

桑苏饮调控TLR4通路抑制哮喘大鼠气道炎症

翟建宾, 赵亮*, 于士昌, 赵臣亮, 赵宏达

(河北省中医院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的:探讨桑苏饮调控Toll样受体4(TLR4)通路对哮喘大鼠气道炎症的抑制作用。方法:48只SD大鼠中选取40只建立哮喘模型,并按照随机数表法分为模型组,地塞米松组,桑菊饮低、中、高剂量组5组,剩余8只SD大鼠作为空白组。地塞米松组予以 $0.005\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,桑苏饮低、中、高剂量组分别予以 $2.1, 4.2, 8.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 桑苏饮灌胃(给药体积 $0.01\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型组和空白组分别予以给药体积 $0.01\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃生理盐水,均每天1次,共7d。比较干预后各组大鼠过敏反应分级;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠干预后血清,支气管肺泡灌洗液(BALF)白细胞介素- 1β (IL- 1β),肿瘤坏死因子- α (TNF- α), γ -干扰素(IFN- γ)水平;苏木精-伊红(HE)染色观察各组肺组织病理改变,比较肺组织炎症细胞浸润评分;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组肺组织TLR4,核转录因子- κ B(NF- κ B)mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组肺组织TLR4,NF- κ B蛋白表达及磷酸化(p)-NF- κ B水平。结果:模型组过敏反应分级、肺组织病理改变较空白组加重,其余各组较模型组均有所减轻;模型组血清,BALF IL- 1β ,TNF- α 水平均高于空白组,其余各组均低于模型组($P<0.01$);模型组血清,BALF IFN- γ 水平均低于空白组,其余各组均高于模型组($P<0.05, P<0.01$);模型组肺组织炎症细胞浸润评分,肺组织TLR4,NF- κ B mRNA与蛋白表达,p-NF- κ B蛋白水平均高于空白组,其余各组均低于模型组($P<0.01$),差异有统计学意义。结论:桑苏饮可抑制哮喘大鼠过敏反应、肺组织病变和气道炎症,可能是通过抑制TLR4通路,下调TLR4,NF- κ B mRNA与蛋白表达,降低p-NF- κ B水平实现。

[关键词] 桑苏饮; Toll样受体4(TLR4); 核转录因子- κ B(NF- κ B); 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK); 哮喘; 气道炎症

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R256.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0021-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211594

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210601.1230.003.html>

[网络出版日期] 2021-06-02 8:42

Inhibitory Effect of Sangsuyin on Airway Inflammation in Asthmatic Rats by Regulating TLR4 Pathway

ZHAI Jian-bin, ZHAO Liang*, YU Shi-chang, ZHAO Chen-liang, ZHAO Hong-da
(Hebei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Sangsuyin on airway inflammation in asthmatic rats by regulating the Toll-like receptor 4 (TLR4) pathway. **Method:** Forty-eight SD rats were randomly divided into a normal group ($n=8$) and an experimental group ($n=40$). Asthma model was induced in the rats of the experimental group which were further divided into the following five groups according to a random number table: a model group, a dexamethasone group ($0.005\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low- ($2.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($4.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high-dose ($8.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) Sangsuyin groups. The drugs were all dissolved in normal saline at $0.01\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$. The rats in the model group and the normal group received normal saline (*ig*) at $0.01\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$. The drug treatment was carried out once per day, for a total of 7 days. The grades of allergic reactions were compared among the groups after intervention. The levels of interleukin- 1β (IL- 1β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and

[收稿日期] 20210224(009)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2018012)

[第一作者] 翟建宾, 硕士, 从事心胸外科、微创胸外科医学研究, E-mail: hbykzjb@163.com

[通信作者] * 赵亮, 博士, 副主任医师, 从事心胸外科、微创胸外科医学研究, E-mail: zhaolcardiac@163.com

interferon- γ (IFN- γ) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissues, and the inflammatory cell infiltration scores of lung tissues were compared. The mRNA expression of TLR4 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) was detected by quantitative real-time fluorescence-based reverse-transcription polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression of TLR4, NF- κ B, and the level of phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B) were detected by Western blot. **Result:** The success rate of modeling was 95.00%. Compared with the normal group, the model group showed a higher grade of allergic reaction and more severe pathological changes of lung tissues, and the groups with drug intervention exhibited relieved conditions. The levels of IL-1 β and TNF- α in the serum and BALF were higher in the model group than in the normal group, and lower in the groups with drug intervention than in the model group ($P < 0.01$). The level of IFN- γ in the serum and BALF was lower in the model group than in the normal group, and higher in the groups with drug intervention than in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The inflammatory cell infiltration score, mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B, and the mRNA level of p-NF- κ B were higher in the model group than in the normal group, and lower in the groups with drug intervention than in the model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Sangsuyin could inhibit allergic reactions, lung tissue lesions, and airway inflammation in asthmatic rats. It is speculated that this effect is achieved by inhibiting the TLR4 pathway, down-regulating the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B, and reducing the level of p-NF- κ B. Sangsuyin can inhibit allergic reaction, lung tissue lesions and airway inflammation in asthmatic rats. It is speculated that this effect is achieved by inhibiting TLR4 pathway, down regulating the mRNA and protein expression of TLR4, NF- κ B, and reducing the levels of p-NF- κ B.

