

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.24.006

银杏叶提取物对 COPD 大鼠 p38MAPK/NF- κ B 信号通路的影响 *

张鹏飞¹ 廖丽君¹ 何智群^{1Δ} 郭栋伟¹ 张洪平¹ 张华玲¹ 吴仰聪²

(1 柳州市中医医院 广西 柳州 545000; 2 广西中医药大学 广西 南宁 530000)

摘要 目的: 观察银杏叶提取物 (Ginkgo biloba extract, GBE) 对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠肺 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路的影响, 探讨 GBE 对 COPD 抗炎作用的分子机制。**方法:** 将 90 只雄性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组、COPD 模型组、GBE 高剂量组、GBE 中剂量组、GBE 低剂量组、SB203580 (p38MAPK 抑制剂) 组, 共计 6 组, 每组 15 只。采用香烟烟雾熏吸联合气道内注入脂多糖 (LPS) 的方法建立 COPD 大鼠模型。造模结束后分组给药, 空白对照组与 COPD 模型组给予生理盐水腹腔注射, GBE 高、中、低剂量组 (14, 7, 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹) 分别给予不同浓度的 GBE 腹腔注射, SB203580 组予 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射, 每天给药 1 次, 连续给药 14 d。通过 HE 染色法观察大鼠肺泡和气道的病理变化, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定大鼠肺泡灌洗液 (BALF) 和血清中 IL-6、IL-8 与 IL-10 水平, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肺组织 p38MAPK、NF- κ B p65、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 蛋白含量, 采取实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time qPCR) 法检测大鼠肺组织中 p38MAPK、NF- κ B p65、I κ B α mRNA 表达。**结果:** 与 COPD 模型组相比, 各用药组均能抑制肺泡破坏与气道重塑, 减轻肺泡与支气管周围炎症浸润; 与空白对照组相比, COPD 模型组 BALF 与血清中 IL-6、IL-8 含量明显升高 ($P < 0.05$), IL-10 含量明显降低 ($P < 0.05$), 肺组织中 p38MAPK、NF- κ B p65 蛋白与 p38MAPK、NF- κ B p65 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), I κ B α 蛋白与 I κ B α mRNA 表达量明显下降 ($P < 0.05$); 与 COPD 模型组相比, 各药物组均能明显降低大鼠 BALF 与血清中 IL-8 含量、提高 IL-10 含量 ($P < 0.05$), 而 GBE 高剂量组与 SB203580 组效果更明显; GBE 高剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-6 含量较 GBE 低剂量组与 COPD 模型组明显降低 ($P < 0.05$); 与 COPD 模型组相比, 各药物组均能明显降低大鼠肺组织中 p38MAPK、NF- κ B p65 蛋白与 p38MAPK、NF- κ B p65 mRNA 表达量 ($P < 0.05$), GBE 高、中剂量组与 SB203580 组能明显提高 I κ B α 蛋白与 I κ B α mRNA 表达量 ($P < 0.05$)。**结论:** GBE 能抑制 COPD 大鼠炎症反应与气道重塑, 其机制可能与调控 p38MAPK/NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 银杏叶提取物; 慢性阻塞性肺疾病; p38MAPK/NF- κ B 信号通路; 炎症

中图分类号: R-33; R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)24-4632-07

Effects of Ginkgo Biloba Extract on p38MAPK/NF- κ B Signaling Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats*

ZHANG Peng-fei¹, LIAO Li-jun¹, HE Zhi-qun^{1Δ}, GUO Dong-wei¹, ZHANG Hong-ping¹, ZHANG Hua-ling¹, WU Yang-cong²

(1 Liuzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuzhou, Guangxi, 545000, China;

2 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530000, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Ginkgo biloba extract (GBE) on p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) / nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) in the lung of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). To explore the molecular mechanism of anti-inflammatory effect of GBE on COPD. **Methods:** 90 male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: blank control group, COPD model group, GBE high dose group, GBE medium dose group, GBE low dose group and SB203580 (p38MAPK inhibitor) group, with 15 rats in each group. The COPD rat model was established by smoking cigarette smoke and injecting lipopolysaccharide (LPS) into the airway. After modeling, the drugs were administered in groups. The blank control group and COPD model group were given intraperitoneal injection of normal saline, the high, medium and low dose GBE groups (14, 7, 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were given intraperitoneal injection of GBE of different concentrations, and the SB203580 group was given intraperitoneal injection of 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ once a day for 14 days. The pathological changes of rat alveoli and airways were observed by HE staining, the levels of IL-6, IL-8 and IL-10 in rat alveolar lavage fluid (BALF) and serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), The protein and mRNA expression of p38MAPK, NF- κ B p65, I κ B α in rat lung tissue were detected by Western blot and Real-time qPCR. **Results:** Compared with the COPD model group, each drug group could inhibit the destruction of alveoli and airway remodeling, and reduce the inflammatory infiltration around alveoli and bronchi; Compared with the blank control group, the contents of IL-6 and IL-8 in BALF and serum of COPD model group increased significantly ($P < 0.05$), the contents of IL-10 decreased significantly ($P < 0.05$). The

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81904111); 广西自然科学基金项目 (2020GXNSFBA297022)

作者简介: 张鹏飞 (1990-), 男, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 呼吸系统疾病的防治研究, 电话: 15289661469, E-mail: 2452506129@qq.com

