

利金方对大鼠单核细胞炎症反应的作用及其机制研究

陈斯宁¹, 黎展华^{1*}, 李瑞祥¹, 黄文锋², 王浩舟¹

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011;

2. 清远市中医院, 广东 清远 511500)

摘要:目的 探讨利金方对香烟提取物诱导的单核细胞炎症反应的影响及作用机制。方法 实验分为①空白对照组; ②香烟烟雾提取物组; ③利金方低剂量组; ④利金方中剂量组; ⑤利金方高剂量组; ⑥NF- κ B 抑制剂组。ELISA 检测 IL-8、IL-21, qRT-PCR 检测 NF- κ B 的 mRNA 表达, WB 检测 NF- κ B P65 的蛋白表达。结果 香烟烟雾提取物使 IL-8 和 IL-21 的分泌量增多, NF- κ B mRNA 表达量增加, NF- κ B P65 的蛋白表达升高。利金方低、中、高剂量及 NF- κ B 抑制剂均能使 IL-8 和 IL-21 的分泌量减少, NF- κ B 的 mRNA 表达量减少, NF- κ B P65 的蛋白表达降低。结论 利金方通过抑制 NF- κ B P65 从而降低 IL-8、IL-21 的表达进而减轻单核细胞的炎症反应。

关键词:慢性阻塞性肺疾病; 利金方; NF- κ B P65; IL-8; IL-21

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2021.07.05

中图分类号: R259 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2021)07-1556-03

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续呼吸症状和气流受限为特征的慢性气道炎症性疾病,因患病率、病死率高,社会经济负担重,现已成为全球重要的健康问题^[1]。香烟烟雾暴露是 COPD 最主要的发病原因之一, COPD 的核心发病机制是慢性炎症反应。控制炎症反应是治疗 COPD 的关键,寻找有效的药物控制 COPD 慢性炎症对于 COPD 的治疗非常重要。目前研究发现,核转录因子 kappa B (nuclear factor of kappa B, NF- κ B) 的激活与肺部炎症反应密切相关, NF- κ B 可以诱导 IL-6、IL-8 等多种炎症因子参与炎症反应^[2]。

利金方据《医学正传》(明朝)中六君子汤加减而成,是本课题组治疗 COPD 肺气虚证患者的有效经验方。前期基础研究中,我们发现利金方通过下调 LTB₄、IL-8、TNF- α 的表达从而抑制 COPD 大鼠模型的气道及肺部的炎症反应^[3,4]。

我们的前期研究表明利金方能抑制 COPD 的炎症反应,但是具体的作用机制尚未清楚,因此在本研究中我们以大鼠脾脏单个核细胞为研究对象,使用香烟烟雾提取物(Cigarette smoke extract, CSE)刺激诱导炎症反应,探讨利金方调控炎症反应的作用并进一步探讨其作用机制,为利金方在治疗 COPD 慢性炎症方面提供实验基础及理论依据。

1 材料、仪器与方法

1.1 动物 健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重(180~200)g,长沙市天勤生物技术有限公司提供[SCXK(湘)2014-0010]。

1.2 药物和试剂 利金方免煎颗粒(江阴免煎颗粒,从广西中医药大学附属瑞康医院订购)的组成:人参 2.5g,黄芪 4.5g,麦冬 3g,五味子 1g,白术 3g,防风 1g,紫菀 4g,川贝 3g,蛤蚧 1g,茯苓 1g,陈皮 1g,甘草 2g。真龙牌香烟:广西中烟工业有限责任公司,烟气的烟碱量 1.2mg,焦油含量 11mg。NF- κ B 抑制剂: MCE 公司,货号: HY-13982。RPMI1640 培养基: 美国 Gibco 公司,货号: 12100046。胎牛血清: 美国 Gibco 公司,货号: 10270-106。大鼠外周血淋巴细胞分离液: 北京 Solarbio 公司,货号: P8630。RIPA

裂解液: 上海碧云天公司,货号: P0013B。BCA 法蛋白定量试剂盒: 杭州联科生物公司,货号: LK-PQ0012。大鼠 IL-8 ELISA 试剂盒: 上海江莱生物科技有限公司,货号: JL20898。大鼠 IL-21 ELISA 试剂盒: 上海江莱生物科技有限公司,货号: JL15562。GAPDH 抗体: 美国 proteintech 公司,货号: HRP-60004。NF- κ B p65 抗体: 美国 CST 公司,货号: 8242T。Anti-rabbit IgG, HRP-linked 抗体: 美国 CST 公司,货号: 7074S。