[**Keywords**] Sangsuyin; Toll-like receptor 4 (TLR4); nuclear factor- κ B (NF- κ B); mitogen-activated protein kinase (MAPK); asthma; airway inflammation; sangsuyin

哮喘是一种临床常见的呼吸道疾病,可出现喘息、咳嗽、气急、胸闷等症状,多呈反复发作。流行病学调查显示,我国成年人中哮喘的患病率约4.2%,其中有高达71.2%的患者从未被医生诊断,预计到2025年哮喘将成为仅次于癌症的致死和致残疾病^[1]。地塞米松是哮喘患者的常用药,具有抗炎、抗过敏等作用,但是哮喘患者治疗后易复发且长期应用该药物容易产生依赖性^[2]。近年来中医药在哮喘患者治疗中的积极作用逐渐被开发,中药的优势也逐渐凸显。

桑苏饮出自《太平惠民和剂局方》,可益气解表、理气化痰、平喘顺气,已有研究证实桑苏饮治疗哮喘有确切疗效,但该方剂的作用机制仍需要进一步探讨^[3]。Toll样受体4(TLR4)通路是经典的炎症反应调控路径,在炎症病变发生和发展过程中,TLR4高表达,可上调其下游的核转录因子- κ B(NF- κ B),增加磷酸化(p)-NF- κ B水平,已有报道证实该通路被激活是哮喘气道炎症发生和加重的重要分子机制^[4-6]。而桑苏饮是否可通过调控该通路减轻哮喘的气道炎症反应尚未可知。鉴于此,本研究设计大鼠实验,探讨桑苏饮是否可通过抑制

TLR4/NF- κ B通路减轻哮喘大鼠的气道炎症反应,从而为桑苏饮在哮喘患者临床治疗中的推广应用提供一定的依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠48只,雌雄各半,7~9周龄,体质量(200 \pm 20)g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2020-0001。动物伦理批号2020-KY-017-05。

1.2 药品与试剂 地塞米松(山西同达药业有限公司,规格2g \cdot L⁻¹,批号1912135);实验所用中药(大理药业有限公司,经河北省中医院鉴定均符合2020年版《中华人民共和国药典》^[7]质量要求,批号分别为瓜蒌191225,鱼腥草191014,桑叶191112,苏叶191204,陈皮191007,姜半夏191104,茯苓191025,浙贝母191023,僵蚕191021,荆芥190922,黄芩191220,炙甘草190814);卵清蛋白(美国Sigma公司,批号AG19083A);氢氧化铝凝胶(山东健康药业有限公司,批号20191102001);磷酸盐缓冲液(北京中杉会桥生物技术有限公司,批号A190711);无菌生理盐水(上海一研生物科技有限公司,批号190812);大鼠血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)

白细胞介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), γ -干扰素(IFN- γ)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海抚生实业有限公司, 批号分别为191204, 191211, 191207, 191213, 191218, 191223); 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉博士德生物工程研究所, 批号1910113); trizol试剂盒(美国Invitrogen公司, 批号1911017); mRNA反转录试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司, 批号GR191118003); 总蛋白提取试剂盒(上海贝博生物科技有限公司, 批号P19100912); 兔抗鼠TLR4, NF- κ B, p-NF- κ B单克隆抗体, 山羊抗兔TLR4, NF- κ B, p-NF- κ B多克隆抗体(Abcam中国公司, 批号分别为20190415136, 20190716151, 20190622130, 20190520178, 20190918191, 20190725185)。

1.3 设备与仪器 Allegra X-15R型离心机(美国Beckman Coulter公司); RM2235型组织切片机(德国Leica公司); MDF-339型医用恒温冰箱(日本Panasonic公司); JSM-6610型光学显微镜(日本电子株式会社); C1000 Touch型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪, Mini-PROTEAN 3型凝胶电泳仪, Trans-Blot Turbo型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 药品制备 取瓜蒌、鱼腥草各15 g, 桑叶、苏叶、陈皮、姜半夏、茯苓、浙贝母、僵蚕、荆芥、黄芩各10 g, 炙甘草6 g, 洗净后加入超过药物1/3的冷水浸泡2 h, 武火烧开, 文火煎煮20 min, 取汁, 煎煮2次。将2次所取药汁混合均匀, 水煎浓缩, 分别煎至每1 mL含0.63, 1.26, 2.52 g生药, 将其保存于无菌量瓶中, 储存于4℃冰箱中备用。

