

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

尚立芝, 季书, 王国强*, 陈晓辉, 王红伟*, 石龙涛, 张光远, 李耀洋, 徐莉莉
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:** 观测二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠外周血单个核细胞(PBMCs)中 Nod 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)炎症小体相关基因表达的影响,探讨二陈汤加味对 COPD 抗炎的分子机制。**方法:** 采用脂多糖(LPS)联合香烟烟雾方法制备 COPD 大鼠模型。40 只大鼠随机平均分为正常组,模型组,二陈汤加味组,MCC950(NLRP3 抑制剂)组。造模期间(从实验第 1~30 天),MCC950 组于实验第 1 天单次腹腔注射 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;二陈汤加味组以 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃,1 次/2 d。造模成功后,从实验第 31~45 天,MCC950 组腹腔注射 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,1 次/2 d;二陈汤加味组以 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃,2 次/d;正常组、模型组灌胃生理盐水 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定大鼠肺组织匀浆中白细胞介素-1 β (IL-1 β),白细胞介素-18(IL-18)和趋化因子 8(CXCL8)含量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测大鼠外周血 PBMCs 中 NLRP3,凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)mRNA 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PBMCs 中 NLRP3,ASC,Caspase-1 蛋白表达;光镜观察肺组织结构变化,免疫组化检测 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 在肺组织中的定位表达。**结果:** 与正常组比较,模型组大鼠肺组织匀浆中 IL-1 β ,IL-18 和 CXCL8 含量均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);PBMCs 中 NLRP3,ASC,Caspase-1 mRNA 及蛋白表达水平均明显增高($P < 0.01$);与模型组比较,二陈汤加味组 PBMCs 中 NLRP3,ASC,Caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),肺匀浆中 IL-1 β ,IL-18 和 CXCL8 含量均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),肺组织结构明显改善。**结论:** 二陈汤加味对 COPD 有抗炎作用。其机制可能与抑制 PBMCs 中 NLRP3,ASC,Caspase-1 mRNA 表达,减少 IL-1 β ,IL-18 和 CXCL8 的释放有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;二陈汤;Nod 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)炎症小体;白细胞介素-1 β (IL-1 β);白细胞介素-18(IL-18)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0056-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192204

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190802.1103.005.html>

[网络出版时间] 2019-08-02 13:15

Effect of Modified Erchentang on NLRP3 Inflammasome Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

SHANG Li-zhi, JI Shu, WANG Guo-qiang*, CHEN Xiao-hui, WANG Hong-wei*, SHI Long-tao,
ZHANG Guang-yuan, LI Yao-yang, XU Li-li
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Erchentang on the expressions of NLRP3

[收稿日期] 20190531(009)

[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);河南省科重点科技攻关项目(152102310337);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,Tel:0371-86253082,E-mail:lzshang2014@163.com

[通信作者] *王国强,博士,助理研究员,从事中医药对免疫性疾病作用机制研究,Tel:0371-86253082,E-mail:biowgq@126.com;

*王红伟,副教授,从事中医药治疗肺系疾病临床研究,E-mail:156119506@qq.com

inflammasome genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) and chemokine8 (CXCL8) in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in order to explore the molecular mechanism of modified Erchentang against inflammation of COPD. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into normal control group, model group, MCC950 (NLRP3 inhibitor) group and modified Erchentang group. The COPD model of rats was prepared by using cigarette smoke and dripping with lipopolysaccharide (LPS). During the modeling period (from the 1st to the 30th day), the MCC950 group received a single intraperitoneal injection with 60 mg·kg⁻¹ on the first day of the experiment, and the modified Erchentang group was given intragastric administration with 10 g·kg⁻¹, once every 2 days. From the 31st to the 45th day, the MCC950 group was intraperitoneally injected with 3 mg·kg⁻¹, once every 2 days, the modified Erchentang group was given intragastric administration with 10 g·kg⁻¹, twice a day, and the normal group and the model group received normal saline (NS) with 10 g·kg⁻¹, twice a day. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18) and chemokine8 (CXCL8) in rats lung tissue homogenate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein (ASC) and cysteinyl aspartate specific proteinase-1 (Caspase-1) mRNA in PBMCs were measured by Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR). Western blot was used to detect the levels of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins in PBMCs. Immunohistochemical (IHC) method was used to detect the expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins in lung tissues. **Result:** The expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 mRNA and protein were increased significantly ($P < 0.01$) in model group compared with normal group. Compared with model group, the expressions of NLRP3, ASC and Caspase-1 mRNA and protein were decreased significantly in PBMCs ($P < 0.05$, $P < 0.01$) of modified Erchentang group. The levels of IL-18, IL-1 β and CXCL8 in lung tissue homogenate in model group were significantly higher than those in the control group. However, compared with model group, the levels of IL-18, IL-1 β and CXCL8 were decreased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in modified Erchentang group. **Conclusion:** NLRP3 inflammasome is involved in the inflammatory response in COPD rats. Modified Erchentang may inhibit the inflammatory response of COPD effectively. The mechanism may be correlated with the reduction of NLRP3, ASC and Caspase-1 gene expressions, and the inhibition of the release of IL-18, IL-1 β and CXCL8.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Erchentang; Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome; interleukin-1 β (IL-1 β); interleukin-18 (IL-18)

