

## 研究论文

# 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响

贺立立 陈勤\* 彭申明 曹炎贵 李杨 朱敏

(安徽大学生命科学学院, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥 230039)

**摘要** 探讨炎性细胞因子在慢性支气管炎小鼠肺细胞中的表达及桔梗皂苷(kikyosaponin, KS)治疗慢性支气管炎的作用机制。将50只健康小鼠分成正常对照组、模型组和桔梗皂苷低、中、高剂量组,除正常对照组外,其余四组动物均采用烟熏加浓氨水吸入法建立慢性支气管炎模型,然后分别用药物进行治疗。实验结束后,取各组小鼠肺组织进行石蜡制片,HE染色光镜观察支气管和肺组织病理形态的变化;免疫组化分析肺细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达。Western blot检测肺组织中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达。免疫组化检测显示,与正常对照组相比,模型组小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达非常显著。在连续用药30天后,与模型组相比,各治疗组小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。蛋白印迹术检测显示,模型组小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平明显增加,与正常对照组比较,差异十分显著( $P<0.01$ )。而连续用药30天后,各治疗组小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达量明显下降,且呈较好的量效关系。结果表明,桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺组织中炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达有明显的抑制作用。推测其作用机制可能是通过抑制肺组织中炎性细胞因子和自由基的生成而达到抗炎、止咳平喘作用的。

**关键词** 桔梗皂苷;慢性支气管炎;慢性支气管炎动物模型;白介素-1 $\beta$ ;肿瘤坏死因子- $\alpha$

## The Effect of Kikyosaponin on Expression of IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ from Pneumonocyte of Chronic Bronchitis (CB) Mice

He Lili, Chen Qin\*, Peng Shenming, Cao Yangui, Li Yang, Zhu Min

(School of Life Science, Anhui University, Anhui Province Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Hefei 230039, China)

**Abstract** To research the expression of inflammatory cytokines of pneumonocyte of chronic bronchitis (CB) mice and study the mechanism of kikyosaponin on bronchitis treatment, fifty healthy mice were divided into five groups: normal control group, CB model group and treatment groups with low, middle and high doses of kikyosaponin groups. Each group of mice inhaled dense smoke and stronger ammonia water to establish a model of chronic bronchitis except the normal control group, and then respectively were treated by kikyosaponin. After the experiment, the lung tissues of mice from each group were removed for paraffin section. Pathology of bronchus and

收稿日期: 2012-08-11 接受日期: 2012-10-15

安徽省教育厅自然科学基金项目(批准号: KJ2012A031)和教育部大学生创新性实验项目(批准号: 2012044)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0551-5108552, E-mail: chenqin169@163.com

Received: August 11, 2012 Accepted: October 15, 2012

This work was supported by the Natural Science Research Programs of Department of Education of Anhui Province (Grant No.KJ2012A031) and the College Students' Innovative Experiment Project of Ministry of Education (Grant No.2012044)

\*Corresponding author. Tel: +86-551-5108552, E-mail: chenqin169@163.com

alveolar cells which stained by HE were observed under the light microscope. The expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of alveolar cells was analyzed by immunohistochemical method and Western blot. Immunohistochemical method showed that the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in chronic bronchitis model group increased significantly compared with the normal group. After treatment for 30 days, the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  decreased significantly in each treated group compared with the model group. Western blot showed that the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the model group increased significantly compared with the normal group. After treatment for 30 days, the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  decreased obviously in each treated group with dose-effect relationship. Kikyosaponin can obviously inhibit the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in mice lung tissue. We speculate that kikyosaponin plays an important role in anti-inflammation, suppressing cough and relieving asthma through inhibition of the generation of inflammatory cytokines and free radical.

