

栀子苷对乳腺炎动物模型 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响

黄永周, 李 漪, 丛竹军

(石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832000)

【摘要】 目的 探讨栀子苷对乳腺炎小鼠乳腺组织及乳腺上皮细胞中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响。**方法** 将 40 只分娩后雌性小鼠随机分为空白对照组、模型组、L 组、M 组和 H 组。建模后 12 h, L 组给予低剂量栀子苷治疗, M 组给予中剂量栀子苷治疗, H 组给予高剂量栀子苷治疗, 空白对照组和模型组给予等量磷酸缓冲盐溶液。建模后 24 h 观察干预效果。**结果** 模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。**结论** 栀子苷可抑制脂多糖诱导的乳腺炎症损伤, 有降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平的作用。

【关键词】 乳腺炎; 栀子苷; 脂多糖; 小鼠; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0095-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.016

Effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in an animal model of mastitis

HUANG Yongzhou, LI Yi, CONG Zhujun

(First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in mammary glands and mammary epithelial cells of mastitic mice. **Methods** Forty female mice after childbirth were randomly divided into blank control, model, L, M, and H groups. At 12 h after modeling, the L group was treated with low-dose geniposide, the M group was administered intermediate-dose geniposide, the H group was treated with high-dose geniposide, and blank control and model groups were administered an equal amount of phosphate-buffered saline. At 24 h after modeling, the treatment effects were observed. **Results** mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in model, L, M, and H groups were significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.05$). Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNAs in the L, M, and H groups were significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNAs in M and H groups were significantly lower than that in the L group ($P < 0.05$). mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the M group were significantly lower than that in M and L groups ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in L, M, and H groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in M and H groups were significantly lower than those in

the L group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the H group were significantly lower than those in M and L groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Geniposide inhibits lipopolysaccharide-induced mammary gland inflammation and reduces the levels of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , and IL-6.

【Keywords】 mastitis; geniposide; lipopolysaccharide; mice; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

乳腺炎是急性、化脓性感染导致乳腺管及周围结缔组织发生炎症的疾病,以乳腺组织炎性细胞浸润、内皮功能受损、大量促炎细胞因子分泌为主要特点,是哺乳动物泌乳期常见疾病,临床症状以局部疼痛和肿块为主,病情加重才出现发热等全身症状,严重者可出现败血症,威胁患者生命安全^[1]。急性乳腺炎临床多由金黄色葡萄球菌和链球菌等致病菌导致,临床采用抗生素治疗,近年来,随着抗生素的广泛应用,细菌耐药现象时有发生,降低了临床治疗^[2]。栀子是一种常见的中药,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效,具有明确的抗炎和抗内毒素作用,但对乳腺炎是否有治疗效果尚需要进一步研究探讨^[3]。本研究建立脂多糖诱导的小鼠乳腺炎模型,观察栀子苷对模型乳腺组织及乳腺上皮细胞中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响,进一步探讨栀子苷在乳腺炎治疗中的临床价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级的 ICR 雌性小鼠 40 只和雄性小鼠 20 只,8~10 周龄,体重 22~25 g,均购自石河子大学医学院实验动物中心[SCXK(新)2017-118],饲养于石河子大学医学院实验动物中心[SYXK(新)2017-142],按照 2:1 比例将雌性小鼠和雄性小鼠随机合笼饲养,恒温、恒湿条件下饲喂,全价日粮,自由采食和饮水,饲养至母鼠分娩,分娩后 5~7 d 开始实验,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。新疆石河子大学医学院实验伦理委员会批号:2017-0032。

1.2 主要试剂与仪器

栀子苷(纯度 > 99%)购自上海融禾医药科技发展有限公司;脂多糖购自北京寰宇科创生物科技发展有限公司;IL-6、TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自北京奥维亚生物技术有限公司;TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;DHEA 购于 Fluka 公司;RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒购于 Fermentas 公司;聚合酶链反应试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 引物序

列由大连宝公司合成。紫外分光光度计购自济南海能仪器股份有限公司;DM3000 生物显微镜购自德国徕卡公司;荧光定量 PCR 系统购自上海生物科技仪器厂;电泳仪 DYY-6C 购自南京莱步仪器厂;SpectraMax iD5-多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物造模