Δ 通讯作者: 何智群, 女, 硕士, 副主任医师, 主要研究方向: 呼吸系统疾病的防治研究, E-mail: hezi2612@qq.com

(收稿日期: 2022-07-01 接受日期: 2022-07-24)

expression of p38MAPK, NF- κ B p65 protein and p38MAPK, NF- κ B mRNA in lung tissue increased significantly ($P<0.05$), I κ B α Protein and I κ B α mRNA expression decreased significantly ($P<0.05$); Compared with COPD model group, each drug group could significantly reduce the content of IL-8 in BALF and serum and increase the content of IL-10 ($P<0.05$), while the effect of GBE high dose group and SB203580 group was more obvious; The content of IL-6 in BALF in GBE high dose group and SB203580 group was significantly lower than that in GBE low dose group and COPD model group ($P<0.05$); Compared with COPD model group, each drug group could significantly reduce the expression of p38MAPK, NF- κ B p65 protein, p38MAPK and NF- κ B p65 mRNA in rat lung tissue ($P<0.05$), and GBE high and medium dose groups and SB203580 groups could significantly increase I κ B α protein and I κ B α mRNA expression ($P<0.05$). **Conclusion:** GBE can inhibit inflammatory response and airway remodeling in COPD rats, the mechanism may be related to the regulation of p38MAPK/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Ginkgo biloba extract; Chronic obstructive pulmonary disease; p38MAPK/NF- κ B signaling pathway; Inflammation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)24-4632-07

前言

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种常见的慢性阻塞性呼吸系统疾病,其特征是不可逆的气道狭窄和持续的呼吸道症状^[1]。COPD 是全球范围内第三大常见死因,每年导致 300 多万人死亡^[2],与发达国家相比,我国 COPD 的经济和社会负担更重,据统计我国 COPD 的总体患病率为 8.6%,而在 40 岁以上人群中,COPD 患者所占的比例高达 13.7%^[3]。气道炎症和重塑是引起 COPD 结构和功能改变的主要原因,它们导致气道狭窄和气流阻力的增大^[4]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族,是最关键的细胞内信号通路之一,包括 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 MAPK 和细胞外信号调节激酶(ERK)三个不同的应激活蛋白激酶途径^[5],其中 p38 MAPK 途径主要与炎症、应激反应及细胞生长密切相关^[6]。在 COPD 中,p38 MAPK 的激活与肺部炎症和呼吸功能的进行性恶化显著相关^[7]。NF- κ B 是 p38 MAPK 的下游信号分子,p38 MAPK 信号通路可促进 I κ B α 的磷酸化和降解,进而激活 NF- κ B 通路^[8]。NF- κ B 是一种具有广泛生物学功能的核转录因子,存在于几乎所有类型的哺乳动物细胞中^[9],是重要的炎症损伤因子,可调节多种炎症介质与细胞因子的表达^[10]。研究发现^[11],通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活,可减轻 COPD 小鼠气道炎症与肺气肿的严重程度。因此,通过抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路减轻肺内炎症、改善肺气肿,可能为治疗 COPD 提供一个新的方法。GBE 是从银杏的干燥叶中提取而来包含多种有效药用成分的混合物,能降低 COPD 大鼠 BALF 与血清中炎症因子水平^[12],但其具体机制尚不清楚。因此,我们通过建立 COPD 大鼠模型,研究 GBE 对 p38MAPK/NF- κ B 信号通路的影响,探讨 GBE 治疗 COPD 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

7 周龄清洁级雄性 Wistar 大鼠 90 只,体质量(200-250 g),购自长沙市天勤生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0013,合格证号:NO.430726210100363131,实验前 1 周将大鼠置于实验环境中饲养,室温维持在 20~26℃,空气流通好。将大鼠称重后,随机分为空白对照组、COPD 模型组、

GBE 高剂量组、GBE 中剂量组、GBE 低剂量组、SB203580 组,每组各 15 只。

1.2 主要药物、试剂与仪器

银杏叶提取物选用金纳多注射剂(规格 5 mL $\times$ 1 支,折合银杏叶提取物 17.5 mg,含银杏黄酮苷为 4.2 mg),购自台湾济生化学制药厂股份有限公司,批准文号:国药准字 HC20181022,批号:P5156;SB203580 购自上海碧云天生物技术有限公司(批号:011421210825),脂多糖购自北京索莱宝科技有限公司(批号:820F036),p38MAPK(批号:BA12018345)、NF κ B p65(批号:A105057712)、IKB α (批号:BA07267205)—抗均购自北京博奥森生物技术有限公司,IL-6、IL-8、IL-10 (批号:20220310) ELISA 试剂盒均购自武汉贝茵莱生物科技有限公司,SYBR FAST qPCR Master Mix (货号:KM4101) 购自美国 KAPA 公司;主要仪器:生物组织石蜡包埋机(YB-6LF,湖北孝感亚光)、石蜡切片机(RM2235,德国 LAICA),倒置显微镜(MI52-N,广东明美)、超低温冰箱(705,美国 THERMO),全波长酶标仪(MULTISKAN SKYHIGH,美国 THERMO SCIENTIFIC),全自动化学发光分析仪采用(Tanon-5200,上海天能),PCR 原位杂交仪(S1000,美国 BIO-RAD),实时荧光定量 PCR 仪(7500,美国 ABI)。

