

## 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠 TLR4/MyD88/ NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

尚立芝, 季书, 王国强\*, 陈晓辉, 谢文英\*, 李耀洋, 张光远, 石龙涛, 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 Toll 样受体 4(TLR4)/髓样分化因子 88(MyD88)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路及相关分子的影响,探讨二陈汤加味对 COPD 抗炎作用的分子机制。**方法:** 将 40 只 SD 大鼠随机平均分为正常组、模型组、二陈汤加味组和 EVP4593(NF- $\kappa$ B 抑制剂)组。以香烟烟雾联合气管滴注脂多糖(LPS)方法制备 COPD 大鼠模型。二陈汤加味组以 10 g·kg<sup>-1</sup>灌胃(ig),EVP4593 组皮下注射 1 mg·kg<sup>-1</sup>,正常组、模型组 ig 等量生理盐水,连续干预 14 d。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清高迁移率族蛋白 B1(HMGB1),趋化因子(CXCL)-2,CXCL-3 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平,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)分别检测肺匀浆中 TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白表达水平,免疫组化(IHC)检测 TLR4,MyD88,磷酸化 NF- $\kappa$ B p65(p-NF- $\kappa$ B p65)在大鼠肺组织中的定位表达。**结果:** 与正常组比较,模型组肺匀浆中 TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及蛋白表达均显著增加( $P < 0.01$ ),HMGB1,CXCL-2,CXCL-3 和 MCP-1 含量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二陈汤加味组 TLR4,MyD88,NF- $\kappa$ B p65 mRNA 及其蛋白表达均显著减弱( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),HMGB1,CXCL-2,CXCL-3 和 MCP-1 含量显著降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。**结论:** 二陈汤加味对 COPD 有抗炎作用,其机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路相关信号分子基因的表达,以及减少 HMGB1,CXCL-2,CXCL-3 和 MCP-1 的释放有关。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病;二陈汤;Toll 样受体 4;核转录因子- $\kappa$ B p65;单核细胞趋化蛋白-1

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0065-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192203

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190808.1434.006.html>

**[网络出版时间]** 2019-08-09 14:59

### Mechanism of Modified Erchentang on Signaling Pathway of TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B in Lung Tissue of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

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

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of modified Erchentang on expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor (MyD88) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) genes in the lung tissue homogenate of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** Forty SD rats were randomly divided into normal group, model group, modified Erchentang group and EVP4593 (NF- $\kappa$ B inhibitor) group. Rat COPD models were prepared through cigarette smoke and tracheal dripping with lipopolysaccharide (LPS). After

**[收稿日期]** 20190520(019)

**[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(182102311163);国家级大学生创新创业训练计划项目(S201810471013);河南中医药大学大学生创新学习项目(CXXM[2017]0252)

**[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,研究员,从事中医药免疫药理研究,E-mail:biowgq@126.com;

\*谢文英,硕士,教授,从事中医药治疗肺系疾病临床研究,E-mail:xiewenyi1963@193.com

the modeling, normal and model groups were intragastrically given normal saline solution, EVP4593 group was given EVP4593 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) through subcutaneous injection, and modified Erchentang group was given corresponding herbal drugs intragastrically ( $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) for 14 days. The levels of high mobility group box 1 (HMGB1), chemokines CXCL-2, CXCL-3 and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rats serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay in rats serum. The expressions of Toll-like receptors 4 (TLR4), myeloid differentiation factor (MyD88) and nuclear factor- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) mRNA were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) method. Western blot were used to detect the levels of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 and p-NF- $\kappa$ B p65 protein. Immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the localization and expressions of TLR4, MyD88 and p-NF- $\kappa$ B p65 protein in the lung tissue. **Result:** The mRNA and protein expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 were increased significantly ( $P < 0.01$ ) in model group compared with normal group. The levels of HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 and MCP-1 in the model group were significantly higher than those in the normal group ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, expressions of TLR4, MyD88 and NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein were decreased significantly ( $P < 0.05$ ) in modified Erchentang. **Conclusion:** Modified Erchentang may inhibit the inflammatory response of COPD effectively. The mechanism may be related to the inhibition of the expressions of the signal molecule genes involved in the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway and the reduction of the release of HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 and MCP-1.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Erchentang; Toll-like receptors 4 (TLR4); nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ B p65); monocyte chemoattractantprotein-1 (MCP-1)

