

苗药杆努尽烟对慢性支气管炎大鼠肺组织 TLR4 及 TNF- α 表达的影响*

胡欣, 褚晓鹏, 赵丹, 李格, 陈嘉慧, 徐红**, 吴宁**

(贵州医科大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 研究苗药杆努尽烟对慢性支气管炎模型大鼠肺组织 Toll 样受体 4 (TLR4) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平的影响。方法: 50 只 SD 大鼠分为正常对照组、慢性支气管炎模型组、杆努尽烟低剂量组 (2 g/kg)、杆努尽烟高剂量组 (8 g/kg) 及桂龙咳喘宁阳性药物组, 除正常对照组外, 其余各组通过烟熏加脂多糖气管注射法建立慢性支气管炎大鼠模型; 观察各组大鼠呼吸系统症状及肺组织病理变化, ELISA 法检测各组大鼠肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量, Western Blot 法及 qPCR 法分别检测各组大鼠肺组织 TLR4 蛋白及 mRNA 水平。结果: 与模型组相比, 高、低剂量杆努尽烟均可改善慢性支气管炎大鼠呼吸系统症状, 减轻肺组织炎症, 降低慢支大鼠肺组织中 TNF- α 的水平, 减少 TLR4 蛋白及 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 其中高剂量杆努尽烟效果更好。结论: 苗药杆努尽烟可减轻慢性支气管炎模型大鼠呼吸道症状及肺组织炎症, 其机制可能与下调大鼠肺组织 TLR4 及 TNF- α 表达水平有关。

[关键词] 杆努尽烟; 慢性支气管炎; 大鼠, Sprague-Dawley; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子- α ; 肺组织

[中图分类号] R562.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)12-1386-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.12.005

Effect of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. on expression of TLR4 and TNF- α of in Chronic Bronchitis Rats

HU Xin, CHU Xiaopeng, ZHAO Dan, LI Ge, CHEN Jiahui, XU Hong, WU Ning
(College of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. on the levels of TLR4 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue of chronic bronchitis rats. **Methods:** 50 SD rats were divided into normal control group, chronic bronchitis model group, low dose group (2 g/kg), high dose group (8 g/kg) and Guilong Kechuaning positive drug group. The rat model of chronic bronchitis was established by fumigation and endotracheal injection of lipopolysaccharide (LPS) in other groups except the normal control group. The respiratory symptoms and pathological changes of lung tissue were observed, and the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue of rats in each group was detected by ELISA method. The levels of TLR4 protein and mRNA in lung tissue of rats in each group were detected by Western Blot and qPCR. **Results:** Compared with the model group, the high and low dose of *Lysionotus pauciflorus* Maxim. could improve the symptoms of respiratory system, alleviate the inflammation of lung tissue, decrease the level of TNF- α and the expression of TLR4 protein and mRNA in the lung tissue of chronic bronchitis rats ($P < 0.05$). Among them, the effect of high dose bar was better. **Conclusion:** *Lysionotus pauciflorus* Maxim. can alleviate the respiratory symptoms and inflammation of lung tissue in rats with chronic bronchitis. The mechanism may be

*[基金项目] 贵州省科技计划项目[黔科合 LH 字[2014]7080]; 贵州省 2017 年大学生创新训练计划项目(201710660055)

** 通信作者 E-mail: 1738943269@qq.com; 1638210715@qq.com

网络出版时间: 2018-12-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181222.1447.008.html>

related to the change of TLR4 and TNF- α expression in rat lung tissue.

