

# 荆防挥发油对炎症相关因子表达和调节的影响

葛卫红<sup>1\*</sup>, 郭建友<sup>2</sup>, 沈映君<sup>3</sup>, 陈民利<sup>1</sup>, 石森林<sup>1</sup>, 韩玉环<sup>1</sup>, 林洁<sup>1</sup>

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2 中国科学院 心理研究所, 北京 100101;

3 成都中医药大学, 四川 成都 610075)

**[摘要]** 目的:研究荆防挥发油对炎症相关因子表达和调节的影响。方法:用 OA 和 LPS 2 次打击,建立 2 次打击急性肺损伤(ALI)模型。荆防挥发油( $45.19 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ )对大鼠 ALI 模型支气管上皮细胞间黏附分子 CD54,肺组织核因子-B(NF- $\kappa$ B)p65、支气管上皮细胞中 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的组织化学观察及统计。结果:荆防挥发油能明显抑制 CD54 的表达、NF- $\kappa$ B p65 的活化及阻止 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的转录增加。结论:荆防挥发油抑制 CD54 的表达,减少 p65 蛋白的合成可能是其抗炎的分子机制之一。

**[关键词]** 荆防挥发油;细胞间黏附分子 CD54;核因子-B p65

**[中图分类号]** R 285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-5302(2007)17-1777-03

荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq 和防风 *Saposhnikovia divaricata* Schischk 是中医临床中常用的一组药对<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明,荆芥、防风均具有解热、镇痛、抗炎、抗菌、抗病毒等作用。荆芥、防风单煎及混合水煎均具有明显的镇痛、解热、抑制肠肌收缩的作用,两药单用与合用无明显差异,但荆芥、防风混合水煎液对炎症的抑制作用明显好于单煎。目前对于荆防挥发油的实验研究,主要集中在荆芥和防风的成分分析上<sup>[2-4]</sup>,对其药理作用研究报道并不多见。近年来,作者的实验室对荆防挥发油的抗炎药理作用进行了较为全面、深入的研究。结果表明,荆防挥发油对角叉菜胶致小鼠足肿胀和大鼠佐剂关节炎足肿胀有显著的抑制作用,能降低炎症小鼠模型血管活性胺和 PGE<sub>2</sub> 释放<sup>[5-7]</sup>。上述研究结果表明,荆防挥发油抗炎效果明确。

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发病机制主要是致病因子对肺血管内皮细胞的直接损伤和全身炎症反应。本实验通过免疫组化等技术观察荆防挥发油对大鼠 ALI 模型支气管上皮细胞间黏附分子-1(inter-cellular adhesion molecule, ICAM-1,又名 CD54)、肺组织核转录因子-B(nuclear transcription factor kappa B, NF- $\kappa$ B)和支气管上皮细胞中 NF- $\kappa$ B mRNA 的影响,以进一步明确荆防挥发油的作用机

制,有助于更好地开展临床应用。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠, (250 ± 25) g, 雄性, 动物质量合格证号: 医动字第 220010004, 由中国科学院上海实验动物中心提供。

**1.2 药品和试剂** 荆防挥发油, 出油率为 0.56%, 以 0.5% 的山梨醇甲酯溶液配成合适浓度使用。CD54 SABC 测定试剂盒(批号 011136), NF- $\kappa$ B p65 即用型 SABC 测定试剂盒(批号 011109)和 NF- $\kappa$ B p65 原位杂交检测试剂盒(批号 011118)均由武汉博士德生物工程有限公司提供。LPS 由美国 Sigma 提供。其余为市售试剂。

## 2 方法

**2.1 动物分组及处理** 大鼠 40 只, 随机分为 4 组( $n = 10$ ), 正常组和模型组: 灌胃(ig)生理盐水 10 mL · kg<sup>-1</sup>; 地塞米松阳性药组: 5 mg · kg<sup>-1</sup> (ig); 荆防油组: 45.19  $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$  (ig)。除阳性药组外, 各组动物每天分别给药 1 次, 连续 3 d, 阳性药组于正式实验前注射地塞米松。末次给药后 2 h, 各鼠经尾静脉注入油酸 0.2 mL · kg<sup>-1</sup>, 分别在注入油酸后 4 h, 实施第 2 次打击, 选择另一支尾静脉注入 LPS 2 mg · kg<sup>-1</sup><sup>[8]</sup>。2 h 后处死动物, 取右侧全肺用 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片。用于免疫组化检测 CD54, NF- $\kappa$ B p65 表达和原位杂交检测 NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达。