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<sup>[1-2]</sup>。COPD 的病理机制主要是炎症<sup>[3]</sup>。研究表明, Toll 样受体 4 (TLR4) 介导炎症反应, 主要是通过 TLR4 触发的髓样分化因子 88 (MyD88) 进行细胞内信号转导, 激活细胞核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), 启动下游基因的表达并释放细胞因子, 趋化因子-2 (CXCL-2), CXCL-3, 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 等炎症介质。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是一种重要的炎性介质<sup>[4]</sup>, 在脂多糖 (LPS), 干扰素- $\gamma$  等因素刺激下, 巨噬细胞等炎症细胞中的 HMGB1 从细胞核转移到胞浆, 进而释放到细胞外, 与其受体 TLR4 结合, 通过激活 NF- $\kappa$ B 导致下游的炎症介质释放增加, 进而加重炎症反应<sup>[5-7]</sup>。HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与并促进 COPD 的炎症进程, 以 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 为靶标将成为控制 COPD 炎症的新思路<sup>[8-10]</sup>。

COPD 属中医学的“肺胀”“喘证”等范畴。中医药治疗 COPD, 以其多成分、多途径、多靶点等特点凸显其优势<sup>[11-13]</sup>。本课题组基于 COPD 的病因病机, 选用由《太平惠民和剂局方》(宋代) 中的二陈汤和四君子汤加减而成二陈汤加味方, 取二陈汤的燥湿化痰, 理气和中, 兼四君子汤的益气健脾, 行气化滞之功效。课题组前期临床观察和实验研究发现, 二陈汤加味对 COPD 的效果稳定, 可能通过其对抗

炎症<sup>[14-15]</sup>, 氧化损伤<sup>[16]</sup>, 气道重塑<sup>[17-18]</sup>等作用, 从而保护肺组织, 改善肺功能。炎症贯穿于 COPD 的全过程, 本课题前期虽初步观测二陈汤加味对炎症细胞因子的影响<sup>[14-15]</sup>, 但有关二陈汤加味对 COPD 抗炎的分子机制, 仍有待深入探究, 尤其二陈汤加味能否通过干预 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路及相关分子而发挥抗炎作用, 本课题尚未涉及。目前国内外基于 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路的中医药对 COPD 抗炎机制的临床意义及研究报道较少。

本文基于前期动物实验研究, 主要观测二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路基因表达及下游分子的影响, 探讨二陈汤加味对 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路作用的分子机制, 为治疗 COPD 的新药开发提供新的靶标。

## 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)2010-001。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 41003100001905), 本研究涉及的动物实验操作均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。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

10 g, 陈皮 10 g, 苦杏仁 10 g, 蜜麻黄 6 g, 茯苓 10 g, 白术 10 g, 党参 10 g, 葶苈子 10 g, 地龙 10 g, 山药 10 g, 甘草片 5 g 均为华润三九医药生产的中药配方颗粒, 批号分别为 1509001H, 1502001H, 1504002S, 1503125S, 1505002W, 1507001W, 1507007W, 1508001S, 1503001S, 1510007H, 1502001S。LPS 和 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); EVP4593 (NF- $\kappa$ B 抑制剂, 美国 Selleck 公司, 批号 S490203); 大鼠 HMGB1 (武汉伊莱瑞特生物科技有限公司, 批号 E-EL-H1554c); 大鼠 CXCL-2 和 CXCL-3 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 3771190428, 3771190429); MCP-1 大鼠酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司, 批号 20170708); 总 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号 086001); cDNA 反转录试剂盒, 苏木素染液(美国 Sigma 公司, 批号分别为 0000123564, H9627); 伊红染液(国药集团化学试剂有限公司, 批号 71014544); SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 试剂盒(日本 Takara 公司, 批号 AKA403); 小鼠抗大鼠 TLR4 一抗(美国 Santa Cruz 公司, 批号# J1016); 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠免疫球蛋白(Ig) G(H + L), 兔抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国 Immuno Way 公司, 批号分别为 B0101, B4501); 兔抗大鼠 MyD88 一抗(美国 Abcom 公司, 批号 GR-193027-2); 兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B p65 一抗, 兔抗大鼠磷酸化(p)-NF- $\kappa$ B p65 一抗(美国 CST 公司, 批号分别为 8242S, 3033S); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig) G(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); 其他试剂均有河南中医药大学科研实验中心提供; TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65, GAPDH 的 PCR 引物均由宝日医生物技术(北京)有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