2.2 建模分组 自48只SD大鼠中随机选取40只建立哮喘模型, 将建模大鼠于第1, 8天分别皮下注射卵清蛋白10 mg和氢氧化铝凝胶200 mg(溶于1 mL磷酸盐缓冲液中), 并取 5×10^9 个灭活百日咳杆菌腹腔注射。第15天开始激发, 激发方法为将大鼠置于密闭容器中, 取2%卵清蛋白磷酸盐缓冲液共50 mL雾化吸入, 每天1次, 每次30 min。若大鼠烦躁不安, 呼吸加深、加快, 静伏不动, 弓背, 甚至伸颈、缩胸、收缩呈喘息状、二便失禁等, 即认为建模成功^[8]。将建模成功大鼠采用自然数进行编号, 并利用SPSS 22.0软件生成随机数表, 根据随机数表将编号分为5组, 即模型组, 地塞米松组, 桑苏饮低、中、高剂量组, 剩余8只SD大鼠记作空白组, 其中地塞米松组予以0.005 g·kg⁻¹灌胃, 桑苏饮低、中、高剂

量组分别予以2.1, 4.2, 8.4 g·kg⁻¹桑苏饮灌胃(给药体积0.01 L·kg⁻¹), 模型组和空白组分别予以给药体积0.01 L·kg⁻¹灌胃生理盐水。各组均每天灌胃1次, 共7 d。

2.3 过敏反应分级 于干预后对各组大鼠的过敏反应评级, 将无过敏反应记为0级; 将瘙痒、舔舐肢体、喷嚏、咳嗽记为I级; 将二便困难、呼吸困难记为II级; 将张口呼吸、喘息记为III级; 将站立不稳、痉挛、翻滚甚至死亡记为IV级。

2.4 血清, BALF炎症因子水平检测 于干预后取BALF, 禁食不禁水24 h, 腹腔麻醉, 固定大鼠, 开胸取右肺组织并将主支气管迅速结扎, 同时对左肺的肺泡实施灌洗术, 首次灌注4 mL生理盐水, 然后灌注3 mL生理盐水, 灌注完毕后轻揉肺叶1~2 min, 回收BALF, 2次回收的BALF需混合均匀, 然后断头法处死, 取腹主动脉血3 500 r·min⁻¹离心10 min, 离心半径8 cm, 取上清液。对血清和BALF采用ELISA检测试剂盒测定IL-1 β , TNF- α 和IFN- γ 水平。

2.5 肺组织病理改变观察 取右肺组织固定、包埋、切片、脱蜡、脱水, 采用HE染色试剂盒, 苏木素染色, 盐酸乙醇分化后流水冲洗, 采用NaHCO溶液漂洗3~5 min返蓝, 伊红染色, 梯度浓度乙醇脱水, 并依次进行透明、封片处理。光学显微镜下观察肺组织病理改变。评价肺组织炎症细胞浸润程度, 将无炎症细胞、有少许炎症细胞、有较多分布不均的炎症细胞、有大量炎症细胞且分布均匀、有大量炎症细胞且聚集成团分别记为0, 1, 2, 3, 4分。

2.6 Real-time PCR检测肺组织TLR4, NF- κ B mRNA表达 取右肺组织, 液氮研磨, 提取总RNA, 测定纯度, 逆转录为单链的cDNA。利用Primer Premier 5.0设计引物序列, 反应体系总体积25 μ L, 程序为95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 52℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 35个循环, 最后72℃延伸5 min, 以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。TLR4, NF- κ B引物由武汉金开瑞生物公司合成, 引物序列见表1。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织TLR4, NF- κ B及p-NF- κ B蛋白水平 取右肺组织, 预冷, 液氮研磨并加入裂解液匀浆。裂解蛋白质10 min, 12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm), 提取总蛋白并定量。上样量为50 μ g, 凝胶电泳, 半干法转膜, 5%脱脂奶粉封闭1.5 h。添加一抗(稀释比分别为1:500, 1:2 000, 1:2 000,), 4℃过夜。滴加生物素标记的二抗(1:2 000), 室温90 min。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TLR4	上游 TCGATAGGCTATAGGCTAG	320
	下游 ATCGCGGCGTATAGCTAG	
NF-κB	上游 TGGCTAGAAGGCTATAGGCTATAG	388
	下游 CGCGGCTAGAGGACTATAGGCTATAG	
β-actin	上游 CTGGCTATAGCTTCTAGA	280
	下游 TAGAGTTCTCTGAGAGCTAG	

