

·经典名方·

基于CXCL8-CXCR1/2轴探讨二陈汤加味对 COPD大鼠的抗炎机制

尚立芝, 季书, 石龙涛, 李耀洋, 毛梦迪, 张光远, 王国强*, 谢文英*, 徐莉莉
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:观察二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织CXC趋化因子配体(CXCL)8-CXC趋化因子受体(CXCR)1/2表达的影响,探讨二陈汤加味对COPD抗炎作用的分子机制。方法:40只SD大鼠随机分为正常组、模型组、二陈汤加味组和急支糖浆组,每组10只。以香烟烟雾联合脂多糖(LPS)制备COPD大鼠模型。二陈汤加味组以10 g·kg⁻¹灌胃(ig)给药,急支糖浆组以10 g·kg⁻¹剂量ig,正常组、模型组ig等量生理盐水,连续干预14 d。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中趋化因子(Chemokines)CXCL1, CXCL8含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测肺组织匀浆中CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA及蛋白表达,苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织的病理变化,免疫组织化学(IHC)检测肺组织中CXCL8, CXCR1和CXCR2的蛋白定位表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠BALF中CXCL1, CXCL8含量显著升高($P < 0.01$),肺组织CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA及蛋白表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,二陈汤加味组显著降低CXCL1, CXCL8含量($P < 0.01$),明显降低CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA及蛋白表达($P < 0.05$),且明显改善肺组织病理学损伤。结论:二陈汤加味对COPD有抗炎作用,其机制可能与抑制CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA及其蛋白的表达,减少趋化因子CXCL1, CXCL8的释放有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 炎症; 二陈汤; 趋化因子; 受体

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0040-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200801

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200104.1220.001.html>

[网络出版日期] 2020-1-4 13:12

Mechanism of Modified Erchentang on Expression of CXCL8-CXCR1/2 Axle Genes in Lung Tissue of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

SHANG Li-zhi, JI Shu, SHI Long-tao, LI Yao-yang, MAO Meng-di, ZHANG Guang-yuan,
WANG Guo-qiang*, XIE Wen-ying*, XU Li-li
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Erchentang on the expression of CXC chemokine ligand (CXCL) 8-CXC chemotaxis factor receptor (CXCR) 1/2 genes in the lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in order to explore the anti-inflammatory molecular mechanism of Erchentang on COPD. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into normal group, model group, Jizhi syrup group and modified Erchentang group. COPD models in rats were prepared by cigarette smoke and

[收稿日期] 20190826(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573881);河南省高等学校重点科研项目(15A360030);河南省科重点攻关项目(182102311163);河南省教育科学“十三五”规划一般课题([2019]-JKGHYB-0101, [2019]-JKGHYB-0114);国家级大学生创新创业训练计划项目(S201810471013, S201910471010);河南中医药大学大学生创新学习项目(CXXM[2017]0252, CXXM[2019]0001)

[第一作者] 尚立芝, 硕士, 教授, 从事中医药作用机制研究, E-mail: lzshang2014@163.com

[通信作者] *王国强, 博士, 助理研究员, 从事中医药免疫药理研究, E-mail: biowgq@126.com;

*谢文英, 教授, 从事中医药治疗肺系疾病研究, E-mail: xiewenying1963.163.com

dripping lipopolysaccharide (LPS) in the trachea. After modeling, normal and model groups were intragastrically given normal saline solution, Jizhi syrup group was given Jizhi syrup ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and modified Erchentang group was given intragastrically corresponding herbal drugs ($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 14 days. The levels of chemokines CXCL1, CXCL8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay in rat bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The mRNA expressions of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 were detected by quantitative real time PCR (Real-time PCR). Western blot was used to detect the levels of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 protein, the pathological changes of lung tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the expressions of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 protein in the lung tissue of all the groups. **Result:** The levels of chemokines CXCL1, CXCL8 in rats BALF were increased significantly ($P < 0.01$), the expressions of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 mRNA and protein were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in model group compared with normal group. Compared with model group, the expressions of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 mRNA and protein were decreased significantly ($P < 0.05$), and the levels of chemokines CXCL1, CXCL8 in rats BALF were decreased significantly ($P < 0.01$) in modified Erchentang. **Conclusion:** Modified Erchentang has an anti-inflammatory effect on COPD. The mechanism may be related to inhibiting the expressions of CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA and protein, and reducing the release of chemokines CXCL1, CXCL8.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); inflammatory; Erchentang; chemokines; receptor

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是以气流受限不完全可逆为特征的呼吸系统慢性炎症性疾病^[1]。因其高发病率、高发率、高致残率成为公共卫生问题而备受关注^[2]。COPD的主要病理基础是炎症^[3]。趋化因子及其受体促使炎细胞的趋化与激活,使炎细胞向炎区迁移,直接加重COPD的进程^[4]。近年发现,CXC趋化因子配体(CXCL1, CXCL8)与其受体CXCR1/2轴的信号转导在COPD的发生、发展中起重要作用^[5-6]。然而, CXCL8-CXCR1/2轴在COPD中的作用及中医药对其影响却少见报道。