1.3 造模方法

参考黄文锋等^[13]的方法,采用香烟烟雾熏吸联合气管内注入 LPS 构建 COPD 大鼠模型,除空白对照组外其余各组在造模的第 1 d、第 14 d 将大鼠以 10%水合氯醛以腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于操作台,暴露喉头,向大鼠气管内注入 LPS100 μ L/100 g(1 mg/mL),完毕后将大鼠直立旋转 10~15 s,使 LPS 均匀分布于肺部,于实验的第 2~13 d、15~28 d,每天在自制烟熏箱(120 cm $\times$ 80 cm $\times$ 80 cm,含 1 个进烟孔,2 个排烟孔)中对大鼠进行香烟烟雾暴露,持续吸入香烟烟雾 1 h/d,30 支/d,造模 28 d 结束;空白对照组于实验第 1 d、第 14 d 气管内注入生理盐水(100 μ L/100 g)做对照,其余时间均进行正常饲养。造模结束后,从每组大鼠中随机选取 2 只,采用过量水合氯醛麻醉处死后,行肺组织病理检测确认造模成功。

1.4 分组给药

于实验的第 29 d-42 d 进行分组给药,其中空白对照组与 COPD 模型组均予腹腔注射生理盐水做对照,GBE 高剂量组予 GBE 14 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$ 腹腔注射,GBE 中剂量组予 GBE 7 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$

腹腔注射、GBE 低剂量组予 GBE 3.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射、SB203580 组予 SB203580 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射。

1.5 标本采集

于实验的第 43 d, 将各组大鼠以 10 % 水合氯醛麻醉 (3 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 分离大鼠腹主动脉, 采用一次性真空采血管取大鼠腹主动脉血约 5 mL/ 只, 离心 (3500 r/min, 离心 10 min) 后留取上层血清分装, 置于 -80 °C 超低温冰箱保存待检; 剪开大鼠颈部皮肤, 分离气管, 在环状软骨下用剪刀做 T 字形切口, 将自制气管插管由切口插入气管内, 缝线结扎固定, 取 5 mL 注射器去针头吸取生理盐水 3 mL, 从气管套管口注入肺脏, 轻柔按摩 2 分钟后回吸, 重复 3 次, 回收 BALF 约 6 mL, 离心 (3500 r/min, 离心 10 min) 后取上清置于 -80 °C 超低温冰箱保存待检; 随后快速剖取肺脏, 将右肺组织连续切片后置于 4 % 多聚甲醛固定液中固定, 用于后续病理检测; 余右肺组织置于 -80 °C 超低温冰箱保存用于后续蛋白提取与 RNA 提取。

1.6 观察指标与方法

1.6.1 HE 染色观察肺组织病理改变 将大鼠右肺组织置于 4 % 多聚甲醛中固定 48 h, 采用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 冰冻后切片, 切片厚度为 3 μm, 二甲苯脱蜡脱水, 行 HE 染色观察各组大鼠肺组织病理改变。

1.6.2 ELISA 检测各组大鼠 BALF 与血清中的炎症因子水平 采用 ELISA 检测大鼠 BALF 与血清中 IL-6、IL-8、IL-10 的含量, 具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.6.3 Western blot 检测各组大鼠肺组织 p38MAPK、NFKB

p65、IKB alpha 蛋白表达量 将各组大鼠肺组织剪成细小的碎片, 按每 20 mg 组织加入 200 μL 裂解液的比例加入裂解液 (裂解液中加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂), 匀浆器匀浆直至完全裂解。裂解后的样品 4 °C, 12000×g 离心 15 min, 取上清, 提取肺组织的总蛋白, 用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 调整蛋白浓度使各组保持一致, 取 20 μg 总蛋白上样, 用 SDS-PAGE 电泳分离后, 湿法转膜, 5 % 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 然后加入一抗 p38MAPK、NFKB p65、IKB alpha、β-Actin, 稀释比均为 1:1000, 4 °C 过夜, PBST 洗涤 3 次, 按照 1:10000 稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 与膜室温孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 3 次, 将膜放置在暗室中, 根据用量取 ECL 发光液进行显影, 采用 Image J 图像分析软件统计各条带灰度值并计算各蛋白表达水平。

1.6.4 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织 p38MAPK、NFKB p65、IKB alpha mRNA 表达 按照 Trizol 试剂说明书提取肺组织总 RNA, 逆转录合成 cDNA 作为模板, 在 20 μL 的反应体系中, 5×PrimeScript II Buffer 4 μL、10 mM dNTP Mix 2 μL、标本 RNA 500 ng, 混匀后 42 °C 60 min、70 °C 15 min, 将反转录产物置于冰中, 将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系如下: SYBR FAST qPCR Master Mix 10 μL、上游引物 F (10 μM) 0.5 μL、下游引物 R (10 μM) 0.5 μL、cDNA 模板 1 μL、ddH₂O (DNase/RNase-Free) 8 μL, 总体积 20 μL; 扩增条件: ① 95 °C 5 s, ② 56 °C 10 s, ③ 72 °C 25 s, 40 cycles; p38MAPK、NFKB p65、IKB alpha 表达水平以它们与 GAPDH 的相对表达量来计算, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析各组相对表达量。引物信息见表 1。