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是以持续气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病中的常见病、多发病, 目前居疾病死因的第 4 位, 已引起全球高度关注^[1]。COPD 的病理基础是炎症, 反复复发的炎症变质与增生, 加重气道重塑, 使气流受限呈不可逆性进展, 继而合并肺气肿、肺源性心脏病。控制炎症是防治 COPD 发生与进展的主要策略之一。研究发现, Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体被认为是潜在的炎症标志物之一^[2]。NLRP3 炎症小体由 NLRP3, 凋亡相关点样蛋白 (ASC) 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1 (Caspase-1) 组成^[3-4], NLRP3 的激活参与多种炎症性疾病^[5-10], 促进 COPD 炎症的发生与发展^[11-12]。本课题组前期基于 COPD 痰湿阻肺、肺失宣降, 伤及脾肾的病机; 取《太平惠民和剂局方》(宋代) 中的二陈汤和四君子汤的燥湿化痰、健脾和中、

行气化滞之功效, 加减而成二陈汤加味方。临床和实验研究发现, 二陈汤加味对 COPD 肺功能的改善和组织结构的保护有显著疗效^[13-18]。其机制可能通过干预转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 通路抑制肺结构重建; 通过减少细胞因子的合成与释放而对抗炎症反应。但其抗炎机制不清, 尤其能否通过抑制 NLRP3 的活化而阻止炎症的发生与发展, 有待深入研究。本实验于造模的第 1 天对二陈汤加味组和 NLRP3 抑制剂组分别给予二陈汤加味和 MCC950, 以求证二陈汤加味能否通过抑制 NLRP3 通路的活化而预防炎症的发生; 成模后给药, 旨在证实 COPD 炎症发生后二陈汤加味能否通过阻断 NLRP3 通路的循环激活而发挥治疗作用, 以期揭示二陈汤加味通过抑制 NLRP3 通路对 COPD 的防治作用及其抗炎机制。

1 材料

1.1 动物 40 只 SD 雄性健康大鼠, SPF 级, 6 月龄, 体质量 (230 ~ 280) g, 购自河南省动物实验中心, 合格证号 SCXK(豫)2010-0001。实验动物质量合格证 41003100001905, 模型制备在河南中医药大学科研实验中心与实验动物中心, 许可证号 SYXY(豫)2015-0005, 经河南中医药大学实验动物伦理委员会审批, 实验动物伦理批号 DWLL20150018。

1.2 药物与试剂 二陈汤加味方药组成: 姜半夏 10 g, 陈皮 10 g, 蜜麻黄 6 g, 苦杏仁 10 g, 葶苈子 10 g, 党参 10 g, 白术 10 g, 地龙 10 g, 茯苓 10 g, 山药 10 g, 甘草片 5 g 均为中药配方颗粒, 由华润三九医药股份有限公司生产, 批号分别为 1503001S, 1502001H, 1509001S, 1504002S, 1508001S, 1507007W, 1507001W, 1503001S, 1505002W, 1510007H, 1502001S。MCC950, NLRP3 抑制剂(北京百奥莱博科技有限公司, 批号 03317); 红旗渠香烟(河南安阳卷烟厂, 烤烟型, 每支焦油量 14 mg, 烟碱量 1.1 mg, 一氧化碳量 14 mg); 脂多糖(LPS), 大鼠外周血单个核细胞分离液试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 701C036, 20160925); 白细胞介素-18(IL-18)大鼠酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉华美生物技术有限公司, 批号 CSB-EO4610r); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)大鼠 ELISA 试剂盒(上海恒远生物有限公司, 批号 20171335); 趋化因子 8(CXCL8)大鼠 ELISA 试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司, 批号 E20190301A); 总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司, 批号 DP419]; 反转录试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司, 批号 RR037A]; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司, 批号 RR037A]; 兔抗大鼠 NLRP3(美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-7302); 兔抗大鼠 ASC(美国 Abcam 公司, 批号 ab175450); 兔抗大鼠 Caspase-1 抗体(美国 Bioworld 公司, 批号 CJ44121); 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 G8795); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Abnova 公司, 批号 301005); RIPA 裂解液, BCA 蛋白定量试剂盒, 超敏 ECL 发光剂, 彩色预染蛋白质相对分子质量 Maker(上海威奥生物科技有限公司, 批号分别为 WB0101, WB0125, WB2164, WB0173); 苏木素染液(美国 Sigma 公司, 批号 H9627); 伊红染液(国药集团化学试剂有限公司, 批号 71014544); Real-time

PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司[引物序列及扩增长度见表 1, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参]。