**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 Bio-Tek 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(美国 ABI 仪器有限公司)及其检测软件; EG1150 型自动包埋机, RM 2265 型全自动轮转切片机(德国 Leica 公司); 20486 型显微摄像仪(日本 Olympus 公司); DYCZ-24DN 型

表 1 PCR 引物序列

Table1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度 /bp
TLR4	上游 5'-AGGGTTTCCTGTCAAGTATCAAGTTT-3'	140
	下游 5'-TGATGCCTCCCTGGCTCCT-3'	
MyD88	上游 5'-TATACCAACCCCTGCACCAAGTC-3'	134
	下游 5'-CAGGCTCCAAGTCAGCTCATC-3'	
NF- $\kappa$ B p65	上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	153
	下游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3'	
GAPDH	上游 5'-AGGCCGGTGCTGAGTATGTC-3'	122
	下游 5'-TGCTGCTTACCACCTTCT-3'	

垂直电泳槽及转膜仪(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 分组、模型制备与给药** 40 只 SD 大鼠随机平均分为正常组、模型组、二陈汤加味和 EVP4593 组。参照文献[19-20]及本课题组前期制备 COPD 大鼠模型。二陈汤加味组以每天 10 g·kg<sup>-1</sup>灌胃(ig), 因前期研究发现该剂量的效果最好<sup>[16-18]</sup>。正常及模型组 ig 同体积的生理盐水。EVP4593 组皮下注射 EVP4593 每天 1 mg·kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次。连续干预 14 d。

**2.2 ELISA 检测血清中 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量** 以 10% 的水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血 10 mL。室温置 2 h 后, 4 ℃ 离心 3 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min, 取上清, -80 ℃ 保存。采用双抗体夹心 ELISA 法, 严格按试剂盒说明书进行操作。用酶标仪在 450 nm 波长测定吸光度 A, 由标准曲线, 计算血清中 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 的浓度。

**2.3 Real-time PCR 检测 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达** 按照总 RNA 提取试剂盒说明书, 从 50 mg 大鼠右肺组织中提取总 RNA, 紫外分光光度仪测定吸光度 A<sub>260</sub>, A<sub>280</sub>, 根据 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值, 计算 RNA 纯度和浓度。逆转录 cDNA 合成: 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, 在 Real-time PCR 仪上进行扩增。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、熔解曲线。用软件分析

TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B 和 GAPDH 基因的扩增曲线, 得到各孔  $C_t$  值。以同一样本中的 GAPDH 的  $C_t$  值作为内参, 用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因相对表达量。

### 2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肺组织中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

采用 RIPA 裂解液提取蛋白质, 用 BCA 法检测样品蛋白质浓度, 4 倍 SDS 上样缓冲液与 100  $\mu$ g 蛋白质按比例混合, 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  $^{\circ}$ C 5% BSA 封闭 2 h; 按说明书用封闭液稀释一抗 (1:1 000), 加入稀释液稀释的兔抗大鼠一抗 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65, 一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; 洗膜后加入用封闭液稀释羊抗兔 IgG-HRP 二抗 (1:2 000), 37  $^{\circ}$ C 轻摇室温孵育 1 h; 洗膜后, 用 ECL 发光试剂盒发光显影。用凝胶成像分析系统扫描, 测定各目的条带及内参 GAPDH 的光密度值, 计算比值求得目的蛋白的相对表达含量。