表 1 p38MAPK、NFKB p65、IKB alpha、GAPDH 的引物序列

Table 1 Primer sequences of p38MAPK, NFKB p65, IKB alpha, GAPDH

Gene	Upstream primer sequence	Downstream primer sequence	Fragment size (bp)
p38MAPK	5'-AGCAACCTCGCTGTGAATG-3'	5'-ACAACGTTCTTCCGGTCAAC-3'	208
NFKB p65	5'-CCAAAGACCCACCTCACCG-3'	5'-CCGCATTCAAGTCATAGTCCC-3'	237
IKB alpha	5'-TGTCTACACTTAGCCTCTATCCA-3'	5'-CATCAGCCCCACACTTCA-3'	172
GAPDH	5'-CAAGTCAACGGCACAG-3'	5'-CCAGTAGACTCCACGACAT-3'	138

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 并进一步用 LSD 法进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺泡病理改变

空白对照组大鼠肺泡结构正常, 肺泡周围无炎症细胞浸润, 肺泡腔无扩大; COPD 模型组大鼠肺泡结构紊乱, 肺泡周围炎症细胞浸润明显, 肺泡腔扩大, 大量肺泡壁断裂融合形成较多肺大泡; GBE 高、中、低剂量组与 SB203580 组肺泡结构稍紊乱, 肺泡周围可见少量炎症细胞浸润, 肺泡腔略扩大, 部分肺泡壁断裂融合形成少量肺大泡。见图 1。

2.2 大鼠气道病理改变

空白对照组大鼠支气管结构正常、管腔通畅, 管壁无增厚、管腔无狭窄, 纤毛排列整齐, 且无倒伏、脱落现象, 管腔周围未见炎症性细胞浸润; COPD 模型组大鼠支气管结构破坏明显、

管腔阻塞严重, 管壁明显增厚, 管腔狭窄, 纤毛排列紊乱、倒伏、脱落明显, 管壁及其周围可见大量炎症细胞浸润; GBE 高、中、低剂量组及 SB203580 组与 COPD 模型组相比, 支气管结构破坏、管腔狭窄及管壁增厚程度均有一定程度改善, 纤毛排列相对整齐, 部分纤毛倒伏、脱落, 管腔周围可见少量炎症性细胞浸润。见图 2。

2.3 各组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8、IL-10 含量的比较

与空白对照组相比, COPD 模型组 BALF 中 IL-6、IL-8 含量明显升高, IL-10 含量明显降低 ($P < 0.05$); 与 COPD 模型组相比, GBE 高、中、低剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-8 含量明显下降, IL-10 含量明显升高 ($P < 0.05$); GBE 高、中剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-6 含量较 COPD 模型组明显下降 ($P < 0.05$); GBE 高、中剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-6、IL-8 含量较 GBE 低剂量组明显下降 ($P < 0.05$), GBE 高剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-10 含量较 GBE 中、低剂量组明显升高 ($P < 0.05$)。详见表 2。

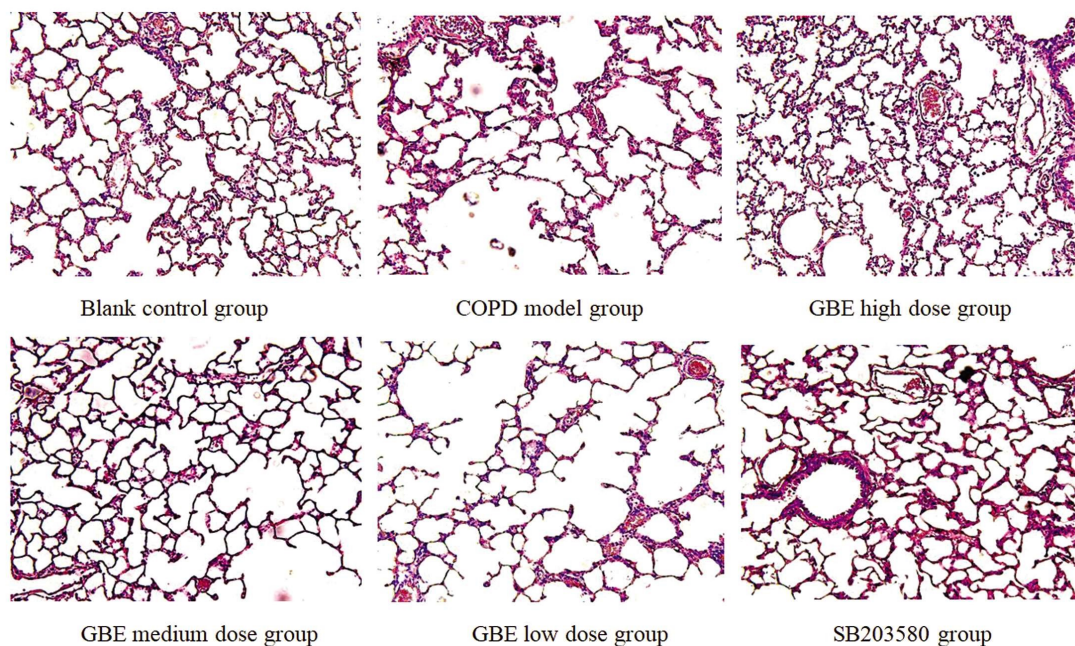


图 1 各组大鼠肺泡病理表现(× 200)

