

· 基础研究 ·

补肺汤对 HMGB1 诱导的特发性肺纤维化
相关细胞 TLR2/NF- κ B 信号通路的影响

文秀华 杨红军

摘要 目的 观察补肺汤对高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 诱导的人非小细胞肺癌细胞 (A549) 和人肺成纤维细胞 (HFL1) 形态损伤、炎症反应和 Toll 样受体 2/髓样分化蛋白 88/核因子- κ B (TLR2/MyD88/NF- κ B) 信号通路的影响。**方法** 使用冷冻技术制备补肺汤冻干粉,大鼠补肺汤灌胃 4 周后取含药血清。将 A549 细胞和 HFL1 细胞随机分为空白组、HMGB1 组 (HMGB1 诱导)、补肺汤冻干粉预培养加 HMGB1 组 (冻干粉组,冻干粉浓度分别为 0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%)、补肺汤含药血清预培养加 HMGB1 组 (含药血清组,含药血清浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%)、阳性药物组 (甲泼尼龙) 及空白血清组,按照分组处理细胞。电镜下观察各组细胞形态和超微变化,ELISA 法检测细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NF- κ B 含量,Western Blot 法检测细胞中 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达。**结果** 电镜显示 HMGB1 组细胞形态和超微结构损伤明显,补肺汤冻干粉和含药血清能有效恢复细胞形态和超微结构损伤,且浓度越高,恢复效果越显著。与空白组比较, HMGB1 组细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NF- κ B 含量均升高 ($P < 0.01$), TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 HMGB1 组比较,冻干粉组和含药血清组能浓度依赖性地降低细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NF- κ B 含量,且 0.25% 和 0.30% 冻干粉组及 15%、20% 和 25% 含药血清组含量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 浓度依赖性抑制 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达,且 0.30% 冻干粉组和 25% 含药血清组抑制作用明显 ($P < 0.01$); 补肺汤冻干粉与含药血清各浓度组间各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 补肺汤冻干粉及含药血清对 HMGB1 诱导的 A549 和 HFL1 细胞损伤有保护作用,并能减轻炎症因子的释放,机制可能与下调 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路有关。

关键词 补肺汤;人非小细胞肺癌细胞;人肺成纤维细胞;Toll 样受体;转导通路

Effects of Bufei Decoction on TLR2/NF- κ B Signal Pathway in HMGB1-Induced Idiopathic Pulmonary Fibrosis Cells WEN Xiu-hua, and YANG Hong-jun *Department of Geriatrics, Sichuan No. 2 Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610031)*

ABSTRACT Objective To investigate the effects of Bufei Decoction (BFD) on morphological damage, inflammatory response, and toll like receptors 2/myeloid differential protein-88/ nuclear factor kappa-B (TLR2/MyD88/NF- κ B) signaling pathways in human non-small cell lung cancer (A549) cells and human lung fibroblasts (HFL1) cells induced by high mobility family protein B1 (HMGB1). **Methods** BFD lyophilized powder was prepared by freezing technique, the medicated serum was taken after gavage of BFD for 4 weeks. A549 cells and HFL1 cells were randomly divided into the blank group, HMGB1 group (HMGB1-induction), BFD lyophilized powder pre-culture plus HMGB1 group (lyophilized powder group, the concentration of lyophilized powder was 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.25%, and 0.30%, respectively), BFD medicated serum pre-culture plus HMGB1 group (medicated serum group, the concentration of medicated serum was 5%, 10%, 15%, 20%, and 25%,

基金项目:四川省公益性科研院所基本科研项目 (No. 2019-4-529)

作者单位:四川省第二中医医院老年病科 (成都 610031)

通讯作者:文秀华, Tel: 028-60157282, E-mail: 405295709@qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20210602. 052

respectively), positive drug group (methylprednisolone) and blank serum group, these cells were treated in their respective groups. The cell morphology and ultrastructural changes of each group were observed under electron microscope. The contents of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and NF- κ B were detected by ELISA, and the expressions of TLR2, MyD88 and NF- κ B were detected by Western Blot. **Results** Electron microscope showed that HMGB1 induced obvious cell morphology and ultrastructure damage were obvious, and lyophilized powder and drug-containing of BFD could effectively restore cell morphology and ultrastructure damage, and the higher the concentration, the more significant the recovery effect. The levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and NF- κ B in HMGB1 induced cells were significantly higher than those in the blank control group ($P < 0.01$), and the protein expressions of TLR2, MyD88 and NF- κ B were increased ($P < 0.01$). Compared with HMGB1 group, the contents of IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and NF- κ B in lyophilized powder and medicated serum groups were decreased in a concentration-dependent manner, and the contents in 0.25% and 0.30% lyophilized powder groups and 15%, 20% and 25% medicated serum groups decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The protein expressions of TLR2, MyD88 and NF- κ B were inhibited in a concentration-dependent manner, and the 0.30% lyophilized powder and 25% medicated serum groups showed significant inhibitory effects ($P < 0.01$), there was no statistical significance between the lyophilized powder and the medicated serum groups ($P > 0.05$). **Conclusion** The lyophilized powder and drug-containing of BFD can protect A549 and HFL1 cells from damage induced by HMGB1 and reduce the release of inflammatory factors, and the mechanism may be related to the down-regulation of TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS Bufe Decoction; human non-small cell lung cancer cells; human lung fibroblasts cells; toll like receptors 2; transduction pathway

