

· 实验研究 ·

黄芪-桑白皮含药血清对人支气管上皮细胞炎症的影响[※]彭朗萍¹ 章 澳¹ 谭 卫¹ 张 钰¹ 李福星¹ 刘 雨^{2,3} 谭光波^{2,3▲}

摘要 目的:探讨黄芪-桑白皮配伍对慢性阻塞性肺疾病(COPD)炎症状态下人支气管上皮细胞(BEAS-2B 细胞)的影响。**方法:**制备大鼠含药(黄芪-桑白皮)血清,采用 10% 香烟烟雾提取物和 20 ng·mL⁻¹ 脂多糖构建 BEAS-2B 细胞 COPD 炎症状态的模型,利用 CCK8 检测 BEAS-2B 细胞活力,Western blot 法检测前期网络药理学预测的 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达。**结果:**与空白组比较,模型组 BEAS-2B 细胞活性降低($P<0.05$),Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达显著增多($P<0.05$),提示 COPD 造模成功;与模型组比较,中药组 BEAS-2B 细胞活性升高($P<0.05$),中药组 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。**结论:**香烟烟雾及脂多糖可诱导 BEAS-2B 细胞中 Caspase3、HIF-1 α 蛋白高表达,成功建立细胞模型。黄芪-桑白皮药对可明显抑制 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达,初步揭示了黄芪-桑白皮药对通过抑制炎症反应、影响肺部细胞焦亡及氧化应激的反应等来治疗 COPD。

关键词 慢性阻塞性肺疾病;黄芪;桑白皮;炎症;人支气管上皮细胞

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是以呼吸困难、咳嗽、咳痰为特征的一种异质性肺部状态,乃气道异常或肺泡异常所导致的持续性进展性的气流阻塞。据 WHO 预计,COPD 将在 2030 年排名全球第 3 位死因^[1]。现代医学治疗 COPD 的主要药物有支气管扩张剂、抗生素及吸入性糖皮质激素(Inhaled Corticosteroids, ICS),越来越多临床研究表明中医药结合现代医学治疗可显著改善慢阻肺患者的临床症状和生活质量,且明显缩短其住院时间^[2]。

COPD 归属于中医学“喘证”“肺胀”“咳嗽”等范畴,主要症状为咳、痰、喘、气促等,其发病机制以正虚痰瘀为主,治疗上应以扶正为主,佐以化痰活血^[3]。根据中医整体观、辨证论治的理念,中医药对 COPD 的治疗具有多靶点、多成分、整体把控的优势,疗效显著且比西药治疗更安全^[4]。

黄芪-桑白皮是临床治疗 COPD 的常用药对,经

典方剂补肺汤、黄芪散^[5]等均有二者配伍。黄芪味甘、性微温,归脾、肺经,具有补气固表、利尿排毒、生肌收疮的作用,是补气的首选,尤适用于呼吸系统虚损性疾病的治疗^[6]。桑白皮味甘、苦、辛,性寒凉,甘能补虚,苦能清泻肺热,辛可消肿利水,其甘寒之性可制黄芪稍热之性,主治肺热导致的咳嗽、咯黄痰、小便不利,用于肺有水热互结者^[7]。黄芪主升补肺气,桑白皮降肺气,一升一降共调肺气,正如《景岳全书·喘促》所说:“然发久者气无不虚,故于消散中宜酌加温补,或于温补中宜量加消散,此等证候……必使元气渐充,庶可望其渐愈。”二者配伍既能补气补虚,促进正气的恢复,又有泻肺平喘、宣肺清痰功效,此外,“气能行血”,黄芪补气则能促进血液运行而防止血液瘀滞,而桑白皮在《本草纲目》中记载其有“散血”之效,故二者合用具有补气化痰活血之功,可标本兼顾调理和治疗 COPD。但黄芪-桑白皮药对治疗 COPD 的作用机理尚不清楚,配伍的科学性尚未阐明,有待深入研究。

笔者团队前期已通过网络药理学研究^[8]探讨了补肺汤治疗 COPD 的作用机制,而进一步分析后发现与黄芪、桑白皮相关的核心靶点 Caspase3、HIF-1 α 可改善 COPD 炎症状态。本研究基于体外细胞实验进一步验证黄芪-桑白皮对 COPD 炎症状态的影响,探讨