本课题组基于COPD的病因病机,选用《太平惠民和剂局方》中的二陈汤,加减成二陈汤加味方,前期临床和实验研究发现二陈汤加味抑制氧化损伤,通过多种信号通路发挥抗炎作用,保护气道和肺的结构与功能^[7-9]。但其对COPD涉及CXCL8-CXCR1/2轴的抗炎机制的研究较少^[10]。本研究采用香烟熏联合脂多糖(LPS)方法,制备COPD大鼠模型,探讨二陈汤加味对CXCL8-CXCR1/2轴的作用靶点,为中医药治疗COPD提供抗炎的分子机制。

1 材料

1.1 动物 40只6月龄SD雄性大鼠, SPF级, 体重(230~280)g, 由河南省动物实验中心提供, 合格证号SCXK(豫)2012-0001。实验动物经河南省动物质量监督监测站检验质量合格(合格证号NO. 41003100001905), 本研究涉及的动物实验操作

均在河南中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号SYXY(豫)2015-0005。实验动物伦理经河南中医药大学实验动物伦理委员会审批(DWLL20130018)。

1.2 药物与试剂 二陈汤加味方药组成: 姜半夏10g, 陈皮10g, 蜜麻黄6g, 杏仁10g, 白术10g, 茯苓10g, 地龙10g, 葶苈子10g, 党参10g, 山药10g, 甘草片5g(均为华润三九医药的中药配方颗粒, 批号分别为1509001H, 1502001H, 1503125S, 1504002S, 1507001W, 1505002W, 1503001S, 1508001S, 1507007W, 1510007H, 1502001S); 急支糖浆(太极集团重庆涪陵制药有限公司, 国药准字Z50020615); LPS, RIPA组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为701C036, 20160928); 大鼠CXCL8酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国R&D公司, 批号446502); 大鼠CXCL1 ELISA试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司, 批号E20190309A); 总RNA提取试剂盒, cDNA反转录试剂盒, 苏木素染液(美国Sigma公司, 批号分别为086001, 0000123564, H9627); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒(日本Takara公司, 批号AKA403); 兔抗大鼠CXCL8单克隆抗体、兔抗大鼠CXCR1多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为A00423-1, ZP575BP75); 兔抗大鼠CXCR2单克隆抗体(美国Santa Cruz公司, 批号17095); 兔抗

大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国 Immuno Way公司,批号B4501);辣根过氧化物标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(北京 Trans Gen Biotech公司,批号K31105);DAB显色试剂盒(北京 Solarbio有限公司,批号20170628);ECL超敏发光液试剂盒(北京普利来基因技术有限公司,批号ZD310-6AC04D);伊红染液(国药集团药业股份有限公司,批号71014544);CXCL8, CXCR1, CXCR2, GAPDH的PCR引物由宝日生物技术(北京)有限公司合成,引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度/ bp
CXCL8	上游5'-TTTCAGAGACAGCAGAGCACACAA-3'	145
	下游5'-CACACAGAGCTGCAGAAATCAGG-3'	
CXCR1	上游5'-CTGTAAGAGGGTTCCAATG-3'	153
	下游5'-AGGTTTCAGCAGTAGACAT-3'	
CXCR2	上游5'-CCCCTCAGCGAACCTAGATA-3'	126
	下游5'-GAGCAGGTGCTTCGATTGTA-3'	
GAPDH	上游5'-GTAAGAAACCCTGGACCACC-3'	128
	下游5'-CTGGGATGGAATTGTGAGGG-3'	

1.3 仪器 Biofuge stratos型多用途4℃离心机(美国热电公司);Powerwave XS型全波长扫描酶标仪(美国BioTek公司);1575型全自动酶标洗板机(美国伯乐公司);StepOnePlus型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪及其检测软件(美国ABI仪器有限公司);EG1150型自动包埋机, RM 2265型全自动轮转切片仪(德国Leica公司);20486型显微摄像机(日本Olympus公司);其他仪器由河南中医药大学中医药科学院提供。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药 40只SD大鼠随机分为4组,分别为正常、模型、二陈汤加味和急支糖浆组。参照文献[11-12]及本课题组前期研究^[13],以香烟烟熏联合LPS诱导COPD大鼠模型,于造模的第1天和第14天,正常组经气管注入生理盐水200 μL,其他各组经气管注入LPS200 μL(LPS按1 g·L⁻¹溶于生理盐水中)。正常组不做烟熏,第2~30天,第14天除外,其他各组大鼠于熏箱内进行香烟烟熏,8支烟/次,30 min/次,2次/d。以肺功能、肺组织病理学改变作为判定造模成功的依据。造模成功后给药,前期研究发现二陈汤加味10 g·kg⁻¹剂量的效果最

好^[13],故本文以二陈汤加味10 g·kg⁻¹灌胃(ig),急支糖浆组以10 mg·kg⁻¹剂量ig,正常及模型组ig同体积的生理盐水。以上各组均连续干预14 d。

