

• 实验研究 •

调补肺肾三法对香烟烟雾提取物和脂多糖刺激单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子的影响

陈玉龙 吴耀松 李建生* 赫丽丽 田燕歌 李 亚

河南中医学院, 河南省郑州市金水路 1 号, 450008)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81130062); 教育部新世纪优秀人才项目(NCET-11-0946)

* 通讯作者: li_js8@163.com, (0371)65676568

[摘要] 目的 探讨调补肺肾三法治疗慢性阻塞性肺疾病的分子机理。方法 用香烟烟雾提取物(CSE)和脂多糖(LPS)及两者联合(LC)体外刺激单核巨噬细胞 THP-1, 每种刺激物下分为正常组(加入 20% 正常大鼠血清)、刺激物组(加入 20% 正常大鼠血清和 5% CSE, 或 75 pg/ml LPS, 或 5% CSE 和 75 pg/ml LPS)、补肺益肾组、补肺健脾组和益气滋肾组(加 20% 相应方药大鼠含药血清和 5% CSE, 或 75 pg/ml LPS, 或 5% CSE 和 75 pg/ml LPS), 检测各组肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-3 (IL-3)、巨噬细胞-粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)、转化生长因子- β (TGF- β)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1)、超氧化物歧化酶(SOD)、CD36、磷脂酸磷酸酶 2B (PPAP2B), 应用网络工具分析细胞因子的转录因子。结果 与正常组比较, CSE 组、LPS 组和 LC 组分泌 MMP-9 增加, 分泌 TNF- α 和 PPAP2B 减少; CSE 组分泌 TIMP-1 减少, LPS 组分泌 TGF- β 增加, LC 组 GM-CSF 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3 个复方对细胞分泌的各因子调节明显不同($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中补益肺肾方在各条件下, 所调节分泌的因子和涉及转录因子较为广泛。结论 CSE 和 LPS 对 THP-1 分泌细胞因子影响不同, 调补肺肾三法在一定程度上都对 CSE 和 LPS 刺激下分泌细胞因子有调控作用, 补益肺肾方药作用最明显而广泛, 补肺健脾方次之。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 调补肺肾三法; 香烟烟雾提取物; 脂多糖; 细胞因子; THP-1 细胞

Effect of Three Therapies of Regulating and Supplementing the Lung and Kidney on the Cytokine Secretion of THP-1 Monocytes and Macrophages Stimulated with Cigarette Smoke Extract and Lipopolysaccharide

CHEN Yulong, WU Yaosong, LI Jiansheng, HE Lili, TIAN Yange, LI Ya

(Henan University of TCM, Henan Province 450008)

ABSTRACT Objective To analyze the molecular mechanism of three formula of regulating and supplementing the lung and kidney for chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** THP-1 monocytes and macrophages were stimulated with cigarette smoke extract (CSE), lipopolysaccharide (LPS) or their combination (LC) in vitro. Every kinds of stimulants were divided into normal group (20% normal rat serum was added), stimulant group (20% normal rat serum and 5% CSE, or 75 pg/ml LPS, or 5% CSE and 75 pg/ml LPS were added), supplementing the lung and kidney group, supplementing the lung and spleen group, and boosting qi enriching the kidney group (20% rat serum containing relevant formula and 5% CSE, or 75 pg/ml LPS, or 5% CSE and 75 pg/ml LPS were added). Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin 3 (IL-3), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), transforming growth factor- β (TGF- β), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), superoxide dismutase (SOD), CD36 and phosphatidic acid phosphatase 2B (PPAP2B) were detected in all groups. The transcription factor of cytokine was analyzed with network tools. **Results** Comparing with the normal group, the secretion of MMP-9 was increased and the secretion of TNF- α and PPAP2B was decreased in CSE group, LPS group and LC group; the secretion of TIMP-1 was decreased in CSE group, the secretion of TGF- β was increased in LPS group and the secretion of GM-CSF was increased in LC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The regulation to the cytokine secretion of three formula was different ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). More cytokines and transcription factors could be regulated by supplementing the lung and kidney formula. **Conclusion** The effect of CSE and LPS on the cytokine secretion of THP-1 cells is different. All the three formula of regulating and supplementing the lung and kidney could regulate the cytokine secretion of THP-1 cells stimulated with CSE and LPS, among which the effect of supplementing the lung and kidney formula is obvious and broad, followed by supplementing the lung and spleen formula.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; three formula of regulating and supplementing the lung and kidney; cigarette smoke extract; lipopolysaccharide; cytokine; THP-1 cell