**2.2 免疫组织化学染色** 一抗 CD54 或 NF- $\kappa$ B p65 (工作浓度 1:100), 按 SABC 试剂盒说明染色, DAB 显

**[收稿日期]** 2006-08-10

**[通讯作者]** \*葛卫红, Tel: (0571) 86613603, E-mail: geweihong

@sina.com

色。光镜 (×330) 观察, 每张切片随机观察 5 个视野, 将视场摄入计算机图像分析系统, 做图象分析, 照像。

**2.3 原位杂交检测方法** 采用的探针为 NF- B p65 的寡核苷酸探针, 经地高辛标记, 其寡核苷酸探针序列为 5'-GA TCACA TCCCCACCGA GGCA GCTGC-CAGA-3'。按试剂盒说明操作, DAB 显色。光镜 (×330) 观察, 每张切片随机观察 5 个视野, 将视场摄入计算机图像分析系统, 做图象分析, 照像。

**2.4 统计方法** 实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 显著性比较采用 Student *t* 检验进行统计学分析。

### 3 结果

**3.1 对支气管上皮细胞间黏附分子 CD54 表达的影响** 光镜下可见 CD54 主要在肺巨噬细胞、间皮细胞及支气管上皮细胞膜中表达。正常大鼠的肺组织中 CD54 表达相对较低, 模型组大鼠的 CD54 表达明显增强, 荆防油组及地塞米松组的 CD54 表达也增强, 但比模型组弱。图像分析显示: 模型组阳性细胞面积总和及积分吸光度 (A) 总和较正常组明显增高, 有显著的统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 荆防油组及地塞米松组大鼠阳性细胞面积总和及积分 A 总和明显降低, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1。

表 2 对大鼠急性肺损伤模型肺组织细胞中 NF- B p65 表达和活化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量 / $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 阳性细胞面积总和 / $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ | 积分 A 总和 / $\times 10^5$         | 阳性细胞发生核位转移率 / %                 |
|--------------------|---|--|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常                 | -                                       | 3.76 $\pm$ 0.92                        | 11.63 $\pm$ 1.81                | 4.23 $\pm$ 2.35                 |
| 模型                 | -                                       | 38.71 $\pm$ 9.11 <sup>1)</sup>         | 62.35 $\pm$ 14.06 <sup>1)</sup> | 79.65 $\pm$ 8.63 <sup>1)</sup>  |
| 地塞米松 <sup>1)</sup> | 5                                       | 13.66 $\pm$ 5.45 <sup>2)</sup>         | 36.47 $\pm$ 9.68 <sup>2)</sup>  | 45.36 $\pm$ 14.66 <sup>2)</sup> |
| 荆防油                | 45.19                                   | 13.09 $\pm$ 7.33 <sup>2)</sup>         | 29.75 $\pm$ 8.43 <sup>2)</sup>  | 41.87 $\pm$ 14.45 <sup>2)</sup> |

**3.3 对大鼠支气管上皮细胞中 NF- B p65 mRNA 表达的影响** 光镜下可见正常大鼠的肺组织中 NF- B p65 mRNA 表达相对较低, 模型组大鼠的 NF- B p65 mRNA 表达明显增强, 荆防油组及地塞米松组的 NF- B p65 mRNA 表达也增强, 但比模型组弱。图像分析显示: 模型组阳性细胞面积总和及积分 A 总和较正常组明显增高, 有显著的统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 荆防油组地塞米松组大鼠阳性细胞面积总和及积分吸光度总和明显降低, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 3。

### 4 讨论

NF- B 是免疫球蛋白 链基因上游增强子的一个多功能核转录调节因子, 广泛存在各种组织细胞中, 具广泛的生物学活性, 激活后可促进细胞因子、黏附因子、趋化因子等基因转录, 调控多种细胞因子