表 1 PCR 引物序列

Table1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度 /bp
NLRP3	上游 5'-CATGAGTGCTGCTTCGACAT-3'	143
	下游 5'-GCTTCAGTCCCACACACAGA-3'	
Caspase-1	上游 5'-ATCGCTTCTGCTCTTCCAC-3'	134
	下游 5'-TCCTCCACATCACAGGAACA-3'	
ASC	上游 5'-CTCTGTATGGCAATGTGCTGAC-3'	342
	下游 5'-GAAACAAGTCTTTCGAGGTCA-3'	
GAPDH	上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'	116
	下游 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'	

1.3 仪器 TopScan 型小动物肺功能测量系统(吉安德尔科技有限公司); DU640 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司); Powerwave XS 型波长扫描酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); 1575 型全自动酶标洗板机(美国伯乐公司); 272007028 型 Real-time PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); TP1020 型全自动组织处理机, EG1150 ST5020 型自动包埋机, RM 2265 型全自动轮转切片机, EM UC7 型超薄切片机, HI1220 型烘片机(德国 Leica 公司); 20486 型显微摄影仪, BX61 + CCD 型病理图像分析系统(日本 Olympus 公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳槽及转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组、模型制备与给药 大鼠随机分为正常组, 模型组, MCC950 组, 二陈汤加味组, 每组 10 只。参照文献[19-20]香烟烟雾联合 LPS 诱导 COPD 大鼠模型, 在造模第 1, 14 天, 正常组以外的动物均经气管注入 LPS 200 μ L(溶于生理盐水 1 g \cdot L⁻¹), 除第 14 天外, 第 2 ~ 30 天将大鼠置入熏箱(50 \times 50 \times 40 cm³)内进行香烟烟雾染毒, 2 次/d, 30 min/次, 香烟 8 支/次。

2.2 给药 造模期间(第 1 ~ 30 天), MCC950 组于实验第 1 天单次腹腔注射 60 mg \cdot kg⁻¹; 二陈汤加味组以 10 g \cdot kg⁻¹灌胃(ig), 1 次/2 d; 正常和模型组不处理。从第 31 ~ 45 天, MCC950 组腹腔注射 MCC950 (3 mg \cdot kg⁻¹), 1 次/2 d^[21-22]; 因前期动物实验证实二陈汤加味以 10 g \cdot kg⁻¹剂量的效果最佳^[23-24], 故二陈

汤加味组以 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 $ig, 2 \text{ 次}/\text{d}$; 正常组、模型组 ig 生理盐水 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}, 2 \text{ 次}/\text{d}$ 。

2.3 指标观测

2.3.1 大鼠一般状态 包括体质量、毛发光泽、呼吸、口鼻分泌物、活动度等。

2.3.2 外周血单个核细胞(PBMCs)的分离 用大鼠外周血单个核细胞分离液(按说明书进行)分离出 PBMCs。采集腹主动脉血于抗凝管,离心后动脉血沉淀物 1 mL 与等量生理盐水充分混合,缓慢滴加于淋巴细胞分离液面上。 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 。离心后管内分为 3 层,上层为血浆和生理盐水,下层主要为红细胞和粒细胞,中间层为淋巴细胞分离液,在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带,将毛细吸管插入到乳白色云雾层,吸取单个核细胞,转到另一无菌 15 mL 离心管中,加入 5 倍以上体积的生理盐水, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,洗涤细胞 2 次。将 PBMCs 分成 2 等份,一份用于 RNA 提取,另一份用于蛋白提取,均 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

2.3.3 ELISA 检测肺组织匀浆中 IL-1 β , IL-18 和 CXCL8 含量 制备肺组织匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 10 \text{ min}$,取上清。采用双抗体夹心法 ELISA 检测 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 的浓度,严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作进行。用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔的吸光度 A ,通过标准曲线,计算大鼠肺匀浆中 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量。

2.3.4 Real-time PCR 检测 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达 提取总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的浓度与纯度值。取 mRNA $2 \text{ }\mu\text{L}$ 按逆转录试剂盒说明书配制 cDNA 合成所需反应液,普通 PCR 仪中合成 cDNA;反应条件为 $25 \text{ }^\circ\text{C} \ 5 \text{ min}$, $42 \text{ }^\circ\text{C} \ 30 \text{ min}$, $85 \text{ }^\circ\text{C} \ 5 \text{ min}$, $4 \text{ }^\circ\text{C} \ 10 \text{ min}$ 。按说明书配制定量反应体系,混匀、离心,于 Real-time PCR 仪进行扩增。两步法程序反应,反应体系 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s , $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s , $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火延伸 30 s ,共 40 循环。扩增结束,获取扩增曲线、熔解曲线及 C_t 值。采用仪器自带软件进行数据和熔解曲线分析,计算各实验组 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值,求得各样本目的基因相对于 GAPDH mRNA 表达量。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白的表达 分离的 PBMC 中加入 RIPA 细胞裂解液(冰上操作),超声破碎仪匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $1 \text{ 万} \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,BCA 法检测蛋白浓度,计算出所需的蛋白量。提取蛋白按