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种以弥漫性肺泡炎、肺泡结构紊乱、细胞外基质沉积为主要病理机制的致死性、慢性进展性疾病, 而特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 占 PF 患者的半数以上^[1]。IPF 患者预后较差, 诊断后 5 年存活率仅为 20%, IPF 病因不明, 发病机制复杂, 目前尚无特效疗法^[2]。最新版 IPF 指南推荐的吡非尼酮、尼达尼布等西药短期效果较好, 但长期疗效并不明确, 且长期使用存在明显的不良反应^[3,4]。中医药学者在探寻 IPF 发病机制, 寻找其有效治疗药物方面进行了深入的研究。

根据 IPF 患者的呼吸困难、咳嗽、咯痰、胸闷、气喘、活动后诸症加剧等临床症状, 中医学将其归属“肺痹”“肺痿”范畴^[5]。IPF 可分为阴虚肺燥证、肺气虚证、肺肾气虚证、痰湿证、血瘀证等几种证候, 其中以肺气虚证为主, 而痰湿证和血瘀证为兼证^[6]。中医学认为 IPF 的发生与痰热阴亏、肺肾气虚, 气虚血瘀密切相关, 治疗时应当以补肺气为首要^[7,8], 而补肺汤重用补气固表中药, 具有补脾肺肾而益气, 提高机体卫外能力的作用, 契合 IPF 的病机^[9]。本研究利用不同浓度的补肺汤冻干粉和含药血清干预高迁移率族蛋白 B1 (high mobility family protein B1, HMGB1) 诱导的人非小细胞肺癌细胞 (A549) 和

对细胞形态学、炎症因子释放及 Toll 样受体 2 (toll like receptors 2, TLR2) / 髓样分化蛋白 (myeloid differential protein-88, MyD88) / 核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 信号通路的影响, 以期揭示补肺汤抗肺纤维化的分子生物学作用和可能机制。

材料与方 法

1 细胞株和动物 A549 和 HFL1 细胞购自中国科学院细胞库; 30 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 (235 \pm 15)g, 购自成都达硕动物科技有限公司, 生产许可证编号: SCXK (川) 2015-030。大鼠分笼饲养于四川大学华西临床医学院华西医院科技园动物实验中心, 允许自由饮水, 普通饲料喂养, 饲养温度为 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 相对湿度 36%。本研究经四川省第二中医医院伦理委员会审批通过 (No. 2019-01-20-12)。

2 药物 补肺汤 (人参、黄芪、熟地黄、桑白皮、五味子、紫菀) 免煎颗粒剂由四川省新绿色药业科技发展有限公司提供, 生药由四川省中药饮片有限公司提供, 四川省第二中医医院药剂科鉴定。甲泼尼松龙 (40 mg/支) 购于国药集团容生制药有限公司。

3 主要试剂与仪器 重组人 HMGB-1 (纯度 >90%, 美国 Sigma 公司, 批号 17-10147); TLR2 抗体 (批号: ab13556)、MyD88 抗体 (批号: ab133739)、NF- κ B 抗体 (批号: ab220803)、山羊

抗兔 IgG 抗体 (批号: ab6721) 均购自英国 Abcam 公司; 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 试剂盒 (批号: H002)、IL-6 试剂盒 (批号: H007)、IL-8 试剂盒 (批号: H008)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 试剂盒 (批号: H052) 均购自南京建成生物工程研究所; Trizol 试剂盒 (批号: AIG1649A) 购自日本 TaKaRa 公司。透射电子显微镜 (型号: JEM-1400PLUS) 由日本电子 (JEOL) 生产; 酶标仪 (型号: SpectraMAX Plus384) 由美谷分子仪器有限公司生产; 电泳仪 (型号: JY200C) 由北京君意东方电泳设备有限公司生产; 化学发光凝胶成像仪 (型号: 5200) 由上海天能科技有限公司生产。

4 补肺汤冻干粉制备 将补肺汤生药于旋转蒸发仪 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行旋转蒸发浓缩, 使浓缩液浓度为 0.25 g/mL (含原药), 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冻后转入冻干机; 冷冻真空干燥 15 天, 取出并碾压称量而得冻干粉。