※基金项目 国家自然科学基金项目(No.82004306);湖南省中医药“神农人才”工程

▲通信作者 谭光波,男,医学博士,主任医师,硕士研究生导师。研究方向:中医药防治 COPD 临床与基础。E-mail: tgb989@126.com

• 作者单位 1. 湖南中医药大学(湖南长沙 410208); 2. 湖南省中医药研究院(湖南长沙 412000); 3. 湖南省中医药研究院附属医院(湖南长沙 412000)

其治疗 COPD 的相关调控蛋白, 以期为后续研究提供思路方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 7只 SPF 级 SD 大鼠, 体质量为(250±50) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证编号为 SYXK(湘)—20190009, 实验动物伦理批号: LLBH-202212030001。动物饲养环境的相对湿度为 40%~70%, 温度为 24~26 °C, 每小时通风换气 8~12 次。

1.2 实验药物 (1) 中药: 黄芪 6 g, 桑白皮 12 g。中药饮片购自湖南省中西医结合医院, 加水煎煮 30 min, 煎 2 次, 过滤, 浓缩得到生药质量为 4 g/mL 的药液备用。(2) 西药: 注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(天津金耀药业有限公司, 国药准字 H20103047)。

1.3 主要仪器及试剂 台式冷冻离心机(中国湖南湘仪, 型号 H1650R); 电泳仪(中国北京六一, 型号 DYY-6C); 电泳槽(中国北京六一, 型号 DYCZ-24DN); 转膜仪(中国北京六一, 型号 DYCZ-40D); 漩涡混合器(中国江苏其林贝尔, 型号 GL-88B); 摇床(中国江苏其林贝尔, 型号 TS-1); 磁力搅拌器(中国雷磁, 型号 JB-13); 精密 PH 仪(中国雷磁, 型号 PHS-3C); 普通冰箱(中国奥克斯, 型号 BCD-196A); 电子天平(美国双杰, 型号 JJ224BC); 生物样品均质仪(中国杭州奥盛, 型号 BioPrep-24); 化学发光成像系统(中国勤翔, 型号 ChemiScope6100); 抗体 HIF1 α (英国 abcam, 批号 GR3368586-25); 抗体 Caspase3(英国 abcam, 批号 GR3452913-2); β -actin(美国 proteintech, 批号 10029224); 脂多糖(sigma, 批号 0000155608); 胰蛋白酶(abiowell, 批号 01A221129); 胎牛血清(abiowell, 批号 06F221002); DMEM 培养基(gibco, 批号 8123239); PBS 缓冲液(gibco, 批号 8122734)。

1.4 CSE 溶液制备 香烟烟雾提取物(Cigarette smoke extract, CSE)溶液制备方法如下: 取 1 支香烟燃烧 5 min, 烟雾在注射器驱动吸引下溶于 10 mL 37 °C 预热的 PBS 溶液中, pH 调节至 7.4 左右, 经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌后, 作为 100% CSE 原液, 用无血清培养液稀释成 10% CSE 溶液。

1.5 含药血清的制备 按照千克体重剂量折算法: 大鼠剂量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)=折算系数 $W(6.25)\times$ 人的剂量($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 计算出中药组生药量为 $0.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 扩大 10 倍量^[9], 最终确定中药组生药量为 $4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

将 SD 大鼠适应性喂养 5 d 后, 予以中药(黄芪-桑白皮药液)灌胃, 每天 1 次, 灌胃前空腹 6 h, 连续 5 d; 末次灌胃后 1 h, 用 4% 水合氯醛对 SD 大鼠进行腹腔注射麻醉, 收集腹主动脉血, 静置 2 h 凝固, 以 2000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 合并同组血清, 用 0.22 μ m 微孔滤膜除菌, 然后用无菌试管分成单独的试管, 保存在 -20 °C 冰箱以备后用, 避免反复冻融。

1.6 实验细胞 实验细胞为人支气管上皮细胞(Bronchial Epithelium transformed with Ad12-SV40 2B, BEAS-2B), 购自北纳创联生物科技有限公司, 细胞培养在湖南中医药研究院细胞实验室, 培养箱设置为 37 °C, 5% 浓度二氧化碳(CO₂)。BEAS-2B 细胞用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM 培养液培养, 换液 24 h/次, 按 1:2 比例传代。