滴加电化学发光液,曝光扫描拍照,以Quantity One软件分析蛋白相对表达量及磷酸化水平。

2.8 统计学方法 以SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量数据使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和

SNK-*q*检验;计数数据使用%表示,等级分布采用秩和检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对过敏反应分级的影响 40只建模大鼠中共38只建模成功,有2只大鼠激发后死亡,建模成功率为95.00%(38/40)。分别为模型组($n=7$),地塞米松组($n=8$),桑苏饮低剂量组($n=8$),桑苏饮中剂量组($n=7$),桑苏饮高剂量组($n=8$),桑苏饮低剂组有1只大鼠灌胃操作时不慎穿破食管死亡,剔除本研究。

各实验组大鼠过敏反应分级比较差异有统计学意义($Z=4.936, P<0.05$);模型组与空白组($Z=6.189, P<0.01$),桑苏饮高剂量组与模型组($Z=7.802, P<0.01$)比较差异均有统计学意义,见表2。

表2 桑苏饮对过敏反应分级的影响

Table 2 Effect of Sangsuyin on classification of allergic reaction of rats in each group

只(%)

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	0级	I级	II级	III级	IV级
空白	8		8(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
模型	7		0(0.00)	1(14.29)	2(28.57)	2(28.57)	2(28.57)
地塞米松	8	0.005	0(0.00)	3(37.50)	3(37.50)	2(25.00)	0(0.00)
桑苏饮	7	2.1	0(0.00)	2(28.57)	3(42.86)	2(28.57)	0(0.00)
	7	4.2	0(0.00)	3(42.86)	2(28.57)	2(28.57)	0(0.00)
	8	8.4	2(25.00)	3(37.50)	3(37.50)	0(0.00)	0(0.00)

3.2 对血清, BALF炎症因子水平的影响 血清, BALF IL-1β, TNF-α水平与空白组比较,模型组均高于空白组($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和桑苏饮各剂量组均低于模型组($P<0.01$);地塞米松组、桑苏饮中剂量组和桑苏饮高剂量组均低于桑苏饮低剂量组($P<0.01$),桑苏饮高剂量组均低于地塞米松组和桑苏饮中剂量组($P<0.05, P<0.01$)。血清,

BALF IFN-γ水平与空白组比较,模型组均低于空白组($P<0.01$);与模型组比较,地塞米松组和桑苏饮各剂量组均高于模型组($P<0.05, P<0.01$);地塞米松组、桑苏饮中剂量组和桑苏饮高剂量组均高于桑苏饮低剂量组($P<0.05, P<0.01$),桑苏饮高剂量组高于地塞米松组和桑苏饮中剂量组($P<0.05, P<0.01$),见表3,4。

表3 桑苏饮对血清炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of Sangsuyin on serum inflammatory factor level of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

ng·L⁻¹

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	TNF-α	IFN-γ
空白	8		40.52±6.17	81.45±10.26	74.85±11.20
模型	7		294.78±30.69 ²⁾	342.89±32.71 ²⁾	40.31±6.86 ²⁾
地塞米松	8	0.005	158.95±20.07 ⁴⁾	211.25±23.78 ⁴⁾	56.73±8.16 ⁴⁾
桑苏饮	7	2.1	204.67±25.43 ^{4,6)}	258.75±27.06 ^{4,6)}	48.79±7.52 ^{4,6)}
	7	4.2	160.23±21.85 ^{4,8)}	209.88±24.52 ^{4,8)}	57.25±8.49 ^{4,8)}
	8	8.4	85.89±20.47 ^{4,6,8,10)}	148.75±20.14 ^{4,6,8,10)}	65.28±10.39 ^{4,5,8,9)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与地塞米松组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$;与桑苏饮低剂量组比较⁷⁾ $P<0.05$,⁸⁾ $P<0.01$;与桑苏饮中剂量组比较⁹⁾ $P<0.05$,¹⁰⁾ $P<0.01$ (表4~7同)。

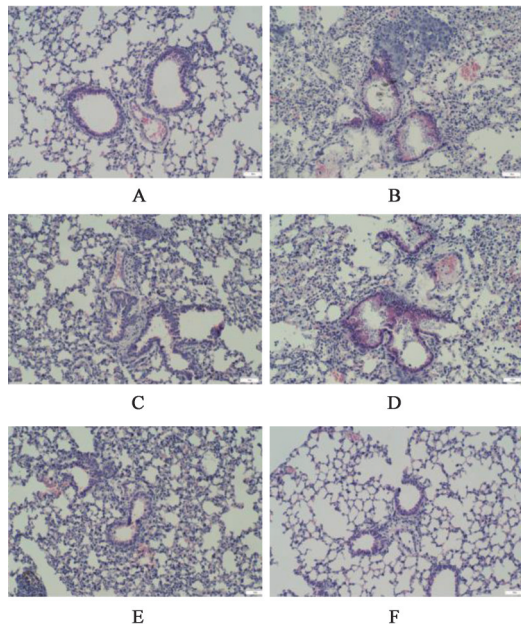
3.3 对肺组织病理的影响 空白组支气管内壁光滑完整,细胞排列整齐,平滑肌层呈正常厚度,支气管黏膜规整;模型组支气管壁及周围有大量炎性细