2.2 ELISA法检测大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中CXCL1和CXCL8含量 BALF的制备:腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,用消毒手术器械迅速打开腹腔。腹主动脉取血及放血后,迅速沿腹部切口向上打开胸腔,充分暴露气管,摘取气管及完整肺脏,用止血钳夹右主支气管,并剪下右侧支气管和肺。用无菌套管针头连接注射器,抽取2 mL生理盐水经气管注入左肺,并迅速轻柔按摩30 s后将液体回抽,快速打入已标记的无菌离心管中,以上述方法操作3次,收集BALF。将离心管中的BALF进行2 000 r·min⁻¹,4℃,离心10 min,取上清液置于高压蒸汽灭菌的离心管,-80℃冰箱储存。采用双抗体夹心法ELISA检测BALF中CXCL1和CXCL8的含量。实验步骤严格按试剂盒说明书进行操作。反应终止后,立即用酶标仪在450 nm波长处测定每孔的吸光度A,通过标准曲线,计算大鼠BALF中CXCL1和CXCL8的含量。

2.3 Real-time PCR法检测大鼠肺组织匀浆中CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA的表达 按照总RNA提取试剂盒说明书,取大鼠右侧肺组织50 mg从中提取总RNA,采用紫外分光光度计260,280 nm处测定A,根据A₂₆₀/A₂₈₀值,计算RNA纯度和浓度。按逆转录试剂盒说明书配制cDNA合成所需反应液,反应条件为25℃5 min,42℃40 min,85℃5 min,4℃10 min,在普通PCR仪中进行cDNA合成反应。按Real-time PCR试剂盒说明配制反应体系,Real-time PCR仪进行扩增。每个cDNA样本分别配制两种反应体系,一种加目的基因特异性扩增引物;另一种加GAPDH特异性扩增引物。反应条件为95℃预变性10 min,95℃变性30 s,60℃退火、延伸1 min,重复40个循环。取得扩增曲线、溶解曲线。用软件分析CXCL8, CXCR1, CXCR2和GAPDH基因的扩增曲线,得到各孔C_t值。以同样样本中的GAPDH的C_t值作为内参,采用2^{-ΔΔC_t}计算目的基因相对表达量。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肺组织中匀浆中CXCL8, CXCR1, CXCR2蛋白的表达 取右侧肺组织50 mg,采用RIPA裂解液提取蛋白质,用BCA法检测样品蛋白质浓度,4×SDS上样缓冲液与100 μg蛋白质按比例混合混合,煮沸5 min后,用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,电泳条件为

浓缩胶 80 V, 30 min, 分离胶 120 V, 1 h; 用甲醇活化的 PVDF 进行转膜, 转膜条件为 120 V, 1.5 h, 转膜结束后, 37 °C 5% BSA 封闭 2 h; 按说明书用封闭液稀释一抗 (1:1 000), 加入稀释的兔抗大鼠 CXCL8, CXCR1, CXCR2 一抗, 4 °C 孵育过夜; 洗膜后加入稀释后的二抗, 用封闭液稀释羊抗兔 IgG 二抗 (1:2 000), 37 °C 轻摇室温孵育 2 h; 洗膜后, 用 ECL 发光试剂盒发光显影。凝胶成像分析系统扫描, 测定各目的条带及内参的灰度值, 计算比值求得目的蛋白的相对表达含量。

2.5 取材与常规病理标本制备 取余下的新鲜右肺组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片厚 5~6 μm, 用于苏木素-伊红(HE)染色和免疫组化检测。

2.6 免疫组化检测 CXCL8, CXCR1, CXCR2 在肺组织中的定位表达 烤片, 常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 阻断过氧化物酶, 微波热修复抗原, 加兔抗大鼠一抗, 4 °C 过夜, 加生物素化山羊抗兔 IgG, 加 SABC 工作液, DAB 显色, 苏木素复染, 冲洗、烤干、封片。阴性对照以 PBS 代替一抗, 以已知阳性片作阳性对照。以棕黄色颗粒为阳性表达, 采用显微图像分析系统, 每张切片选取 10 个不重叠高倍 (×400) 视野, 计算每张切片阳性着色积分吸光度 IA 的平均值。

2.7 HE 染色观察大鼠肺组织结构的变化 取肺组织切片, 行 HE 染色, 中性树胶封片后, 光学显微镜下进行组织病理学观察。

2.8 统计学处理 数据采用统计软件 SPSS 18.0 处理, 定量资料采用 $\bar{x} \pm s$, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状况 实验结束时, 正常组无死亡, 体质量增加, 毛白光亮, 鼻腔无分泌物流出; 模型组死亡 2 只, 存活大鼠体质量减轻, 毛色暗黄, 有的大鼠咳、喘, 有的伴有呼吸哮鸣音, 有的鼻腔有脓性分泌物等呼吸系统症状; 二陈汤加味组死亡 2 只, 急支糖浆组死亡 1 只, 二陈汤加味组和急支糖浆组存活大鼠的体质量增加, 毛色光亮, 咳、喘等呼吸系统症状明显减轻。