1.7 细胞分组及干预 取对数生长期细胞进行实验, 将 DMEM 培养液+10% FBS 加入 T25 培养瓶中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h, 细胞贴壁后去除原培养基, 加入无血清 DMEM 培养液, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱饥饿培养 24 h; 再去除原培养基, 以培养瓶为单位, 将其随机分为空白组、模型组、中药组、西药组。(1) 空白组: 常规培养基培养 24 h; (2) 模型组: 10% CSE 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 干预 12 h 后, 加入常规培养基继续干预 12 h, 构建 BEAS-2B 细胞 COPD 炎症状态模型; (3) 中药组: 10% CSE 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 干预 12 h 后, 加入 15% 含药血清继续干预 12 h; (4) 西药组: 10% CSE 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 干预 12 h 后, 加入 2 $\mu\text{mol/L}$ 甲泼尼龙继续干预 12 h。各组细胞均置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 后收集细胞进行细胞形态、细胞活性及 Western blot 蛋白检测。

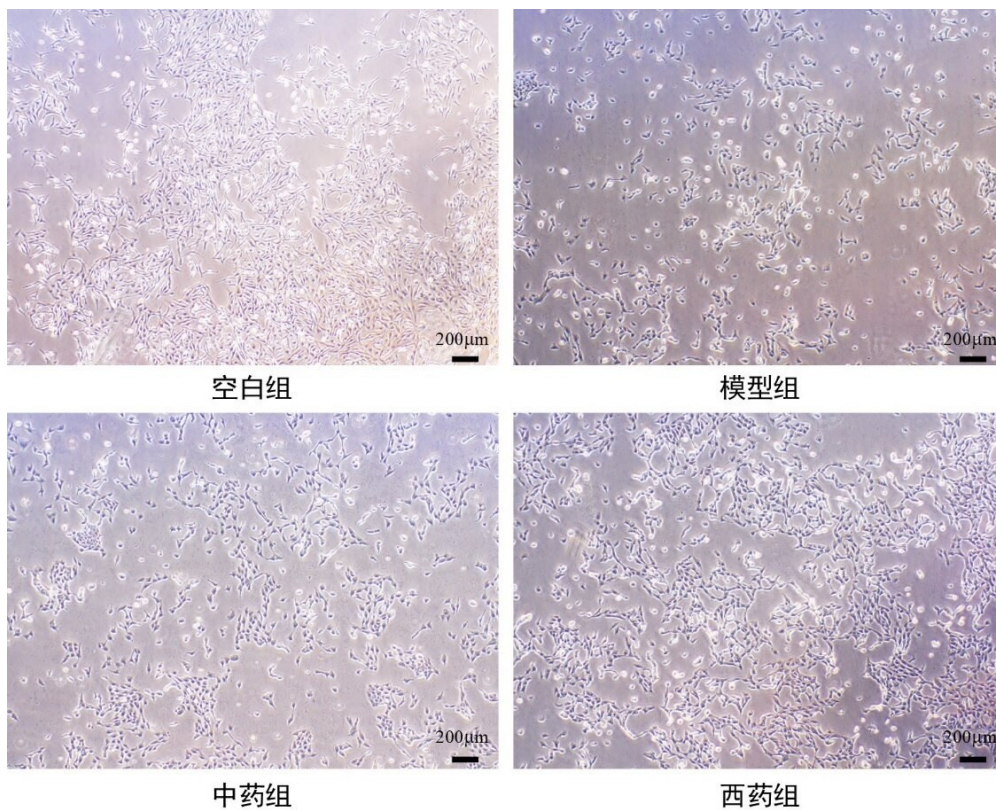
1.8 细胞活性检测 按照“1.7”所述分组, 将 CCK-8 溶液加入细胞培养液中, 孵育 2.5 h 后, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。细胞存活率=100%-(正常细胞组吸光值-加药组吸光值)/(正常细胞组)×100%^[10]。

1.9 Western blot 蛋白检测 采用 Western Blot 检测空白组、模型组、中药组和西药组细胞中 Caspase3、HIF-1 α 蛋白相对表达量, 通过裂解细胞提取蛋白、蛋白定量、电泳、转膜、封闭、一抗(Caspase3 稀释比例 1:2000, HIF-1 α 稀释比例 1:1000, β -actin 稀释比例 1:5000)孵育、二抗(HRP goat anti-mouse IgG 稀释比例 1:5000, HRP goat anti-rabbit IgG 稀释比例 1:5000)孵育、显影以测定各样本蛋白相对表达量。