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种具有气流受限特征的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。反复气道感染是 COPD 进展和肺功能下降的关键因素,肺泡巨噬细胞在 COPD 病理过程起中心作用^[1]。结合 COPD“正虚积损”的病机特点,制定了以补益肺肾兼顾脾、佐以祛痰活血的调补肺肾法及其三法,即补肺健脾法、补肺益肾法、益气滋肾法。研究发现其治疗肺功能 I ~ III 级的 COPD 稳定期具有明显效果^[2],机制可能为调节患者细胞免疫功能、改善细胞外基质损伤、减低炎性细胞和炎性因子及黏附分子水平等^[3]。为了进一步研究调补肺肾三法及其对应方药的作用机制,本研究以香烟烟雾提取物(CSE)和脂多糖(LPS)作为刺激剂,以诱导的单核巨噬细胞 THP-1 为研究对象,观察调补肺肾三法相应方药对其分泌细胞因子的影响。

1 材料

1.1 药物及细胞株

补肺健脾方由党参 15g,白术 12g,茯苓 12g,炙甘草 6g 等组成;补肺益肾方由人参 9g,山茱萸 12g,五味子 9g,陈皮 9g 等组成;益气滋肾方由人参 9g,枸杞子 12g,麦冬 15g,炙甘草 6g 等组成。药物由河南中医学院第一临床医学院中药制剂与剂型改革基地提供,用具有挥发油药物水蒸馏,收集挥发油,备用;药渣与其他药物采用 80% 乙醇回流、减压回收乙醇、浓缩,备用;乙醇回流后的药渣水煎煮过滤减压浓缩,混合 2 次浸膏和挥发油。用水制成 1g/ml 悬乳液。单核巨噬细胞 THP-1 购于中国科学院上海生化与细胞所。

1.2 试剂

DMEM 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),MTT、台盼蓝、LPS(Sigma 公司),二甲基亚砜(DMSO)、聚丙烯酸甲酯(PMA, Amresco 公司),肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号:GS-E10031)、白细胞介素-1 β (IL-1 β , 批号:GS-E20121)、白细胞介素-3(IL-3, 批号:GS-E10143)、巨噬细胞一粒细胞集落刺激因子(GM-CSF, 批号:GS-E10393)、转化生长因子- β (TGF- β , 批号:GS-E10031)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9, 批号:GS-E10933)、金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1, 批号:GS-E10316)、超氧化物歧化酶(SOD, 批号:GS-E11086)、CD36(批号:GS-E10043)、磷脂酸磷酸酶 2B(PPAP2B, 批号:GS-

E20145)ELISA 试剂盒(上海信然生物技术有限公司)。

1.3 实验动物

SD 大鼠 40 只,SPF 级,雌雄各半,4 月龄,体重 200~220g,由河北省实验动物中心提供,动物合格证号:1104072。

1.4 主要仪器设备

Heraeus 细胞培养箱(Kendro 公司),倒置显微镜(ZEISS 公司),紫外分光光度计(BioMate 公司),SG-603 生物安全柜(Baker 公司),ELx800 型酶标仪(BIO-TEK 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备^[4]

采用随机数字表法将大鼠分为正常组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组,每组 10 只。3 个用药组以 18g/kg 连续灌胃相应方药,每日 2 次,两次相隔 12h,连续灌胃 7 次;正常组灌胃等量生理盐水。末次给药后 2h(灌药前禁食不禁水 12h)腹主动脉采血,3000r/min 离心 15min,无菌分离血清,同组血清相混合,经 56℃、30min 灭活后, -20℃ 保存备用。

2.2 CSE 制备

根据文献^[5]方法改良,1 支去过滤嘴燃烧的香烟(红旗渠牌,焦油含量 13mg,烟气烟碱含量 1.1mg),由 50ml 注射器负压吸引连续抽吸,每次抽吸时间约 10s,300ml 烟雾导入 25ml 无血清的 RPMI1640 培养基中制成悬液,用 1mol/L NaOH 调 pH 值至 7.4,通过 0.22 μ m 的滤器过滤除菌,得到的悬液定义为 100% 的 CSE。CSE 浓度用紫外分光光度计在波长为 320nm 进行检测,使不同批次的 CSE 溶液吸光值相差 0.2 左右。