1.3 实验仪器 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司,货号: Thermo 3121b)。7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,货号: 7500); 基因扩增仪(德国 Biometra Tone 公司); Thermo 酶标仪(美国 Thermo 公司)。

1.4 大鼠单个核细胞原代培养 解剖大鼠,取出脾脏,脾脏剪碎过筛,适当血清稀释液稀释,加入淋巴细胞分离液,离心,取中层单个核细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基接种于培养瓶中,于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5 CSE 的制作及 CSE 实验浓度确定 参考李梅华等^[5]的方法的基础上改动,将 2 支去过滤嘴香烟连接于一个抽吸装置点燃。吸入的烟雾经过入口通入 10ml 无血清 RPMI1640 培养液中,制成悬液,滴定至 pH 在 7.4 左右。通过测量悬液 OD 值,一般 OD (320nm) = 0.783 ± 0.04。悬液经 0.22 μ m 微孔过滤器过滤除菌作为 CSE 原液(100%) 并根据实验需要稀释成相应的浓度。

本研究中使用的 CSE 浓度为 CSE 原液浓度的 0.02%。

1.6 实验用利金方的制备 利金方免煎颗粒溶解配制成溶液用于本研究。本研究中利金方母液浓度为 1g/ml,利金方高剂量组使用的利金方浓度为 1mg/ml,利金方中剂量组使用的利金方浓度为 0.5mg/ml,利金方低剂量组使用的利金方浓度为 0.25mg/ml。

1.7 细胞分组培养及药物干预 将大鼠单核细胞接种于 6 孔板或者 96 孔板中分为以下 5 组: ①空白对照组: 单核细胞单纯培养; ②香烟烟雾提取物组: 单核细胞使用浓度为 0.02% 的 CSE 溶液干预 24h; ③利金方低剂量组: 单核细胞先用 0.25mg/ml 的利金方干预 24h,再用 0.02% 的 CSE 干预 24h; ④利金方中剂量组: 单核细胞先用 0.5mg/ml 的利金方干预 24h,再用 0.02% 的 CSE 干预 24h; ⑤利金方高剂量组: 单核细胞先用 1mg/ml 的利金方干预 24h,再用 0.02% 的 CSE 干预 24h; ⑥NF- κ B 抑制剂组: 单核细胞先用 NF- κ B 抑制剂干预 1h,再用 0.02% 的 CSE 干预 24h。

1.8 ELISA 检测 IL-8 和 IL-21 收集各组细胞溶液进行离心

收稿日期: 2021-02-08; 修订日期: 2021-07-20

基金项目: 国家自然科学基金(81760853)

作者简介: 陈斯宁(1963-),女(汉族),广西玉林人,广西中医药大学附属瑞康医院主任医师,学士学位,主要从事慢性阻塞性肺疾病研究工作。

* 通讯作者简介: 黎展华(1987-),男(汉族),广西玉林人,广西中医药大学附属瑞康医院主治医师,硕士学位,主要从事呼吸系统疾病研究工作。

后留取各组细胞培养上清液 根据试剂盒说明书使用 IL-8 Elisa 试剂盒及 IL-21 Elisa 试剂盒检测各组细胞培养上清液中的 IL-8 和 IL-21 并使用酶标仪检测 OD 值 进行统计学分析。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测 NF-κB P65 的 mRNA 表达 NF-κB 引物序列为 5'-AACGCGTCCAACCTGAAGAT-3' (上游引物) 5'-TGTCTGTGAACATCCGTGGG-3' (下游引物)。内参 GAPDH 引物序列为 5'-TGTGAACGGATTGGCCGTA-3' (上游引物) 5'-GATGGTGATGGGTTTCCCCT-3' (下游引物)。收集各组细胞 按照相关试剂说明书裂解细胞、提取 RNA、逆转录 cDNA。实时荧光定量 PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 2min, 95℃ 变性 5s, 60℃ 退火 30s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对表达量。

1.10 Western blots 检测 NF-κB P65 的蛋白表达 收集各组细胞 加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂 按照使用说明提取蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度 煮沸使蛋白变性 按照凝胶试剂说明书及检测指标的分子量大小 配置相应浓度的蛋白胶 上样、电泳、转膜、封闭 按照抗体说明书推荐的稀释比 稀释相应抗体: GAPDH、NF-κB P65, 一抗室温摇床孵育 2h, HRP 标记的二抗室温摇床孵育 1h, ECL 化学发光显影 用 Image J 软件对目的条带进行灰度值计算。