**Key words** kikyosaponin; chronic bronchitis(CB); bronchitis animal model; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

慢性支气管炎(chronic bronchitis, CB), 简称慢支, 是指由于感染或非感染因素引起的气管、支气管黏膜及其周围组织的慢性非特异性炎症, 是一种常见的呼吸系统疾病。其主要临床表现为咳嗽、咯痰并伴有喘息, 其病因至今尚未明了, 通常认为与大气污染、吸烟、病原体感染、气候、环境某些过敏因子和患者免疫功能低下等有关<sup>[1-5]</sup>。临床研究表明, 慢支患者的支气管壁和气管黏膜中有多种炎性细胞浸润、充血水肿和纤维增生, 不同程度地存在急性或慢性炎症。进一步研究表明, 慢支患者支气管黏膜上皮细胞中分泌大量诸如白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等细胞因子, 后者进一步加重了炎症病理过程, 因此, 抑制或减少肺组织中炎性细胞因子的生成, 就可使慢支症状得到改善或治愈<sup>[6-7]</sup>。桔梗皂苷(kikyosaponin, KS)是桔梗科植物桔梗(*Platycodon grandiflorum*(Jacq.)A. DC.)中的主要活性成分, 前期实验中我们已经证明桔梗皂苷对慢支小鼠有较好的止咳、化痰、平喘和清除自由基的作用<sup>[8-9]</sup>, 但其机制尚未清楚。本研究拟在前期实验的基础上通过建立慢支小鼠模型, 观察桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织中细胞因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 生成的抑制作用, 并探讨慢支肺组织细胞的病理形态改变与炎性细胞因子表达的关系以及评价桔梗皂苷的抗炎作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 动物 昆明种小鼠, 体重(20 $\pm$ 2) g, 雌雄各半, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 合格证为皖医动准第01号。实验所使用的动物均符合《中华人民共和国动物保护法》(专家建议稿, 2010年)和美国国

家卫生研究院(NIH No.85-23出版, 1996年修订)之规定。

1.1.2 药品与试剂 桔梗皂苷呈白色结晶粉末, 由本实验室保存(批号20111027, 经HPLC测定, 纯度 $\geq$ 98%); 兔抗 $\beta$ -actin、兔抗IL-1 $\beta$ 多克隆抗体、鼠抗TNF- $\alpha$ 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG均为北京博奥森生物技术有限公司产品; 生物素标记的羊抗兔IgG和羊抗鼠IgG为江苏碧云天生物公司产品; 正常山羊血清、SABC免疫组化试剂盒均为武汉博士德生物工程有限公司产品; HRP-DAB底物显色试剂盒、化学发光试剂盒均为天根生化科技(北京)有限公司产品; 硝酸纤维素膜(NC)为美国Millipore公司产品; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器 BX41荧光显微镜为日本Olympus公司产品; Image-Pro Plus6.0图像分析软件为美国Media Cybernetics公司产品; 450型酶标仪购自美国BioRAD公司; 5417型台式冷冻离心机购自德国Eppendorf公司; RM2135石蜡切片机为德国Leica公司产品; DYCZ-24DN型迷你双垂直电泳槽、DYCZ-40D型半干式转移电泳槽均为北京市六一仪器厂产品。

### 1.2 方法

1.2.1 慢支小鼠模型建立方法、分组与用药 取小鼠50只, 随机分为5组, 即正常对照组(即生理盐水组)、慢支模型组、桔梗皂苷胶囊低、中、高剂量组, 每组10只, 雌雄各半。观察3 d后, 除生理盐水组外, 其余各组均进行熏烟+浓氨水法处理<sup>[8-9]</sup>, 连续造模型30 d。从第31 d起, 桔梗皂苷低、中、高剂量组分别灌胃KS 12.5, 25.0, 50.0 mg/kg, 连续用药30 d。

1.2.2 石蜡制片与HE染色 (1)制片: 各实验组小鼠末次用药2 h后, 采用10%水合氯醛腹腔注射麻醉(340 mg/kg)进行麻醉, 剖开胸腔, 剖取适量肺叶,

用0.9%生理盐水清洗肺表面血污, 然后放入新鲜的10%中性甲醛溶液中固定, 固定5~7 d, 其间更换新鲜固定液3次。取出固定的肺组织, 流水冲洗6 h。分别经70%, 80%, 90%, 95%乙醇(I、II)、100%乙醇(I、II)脱水各0.5 h, 二甲苯(I、II)透明各0.5 h、熔蜡(I、II)处理各1.5 h, 然后包埋。将包埋好的蜡块进行冠状切片, 片厚4  $\mu$ m, 42  $^{\circ}$ C温水中展片与捞片, 37  $^{\circ}$ C烘片24 h, 用于常规病理染色与免疫组化; (2)HE染色: 将切片分别经二甲苯(I、II)透明10 min, 100%(I、II), 95%, 90%, 80%, 70%乙醇脱水3 min, 蒸馏水冲洗3 min, 然后苏木精复染10 min, 自来水浸洗返蓝, 然后经70%, 80%, 90%乙醇脱水5 min, 经95%伊红醇液染色3 s, 经95%, 100%乙醇(I、II)脱水3 min, 二甲苯(I、II)透明各3 min, 中性树胶封片与镜检。