5 补肺汤含药血清制备 参考吴永刚^[10]和廖嘉仪等^[11]制备中药复方含药血清方法, 具体如下: 大鼠适应性饲养 3 周后随机分为补肺汤含药血清组和空白血清组, 每组 15 只。根据人和动物体表面积折算的等效剂量比值^[12], 计算出大鼠服用补肺汤的等效剂量, 药物剂量比例为: 熟地黄: 桑白皮: 人参: 黄芪: 五味子: 紫菀 = 2: 2: 1: 1: 1: 1, 予以免煎颗粒剂将上述药物按 10 g/1.5 mL 的浓度进行配制。采取灌胃的方式给药, 含药血清组每 100 g 体重给予 1 mL 药液, 空白血清组每 100 g 体重给予 1 mL 生理盐水, 每天早、晚各 1 次, 连续 7 天, 末次给药后 1~2 h 取血。首先用 PBS 溶解水合氯醛粉剂, 配制成 4% 水合氯醛, 以 0.5 mL/100 g 体重的剂量腹腔注射麻醉大鼠, 采用腹主动脉取血法, 采血前 12 h 禁食。将血液予以 3 000 r/min 离心 10 min, 小心吸取上清液, 过滤并分装, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

6 细胞培养和干预 A549 和 HFL1 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂。细胞分为空白组、HMGB1 组 (HMGB1 诱导)、补肺汤冻干粉加 HMGB1 诱导组 (冻干粉浓度分别为 0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30%)、补肺汤含药血清加 HMGB1 诱导组 (含药血清浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%)、阳性 (甲泼尼松龙) 加 HMGB1 诱导组和 10% 空白血清预培养加 HMGB1 诱导组, 按照分组处理细胞 24 h。

7 透射电镜实验 细胞干预结束后, 收集细胞, PBS 洗涤, 1% 四氧钼酸室温固定, 乙醇梯度脱水, Epon-812 包埋剂渗透包埋, 进行 70 nm 超薄切片, 2%

醋酸双氧铀-枸橼酸铅染色, 在透射电镜下观察各组细胞超微结构变化情况。

8 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NF- κ B 含量 将 A549 和 HFL1 细胞以 6×10^5 个/mL 密度接种于 96 孔板中, 各组细胞经干预后, 收集细胞上清, 按照试剂盒操作说明, 检测各组细胞上清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、NF- κ B 的含量。

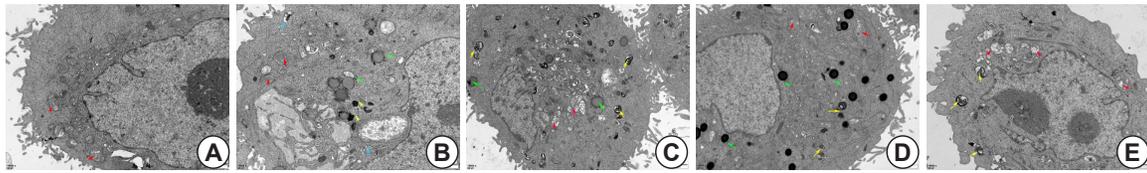
9 Western Blot 实验 用裂解液提取各组细胞总蛋白, BCA 法进行定量, 取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 将蛋白湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 用 TLR2 抗体 (1: 1 000)、MyD88 抗体 (1: 1 000)、NF- κ B (1: 500) 抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤, 用 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, 化学发光显影, 凝胶图像处理系统分析数据。

10 统计学方法 使用 SPSS 20.0 软件进行数据处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 补肺汤对 HMGB1 诱导的 A549 和 HFL1 细胞形态的影响 (图 1、2) 电镜下见空白组细胞核呈类椭圆形, 染色质分布均匀, 以常染色质为主, 核膜清晰完整; 胞浆中可见线粒体、粗面内质网、高尔基体和核糖体等细胞器且结构完整清晰, 其中部分线粒体出现轻度肿胀, 亦可见少量空泡和自噬体; HMGB1 组细胞核呈不规则多边形, 染色质分布均匀, 以常染色质为主, 部分细胞存在染色质丢失的情况, 核膜清晰完整; 胞浆中可见线粒体、粗面内质网和核糖体等细胞器且结构完整清晰, 其中少数线粒体发生肿胀, 多数粗面内质网出现扩张, 可见少量脂滴和大量自噬体。0.30% 冻干粉、25% 含药血清和阳性组细胞更趋近于空白组, 可见染色质分布均匀, 核膜清晰完整; 胞浆中可见线粒体、粗面内质网和核糖体等细胞器且结构完整清晰, 少量自噬体及空泡。冻干粉组和阳性组形态上更趋近于 HMGB1 组。

2 各组 A549 和 HFL1 细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 含量比较 (表 1、2) 与空白组比较, HMGB1 组两种细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 含量均升高 ($P < 0.01$); 与 HMGB1 组比较, 冻干粉组和含药血清组能浓度依赖性降低细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 含量, 且 0.25%、0.30% 冻干粉组及 15%、20%、25% 含药血清组其含量降