比例加蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min 后,进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。根据蛋白 Marker 显示蛋白充分分离后,将蛋白电转移至 PVDF 膜,置于含 5% 脱脂奶粉的封闭液中,室温封闭 2 h 。TBST 洗膜 5 min ,洗 3 次。加入相对应的兔抗大鼠 NLR3P 一抗($1:500$),兔抗大鼠 Caspase-1 一抗($1:500$),兔抗大鼠 ASC 一抗($1:250$),兔抗大鼠 GAPDH 一抗($1:1\ 000$), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min ,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔($1:5\ 000$)二抗,室温孵育 2 h ,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min ,ECL 曝光显像,分析灰度值。

2.4 肺组织取材与病理常规标本制备 腹主动脉取血后,立即开胸,所有大鼠均取新鲜右肺下叶肺组织, 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,以乙醇梯度脱水、二甲苯梯度透明,常规石蜡包埋,连续冠状切片厚约 $5 \sim 6 \text{ }\mu\text{m}$,烤片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织结构变化。

2.5 免疫组化法(IHC)检测 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白的定位表达 按说明书操作进行, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤片,石蜡切片常规脱蜡至水化, $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 阻断内源性过氧化物酶;微波加热修复抗原,滴加兔抗大鼠 NLRP3, ASC, Caspase-1 一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱过夜, PBS 冲洗 3 次;加生物素化山羊抗兔 IgG, PBS 冲洗 3 次;滴加 SABC 试剂, PBS 冲洗 2 次;DAB 染色,苏木素复染;流水冲洗,封片。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以已知阳性肺组织切片作阳性对照。以棕黄色颗粒为阳性表达,用 20486 型显微摄影仪观察与拍照。采用 BX61 + CCD 型病理图像分析系统,每张切片选取 10 个高倍视野,计算每张切片阳性着色积分吸光度 IA 的平均值。

2.6 统计学处理 采用统计软件 SPSS 18.0 处理数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,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,一般状况好,体质量增长,无死亡。模型组和二陈汤加味组各死亡 2 只,体质量较造模前下降。MCC950 组体质量增加,死亡 1 只。

3.2 对 COPD 大鼠肺组织 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量的影响 与正常组比较,模型组肺匀浆 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量明显增加($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较, MCC950 和二陈汤加味组 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量明显减少($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-18	CXCL8
正常	10	-	65.24 ± 26.48	50.78 ± 4.67	68.96 ± 3.27
模型	8	-	232.48 ± 35.17 ²⁾	125.41 ± 7.52 ²⁾	121.56 ± 8.51 ¹⁾
二陈汤加味	8	10	281.81 ± 21.22 ⁴⁾	82.75 ± 5.43 ⁴⁾	96.47 ± 4.22 ³⁾
MCC950	9	0.06	165.62 ± 25.69 ⁴⁾	64.89 ± 5.37 ⁴⁾	73.24 ± 6.27 ³⁾

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)。

3.3 对 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达的影响

3.3.1 对 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达的影响

表 3 二陈汤加味对 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常	-	1.79 ± 0.06	0.57 ± 0.05	1.74 ± 0.05
模型	-	5.81 ± 0.19 ²⁾	3.31 ± 0.13 ²⁾	4.21 ± 0.14 ²⁾
二陈汤加味	10	3.01 ± 0.13 ⁴⁾	2.33 ± 0.71 ³⁾	2.09 ± 0.09 ⁴⁾
MCC950	0.001	2.37 ± 0.12 ⁴⁾	1.93 ± 0.06 ³⁾	2.47 ± 0.13 ³⁾

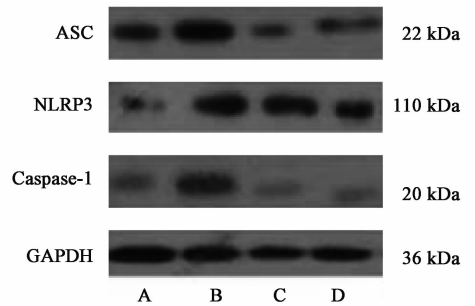
3.3.2 对 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组 PBMCs 中 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1,表 4。

3.4 对 COPD 大鼠肺组织病理变化的影响

光镜下观察,正常组肺组织结构完整,各级细支气管及肺泡腔内无渗出物及异物,小气道上皮及肺泡 I 型, II 型上皮细胞无脱落,肺泡间隔均匀,无炎细胞浸润及纤维化,未见肺大泡。模型组可见细支气管腔内有

NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组 NLRP3, ASC, Caspase-1 mRNA 的表达水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。



A. 正常组;B. 模型组;C. MCC950;D. 二陈汤加味(图 2~5 同)

图 1 各组大鼠 PBMCs 中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达
Fig. 1 Expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 protein in PBMCs of each group rats

表 4 二陈汤加味对大鼠外周血单个核细胞中 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	Caspase-1/GAPDH
正常	-	0.15 ± 0.04	0.53 ± 0.06	0.23 ± 0.08
模型	-	1.27 ± 0.10 ²⁾	1.35 ± 0.13 ²⁾	0.84 ± 0.10 ²⁾
二陈汤加味	10	0.86 ± 0.11 ³⁾	0.43 ± 0.15 ⁴⁾	0.26 ± 0.02 ⁴⁾
MCC950	0.001	1.09 ± 0.12 ³⁾	0.34 ± 0.08 ⁴⁾	0.24 ± 0.05 ⁴⁾