小鼠分娩后 5~7 d,将 40 只 ICR 雌性小鼠随机分为空白对照组、模型组、脂多糖低剂量组(L 组)、脂多糖中剂量组(M 组)和脂多糖高剂量组(H 组),每组 8 只。模型组、L 组、M 组、H 组四组参照文献^[4]的方法,取第四对乳头消毒后乳导管灌注 50 μ g 浓度为 0.2 mg/mL 的脂多糖,空白对照组注射等量的磷酸缓冲盐溶液。L 组、M 组、H 组分别注射 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 的栀子苷,模型组和空白对照组注射等量的磷酸缓冲盐溶液,建模后 24 h 处死小鼠。

1.3.2 标本采集

采用颈椎脱臼处死小鼠,常规消毒小鼠皮肤,解剖剪剪开腹部皮肤,剥离开皮肤,充分暴露第四对乳腺组织,剥离乳腺组织并储存于 -80℃ 条件。

1.3.3 HE 染色

每组取一份乳腺组织采用 4% 甲醛溶液固定 48 h,流水冲洗固定好的组织采用梯度酒精脱水,放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中直至组织呈透明状态,随后以石蜡包埋组织进行切片、烘干、脱蜡,最后行苏木精-伊红染色和封片,显微镜下观察组织形态。

1.3.4 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平检测

收集 100 mg 乳腺组织,TRIzol 提取 RNA,并采用反转录试剂盒反转录成 cDNA,利用 Primer Premier 5.0 设计 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 β -actin 内参基因的引物序列:TNF- α :上游:5'-GTCTCAGCCTCTTCTCATTC-3',下游:5'-CATAGAACTGATGAGAGGGA-3',产物长度:128 bp;IL-1 β :上游:5'-AAATACCTGTGGCCTTGGGC-3',下游:5'-CTTGGGATCCACACTCTCCAG-3',产物长度:101 bp;IL-6:

上游 5'-GAGTCCTTCAGAGAGATACAG-3',下游: 5'-CTGTGACTCCAGCTTATCTG-3',产物长度:125 bp; β -actin: 上游: 5'-CTTCATTGACCTCAACTAC ATGG-3',下游: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGT GAT-3',产物长度:134 bp。

1.3.5 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白水平检测

收集 100 mg 乳腺组织,按 1:9 比例加入磷酸缓冲盐溶液,碎冰上匀浆,3000 r/min 离心 15 min,移液枪去除上层乳白色脂肪组织,收集上清液,采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,严格按照说明操作。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学数据分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

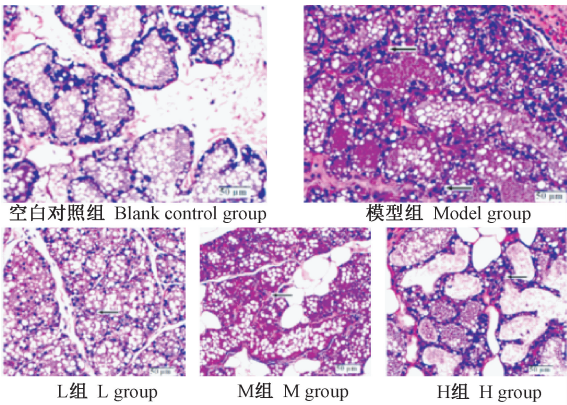
2 结果

2.1 小鼠乳腺组织 HE 染色结果

空白对照组乳腺组织腺泡上皮排列整齐,模型组乳腺腺泡结构崩塌,乳腺上皮脱落或坏死,乳腺小叶间隔变宽度;L 组、M 组、H 组给药后炎性细胞浸润明显减少,间质水肿缓解。见图 1。

2.2 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平检测结果比较

模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$);L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$);M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$);H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。见表 1。



注:图中箭头处为乳腺炎症浸润病变。标尺 = 50 μm 。
图 1 小鼠乳腺组织 HE 染色结果 ($\times 200$)
Note. Arrowheads indicate the infiltrative lesion of mastitis. Bars = 50 μm .
Figure 1 Histological changes in the mouse mammary gland tissues. HE staining

