

文章编号: 1000-5862(2020)03-0259-04

山香圆总黄酮对慢性咽炎模型大鼠 NF- κ B、I κ B α 表达的影响

陈世华, 董德刚, 王思佳, 黎美琦, 胡明明, 黄佩蓓*

(江西中医药大学医学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 以 2.5% 氨水喷洒部建立大鼠慢性咽炎模型, 用 HE 染色法观察咽部病理形态学改变, 用 ELISA 法检测血清炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6, 用 RT-qPCR 测定咽部组织 NF- κ Bp65 mRNA 的表达, 用 Western blot 检测咽部组织 NF- κ Bp65 和 I κ B α 蛋白的表达, 探讨山香圆总黄酮对慢性咽炎模型大鼠 NF- κ B、I κ B α 表达的影响。结果显示: 山香圆总黄酮能明显改善模型大鼠咽部病理形态学; 与模型组比较, 山香圆总黄酮各组能不同程度地下调 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NF- κ Bp65 的表达并上调 I κ B α 的表达, 其中高剂量组最显著。这表明山香圆总黄酮能通过抑制 NF- κ B 的表达和 I κ B α 的解离下调炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达, 从而减轻炎症, 发挥抗慢性咽炎作用。

关键词: 山香圆; 总黄酮; 慢性咽炎; NF- κ B; I κ B α

中图分类号: R 285 **文献标志码:** A **DOI:** 10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.03.08

0 引言

山香圆盛产于江西赣南山区, 其叶入药^[1], 主治咽炎、扁桃体炎等咽喉疾病, 临床疗效确切^[2]。其主要化学成分为黄酮类、三萜类和有机酸等^[3-4]。现代药理研究发现, 山香圆具有抗炎、镇痛、增强免疫力等作用, 总黄酮是其发挥抗炎作用的主要有效成分^[5-7], 但其作用机制尚未明确。前期体外实验研究表明, 其抗炎作用与抑制 NF- κ B 蛋白表达有关^[8]。本文采用氨水喷洒部建立慢性咽炎大鼠模型, 以 NF- κ B/I κ B 信号通路为靶标, 探讨山香圆总黄酮抗慢性咽炎的作用及其机制, 为其临床应用、新药开发提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 60 只, 8~12 周龄, 220~250 g, 由江西中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(赣) 2018-0003。

1.1.2 实验试剂 ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技公司; RT-qPCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 引物由北京鼎国昌盛生物技术公司合成; NF- κ Bp65、I κ B α 抗体购自 Bioss 公司; 山香圆总黄酮为本实验室自提取, 质量分数为 53%; 慢严舒柠清喉利咽颗粒购自桂龙药业有限公司(批号 180503); 其他所用试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

酶标仪: Thermo; PCR 仪: ABI; 电泳仪: Bio-rad; 凝胶成像分析系统: Fluor Chem M。

2 方法

2.1 动物模型制备

用 2.5% 氨水在 50 只大鼠咽部喷雾造成大鼠慢性咽炎模型, 共处理 30 d, 每天 2 次, 每次 3 滴。

2.2 给药方式

空白对照组(10 只), 模型组(10 只), 给药低、中、高剂量组(每组 10 只), 阳性药组(10 只)。采用灌胃方式进行给药。造模成功后随机分为模型组(直

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 财政部中医药公共卫生服务补助专项(财社[2017]66 号), 江西省教育厅科技课题(170740) 和江西省卫计委中医药科研课题(2017A294) 资助项目。

通信作者: 黄佩蓓(1964-), 女, 江西南昌人, 教授, 主要从事中药生化研究。E-mail: 2072746792@qq.com

接取材)和给药山香圆总黄酮低剂量组($0.208 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组($0.416 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($0.832 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)以及阳性药(慢严舒柠清喉利咽颗粒)组($1.125 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),空白对照组灌服等体积生理盐水,每天1次,连续14 d.

2.3 HE 染色观察咽部病理形态学改变

取咽部黏膜及其下组织置于4%多聚甲醛中固定,制片、HE染色观察.

2.4 ELISA 检测炎症因子

于大鼠下腹部暴露主动脉处取血,分离血清,按照ELISA试剂盒操作方法测定血清中的炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6.