3.2 对 COPD 大鼠 BALF 中 CXCL1 和 CXCL8 含量的影响 与正常组比较, 模型组 CXCL1 和 CXCL8 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二陈汤加味组显著降低 CXCL1 和 CXCL8 含量 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 COPD 大鼠肺组织中 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠 BALF 中 CXCL1 和 CXCL8 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of modified Erchentang on BALF levels of CXCL1 and CXCL8 in COPD rats ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL1	CXCL8
正常	10	-	42.47±2.71	58.22±4.32
模型	8	-	154.68±5.24 ²⁾	138.17±2.84 ²⁾
二陈汤加味	8	10	73.31±3.78 ⁴⁾	81.55±5.16 ⁴⁾
急支糖浆	9	10	86.72±4.25 ⁴⁾	75.34±3.71 ⁴⁾

注: 与正常组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~5 同)。

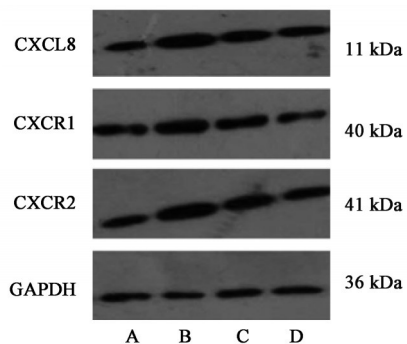
组肺组织 CXCL8 显著升高 ($P < 0.01$), CXCR1, CXCR2 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 二陈汤加味组均明显降低 CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 二陈汤加味对大鼠肺组织中 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of modified Erchentang on expression of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 mRNA in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8	CXCR1	CXCR2
正常	-	3.87±0.45	4.58±0.55	3.64±0.18
模型	-	8.67±0.22 ²⁾	8.98±0.35 ¹⁾	7.03±0.34 ¹⁾
二陈汤加味	10	5.34±0.22 ³⁾	5.76±0.17 ³⁾	3.29±0.15 ³⁾
急支糖浆	10	4.31±0.13 ³⁾	4.43±0.26 ³⁾	4.15±0.33 ³⁾

3.4 对 COPD 大鼠肺组织中 CXCL8, CXCR1, CXCR2 蛋白表达水平的影响 与正常组比较, 模型组肺组织 CXCL8 显著升高 ($P < 0.01$), CXCR1, CXCR2 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 二陈汤加味组均显著降低 CXCL8, CXCR1, CXCR2 蛋白的表达量 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 4。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二陈汤加味组; D. 急支糖浆组 (图 2~5 同)

图 1 各组肺匀浆中 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 protein expression in lung homogenate of COPD rats

表 4 二陈汤加味对大鼠肺组织中 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of modified Erchentang on expression of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 protein levels in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8	CXCR1	CXCR2
正常	-	4.12±0.18	3.47±0.19	3.54±0.12
模型	-	8.55±0.16 ²⁾	7.92±0.23 ¹⁾	6.89±0.11 ¹⁾
二陈汤加味	10	4.51±0.13 ³⁾	4.46±0.11 ³⁾	4.02±0.15 ³⁾
急支糖浆	10	3.83±0.21 ³⁾	4.35±0.12 ³⁾	4.42±0.14 ³⁾

3.5 对 COPD 大鼠肺组织结构的影响 光镜下观察,正常组细支气管管腔、肺泡腔内未见渗出液、透明膜、纤维素及炎细胞,肺泡壁 I 型, II 型上皮细胞结构完整,排列整齐,肺泡间隔未见水肿、出血及炎细胞浸润及间质增厚,未见肺大泡。模型组细支气管及肺泡内可见渗出液、脱落的上皮细胞,有大量中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞浸润,肺间质明显增厚,炎细胞浸润明显,远端肺泡可见局部肺不张及周围肺大泡。与模型组比较,二陈汤加味组肺组织炎细胞浸润明显减少,部分肺间质的组织结构趋向正常,部分肺泡轻度扩张。见图 2。

3.6 对 COPD 大鼠肺组织中 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 蛋白定位表达的影响

3.6.1 对 CXCL8 在肺组织中定位表达的影响 CXCL8 阳性信号呈黄色,阳性表达于细支气管上皮细胞和平滑肌细胞、中性粒细胞、肺巨噬细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞的胞浆,见图 3。与正常组

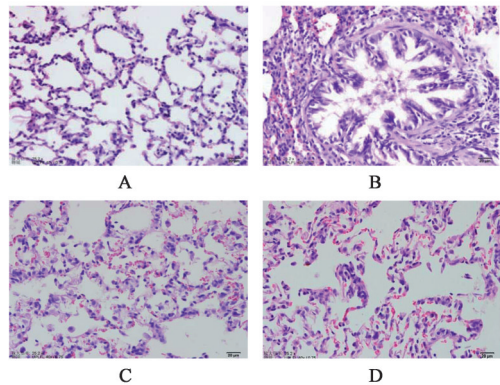


图 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织结构的影响(HE, ×400)