1.11 统计学分析 采用 SPSS22.0 和统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 组间比较采用单因素方差分析 方差不齐则采用秩和检验 检验水平以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 各实验组对 IL-8、IL-21 分泌的影响 ELisa 结果显示: 香烟烟雾提取物刺激单核细胞后使 IL-8、IL-21 的分泌明显增多 与空白对照组相比 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。利金方低、中、高剂量组及 NF-κB 抑制剂组均能明显减少 IL-8、IL-21 的分泌 与香烟烟雾提取物组相比 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。并且利金方低、中、高剂量三组中 利金方高剂量组的 IL-8、IL-21 分泌量最少 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 呈现浓度依赖性。见图 1。

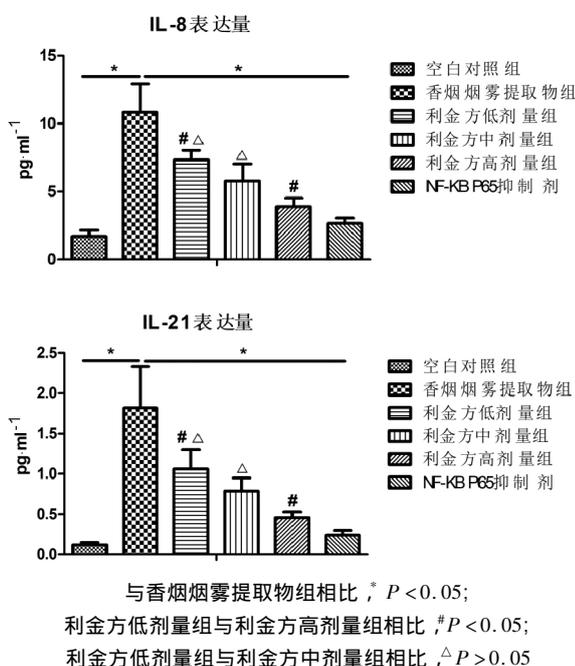


图 1 ELisa 法检测 IL-8、IL-21 的表

2.2 各实验组对 NF-κB 的 mRNA 表达的影响 实时荧光定量 PCR 结果显示: 香烟烟雾提取物刺激单核细胞后 NF-κB 的 mRNA

表达量均明显上调 与空白对照组相比 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。利金方低、中、高剂量组及 NF-κB 抑制剂组均能明显降低 NF-κB 的 mRNA 表达量; 与香烟烟雾提取物组相比 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。另外利金方低、中、高剂量三组中 利金方低剂量组的 NF-κB 的 mRNA 表达量是最高的 利金方高剂量组的 NF-κB 的 mRNA 表达量是最低的 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 呈浓度依赖性。见图 2。

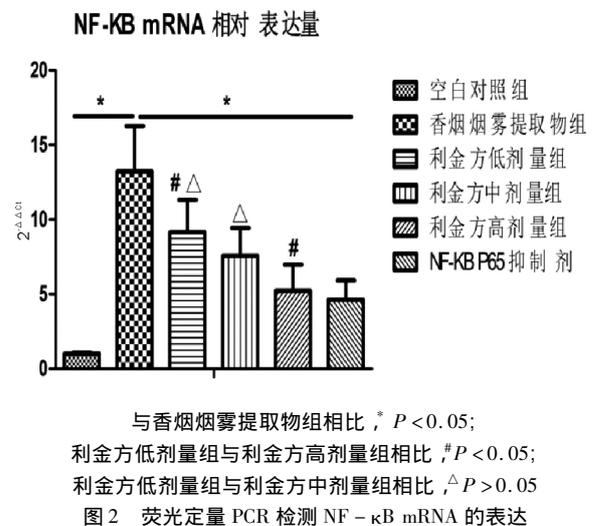


图 2 荧光定量 PCR 检测 NF-κB mRNA 的表

2.3 各实验组对 NF-κB P65 的蛋白表达的影响 Western blots 结果显示: 香烟烟雾提取物刺激单核细胞后 NF-κB P65 蛋白的表达量明显上调 与空白对照组相比 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。利金方低、中、高剂量组及 NF-κB 抑制剂组均能明显降低 NF-κB P65 蛋白的表达量 与香烟烟雾提取物组相比 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

