

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.13.004

文章编号: 1005-8982 (2020) 13-0019-04

槲皮素对支气管哮喘小鼠气道炎症的作用及机制研究

朱翔, 肖云斌, 易晓莲

(杭州师范大学附属医院 儿科, 浙江 杭州 310015)

摘要: **目的** 研究槲皮素是否对支气管哮喘小鼠模型气道炎症具有抑制作用及可能的分子机制。**方法** 通过腹腔注射卵蛋白 (OVA) 致敏并行雾化激发复制小鼠支气管哮喘模型。将 36 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为 6 组, 分别为对照组 (CON 组)、哮喘模型组 (OVA 组)、槲皮素低剂量组 (LOW 组)、槲皮素中剂量组 (MID 组)、槲皮素高剂量组 (HIGH 组) 剂量组、地塞米松阳性对照组 (POS 组)。对小鼠哮喘症状的程度进行评分; 通过 ELISA 法检测小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的上清液中白细胞介素-4 (IL-4) 和 IL-5 的水平; qRT-PCR 检测肺组织 miR-155 的水平。**结果** 与 CON 组比较, OVA 组小鼠的哮喘症状评分较高, IL-4、IL-5 和 miR-155 表达水平上调 (均 $P < 0.05$)。与 OVA 组小鼠比较, 随着槲皮素药物浓度的升高, 槲皮素不同浓度组小鼠的哮喘症状评分下降, IL-4、IL-5 和 miR-155 表达水平降低 (均 $P < 0.05$)。**结论** 槲皮素能改善支气管哮喘小鼠气道炎症, 其机制可能与下调 IL-4、IL-5 和 miR-155 表达有关。

关键词: 支气管哮喘; 槲皮素; 气道炎症; 炎症介质

中图分类号: R562.25

文献标识码: A

Inhibitory effect of quercetin on airway inflammation in mice with bronchial asthma

Xiang Zhu, Yun-bin Xiao, Xiao-lian Yi

(Department of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University,
Hangzhou, Zhejiang 310015, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether quercetin can inhibit airway inflammation in asthmatic mice and its specific molecular mechanism. **Methods** A mouse model of bronchial asthma was established by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA). Thirty-six female BALB/c mice were randomly divided into 6 groups: control group (CON group), asthma model group (OVA group), low dose quercetin (LOW group), middle dose quercetin (MID group), high dose quercetin (HIGH group) and dexamethasone positive control group (POS group). The asthmatic symptoms were scored in mice, the levels of inflammatory mediators IL-4 and IL-5 in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the levels of microRNA-155 in lung tissues were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with CON group, OVA group had higher asthma symptom score and higher expression of IL-4, IL-5 and microRNA-155 (all $P < 0.05$). Compared with OVA group, the asthma symptom score decreased, and IL-4, IL-5 and microRNA-155 decreased with the increase of quercetin concentration (all $P < 0.05$). **Conclusion** Quercetin inhibits the inflammatory mediators IL-4 and IL-5, ameliorate airway inflammation in mice with bronchial asthma, which may be related to the down-regulation of microRNA155.

Keywords: asthma; quercetin; airway inflammation; inflammatory mediators

收稿日期: 2020-01-15

哮喘是一种慢性炎症性肺病,其特征是气道对过敏原的过度反应,气道水肿和黏液分泌增加。目前中国约有两千万哮喘患者,其病死率位居世界前列^[1]。支气管哮喘是一种免疫介导的疾病,其特征为气道高反应性和嗜酸性粒细胞性气道炎症,具体表现为慢性气道炎症、气道黏液高分泌和气道重塑^[2]。其中T辅助2型细胞(T helper cell 2, Th2)在气道中大量存在,其分泌的Th2因子如白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-5(IL-5)在哮喘的病理生理学中起关键作用^[3]。

槲皮素是一种植物衍生的黄酮类化合物(化学命名为3,3',4',5,7-五羟基黄酮),以其抗氧化和抗炎特性而广为人知。大多数植物来源的次级代谢产物能够直接影响炎症介质关键的促炎分子表达^[4]。黄酮类化合物是植物界常见的次生代谢产物。槲皮素存在于多种食物中,比如茶、洋葱、苹果和红葡萄酒,具有抗氧化、抗炎、抗癌等多方面药理作用,以及止咳、平喘和抗过敏等临床作用^[5-6]。有文献报道,槲皮素对于哮喘有一定的疗效,而且槲皮素能够通过下调microRNA-155(miR-155)发挥抗炎作用^[7]。本研究通过腹腔注射卵蛋白(Ovalbumin, OVA)致敏复制小鼠哮喘模型,研究槲皮素对IL-4和IL-5表达水平的影响,并探讨其保护作用机制是否与下调miR-155有关,以明确槲皮素治疗哮喘的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组与哮喘小鼠模型的复制