2.3 细胞培养

单核巨噬细胞 THP-1 培养于含 10% 胎牛血清,100U/ml 青霉素,100U/ml 链霉素,0.05mmol/L 的 β -巯基乙醇的 RPMI 1640 完全培养基中,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2 天更换 1 次培养液,约每 3 天按 1:3 比例传代 1 次。

2.4 药物刺激

2.4.1 最佳 CSE 和 LPS 刺激浓度的筛选 实验按照 CSE 和 LPS 的浓度梯度依次分为以下 10 组:空白对照组、5% CSE 刺激组、10% CSE 刺激组、20% CSE 刺激组、40% CSE 刺激组、12.5pg/ml LPS 刺激组、25pg/ml LPS 刺激组、50pg/ml LPS 刺激

组、75pg/ml LPS 刺激组、150pg/ml LPS 刺激组。每孔 1×10^4 单核细胞 THP-1 接种 96 板,培养 24h 后,空白对照组换为无血清 RPMI1640 培养基,CSE 刺激组分别换为含不同浓度的 CSE 的无血清 RPMI1640 培养基,LPS 刺激组分别换为含不同浓度 LPS 的无血清 RPMI1640 培养基,37℃、5%CO₂ 培养 48h。每个浓度 6 个重复孔,重复 3 次实验。用 MTT 法测定细胞增殖情况,以对细胞生长没有明显促进和抑制的最高浓度确定为最佳浓度。研究发现,5% CSE 和 75pg/ml LPS 对细胞株没有出现明显抑制和促进生长作用。因此,选用 5% CSE 和 75pg/ml LPS 作为以下实验刺激浓度。

2.4.2 分组给药 每孔 1×10^4 单核巨噬细胞 THP-1 接种 96 板,同时加入 20μmol/L 佛波酯 (PHA)培养 24h 后,以孔为单位。①在 CSE 刺激下:正常组(加入含 200ml/L 正常大鼠血清),CSE 组(加入含 200ml/L 正常大鼠血清和终浓度为 5% CSE),补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组(加入含 200ml/L 相应大鼠含药血清和终浓度为 5% CSE)。②在 LPS 刺激下:LPS 组(加入含 200ml/L 正常大鼠血清和终浓度为 75pg/ml LPS),补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组(加入含 200ml/L 相应大鼠含药血清和终浓度为 75pg/ml LPS)。③在 LPS 联合 CSE 刺激(LC)下:LC 组(加入含 200ml/L 正常大鼠血清和终浓度为 75pg/ml LPS+5% CSE),补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组(加入含 200ml/L 相应大鼠含药血清和终浓度为 75pg/ml LPS+5% CSE)。上述各组设 4 个复孔,37℃,5%CO₂ 培养 48h 后收集细胞上清-80℃ 保存备用。重复 3 次实验。

2.5 ELISA 法检测细胞因子

严格按照 ELISA 说明书,检测单核巨噬细胞

THP-1 培养基上清中 GM-CSF、TNF-α、IL-1β、IL-3、MMP-9、TIMP-1、TGF-β、SOD、CD36、PPAP2B。

2.6 转录因子分析

采用 Essaghir A's 法^[6]在线进行转录因子分析。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计,对数据进行正态分布检验,符合正态分布者采用单因素方差分析的 SNK 法,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 CSE 及 LPS 刺激对 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

表 1 示,与正常组比较,CSE 组、LPS 组和 LC 组 THP-1 分泌 MMP-9 增加,分泌 TNF-α 和 PPAP2B 减少;CSE 组分泌 TIMP-1 减少,LPS 组分泌 TGF-β 增加,LC 组 GM-CSF 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。LPS 组 TNF-α、TGF-β 和 PPAP2B 与 CSE 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。LC 组 TIMP-1 与 CSE 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);LC 组 TGF-β、PPAP2B 与 LPS 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.2 含药血清对 5% CSE 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

表 2 示,与 CSE 组比较,补肺益肾组分泌 GM-CSF 减少($P < 0.01$),TIMP-1、PPAP2B、MMP-9 和 CD36 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);补肺健脾组分泌 GM-CSF、PPAP2B 减少,TIMP-1、TGF-β 分泌增加($P < 0.01$);益气滋肾组分泌 MMP-9 和 CD36 增加($P < 0.05$)。补肺健脾组分泌 MMP-9、TGF-β、PPAP2B、CD36 和益气滋肾组分泌 GM-CSF、MMP-9、TIMP-1、PPAP2B 与补肺益肾组比较