Fig. 1 Pathological manifestations of alveoli of rats in each group(× 200)

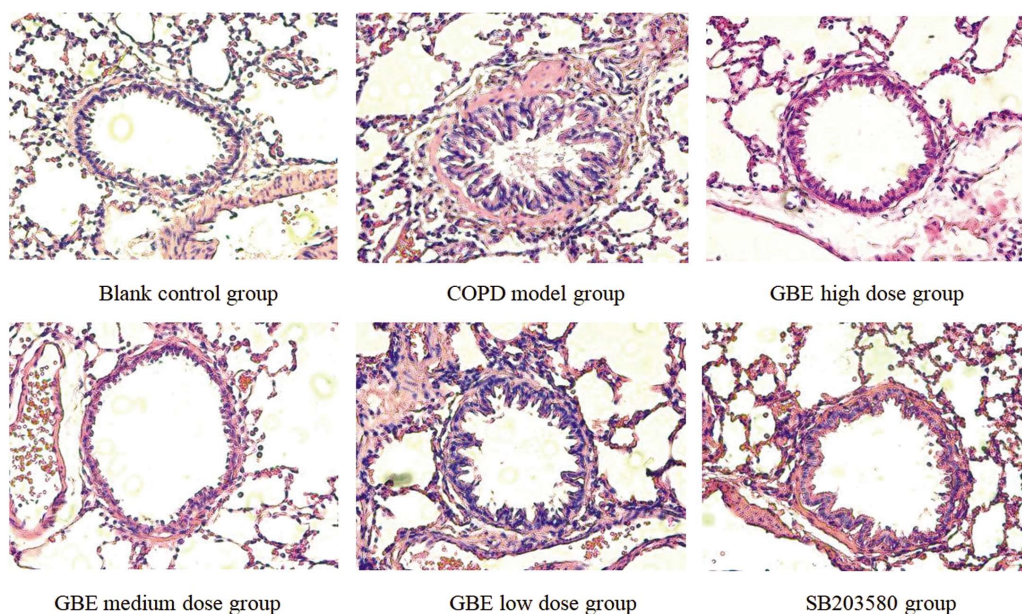


图 2 各组大鼠气道病理表现(× 400)

Fig. 2 Pathological manifestations of airway of rats in each group(× 400)

表 2 各组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8、IL-10 含量的比较($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n=13)Table 2 Comparison of the contents of IL-6, IL-8 and IL-10 in BALF of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, pg/mL, n=13)

Groups	IL-6	IL-8	IL-10
Blank control group	45.12±11.10	176.10±19.60	95.96±15.83
COPD model group	106.60±35.72 ^a	287.55±40.99 ^a	46.03±8.17 ^a
GBE high dose group	70.11±20.83 ^{ab}	197.16±16.17 ^{ab}	77.89±13.70 ^{ab}
GBE medium dose group	73.93±22.57 ^{ab}	210.80±15.01 ^{ab}	67.52±8.26 ^{abc}
GBE low dose group	97.32±28.08 ^{acd}	232.57±17.76 ^{abcd}	63.17±8.00 ^{abc}
SB203580 group	58.30±11.83 ^{bc}	209.51±22.23 ^{abc}	76.64±7.53 ^{abc}

Note: compared with the blank control group, ^a $P < 0.05$; Compared with COPD model group, ^b $P < 0.05$; Compared with GBE high dose group, ^c $P < 0.05$; Compared with GBE medium dose group, ^d $P < 0.05$; Compared with GBE low dose group, ^e $P < 0.05$.

2.4 各组大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-10 含量的比较

与空白对照组相比,COPD 模型组血清中 IL-6、IL-8 含量明显升高,IL-10 含量明显降低 ($P<0.05$);与 COPD 模型组相比,GBE 高、中、低剂量组与 SB203580 组 BALF 中 IL-6、IL-8 含量明显下降,IL-10 含量明显升高 ($P<0.05$);GBE 高剂量组血

清 IL-6 含量较 GBE 中、低剂量组与 SB203580 组明显下降 ($P<0.05$),而血清 IL-10 含量较 GBE 中、低剂量组与 SB203580 组明显升高 ($P<0.05$),GBE 中、低剂量组与 SB203580 组在血清 IL-6、IL-8、IL-10 含量的比较上,无统计学差异 ($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 IL-6、IL-8、IL-10 含量的比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL,n=13)

Table 3 Comparison of the contents of IL-6, IL-8 and IL-10 in serum of rats in each group($\bar{x}\pm s$,pg/mL,n=13)

Groups	IL-6	IL-8	IL-10
Blank control group	56.80±8.24	128.81±8.58	117.56±15.86
COPD model group	132.98±17.16 ^a	242.06±24.26 ^a	50.29±13.28 ^a
GBE high dose group	73.54±6.64 ^{ab}	151.50±12.08 ^{ab}	102.74±17.07 ^{ab}
GBE medium dose group	83.14±9.22 ^{abc}	162.54±12.26 ^{ab}	86.39±8.79 ^{abc}
GBE low dose group	87.57±4.88 ^{abc}	168.03±25.01 ^{abc}	76.99±17.62 ^{abc}
SB203580 group	82.47±7.47 ^{abc}	161.68±10.55 ^{ab}	83.49±9.34 ^{abc}

Note: compared with the blank control group, ^a $P<0.05$; Compared with COPD model group, ^b $P<0.05$; Compared with GBE high dose group, ^c $P<0.05$.