表 1 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 7$) Table 1 Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA in the mouse breast tissues			
组别 Groups	TNF- α	IL-6	IL-1 β
空白对照组 Blank control group	1.05 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.11
模型组 Model group	3.47 $\pm$ 0.34 *	11.89 $\pm$ 0.92 *	14.05 $\pm$ 2.97 *
L 组 L group	2.24 $\pm$ 0.18 *#	8.27 $\pm$ 0.49 *#	7.42 $\pm$ 0.72 *#
M 组 M group	1.82 $\pm$ 0.14 *# Δ	5.74 $\pm$ 0.74 *# Δ	4.08 $\pm$ 0.80 *# Δ
H 组 H group	1.51 $\pm$ 0.10 *# Δ &	2.38 $\pm$ 0.25 *# Δ &	2.14 $\pm$ 0.37 *# Δ &
F 值 F-value	54.054	82.470	93.758
P 值 P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与 L 组相比, Δ $P < 0.05$;与 M 组相比, & $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the L group, Δ $P < 0.05$. Compared with the M group, & $P < 0.05$.

2.3 乳腺组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 蛋白水平

模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); L 组、M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

研究乳腺炎需要规范化和标准化的动物模型,有报道显示奶牛、奶山羊、兔、小鼠、大鼠等动物均可用于制作乳腺炎病理模型^[5-6]。小鼠价格低廉,成本低,重复性好,国内外乳腺炎模型多采用小鼠建立乳腺炎模型^[7]。金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌常用作乳腺炎模型的诱导细菌,但菌体结构复杂,缺乏一致性和重复性^[8]。脂多糖是大肠埃希菌细胞壁外膜主要成分,可通过细胞信号转导系统激活单核巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等合成和释放多种细胞因子和炎性介质,诱导乳腺炎,具有良好的一致性和重复性^[4]。本研究采用小鼠作为乳腺炎病理模型研究实验动物,用脂多糖诱导乳腺炎动物模型,解颖颖等^[4]研究显示,10、20、40、50 μg 脂多糖注射后 24 h 均可诱导不同程度乳腺炎病理模型,本研究参考其结果,取 50 μg 脂多糖注射后 24 h 进行观察。

细胞因子在免疫和炎症反应中发挥重要作用,脂多糖可诱导乳腺局部炎症组织浸润,导致 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子释放增加,炎症因子释放增加一方面可趋化免疫细胞清除病原体,但炎症反应进展可引起乳腺微循环障碍,导致乳腺组织坏死、化脓,控制乳腺炎患者炎症反应对治疗具有重要作用^[9]。此外,研究表明,脂多糖作用下 TNF-α、IL-6、IL-1β 等细胞因子含量增加,导致单核吞噬细胞、中性粒细胞集聚,诱导并促进前列腺素、溶酶体酶和过氧化氢类物质等的释放,引起或加重炎症^[10],所以 TNF-α、IL-6、IL-1β 不仅可作为诊断炎症反应的重要实验室指标,也可作为反映治疗效果与炎性状态的重要参考指标。本研究结果显示,与空白对照组比较,脂多糖诱导的小鼠乳腺炎模型乳腺组织中 IL-6、TNF-α、IL-1β mRNA 水平和蛋白水平显著增加。

因为抗生素的毒副作用和耐药性,治疗乳腺炎临床应用受到一定限制,传统中药具有多靶点作用,在炎症治疗中发挥积极作用。中医无急性乳腺炎之病名,多根据临床症状将其归于“乳痈”范畴,病机主要为乳汁淤积,乳络阻塞成块,郁久化热酿脓而成痈肿,早期红肿热痛表现明显,热毒与炎症在病理、病机、治则方面具有密切联系,治疗以清热解毒、散结消肿为主^[11]。栀子临床常用清热解毒中药,栀子苷是栀子的有效成分,体外培养脂多糖诱导损伤的大鼠巨噬细胞,应用栀子苷治疗可降低

表 2 乳腺组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)
Table 2 TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in the mouse breast tissues

