

基于 ERK/p38 MAPK 信号通路探讨复方玄参利咽合剂对慢性咽炎模型兔抗炎机制研究

王利敏, 朱滢润, 唐映红(浙江中医药大学附属湖州中医院, 浙江 湖州 313000)

摘要: 目的 研究复方玄参利咽合剂减轻慢性咽炎模型兔炎症反应的作用机制。方法 利用彭氏造模法咽部喷 2.5%氨水和咽部黏膜下注射 0.5 mL 松节油复合因素建立新西兰兔的慢性咽炎模型, 随机分为模型对照组、金果饮组、复方玄参利咽合剂组, 另取正常新西兰兔为正常对照组。观察复方玄参利咽合剂对慢性咽炎兔咽喉黏膜病理改变的影响, ELISA 检测血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和前列腺素 E2(PGE2)含量的变化, Western blotting 检测兔咽部组织中 p38、P-p38、ERK1/2 及 P-ERK1/2 的表达。结果 与正常对照组比, 慢性咽炎模型对照组病理表现黏膜层不平整, 部分细胞坏死、脱落, 黏膜下层结构被破坏, 血清中 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 均极显著升高($P<0.01$), 咽部组织中 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达水平极显著上升($P<0.01$), 提示造模成功。与模型对照组相比, 复方玄参利咽合剂组显示病理状态有所好转, 血清中炎症指标 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 均显著降低($P<0.01$), 咽部组织中 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论 复方玄参利咽合剂可能通过降低 MAPK 信号通路中 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达水平减轻慢性咽炎炎症反应。

关键词: 复方玄参利咽合剂; 慢性咽炎; 彭氏造模法; 白细胞介素-1 β ; 肿瘤坏死因子- α ; 前列腺素 E2; 兔

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)02-0179-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.02.009

引用本文: 王利敏, 朱滢润, 唐映红. 基于 ERK/p38 MAPK 信号通路探讨复方玄参利咽合剂对慢性咽炎模型兔抗炎机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(2): 179-183.

Study on Anti-inflammatory Mechanism of Compound Xuanshen Liyan Mixture on Chronic Pharyngitis Model Rabbits Based on ERK/p38 MAPK Signaling Pathway

WANG Limin, ZHU Yingjian, TANG Yinghong(Huzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the mechanism of Compound Xuanshen Liyan mixture in reducing the inflammatory response of chronic pharyngitis model rabbits. **METHODS** The chronic pharyngitis model of New Zealand rabbits was established by using the combined factors of 2.5% ammonia injection in pharynx and 0.5 mL turpentine injection in submucosa of pharynx by Peng's modeling method, which were divided into model control group, Jinguoyin group, Compound Xuanshen Liyan mixture group, normal New Zealand rabbits were taken as normal control group. Observed the effect of Compound Xuanshen Liyan mixture on the pathological changes of pharyngeal mucosa in rabbits with chronic pharyngitis, and detected the changes of serum IL-1 β , TNF- α and PGE2 by ELISA, and detected the expressions of p38, P-p38, ERK1/2 and P-ERK1/2 in pharyngeal tissues by Western blotting. **RESULTS** Compared with the normal control group, in the model control group of chronic pharyngitis, the mucosa was not smooth, some cells died and fell off, and the submucosal structure was destroyed, IL-1 β , TNF- α and PGE2 in serum were significantly increased($P<0.01$), the expression levels of P-p38 and P-ERK1/2 proteins in pharyngeal tissues were significantly increased($P<0.01$), indicated a successful modeling. Compared with the model control group, in the Compound Xuanshen Liyan mixture group, the pathological state was improved, the inflammatory indicators IL-1 β , TNF- α and PGE2 in serum were all significantly decreased($P<0.01$), and the protein expression levels of P-p38 and P-ERK1/2 in pharyngeal tissues were significantly decreased($P<0.01$). **CONCLUSION** Compound Xuanshen Liyan mixture may reduce the inflammatory response of rabbits with chronic pharyngitis by reducing the expression levels of P-p38 and P-ERK1/2 proteins in the MAPK signaling pathway.