2.5 荧光定量检测基因表达

取大鼠咽部组织,依照试剂盒操作方法进行总RNA提取、cDNA的合成和qPCR反应.所用引物如表1所示.通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析NF- κ Bp65mRNA的表达水平.

表1 引物信息

目的基因	引物序列	产物长度/bp
β -actin	F5'-TTACTGCCCTGGCTCCTAG-3'	138
	R5'-CGTACTCTGCTTGCTGATC-3'	
NF- κ B	F5'-GCATTCTGACCTTGCTATC-3'	182
	R5'-CCAGTCTCCGAGTGAAGC-3'	

2.6 Western blot 检测蛋白表达

取大鼠咽部组织,用液氮研磨提取蛋白,并测定其质量浓度.按 $20 \mu\text{g}$ /孔进行蛋白电泳分离、转膜、封闭.结合1抗、2抗后,加入化学发光试剂显色、检测.

2.7 数据处理

采用SPSS22.0统计软件,对所有实验数据进行

处理分析.

3 结果

3.1 咽部病理形态学的改变观察

由图1可知,相比空白组,模型组黏膜上皮层角化,有明显增生、出血现象,炎性细胞密集性浸润;固有层大部分结缔组织纤维化;黏膜下层腺体肥大、增生.经药物干预后,各组病变均有不同程度好转,阳性药组和高剂量组明显好转,其咽部黏膜基本恢复正常,见极少量的炎性细胞浸润.

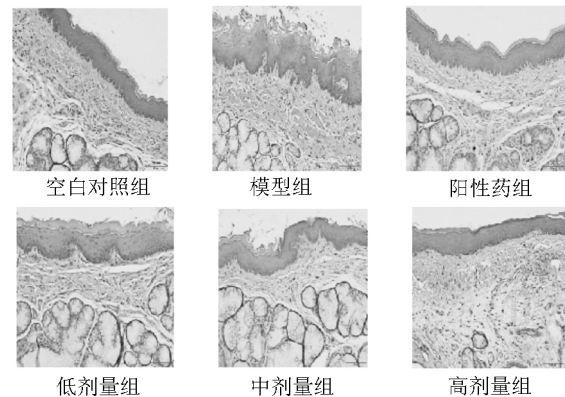


图1 各组大鼠咽部组织病理图片(HE染色,100倍)

3.2 血清炎症因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达

由表2可见,与空白组比较,模型组TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,阳性药物组能显著使其下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),低、高剂量组对IL-1 β 、IL-6的下调效果与阳性药物组无明显差异,中剂量组的下调效果低于低、高剂量组的下调效果,但仍能促使IL-1 β 、IL-6的表达下调.

表2 各组血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

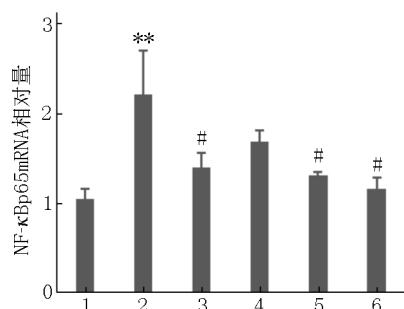
组别	TNF- α /($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-1 β /($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	IL-6/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	107.17 ± 3.448	16.45 ± 0.28	59.91 ± 0.56
模型组	$170.03 \pm 43.05^*$	$28.99 \pm 1.60^{**}$	$74.93 \pm 9.42^*$
阳性药组	$127.28 \pm 4.26^\#$	$20.75 \pm 1.36^{\#\#}$	$62.70 \pm 4.17^\#$
低剂量组	164.28 ± 39.02	$21.28 \pm 2.89^{\#\#}$	65.30 ± 5.33
中剂量组	155.47 ± 9.21	24.95 ± 1.57	70.57 ± 6.30
高剂量组	146.28 ± 14.80	$21.18 \pm 3.40^{\#\#}$	$64.06 \pm 4.05^\#$

注:与空白组比较,*、**分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$;与模型组比较,##、###分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$.