Fig. 2 Effect of modified Erchentang on lung tissue of COPD rats (HE, ×400)

比较,模型组大鼠肺组织中 CXCL8 蛋白的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味组显著降低 CXCL8 蛋白的表达($P<0.01$)。见表 5。

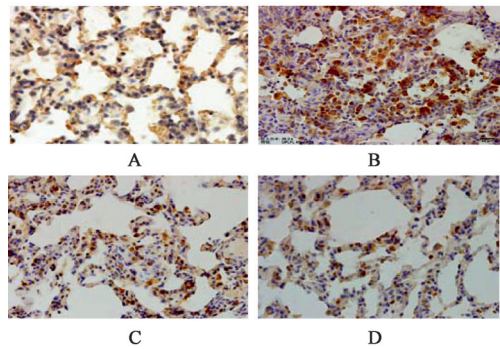


图 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 CXCL8 蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Erchentang on expression of CXCL8 protein in lung tissue of COPD rats(IHC, ×400)

表 5 二陈汤加味对大鼠肺组织 CXCL8, CXCR1 和 CXCR2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of modified Erchentang on expression of CXCL8, CXCR1 and CXCR2 protein in lung tissue of COPD rats($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CXCL8	CXCR1	CXCR2
正常	-	37.39±12.35	45.85±17.05	43.88±13.52
模型	-	88.32±16.25 ²⁾	96.12±15.11 ²⁾	85.47±16.17 ²⁾
二陈汤加味	10	62.31±13.11 ⁴⁾	56.86±14.13 ⁴⁾	55.55±11.64 ⁴⁾
急支糖浆	10	50.04±11.12 ⁴⁾	52.15±12.09 ⁴⁾	75.52±14.21 ³⁾

3.6.2 对 CXCR1 在肺组织中定位表达的影响 CXCR1 阳性显色呈黄色或棕色,阳性表达于中性粒细胞、肺巨噬细胞和肺泡 II 型上皮细胞的胞膜和胞浆,见图 4。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 CXCR1 蛋白的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味组显著降低 CXCR1 蛋白的表达($P<0.01$)。见表 5。

3.6.3 对 CXCR2 在肺组织中定位表达的影响

CXCR2 阳性呈黄色,阳性表达于肺巨噬细胞和肺泡 I 型, II 型上皮细胞的胞膜和胞浆,见图 5。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 CXCR2 蛋白的表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味组显著降低 CXCR2 蛋白的表达($P<0.01$)。见表 5。

4 讨论

COPD 属中医学“咳嗽”“肺胀”“喘证”等范畴。COPD 临床主要表现咳、痰、喘。传统中医认为,长

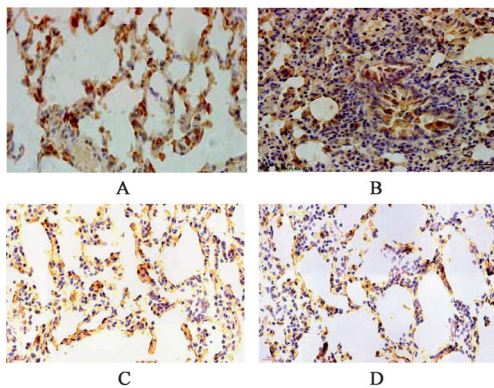


图4 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织CXCR1蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Erchentang on expression of CXCR1 protein in lung tissue of COPD rats(IHC, ×400)

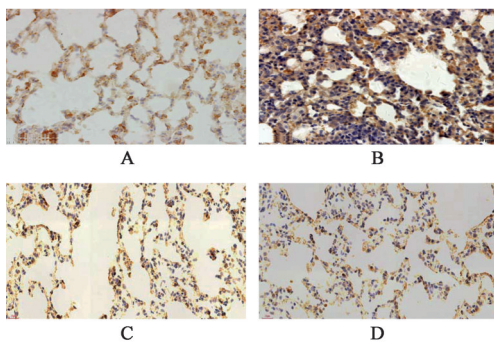


图5 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织CXCR2蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 5 Effect of modified Erchentang on expression of CXCR2 protein in lung tissue of COPD rats(IHC, ×400)

慢性肺系疾病反复迁延,久咳肺虚,宣降不足,肺气逆行向上,致咳、痰、宿痰着肺,肺失布津;脾气虚,水液运化减弱,聚湿成痰,痰湿阻肺。该病其表在肺,而本在脾、肾。基于痰湿阻肺病机,治疗以补肺健脾、化痰平喘为主。二陈汤加味方由二陈汤与四君子汤加减而成,方中麻黄、杏仁、陈皮宣降肺气,祛痰、止咳、平喘;姜半夏、葶苈子燥湿化痰;党参、白术补肺健脾;茯苓、山药、甘草片、地龙温肺健脾,益气活血、固肾化湿、逐瘀通络;甘草片和中健脾。诸药合用,补泄兼顾、祛痰逐水,共奏补肺健脾,宣肺降气、活血化瘀之功。前期研究发现其疗效稳定,通过多途径对COPD发挥抗炎作用^[7-10],但其作用的分子机制仍有待研究。急支糖浆由鱼腥草、金荞麦、麻黄、四季青、前胡、紫菀、枳壳、甘草片组成,该方药符合COPD的发病机制,方中金荞麦、鱼腥草为君药,化痰止咳,清降肺热。麻黄、四季青、前胡为臣药,宣肺平喘,化痰止咳,以增强君药止咳之力。紫菀、枳壳为佐药,理气祛痰。甘草片