胞浸润,管腔内容物增多,微血管渗漏,且可见管腔内有大量炎性分泌物,部分小支气管被炎性细胞及黏液栓堵塞,气道上皮增生,平滑肌层增厚,上皮细

表 4 桑苏饮对 BALF 炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	TNF- α	IFN- γ
空白	8		22.45 \pm 4.12	31.56 \pm 5.18	51.58 \pm 10.02
模型	7		43.87 \pm 7.15 ²⁾	58.97 \pm 8.78 ²⁾	29.30 \pm 4.15 ²⁾
地塞米松	8	0.005	30.25 \pm 5.71 ⁴⁾	44.38 \pm 6.95 ⁴⁾	39.25 \pm 6.18 ⁴⁾
桑苏饮	7	2.1	36.19 \pm 6.03 ^{4,6)}	50.25 \pm 7.06 ^{4,6)}	33.76 \pm 5.73 ^{3,6)}
	7	4.2	30.01 \pm 5.89 ^{4,8)}	43.52 \pm 6.83 ^{4,8)}	40.07 \pm 6.28 ^{4,8)}
	8	8.4	26.17 \pm 4.71 ^{4,5,8,9)}	35.86 \pm 6.74 ^{4,6,8,10)}	45.86 \pm 8.33 ^{4,6,8,10)}

胞脱落且呈纤维化,支气管黏膜水肿、增厚,皱壁增多、延长;桑苏饮低剂量组支气管壁及周围有明显炎性细胞浸润,管腔内容物多,可见管腔内有黏液及脱落的上皮细胞,管壁及平滑肌层增厚;桑苏饮中剂量组与地塞米松组支气管壁及周围有部分炎性细胞浸润,气管管壁结构层次基本清晰,管腔内偶见黏液及脱落的上皮细胞,管腔内有少量渗出物,管壁及平滑肌层稍厚;桑苏饮高剂量组支气管壁及周围偶见炎性浸润,管壁和平滑肌层厚度接近空白组,支气管黏膜规整,管腔内黏液及脱落的上皮细胞甚为少见,见图 1。



A. 空白组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D-F. 桑苏饮低、中、高剂量组(图 2 同)

图 1 桑苏饮对大鼠肺组织病理的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Sangsuyin on lung histopathology of asthmatic rats (HE, $\times 200$)

干预后与空白组比较,模型组大鼠肺组织炎症细胞浸润评分高于空白组($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组和桑苏饮各剂量组均低于模型组

($P < 0.01$),地塞米松组、桑苏饮中剂量组和桑苏饮高剂量组均低于桑苏饮低剂量组($P < 0.01$),桑苏饮高剂量组低于地塞米松组和桑苏饮中剂量组($P < 0.01$),见表 5。

表 5 桑苏饮对肺组织炎症细胞浸润评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/g·kg ⁻¹	炎症细胞浸润评分
空白	8		0
模型	7		3.57 \pm 0.65 ²⁾
地塞米松	8	0.005	2.13 \pm 0.35 ⁴⁾
桑苏饮	7	2.1	2.71 \pm 0.46 ^{4,6)}
	7	4.2	2.14 \pm 0.37 ^{4,8)}
	8	8.4	1.50 \pm 0.22 ^{4,6,8,10)}

3.4 对肺组织 TLR4, NF- κ B mRNA 表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠肺组织 TLR4, NF- κ B mRNA 表达均高于空白组($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组和桑苏饮各剂量组均低于模型组($P < 0.01$);桑苏饮中、高剂量组与地塞米松组均低于桑苏饮低剂量组($P < 0.01$),桑苏饮高剂量组均低于桑苏饮中剂量组和地塞米松组($P < 0.01$),见表 6。

3.5 对肺组织 TLR4, NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白表达水平的影响

与空白组比较,模型组大鼠肺组织 TLR4, NF- κ B 及 p-NF- κ B 蛋白水平均高于空白组($P < 0.01$);与模型组比较,地塞米松组和桑苏饮各剂量组均低于模型组($P < 0.01$);桑苏饮中、高剂量组与地塞米松组均低于桑苏饮低剂量组($P < 0.01$),桑苏饮高剂量组均低于桑苏饮中剂量组、地塞米松组($P < 0.01$),见表 7,图 2。