3.3 咽部组织NF- κ Bp65mRNA的表达

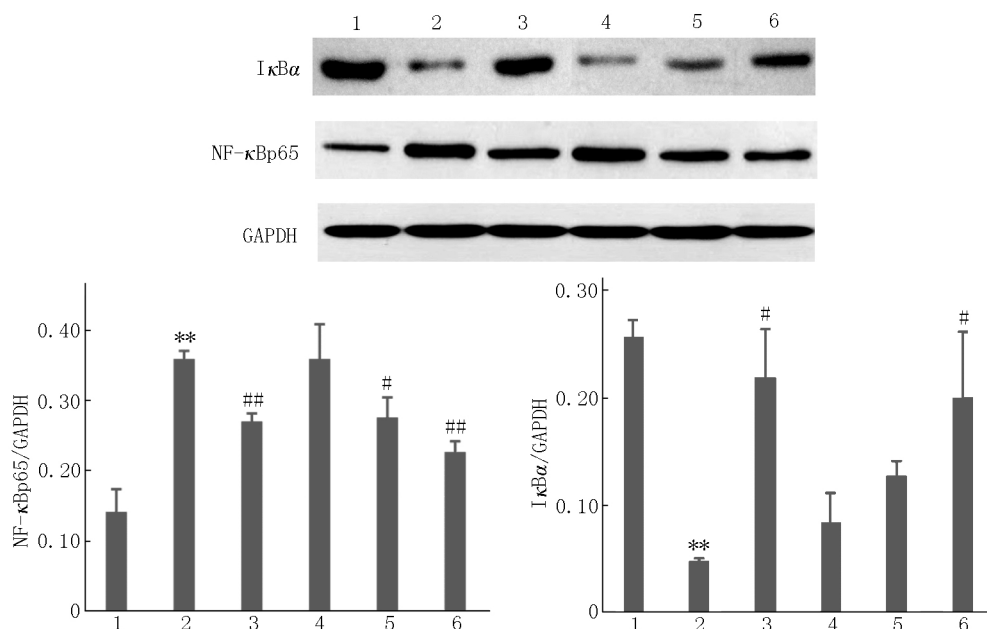
由图2可知,与空白组比较,模型组NF- κ Bp65mRNA的表达水平显著上升($P < 0.05$);与模

型组比较,除低剂量组NF- κ Bp65mRNA的下调无统计学意义上显著性外,其他各药物组均显著性下调($P < 0.05$).



注: 1. 空白组; 2. 模型组; 3. 阳性药组; 4. 低剂量组; 5. 中剂量组; 6. 高剂量组。与空白组比较, * 表示 $P < 0.05$; 与模型组比较 # 表示 $P < 0.05$ 。

图2 各组咽部组织 NF- κ Bp65mRNA 的表达



注: 1. 空白组; 2. 模型组; 3. 阳性药组; 4. 低剂量组; 5. 中剂量组; 6. 高剂量组。
与空白组比较, ** 表示 $P < 0.01$; 与模型组比较 #、## 分别表示 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

图3 各组咽部组织 NF- κ Bp65 和 I κ B α 蛋白的表达

4 讨论

慢性咽炎主要为咽部黏膜炎症^[9]。本文采用氨水于大鼠咽部喷雾制备模型,病理形态学观察结果表明:模型组与慢性炎症的改变基本一致^[10-11];经药物干预后,病变得到了改善,阳性药组和高剂量组咽部基本恢复到接近空白组。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子是慢性炎症反应的标记物,这反映在其水平的上升上^[12-13]。本文研究结果表明:模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达水平比空白组的均明显上升,经药物干预后其表达下调,阳性药组和高剂量组下调更显著。这指示本次大鼠慢性咽炎模型造模成功,山香圆总黄酮具有抑制慢性炎症的作用。

3.4 咽部组织 NF- κ Bp65 和 I κ B α 蛋白的表达

由图3可知,与空白组比较,模型组 NF- κ Bp65 蛋白的表达水平显著增加($P < 0.01$), I κ B α 蛋白的表达水平与 NF- κ Bp65 相反,显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,对于 NF- κ Bp65 蛋白,低剂量组的表达水平下调无统计学意义上显著性,其他各药物组均显著性下调($P < 0.05$, $P < 0.01$);对于 I κ B α 蛋白,低、中剂量组的表达水平上调无统计学意义上显著性,阳性药物组、高剂量组呈显著性上调($P < 0.05$)。