1.10 统计学处理 应用SPSS 25.0软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。资料符合正态性及方差齐性时,组间比较采用单因素方差分析;不满足正态性或方差齐性时,采用非参数检验秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态 空白组、模型组、中药组、西药组细胞



长度标尺 200 μm,放大倍数 40×10倍

图1 显微镜下各组BEAS-2B细胞形态

2.2 CCK-8结果 10% CSE和20 ng·mL⁻¹ LPS干预后, BEAS-2B的细胞增殖受到抑制;使用15%含药血清以及阳性药物(甲泼尼龙)对损伤的BEAS-2B细胞进行干预后, CCK-8结果显示含药血清和阳性药物对损伤的BEAS-2B细胞具有一定的恢复增殖的作用。见表1。

2.3 Western blot分析结果 与空白组比较,模型组的Caspase3、HIF-1α蛋白条带增粗且颜色加深($P < 0.05$),证明模型建立成功。与模型组相比,西药组、中药组的Caspase3、HIF-1α蛋白条带不同程度地变

细,颜色变浅,西药组比中药组蛋白条带更细更浅($P < 0.05$)。这说明甲泼尼龙、黄芪-桑白皮均可抑制Caspase3、HIF-1α的表达,其中甲泼尼龙抑制程度更大。见图2、图3。

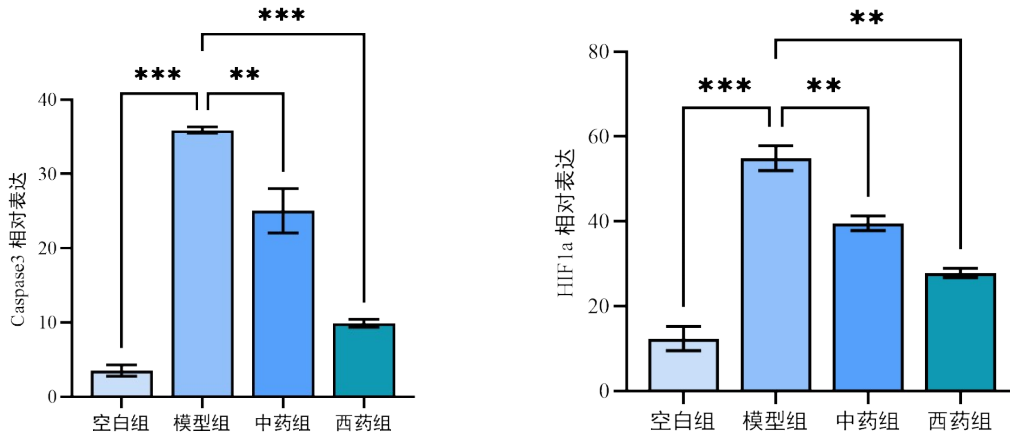
胞培养按照“1.7”所述方法进行培养24 h后,在400倍显微镜下观察BEAS-2B细胞数量和形态(见图1)。与空白组细胞比较, CSE和LPS干预后的模型组培养基中的细胞数量显著减少,细胞形态变短圆,细胞间隙扩大。中药组和西药组细胞数目下降幅度低于模型组,且细胞形态性较好。结果表明黄芪-桑白皮可以提高COPD炎症状态下的BEAS-2B细胞存活率。

表1 各组BEAS-2B细胞活性比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	450 nm 吸光光度值(OD值)
空白组	1.11±0.64
模型组	0.57±0.13 [△]
中药组	0.84±0.20 [*]
西药组	1.04±0.25 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与空白组比较,[△] $P < 0.05$

细,颜色变浅,西药组比中药组蛋白条带更细更浅($P < 0.05$)。这说明甲泼尼龙、黄芪-桑白皮均可抑制Caspase3、HIF-1α的表达,其中甲泼尼龙抑制程度更大。见图2、图3。



模型组与空白组比较,*** $P < 0.001$;模型组与给药组比较,*** $P < 0.001$;模型组与给药组比较,** $P < 0.01$

图2 各组细胞 Caspase3、HIF-1α 表达比较($\bar{x} \pm s, n=2$)