**1.2.3 免疫组织化学检测** 实验时将已脱蜡和复水后的切片序列随机分为2批(分别用于检测IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ )。 (1)清除内源性H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>酶: 滴加0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>液于切片上, 室温静置10 min。用PBS液洗5 min $\times$ 3次; (2)细胞打孔: 滴加1% Triton X-100于切片上, 室温静置10 min, PBS洗5 min $\times$ 3次; (3)热修复抗原: 将石蜡切片置于铜架上, 浸入0.01 mol/L柠檬酸缓冲液(pH6.0), 电炉上加热至沸后断电, 间隔10 min后, 反复2次, 冷却后PBS液洗5 min $\times$ 2次; (4)封闭: 于切片上滴加5%山羊血清封闭, 在37  $^{\circ}$ C湿盒中温育20 min, 然后吸去封闭液(勿洗); (5)加一抗: 于切片上加入兔抗IL-1 $\beta$ 或鼠抗TNF- $\alpha$ 一抗工作液(1:100) 50  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C湿盒中反应过夜; PBS洗5 min $\times$ 3次; (6)加二抗: 于切片上滴入羊抗兔IgG(1:100)或羊抗鼠IgG(1:100) 1滴, 于37  $^{\circ}$ C温室中温育1 h, PBS洗5 min $\times$ 3次; (7)加SABC: 于切片上滴加SABC(1:100)辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素) 1滴, 在湿盒中温育45 min, PBS洗5 min $\times$ 3次; (8)显色: 于切片上滴加DAB显色应用液50  $\mu$ L, 染色10 min, PBS洗5 min $\times$ 3次; (9)苏木精复染: 滴加苏木精染液复染10 min, 用自来水冲洗返蓝, 若颜色过深, 可用0.1%盐酸酒精分化3~5 s, 自来水冲洗返蓝; (10)脱水、透明与封片: 将切片依次按70%, 80%, 90%, 95%, 100%乙醇(I、II)脱水3 min, 二甲苯(I、II)透明3 min, 中性树胶封片后镜检。以PBS置换一抗作为阴性对照。阳性细胞表现为在胞质中出现棕黄色斑块或斑点。在400倍显微镜下, 对五组进行选片, 每组选10张, 在每张片上任意选取5个视野互不重叠的范围, 在每个视野范围内, 计算阳性细胞占

总细胞的百分率。

**1.2.4 Western blot检测** 提取各组小鼠肺组织中的蛋白样品, 用BCA试剂盒进行蛋白定量。取适量样品, 加入等体积的2 $\times$ 上样缓冲液混匀, 在100  $^{\circ}$ C水中煮5 min, 各组取15  $\mu$ g样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5%浓缩胶、12%分离胶)电泳分离, 先用100 V电泳, 待溴酚蓝至浓缩胶底后改用120 V电泳, 当溴酚蓝距离分离胶底1 cm时停止电泳。分离的蛋白在250 mA条件下转膜150 min, 将目的蛋白转移到NC膜上, 用TBST洗膜, 室温下用新鲜的5%脱脂奶粉封闭作用3 h, TBST洗膜后分别加入TBST稀释的一抗[ $\beta$ -actin(1:1 000)和IL-1 $\beta$ 或TNF- $\alpha$ (1:400)]4  $^{\circ}$ C过夜; TBST洗涤20 min $\times$ 3次, 加入TBST稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000)室温孵育2 h, TBST洗涤20 min $\times$ 3次, 化学发光反应2 min, 在暗室中感光。以 $\beta$ -actin作为内参, 统计各组蛋白与 $\beta$ -actin吸光度的比值。

**1.2.5 统计学分析** 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用SPSS17.0进行统计分析, 采用单因素方差(One-way ANOVA)分析。组间两两比较采用LSD检验,  $P<0.05$ 为具有显著差异,  $P<0.01$ 为具有极显著差异。