[**Key words**] *Lysionotus pauciflorus* Maxim.; chronic bronchitis; rats, Sprague-Dawley; Toll-like receptor 4; tumor necrosis factor- α ; lung tissue

慢性支气管炎是一种常见的慢性气道炎性疾病,临床上以咳嗽、咳痰或伴有喘息及反复发作的慢性过程为特征,常并发阻塞性肺气肿,易引起肺动脉高压及肺源性心脏病等,其防治与研究已受到国内外学者的普遍重视^[1-2]。慢性支气管炎患者支气管黏膜上皮细胞分泌大量诸如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等细胞因子,进一步加重了炎症病理过程,因此,抑制或减少支气管及肺组织中炎性细胞因子的生成,可使症状得到改善。作为固有免疫的重要组成部分, Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是连接环境暴露与适应性免疫的重要桥梁,其在炎症发病机制中发挥的作用近年来受到广泛关注,当 TLR4 受体与来自细菌的配体——脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 结合后,主要启动 MyD88 依赖的信号通路,进而引发下游各类炎症通路,促进大量炎症因子的释放^[3-5]。前期研究表明苗药杆努尽烟对慢性支气管炎有一定疗效^[6],本研究以 TLR4 介导的炎症因子释放为靶点,进一步探究其确切疗效及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器、药品与试剂

SD 大鼠 50 只,雄性,清洁级,体质量 (200 \pm 20) g,购于重庆腾鑫公司。4 $^{\circ}$ C 低温高速离心机 (美国 Thermo)、RM2015 型石蜡切片机 (德国 Leica)、BX51T - PHD - J11 型显微镜 (日本 Olympus)、Synergy H1 全功能酶标仪 (美国 Bio Tek)、SynGeneTM 凝胶成像系统 (美国 Synoptics)、ABI StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo)。遵义牌香烟、桂龙咳喘宁胶囊 (桂龙药业)、脂多糖 (美国 Sigma)、TNF- α 酶联免疫试剂盒 (欣盛博公司)、TLR4 兔抗大鼠一抗 (美国 Abcam 公司)、 β -actin (美国 Bioworld 公司)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (美国 Bioworld 公司)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (碧云天公司)、Trizol (美国 Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, RR037A)、PCR 反应试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, RR430A)、TLR4 mRNA 及内参照 GADPH 引物 (武

汉天一辉远公司)。杆努尽烟全草于 2014 年 6 月采自贵州省凯里市炉山镇,经贵阳中医学院潘炉台教授鉴定为吊石苣苔属植物吊石苣苔 (*Lysionotus pauciflorus* Maxim.)。

1.2 方法

1.2.1 杆努尽烟水提液的制备 取杆努尽烟干样 2 kg,用蒸馏水浸泡,并于 90 $^{\circ}$ C 的电热恒温水箱中连续浸提 12 h,收集并过滤浸提液,旋蒸后合并浸提液,浓缩至药物浓度 2.5 kg/L (按生药量计),最后分装灭菌,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 动物分组 所有动物饲养于室温中,自由饮水饮食 1 周,然后按随机数字法将其分为正常对照组、慢性支气管炎模型组、杆努尽烟低剂量组、杆努尽烟高剂量组及桂龙咳喘宁阳性药物组,每组 10 只。

1.2.3 大鼠慢性支气管炎模型复制 除正常对照组置于正常无烟环境中常规饲养外,其余各组采用烟熏结合脂多糖气管注射法复制大鼠慢性支气管炎模型^[7-8]。自制被动吸烟染毒箱 (50 cm \times 40 cm \times 30 cm,上壁留有通气孔)。造模共用 28 d,第 1 天和第 14 天以 8% 水合氯醛 (0.05 mL/kg) 腹腔内注射麻醉大鼠后,气道内注射 200 g/L 脂多糖溶液 0.2 mL,当天不予香烟烟熏,其余时间每次烟熏 30 min (每箱每次 4 支香烟),每天 2 次。造模 28 d 后,每组随机抓取 2 只大鼠,取其肺部标本制作 HE 切片,检验造模情况,判定造模成功后,开始灌胃。

1.2.4 给药方案 从造模结束的第 2 天开始给药,杆努尽烟高、低剂量组分别按 8 g/kg、2 g/kg (按生药计) 进行灌胃,阳性治疗对照组以桂龙咳喘宁 1 g/kg 灌胃,正常对照组及模型组灌以等量的生理盐水,每日 1 次,连续给药 28 d。