36只10周龄的BALB/c雌性小鼠随机分成6组,即对照组(CON组)、哮喘模型组(OVA组)、槲皮素低剂量组(LOW组)、槲皮素中剂量组(MID组)、槲皮素高剂量组(HIGH组)和地塞米松阳性对照组(POS组),每组6只。除CON组外,分别在第1、7和14天分3次对其他组小鼠进行致敏,每次每只小鼠腹腔注射200 μ l OVA混合液(含100 μ g卵清蛋白和4mg氢氧化铝),CON组腹腔注射等量的生理盐水。除CON组外,在第21天对其他5组小鼠进行持续4d的3%OVA混合液雾化激发,CON组则用等量生理盐水雾化吸入。LOW组、MID组和HIGH组小鼠在第18天时分别用50、100和200 mg/kg槲皮素(美国Sigma公司)溶液灌胃,POS组用10 mg/kg地塞米松(重庆市西南药业股份有限公司)溶液灌胃,CON组和OVA组则用生理盐水灌胃,连续1周,1次/d。

1.2 哮喘程度评分

通过观察小鼠行为对哮喘的严重程度进行评估。

表现正常为0分;震颤或点头为1分;呛咳为2分;腹肌痉挛为3分;跌倒为4分^[8]。

1.3 支气管肺泡灌洗液标本采集

第28天将小鼠处死,打开胸腔并结扎右肺门,分2次每次用4ml生理盐水灌洗左支气管,反复抽吸灌洗液,总回抽支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)约7ml。收集灌洗液后于冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司)中以5000 r/min离心6min,吸取上清液置入-80℃冰箱保存。

1.4 ELISA法检测IL-4和IL-5的含量

取BALF标本,按照ELISA试剂盒(武汉博士德生物科技公司)说明书步骤操作,样品用酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)检测其吸光度并计算样品浓度。

1.5 qRT-PCR检测miR-155基因表达水平

按照TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit(美国Thermo Fisher Scientific公司)的使用说明,在避光条件下分别配制miR和U6的反应体系。称取适量肺组织,加入适量Trizol(美国Thermo Fisher Scientific公司),冰上匀浆,提取总RNA。逆转录体系为5 μ l RNA模板、1 μ l miR逆转录探针、1 μ l U6逆转录探针和8 μ l DEPC水,混匀离心后于PCR仪反应,反应条件:96℃变性20min,42℃退火30min,85℃延伸5min,经逆转录制成cDNA。使用实时PCR仪(美国Applied Biosystems公司)进行qRT-PCR反应,反应条件为95℃预变性10min,95℃变性10s,60℃延伸45s,重复40个循环。以U6作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组小鼠肺组织miR-155的表达水平。

1.6 统计学方法

数据分析采用SPSS 21.0统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用One-way ANOVA结合SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对小鼠的支气管哮喘的影响

各组哮喘症状评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与CON组比较,OVA组小鼠的哮喘评分上升,小鼠出现呛咳、腹肌抽搐和运动功能失调,这表明OVA诱导支气管哮喘小鼠模型复制成功。而用槲皮素对哮喘小鼠给药后,随着槲皮素浓度的增加,小鼠

哮喘评分降低, 哮喘症状减轻。见表 1。

2.2 槲皮素对炎症因子的影响

各组 IL-4 和 IL-5 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。OVA 组小鼠 BALF 的上清液中 IL-4 和 IL-5 水平高于 CON 组, 而在槲皮素不同浓度组, IL-4 和 IL-5 水平均低于 OVA 组 ($P < 0.05$), 且槲皮素浓度越高, IL-4 和 IL-5 水平越低。见表 2。

2.3 槲皮素对 miR-155 相对表达量的影响

各组 miR-155 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 CON 组比较, OVA 组中 miR-155 上调 ($P < 0.05$)。而在槲皮素不同浓度组, miR-155 的相对表达量均低于 OVA 组 ($P < 0.05$), 且槲皮素浓度越高, miR-155 的相对表达量越低。见表 3。

表 1 各组小鼠哮喘症状评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	哮喘症状评分
CON 组	6	0.00 ± 0.00
OVA 组	6	3.38 ± 1.06 ^①
LOW+MID+HIGH 组	18	1.75 ± 0.99 ^②
LOW 组	6	2.25 ± 0.46 ^②
MID 组	6	1.88 ± 1.13 ^{②③}
HIGH 组	6	1.13 ± 0.99 ^{②③④}
POS 组	6	0.88 ± 0.64 ^②
F 值		16.700
P 值		0.000

注: ①与 CON 组比较, $P < 0.05$; ②与 OVA 组比较, $P < 0.05$; ③与 LOW 组比较, $P < 0.05$; ④与 MID 组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠 BALF 的上清液炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-4	IL-5
CON 组	6	21.97 ± 4.34	25.77 ± 4.65
OVA 组	6	172.28 ± 21.65 ^①	213.70 ± 14.54 ^①
LOW+MID+HIGH 组	18	79.47 ± 26.06 ^②	87.74 ± 29.86 ^②
LOW 组	6	117.89 ± 12.15 ^②	130.19 ± 18.57 ^②
MID 组	6	77.07 ± 3.52 ^{②③}	81.73 ± 8.40 ^{②③}
HIGH 组	6	43.36 ± 6.27 ^{②③④}	50.53 ± 9.21 ^{②③④}
POS 组	6	27.53 ± 2.42 ^②	38.57 ± 11.16 ^②
F 值		88.242	109.336
P 值		0.000	0.000