注: A 为空白组; B 为 HMGB1 组; C 为 0.30% 冻干粉组; D 为 25% 含药血清组; E 为阳性组; 红色箭头表示线粒体肿胀; 绿色箭头表示初级溶酶体; 黄色表示自噬体; 图 2 同

图 1 各组 A549 细胞超微结构观察结果 (× 15 000)

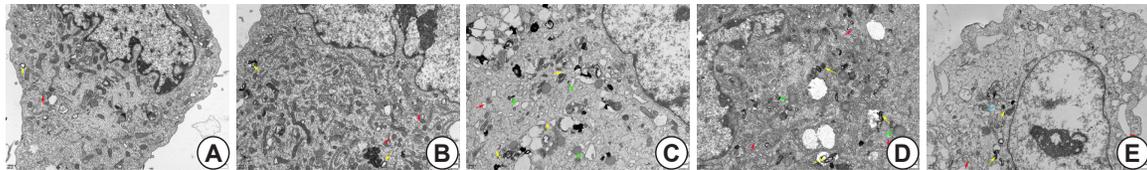


图 2 各组 HFL1 细胞超微结构观察结果 (× 15 000)

表 1 各组 A549 细胞 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
空白	3	2.295 ± 0.106	12.875 ± 0.134	6.155 ± 0.403	3.365 ± 0.148
HMGB1	3	3.600 ± 0.226*	19.713 ± 1.896*	9.960 ± 0.541*	4.387 ± 0.270*
0.10% 冻干粉	3	3.533 ± 0.270	19.613 ± 0.749	8.697 ± 0.445 ^Δ	4.177 ± 0.180
0.15% 冻干粉	3	3.327 ± 0.111	18.017 ± 1.099	7.643 ± 0.640 ^{ΔΔ}	4.103 ± 0.205
0.2% 冻干粉	3	2.857 ± 0.252 ^{ΔΔ}	17.280 ± 1.480	6.907 ± 1.070 ^{ΔΔ}	4.253 ± 0.248
0.25% 冻干粉	3	2.840 ± 0.193 ^{ΔΔ}	14.927 ± 2.331 ^{ΔΔ}	7.483 ± 0.316 ^{ΔΔ}	4.000 ± 0.229 ^Δ
0.30% 冻干粉组	3	2.767 ± 0.193 ^{ΔΔ}	16.370 ± 1.554 ^Δ	6.973 ± 0.657 ^{ΔΔ}	3.717 ± 0.199 ^{ΔΔ}
5% 含药血清	3	3.500 ± 0.100	20.107 ± 1.030	9.620 ± 0.805	4.037 ± 0.251
10% 含药血清	3	3.217 ± 0.107 ^Δ	19.517 ± 1.704	8.897 ± 0.761	3.823 ± 0.136 ^{ΔΔ}
15% 含药血清	3	2.770 ± 0.141 ^{ΔΔ}	18.343 ± 1.255	8.677 ± 0.550 ^Δ	3.893 ± 0.194 ^Δ
20% 含药血清	3	2.860 ± 0.161 ^{ΔΔ}	16.773 ± 0.545 ^Δ	8.157 ± 0.856 ^{ΔΔ}	3.770 ± 0.288 ^{ΔΔ}
25% 含药血清	3	2.823 ± 0.225 ^{ΔΔ}	15.387 ± 0.877 ^{ΔΔ}	7.370 ± 0.613 ^{ΔΔ}	3.853 ± 0.140 ^{ΔΔ}
阳性	3	2.667 ± 0.107 ^{ΔΔ}	14.277 ± 2.101 ^{ΔΔ}	6.680 ± 0.531 ^{ΔΔ}	3.477 ± 0.237 ^{ΔΔ}
10% 空白血清	3	3.577 ± 0.203	18.550 ± 0.795	8.830 ± 0.893 ^Δ	4.200 ± 0.026

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与 HMGB1 组比较, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$

低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 阳性组 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 的含量降低 ($P < 0.01$); 在 A549 细胞中, 10% 空白血清组 IL-8 含量降低 ($P < 0.05$), HFL1 细胞中, 10% 空白血清组各指标含量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 补肺汤冻干粉与含药血清各浓度组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 各组 A549 和 HFL1 细胞中 TLR2/MyD88/NF-κB 蛋白表达比较 (表 3、4) 在 A549 和 HFL1 细胞中, 与空白组比较, HMGB1 组 TLR2、MyD88、NF-κB 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 HMGB1 组比较, 冻干粉组和含药血清组能浓度依赖性地抑制 TLR2、MyD88、NF-κB 蛋白表达, 且 0.30% 冻干粉组和 25% 含药血清组抑制作用明显 ($P < 0.01$); 阳性组 TLR2、MyD88 和 NF-κB 蛋白相对表达均降