为使药,调和诸药并止咳。诸药共奏清热化痰、宣肺止咳之功效。对COPD患者有良好的临床治疗效果^[14]。药理研究显示,急支糖浆有较强的抑菌、抗病毒、消炎、止咳化痰作用,且抗菌和消炎作用优于阿莫西林^[15]。临床常选用抗生素抗菌、用糖皮质激素抗炎。中药治疗COPD具有多途径、多靶点的优势,且疗效可靠、安全性高,受到越来越多临床医生和患者的重视。受此启发,为避免抗生素与激素的滥用,为选择替代药物提供依据,本研究侧重于二陈汤加味对参与COPD炎症过程中的趋化因子及其受体的研究,揭示二陈汤加味抗炎的分子机制。

COPD的主要病理机制是炎症,趋化因子及其受体直接参与肺部的炎症进程^[16]。趋化因子是由免疫或非免疫细胞分泌的、具有趋化作用的一类结构和功能相似的小分子蛋白质;趋化因子受体属G蛋白偶联受体。CXCR1, CXCR2是CXCR家族中的两个重要成员, CXCR1和CXCR2主要表达于中性粒细胞,单核细胞,肥大细胞, NK细胞,巨噬细胞,淋巴细胞等炎症细胞和上皮细胞、成纤维细胞等细胞表面^[17-18]。CXCR1和CXCR2可与配体CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8结合,形成复杂的网络系统^[19]。趋化因子信号通路为趋化因子配体-膜受体-G蛋白-效应蛋白-第二信使。趋化因子(第一信使)与靶细胞膜上的受体结合后,使CXCR1/2胞浆区构象发生改变, G蛋白与二磷酸鸟苷(GDP)解离,结合三磷酸鸟苷(GTP),激活效应蛋白腺苷酸环化酶(AC),磷酸二酯酶(PDE),磷脂酶C(PLC)和磷脂酶A₂(PLA₂)等,活化的效应蛋白提高第二信使环磷酸腺苷(cAMP),三磷酸肌醇(IP₃),二酰甘油(DG)及细胞内Ca²⁺浓度,激活钙调蛋白激酶,提升蛋白质磷酸化水平,使效应细胞发生附壁、定向迁移,脱颗粒分泌活性产物,进而参与炎症、血管形成、肿瘤转移等过程^[20]。

由肺泡上皮细胞、巨噬细胞释放的高水平趋化因子CXCL1, CXCL8等及其受体CXCR1/2在COPD炎症过程中起关键作用^[21-22]。然而, CXCL趋化因子配体CXCL1, CXCL8及其受体在COPD患者中的临床意义却知之甚少^[23]。由多种细胞产生的CXCL1和CXCL8与其受体CXCR1/2结合,调节下游信号通路,诱导、趋化并激活中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞发生迁移、活化和吞噬,诱发和加重COPD的炎症反应^[24]。研究证明LPS,细胞因子如白细胞介素1-β(IL-1β)等,

通过核转录因子(NF)- κ B和丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)p38可诱导中性粒细胞、巨噬细胞等产生CXCL1, CXCL8, CCL3, CCL4, IL-6, IL-10和肿瘤坏死因子- α (TNF- α),参与COPD的进展过程^[25]。香烟烟雾(CS)使气道上皮细胞分泌的CXCL8增加,诱导中性粒细胞和巨噬细胞,诱发气道炎症,反复发作的炎症导致的气流受限,促进COPD的发展^[26-28]。本实验以香烟烟雾联合LPS制备COPD大鼠模型,模拟患者因空气污染或吸烟、细菌感染因素诱发的COPD。结果显示,与正常组比较,模型组CXCL8, CXCR1, CXCR2 mRNA和蛋白表达均显著增强。与文献报道一致^[26-28],提示香烟烟雾, LPS诱导CXCL8, CXCR1和CXCR2基因的转录增强。本研究经Western blot和免疫组化检测,发现模型组CXCL8, CXCR1和CXCR2蛋白表达显著高于正常组,提示COPD模型中存在CXCL8, CXCR1和CXCR2基因翻译增强,可能是香烟烟雾, LPS通过诱导嗜中性粒细胞、单核细胞合成和释放CXCL8增加。本研究经ELISA检测支气管肺泡灌洗液,模型组支气管肺泡灌洗液中CXCL1, CXCL8含量显著高于正常组,与文献报道一致^[21,29],说明模型组CXCL1, CXCL8从炎症细胞分泌到胞外的量增加,使靶细胞趋化因子受体CXCR1和CXCR2因响应CXCL1, CXCL8而表达增强。CXCR1和CXCR2的共同配体是CXCL1, CXCL8,当过表达的CXCL1, CXCL8与其受体CXCR1和CXCR2特异性结合后,通过G蛋白偶联受体介导信号通路,诱导中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞等大量细胞趋化游走至感染部位,介导细胞在炎症部位的聚集、活化,引起炎症反应及肺组织损伤。本实验模型组细支气管及肺泡内中有渗出液和大量中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞浸润,肺泡间质明显增厚,间质中炎细胞浸润明显,募集至感染灶中的中性粒细胞、单核细胞因吞噬大量细菌脱颗粒,释放的多种水解酶,溶解、破坏周围肺组织^[30-32],合并局部肺不张及周围代偿性肺大泡,促进COPD的恶化进展^[33]。