KEYWORDS: Compound Xuanshen Liyan mixture; chronic pharyngitis; Peng's modeling method; IL-1 β ; TNF- α ; PGE2; rabbit

慢性咽炎为咽部黏膜、黏膜下及淋巴组织的慢性炎症^[1]。MAPK 信息通路中重要的细胞信号传

递者细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)和 p38 是机体炎症反应的主导, 二者作为炎症反应的关键指标

基金项目: 湖州市科学技术局技术应用研究(2018GYB40)

作者简介: 王利敏, 女, 主管中药师 Tel: (0572)2770892 E-mail: 114717527@qq.com

受到广泛研究^[2-5]。目前临床上治疗慢性咽炎首选抗菌药物和激素药物,但长期应用会对患者健康产生不利影响。中医药治疗慢性咽炎有疗效确切且不良反应小的优势^[6-8]。浙江中医药大学附属湖州中医院复方玄参利咽合剂(曾用名:咽炎浓煎剂)在慢性咽炎治疗方面有良好的临床效果^[9]。且有初步试验表明其对多种致病菌均有明显的体外抗菌作用^[10]。本研究通过 ERK/p38 MAPK 信号通路对复方玄参利咽治疗慢性咽炎的作用机制进行了初步探讨,为该制剂的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

普通级健康♂新西兰兔 24 只,体质量(2.0±0.03)kg,购于新昌大市聚镇欣健兔场,动物许可证号:SYXK(浙)2018-0012。饲养条件:温度(22±2)℃,湿度 50%~60%,14 h 光照和 10 h 黑暗的环境明暗交替,换风次数每小时 15~20 次。由浙江中医药大学动物实验研究中心饲养。

1.2 药物、试剂与仪器

复方玄参利咽合剂(浙江中医药大学附属湖州中医院院内制剂,由玄参、麦冬、诃子、板蓝根、甘草组成,制剂文号:浙药制字 Z20100170);金果饮(江西南昌济生制药厂,批号:100848)。

白细胞介素-1β(IL-1β) ELISA 试剂盒(批号:MM-030502)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α) ELISA 试剂盒(批号:MM-024002)、前列腺素 E2(PGE2) ELISA 试剂盒(批号:MM-026702)均来自江苏酶免实业有限公司;PVDF 膜(GE Healthcare Life,批号:10600023);GAPDH 抗体(华安生物,批号:60004-1-1g);p44/42 MAPK(ERK1/2)抗体(批号:bsm-33232M)、Anti-phospho-ERK1/2(Thr197+Thr202)抗体(批号:bs-3292R)、Anti-p38 抗体(批号:bs-0637R)、Phospho-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)抗体(批号:bs-5476R)均来自北京博奥森生物技术有限公司。

N18105C 微量加样器(Physiocare concept);DM3000 正置荧光显微镜(Leica);LRH-150 生化培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);CMaxPlus 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);VE186 转膜仪(上海天能科技有限公司)。

1.3 兔慢性咽炎模型建立和给药

1.3.1 模型建立 按文献方法^[11]建立慢性咽炎动物模型,第 1~15 天,每日用 2.5%氨水喷其咽部 2 次,每次用喷雾器喷 3 揿。第 8 日,用扁桃体注

射针将 0.5 mL 松节油注射于家兔咽部黏膜下。随机从造模兔中选取 1 只做组织切片,若咽部黏膜出现大量炎症细胞浸润现象表明造模成功。

1.3.2 给药 24 只新西兰兔随机分为正常对照组、模型对照组、金果饮组和复方玄参利咽合剂组,每组 6 只。除正常对照组外,其余 3 组在造模成功第 1 天 HE 染色观察病理改变。金果饮组给予口服金果饮 1 mL·kg⁻¹,复方玄参利咽合剂组给予口服复方玄参利咽合剂 1.25 mL·kg⁻¹,模型对照组和正常对照组给予口服生理盐水 1 mL·kg⁻¹,每天 1 次,连续 10 d。

1.4 检测

1.4.1 HE 染色观察复方玄参利咽合剂对慢性咽炎兔咽喉黏膜病理改变的影响 取慢性咽炎兔咽喉黏膜组织样本置入 4%多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,按程序脱水,包埋,切厚为 4 μm 的组织切片,放入 60℃烘箱内烤片,直至水烤干蜡烤化后,取出常温保存。HE 染色:①二甲苯脱蜡,各级乙醇蒸馏水洗;②苏木素染色 5 min,水洗;③盐酸乙醇分化 30 s,水洗;④伊红液染色 2 min,水洗;⑤常规脱水,透明,封片。