低 ($P < 0.01$), 10% 空白血清组各指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 补肺汤冻干粉与含药血清各浓度组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 各组细胞 NF-κB 含量比较 (表 5) 在 A549 和 HFL1 细胞中, 与空白组比较, HMGB1 组 NF-κB 含量升高 ($P < 0.01$); 与 HMGB1 组比较, 冻干粉组和含药血清组能浓度依赖性地降低细胞中 NF-κB 含量, 且 0.20%、0.25% 和 0.30% 冻干粉组及 10%、15%、20% 和 25% 含药血清组含量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在 HFL1 细胞中, 5% 含药血清组及阳性组 NF-κB 含量亦降低 ($P < 0.01$), 10% 空白血清组 NF-κB 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。补肺汤冻干粉与含药血清各组指标之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组 HFL1 细胞 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α
空白	3	2.833 \pm 0.403	14.743 \pm 1.924	6.160 \pm 0.895	3.720 \pm 0.217
HMGB1	3	4.310 \pm 0.347*	21.507 \pm 0.881*	9.743 \pm 0.248*	5.007 \pm 0.253*
0.10% 冻干粉	3	4.070 \pm 0.187	20.260 \pm 1.214	9.297 \pm 0.276	4.760 \pm 0.175
0.15% 冻干粉	3	3.783 \pm 0.114 Δ	19.567 \pm 1.888	9.177 \pm 0.728	4.473 \pm 0.316 Δ
0.20% 冻干粉	3	3.493 \pm 0.293 $\Delta\Delta$	18.667 \pm 1.384 Δ	8.753 \pm 0.756	4.253 \pm 0.190 $\Delta\Delta$
0.25% 冻干粉	3	2.863 \pm 0.150 $\Delta\Delta$	16.930 \pm 0.544 $\Delta\Delta$	7.203 \pm 0.834 $\Delta\Delta$	3.993 \pm 0.203 $\Delta\Delta$
0.30% 冻干粉	3	2.883 \pm 0.440 $\Delta\Delta$	17.100 \pm 0.638 $\Delta\Delta$	6.790 \pm 0.658 $\Delta\Delta$	3.923 \pm 0.270 $\Delta\Delta$
5% 含药血清	3	4.100 \pm 0.165	19.723 \pm 1.396	9.167 \pm 0.816	4.853 \pm 0.190
10% 含药血清	3	3.840 \pm 0.176 Δ	18.470 \pm 1.383 Δ	8.767 \pm 0.663	4.670 \pm 0.144
15% 含药血清	3	3.650 \pm 0.161 $\Delta\Delta$	17.323 \pm 0.994 $\Delta\Delta$	8.247 \pm 0.727 Δ	4.357 \pm 0.223 $\Delta\Delta$
20% 含药血清	3	3.363 \pm 0.190 $\Delta\Delta$	18.303 \pm 3.386 Δ	8.180 \pm 0.135 Δ	4.217 \pm 0.186 $\Delta\Delta$
25% 含药血清	3	3.270 \pm 0.154 $\Delta\Delta$	17.040 \pm 0.544 $\Delta\Delta$	8.107 \pm 0.774 $\Delta\Delta$	3.913 \pm 0.177 $\Delta\Delta$
阳性	3	3.077 \pm 0.146 $\Delta\Delta$	14.983 \pm 1.479 $\Delta\Delta$	7.130 \pm 0.514 $\Delta\Delta$	3.947 \pm 0.318 $\Delta\Delta$
10% 空白血清	3	4.180 \pm 0.184	19.853 \pm 2.194	9.643 \pm 0.742	4.847 \pm 0.323

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与 HMGB1 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 3 各组 A549 细胞中 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR2	MyD88	NF- κ B
空白	3	1.0000 \pm 0.0000	1.0000 \pm 0.0000	1.0000 \pm 0.0000
HMGB1	3	3.0840 \pm 0.6241*	1.7515 \pm 0.1587*	2.5040 \pm 0.7188*
0.10% 冻干粉	3	2.7666 \pm 0.3708	1.6840 \pm 0.3114	1.9982 \pm 0.7105
0.20% 冻干粉	3	2.3080 \pm 0.6117	1.5643 \pm 0.3175	1.6860 \pm 0.4289
0.25% 冻干粉	3	1.6199 \pm 0.6034 $\Delta\Delta$	1.2507 \pm 0.3899	1.2437 \pm 0.3370 $\Delta\Delta$
0.30% 冻干粉	3	1.3092 \pm 0.0159 $\Delta\Delta$	1.0068 \pm 0.3232 Δ	1.2757 \pm 0.4416 $\Delta\Delta$
5% 含药血清	3	2.8646 \pm 0.8045	1.5638 \pm 0.4358	1.9919 \pm 0.6536
10% 含药血清	3	2.6424 \pm 0.7736	1.3702 \pm 0.2553	2.0125 \pm 0.6554
20% 含药血清	3	2.0825 \pm 1.1623	1.1185 \pm 0.2114 Δ	1.6371 \pm 0.2902 Δ
25% 含药血清	3	1.9139 \pm 0.4304 Δ	0.9055 \pm 0.6818 $\Delta\Delta$	1.5874 \pm 0.5524 Δ
阳性	3	1.3664 \pm 0.3416 $\Delta\Delta$	1.2655 \pm 0.1763 $\Delta\Delta$	1.2797 \pm 0.2917 $\Delta\Delta$
10% 空白血	3	2.6803 \pm 0.5986	1.6889 \pm 0.2259	1.8595 \pm 0.4014