### 2.5 免疫组化法检测 TLR4, MyD88, p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

75  $^{\circ}$ C 烤片, 常规脱蜡至水, 3%  $H_2O_2$

阻断过氧化物酶, 微波热修复抗原, 加兔抗大鼠一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜, 加生物素化山羊抗兔 IgG, 加 SABC 工作液, DAB 染色, 苏木素复染, 封片。阴性对照以磷酸盐缓冲液 (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 数据采用统计软件 SPSS 18.0 进行分析, 定量资料采用  $\bar{x} \pm s$  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, 正常组大鼠体质量增加, 一般状况好, 无死亡。模型组和二陈汤加味组各死亡 2 只, 存活动物体质量较造模前下降。EVP4593 组死亡 1 只, 体质量增加。

3.2 对 COPD 大鼠血清 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量的影响 与正常组比较, 模型组血清 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠血清 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	HMGB1	CXCL-2	CXCL-3	MCP-1
正常	10	-	53.35 $\pm$ 0.78	40.37 $\pm$ 0.45	50.31 $\pm$ 0.41	70.35 $\pm$ 7.31
模型	8	-	234.15 $\pm$ 5.31 <sup>1)</sup>	187.29 $\pm$ 4.57 <sup>1)</sup>	147.52 $\pm$ 3.55 <sup>1)</sup>	167.22 $\pm$ 8.61 <sup>1)</sup>
二陈汤加味	8	10	187.52 $\pm$ 2.34 <sup>2)</sup>	88.29 $\pm$ 9.53 <sup>3)</sup>	82.71 $\pm$ 1.51 <sup>3)</sup>	74.63 $\pm$ 8.05 <sup>3)</sup>
EVP4593	9	0.001	136.21 $\pm$ 6.71 <sup>3)</sup>	84.87 $\pm$ 3.16 <sup>3)</sup>	85.75 $\pm$ 1.64 <sup>3)</sup>	68.23 $\pm$ 8.33 <sup>3)</sup>

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

### 3.3 对 COPD 大鼠肺组织中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的影响

与正常组比较, 模型组肺组织 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达显著

升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 的表达均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR4	MyD88	NF- $\kappa$ B p65
正常	-	1.48 $\pm$ 0.11	0.33 $\pm$ 0.05	1.96 $\pm$ 0.02
模型	-	4.97 $\pm$ 0.07 <sup>1)</sup>	2.88 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	6.12 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>
二陈汤加味	10	3.45 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	1.55 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	2.18 $\pm$ 0.07 <sup>3)</sup>
EVP4593	0.001	2.09 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>	0.93 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>	2.44 $\pm$ 0.03 <sup>3)</sup>

### 3.4 对 COPD 大鼠肺组织匀浆中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平的影响

与正常组比较, 模型组肺组织 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ );

与正常组比较, 模型组肺组织 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ );

与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1, 表 4。

### 3.5 对 COPD 大鼠肺组织 TLR4, MyD88, p-NF- $\kappa$ B p65 表达的影响

#### 3.5.1 对 COPD 大鼠肺组织 TLR4 表达的影响

TLR4 阳性表达在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膜和胞浆上呈棕黄色。见图 2。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中 TLR4 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 TLR4 蛋白的表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