2.5 各组大鼠肺组织中 p38MAPK、NF-κB p65、IκBα 蛋白含量的比较

与空白对照组相比,COPD 模型组大鼠肺组织中 p38MAPK 与 NF-κB p65 蛋白含量明显升高,IκBα 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$);与 COPD 模型组相比,GBE 高、中、低剂量组与 SB203580 组大鼠肺组织中 p38MAPK、NF-κB p65 蛋白含量

明显下降,GBE 高、中剂量组与 SB203580 组大鼠肺组织中 IκBα 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$);GBE 低剂量组大鼠肺组织中 p38MAPK 与 NF-κB p65 蛋白含量明显高于 GBE 高、中剂量组,而 IκBα 蛋白含量明显低于 GBE 高剂量组 ($P<0.05$)。详见表 4,图 3。

表 4 大鼠肺组织 p38MAPK、NF-κB p65、IκBα 蛋白含量的比较($\bar{x}\pm s$,n=3)

Table 4 Comparison of p38MAPK, NF-κB p65, IκBα protein contents in rat lung tissue($\bar{x}\pm s$,n=3)

Groups	p38MAPK	NF-κB p65	IκBα
Blank control group	0.26±0.13	0.13±0.05	0.68±0.12
COPD model group	0.88±0.13 ^a	0.89±0.13 ^a	0.19±0.01 ^a
GBE high dose group	0.33±0.13 ^b	0.29±0.07 ^{ab}	0.58±0.13 ^b
GBE medium dose group	0.43±0.13 ^b	0.39±0.08 ^{ab}	0.48±0.09 ^{ab}
GBE low dose group	0.65±0.11 ^{abcd}	0.65±0.07 ^{abcd}	0.34±0.13 ^{ac}
SB203580 group	0.51±0.07 ^{ab}	0.48±0.02 ^{abce}	0.40±0.12 ^{ab}

Note: compared with the blank control group, ^a $P<0.05$; Compared with COPD model group, ^b $P<0.05$; Compared with GBE high dose group, ^c $P<0.05$; Compared with GBE medium dose group, ^d $P<0.05$; Compared with GBE low dose group, ^e $P<0.05$.

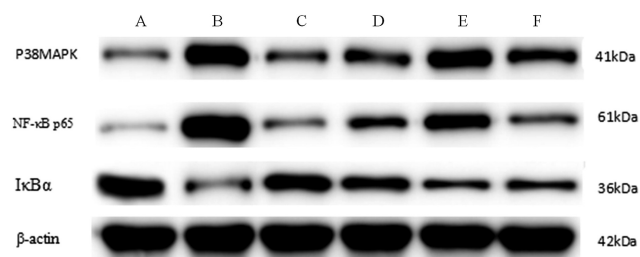


图 3 各组大鼠肺组织中 p38MAPK、NF-κB p65、IκBα 蛋白含量的比较

Fig. 3 Comparison of p38MAPK, NF-κB p65, IκBα protein contents in lung tissue of rats in each group

Note: A(Blank control group), B(COPD model group), C(GBE high dose group), D(GBE medium dose group), E(GBE low dose group), F(SB203580 group).

2.6 各组大鼠肺组织 p38MAPK、NFKB p65、IKB alpha mRNA 表达量的比较

与空白对照组相比,COPD 模型组大鼠肺组织中 p38MAPK 与 NF-κB p65 mRNA 表达量明显升高,IκBα mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$);与 COPD 模型组相比,GBE 高、中、低剂量组与 SB203580 组大鼠肺组织中 p38MAPK、NF-κB p65mRNA 表达量明显下降,GBE 高、中剂量组与 SB203580 组大鼠肺组织中 IκBα mRNA 表达量明显升高 ($P<0.05$);GBE 低剂量组大鼠肺组织中 p38MAPK mRNA 表达量明显高于 GBE 高、中剂量组 ($P<0.05$),GBE 低剂量组与 SB203580 组 IκBα mRNA 表达量明显低于 GBE 高、中剂量组 ($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 大鼠肺组织 p38MAPK、NF- κ B p65、I κ B α mRNA 表达量的比较($\bar{x}\pm s$, n=6)Table 5 Comparison of p38MAPK, NF- κ B p65, I κ B α mRNA expression in rat lung tissue($\bar{x}\pm s$, n=6)

Groups	p38MAPK	NFKB p65	IKB alpha
Blank control group	1.30 $\pm$ 0.92	1.07 $\pm$ 0.43	1.01 $\pm$ 0.14
COPD model group	67.52 $\pm$ 47.59 ^a	264.47 $\pm$ 122.28 ^a	0.01 $\pm$ 0.00 ^a
GBE high dose group	3.03 $\pm$ 1.90 ^b	3.20 $\pm$ 1.47 ^b	0.50 $\pm$ 0.04 ^{ab}
GBE medium dose group	5.90 $\pm$ 4.09 ^b	6.97 $\pm$ 2.08 ^b	0.21 $\pm$ 0.05 ^{abc}
GBE low dose group	36.52 $\pm$ 24.71 ^{abcd}	29.28 $\pm$ 15.07 ^b	0.03 $\pm$ 0.01 ^{acd}
SB203580 group	11.23 $\pm$ 6.65 ^b	11.86 $\pm$ 1.77 ^b	0.10 $\pm$ 0.02 ^{abcd}

Note: compared with the blank control group, ^a $P<0.05$; Compared with COPD model group, ^b $P<0.05$; Compared with GBE high dose group, ^c $P<0.05$; Compared with GBE medium dose group, ^d $P<0.05$.