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与 HMGB1 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 4 各组 HFL1 细胞 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR2	MyD88	NF- κ B
空白	3	1.0000 \pm 0.0000	1.0000 \pm 0.0000	1.0000 \pm 0.0000
HMGB1	3	2.1225 \pm 0.2972*	2.1182 \pm 0.4385*	2.0545 \pm 0.1578*
0.10% 冻干粉	3	2.0017 \pm 0.0698	1.5915 \pm 0.1068 Δ	1.7212 \pm 0.2019
0.20% 冻干粉	3	1.7686 \pm 0.2732	1.7340 \pm 0.2527	1.5865 \pm 0.0404
0.25% 冻干粉	3	1.6293 \pm 0.3193 Δ	1.4535 \pm 0.3591 Δ	1.1223 \pm 0.0913 $\Delta\Delta$
0.30% 冻干粉	3	1.2134 \pm 0.1990 $\Delta\Delta$	1.3792 \pm 0.3388 $\Delta\Delta$	1.0769 \pm 0.1060 $\Delta\Delta$
5% 含药血清	3	2.1387 \pm 0.2108	1.8452 \pm 0.4311	1.5342 \pm 0.3275
10% 含药血清	3	2.1349 \pm 0.2666	1.7325 \pm 0.0806	1.5068 \pm 0.2582
20% 含药血清	3	1.7440 \pm 0.1299	1.4165 \pm 0.2198 Δ	1.3556 \pm 0.2325 Δ
25% 含药血清	3	1.2063 \pm 0.1908 $\Delta\Delta$	1.3192 \pm 0.1253 $\Delta\Delta$	1.0520 \pm 0.0663 $\Delta\Delta$
阳性	3	1.4640 \pm 0.2555 $\Delta\Delta$	1.4410 \pm 0.2884 Δ	1.1577 \pm 0.1938 $\Delta\Delta$
10% 空白血	3	1.8405 \pm 0.3095	1.7768 \pm 0.4631	1.6794 \pm 0.4267

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与 HMGB1 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 5 各组 A549 和 HFL1 细胞中 NF- κ B 含量比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm SD$)

组别	n	A549 细胞	HFL1 细胞
空白	3	41.365 \pm 1.280	41.653 \pm 2.420
HMGB1	3	56.170 \pm 1.657*	56.353 \pm 2.541*
0.10% 冻干粉	3	54.817 \pm 1.658	56.353 \pm 2.541
0.15% 冻干粉	3	52.873 \pm 1.369	55.687 \pm 2.117
0.20% 冻干粉	3	50.823 \pm 5.037 Δ	51.740 \pm 1.896 Δ
0.25% 冻干粉	3	48.893 \pm 1.455 $\Delta\Delta$	49.473 \pm 1.939 $\Delta\Delta$
0.30% 冻干粉	3	47.917 \pm 2.735 $\Delta\Delta$	43.617 \pm 4.329 $\Delta\Delta$
5% 含药血清	3	53.600 \pm 2.046	52.477 \pm 2.320 $\Delta\Delta$
10% 含药血清	3	52.010 \pm 2.016 Δ	49.647 \pm 2.482 $\Delta\Delta$
15% 含药血清	3	49.137 \pm 2.352 $\Delta\Delta$	48.047 \pm 1.950 $\Delta\Delta$
20% 含药血清	3	46.390 \pm 1.918 $\Delta\Delta$	45.787 \pm 1.337 $\Delta\Delta$
25% 含药血清	3	43.950 \pm 2.711 $\Delta\Delta$	46.860 \pm 1.956 $\Delta\Delta$
阳性	3	44.023 \pm 2.438 $\Delta\Delta$	47.270 \pm 2.690 $\Delta\Delta$
10% 空白血清	3	54.820 \pm 1.775	55.460 \pm 1.759

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与 HMGB1 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