表 1 对大鼠急性肺损伤模型支气管上皮细胞 CD54 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量 / $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 阳性细胞面积总和 / $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ | 积分 A 总和 / $\times 10^5$         |
|--------------------|---|--|---------------------------------|
| 正常                 | -                                       | 2.16 $\pm$ 0.53                        | 5.63 $\pm$ 0.67                 |
| 模型                 | -                                       | 23.41 $\pm$ 6.07 <sup>1)</sup>         | 40.18 $\pm$ 11.82 <sup>1)</sup> |
| 地塞米松 <sup>3)</sup> | 5                                       | 10.55 $\pm$ 4.13 <sup>2)</sup>         | 16.56 $\pm$ 7.02 <sup>2)</sup>  |
| 荆防油                | 45.19                                   | 9.82 $\pm$ 3.61 <sup>2)</sup>          | 10.37 $\pm$ 3.43 <sup>2)</sup>  |

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;

<sup>3)</sup> 地塞米松的剂量单位是  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (下同)

**3.2 对肺组织细胞中 NF- B p65 表达及其活性的影响** 光镜下可见正常大鼠肺组织在间质细胞中只见淡淡的棕色物质; 模型对照组大鼠肺组织的巨噬细胞、间质细胞胞浆及胞核大多有棕色物质, 且大多数已进入胞核, 表明 NF- B p65 已活化。给药各组大鼠肺组织的巨噬细胞、间质细胞的胞浆及胞核亦有棕色物质, 但与模型组比较症状明显减轻。图像分析显示: 模型组阳性细胞面积总和、积分 A 总和及阳性细胞发生核位转移率较正常组明显增高, 有显著的统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 荆防油组及地塞米松组大鼠阳性细胞面积总和、积分吸光度总和及阳性细胞发生核位转移率均明显降低, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 2。

表 3 对大鼠急性肺损伤模型支气管上皮细胞中 NF- B p65 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别                 | 剂量 / $\mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 阳性细胞面积总和 / $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ | 积分 A 总和 / $\times 10^5$        |
|--------------------|---|--|--------------------------------|
| 正常                 | -                                       | 2.88 $\pm$ 1.96                        | 5.36 $\pm$ 3.65                |
| 模型                 | -                                       | 15.28 $\pm$ 3.69 <sup>1)</sup>         | 29.31 $\pm$ 5.62 <sup>1)</sup> |
| 地塞米松 <sup>3)</sup> | 5                                       | 6.44 $\pm$ 4.12 <sup>2)</sup>          | 13.39 $\pm$ 5.28 <sup>2)</sup> |
| 荆防油                | 45.19                                   | 7.52 $\pm$ 3.23 <sup>2)</sup>          | 16.11 $\pm$ 6.09 <sup>2)</sup> |

和炎性介质等基因的表达, 参与免疫及炎症反应<sup>[9, 10]</sup>。Schwartz 等<sup>[11]</sup>研究证明, 内毒素激活核转录因子 B, 进而诱导促炎因子的大量生成, 这是急性肺损伤的关键发病环节, 因而防止 NF- B 的激活或抑制其活性已经成为治疗急性肺损伤的新途径之一。氧化应激是 NF- B 激活的重要途径, 而荆防挥发油具有较强的抗氧化效应<sup>[7]</sup>, 实验结果还表明荆

防挥发油能够抑制 NF- $\kappa$ B 的活化。荆防挥发油抗氧化效应、抑制 NF- $\kappa$ B 的活化和 mRNA 表达,可能是其发挥防治肺损伤作用的机制之一。