表 1 CSE 和 LPS 刺激对 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞因子	孔数	正常组	CSE 组	LPS 组	LC 组
GM-CSF(ng/L)	4	15.22±1.12	17.08±1.28	14.12±1.30	18.17±2.10*
TNF-α(ng/L)	4	75.11±8.15	49.50±6.86**	38.73±3.12**▲	50.65±5.02**
IL-3(ng/L)	4	3.57±0.56	3.45±0.41	3.30±0.29	2.64±0.47
MMP-9(μg/L)	4	106.41±12.36	158.30±13.25**	140.13±13.72*	140.02±13.52*
TIMP-1(μg/L)	4	12.60±1.23	9.17±1.45*	11.14±1.02	13.89±1.44▲▲
IL-1β(pg/L)	4	3.49±0.98	3.81±0.66	3.84±0.42	3.06±0.42
SOD(U/ml)	4	8.04±1.21	8.11±1.35	7.74±0.62	6.45±0.49
TGF-β(ng/L)	4	72.84±6.56	76.48±7.02	114.65±10.89**▲▲	85.76±7.95△
PPAP2B(pg/L)	4	28.91±2.33	20.69±2.45**	14.99±1.07**▲▲	21.52±1.49**△
CD36(ng/L)	4	1.43±0.24	1.58±0.16	1.46±0.09	1.72±0.24

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 CSE 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与 LPS 组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 2 含药血清对 5% CSE 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞因子	孔数	CSE 组	补肺益肾组	补肺健脾组	益气滋肾组
GM-CSF(ng/L)	4	17.08±1.28	11.16±0.98**	11.08±0.87**	18.17±2.12▲▲△△
TNF-α(ng/L)	4	49.50±6.86	63.25±7.42	53.89±6.12	48.38±6.45
IL-3(ng/L)	4	3.45±0.41	3.21±0.58	4.15±0.64	2.64±0.25△
MMP-9(μg/L)	4	158.30±13.25	338.90±21.78**	137.67±12.97▲▲	200.58±18.68*▲▲△△
TIMP-1(μg/L)	4	9.17±1.45	17.56±2.32**	19.34±2.71**	11.34±2.10▲▲△△
IL-1β(pg/L)	4	3.81±0.66	2.39±0.62	3.69±0.69	3.19±0.46
SOD(U/ml)	4	8.11±1.35	6.49±1.56	6.78±1.27	6.58±1.48
TGF-β(ng/L)	4	76.48±7.02	82.07±6.87	104.39±8.69**▲▲	81.93±7.21△
PPAP2B(pg/L)	4	20.69±2.45	35.59±3.16**	10.98±2.75**▲▲	15.64±3.56▲▲
CD36(ng/L)	4	1.58±0.16	2.39±0.32*	1.80±0.25▲	2.55±0.41*△

注:与 CSE 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与补肺益肾组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与补肺健脾组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表 3 含药血清对 75pg/ml LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞因子	孔数	LPS 组	补肺益肾组	补肺健脾组	益气滋肾组
GM-CSF(ng/L)	4	14.12±1.30	17.11±1.37*	15.72±1.50	10.20±0.91**▲▲△△
TNF-α(ng/L)	4	38.73±3.12	61.25±6.03**	45.88±4.08▲	100.69±9.37**▲▲△△
IL-3(ng/L)	4	3.30±0.29	3.81±0.34	3.60±2.89	3.19±3.01
MMP-9(μg/L)	4	140.13±13.72	255.10±25.10**	190.72±18.88*▲▲	227.73±20.26**△
TIMP-1(μg/L)	4	11.14±1.02	20.42±2.11**	14.62±1.75▲▲	13.12±1.81▲▲
IL-1β(pg/L)	4	3.84±0.42	2.95±0.25	2.59±0.46*	3.69±0.49▲△
SOD(U/ml)	4	7.74±0.62	10.66±1.45**	6.48±0.73▲▲	6.48±0.49▲▲
TGF-β(ng/L)	4	114.65±10.89	64.24±6.72**	67.45±5.86**	79.58±7.32**
PPAP2B(pg/L)	4	14.99±1.07	23.42±2.73**	16.93±0.84▲▲	18.63±1.42▲▲
CD36(ng/L)	4	1.46±0.09	1.90±0.24*	2.05±0.12*	2.19±0.42*