IPF 是一种弥漫性间质性肺疾病,具有慢性、渐进性、致死性的特点,其中位生存期仅为 3~5 年^[13]。肺移植是治疗 IPF 的有效方法,但移植后约 50% 患者生存时间仅为 5 年,且受限于供体数量和等待时间^[14]。尼达尼布和吡非尼酮是目前常用的抗 PF 药物,其短期有效性得到认可,它们均是针对病程中的细胞因子发挥作用,例如碱性纤维母细胞生长因子 2 (basic Fibroblast growth factor-2, bFGF-2)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等^[15]。因此,基于病程中的细胞因子发挥作用是开发治疗 IPF 药物的重要思路。

HMGB1 是一种非组蛋白核蛋白,在细胞外可与 TLR 结合,通过激活 MAPKs、NF- κ B 等信号通路,刺激 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等炎症因子的释放,促进 PF、糖尿病肾病等多种疾病进程中的炎症损伤^[16]。HMGB1 诱导的肺上皮细胞炎症损伤模型已被广泛用于 IPF 的体外研究。TLR2 是 TLR 家族成员之一,主要表达于单核-巨噬细胞表面,通过识别细菌的脂蛋白、革兰氏阳性菌的磷壁酸和肽聚糖及分支杆菌等病原配体,调节机体天然免疫和获得性免疫反应^[17]。既往研究证实,TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路是包括 IPF 在内的多种肺炎症和肺纤维化疾病发生发展的重要机制之一。周韶伟等^[18] 研究发现 TLR2 shRNA 慢病毒能够抑制大鼠 TGF- β_1 、IL-1 β 、IL-6

的释放,并对肺病理损伤和纤维化具有保护作用。Li C 等^[19] 研究发现 TLR2 基因敲除可减轻博莱霉素诱导的 PF 模型小鼠肺组织纤维化和降低炎症因子 IL-6、TNF- α 释放,并发现 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路是 TLR2 减轻小鼠炎症损伤和 PF 的重要通路。

补肺汤出自《永类铃方》,全方由人参、黄芪、熟地黄、桑白皮、五味子、紫菀 6 味药物组成,其功能补肺益肾,止咳化痰^[20]。肺为气之主,肾为气之根。方中人参、黄芪补肺益气,五味子、熟地黄补肾纳气,紫菀化痰止咳,桑白皮泻肺平喘。纵观全方,攻补兼施,以补为主,兼顾肺、脾、肾三脏,契合 IPF 本虚标实的病机^[21]。既往研究证实,补肺汤能减轻博莱霉素诱导的 IPF 模型小鼠肺组织纤维化和病理损伤,并减轻炎症因子释放和肺组织中巨噬细胞浸润^[19],但其具体机制至今仍不十分明确。笔者前期研究发现补肺汤能通过抑制 TLR2/NF- κ B 信号通路,减少 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子的释放,从而改善阻塞性肺疾病模型大鼠气道重塑^[22]。本研究利用补肺汤含药血清和冻干粉对 HMGB1 诱导的细胞模型进行干预,以期在细胞和分子水平明确补肺汤抗 IPF 的作用机制,并探究其对 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响。

本研究通过电镜观察,发现 HMGB1 能破坏 A549 和 HFL1 细胞正常形态,导致细胞内线粒体、粗面内质网和核糖体等细胞器正常结构的破坏,而补肺汤含药血清和冻干粉均能浓度依赖性地维持细胞形态,尤其是对于 HFL1 细胞,空白血清对 HMGB1 诱导的细胞形态损伤也有一定的保护作用,但差异无统计学意义,提示补肺汤对 IPF 患者肺功能可能具有保护作用。为了进一步探究补肺汤保护 HMGB1 诱导的 A549 和 HFL1 细胞形态损伤机制,本实验检测了各组细胞中炎症因子释放情况,结果进一步提示 HMGB1 诱导的 A549 和 HFL1 细胞炎症模型构建成功,可用于药物药效研究;而经过补肺汤冻干粉和含药血清干预后,细胞中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 含量呈浓度依赖性的降低趋势。由此说明,补肺汤冻干粉和含药血清保护 HMGB1 诱导的 A549 和 HFL1 细胞形态损伤作用可能与其抑制炎症因子释放,减轻炎症损伤有关。由于本实验中分组较少,并未探究出冻干粉和含药血清的最佳药物浓度,也并未明确过高剂量的补肺汤是否会对细胞产生不良反应,但发现其量-效之间有类似函数的关系,具体的量-效关系函数曲线尚需进一步的研究。