痰栓(渗出液、纤维素、炎细胞及脱落的上皮),小气道黏膜上皮、肺泡上皮有脱落,肺泡腔内可见纤维

素、中性粒细胞、淋巴细胞及巨噬细胞,肺泡间隔明显增厚,间质中由大量炎细胞浸润、成纤维细胞、

纤维细胞及细胞外基质增多。局部肺泡实变、受压萎陷明显,邻近肺大泡多见。与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组小气道及肺泡腔内仅少量渗出物,肺泡间隔明显变薄,炎细胞浸润明显减少,未见肺大泡。见图 2。

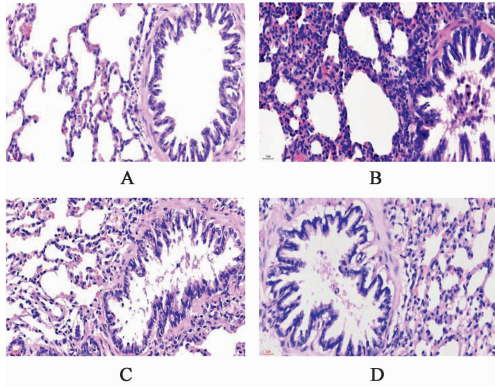


图 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织结构的影响(HE, ×400)
Fig.2 Effect of modified Erchentang on lung tissue of COPD rats (HE, ×400)

3.5 对 COPD 大鼠肺组织 NLRP3, ASC, Caspase-1 蛋白表达的影响

3.5.1 对 COPD 大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达的影响 NLRP3 蛋白阳性表达于肺组织中的肺泡 I 型上皮细胞、中性粒细胞、巨噬细胞的胞浆,呈黄色。见图 3。与正常组比较,模型组肺组织中 NLRP3 蛋白阳性表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组 NLRP3 蛋白阳性表达均明显降低($P < 0.05$)。见表 5。

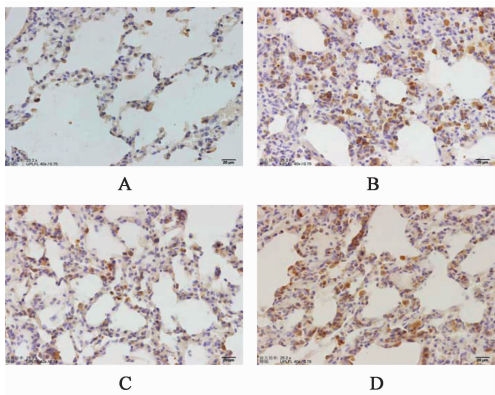


图 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 NLRP3 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)
Fig.3 Effect of modified Erchentang on expression of NLRP3 protein in lung tissue of COPD rats(IHC, ×400)

3.5.2 对 COPD 大鼠肺组织 ASC 蛋白表达的影响

ASC 阳性表达在肺巨噬细胞、淋巴细胞的胞核中呈棕黄色。见图 4。与正常组比较,模型组大鼠

肺组织中 ASC 蛋白的表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组中 ASC 蛋白的表达均明显减弱($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5。

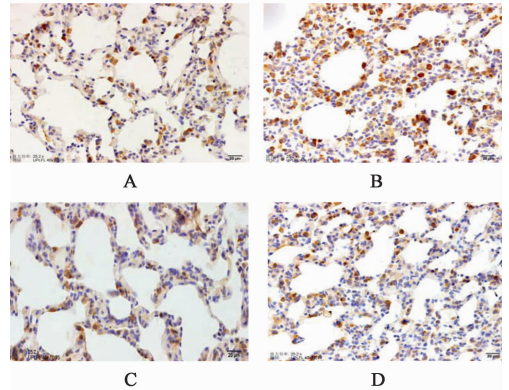


图 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 ASC 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

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

3.5.3 对 COPD 大鼠肺组织 Caspase-1 蛋白表达的影响

Caspase-1 蛋白阳性表达于肺巨噬细胞、中性粒细胞的胞浆,肺 II 型上皮细胞胞浆,呈棕黄色。见图 5。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 Caspase-1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,MCC950 和二陈汤加味组 Caspase-1 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$)。见表 5。

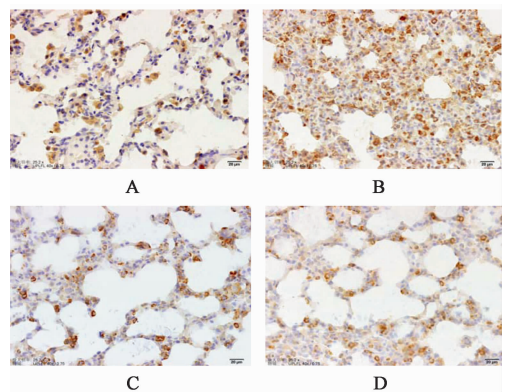


图 5 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 Caspase-1 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig.5 Effect of modified Erchentang on expression of Caspase-1 protein in lung tissue of COPD rats(IHC, ×400)