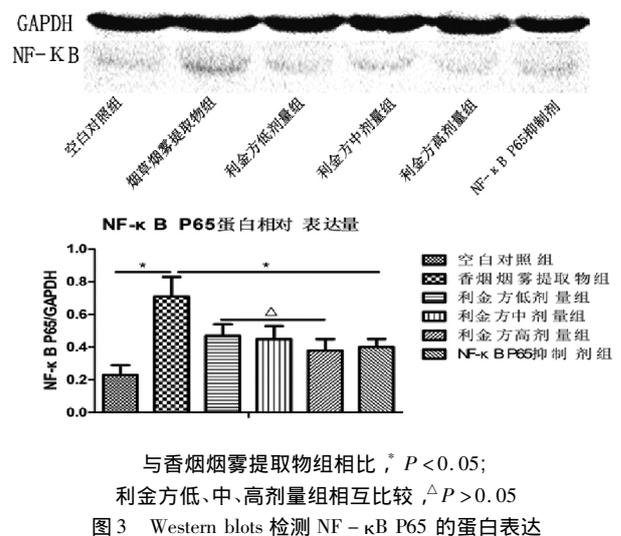


图 3 Western blots 检测 NF-κB P65 的蛋白表

3 讨论

COPD 是一种由香烟烟雾、粉尘、有害颗粒长期刺激所致的慢性炎症性气道疾病 常累积全身多个脏器 也是一种全身性疾病 [1]。控制慢性炎症能有效防治 COPD。目前西药治疗 COPD 可缓解临床症状 但因副作用较多而致部分患者产生了对西药治疗的排斥 进而影响疗效 而中医药恰好能补充西药不足之处。根据其咳嗽、咳痰、喘息等特点 COPD 归属于中医“咳嗽”“肺胀”等病范畴。中医认为肺为五脏之华盖 感受外邪 上先受之 肺失

宣降 而土为金之母 子盗母气 肺病及脾 脾失健运 则津液输布失常 聚而为痰。肺为气之主 肾为气之根。肺主气 肾主水 金水相生 肺失宣降 久则伤肾 肾气亏虚 则摄纳无力 津液输布失常 痰壅则阻碍气机 气机不畅 则咳嗽反复 迁延不愈 最终引起肺、脾、肾俱虚。即“肺不伤不咳 脾不伤不久咳 肾不伤不咳喘” 其中肺气虚乃病变的根本因素 因此早期对其干预具有重要意义。利金方为广西名中医陈斯宁教授根据 COPD 中医的病机特点 以明·虞抟《医学正传》中六君子汤为基础方 通过长期临床实践总结出的治疗 COPD 肺气虚证的有效经验方。六君子汤本身具有益气健脾 燥湿化痰的功效 在此基础上半夏取其过于温燥易伤阴气特点 加黄芪与人参相须为用 加强补脾益肺之功 五味子、紫菀敛肺止咳 与黄芪配伍 益增补气固表之效 麦冬养阴生津 川贝润肺 与紫菀、麦冬合用具养阴润肺之功 蛤蚧纳气定喘 为肺肾两虚之要药 防风祛风解表 与黄芪、白术益卫固表之药合用 兼具扶正祛邪。全方既能祛邪外出 又能化痰止咳平喘 更兼补肺健脾固肾。

在本研究中 我们通过体外使用 CSE 刺激诱导大鼠脾脏单个核细胞产生炎症反应观察了利金方对炎症因子的影响。实验证明了利金方能使 CSE 诱导炎症反应所产生的 IL-8、IL-21 炎症因子明显减少 并且利金方对炎症因子的抑制作用有浓度依赖性 证实了利金方能够有效抑制炎症反应。

众所周知 CD4⁺T、CD8⁺T 等免疫调节细胞属于单个核细胞 IL-21 是近年来发现的新的炎症因子 产生于活化的 CD4⁺T 细胞 当 CD4⁺T 分化为 Th17 细胞时可大量分泌^[6,7]。CD4⁺T/Th17 细胞失衡所导致的免疫调节异常是 COPD 慢性炎症存在的重要原因^[8-10]。陈裕民等研究发现 COPD 患者外周血中 IL-21 的分泌量比健康对照组高 并且存在 CD4⁺T/Th17 细胞失衡^[11]。我们的实验表明利金方除了抑制 IL-8 下降外 能使 IL-21 表达下降 提示利金方可能具有调节 CD4⁺T、Th17 细胞的作用。