为了进一步明确补肺汤减轻 IPF 进程中炎症反应的可能机制,本研究采用 Western Blot 法检测了各组细胞中 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达情况,结果发现 HMGB1 诱导后 A549 和 HFL1 细胞中 TLR2、MyD88、NF- κ B 含量均升高,表明 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路激活是 IPF 发生、发展的重要机制。本研究还发现补肺汤冻干粉和含药血清能浓度依赖性地下调 HMGB1 刺激后 A549 和 HFL1 细胞中 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达,结果表明补肺汤冻干粉和含药血清可能通过抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路,从而减缓炎症因子释放和炎症损伤的过程。值得注意的是,与 HMGB1 组比较,10% 空白血清组细胞上清中炎症因子含量也呈降低趋势,同时 TLR2、MyD88、NF- κ B 蛋白表达亦降低,这可能与健康动物血清中含有免疫细胞因子有关,但结果差异无统计学意义,这也进一步说明含药血清抑制 TLR2/MyD88/NF- κ B 信号通路激活和炎症因子分泌是中药补肺汤的作用效果。

综上所述,补肺汤冻干粉和含药血清均能抑制 A549、HFL1 两种细胞中 TLR2 受体的活化,通过 MyD88 依赖性经典途径,调节下游 NF- κ B 信号通路,从而减少 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子的释放。本研究为补肺汤的临床应用提供了实验依据,从而进一步论证了“补肺益肾”法作为 IPF 中医药治疗措施的可行性,对指导中医药治疗 IPF 的基础研究和临床应用均具有重要的意义。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Li F, Han F, Li H, et al. Human placental mesenchymal stem cells of fetal origins-alleviated inflammation and fibrosis by attenuating MyD88 signaling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis mice [J]. *Mol Immunol*, 2017, 90(10): 11–21.
- [2] 杨伟强, 赵峰. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(9): 1684–1689, 1695.
- [3] King TJ, Bradford WZ, Castro-Bernardini S, et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(22): 2083–2092.
- [4] 马艺蕾, 伏振, 段彦然, 等. 吡非尼酮与尼达尼布治疗特发性肺纤维化的成本-效果分析 [J]. *医药导报*, 2020, 39(11): 1552–1557.
- [5] 臧凝子, 庞立健, 李晶, 等. 基于中医络病理论治疗特发性肺纤维化临床疗效的 Meta 分析 [J]. *中华中医学杂志*, 2017, 32(7): 3170–3174.
- [6] 李建生, 王至婉, 春柳, 等. 特发性肺纤维化中医证候诊断标准 (2019 版) [J]. *中医杂志*, 2020, 61(18): 1653–1656.
- [7] 张川锋, 王振兴, 杨昆, 等. 依据“方-证要素对应”分析补阳还五汤治疗肺纤维化疾病机制 [J]. *时珍国医国药*, 2018, 29(6): 1406–1408.
- [8] 李壮花. 养阴益肺通络丸治疗特发性肺纤维化的临床研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [9] 陈文明, 李静波, 蔡纪堂, 等. 加味补肺汤对肺肾两虚型小儿变应性鼻炎患者的临床疗效 [J]. *中成药*, 2020, 42(8): 2049–2053.
- [10] 吴永刚. 复方芪麻胶囊对高血压血管内皮保护机制及应用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [11] 廖嘉仪, 熊天琴, 康萨·索朗其美, 等. 甲嘎松汤调控 Nrf2, Bach1 表达保护氧化应激肝细胞 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(3): 118–124.
- [12] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1079–1072.
- [13] 杜全宇, 王振兴, 孙中莉, 等. HMGB1 对人肺成纤维细胞 ERK1/2-NF- κ B 信号通路的影响及补阳还五汤含药血清的干预作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(13): 153–157.
- [14] 陈曦, 伍俊. 特发性肺纤维化的机制与治疗 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(3): 21–28.
- [15] 熊丽, 胡良安. 吡非尼酮治疗特发性肺纤维化的研究进展 [J]. *延边医学*, 2015, 10(15): 260–262.
- [16] 高希震, 陈海冰, 蒋丹玛, 等. 高迁移率族蛋白 B1/Toll 样受体 4/核因子 κ B 信号通路在糖尿病肾脏病患者中的表达 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(11): 801–805.
- [17] 臧博文, 王宝军. TLR2, TLR4 相关疾病的研究进展 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2019, 6(70): 188, 190.
- [18] Finn RS, Qin S, Ikeda M, et al. Atezolizumab plus bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(20): 1894–1905.
- [19] Li C, Yu Y, Li W, et al. Phycocyanin attenuates pulmonary fibrosis via the TLR2-MyD88-NF- κ B signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5843.
- [20] 元·李仲南撰. 刘洋校注. 永类铃方 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2014: 295.
- [21] 刘炜, 骆新, 沈静. 补肺汤通过 TGF- β /Smad3 信号通路抑制小鼠肺纤维化的研究 [J]. *医药导报*, 2020, 39(6): 747–752.
- [22] 文秀华. 补肺汤通过调控 TLR2/NF- κ B 信号转导通路改善 COPD 气道重塑机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.

收稿: 2020-09-21 在线: 2021-09-02

责任编辑: 白 霞