注:与 CSE 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与补肺益肾组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与补肺健脾组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表 4 含药血清对 5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

细胞因子	孔数	LC 组	补肺益肾组	补肺健脾组	益气滋肾组
GM-CSF(ng/L)	4	18.17±2.10	14.84±1.01**	12.97±0.87**	12.00±0.25**▲
TNF-α(ng/L)	4	50.65±5.02	41.99±3.82	80.77±7.52**▲▲	71.22±6.99**▲▲
IL-3(ng/L)	4	2.64±0.47	3.61±0.34*	3.91±0.19**	2.74±0.25▲▲△
MMP-9(μg/L)	4	140.02±13.52	202.51±21.01**	167.69±15.76*▲	106.79±10.12**▲▲△
TIMP-1(μg/L)	4	13.89±1.44	16.46±1.10	15.45±1.78	12.70±1.14▲
IL-1β(pg/L)	4	3.06±0.42	2.41±0.48	2.69±0.13	2.96±0.45
SOD(U/ml)	4	6.45±0.49	9.54±0.75**	7.62±0.75*▲▲	4.73±0.46**▲▲△
TGF-β(ng/L)	4	85.76±7.95	65.89±5.97*	83.20±8.01▲	94.22±9.12▲▲
PPAP2B(pg/L)	4	21.52±1.49	12.75±1.21**	15.29±1.15**▲	24.35±1.82*▲▲△
CD36(ng/L)	4	1.72±0.24	1.91±0.24	1.60±0.13	1.87±0.21

注:与 CSE 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与补肺益肾组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与补肺健脾组比较,△ $P<0.01$

差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。益肾滋肾组分泌 GM-CSF、MMP-9、TIMP-1、TGF-β、CD36、IL-3 与补肺健脾组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.3 含药血清对 75pg/ml LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

表 3 示,与 LPS 比较,补肺益肾组分泌 TNF-α、PPAP2B、TIMP-1、SOD、MMP-9 和 GM-CSF、CD36 增加,TGF-β 分泌减少($P<0.05$ 或 $P<$

0.01);补肺健脾组分泌 MMP-9 和 CD36 增加,TGF-β 和 IL-1β 分泌减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);益气滋肾组分泌 TGF-β、GM-CSF 减少,TNF-α、MMP-9 和 CD36 分泌增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。补肺健脾分泌 TNF-α、MMP-9、TIMP-1、SOD、PPAP2B 和益气滋肾组分泌 GM-CSF、TNF-α、TIMP-1、IL-1β、SOD、PPAP2B 与补肺益肾组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。益肾滋肾组分泌 GM-CSF、TNF-α、MMP-9、IL-1β 与补肺健

脾组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.4 含药血清对 5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

表 4 示,与 LC 组比较,补肺益肾组分泌 GM-CSF、PPAP2B 和 TGF- β 减少,SOD、MMP-9 和 IL-3 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);补肺健脾组分泌的 GM-CSF 减少,TNF- α 、IL-3、PPAP2B、MMP-9 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);益气滋肾组分泌 GM-CSF、SOD 和 MMP-9 减少,TNF- α 、TGF- β 分泌增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肺健脾组分泌 TNF- α 、MMP-9、SOD、TGF- β 、PPAP2B 和益气滋肾组分泌 GM-CSF、TNF- α 、IL-3、MMP-9、TIMP-1、SOD、TGF- β 、PPAP2B 与补肺益肾组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。益气滋肾组分泌 IL-3、MMP-9、SOD、PPAP2B 与补肺健脾组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.5 含药血清对细胞因子的转录因子影响

把含药血清对它影响的细胞因子输入在线工具(www.tfacts.org),条件是: P 值 < 0.05 , E 值 0.05 , Q 值 < 0.05 ,假阳性率 < 0.05 。补益肺肾组 5% CSE 刺激下细胞因子 NF κ B1、STAT3 和 PPARG,75pg/ml LPS 刺激下细胞因子 AP1、NF κ B1、STAT3、SMAD3 和 PPARG,5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激下细胞 AP1、NF κ B1、STAT3、SMAD3 符合以上条件。补肺健脾组 5% CSE 刺激下细胞 SMAD3、STAT 3,75pg/ml LPS 刺激下细胞 NF κ B1 和 PPARG,5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激下细胞的 AP1 符合以上条件。益气滋肾组 5% CSE 刺激下细胞 PPARG,75pg/ml LPS 及 5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激下细胞 NF κ B1 符合以上条件。