1.4.2 ELISA 检测咽喉黏膜组织中 IL-1β、TNF-α 和 PGE2 的含量 取咽部黏膜组织制成匀浆,严格按照 ELISA 试剂盒说明书方法操作,在 450 nm 波长测定各孔的吸光度(OD)值。

1.4.3 Western blotting 检测咽部组织中 p38 与 ERK1/2 及 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达 咽部组织蛋白制备后,采用 BCA 法测定样品的总蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳和转膜,转膜结束后,取出 PVDF 膜并作好标记,用 TBST 洗膜 10 min×3 次。将 PVDF 膜放入孵育盒中,加入含 5%脱脂奶粉的封闭液,摇床振荡 1.5~2 h;封闭结束后,用 TBST 洗膜 10 min×3 次;将膜放入含一抗稀释液(1:500)的孵育盒中,4℃摇床振荡孵育过夜;室温振荡 30 min,吸弃一抗,用 TBST 洗 10 min×3 次;用 5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗(1:3 000),室温摇床振荡反应 1~2 h;然后用 TBST 洗膜 5~10 min×3 次。在暗室中用 X 胶片感光、显影、定影。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较,方差齐性者采用两独立样本 *t* 检验,方差不齐者采用 Kruskal-Wallis, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色观察复方玄参利咽合剂对慢性咽炎兔咽喉黏膜病理改变的影响

正常对照组兔咽部组织各层分界清晰,黏膜层光滑,无细胞坏死及黏膜脱落现象,无炎性细胞浸润现象,黏膜下层为疏松结缔组织。模型对照组相较于正常对照组,黏膜层不平整,部分细胞坏死、脱落,黏膜下层结构被破坏。给药组在给予药物治疗后,有所好转,病理改变程度由低到高依次为正常对照组、复方玄参利咽合剂组、金果饮组、模型对照组。结果见图 1。

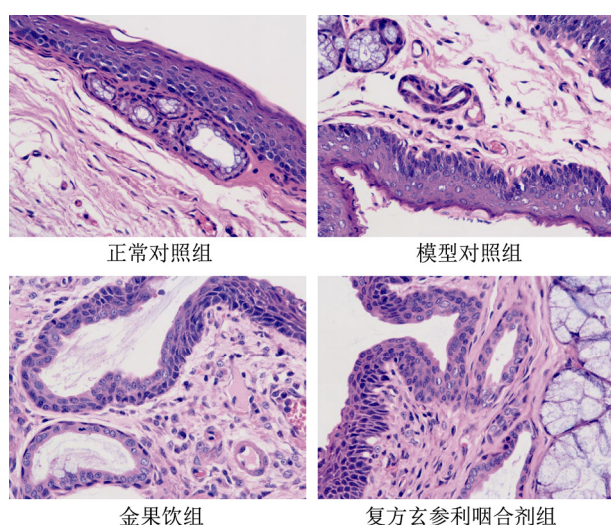


图 1 慢性咽炎兔咽喉黏膜病理改变(HE, 400×)

Fig. 1 Pathological changes of throat mucosa in rabbits with chronic pharyngitis(HE, 400×)

2.2 ELISA 检测黏膜组织 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 含量

与正常对照组相比,模型对照组兔咽喉黏膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 均极显著升高($P<0.01$)。与模型对照组相比,给药组咽喉黏膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 均有降低趋势,其中仅金果饮组咽喉黏膜组织中的 TNF- α 无显著性变化,其余均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

2.3 Western blotting 检测咽部组织中 p38、P-p38、ERK1/2 及 P-ERK1/2 的表达情况

与正常对照组相比,模型对照组兔咽部组织中 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达水平极显著上升($P<0.01$), p38 与 ERK1/2 蛋白表达水平无显著性变化。与模型对照组相比,金果饮组与复方玄参利咽合剂组兔咽部组织中 P-p38 和 P-ERK1/2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), p38 与 ERK1/2 蛋白表达水平无显著性变化。结果见图 2。