## 2 结果

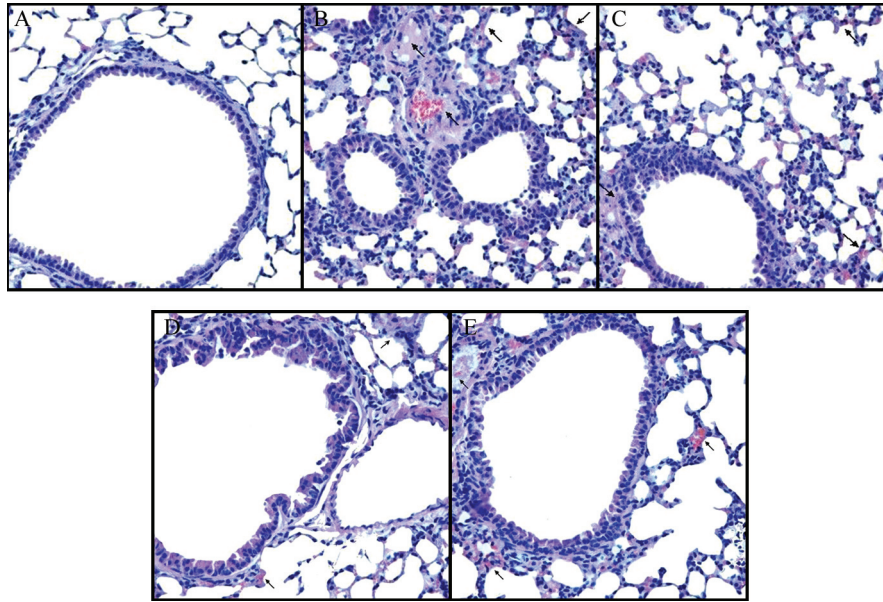
### 2.1 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺组织病理形态的影响

从图1可知, 正常对照组小鼠的肺泡形态正常, 排列有序, 肺泡间隔无增宽和水肿, 肺泡腔中未见渗出液、出血等异常改变, 气管黏膜上皮完整, 细胞排列整齐, 支气管壁平滑、无增厚, 支气管腔直径较大, 腔内无炎性浸润; 而模型组小鼠肺组织有明显渗出、水肿及出血, 肺泡壁增厚明显, 肺泡腔内和肺泡间有炎性细胞浸润, 支气管管壁增厚, 管径明显变小。管壁及管腔内炎性细胞浸润。经桔梗皂苷治疗30 d后, 三个剂量组小鼠肺组织中支气管壁明显变薄, 腔直径逐渐增大, 炎性细胞浸润明显减轻, 以中、高剂量组的作用最佳。

### 2.2 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响

由图2-图4可以看出, 模型组支气管和肺泡细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达显著升高, 与正常组比较, 可见胞质中出现大量的棕黄色斑块, 主要分布在支气管内壁、支气管腔内和肺泡中, 同时伴有支气管管壁





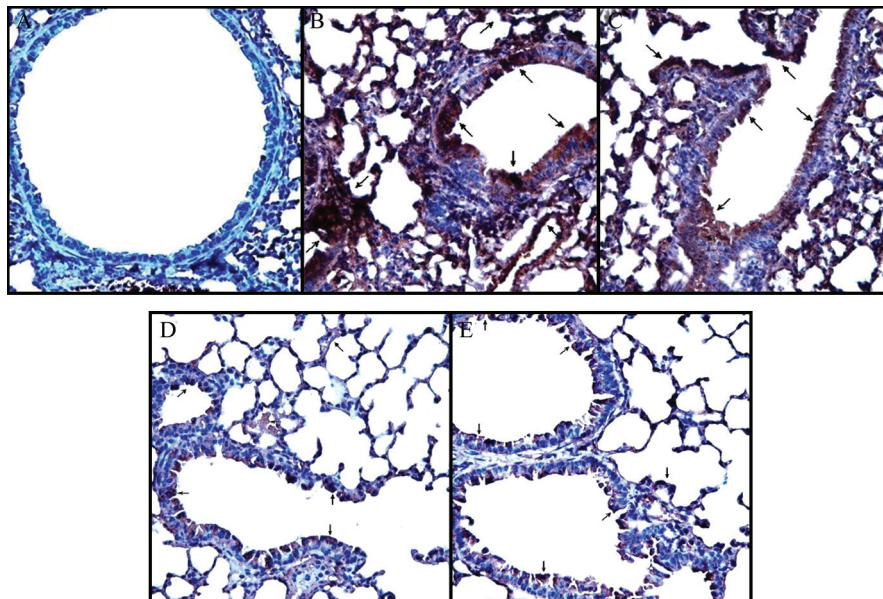
A: 正常对照组; B: 模型组; C-E: 桔梗皂苷低剂量组(12.5 mg/kg)、中剂量组(25.0 mg/kg)和高剂量组(50.0 mg/kg)。箭头表示炎性细胞浸润。  
A: normal control group; B: model group; C-E: KS 12.5 mg/kg, 25.0 mg/kg and 50.0 mg/kg groups. Arrows indicate inflammatory cell infiltration.