4 讨论

吸烟是导致 COPD 主要的危险因素,香烟烟雾中所含的多种有害物质可损伤肺上皮细胞,激发炎症反应。气道中持续的炎症和氧化应激及肺基质破坏是其病理特点,而 COPD 患者又常易感染细菌和病毒而加重病情。小气道炎症主要以巨噬细胞、T 淋巴细胞和中性粒细胞聚集为特点,与 COPD 的急性加重密切相关,其中肺泡巨噬细胞在 COPD 病理过程起中心作用,它可以分泌多种细胞因子和蛋白酶,无论对炎症细胞趋化、活化,还是对气道重塑都起到关键作用^[7-10]。本实验结果表明,一定浓度香烟烟雾提取物和 LPS 对单核巨噬细胞株 THP-1 有一定促进增殖作用,在 CSE10%~40% 浓度范围内

有剂量依赖性。而 48h 内 5% CSE 或 75pg/ml LPS 浓度的细胞生长影响很小。为了排除由于细胞数目的变化对检测分泌因子的干扰,本研究选择了 5% CSE 和 75pg/ml LPS 作为刺激剂量。

巨噬细胞可以通过自分泌和旁分泌活化自身和其他炎症细胞,使其产生其他多种细胞因子^[11]。TNF- α 和 IL-1 β 是其重要的炎症因子,GM-CSF 对气道中巨噬细胞和中性粒细胞的不断成熟有重要作用。在 COPD 患者中支气管肺泡灌洗液中,GM-CSF 的浓度增加,尤其是在急性加重期。TGF- β 不但参与了成纤维细胞及气道平滑肌细胞的增殖、细胞外基质的沉积以及上皮的修复,还参与了免疫调节作用^[12-13]。本结果表明,经 PMA 诱导的 THP-1 能够分泌 TNF- α 、IL-1 β 、GM-CSF 和 TGF- β ,但在 5% CSE、75pg/ml LPS 及 5% CSE 联合 75pg/ml LPS 刺激下,分泌的多少有所不同,而 3 个复方对它们调解下作用也有很大差别。说明 CSE 和 LPS 对巨噬细胞作用机制不同,在病理过程中又有交互作用,在临床上吸烟和细菌感染对 COPD 作用可以相互影响,同时也说明 3 个复方中药作用靶点有别。从整体结果看,补肺益肾方纠正 CSE 和 LPS 刺激所引起分泌变化的细胞因子数目最多,补肺健脾方作用次之,益气滋肾方作用最少;但对于 CSE 联合 LPS 刺激,补肺健脾方所纠正的变化细胞因子数最多,补肺益肾和益气滋肾方作用相当。

COPD 存在蛋白酶—抗蛋白酶失衡,主要表现为蛋白酶量的增多和抗蛋白酶不足,导致肺组织受损和气道重塑。中性粒细胞、巨噬细胞和气道上皮细胞所产生基质金属蛋白酶(MMPs)可降解所有肺实质中细胞外基质成分,金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)具有对抗 MMPs 的效应^[14]。本研究结果显示,3 个复方对细胞分泌的 TIMP-1 和 MMP-9 调节明显不同,值得注意的是,除益气补肾法对 5% CSE 联合 75pg/ml LPS 联合刺激下分泌 MMP-9 和 TIMP-1 负调节外,5% CSE、75pg/ml LPS 刺激条件下,3 个复方对分泌 TIMP-1 和 MMP-9 都是正调节作用,其原因可能两者都受到 AP1 转录因子的调节。

为了进一步分析含药血清调控细胞分泌细胞因子的机理,我们利用网络数据库和工具对其有所调控作用的细胞因子进行了转录因子分析。有较多方法可以通过多个分子表达的量对其转录因子进行富集分析^[15],本研究采用 Ahmed Essaghir's 的方法,

所利用的转录因子靶基因数据库是经过高质量实验验证,用 Hypergeometric 公式进行 Fisher's test 计算 P 值。结果发现,3 个复方中补益肺肾方在各条件下,所调节分泌的因子和涉及转录因子较为广泛,这些转录因子都参与了炎症反应。