组别 Groups	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
空白对照组 Blank control group	105.42 ± 15.86	31.25 ± 5.28	452.37 ± 44.18
模型组 Model group	692.70 ± 52.16 *	94.37 ± 8.25 *	1485.72 ± 123.74 *
L 组 L group	454.23 ± 37.69 *#	65.14 ± 7.83 *#	1042.89 ± 105.47 *#
M 组 M group	324.05 ± 26.94 *#Δ	53.42 ± 6.13 *#Δ	832.54 ± 97.85 *#Δ
H 组 H group	187.73 ± 24.52 *#Δ&	41.59 ± 5.43 *#Δ&	630.32 ± 84.62 *#Δ&
F 值 F-value	63.589	73.518	97.923
P 值 P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$;与 L 组相比,Δ $P < 0.05$;与 M 组相比,& $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the L group, Δ $P < 0.05$. Compared with the M group, & $P < 0.05$.

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子释放^[12]。Yang 等^[13]采用脂多糖诱导制造肺炎小鼠模型,采用栀子苷进行治疗,结果显示,栀子苷治疗可显著降低 IL-4、IL-5、IL-13 和细胞黏附分子表达。Shi 等^[14]研究则显示,栀子苷的抗炎机制可能与其抑制 NF- κ B、TLR4、MMP9 表达和减少前炎症细胞因子有关。本研究结果显示,L 组、M 组和 H 组小鼠炎性细胞浸润明显减少,间质水肿缓解,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平显著低于模型组,且随着剂量增加,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平逐渐降低,呈负相关关系,结果提示,栀子苷可抑制脂多糖诱导的乳腺炎症损伤,有降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平的作用。

本研究的不足之处在于:①初步阐明了栀子苷可抑制乳腺炎动物模型乳腺组织炎症因子表达,栀子苷通过何种机制发挥抑制炎症因子表达的作用尚需要进一步研究探讨;②本研究设计前,经查询相关文献,未查找到良好的在临床或实验室具有同样或类似药理作用机制的阳性药物,本研究实验中未设置阳性对照组,在下一步阐明栀子苷抑制炎症因子作用机制的研究中,将设置阳性对照组进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] 曹博,朱晓萍,江琴,等. 哺乳期化脓性乳腺炎患者感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(1): 4975 - 4977.
- [2] 李玉凤. 乳痈消联合芒硝外敷对急性乳腺炎患者血清 Wbc、ESR 及 hs-CRP 水平的影响 [J]. 北方药学, 2017, 14(11): 109, 108.
- [3] 刘益华,李晶,林曼婷,等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(6): 406 - 409.
- [4] 解颖颖,胡学权,崔京春,等. 脂多糖诱导哺乳期 SD 大鼠乳腺炎模型的建立 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(2): 46

- 50.

- [5] 武瑞仙,楼丽华,赵虹,等. 实验性乳腺炎动物模型研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(2): 126 - 128.
- [6] Gao X, Guo MY, Zhang ZC, et al. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis [J]. Inflammation, 2014, 38(3): 1 - 9.
- [7] 郭健,严秋芳,沈利华. SrtA 基因在金黄色葡萄球菌诱发的小鼠乳腺炎致病过程中的作用研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(10): 950 - 954.
- [8] 张大松,张源淑,邹思湘,等. 两种病原菌联合诱导大鼠实验性乳腺炎研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(7): 11 - 14.
- [9] 王波,张彤. 骨髓间充质干细胞和抗生素对乳腺炎模型大鼠血清中急性期蛋白水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3049 - 3051.
- [10] 秦小惠,古再丽·努尔·艾麦提,邵伟,等. 乳腺炎模型大鼠注射骨髓间充质干细胞和抗生素后血清中促炎因子浓度变化的规律探索 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 643 - 648.
- [11] 米海霞,朱雪琼,林希,等. 消肿解毒软膏联合乳腺治疗仪外治早期哺乳期急性乳腺炎疗效观察 [J]. 山东中医药大学学报, 2017, 41(1): 48 - 50.
- [12] Fu Y, Liu B, Liu J, et al. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4): 792 - 798.
- [13] Yang X, Cai Q, He J, et al. Geniposide an iridoid glucoside derived from *Gardenia jasminoides*, protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Planta Med, 2012, 78(6): 557 - 564.
- [14] Shi Q, Cao J, Fang L, et al. Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(2): 298 - 306.

[收稿日期] 2018 - 03 - 12