表 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of modified Erchentang on expression of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 and p-NF- $\kappa$ B p65 protein in lung tissue of COPD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TLR4/GAPDH	MyD88/GAPDH	NF- $\kappa$ B p65/GAPDH	p-NF- $\kappa$ B p65/GAPDH
正常	-	1.52 $\pm$ 0.07	1.85 $\pm$ 0.05	3.72 $\pm$ 0.14	1.28 $\pm$ 0.12
模型	-	6.49 $\pm$ 0.17 <sup>1)</sup>	6.12 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	7.26 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>	5.95 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>
二陈汤加味	10	2.31 $\pm$ 0.11 <sup>3)</sup>	3.86 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>	5.01 $\pm$ 0.25 <sup>2)</sup>	3.29 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>
EVP4593	0.001	2.04 $\pm$ 0.12 <sup>3)</sup>	2.15 $\pm$ 0.09 <sup>3)</sup>	5.36 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	2.41 $\pm$ 0.15 <sup>3)</sup>

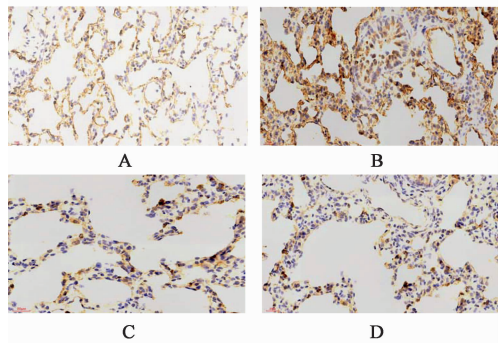


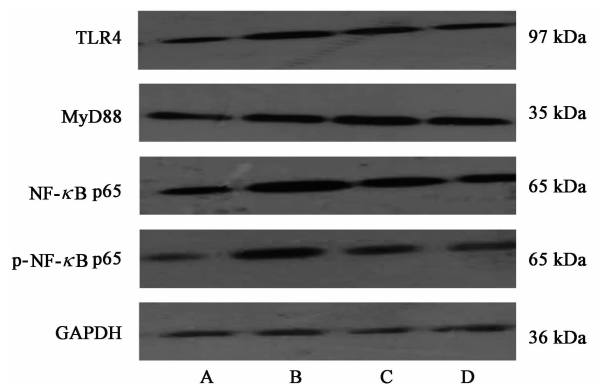
图 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TLR4 蛋白表达的影响 (IHC,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of modified Erchentang on expression of TLR4 protein in lung tissue of rats (IHC,  $\times 400$ )

#### 3.5.2 对 COPD 大鼠肺组织 MyD88 表达的影响

MyD88 阳性表达在中性粒细胞、肺巨噬细胞和肺泡 II 型上皮细胞的胞浆上呈棕黄色或棕色。见图 3。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中 MyD88 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 MyD88 蛋白的表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 5。

#### 3.5.3 对 COPD 大鼠肺组织 p-NF- $\kappa$ B p65 表达的



A. 正常组; B. 模型组; C. EVP4593; D. 二陈汤加味 (图 2~4 同)

图 1 大鼠肺组织中 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 和 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达

Fig. 1 Expression of TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 and p-NF- $\kappa$ B p65 protein in lung tissue of rats

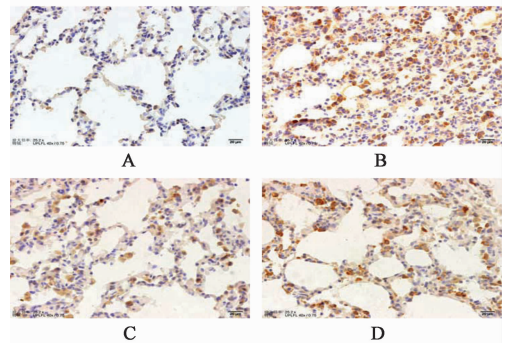


图 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 MyD88 蛋白表达的影响 (IHC,  $\times 400$ )

Fig. 3 Effect of modified Erchentang on expression of MyD88 protein in lung tissue of rats (IHC,  $\times 400$ )

影响 p-NF- $\kappa$ B p65 阳性表达在肺巨噬细胞、淋巴细胞、肺泡上皮细胞的胞浆和(或)胞核上呈棕黄色。见图 4。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