4 讨论

哮喘可由遗传因素、变应原接触、吸烟、空气污染、呼吸道感染等引发,常见气道过敏性炎症病变,而慢性气道炎症反应也是哮喘基本的病理改变^[9-10]。在哮喘气道炎症发生过程中,肥大细胞, T

表6 桑苏饮对肺组织TLR4, NF-κB mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Sangsuyin on TLR4, NF-κB mRNA expression in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4	NF-κB
空白	8		0.15±0.03	0.29±0.04
模型	7		0.98±0.11 ²⁾	1.35±0.18 ²⁾
地塞米松	8	0.005	0.74±0.09 ⁴⁾	0.81±0.10 ⁴⁾
桑苏饮	7	2.1	0.85±0.10 ^{4,6)}	1.10±0.12 ^{4,6)}
	7	4.2	0.75±0.11 ^{4,8)}	0.79±0.09 ^{4,8)}
	8	8.4	0.46±0.05 ^{4,6,8,10)}	0.54±0.07 ^{4,6,8,10)}

表7 桑苏饮对肺组织TLR4, NF-κB及p-NF-κB蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Effect of Sangsuyin on TLR4, NF-κB protein expression in lung tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin	p-NF-κB/β-actin
空白	8		0.09±0.03	0.18±0.04	0.11±0.03
模型	7		1.15±0.18 ²⁾	1.29±0.16 ²⁾	1.40±0.22 ²⁾
地塞米松	8	0.005	0.26±0.04 ⁴⁾	0.54±0.09 ⁴⁾	0.63±0.07 ⁴⁾
桑苏饮	7	2.1	0.65±0.10 ^{4,6)}	0.89±0.11 ^{4,6)}	0.85±0.10 ^{4,6)}
	7	4.2	0.24±0.04 ^{4,8)}	0.52±0.08 ^{4,8)}	0.69±0.09 ^{4,8)}
	8	8.4	0.12±0.03 ^{4,6,8,10)}	0.28±0.05 ^{4,6,8,10)}	0.20±0.04 ^{4,6,8,10)}

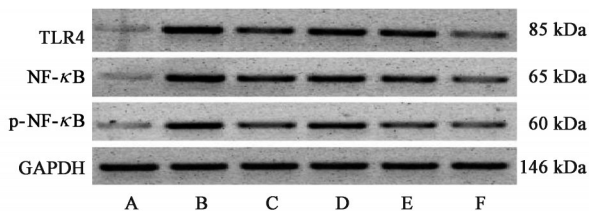


图2 各组大鼠肺组织TLR4, NF-κB及p-NF-κB蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of TLR4, NF-κB, p-NF-κB protein expression in lung tissues of rats in each group

淋巴细胞,嗜酸性粒细胞均有参与,不仅可引起咳嗽、喘息、胸闷等症状,还可损伤呼吸系统功能,甚至导致猝死。因此如何有效控制哮喘患者的气道炎症反应一直是该领域工作者重点关注的问题。

根据中医学理论,哮喘可归属于“哮病”“喘证”等范畴,关于该病的中医典籍记载可追溯至《黄帝内经》,其中记载的“喘鸣”“够胎”与本病特征相似;《诸病源候论》曰:“痰气相击,随嗽动息,呼呷有声”,应以“消痰破饮”治之;《临症指南医案·哮》曰:“寒人背膂,内合肺系,宿邪阻气阻痰。”可知寒气入侵、邪气客于肺,阻于气血痰浊是该病的重要病因;《症因脉治·哮病》中指出“哮病之因,痰饮留伏……潜伏于内,偶有七情之犯,饮食之伤……则哮喘之症作矣”,表明痰饮留伏是喘证的内因,而情志不遂、饮食不节等均是其诱因。现代中医学家认为哮喘的基本病因包括外邪袭肺、饮食失节、情志失调、久咳伤肺等,外邪入侵、肺气不宣,可阻塞肺气,加

之寒凝津液、气道不畅,而致肺气不宣;饮食失节,伤于脾胃,脾失健运,致使痰浊内生,上宣于肺,肺气壅阻,痰湿内蕴,可发为哮病;情志失调,肝郁气滞,忧思气结,伤于肺脏,肺气痹阻,宣降失调,发为喘证;久咳伤肺,气失所主,久病及肾,肾失摄纳,化气行水不能,水凌心肺,引发哮病^[11]。因此,哮病的病因无外乎风、热、湿、邪、寒,伤于肺脏,不能宣降,以致宿痰伏肺、肺气郁闭,因咳嗽哮鸣、病情缠绵,多有痰多色黄、口渴咽干之症,故以“热哮”多见,应以清热化痰、宣肺平喘为治则。