趋化因子及其受体作为COPD新的治疗靶点,二陈汤加味可能通过阻断趋化因子信号转导,抑制炎症反应。CXCR1及CXCR2的拮抗剂能够有效抑制LPS诱导小鼠肺炎模型的炎性反应,降低死亡率^[34-35]。CXCR1/CXCR2的双重拮抗剂(SCH-527123),拮抗CXCL1和CXCL8,可逆性结合受体CXCR1和CXCR2,并具有饱和性,阻断CXCL1和

CXCL8与CXCR1/CXCR2结合,从而失去生物学活性。动物实验和临床观察显示, CXCR1/CXCR2的拮抗剂可减少血液及痰液中的中性粒细胞计数,抑制中性粒细胞释放CXCL8和过氧化物酶,未见严重不良反应^[36-37]。CXCR2拮抗剂(SB656933, SCH-527123)已被用于多种免疫疾病治疗(抑制CXCR2作用强,对CXCR1作用弱),选择性抑制CXCR2,减轻气道炎症,可有效抑制COPD的局部及全身炎症反应,为COPD治疗提供了新的思路^[38]。本研究发现,与模型组比较,二陈汤加味组CXCL8, CXCR1和CXCR2 mRNA和蛋白表达均显著降低,提示二陈汤加味可抑制CXCL8, CXCR1和CXCR2基因的表达。使肺组织中的巨噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞以及炎细胞趋化减少,以致肺匀浆中的CXCL1, CXCL8分泌与释放减少,从而减轻炎症反应。与模型组相比,二陈汤加味组肺组织炎细胞浸润减少,肺组织结构趋向正常,以此予以佐证。提示二陈汤加味可能通过抑制CXCL8-CXCR1/2轴而起到抗炎作用。

综上所述,二陈汤加味能有效抑制COPD炎症反应。其机制可能与其抑制CXCL8, CXCR1和CXCR2基因表达,下调趋化因子CXCL1, CXCL8的合成与分泌有关,从而致使炎细胞趋化被控制,进而延缓或阻滞COPD的炎症进程。

[参考文献]

- [1] ALVARADO-GONZALEZ A, ARCE I. Tiotropium bromide in chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma[J]. J Clin Med Res, 2015, 7(11): 831-839.
- [2] VLAHOS R, BOZINOVSKI S. Recent advances in preclinical mouse models of COPD[J]. Clin Sci, 2014, 126(4): 253-256.
- [3] 程艳慧, 何东初. COPD发病机制分子生物学的最新研究进展[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(2): 232-233.
- [4] HENROT P, PREVEL R, BERGER P, et al. Chemokines in COPD: from implication to therapeutic use[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): E2785.
- [5] PONCE-GALLEGOS MA, RAMÍREZ-VENEGAS A, FALFÁN-VALENCIA R. Th17 profile in COPD exacerbations[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 22(12): 1857-1865.
- [6] PAPLIŃSKA-GORYCA M, NEJMAN-GRYZ P, GÓRSKA K, et al. Expression of inflammatory mediators in induced sputum: comparative study in asthma and COPD [J]. Adv Exp Med Biol, 2018,