## 4 讨论

COPD 的主要病因多因咳喘持久而至肺气

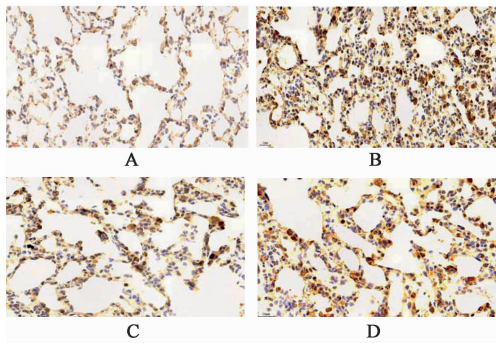


图 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 p-NF-κB p65 蛋白表达的影响 (IHC, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Erchentang on expression of p-NF-κB p65 protein in lung tissue of rats (IHC, ×400)

表 5 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TLR4, MyD88, p-NF-κB p65 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of modified Erchentang on expression of TLR4, MyD88, NF-κB p65 protein in lung tissue of COPD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TLR4	MyD88	p-NF-κB p65
正常	-	1.52 ± 0.07	1.85 ± 0.05	3.72 ± 0.14
模型	-	6.49 ± 0.17 <sup>1)</sup>	6.12 ± 0.11 <sup>1)</sup>	7.26 ± 0.15 <sup>1)</sup>
二陈汤加味	10	2.31 ± 0.11 <sup>3)</sup>	3.86 ± 0.13 <sup>3)</sup>	5.01 ± 0.25 <sup>2)</sup>
EVP4593	0.001	2.04 ± 0.12 <sup>3)</sup>	2.15 ± 0.09 <sup>3)</sup>	5.36 ± 0.22 <sup>2)</sup>

甘草和中健脾。全方补肺益脾,化痰平喘;补泄并施,补而不滞。兼顾补肺健脾、祛痰逐水,驱散痰湿,临床观察对 COPD 患者的疗效较好<sup>[14,16]</sup>。

TLR4 是 Toll 样受体家族成员之一,是一种跨膜蛋白,TLR4 广泛分布于中性粒细胞、气道上皮细胞、气道平滑肌细胞、肺巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞等。外源性配体主要是病原体相关分子如 LPS 等<sup>[25-27]</sup>,HMGB1 是 TLR4 的内源性配体。通常 NF-κB 以 p50-p65 异二聚体与 NF-κB 抑制蛋白(IκB)结合,以无活性形式存在于胞质中,阻止 NF-κB 的核转位。外源性或/和内源性配体与 TLR4 结合,引起炎症瀑布反应。吸烟、外源性配体如 LPS,白细胞介素(IL)-1, IL-6 和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等与 TLR4 结合,胞外炎症信号呈递给胞内 MyD88<sup>[28]</sup>,募集转导分子发生级联反应,磷酸化 IκB 激酶(IKK)复合物(IKKα, IKKβ 和 IKKγ),其中 IKKβ 将 IκB 磷酸化, IκB 被蛋白酶降解, NF-κB 与 IκB 解离, NF-κB 活化并进入细胞核与下游基因上的特定位点结合,启动并调控下游基因的转录,合成并释放细胞因子(如 IL-1β, IL-2, IL-6, TNF-α 等)和趋化因子(MCP-1, CXCL2, CXCL3)等炎症介质。而释放出的趋化因子又反过来趋化并激活炎症细胞的 NF-κB 系统,以正反馈调节,使炎症反应级联放

亏虚,脾虚津亏、痰瘀阻滞,主要病机为本虚标实<sup>[21]</sup>。COPD 主要症状为咳、痰,重者伴喘,属于中医学“久咳”“肺胀”<sup>[22]</sup>“喘证”等范畴。肺气虚,宣降不足,肺气逆行向上,致咳、痰,痰浊瘀阻,胸闷兼喘;通利不及,痰浊集聚;脾气虚,水液运化减弱,湿聚成痰;累及肺、脾、肾三脏<sup>[23]</sup>。治疗以补肺健脾、化痰平喘为主;二陈汤加味方兼有二陈汤与四君子汤加减而成,二陈汤加味由姜半夏、陈皮、苦杏仁、蜜麻黄、白术、党参、山药、茯苓、葶苈子、干姜、地龙、甘草等组成。姜半夏燥湿化痰;陈皮、苦杏仁、麻黄宣降肺气;白术、党参补肺健脾不腻<sup>[24]</sup>;山药、茯苓、葶苈子、干姜、地龙逐瘀通络、平喘通肺、健脾渗湿;