图1 桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织病理形态的影响(400×)

Fig.1 Effect of kikyosaponin on the pathomorphology of lung tissue cells in CB mice(400×)

明显增厚、管腔变狭窄, 肺泡细胞可见弥散性棕黄色斑块, 局部有些肺泡细胞出现破损和缺失, 说明支气管和肺泡细胞由于受到烟雾和浓氨水刺激后炎性细胞因子表达异常增多。当慢支小鼠连续用药30 d

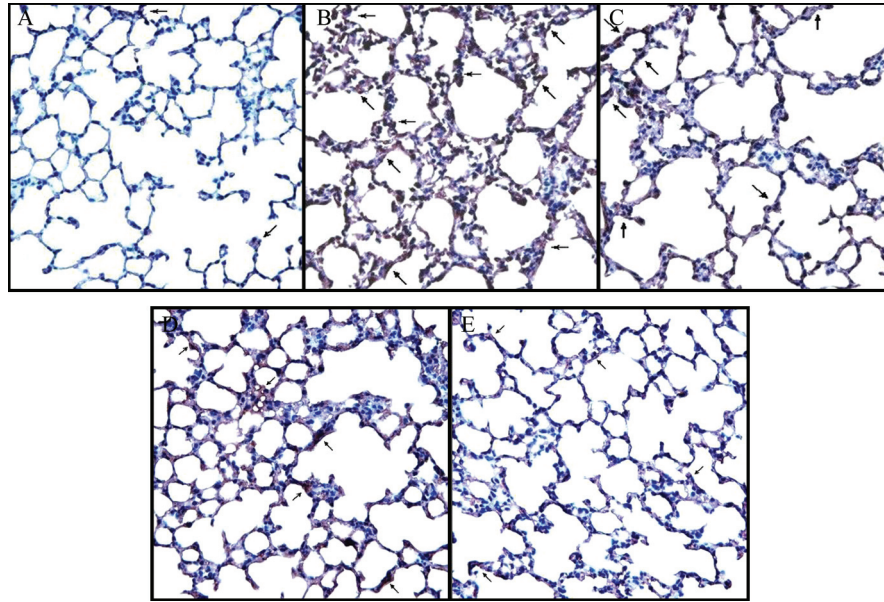
后, IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的阳性细胞百分率均明显减少, 与模型组相比差异十分显著( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 提示桔梗皂苷能显著降低慢支小鼠肺组织中炎性细胞因子的表达。



A: 正常对照组; B: 模型组; C-E: 桔梗皂苷低剂量组(12.5 mg/kg)、中剂量组(25.0 mg/kg)和高剂量组(50.0 mg/kg)。箭头表示阳性细胞。  
A: normal control group; B: model group; C-E: KS 12.5 mg/kg, 25.0 mg/kg and 50.0 mg/kg groups. Arrows indicate positive cells.