本研究中采用卵清蛋白与氢氧化铝凝胶皮下注射配合灭活百日咳杆菌腹腔注射,并以卵清蛋白磷酸盐缓冲液进行激发,可诱发气道过敏性炎症反应,而哮喘的基本病理改变即气道过敏性炎症反应^[12],利用该方法可建立哮喘模型,且建模成功率高。此外,本研究中干预后地塞米松组和桑苏饮各剂量组过敏反应和肺组织病理改变均减轻,肺组织炎症细胞浸润评分均下降,其中桑苏饮高剂量组效果最佳,表明地塞米松和桑苏饮均可减轻哮喘大鼠的过敏反应和肺组织病理改变,减轻肺组织炎症细胞浸润,还可控制气道炎症反应,且高剂量的桑苏饮在此方面表现出明显的优势。桑苏饮组方中以黄芩、鱼腥草为君药,黄芩善清肺热、鱼腥草清热解毒,二者配合,与哮证痰浊内生、湿热内蕴之病因相契合,故对肺实热证疗效良好;瓜蒌、浙贝母为臣

药,瓜蒌清热化痰、宽胸散结,浙贝母清热散结、化痰止咳,二者合用可增强清热化痰之效;以姜半夏、陈皮、桑叶、苏叶、荆芥为佐药,姜半夏意在祛痰,陈皮重在理气,桑叶清热去火、润肺,苏叶芳香化湿,荆芥辛可散邪、温可祛寒,诸药共用可理气化痰、宣肺通气;炙甘草、茯苓共为使药,炙甘草司调和之职,茯苓健脾和中,可中和药性、调达气机。全方合用,宣肺通气、畅达气机,气畅则痰易于化,痰化而喘自消,清而不寒、寒而不凝,与叶天士“清邪在上,必用轻清之药”和吴鞠通“治上焦如羽,非轻而不举”相和。桑苏饮治疗哮喘有清热化痰、宣肺平喘之用,且方中多用黄芩、鱼腥草、瓜蒌、浙贝母、桑叶等清肺热的药材,伍用陈皮、苏叶等平喘理气、润肺祛痰的中药,可治上焦热证,配以茯苓健脾和中,清热而不伤阴,理气而不耗气,祛痰而不伤正,是以哮喘得控、喘症得除。现代药理研究显示,黄芩汤可减轻哮喘模型大鼠的肺组织炎症浸润,且鱼腥草的有效成分——鱼腥草素钠有助于减轻哮喘模型小鼠的炎症反应,控制肺组织病理改变和炎症细胞浸润,减少管腔内分泌物,且25 mg·kg⁻¹剂量的鱼腥草素钠的效果更佳。因此桑苏饮对哮喘有良好疗效,可减轻肺组织病变^[13-14]。

IL-1 β 和TNF- α 均是常见的促炎因子,前者是趋化因子家族的重要成员,主要由单核和巨噬细胞产生,在炎症反应内环境中其水平显著升高^[15-16];后者也是由单核细胞、巨噬细胞产生的,具有多种生物学活性,在炎症、肿瘤等发生和发展过程中均有参与;IFN- γ 主要由自然杀伤细胞、抗原、有丝分裂的T细胞产生,可增强抗原递呈细胞功能,促进免疫修复,调节免疫功能^[17]。在哮喘病患中,受多种因素刺激,单核细胞和巨噬细胞可分泌大量的IL-1 β , TNF- α ,而IFN- γ 的合成与分泌则减少,诱导及加重气道炎症反应。有研究显示,气道炎症反应受TLR4通路调控,在病理因素刺激下该通路被激活,使得TLR4, NF- κ B表达升高,提高p-NF- κ B水平,进而诱导单核细胞和巨噬细胞产生大量的IL-1 β 和TNF- α ,与此同时IFN- γ 被抑制,最终导致肺组织炎症浸润,引发气道炎症反应^[18]。既往有实验指出,抑制哮喘大鼠肺组织TLR4/NF- κ B表达,可降低BALF中的炎性细胞水平^[19]。本研究中地塞米松组和桑苏饮各剂量组血清和BALF IL-1 β , TNF- α 水平均较模型组下降,IFN- γ 水平均较模型组升高,且其肺组织TLR4, NF- κ B mRNA与蛋白表达, p-NF- κ B水平也均较模型组下降,表明地塞米松和桑苏饮均

可减轻哮喘大鼠的气道炎症,推测与抑制TLR4通路有关。桑苏饮中黄芩苷可调控哮喘病鼠TLR4通路减轻气道炎症反应,还可抑制大鼠气道重塑^[20-21];鲜鱼腥草挥发油可减轻哮喘豚鼠肺组织的炎性病变,因此桑苏饮可抑制TLR4通路减轻哮喘大鼠的气道炎症^[22]。