大<sup>[29-30]</sup>。受刺激的炎症细胞将 HMGB1 从细胞核移位至胞浆再释放到胞外, HMGB1 与 TLR4 结合后,激活 TLR4/NF-κB 信号通路,调控细胞因子和炎症趋化因子 MCP-1, CXCL2, CXCL3 等的表达与分泌, MCP-1, CXCL2, CXCL3 对单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞有强烈的趋化作用,维持慢性炎症的正反馈,促进 COPD 的病理进程<sup>[31-33]</sup>。以 TLR4/MyD88/NF-κB 为靶标,将成为治疗 COPD 的新思路<sup>[34-35]</sup>。

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 TLR4, MyD88, NF-κB p65 mRNA 和蛋白表达均显著增强,与文献报道一致<sup>[30,36]</sup>。提示外源性配体 LPS 与 TLR4 结合,诱导 TLR4, MyD88, NF-κB p65 基因的表达。Western blot 和免疫组化检测 p-NF-κB p65 表达,模型组 p-NF-κB p65 蛋白表达显著高于正常组,提示 NF-κB p65 活化转为 p-NF-κB p65 的量增多,可能 LPS 与 TLR4 结合通过激活 NF-κB p65 起到促炎作用。模型组血清 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量显著高于正常组,与文献报道一致<sup>[37-38]</sup>,说明模型组 HMGB1 从炎症细胞核移位至胞浆并分泌到胞外的量增加。HMGB1 作为 TLR4 的内源性配体,二者结合后,通过活化 TLR4/

MyD88/NF- $\kappa$ B 通路,激活单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、树突状细胞、上皮细胞等细胞,增多的 p-NF- $\kappa$ B p65 上调下游 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 基因的表达、合成与分泌,维持 COPD 的慢性炎症反应<sup>[5-7]</sup>。与模型组比较, EVP4593 和二陈汤加味组 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达均减弱,提示二陈汤加味可抑制 TLR4, MyD88, NF- $\kappa$ B p65 基因表达。 EVP4593 和二陈汤加味组中 p-NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达显著低于模型组,提示 EVP4593 和二陈汤加味抑制 NF- $\kappa$ B p65 的活化,使下游细胞因子释放减少,本研究 EVP4593 和二陈汤加味组 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 含量减少予以佐证。减少的细胞因子活化 NF- $\kappa$ B 的作用减弱,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的增殖和趋化减少,以至于肺匀浆中的 p-NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达低于模型组, Western blot 和免疫组化结果也予以证实。提示二陈汤加味通过抑制 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 通路,下调下游炎症介质 HMGB1, CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 合成与释放,从而发挥抗炎作用

综上所述,二陈汤加味能有效抑制 COPD 炎症反应。其机制可能与二陈汤加味抑制受体 TLR4 表达,降低配体 LPS 和 HMGB1 对 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B p65 通路的诱导作用,下调趋化因子 CXCL-2, CXCL-3 和 MCP-1 的合成与分泌有关,致使炎细胞的活化、渗出及趋化被限制,从而延缓或阻滞 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 pre-clinical 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] Paudel Y N, Angelopoulou E, Piperi C, et al. Enlightening the role of high mobility group box 1 (HMGB1) in inflammation: updates on receptor signaling [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 20(858):172487.

[5] YANG H, Hreggvidsdottir H S, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine

release[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(26):11942-11947.

[6] Tsung A, Tohme S, Billiar T R, et al. High-mobility group box-1 in sterile inflammation[J]. J Int Med, 2014, 276(5):425-443.