图2 桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 表达的影响(免疫组织化学法, 400×)

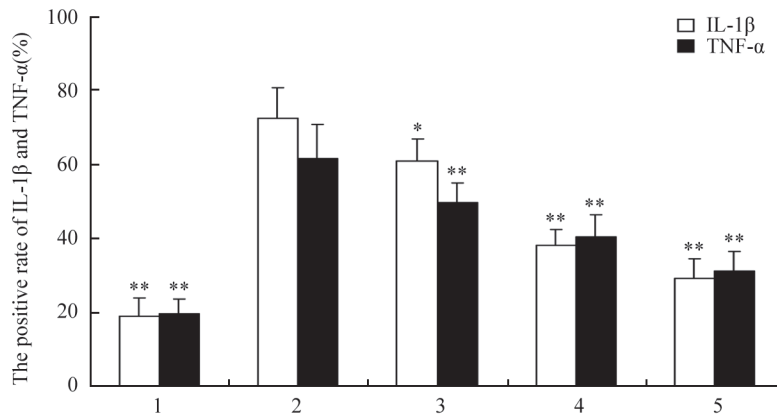
Fig.2 Effect of kikyosaponin on the expression of IL-1 $\beta$  of lung tissue cells in CB mice(immunohistochemical staining, 400×)



A: 正常对照组; B: 模型组; C-E: 桔梗皂苷低剂量组(12.5 mg/kg)、中剂量组(25.0 mg/kg)和高剂量组(50.0 mg/kg)。箭头表示阳性细胞。  
A: normal control group; B: model group; C-E: KS 12.5 mg/kg, 25.0 mg/kg and 50.0 mg/kg groups. Arrows indicate positive cells.

图3 桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织细胞中TNF- $\alpha$ 表达的影响(免疫组织化学法, 400 $\times$ )

Fig.3 Effect of kiyosaponin on the expression of TNF- $\alpha$  of lung tissue cells in CB mice(immunohistochemical staining, 400 $\times$ )



1: 正常对照组; 2: 模型组; 3-5: 桔梗皂苷低剂量组(12.5 mg/kg)、中剂量组(25.0 mg/kg)和高剂量组(50.0 mg/kg)。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01与模型组比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )。

1: normal control group; 2: model group; 3-5: KS 12.5 mg/kg, 25.0 mg/kg and 50.0 mg/kg groups. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, compared with model group( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ ).

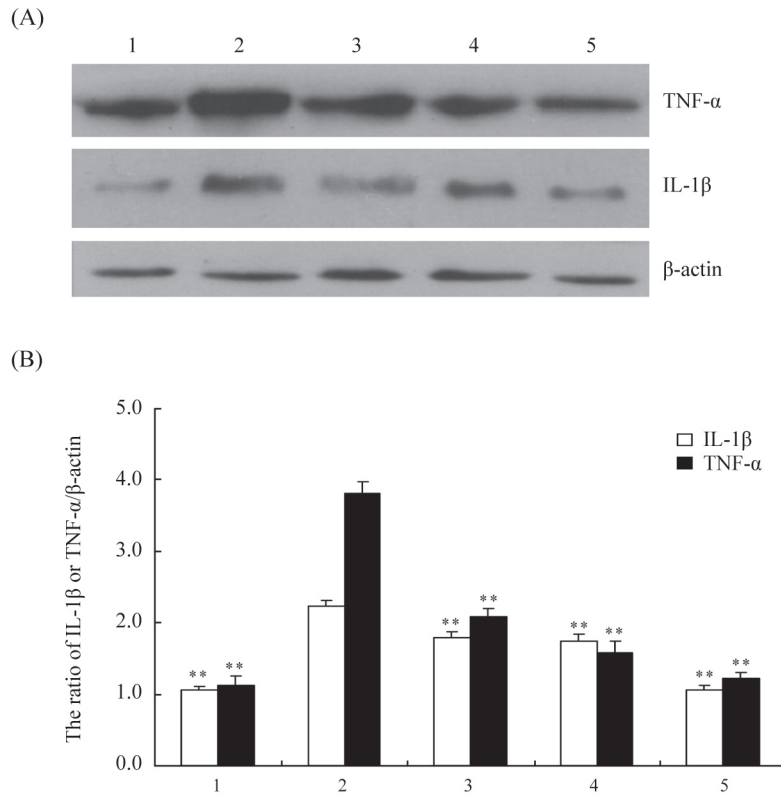
图4 桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响

Fig.4 Effect of kiyosaponin on the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of lung tissue cells in CB mice

### 2.3 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达水平的影响

正常对照组中, 小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin吸光度比值为1.052 $\pm$ 0.06, TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin吸光度比值为1.13 $\pm$ 0.12。模型组中, 小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ / $\beta$ -actin吸光度比值为2.23 $\pm$ 0.08, TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin吸光度