综上所述,桑苏饮可减轻哮喘大鼠的过敏反应与气道炎症,调节血清与BALF中炎性因子水平,可能与抑制TLR4通路下调TLR4, NF- κ B mRNA与蛋白表达、降低p-NF- κ B水平有关。但是桑苏饮是否可通过其他机制治疗哮喘尚未可知,可作为后期研究的研究重点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 中华医学会变态反应分会呼吸过敏学组,中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 中国过敏性哮喘诊治指南(第一版,2019年)[J]. 中华内科杂志,2019,58(9):636-655.
- [2] ABAYA R, JONES L, ZORC J J. Dexamethasone compared to prednisone for the treatment of children with acute asthma exacerbations [J]. *Pediatr Emerg Care*,2018,34(1):53-58.
- [3] 苏奎国,姜良铎,郭勇英,等. 桑苏饮对哮喘模型大鼠气道重塑及肺组织上皮细胞ICAM-1表达的影响[J]. 山东中医药大学学报,2010,34(4):354-356.
- [4] WANG Z R, WANG Q, SUI Y, et al. Dexamethasone alleviates allergic asthma immature rat through Toll like receptor 4 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2018,22(1):184-189.
- [5] JIAO W, CUI H, HUO Y, et al. Effects of Baicalin on the activation of Toll like receptor 4/NF- κ B signaling pathway in mice with recurrent abortion [J]. *World Chinese Medicine*,2020,15(6):846-849.
- [6] MA S Q, WEI H L, ZHANG X. TLR2 regulates allergic airway inflammation through NF- κ B and MAPK signaling pathways in asthmatic mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2018,22(10):3138-3146.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [8] 杨飞,惠毅,闫曙光,等. 卵蛋白加氢氧化铝致敏建立哮喘大鼠模型研究[J]. 现代中西医结合杂志,2018,27(15):1600-1602.
- [9] SCHOETTLER N, STREK M E. Recent advances in severe asthma: from phenotypes to personalized medicine[J]. *Chest*,2020,157(3):516-528.
- [10] LOVINSKY-DESIR S. The use of biologic therapies

- for the management of pediatric asthma [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2020, 55(3): 803-808.
- [11] 袁为远,魏盼,包凯帆,等. 麻黄-甘草药对抑制过敏性哮喘的效应及机制初探[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(1): 41-45.
- [12] 高琴琴,丁子桐,李友林,等. 不同剂量卵蛋白诱发BALB/c小鼠支气管哮喘模型的比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(4): 52-57.
- [13] 陈秋仪,任培中,王佳美,等. 加减乌梅丸颗粒对哮喘大鼠激素干预模型气道重塑及转化生长因子- β_1 /Smad信号通路的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(8): 1114-1119.
- [14] 陈叶,黄丽娟,胡智立,等. 鱼腥草素钠对急性哮喘模型小鼠炎症的影响及机制研究[J]. *药物评价研究*, 2019, 42(6): 70-74.
- [15] MAHMUTOVIC-PERSSON I, MENZEL M, RAMU S, et al. IL-1 β mediates lung neutrophilia and IL-33 expression in a mouse model of viral-induced asthma exacerbation [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 16.
- [16] GHEBRE M A, PANG P H, DIVER S, et al. Biological exacerbation clusters demonstrate asthma and chronic obstructive pulmonary disease overlap with distinct mediator and microbiome profiles [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(6): 2027-2036.
- [17] SHARMA N, AKKOYUNLU M, RABIN R L. Macrophages-common culprit in obesity and asthma [J]. *Allergy*, 2018, 73(6): 1196-1205.
- [18] SCHURMAN S H, BRAVO M A, INNES C L, et al. Toll-like receptor 4 pathway polymorphisms interact with pollution to influence asthma diagnosis and severity [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 12713.
- [19] 王亚洲,何鹏,王丹虹. 孟鲁司特钠通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路影响哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖和凋亡[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2020, 46(2): 77-82.
- [20] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷抗哮喘作用与HMGB1/TLR4传导通路的相关性研究[J]. *世界中医药*, 2019, 14(6): 1402-1407.
- [21] 韩超,杨柳,张秋玲,等. 黄芩苷对哮喘大鼠气道重塑作用的实验研究[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2017, 22(7): 749-754.
- [22] 吴慧芬. 鲜鱼腥草挥发油对哮喘豚鼠肺组织干细胞因子和KL-6的影响[J]. *儿科药学杂志*, 2017, 14(6): 5-7.

[责任编辑 王鑫]