1.2.5 肺组织的采集 连续给药 28 d 后各组大鼠行心脏取血处死,打开胸腔,取下肺组织用生理盐水冲洗后,将左肺上叶固定于 10% 甲醛中,另取右肺经液氮处理后置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,用于后续指标的检测。

1.2.6 病理形态学观察 固定后的肺组织经乙醇及二甲苯透明、石蜡包埋,切成 5 μ m 薄片,HE 染色,在光学显微镜下观察,找到完整的中小支气管

横断面,观察小气道黏膜上皮、杯状细胞、腺体、纤毛及肺泡壁等结构改变及炎性细胞浸润情况。

1.2.7 ELISA 检测肺组织 TNF- α 水平 取保存的肺组织用冰冷的生理盐水漂洗,滤纸拭干、称取 20 μg 置于小烧杯中快速剪碎组织块。用 PBS 稀释置匀浆管中,充分研磨使组织匀浆化,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 ELISA 法检测 TNF- α 水平,按标准曲线计算各个标本所得浓度。

1.2.8 Western Blot 测定肺组织 TLR4 蛋白表达 取 20 mg 肺组织样本于 200 μL 裂解液中充分研磨,BCA 法定量蛋白浓度。取总蛋白 40 μg ,以 5 \times 样品缓冲液配平上样体积,沸水浴 5 min 使蛋白变性后上样,SDS-PAGE 电泳后转膜。5% TBST 脱脂奶粉封闭后,加入一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 漂洗液洗膜 3 次,加入 HRP 标记的二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 60 min。洗涤后将 PVDF 膜置于 ECL 混合液中于室温下振荡温育,应用凝胶成像系统对扫描图像的目的条带进行灰度分析,各目的条带与 β -actin 的灰度比值即为目的蛋白的相对表达量。

1.2.9 实时荧光定量 RT-PCR 检测肺组织 TLR4 mRNA 表达 Trizol 法提取大鼠肺组织匀浆总 RNA,取 500 ng RNA 进行逆转录,按说明书合成 cDNA,引物序列见表 1。按 PCR 反应试剂盒说明书进行反应,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,共 40 个循环。每一例样本反应结束后由软件读出结果 Ct 值。

表 1 TLR4 及 GAPDH 引物序列

Tab.1 Primer sequence of TLR4 and GAPDH

名称	引物序列
TLR4	上游 5'-GAGGACTGGGTGAGAAACGA-3'
	下游 5'-AGATACACCAACGGCTCTGG-3'
GAPDH	上游 5'-ATGGAAGCTGCTCATCAAC-3'
	下游 5'-GTGGTTCACCCATCACAA-3'

1.3 统计学方法

实验结果均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 19.0 进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

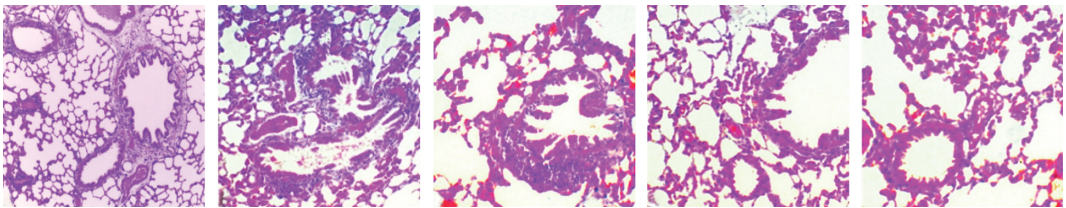
正常对照组大鼠未见明显症状,模型组大鼠较正常对照组相比,体质量减轻,毛发光泽度下降,并伴有喘息、咳嗽等症状。与模型组相比,杆努尽烟各给药组及阳性药物组的大鼠一般情况均有改善,其中杆努尽烟高剂量组症状明显改善。