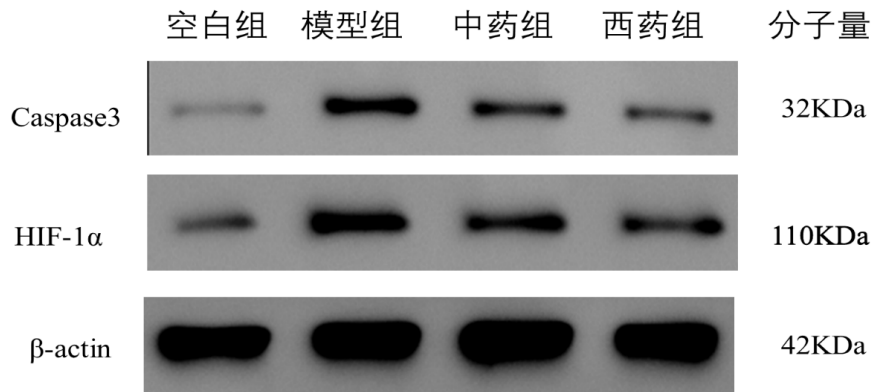


图3 Western blot分析中各组细胞Caspase3、HIF-1α含量

3 讨论

COPD属于中医学“肺胀”“喘证”等范畴,主要表现为反复咳嗽、咯痰、喘息、胸闷。《景岳全书·喘促》云:“盖实喘者有邪,邪气实也;虚喘者无邪,元气虚也。”本病病性为本虚标实,发作期偏于标实,缓解期偏于本虚,气虚贯穿 COPD 整个疾病过程。黄芪-桑白皮是临床治疗 COPD 的常用药对。其中,黄芪补脾益肺,扶正固本,为补气首选;桑白皮具有泻肺平喘的功效,现代药理研究表明,桑白皮能够抑制金黄色葡萄球菌的活性,具有清肺消痰、降气平喘之功^[11]。黄芪与桑白皮配伍有补气固表、泻肺平喘的功效,能改善正气虚损,增强清泄肺热、利水消肿之功,标本兼顾治疗 COPD。

COPD的特征是持续气流受限和急性加重,气流受限通常是持续且逐渐发展的,与慢性炎症反应有

关。COPD的病理机制尚未明确,目前所被接受的主要包括炎症假说、氧化和抗氧化失衡的假说,以及免疫和蛋白酶和抗蛋白酶的假说^[12]。其中,炎症是目前临床研究的重点,已发现 50 多种细胞因子参与 COPD 的发病机制^[13]。缺氧诱导因子 1α(HIF-1α)是氧稳态的主要调节因子,可调节缺氧的病理生理学^[14],并作为重要的转录调节因子促进细胞对炎症和氧化应激的反应^[15],在 COPD 患者的肺部过度表达。研究^[16,17]表明,HIF-1α 及其下游血管内皮生长因子基因可能与 COPD 有关,缺氧可诱导 HIF-1α 的持续表达,促进肺血管重构,加重 COPD 病程。

香烟烟雾被认为是 COPD 发病的关键因素,香烟烟雾会引起内质网应激和线粒体功能障碍^[18],导致 NLRP3 炎症小体激活,而炎症是 COPD 最主要的发病机制^[19]。激活的 NLRP3 炎症小体引起 Caspase 介导的

IL-1 β 和 IL-18 释放,导致炎症爆发^[20,21]。焦亡是由 GSDM 家族诱导的一种新型调节细胞死亡^[22],通常伴有活性促炎细胞因子如 IL-1 β 和 IL-18 的释放^[23]。其中 GSDME 可由 Caspase3 激活,GSDMB 可由 caspase-3/6/7 激活。GSDMA3 的表达可使 Caspase3 表达上调,意味着 Caspase3 可能通过 GSDM 家族与细胞炎症及焦亡密切相关^[24],进而影响 COPD 的发生、发展。