表 1 黏膜组织 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 含量变化($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Changes of the contents of IL-1 β , TNF- α and PGE2 in mucosal tissues($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	IL-1 β	TNF- α	PGE2
正常对照组	25.64 $\pm$ 2.67	28.30 $\pm$ 3.38	260.78 $\pm$ 30.68
模型对照组	127.42 $\pm$ 14.49 ¹⁾	93.90 $\pm$ 13.67 ¹⁾	600.50 $\pm$ 76.40 ¹⁾
金果饮组	93.04 $\pm$ 9.10 ²⁾	74.03 $\pm$ 9.98	434.98 $\pm$ 45.39 ²⁾
复方玄参利咽合剂组	66.38 $\pm$ 7.27 ³⁾	53.46 $\pm$ 5.75 ³⁾	367.62 $\pm$ 44.13 ³⁾

注:与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3 讨论

慢性咽炎主要表现为咽干、咽痒、咽灼热感、咽痛及咽喉部异物感等,且症状顽固,易反复发作^[12]。中医认为慢性咽炎的病因以肺肾阴虚导致的虚火上升、咽喉失养为主,多因肺脾肾虚损,喉窍失养而致^[13-14]。而湖州当地百姓的体质本以阴虚为主,与湖州地处杭嘉湖平原,地理位置特殊,环境、气候潮湿及饮食习惯等息息相关。因此,笔者所在医院以“湖州西阳喉科”的经典方,取玄参、麦冬、诃子、板蓝根、甘草等中药材,遵循“药有个性之特长,方有合群之妙用”的配伍原则制成复方玄参利咽合剂可有效调理阴虚体质。

调控炎症基因表达的 MAPK 信号通路中有三大类亚族在 MAPK 级联反应中发挥重要作用:细胞外信号调节蛋白激酶(ERK), c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和 p38^[15-17]。活化的 MAPK 能够使细胞核、细胞质中的转录因子发生磷酸化而激活,从而调控目标基因的表达,产生不同的生理反应,炎症反应就是其中一种由 MAPK 通路调控的^[18]。有研究表明 ERK 受上游特异性刺激分子 MEK 双磷酸化激活,活化的 P-ERK 形成二聚体,从细胞质移位到细胞核,通过调控一系列转录因子,引起炎症反应^[19],而 p38 MAPK 主要调节炎症与细胞凋亡等应激反应。ERK 和 p38 是 MAPK 中占重要地位的信号通路,与炎症反应的活化有密切的联系。通过 p38 MAPK 的活化,许多参与炎症反应的细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)、炎症介质的基因表达被上调,并且这种调控能够在转录过程中和转录后发生。在活化的巨噬细胞中,上调 iNOS 的表达和 NO 的合成及最终浓度,都受到 p38 MAPK 的控制^[20]。Guan 等^[21]报道,一种能选择性抑制系膜细胞内 p38 通路的药物 SC68376,能抑制肾小球系膜细胞内 IL-1 β 对 p38 的激活,从而增加 NO 的合成并抑制 PGE2 的释放。