2.2 大鼠肺组织病理学改变

病理观察结果显示(图 1),正常对照组大鼠肺组织未见损伤,肺泡壁完整均一,无炎性细胞浸润,细支气管上皮细胞排列整齐,结构完整;模型组大鼠肺组织可见肺泡壁增厚明显且不均一,肺泡间和气管旁有大量炎性细胞浸润,细支气管上皮细胞排列不整齐,管壁上皮细胞多处变性、坏死而脱落,管腔内可见明显分泌物,提示炎性损伤的发生,造模成功;杆努尽烟低剂量组大鼠肺组织肺泡壁增厚、炎细胞增生、细支气管上皮细胞、可见坏死脱落,但均较模型组减轻;杆努尽烟高剂量组大鼠肺组织肺泡壁增厚情况得到明显改善,细支气管上皮细胞排列情况与正常对照组相近,炎细胞增生情况缓解,管腔内分泌物明显减少;阳性药物对照组大鼠肺泡壁及细支气管周围炎细胞浸润程度明显减轻,上皮细胞排列较为完整,管腔内仍可见少量分泌物及脱落物。

2.3 大鼠肺组织中 TNF- α 含量

ELISA 法检测结果见表 2,模型组、阳性药物组和杆努尽烟低剂量组大鼠肺组织 TNF- α 含量与正常对照组相比均明显升高 ($P < 0.01$),其中杆努



正常对照组 模型组 杆努尽烟低剂量组 杆努尽烟高剂量组 阳性药物组

图 1 各组大鼠肺组织切片(HE, $\times 100$)

Fig.1 Lung tissue sections of rats in each group

尽烟高剂量组大鼠肺组织TNF-α含量最接近正常对照组;阳性药物组和杆努尽烟高、低剂量组大鼠组织TNF-α含量与模型组相比均显著降低($P<0.01$)。

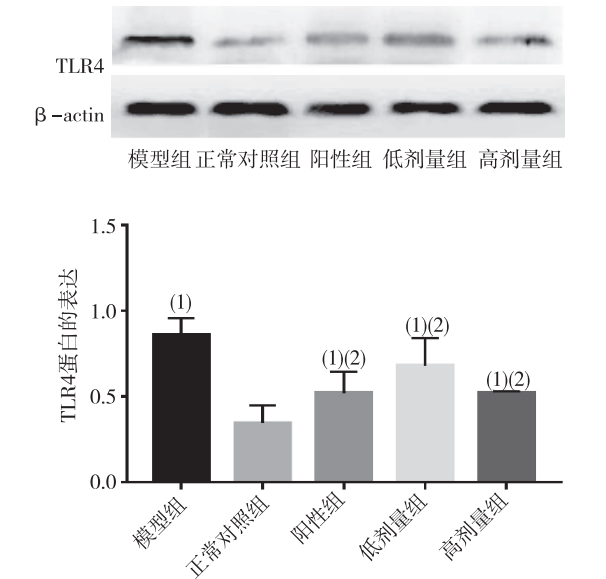
表2 各组大鼠肺组织中TNF-α含量($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Expression of TNF-α in lung tissue of rats in each group

组别	TNF-α (mg/L)
正常对照组	44.98 ± 4.36
模型组	72.96 ± 10.33 ⁽¹⁾
阳性药物组	54.98 ± 11.57 ⁽¹⁾⁽²⁾
杆努尽烟高剂量组	52.99 ± 1.33 ⁽¹⁾⁽²⁾
杆努尽烟低剂量组	59.27 ± 5.40 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与正常对照组比较, $P<0.05$; ⁽²⁾与模型对照组比较, $P<0.01$

2.4 大鼠肺组织中TLR4蛋白表达

Western blot 法检测结果见图2,模型组、杆努尽烟低、高剂量组及阳性药物组大鼠肺组织TLR4蛋白水平与正常对照组相比显著升高($P<0.05$),其中杆努尽烟高剂量组及阳性药物组大鼠肺组织TLR4蛋白水平较接近正常对照组;阳性药物组和杆努尽烟高剂量组大鼠肺组织TLR4蛋白水平与模型组相比均显著降低($P<0.05$)。