4 讨论

COPD 临床表现主要为咳嗽、咳痰,重者喘息。属中医“肺胀”“喘证”等范畴。中医认为,肺主皮毛司肃降,外邪伤肺;因 COPD 反复复发,久咳肺虚,肺失宣降,致肺气上逆而咳、喘,肺失布津,脾运化减弱,痰湿阻肺,水不化津,继之伤肾;因 COPD 反复

表 5 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 NLRP3,ASC,Caspase-1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of modified Erchentang on expression of NLRP3,ASC,Caspase-1 protein in lung tissue of COPD rats($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NLRP3	ASC	Caspase-1
正常	-	10.96 ± 2.13	20.25 ± 3.26	13.87 ± 1.25
模型	-	60.73 ± 3.17 ²⁾	60.64 ± 2.25 ²⁾	70.87 ± 1.17 ²⁾
二陈汤加味	10	31.95 ± 3.06 ³⁾	27.76 ± 2.17 ³⁾	20.25 ± 1.24 ⁴⁾
MCC950	0.06	35.88 ± 4.17 ³⁾	20.35 ± 1.41 ⁴⁾	16.05 ± 2.26 ⁴⁾

迁延,肺、脾、肾三脏相继受损。治宜补肺健脾,涤痰温肾、活血逐瘀。二陈汤出自《太平惠民和剂局方》,有燥湿化痰,理气和中之功,主治痰湿内阻,咳嗽痰多,脾胃不和,恶心呕吐,胸脘痞闷,头眩心悸。为提高疗效本课题组拟定二陈汤加味方,由姜半夏、陈皮、苦杏仁、蜜麻黄、白术、党参、山药、茯苓、葶苈子、干姜、地龙、甘草片等组成。其中姜半夏燥湿化痰;陈皮、杏仁、麻黄宣降肺气;白术、党参补肺健脾;山药、茯苓、葶苈子、地龙逐瘀通络、健脾渗湿;甘草和中健脾。全方补肺健脾、化痰平喘、祛痰逐湿,补泄兼顾。经多年临床研究证实,二陈汤加味能显著提高 COPD 患者的肺功能、改善肺组织结构^[17-18]。但目前其作用机制仍不清,限制了该复方的临床运用。

NLRP3 炎性小体的活化参与多种炎症性疾病^[25-30]。NLRP3 炎症小体由 NLRP3, Caspase-1, ASC 组成^[31]。研究显示,细胞未接受刺激时,ASC 位于胞核。内源性或外源性炎性刺激使 NLRP3 炎症小体过度活化,ASC 由胞核转位到胞浆,ASC 作为接头蛋白募集前体 Caspase-1 (pro-Caspase-1),被招募的 pro-Caspase-1 通过自切割、形成具有酶活性的 Caspase-1,激活形式的 Caspase-1 对 IL-1 β 前体 (pro-IL-1 β) 及 IL-18 前体 (pro-IL-18) 进行切割,产生成熟的、活性形式的 IL-1 β 和 IL-18 而分泌到胞外,发挥促炎效应^[32-34]。

炎性小体的过度活化促进 COPD 的发生与恶化^[35-37]。在炎症分子机制网络中,IL-1 β 和 IL-18 既是 NLRP3 炎症小体通路的下游分子,也是核转录因子 (NF)- κ B 通路的上游分子^[38]。炎症刺激信号可激活 NF- κ B 通路,上调 NLRP3 表达;而活化的 NLRP3 炎症小体可上调细胞因子的表达,高水平的细胞因子促进 NF- κ B 信号通路活化,活化的 NF- κ B 进入核内,启动下游基因的转录,合成并释放更多的细胞因子,如 IL-1 β , IL-6, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及 CXCL8 等炎症介质,如此形成恶性循环,循环促进炎细胞的渗出并向炎区趋化,释放炎症介质,启

动、加重炎症进程^[39]。经博来霉素干预的细胞中 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 mRNA 和蛋白表达均升高;地塞米松通过抑制 NLRP3 的激活而起到抗炎作用^[40]。目前 NLRP3 相关抑制剂,有 GSK314181A, AZ11645373 等多种,能抑制 NLRP3 的活化^[41]。IL-18 阻断剂 GSK1070806, IL-1 β 阻断剂卡纳单抗, Caspase-1 抑制剂欧昔菊等进入或即将进入临床试验^[7]。抑制 NLRP3 炎性小体的活化途径,是 COPD 新的治疗靶点^[8]。