- 1040:101-112.
- [7] 尚立芝,季书,王国强,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠TLR4/MyD88/NF- κ B通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):65-72.
- [8] 尚立芝,季书,王国强,等.二陈汤加味通过抑制NLRP3通路对慢性阻塞性肺疾病的防治作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):56-64.
- [9] 徐莉莉,尚立芝,王博宇,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺病大鼠细支气管IL-19,IL-20R1,IL-20R2表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):41-47.
- [10] 尚立芝,季书,李耀洋,等.二陈汤加味对急性加重期COPD患者CXCL8及CXCR1/2蛋白表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(24):1-8.
- [11] MAHADEVA R, SHAPIRO S D. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animal models of pulmonary emphysema [J]. *Thorax*, 2002, 57 (10) : 908-914.
- [12] 宋小莲,王昌惠,白冲.脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比[J].第二军医大学学报,2010,31(3):246-249.
- [13] 尚立芝,季书,刘坦,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠Smad3,4,6,7基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(10):139-146.
- [14] 沃武杰.急支糖浆治疗慢性支气管炎疗效观察[J].新中医,2015,47(9):57-58.
- [15] 陈延军,郝东伟,杨立波.急支糖浆或抗生素治疗单纯急性气管-支气管炎的随机对照临床研究[J].中药药理与临床,2015,31(1):262-264
- [16] KAUR M, SINGH D. Neutrophil chemotaxis caused by chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages: the role of CXCL8 and the receptors CXCR1/CXCR2[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 347 (1):173-180.
- [17] PEVERI P, WALZ A, DEWALD B, et al. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes [J]. *J Exp Med*, 1988, 167 (5):1547-1559.
- [18] HOLMES W E, LEE J, KUANG W J, et al. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor[J]. *J Immunol*, 2009, 183(5):2895-2897.
- [19] WANG J P, HU W M, WANG K S, et al. Expression of C-X-C chemokine receptor types 1/2 in patients with gastric carcinoma: clinicopathological correlations and significance [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5 (2):574-582.
- [20] STILLIE R, FAROOQ S M, GORDON J R, et al. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86 (3):529-543.
- [21] BELCHAMBER K B R, DONNELLY L E. Macrophage dysfunction in respiratory disease [J]. *Results Probl Cell Differ*, 2017, 62:299-313.
- [22] VACCHINI A, MORTIER A, PROOST P, et al. Differential effects of posttranslational modifications of CXCL8/interleukin-8 on CXCR1 and CXCR2 internalization and signaling properties [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi: 10.3390/ijms19123768.
- [23] INUI T, WATANABE M, NAKAMOTO K, et al. Bronchial epithelial cells produce CXCL1 in response to LPS and TNF α : A potential role in the pathogenesis of COPD [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(7):323-331.
- [24] PLANAGUMÀ A, DOMÈNECH T, PONT M. Combined anti CXC receptors 1 and 2 therapy is a promising anti-inflammatory treatment for respiratory diseases by reducing neutrophil migration and activation [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2015, 34(10) : 37-45.
- [25] RIMINGTON T L, HODGE E, BILLINGTON C K, et al. Defining the inflammatory signature of human lung explant tissue in the presence and absence of glucocorticoid [J]. *F1000Res*, 2017, doi: 10.12688/f1000research.10961.1.
- [26] POUWELS S D, HESSE L, FAIZ A, et al. Susceptibility for cigarette smoke-induced DAMP release and DAMP-induced inflammation in COPD [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311 (5):L881-L892.
- [27] KIM V, CORNWELL W D, OROS M, et al. Plasma Chemokine signature correlates with lung goblet cell hyperplasia in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease [J]. *BMC Pulm Med*, 2015, 11(1):2-10.
- [28] NICHOLSON G C, TENNANT R C, CARPENTER D C, et al. A novel flow cytometric assay of human whole blood neutrophil and monocyte CD11b levels: upregulation by chemokines is related to receptor expression, comparison with neutrophil shape change, and effects of a chemokine receptor (CXCR2) antagonist [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2007, 20(1):52-59.
- [29] HUANG Z W, LIEN G S, LIN C H, et al. p300 and C/EBP β -regulated IKK β expression are involved in thrombin-induced IL-8/CXCL8 expression in human lung epithelial cells [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 121(1) : 33-41.
- [30] 徐绍娟,胡爱民.细菌性肺炎患者IL-6及IL-8及C反

- 应蛋白的测定及其意义[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(6): 702-703.
- [31] MARCH T H, BARR E B, FINCH G L, et al. Effects of concurrent ozone exposure on the pathogenesis of cigarette smoke induced emphysema in B6C3F1 mice [J]. *Inhal Toxicol*, 2002, 14(12): 1187-1213.
- [32] CRUL T, SPRUIT M A. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Eur J Clin Invest*, 2007, 11(37): 897-904.
- [33] LEE H J, SONG I C, YUN H J, et al. CXCL chemokines and chemokine receptors in gastric cancer: from basic findings towards therapeutic targeting [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1681-1693.
- [34] KADOWAKI M, YAMADA H, SATO K, et al. Extracellular acidification-induced CXCL8 production through a proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells: a response inhibited by dexamethasone [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2019, doi: 10.1186/s12950-019-0207-1.
- [35] HA H, DEBNATH B, NEAMATI N. Role of the CXCL8-CXCR1/2 axis in cancer and inflammatory diseases [J]. *Theranostics*, 2017, 7(6): 1543-1588.
- [36] AUL R, PATEL S, SUMMERHILL S, et al. LPS challenge in healthy subjects: an investigation of neutrophil chemotaxis mechanisms involving CXCR1 and CXCR2 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(3): 225-231.
- [37] NAIR P, GAGA M, ZERVAS E, et al. Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial [J]. *Clin Exp Allergy*, 2012, 42(7): 1097-1103.
- [38] LAZAAR A L, SWEENEY L E, MACDONALD A J, et al. SB-656933, a novel CXCR2 selective antagonist, inhibits *ex vivo* neutrophil activation and ozone-induced airway inflammation in humans [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2011, 72(2): 282-293.

[责任编辑 周冰冰]