NF- κ B 是调节许多基因转录的重要转录因子^[14],通常以 p50-p65 二聚体与其抑制蛋白 I κ B α 结合,在细胞质中处于非活性状态;当受胞外因子刺激时, I κ B α 磷酸化降解, NF- κ B 活化入核,启动炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等相关基因的转录与表达,引发炎症^[15]。本文研究结果表明:模型组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、NF- κ Bp65 的表达水平比空白组的均明显上升,而 I κ B α 的表达水平比空白组的明显下降;与模型组比较,山香圆总黄酮各组均能不同程度地下调 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NF- κ Bp65 的表达并上调 I κ B α 的表达,其中以高剂量组最为显著。这说明山香圆总黄酮能通过抑制 NF- κ B 的表达和 I κ B α 的解离下调炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达,从而减轻炎症,发挥抗慢性咽炎的作用。

5 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典: I 部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 28.
- [2] 刘地发, 李志勇, 程帆, 等. 不同产地山香圆叶药材的质量评价 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 476-477.
- [3] 李云秋, 雷心心, 冯育林, 等. 锐尖山香圆叶化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(4): 261-264.
- [4] Wu Min, Wu Ping, Wei Xiaoyi. Megastigmans from *Turpinia arguta* [J]. Chemistry of Natural Compounds, 2014, 4(50): 772-773.
- [5] 肖春荣, 涂林锋, 张睿增, 等. 山香圆属植物的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1295-1304.
- [6] 马双刚, 袁绍鹏, 侯琦, 等. 山香圆叶中黄酮苷类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1747-1750.
- [7] 张磊, 李俊, 余世春, 等. 山香圆总黄酮的抗炎作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(3): 185-188.
- [8] 陈世华, 曾贤, 梁昊, 等. 山香圆总黄酮对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 iNOS、COX-2、NF- κ B 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(11): 69-71.
- [9] 王艺, 张玲, 周家璇. 咽炎消毒剂对慢性咽炎大鼠咽黏膜修复作用的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2015(15): 1600-1602.
- [10] 孔庆新, 东方, 李思阳, 等. 荔枝草提取物治疗慢性咽炎的作用及机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30: 109-113.
- [11] 杨铭, 郝慧, 于德伟, 等. 利咽灵对慢性咽炎大鼠治疗作用的实验研究 [J]. 中国药师, 2017, 20(3): 442-446.
- [12] 梁璐, 朴晋华, 马建丽. 急性和慢性咽炎的发病机制与动物模型建立的研究现状 [J]. 临床医药实践, 2012, 219(7): 540-543.
- [13] 刘雨娟, 王莉, 姚兰, 等. TNF- α 介导的 NF- κ B 通路在沙尘导致大鼠慢性咽炎中的作用及射干对其影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018(38): 94254-94256.
- [14] TaK P P, Firestein G S. NF- κ B: a key role in inflammatory disease [J]. Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(1): 7-11.
- [15] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路炎症反应 [J]. 生理科学进展, 2014, 45(1): 68-71.

The Effect of Total Flavonoids from *Turpinia arguta* Seem on NF- κ B and I κ B α Expression in Chronic Pharyngitis Model Rats

CHEN Shihua, DONG Degang, WANG Sijia, LI Meiqi, Hu Mingming, HUANG Peibei*

(College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Nanchang 330004, China)

Abstract: The rat chronic pharyngitis model is established by direct spray method of 2.5% ammonia water in rat pharyngeal mucosa. HE staining is used to observe pathological changes of pharynx. Serum inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 are detected by ELISA. NF- κ Bp65 mRNA expression is detected by RT-qPCR. NF- κ Bp65 and I κ B α protein expression is detected by Western blot. The effect of total flavonoids from *Turpinia arguta* Seem on the expression of NF- κ B and I κ B α in chronic pharyngitis model rats is investigated. The results show that total flavonoids from *Turpinia arguta* Seem can obviously improve the pathological morphological of pharynx tissue in rats. Compared with the model group, the total flavonoids from *Turpinia arguta* Seem group can down-regulate the expression of TNF- α , IL-6 and NF- κ Bp65, and up-regulate the expression of I κ B α in different degree, which is most significant in the high dose group, which indicates that total flavonoids from *Turpinia arguta* Seem can restrain the expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and IL-6 by inhibiting the expression of NF- κ B and the dissociation of I κ B α , reducing inflammation and exerting anti-chronic pharyngitis role.

Key words: *Turpinia arguta* Seem; total flavonoids; Chronic pharyngitis; NF- κ B; I κ B α

(责任编辑: 刘显亮)