LPS,香烟烟雾激活 NLRP3 通路诱发并促进 COPD 炎症过程。本研究采用 LPS 联合香烟烟雾方法制备 COPD 大鼠模型,结果显示,与正常组比较,模型组 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 mRNA 和蛋白表达均显著增强,模型组肺组织匀浆中 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量显著高于正常组,与文献报道一致^[35,37,42]。可能 LPS,香烟烟雾激活 NF- κ B,促进 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 合成与分泌^[43]。IL-1 β , IL-18 和 CXCL8 能够增强中性粒细胞、巨噬细胞的渗出及趋化作用^[44] 迁移至炎区中活化的中性粒细胞、巨噬细胞接受增多的 IL-1 β , IL-18 和 CXCL8 刺激,活化 NLRP3 通路,上调 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 基因的转录和翻译,高表达的 ASC 自胞核转入胞浆内增多,招募、激活 Caspase-1,将活性形式的 IL-1 β , IL-18 和 CXCL8 分泌到胞外^[45],提高气道和肺的中性粒细胞、巨噬细胞的浸润,发挥促炎效应^[32-34]。本实验结果显示,模型组肺组织结构明显的炎性渗出及增生,也予以佐证。

二陈汤加味通过抑制 NLRP3 对 COPD 有防治作用。MCC950 是 NLRP3 的抑制剂^[21-22],本研究从造模第 1 天,对 MCC950 组造模同时腹腔注射 MCC950,结果显示 MCC950 组 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 mRNA 和蛋白表达较模型组显著减弱,提示 MCC950 抑制 NLRP3,ASC 和 Caspase-1 基因表达。细胞因子 IL-18, IL-1 β 和趋化因子是炎性渗出及炎细胞趋化的物质基础,其合成与释放的前提需要 NLRP3 炎症小体的激活^[39]。本研究发现

MCC950 组肺组织匀浆中 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量显著低于模型组。提示 MCC950 通过抑制 NLRP3 的活性,限制 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 的合成与释放,对 COPD 炎症的发生有一定的预防作用。二陈汤加味组于造模第 1 天给予二陈汤加味干预,检测结果发现,二陈汤加味组 NLRP3, ASC 和 Caspase-1 mRNA 和蛋白表达较模型组均显著减弱,肺组织匀浆中 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 含量显著低于模型组,提示二陈汤加味可能通过抑制 NLRP3, 预防或减轻炎症的发生。造模后给予 MCC950, 利用 MCC950 抑制 NLRP3 活性,限制 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 的合成与释放,阻止炎症反应的循环加重,发挥其治疗作用。造模后继续给予二陈汤加味,与 MCC950 同理,提示二陈汤加味通过抑制 NLRP3 炎症小体相关分子,减少 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 后续的合成与释放,进而减少炎细胞渗出及其向炎区趋化,阻断炎症的恶性循环通路。免疫组化结果证实, NLRP3, ASC 和 Caspase-1 蛋白在肺内定位表达较模型组均显著减弱。肺组织结构从形态学角度佐证二陈汤加味组炎症渗出与增生较模型组明显减轻。提示二陈汤加味通过抑制 NLRP3 通路,发挥对 COPD 的治疗作用。

综上所述,二陈汤加味能有效抑制 COPD 中 NLRP3 介导的单个核细胞参与的炎症反应。其机制可能是通过抑制单个核细胞中 NLRP3 炎症小体相关基因表达及其活化,从而阻滞 IL-18, IL-1 β 和 CXCL8 的合成、成熟与分泌,阻止或减轻炎症的发生,并阻断炎症的恶性循环,发挥对 COPD 炎症的防治作用。

[参考文献]

[1] Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). updated 2016. <http://goldcopd.org/>. 1.

[2] Martinon F, Burns K, Tschoep J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL- β [J]. *Mol Cell*, 2002, 10(2):417-426.

[3] Howrylak J A, Nakahira K. Inflammasomes: key mediators of lung immunity [J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79(1):471-494.

[4] Shrivastava G, León-Juárez M, García-Cordero J, et al. Inflammasomes and its importance in viral infections [J]. *Immunol Res*, 2016, 64(5-6):1101-1117.

[5] SHI J, GAO W, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-

mediated programmed necrotic cell death [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 42(4):245-254.

[6] HE Y, ZENG M Y, YANG D, et al. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux [J]. *Nature*, 2016, 530 (7590): 354-357.

[7] Giavridis T, van der Stegen S J C, Eyquem J, et al. CAR T cell-induced cytokine release syndrome is mediated by macrophages and abated by IL-1 blockade [J]. *Nat Med*, 2018, 24:731-738.

[8] Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CART cells [J]. *Nat Med*, 2018, 24(6):739-748.

[9] Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(5):454-460.

[10] Iyer S S, HE Q, Janczy J R, et al. Mitochondrial cardiolipin is required for NLRP3 inflammasome activation [J]. *Immunity*, 2013, 39(2):311-323.

[11] 刘力兴, 贾钦尧. 支气管哮喘患者外周血单个核细胞 NLRP3 mRNA 和血清 IL-18、IL-1 β 的表达和研究 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2016, 15(4):345-347.

[12] 张维康, 潘灵辉. NOD 样受体蛋白 3 炎症小体在呼吸机相关性肺损伤中的作用机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(10):821-825.

[13] 谢文英, 司春婴, 尚立芝. 爱罗咳喘宁对老年 COPD 急性加重期痰湿阻肺证患者血清中细胞因子及肺功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(12):143-146.

