan VL, Adcock IM, et al. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158(5 Pt 1): 1585-1592
[3] Huang CS, Lii CK, Lin AH, et al. Protection by chrysin, apigenin, and luteolin against oxidative stress is mediated by the Nrf2-dependent up-regulation of heme oxygenase 1 and glutamate cysteine ligase in rat primary hepatocytes [J]. Arch Toxicol, 2013, 87(1): 167-178
[4] Rehman MU, Tahir M, Khan AQ, et al. Chrysin suppresses renal carcinogenesis via amelioration of hyperproliferation, oxidative stress and inflammation; plausible role of NF- κ B[J]. Toxicol Lett, 2013, 216(2-3): 146-158
[5] Rehman MU, Ali N, Rashid S, et al. Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: probable role of oxidative and inflammatory markers[J]. Pharmacol Rep, 2014, 66(6): 1050-1059
[6] Du Q, Gu X, Cai J, et al. Chrysin attenuates allergic airway inflammation by modulating the transcription factors T-bet and GATA-3 in mice[J]. Mol Med Report, 2012, 6(1): 100-104
[7] Xiao J, Zhai H, Yao Y, et al. Chrysin attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing immuno-inflammatory responses[J]. Neuroscience, 2014, 262: 156-164
[8] Du Q, Feng GZ, Shen L, et al. Paeonol attenuates airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of ovalbumin-induced asthma[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88(10): 1010-1016
[9] Zha WJ, Qian Y, Shen Y, et al. Galangin abrogates ovalbumin-induced airway inflammation via negative regulation of NF- κ B[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 767689
[10] Shen Y, Tian P, Li D, et al. Chrysin suppresses cigarette (下转第 829 页)