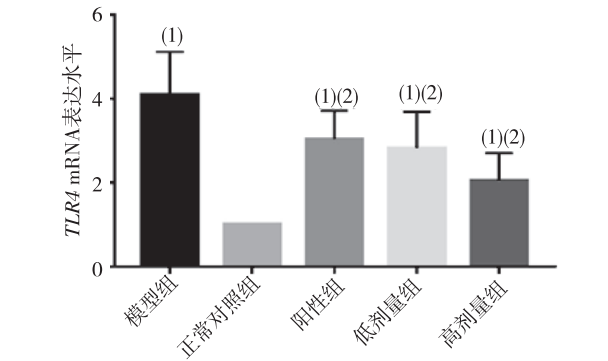
⁽¹⁾与正常对照组比较, $P<0.05$; ⁽²⁾与模型组比较, $P<0.05$

图2 各组大鼠肺组织TLR4蛋白表达
Fig.2 Expression of TLR4 protein in lung tissue of rats in each group

2.5 大鼠肺组织中TLR4 mRNA表达

实时荧光定量RT-PCR法检测结果见图3,模型组、阳性药物组、杆努尽烟高、低剂量组大鼠

TLR4 mRNA含量与正常对照组相比均显著升高($P<0.05$),其中杆努尽烟高剂量组较接近正常对照组。阳性药物对照组、杆努尽烟高、低剂量组大鼠TLR4 mRNA含量与模型组相比均显著下降($P<0.05$)。



⁽¹⁾与正常对照组比较, $P<0.05$; ⁽²⁾与模型组比较, $P<0.05$

图3 各组大鼠肺组织TLR4 mRNA水平
Fig.3 The level of TLR4 mRNA in lung tissue of rats in each group

3 讨论

气道炎症是慢性支气管炎生理机制中的一个关键环节,亦是其向COPD发展的重要病理生理基础^[9-10]。气道炎症性疾病的进展中,炎性因子TNF-α等可刺激单核-巨噬细胞产生更多的炎性介质,同时,TNF-α具有巨噬细胞和中性粒细胞的趋化作用,加重支气管炎,易导致组织损伤^[11-13]。革兰氏阴性菌感染是慢性气道疾病发生发展或反复加重的重要因素,作为TLR4的配体,脂多糖则是革兰氏阴性菌感染的主要毒力^[14]。近年研究表明,TLR4在气道及肺部疾病中的过度表达与细菌感染和炎症的加重密切相关^[15-16]。同时,有研究表明,香烟烟雾也能够激活TLR4,引发相关反应^[17-18]。因而,普遍认为TLR4在慢性支气管炎的发病机制中起着中枢调控作用。TLR4识别LPS后,可启动髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)依赖的信号通路,通过瀑布样的下游反应,使核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)激活,入核诱导特定基因的表达,最终引起前炎症因子IL-1、IL-8、TNF-α等的释放^[19]。

贵州省苗药资源丰富,苗医习用杆努尽烟治疗支气管炎等病,疗效显著。研究表明杆努尽烟中含

有黄酮类、苯乙醇类、 β -谷甾醇、熊果酸等有机化学成分,近年来大量文献表明,以上成分在抗炎、抗感染方面有一定疗效^[20-21]。本药方应用范围广、历史长,特别是在呼吸类疾病的治疗中应用较多。成药“复方岩连片”等已在临床使用,对慢性支气管炎具有显著疗效且安全性良好,而对于其治疗慢性支气管炎作用机制的研究少见报道,故本研究在前期研究的基础上进一步探究其确切疗效,并为其临床应用提供理论支持和实验数据。

本研究结果显示,杆努尽烟药物治疗后,大鼠肺部病理状态得到一定改善,与模型组相比,肺组织匀浆中 TLR4 及 TNF- α 水平均有所下调($P < 0.05$),其中高剂量组的改善效果可能更为明显,提示杆努尽烟能下调 TLR4 的表达水平,并有效抑制炎症因子 TNF- α 的释放,因此,本药方可能是通过干预受体 TLR4 介导的相关炎性信号通路,进而减少如 TNF- α 一类的炎性介质分泌,从而抑制气道炎症。