[14] 尚立芝, 谢文英, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对稳定期和急性加重 COPD 抗炎作用及机制研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(1):134-139.

[15] 尚立芝, 谢文英, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠肺组织炎症因子及氧化应激的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(24):168-171.

[16] 尚立芝, 季书, 谢文英, 等. 二陈汤加味对 COPD 急性期患者 CCL6, SP-D 及 HAT/HDAC 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):163-170.

[17] 陈四清, 谢文英, 尚立芝, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病急性加重期老年患者免疫功能及 CCL18、CC16、IL-8、sICAM-1 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):171-177.

[18] 谢文英, 季书, 尚立芝. 二陈汤加味对 COPD 患者氧化应激、缺氧诱导因子 1 α 及沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(10):155-162.

[19] Yildirim E, Kormi I, Baolu K, et al. Periodontal health and serum, saliva matrix metalloproteinases in patients

- with mild chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Periodontal Res*, 2013, 48(3):269-275.
- [20] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animal models of pulmonary emphysema [J]. *Thorax*, 2002, 57(10):908-914.
- [21] 齐先梅, 王蕾, 张瑞恒, 等. MCC950 在野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型中的治疗作用及其机制研究 [J]. *首都医科大学学报*, 2018, 39(6):871-875.
- [22] Coll R C, Robertson A A, Chae J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [J]. *Nat Med*, 2015, 21(3):248-255.
- [23] 吴珂, 尚立芝, 谢文英, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病细支气管壁细胞外基质重塑的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(14):122-127.
- [24] 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.
- [25] 何子凡, 高岩, 王晓玲, 等. NLRP3 炎性小体在慢性阻塞性肺病患者机体炎症反应中作用的研究 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2018, 17(2):119-123.
- [26] ZHU J, WU S, HU S, et al. NLRP3 inflammasome expression in peripheral blood monocytes of coronary heart disease patients and its modulation by rosuvastatin [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2):1826-1836.
- [27] Riteau N, Gasse P, FAUCONNIER L, et al. Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(6):774-783.
- [28] Kanneganti T D, Body-Malapel M, Amer A, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of Caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(48):36560-36568.
- [29] Kanneganti T D, Ozören N, Body-Malapel M, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate Caspase-1 through cryopyrin/Nalp3 [J]. *Nature*, 2006, 440(7081):233-236.
- [30] Martinon F, Agostini L, Meylan E, et al. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(21):1929-1934.
- [31] GUO H, Callaway J B, TING J P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics [J]. *Nat Med*, 2015, 21(7):677-687.
- [32] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140(6):821-883.
- [33] De Nardo D, Latz E. NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(8):373-379.
- [34] Gross O, Thomas C J, Guarda G, et al. The inflammasome: an integrated view [J]. *Immunol Rev*, 2011, 243(1):136-151.
- [35] Franklin B S, Bossaller L, De Nardo D, et al. The adaptor ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(8):727-737.
- [36] Uh S T, Koo S M, Kim Y, et al. The activation of NLRP3-inflammasome by stimulation of diesel exhaust particles in lung tissues from emphysema model and RAW 264.7 cell line [J]. *Korean J Intern Med*, 2017, 32(5):865-874.
- [37] LI C, HUANG Z H, LI W L, et al. The nucleotide-binding oligomerization domain-Like receptor family pyrin domain-containing inflammasome regulates bronchial epithelial cell injury and proapoptosis after exposure to biomass fuel smoke [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(6):815-824.
- [38] Pinkerton J W, Kim R Y, Robertson A A B, et al. Inflammasomes in the lung [J]. *Mol Immunol*, 2017, 86:44-55.
- [39] Goldberg E L, Asher J L, Molony R D, et al. β -Hydroxybutyrate deactivates neutrophil NLRP3 inflammasome to relieve gout flares [J]. *Cell Rep*, 2017, 18(9):2077-2087.
- [40] TIAN R, ZHU Y, YAO J Y, et al. NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 357(2):328-334.
- [41] Cocco M, Pellegrini C, Martinez-Banaclocha H, et al. Development of an acrylate derivative targeting the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *J Med Chem*, 2017, 60(9):3656-3671.
- [42] Tsai Y M, Chiang K H, Hung J Y, et al. Der f1 induces pyroptosis in human bronchial epithelia via the NLRP3 inflammasome [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2):757-764.
- [43] 彭菲菲, 邵强, 赵宁, 等. MCC950 对线粒体损伤相关分子模式诱导大鼠肺损伤的保护作用 [J]. *医学研究生学报*, 2017, 30(11):1166-1171.
- [44] Dima E, Koltsida O, Katsaounou P, et al. Implication of Interleukin (IL)-18 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Cytokine*, 2015, 74(2):313-317.
- [45] Jordan J A, GUO R F, YUN E C, et al. Role of IL-18 in acute lung inflammation [J]. *J Immunol*, 2001, 167(12):7060-7068.

[责任编辑 周冰冰]