3 讨论

COPD 是一种以不可逆的气流阻塞为特征的肺部炎症性疾病,其发病主要与长期吸入有害颗粒和气体有关^[4]。COPD 的发病机制非常复杂,具有多种致病机制,其中以气道炎症为 COPD 的核心发病机制,并与氧化应激、衰老、线粒体功能障碍、上皮-间充质转化等机制相关^[5]。巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞参与 COPD 气道炎症的发生、发展,这些细胞被激活后可促进多种炎症介质与细胞因子的释放,主要包括 IL-6、IL-8 等^[6]。研究发现^[7],COPD 大鼠 BALF 中炎症细胞数量与血浆中 IL-6 和 IL-8 含量明显升高。IL-6 是一种多功能促炎细胞因子,在炎症反应的发展中起着关键作用^[8]。IL-8 的主要功能是一种趋化因子,参与肺部疾病气道炎症中中性粒细胞的募集,而且通过促进肺成纤维细胞的增殖和迁移,在气道纤维化和重塑中发挥重要作用^[9]。IL-10 是一种抗炎因子,可以抑制炎症反应的扩大^[20],其是 B 淋巴细胞的经典刺激物,通过抑制 NF- κ B 的表达来抑制 Th1 细胞产生 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ ^[21]。

COPD 的主要触发因素是空气污染、香烟烟雾、空气传播的污染物和病毒/细菌感染,而这些因素均可激活 p38 MAPK 信号通路,进而引起 COPD 患者肺部炎症加重和呼吸功能下降^[22]。研究发现^[23],应用 p38 MAPK 抑制剂可降低肺成纤维细胞分泌 IL-6、IL-8、TNF- α 等细胞因子的水平,进而发挥抑制 COPD 气道炎症与气道重塑的作用。NF- κ B 是一种调节多种炎症基因表达的转录因子,与 COPD 的发病密切相关^[24],通过抑制 NF- κ B 的激活,能明显降低 COPD 小鼠 BALF 中炎症细胞数量和 IL-6、IL-8 等炎症因子水平^[25]。NF- κ B 家族由 RelA (p65)、RelB、c-Rel、p105/p50 (NF- κ B1) 和 p100/p52 (NF- κ B2) 五种转录因子组成^[26],其中 p65 蛋白在 NF- κ B 信号通路的调节中发挥重要作用,是 NF- κ B 核转移、激活靶基因转录的关键性蛋白^[27]。I κ B 蛋白,包括 I κ B α 、I κ B β 、I κ B ϵ 、I κ B ζ 、Bcl-3 (B 细胞淋巴瘤 3 编码蛋白)和前体 Rel 蛋白 p100 (I κ B δ)、p105 (I κ B γ),其中 I κ B α 被认为是 NF- κ B 信号通路的唯一抑制剂^[28]。研究发现^[10],通过抑制 I κ B α 的降解,可降低 NF- κ B 的活性,从而发挥减轻 COPD 小鼠气道炎症和气道重塑的作用。

本研究中,与空白对照组相比,COPD 模型组大鼠肺泡结构破坏与气道重塑均较明显,BALF 与血清中促炎因子 IL-6、IL-8 含量明显升高,而抑炎因子 IL-10 含量明显降低;肺组织

中 p38MAPK、NF- κ B p65 蛋白与 p38MAPK、NF- κ B p65 mRNA 表达量明显升高,而 I κ B α 蛋白与 I κ B α mRNA 表达量明显下降;说明在 COPD 中 p38MAPK/NF- κ B 信号通路被激活,促进炎症因子 IL-6、IL-8 的释放,进而引起气道炎症与全身炎症反应,导致肺组织损伤与气道重塑。与 COPD 模型组相比,各药物干预组肺组织中 p38MAPK、NF- κ B p65 蛋白与 p38MAPK、NF- κ B p65 mRNA 表达量明显降低,I κ B α 蛋白与 I κ B α mRNA 表达量升高,BALF 与血清中 IL-6、IL-8 含量下降,IL-10 含量明显升高,肺泡结构破坏与气道重塑情况均有一定程度的改善。在降低 BALF 中 IL-6、IL-8 含量与提高 IL-10 含量上,GBE 高剂量组与 SB203580 组明显优于 GBE 低剂量组;与 GBE 中、低剂量组及 SB203580 组相比,GBE 高剂量组能明显降低大鼠血清中 IL-6 含量,提高 IL-10 含量;GBE 高、中剂量组在抑制 p38MAPK、NF- κ B p65 蛋白表达上明显优于 GBE 低剂量组,在降低 p38MAPK mRNA 表达上与 GBE 低剂量组相比 GBE 高、中剂量组更具优势;而在提高 I κ B α mRNA 表达上,GBE 高剂量组明显优于 GBE 中、低剂量组及 SB203580 组。说明 GBE 在抑制 p38MAPK/NF- κ B 信号通路活性,降低 IL-6、IL-8 含量与提高 IL-10 含量上与给药剂量呈正相关,使用高剂量 GBE 更具优势。