CD54 是一种免疫球蛋白超家族类的细胞表面黏附分子,参与多种炎症性疾病过程,其黏附功能是参与多种炎症性疾病的重要病理生理基础,CD54 在细胞表面表达量的多少代表炎症病变的程度<sup>[12,13]</sup>。在炎症反应中,CD54 是细胞与细胞接触过程中起中介作用的一种细胞黏附分子。在 ALI 时,炎症细胞与血管内皮细胞的相互作用可能对 CD54 的表达起关键作用。因此,本试验结果荆防挥发油能抑制 CD54 的表达,也是荆防挥发油降低 ALI 的发生程度、发挥抗炎作用的机制之一。荆防挥发油治疗 ALI 的作用,是否优于荆芥或防风挥发油单用治疗 ALI,本次实验没有进行比较研究,将在下次实验中进行探讨。

#### [参考文献]

- [1] 苏庆英. 中医临床常用对药配伍 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 11.
- [2] 吴玉兰, 丁安伟, 冯有龙. 荆芥及其相关药材挥发油的成分研究 [J]. 中草药, 2000, 31 (12): 891.
- [3] 贺蕊, 钟红玲, 张新, 等. 荆防口服液质量标准的研究 [J]. 中成药, 1999, 21 (1): 9.
- [4] 贺蕊, 刘葆琴, 钟红玲, 等. ZTC1 + 1 澄清剂法与水醇法制备荆防口服液的比较研究 [J]. 中草药, 1998, 29 (11): 734.
- [5] 葛卫红. 荆芥、防风挥发油抗炎作用的实验研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2003, 25 (1): 55.
- [6] 葛卫红, 李昌煜, 石森林, 等. 荆防挥发油的抗炎作用及 PGE<sub>2</sub> 的影响 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19 (1): 9.
- [7] 葛卫红, 李昌煜, 石森林, 等. 荆防挥发油对炎症介质、自由基及 VC、胆固醇含量的影响 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19 (2): 19.
- [8] 张青, 毛宝龄, 钱桂生, 等. 油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤动物模型研究 [J]. 第三军医大学学报, 2000, 22 (6): 99.
- [9] Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17 (1): 3.
- [10] Yi C, Wang S R, Zhang S Y, et al. Effects of recombinant human growth hormone on acute lung injury in endotoxemic rats [J]. Inflamm Res, 2006, 55 (11): 491.
- [11] Schwartz M D, Moore E E, Moore F A, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 1996, 24 (8): 1285.
- [12] Sato N, Suzuki Y, Nishio K, et al. Roles of ICAM-1 for abnormal leukocyte recruitment in the microcirculation of bleomycin-induced fibrotic lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161 (5): 1681.
- [13] Albelda S M, Smith C W, Ward P A. Adhesion molecules and inflammatory injury [J]. FASEB J, 1994, 8 (8): 504.

## Effects of volatile oil of *Fineleaf schizonepeta* herb and *Divaricate saposnikovia* root on proinflammatory cytokine expression and regulation

GE Wei-hong<sup>1</sup>, Guo Jian-you<sup>2</sup>, SHEN Ying-jun<sup>3</sup>, CHEN Min-li<sup>1</sup>, SHI Sen-lin<sup>1</sup>, HAN Yu-huan<sup>1</sup>, LI N Jie<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3. Chengdu Traditional Chinese Medical University, Chengdu 610075, China)

**[Abstract] Objective:** To study the effects of volatile oil of *F. schizonepeta* herb and *D. saposnikovia* root (OSS) on proinflammatory cytokine expression and regulation in rats. **Method:** OA and LPS were injected intravenously to rats to develop ALI. The rats were treated with OSS (45.19  $\mu$ L  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>). The pathological sections of lung tissue were prepared and observed in acute lung injury rats. The expression of nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65), intercellular adhesion molecule CD54, and NF- $\kappa$ B p65 mRNA were determined in lung cells. **Result:** volatile oil of *F. schizonepeta* herb and *D. saposnikovia* root significantly inhibited the expression of CD54, the activation of NF- $\kappa$ B p65, and the transcription of NF- $\kappa$ B p65 mRNA. **Conclusion:** OSS can reduce the expression of CD54 and NF- $\kappa$ B p65 protein synthesis, which may be its anti-inflammatory molecular mechanisms.

**[Key words]** volatile oil of *Fineleaf schizonepeta* herb and *Divaricate saposnikovia* root; CD54; nuclear factor- $\kappa$ B p65

[责任编辑 古云侠]