比值为3.81 $\pm$ 0.16; 与正常组相比, IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达量均显著升高( $P$ <0.01)。经连续给药30 d后, 三个剂量组小鼠肺细胞中的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达量显著降低, 与模型组相比差异十分明显( $P$ <0.01), 且呈明显的量效关系。提示桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织中细胞因子表达水平有明显的抑制作用(图5)。



A: Western blot检测肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的条带; B: 各实验组肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达分析。1: 正常对照组; 2: 模型组; 3-5: 桔梗皂苷低剂量组(12.5 mg/kg)、中剂量组(25.0 mg/kg)和高剂量组(50.0 mg/kg)。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01与模型组比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )。

A: the expressive banding of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of lung tissue cells in CB mice; B: the expression analysis of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of lung tissue cells in the experimental group. 1: normal control group; 2: model group; 3-5: KS 12.5 mg/kg, 25.0 mg/kg and 50.0 mg/kg groups. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, compared with model group( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ ).

图5 桔梗皂苷对慢支小鼠肺组织细胞中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达水平的影响

Fig.5 Effect of kiyosaponin on the expression level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of lung tissue cells in CB mice

### 3 讨论

大量的临床资料研究表明,吸烟是慢性支气管炎、肺气肿、慢性气道阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和肺癌的主要诱因之一<sup>[10-13]</sup>。香烟中含有4 000多种有害成分和致癌物质,长期吸烟可损伤支气管黏膜上皮细胞和纤毛结构,影响纤毛的清除功能和降低局部抵抗力,削弱肺泡吞噬细胞对病原微生物的吞噬作用。同时,会造成黏膜下腺体增生与肥大,引起黏液分泌增多,容易阻塞细支气管,并能引起支气管痉挛,增加气道阻力<sup>[14-15]</sup>。本实验采用熏烟和浓氨水吸入法建立慢支模型,发现慢支小鼠出现精神萎靡、体重下降、呼吸道分泌物增多、咳嗽和肺部干啰音明显、腹式呼吸频率加快等一系列典型的慢支症状。通过HE染色观察到,慢支小鼠肺组织有明显渗出、水肿及出血现象,肺泡壁和支气管管壁增厚,管壁及管腔内炎

性细胞浸润。经桔梗皂苷治疗30 d后,上述各种症状得到明显改善。

近年来的研究发现,慢支患者支气管炎等病理变化与其黏膜上皮细胞中分泌的大量的细胞因子和自由基有关<sup>[16-17]</sup>。炎症时,肺支气管上皮细胞和肺泡中可分泌细胞因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ ,两者在肺部炎症中起级联放大作用。IL-1 $\beta$ 是单核细胞产生的参与机体免疫反应的一种细胞因子,在慢支时可由炎性细胞大量合成,加重炎症反应。TNF- $\alpha$ 是一种主要由单核-巨噬细胞产生的前炎症细胞因子,它能刺激单核-巨噬细胞合成IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8等细胞因子及TNF本身,同时TNF- $\alpha$ 具有巨噬细胞和中性粒细胞的趋化作用,诱导中性粒细胞的局部浸润,促使白细胞黏附于血管内皮细胞,导致白细胞游出血管内壁进入气道。此外, TNF- $\alpha$ 又能激活巨噬细胞和中性粒细胞,使其细胞毒性增加,生成更多的促炎症基因以及



IL-1 $\beta$ 等细胞因子, 从而介导肺组织炎症反应等许多病理过程, 诱发或加重支气管炎<sup>[18-19]</sup>。本实验通过免疫组化技术证实, 慢支小鼠的支气管周围IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达显著增多, 同时伴有支气管管壁增厚、管腔变狭窄, 肺泡细胞可见弥散性IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 阳性斑块。Western blot实验显示, 模型组小鼠肺组织中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平明显升高, 与正常对照组比较, 差异有显著的统计学意义, 说明慢支时肺部炎症反应与细胞因子分泌异常增高有关。