注: ①与 CON 组比较, $P < 0.05$; ②与 OVA 组比较, $P < 0.05$; ③与 LOW 组比较, $P < 0.05$; ④与 MID 组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组小鼠肺组织 miR-155 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR-155
CON 组	6	100.00 ± 13.61
OVA 组	6	357.37 ± 11.26 ^①
LOW+MID+HIGH 组	18	213.51 ± 56.15 ^②
LOW 组	6	289.13 ± 21.31 ^②
MID 组	6	206.55 ± 32.09 ^{②③}
HIGH 组	6	143.41 ± 16.46 ^{②③④}
POS 组	6	122.87 ± 15.31 ^②
F 值		75.141
P 值		0.000

注: ①与 CON 组比较, $P < 0.05$; ②与 OVA 组比较, $P < 0.05$; ③与 LOW 组比较, $P < 0.05$; ④与 MID 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

过敏性哮喘是一种复杂的炎症性疾病, 其特征是气道高反应性, 嗜酸性粒细胞炎症和杯状细胞黏液分泌过多, 伴有肺内细胞产生的 IL-4 和 IL-5 等炎症介质, 从而导致气道炎症反应的发生^[9]。IL-4 与其他炎症因子整合信号传导, 通过刺激嗜酸性粒细胞特异性黏附途径并调节肺嗜酸性粒细胞增多。IL-5 不仅可以活化嗜酸性粒细胞, 并参与嗜酸性粒细胞前体终末分化和增殖。此外, 嗜酸性粒细胞从骨髓迁移到血液这一过程也依赖于 IL-5^[4]。miR-155 是一种重要的 miRNAs, 其可调节自身免疫和炎症反应。有研究显示, miR-155 在过敏性哮喘中上调, 表明其在过敏性哮喘中发挥重要作用。miR-155 缺失抑制 Th2 启动能力, 从而缓解小鼠过敏性气道炎症^[10]。

黄酮类化合物槲皮素具有抗炎和抗过敏的特性。在豚鼠哮喘模型中, 槲皮素可预防过敏原与血小板活化因子所诱导的支气管阻塞和支气管高反应性^[11]。前期研究表明, 槲皮素对哮喘小鼠具有一定的保护作用, 但其在哮喘发病机制方面的研究甚少。

本研究通过复制 OVA 诱发的小鼠哮喘模型, 一方面证明槲皮素对气道炎症有抑制作用, 对哮喘反应具有缓解作用; 另一方面明确槲皮素保护支气管哮喘小鼠的作用与下调 IL-4、IL-5 和 miR-155 有关。这些发现为槲皮素在哮喘小鼠模型中的作用提供了新的见解, 并且拓宽目前对槲皮素免疫药理学功能的认识和理解, 为槲皮素防治支气管哮喘提供参考证据。

参 考 文 献:

- [1] BERGMANN K C. Asthma[J]. Chemical Immunology & Allergy, 2013, 100: 69-80.
- [2] JAIN V. Role of polyamines in asthma pathophysiology[J]. Medical Sciences, 2018, 6(1): 4.
- [3] OHSHIMA M, YOKOYAMA A, OHNISHI H, et al. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-5 augments eosinophilic airway inflammation in mice[J]. Clinical & Experimental Allergy, 2010, 37(5):735-742.
- [4] ROGERIO A P, KANASHIRO A, FONTANARI C, et al. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma[J]. Inflammation Research, 2007, 56(10): 402-408.
- [5] DARBAND S G, KAVIANI M, YOUSEFI B, et al. Quercetin: A functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(9): 6544-6560.
- [6] LOKE W M, PROUDFOOT J M, STEWART S, et al. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity[J]. Biochemical Pharmacology, 2008, 75(5): 1045-1053.
- [7] BOESCH-SAADATMANDI C, LOBODA A, WAGNER A E, et al. Effect of quercetin and its metabolites isorhamnetin and quercetin-3-glucuronide on inflammatory gene expression: role of miR-155[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2011, 22(3): 293-299.
- [8] 杨柳. 黄芩苷对大鼠过敏性哮喘的防治作用与机制研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [9] LIU C, ZHANG X, XIANG Y, et al. Role of epithelial chemokines in the pathogenesis of airway inflammation in asthma[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 6935-6941.
- [10] ZECH A, AYATA C K, PANKRATZ F, et al. MicroRNA-155 modulates P2R signaling and Th2 priming of dendritic cells during allergic airway inflammation in mice[J]. Allergy, 2015, 70(9): 1121-1129.
- [11] DORSCH W, BITTINGER M, KAAS A, et al. Antiasthmatic effects of galphimia glauca, gallic acid, and related compounds prevent allergen-and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs[J]. International Archives of Allergy and Immunology, 1992, 97(1): 1-7.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 朱翔, 肖云斌, 易晓莲. 槲皮素对支气管哮喘小鼠气道炎症的作用及机制研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(13): 19-22.