NF-κB 是调控炎症因子的重要转录因子 能调控多种炎症因子如 TNF-α、IL-6、IL-8 的表达。吴桂英等研究发现参芪补肺汤能抑制 COPD 肺气虚证模型大鼠 ASM 增殖 其机制可能与 NF-κB 下调有关^[12]。我们的实验结果表明利金方能逆转 CSE 诱导的 NF-κB P65 表达上调 使 NF-κB P65 的表达量下调 提示利金方能通过调控 NF-κB 减轻 CSE 诱导的炎症反应。NF-κB 能够调节 Th17 细胞免疫反应 邱国瑞等^[13]研究发现调控 Rel/NF-κB P65 轴可以抑制 CD4⁺T 向 Th17 细胞分化。Th17 细胞可分泌大量 IL-21^[7]。我们的研究表明利金方能使 IL-21 表达下调 同时使 NF-κB P65 表达下调 说明利金方有可能通过作用于 NF-κB 等因子调节免疫炎症反应。我们的前期研究表明利金方联合噻托溴铵治疗能降低 COPD 稳定期肺气虚证患者血清 IL-17、TGF-β1 表达水平 减轻患者气道炎症及延缓气道重塑^[14]。刘建博等^[15]研究发现在常规西医治疗的基础上联合健脾、清肺、化痰中药治疗 COPD 急性发作期脾肺两虚、痰热郁肺型合并 SIRS 的患者能改善患者的症状 并且使 NF-κB 的表达明显下降。因此结合我们的研究结果 我们认为利金方可能通过调控 NF-κB P65 使 IL-8、IL-21 等炎症因子下降从而减轻 COPD 患者的免疫炎症反应。

综上所述 本研究的结果表明 利金方通过抑制 NF-κB P65 从而降低 IL-8、IL-21 的表达进而减轻单核细胞的炎症反应。NF-κB P65 可能是利金方发挥调节免疫炎症反应的靶点之一 为利金方治疗 COPD 的临床应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019 [J]. Eur Respir J, 2019, 53(5): 1900164.
- [2] Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor-κB in pulmonary diseases [J]. Chest 2000, 117(5): 1482.
- [3] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠 IL-8 及 TNF-α 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(6): 939.
- [4] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病大鼠 LTB4 表达及气道炎症的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7): 1410.
- [5] Li M, Zhong X, He Z, et al. Effect of erythromycin on cigarette-induced histone deacetylase protein expression and nuclear factor-κB activity in human macrophages in vitro [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(4): 643.
- [6] 黄牧华, 董克成, 魏颖, 等. 慢性阻塞性肺疾病中医证候及证素分布规律与特征的文献分析研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(10): 1373.
- [7] Lei L, Zhong XN, He ZY, et al. IL-21 Induction of CD4⁺T Cell Differentiation into Th17 Cells Contributes to Bleomycin-Induced Fibrosis in Mice [J]. Cell Biol Int, 2015, 39(4): 388.
- [8] 刘晓君, 吴世满, 康彩云, 等. 香烟烟雾提取物致 Th17/Treg 的失衡在慢性阻塞性肺疾病发生发展中的作用与意义 [J]. 中华临床医师杂志(电子版) 2014, 8(11): 61.
- [9] 段敏超, 钟小宁, 黄颖, 等. 香烟烟雾暴露肺气肿小鼠肺中 Th17 细胞的变化及可能机制 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(28): 1996.
- [10] 龙翔, 李延红, 尹慧, 等. 吸烟相关慢性阻塞性肺疾病患者肺组织 Th17/Treg 细胞的表达及其可能意义 [J]. 湖北医药学院学报, 2015, 35(13): 968.
- [11] 陈裕民, 占学兵, 张美娣. 不同分期老年 COPD 患者 Th17、Treg 细胞比例及炎症因子水平研究 [J]. 临床肺科杂志, 2015, 20(1): 83.
- [12] 吴桂英, 张葵, 闫萍, 等. 参芪补肺汤对 COPD 肺气虚证大鼠气道平滑肌 HDAC2 与 NF-κB p65 表达的影响 [J]. 医药导报, 2016, 35(3): 224.
- [13] Ruan QG, Kameswaran V, Zhang Y, et al. The Th17 immune response is controlled by the Rel-RORγ-RORγ T transcriptional axis [J]. J Exp Med 2011, 208(11): 2321.
- [14] 陈斯宁, 王浩舟, 李瑞祥. 利金方对慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气虚证患者的临床疗效及对血清 IL-17、TGF-β1 的影响 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(21): 3063.
- [15] 刘建博, 杨海娟. 健脾清肺化痰法对慢性阻塞性肺疾病合并全身炎症反应综合征疗效及核因子-κB 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(2): 120.