桔梗皂苷是桔梗中的主要有效成分, 在前文中我们已经证实桔梗皂苷能显著降低慢支小鼠肺泡灌洗液(BALF)中白细胞总数及中性粒细胞、淋巴细胞比例和提高巨噬细胞比例, 并有明显的抗炎和抗氧化作用<sup>[8]</sup>。本实验证实, 连续给慢支小鼠用药30 d, 可以使慢支小鼠肺组织病理形态明显得到改善, 表现在支气管管径增宽、管壁纤维厚度明显减少、管腔和肺泡中的炎性浸润得到控制, 同时对肺组织中的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达有显著的抑制作用。与模型组相比, 中、高剂量组小鼠肺组织中的炎性因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 含量已趋于正常水平。由此我们认为, 桔梗皂苷可能是通过提高肺细胞中抗氧化酶的活性来减少脂质过氧化对细胞膜的攻击, 抑制肺组织中的白细胞、中性粒细胞、巨噬细胞等分泌细胞因子和炎症介质(未发表数据), 从而达到清除肺组织细胞中的炎症、改善慢支小鼠的病理形态的治疗效果。

### 参考文献 (References)

- Po JY, FitzGerald JM, Carlsten C. Respiratory disease associated with solid biomass fuel exposure in rural women and children: Systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2011; 66(3): 232-9.
- Kurmi OP, Semple S, Simkhada P, Smith WC, Ayres JG. COPD and chronic bronchitis risk of indoor air pollution from solid fuel: A systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2010; 65(3): 221-8.
- Rohde G. The effects of air pollution and climate change on pulmonary diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; 133(14): 733-6.
- Wilson R. Evidence of bacterial infection in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Semin Respir Infect* 2000; 15(3): 208-15.
- Wilson R, Grossman R. Introduction: the role of bacterial infection in chronic bronchitis. *Semin Respir Infect* 2000; 15(1): 1-6.
- John M, Heath MD. Chronic bronchitis: Primary care management. *Am Fam Physician* 1998; 57(10): 2365-72.
- Simpson JL, Phipps S, Gibson PG. Inflammatory mechanisms and treatment of obstructive airway diseases with neutrophilic bronchitis. *Pharmacol Ther* 2009; 124(1): 86-95.
- 陈 尘, 张满云, 孙荏苒, 张珍珍, 陈 勤. 桔梗皂苷胶囊对慢性支气管炎小鼠肺组织中抗氧化酶活性和自由基浓度的影响. *中国中医药科技*(Chen Chen, Zhang Manyun, Sun Renran, Zhang Zhenzhen, Chen Qin. *Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology*) 2010; 17(4): 323-4.
- 孙荏苒, 张满云, 陈 勤. 桔梗皂苷胶囊抗炎止咳平喘作用的实验研究. *中药药理与临床*(Sun Renran, Zhang Manyun, Chen Qin. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*) 2010; 26(4): 27-9.
- Pelkonen M. Smoking: Relationship to chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary disease and mortality. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(2): 105-9.
- Begum S. Molecular changes in smoking-related lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2012; 12(1): 93-106.
- Stapleton M, Howard-Thompson A, George C, Hoover RM, Self TH. Smoking and asthma. *J Am Board Fam Med* 2011; 24(3): 313-22.
- Patel RR, Ryu JH, Vassallo R. Cigarette smoking and diffuse lung disease. *Drugs* 2008; 68(11): 1511-27.
- Tamimi A, Serdarevic D, Hanania NA. The effects of cigarette smoke on airway inflammation in asthma and COPD: Therapeutic implications. *Respir Med* 2012; 106(3): 319-28.
- Nelson S, Mason CM. The inflammatory response in chronic bronchitis. *Semin Respir Crit Care Med* 2000; 21(2): 79-86.
- Postnikova LB, Alekseeva OP, Kubysheva NI, Ishanova OS. Metabolism of proinflammatory cytokine (interleukin-1 beta) and oxidant activity of neutrophils in various forms of chronic bronchitis. *Ter Arkh* 2004; 76(3): 40-3.
- Kottová M, Pourová J, Voprsalová M. Oxidative stress and its role in respiratory diseases. *Ceska Slov Farm* 2007; 56(5): 215-9.
- Desai D, Brightling C. Cytokines and cytokine-specific therapy in asthma. *Adv Clin Chem* 2012; 57: 57-97.
- Lambert GP, Spurzem JR, Romberger DJ, Wyatt TA, Lyden E, Stromquist AM, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha hyper-responsiveness to endotoxin in whole blood is associated with chronic bronchitis in farmers. *J Agromedicine* 2005; 10(1): 39-44.