综上所述,TLR4 及 TNF- α 可能在慢性支气管炎的进程中起炎症损伤作用,苗药杆努尽烟可通过影响其表达水平,抑制气道炎症。

4 参考文献

- [1] 贺立立,陈勤,彭申明,等. 桔梗皂苷对慢性支气管炎小鼠肺细胞中的 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(1): 17-23.
- [2] PELKONEN M K, NOTKOLA I L K, LAATIKAINEN T K, et al. Chronic bronchitis in relation to hospitalization and mortality over three decades[J]. Respir Med, 2017 (123): 87-93.
- [3] PACE E, FERRARO M, GIARRATANO A, et al. TLR4 up-regulation and reduced Foxp3 expression in mechanically ventilated smokers with obstructive chronic bronchitis[J]. COPD, 2013, 10(2): 147-155.
- [4] DI STEFANO A, CARAMORI G, OATES T, et al. Increased expression of nuclear factor- κ B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD [J]. Eur Respir J, 2002, 20(3): 556-563.
- [5] 潘明鸣. Toll 样受体在慢性阻塞性肺疾病发病机制中的作用[D]. 北京:中国协和医科大学, 2008.
- [6] 汪志勇,江峰,徐红,等. 苗药吊石苣苔的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(22): 64-65.
- [7] 王瑛. 气道滴入加烟熏法建立慢性支气管炎大鼠模型的实验研究[J]. 实用医药杂志, 2011, 28(7): 633-635.
- [8] 王勤,邓家刚,杨柯,等. 芒果苷对慢性支气管炎大鼠炎症因子及小鼠巨噬细胞环氧化酶-2 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1348-1352.
- [9] 唐光华,黄启福,姜良铎. 艾麻口服液对慢性支气管炎大鼠气道炎症影响的实验研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007;33(11): 748-752.
- [10] PELKONEN M K, NOTKOLA I L K, LAATIKAINEN T K, et al. Twenty-five-year trends in prevalence of chronic bronchitis and the trends in relation to smoking[J]. Respiratory Medicine, 2014, 108(11): 1633-1640.
- [11] 孙圣华,唐文祥,刘纯,等. 肿瘤坏死因子 α 对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型呼吸肌蛋白质分解代谢的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(3): 186-191.
- [12] 杜秀婷,林海雄,卓桂锋,等. 苏子降气汤对慢性支气管炎模型小鼠 TNF- α 、IL-8 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2311-2313.
- [13] SAINI Y, LEWIS BW, YU D, et al. Effect of LysM + macrophage depletion on lung pathology in mice with chronic bronchitis [J]. Physiological Reports, 2018, 6(8): e13677.
- [14] 田刚. 慢性阻塞性肺疾病血管重建与 Toll 样受体4、核因子- κ B 及活化蛋白-1 的临床研究[D]. 青岛:青岛大学, 2012.
- [15] DI STEFANO A, RICCIARDOLO F L M, CARAMORI G, et al. Bronchial inflammation and bacterial load in stable COPD is associated with TLR4 overexpression[J]. Eur Respir J, 2017, 49(5): 1602006.
- [16] COSIO M G, SAETTA M, AGUSTI A, et al. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2009, 360(23): 2445-2454.
- [17] BARUA R S, SHARMA M, DILEEPAN K N. Cigarette smoke amplifies inflammatory response and atherosclerosis progression through activation of the H1R-TLR2/4-COX2 axis[J]. Front Immunol, 2015, 6: 572.
- [18] 王萍,曾玉兰,熊玮,等. TLR4/NF- κ B 在烟雾暴露大鼠肺血管重塑中的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(11): 2083-2087.
- [19] POOLE J A, WYATT T, ROMBERGER D J, et al. TLR4 in lung resident cells governs airway inflammatory and pulmonary function responses to organic dust treatment [J]. Respiratory Res, 2015, 16(1): 111-122.
- [20] 饶澄,黄显. 黄酮类化合物抗炎和抗肿瘤共同作用机制的研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(6): 8-11.
- [21] 肖志彬,贾韩学,刘小雷. β -谷甾醇药理活性的研究现状[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(8): 66-68.

(2018-09-12 收稿,2018-11-19 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:乐 萍