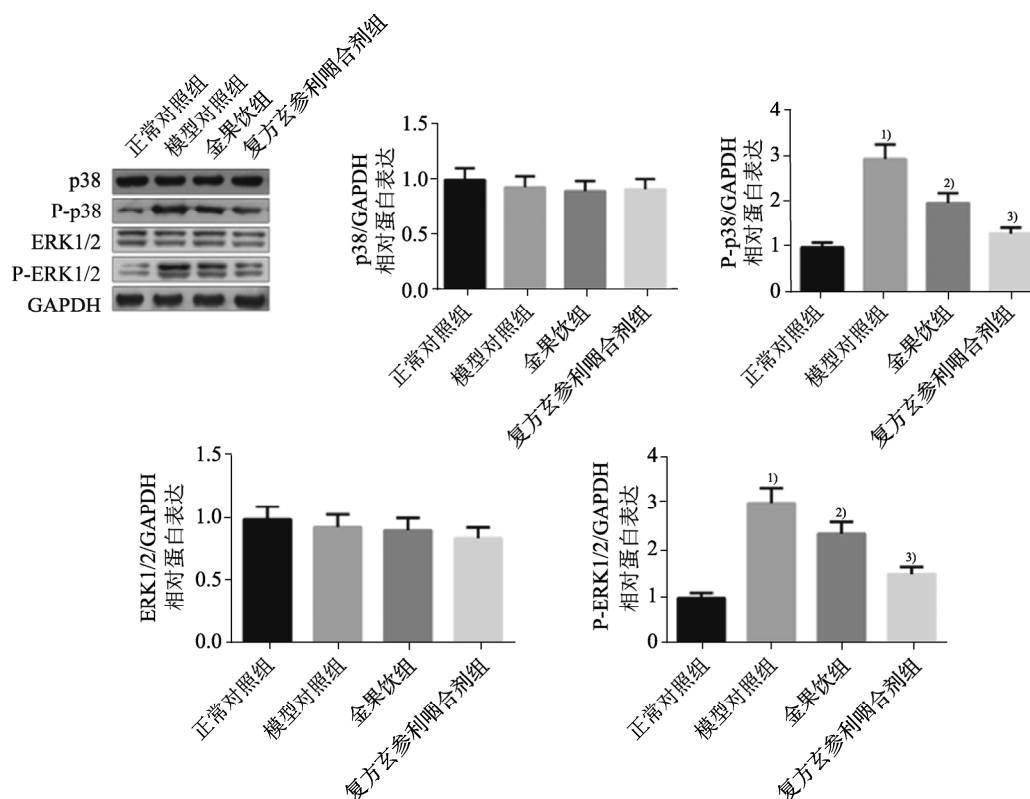


图2 咽部组织中 p38、P-p38、ERK1/2 及 P-ERK1/2 的表达($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型对照组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Expression of p38, P-p38, ERK1/2 and P-ERK1/2 in pharyngeal tissues($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

彭氏造模法造模后兔咽部出现黏膜层不平整, 部分细胞坏死、脱落, 黏膜下层结构被破坏, 表明造模成功。本研究显示, 复方玄参利咽合剂可明显改善慢性咽炎兔咽喉黏膜病理形态。咽炎发病时, 作为炎症反应主要介质的 IL-1 β 、TNF- α 增多^[22-23], PGE2 含量增加^[24], 炎症因子可通过诱导巨噬细胞活化, 进而促进组织细胞的凋亡, 激活 p38 MAPK 信号通路发挥作用。而在多种生长因子、炎症因子和应激反应作用下 p38 MAPK 可被激活为其活化形式即 P-p38 MAPK^[25-26]。本研究结果显示复方玄参利咽合剂能降低兔咽喉黏膜组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 含量, 咽部组织中 P-p38 与 P-ERK1/2 蛋白表达水平降低。表明复方玄参利咽合剂抗炎作用与降低 IL-1 β 、TNF- α 和 PGE2 等炎症因子相关, 其作用可能与 MAPK 信号通路中对 ERK/p38 蛋白表达水平的调节作用有关。

REFERENCES

- [1] 孔维佳, 周梁. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 391-392.
- [2] CHAI D Y, YUAN J Q, ZHOU Y P. Research progress of MAPK signaling pathway for multidrug resistance in

tumors[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2019, 28(8): 948-953.

- [3] CHENG L Y, TU L L, SHI H. Effects of p38MAPK on rats with chronic nonbacterial prostatitis neuralgia and the intervention effect of quercetin[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(8): 984-988.
- [4] 占敏霞, 杜伟, 李恒华, 等. 双氢青蒿素与火把花配伍对迟发型超敏反应模型小鼠 p-p38 MAPK 及 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5561-5566.
- [5] YANG J M, RUI B B, CHEN C, et al. Acetylsalicylic acid enhances the anti-inflammatory effect of fluoxetine through inhibition of NF- κ B, p38-MAPK and ERK1/2 activation in lipopolysaccharide-induced BV-2 microglia cells[J]. Neuroscience, 2014(275): 296-304.
- [6] 周兴玮, 孙永东, 胡文健, 等. 散结利咽颗粒联合撤针治疗痰凝血瘀型慢性咽炎疗效观察[J]. 山西中医, 2020, 36(2): 20-21.
- [7] WANG H M, YU W F, ZHOU H, et al. Analysis the clinical effect of syndrome differentiation of traditional Chinese medicine treatment in the chronic pharyngitis[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med(陕西中医), 2017, 38(4): 487-489.
- [8] DAI D, LI Y J, ZHANG J. Clinical observation of shuyanqing spray in treatment of acute and chronic pharyngitis after radiotherapy and chemotherapy[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2018, 36(4): 908-911.
- [9] KE W X, XU H P, LI J. Yanyan decoction treat chronic pharyngitis with Yin deficiency of lung and kidney[J]. J