CSE 和 LPS 在刺激单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子作用不同,但两者有交互作用。3 个调补肺肾方药在一定程度上都对 CSE 和 LPS 刺激下分泌细胞因子和转录因子有一定调控作用,补益肺肾方药作用最明显而广泛,补肺健脾方次之,其调控分泌细胞因子的机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). The Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD [EB/OL]. 2010[2012-05-25]. <http://www.goldcopd.org/>
- [2] 张海龙. 辨证治疗慢性阻塞性肺病稳定期的疗效及全身炎症反应的影响[D]. 郑州:河南中医学院, 2010.
- [3] 邓丽. 调补肺肾三法治疗 COPD 稳定期大鼠的远后效应及其对炎症因子的影响[D]. 郑州:河南中医学院, 2011.
- [4] 王力倩,李仪奎,符胜光,等. 血清药理学方法研究探索[J]. 中药药理与临床, 1997, 17(3): 29-31.
- [5] Pace E, Ferraro M, Siena L, et al. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells[J]. Immunology, 2008, 124(3): 401-411.
- [6] Essaghir A, Toffalini F, Knoops L, et al. Transcription factor regulation can be accurately predicted from the presence of target gene signatures in microarray gene expression data[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(11): 120.
- [7] Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications[J]. Environ Health Perspect, 1985, 64: 111-126.
- [8] Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD[J]. COPD, 2004, 1(1): 59-70.
- [9] Byers DE, Holtzman MJ. Alternatively activated macrophages and airway disease[J]. Chest, 2011, 140(3): 768-774.
- [10] Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(2): 336-363.
- [11] Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(4): 515-548.
- [12] Vlahos R, Bozinovski S, Chan SP, et al. Neutralizing granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(1): 34-40.
- [13] Königshoff M, Kneidinger N, Eickelberg O. TGF-beta signalling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimens [J]. Swiss Med Wkly, 2009, 139(39-40): 554-563.
- [14] Mocchegiani E, Giacconi R, Costarelli L. Metalloproteases/anti-metalloproteases imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: genetic factors and treatment implications[J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17 (Suppl 1): 11-19.
- [15] Hestand MS, van Galen M, Villerius MP, et al. CORE__TF: a user-friendly interface to identify evolutionary conserved transcription factor binding sites in sets of co-regulated genes[J]. BMC Bioinformatics, 2008, 9: 495.

(收稿日期: 2012-05-25; 修回日期: 2012-08-01)

[编辑: 邓媛]

基层医生手穴诊疗培训班招生通知

为了发掘民族瑰宝、弘扬中医精粹,满足广大基层学员对中医特色诊疗的需求,世界针联世针针灸交流中心拟于 2012 年 12 月在北京举办 2012 年国家中医药继续教育项目“基层医生手穴诊疗培训班”。由中国人体健康科技促进会医药科技专业委员会副主任委员、中国老年教授协会医药专业委员会手诊分会副会长、江苏省常州市手穴诊疗研究所所长刘浩兴主讲、传授“望诊、触诊、压诊”的手穴诊疗方法。该法以中医整体观念为基石,融西医组织解剖理论,结合中医“四诊”察病智慧与经络腧穴治病经验,创造性的将中医整体理论运用于手诊,数分钟即可概知家族遗传性疾病和自身健康状况,鉴别诊断多种疑难病症,方法独特,在临床有较高的实用价值。该法还能根据掌、指的各种特征预测部分隐患。该手诊方法直观明了、易学易用,为广大医务工作者诊病寻根、治病求本、治未病提供了新思路、新方法,尤其适用于基层。

每人学费 1200 元(含培训费、资料费等),学期 3 天,交通、食宿费用自理,会务组可协助安排食宿事宜。每班 40 人开班。学习经考核合格予以结业,颁发中英文对照的结业证书和国家继续教育学分证书 I 类继续教育学分 12 分。凡参加学习者的优秀论文,《世界中医药》杂志将优先发表。欲参加学习者请先交报名费 50 元,并附个人简况、身份证复印件(注明通讯地址、邮政编码、联系电话、邮箱以及职业等)。会务组收到报名函后即做安排。经审查合格,在开班前 1 个月内发入学通知。

报名地址与联系方式:北京市朝阳区小营路 19 号财富嘉园 A 座 302 室,《世界中医药》杂志社。邮编:100101。电话:(010)62143672。邮箱:13901318403@139.com。手机:13901318403。传真:(010)58239066。联系人:徐晖、赵和爱。