综上所述,GBE 能抑制 COPD 大鼠气道与全身炎症反应,改善肺组织损伤与气道重塑,其机制可能与调控 p38MAPK/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献 (References)

- [1] Liu J, Ran Z, Wang F, et al. Role of pulmonary microorganisms in the development of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Crit Rev Microbiol, 2021, 47(1): 1-12
- [2] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2021 GOLD Report. Global strategy for prevention, diagnosis and management of COPD.<https://goldcopd.org/2021-gold-reports/> Accessed April 2021
- [3] Wang C, Xu J Y, Yang L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study [J]. Lancet, 2018, 391 (10131): 1706-1717
- [4] Barnes PJ. Inflammatory endotypes in COPD[J]. Allergy, 2019, 74(7): 1249-1256
- [5] An J, Yang T, Dong J, et al. Identifying miRNA Modules and Related Pathways of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Associated

- Emphysema by Weighted Gene Co-Expression Network Analysis[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 3119-3130
- [6] 吕天宜,李得民,程思益,等.呼吸系统疾病中 p38 MAPK 信号通路对糖皮质激素受体的调控[J]. *医学综述*, 2021, 27(4): 625-630
- [7] Pelaia C, Vatrella A, Gallelli L, et al. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Asthma and COPD: Pathogenic Aspects and Potential Targeted Therapies[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 1275-1284
- [8] 严春霞,何国产,闻人庆,等.解毒清肺合剂对肺炎支原体感染大鼠肺组织 NF- κ B 和 p38 MAPK 通路的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(5): 926-932
- [9] Zhang T, Ma C, Zhang Z, et al. NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *MedComm*, 2021, 2(4): 618-653
- [10] Yuan J, Liu R, Ma Y, et al. Curcumin Attenuates Airway Inflammation and Airway Remodeling by Inhibiting NF- κ B Signaling and COX-2 in Cigarette Smoke-Induced COPD Mice [J]. *Inflammation*, 2018, 41(5): 1804-1814
- [11] Zhang X, Guo S, Huang X, et al. A novel macrolide derivative ameliorates smoke-induced inflammation and emphysema by inhibiting NF- κ B activation[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(3): 1209-1220
- [12] 谭玉萍,张鹏飞,冯玉清,等.GBE 对 COPD 大鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-1、IL-8 含量的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(5): 7-10
- [13] 黄文锋,陈斯宁,吴嘉冬,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的构建[J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(6): 801-803
- [14] Leap J, Arshad O, Cheema T, et al. Pathophysiology of COPD[J]. *Crit Care Nurs Q*, 2021, 44(1): 2-8
- [15] 李锋,周新.慢性阻塞性肺疾病的发病机制研究进展[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2019, 18(1): 88-92
- [16] Barnes PJ. The cytokine network in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(6): 631-638
- [17] Li L, Xu L, Wu X, et al. Effect of Daiqin phlegm-expelling pill on development of inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease induced by lipopolysaccharide and smoke [J]. *J Tradit Chin Med*, 2019, 39(1): 59-64
- [18] Ghebre MA, Pang PH, Diver S, et al. Biological exacerbation clusters demonstrate asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and microbiome profiles [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 2027-2036
- [19] Li Y, Su G, Zhong Y, et al. HB-EGF-induced IL-8 secretion from airway epithelium leads to lung fibroblast proliferation and migration [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 347
- [20] Yang D, Wang L, Jiang P, et al. Correlation between hs-CRP, IL-6, IL-10, ET-1, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Combined with Pulmonary Hypertension[J]. *J Healthc Eng*, 2022, 2022: 3247807
- [21] Leon-Cabrera S, Arana-Lechuga Y, Esqueda-León E, et al. Reduced systemic levels of IL-10 are associated with the severity of obstructive sleep apnea and insulin resistance in morbidly obese humans [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 493409
- [22] Pelaia C, Vatrella A, Sciacqua A, et al. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in COPD: pathobiological implications and therapeutic perspectives[J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(5): 485-491
- [23] Higham A, Singh D. Dexamethasone and p38MAPK inhibition of cytokine production from human lung fibroblasts [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2021, 35(4): 714-724
- [24] Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age[J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(5): 309-324
- [25] Lee J W, Ryu H W, Lee S U, et al. Pistacia weinmannifolia ameliorates cigarette smoke and lipopolysaccharide induced pulmonary inflammation by inhibiting interleukin 8 production and NF- κ B activation[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(3): 949-959
- [26] Zhang L, Zhao J, Gurkar A, et al. Methods to Quantify the NF- κ B Pathway During Senescence [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1896: 231-250
- [27] Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- κ B p65 and strategies for therapeutic manipulation[J]. *J Inflamm Res*, 2018, 11: 407-419
- [28] Espinosa L, Marruecos L. NF- κ B-Dependent and -Independent (Moonlighting) I κ B α Functions in Differentiation and Cancer [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(9): 1278