[7] WANG J, HE G Z, WANG Y K, et al. TLR4-HMGB1-MyD88-and TRIF-dependent signaling in mouse intestinal ischemia/reperfusion injury [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(27):8314-8325.

[8] JIANG H, DUAN J, XU K, et al. W. Resveratrol protects against asthma-induced airway inflammation and remodeling by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(1):459-466.

[9] Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, et al. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(9):917-927.

[10] LIU W, LIU Z, ZHANG W, et al. Ulinastatin protects the lungs of COPD rats through the HMGB1/TLR4 signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 16(3):4057-4063.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 陈四清, 季书, 尚立芝. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠转化生长因子- $\beta_1$  及组蛋白去乙酰化酶 2 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10):147-154.

[16] 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 $\alpha$  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.

[17] 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.

[18] 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.

- [19] 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比较[J]. 第二军医大学学报,2010,31(3):246-249.
- [20] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease 3: experimental animal models of pulmonary emphysema [J]. Thorax, 2002, 57 ( 10 ): 908-914.
- [21] 陈志斌,刘中友,连林辉,等. 补肺一号方治疗 COPD 肺气虚证的临床研究[J]. 中医临床研究,2011,3(19):14-16.
- [22] 朱文峰. 中医诊断与鉴别诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:124-134.
- [23] 谢文英,尚立芝,胡文豪,等. 慢性阻塞性肺疾病的发病机制及中医药治疗进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):227-230.
- [24] 柳西河,李朝晖,董印宏,等. 重订医学衷中参西录[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:108.
- [25] Poltorak A, HE X, Smirnova I, et al. Defective LPS signalling in C3H/He J and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science,1998,282(5396):2085-2088.
- [26] Seong S Y, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses[J]. Nat Rev Immunol,2004,4(6):469-478.
- [27] Roeder A, Kirschning C J, Rupec R A, et al. Toll-like receptors and innate antifungal responses [J]. Trends Microbiol,2004,12(1):44-49.
- [28] XU X M, NING Y C, WANG W J, et al. Anti-inflammatory effects of long-term caloric restriction via overexpression of SIGIRR to inhibit NF-kappaB signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37 ( 4 ): 1257-1270.
- [29] Bowie A G, Haga I R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses[J]. Mol Immunol, 2005, 42(8):859-867.
- [30] LIU X, YIN S, CHEN Y, et al. LPS induced proinflammatory cytokine expression in human airway epithelial cells and macrophages via NF- $\kappa$ B, STAT3 or AP-1 activation [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 ( 4 ): 5484-5491.
- [31] van Beijnum J R, Buurman W A, Griffioen A W. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1)[J]. Angiogenesis,2008,11(1):91-99.
- [32] Shah B S, Burt K G, Jacobsen T, et al. High mobility group box-1 induces pro-inflammatory signaling in human nucleus pulposus cells via toll-like receptor 4-dependent pathway [J]. J Orthop Res, 2019, 37 ( 1 ): 220-231.
- [33] Pouwels S D, van Geffen W H, Jonker M R, et al. Increased neutrophil expression of pattern recognition receptors during COPD exacerbations [J]. Respirology, 2017,22(2):401-404.
- [34] LIU L, GU H, LIU H, et al. Protective effect of Resveratrol against IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway: an " *in vitro* study" [J]. Int J Mol Sci,2014,15(4):6925-6940.
- [35] 杨梅,安瑞娣,李明航,等. 作用于 HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路减轻小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(7):1009-1013.
- [36] 潘秀和,刘超波,孙俊,等. 核因子  $\kappa$ B 信号通路在炎症性肺部疾病中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2016,30(7):762-769.
- [37] 李留成,高建,李俊. HMGB1 在呼吸系统疾病中的作用及其机制[J]. 中国药理学通报,2015,31(1):15-18.
- [38] Krohn N, Kapoor S, Enami Y, et al. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells [J]. Gastroenterology, 2009, 136 ( 5 ): 1806-1817.

[责任编辑 周冰冰]