- Zhejiang Univ Tradit Chin Med(浙江中医药大学学报), 2014, 38(2): 163-165.
- [10] WANG J Z, YANG H X, WU Y M, et al. Study of external antiseptics on decoction for pharyngitis[J]. J Pract Tradit Chin Med(实用中医药杂志), 2004, 20(3): 115-116.
- [11] PENG S L, ZHONG Q, XIONG D J, et al. Study on animal models of chronic pharyngitis[J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med(成都中医药大学学报), 1999, 22(1): 51-52.
- [12] LEONE C A, ARMONE CARUSO A, ALLOCCA V, et al. Pilot study on the effects of high molecular weight sodium hyaluronate in the treatment of chronic pharyngitis[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2015, 28(4): 532-538.
- [13] XU L Z, ZHU W. Analysis of TCM constitution characteristics in patients with chronic pharyngitis[J]. J Henan Univ Chin Med(中医学报), 2016, 31(2): 285-288.
- [14] 张颖, 贾育新. 慢性咽炎的中医证治规律研究[J]. 甘肃中医学院学报, 2015, 32(1): 52-55.
- [15] WANG B, LI L H. Changes of p38 MAPK and P-p38 MAPK levels in peripheral blood mononuclear cells during inflammation reaction of acute and chronic pancreatitis[J]. Chin J Clin Res(中国临床研究), 2016, 29(1): 5-8, 12.
- [16] PETER A T, DHANASEKARAN N. Apoptosis of granulosa cells: A review on the role of MAPK-signalling modules[J]. Reprod Domest Anim, 2003, 38(3): 209-213.
- [17] SI T L, LIU Q, REN Y F, et al. Enhanced anti-inflammatory effects of DHA and quercetin in lipopolysaccharide-induced RAW_{264.7} macrophages by inhibiting NF- κ B and MAPK activation[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 499-508.
- [18] ZHAO Y, YANG J H, HAN J P, et al. Research progress of MEK/ERK pathway in bronchial asthma pathogenesis[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2017, 35(2): 329-331.
- [19] RAVANTI L, TORISEVA M, PENTTINEN R, et al. Expression of human collagenase-3(MMP-13) by fetal skin fibroblasts is induced by transforming growth factor beta via p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Faseb J, 2001, 15(6): 1098-1100.
- [20] KOSTENKO S, DUMITRIU G, LÆGREID K J, et al. Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase[J]. World J Biol Chem, 2011, 2(5): 73-89.
- [21] KONO M, TATSUMI K, IMAI A M, et al. Inhibition of human coronavirus 229E infection in human epithelial lung cells (L132) by chloroquine: Involvement of p38 MAPK and ERK[J]. Antivir Res, 2008, 77(2): 150-152.
- [22] LIU S W. Protective mechanism of eplerenone on rats with diabetic nephropathy[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 812-815.
- [23] WANG L, LIU Y J, YAO L, et al. Effect of Shandougen on the NF- κ B signaling pathway in the chronic pharyngitis caused by dust[J]. Chin J Basic Med Tradit Chin Med(中国中医基础医学杂志), 2018, 24(4): 471-473.
- [24] STOTZ M, LIEGL-ATZWANGER B, POSCH F, et al. Blood-based biomarkers are associated with disease recurrence and survival in gastrointestinal stroma tumor patients after surgical resection[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0159448. Doi:10.1371/journal.pone.0159448.
- [25] LAKE D, CORRÊA S A L, MÜLLER J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(23): 4397-4413.
- [26] LIN L, JIN Y, HU K. Tissue-type plasminogen activator(tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase(RSK) and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway[J]. J Biol Chem, 2015, 290(12): 7910-7916.

收稿日期: 2020-02-28

(本文责编: 沈倩)