BEAS-2B 细胞是由腺病毒 12-SV40 转染的“正常”人支气管上皮细胞系。该细胞系能够替代目前无法获得的正常人支气管上皮细胞,具有来源稳定、易于培养、稳定性好、表达多种肺上皮细胞标志物等优点,可用于评估细胞的表型特征以及研究肺上皮的生理和病理过程,并在众多毒理学和癌症转化实验中作为相关研究的模型^[25]。本研究选取吸烟和感染这两个导致人类 COPD 发展最重要的暴露因素,采用 10% CSE 和 20 ng·mL⁻¹ LPS 建立 BEAS-2B 细胞炎症损伤模型,同时用含药血清干预,结果显示模型组 BEAS-2B 细胞活性受损,而经含药血清干预的中药组 BEAS-2B 细胞活性较模型组显著升高 ($P < 0.05$),说明黄芪-桑白皮能够提升 COPD 炎症状态下 BEAS-2B 细胞的活性,减少细胞损害。此外,本研究还发现,模型组 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达较正常组均显著升高;与模型组比较,中药组能显著降低 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达,提示黄芪-桑白皮可抑制 Caspase3、HIF-1 α 蛋白表达。

综上所述,本研究发现黄芪-桑白皮药对可能通过抑制 Caspase3、HIF-1 α 蛋白的表达,影响肺部细胞对炎症和氧化应激的反应,证实了黄芪-桑白皮药对通过多靶点和多通路发挥治疗慢性阻塞性肺病的作用。后续还可对黄芪-桑白皮药对调控 Caspase3、HIF-1 α 蛋白的作用机制进行深入研究。

参考文献

[1]慢性阻塞性肺疾病中西医结合管理专家共识工作组.慢性阻塞性肺疾病中西医结合管理专家共识(2023版)[J].中国全科医学,2023,26(35):4359-4371.
 [2]LI J S, ZHANG H L, RUAN H R, et al. Effects of Chinese herbal medicine on acute exacerbations of COPD: a randomized, placebocontrolled study[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 2901-2912.
 [3]刘国伦,赵迪,刘学芳,等.基于网络药理学和分子对接技术研究黄芪-赤芍治疗 COPD 的作用机制[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(9):3132-3146.
 [4]郝正华,张虹.慢性阻塞性肺疾病中医治疗进展[J].辽宁中医杂志,2015,42(6):1376-1378.
 [5]邢菊玲,刘芬,冯萌,等.基于网络药理学及分子对接的黄芪散治疗 2 型糖尿病机制探讨[J].广州中医药大学学报,2022,39(4):920-931.

[6]吴迪,王小乐,高雅婷,等.参芪温肺方减轻慢性阻塞性肺疾病大鼠的肺气虚证:基于调节 NLRP3/GSDMD 细胞焦亡通路[J].南方医科大学学报,2023,43(9):1500-1508.
 [7]杨萍,瞿继兰.含桑白皮古今方剂组方规律对比研究[J].湖南中医杂志,2022,38(6):22-29.
 [8]李剑庆,王慧,刘雨,等.基于网络药理学探讨补肺汤治疗慢性阻塞性肺疾病的作用[J].中医药通报,2022,21(7):25-30.
 [9]黄萍,周祯祥,李德顺,等.基于代谢组学和网络药理学探讨细辛-干姜药对对 COPD 大鼠肺、肝脂质代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(18):152-160.
 [10]张钰,李福星,柳卓,等.金水六君煎含药血清对香烟烟雾及脂多糖诱导 BEAS-2B 细胞 COPD 黏液高分泌的影响[J].中国中医急症,2022,31(11):1904-1908.
 [11]马将,张湘苑,胡诗苑,等.重构本草:桑白皮[J].吉林中医药,2023,43(1):99-102.
 [12]RUTA A, EDVARDAS B, JOVILE R, et al. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015, 10: 995-1013.
 [13]BARNES P J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD[J]. Clin Sci, 2017, 131(13): 1541-1558.
 [14]王志华,杨焕章,傅晓燕,等.血管内皮细胞生长因子在急性肺损伤大鼠中的表达及意义[J].临床肺科杂志,2016,21(12):2230-2233, 2237.
 [15]ZHONG S, YANG L, LIU N, et al. Identification and validation of aging-related genes in COPD based on bioinformatics analysis[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(10): 4336-4356.
 [16]SUN S, SHEN Y, WANG J, et al. Identification and validation of autophagy-related genes in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2021, 16: 67-78.
 [17]WU H, MA H, WANG L, et al. Regulation of lung epithelial cell senescence in smoking-induced COPD/emphysema by microR-125a-5p via Sp1 mediation of SIRT1/HIF-1 α [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(2): 661-674.
 [18]卓怀蜜,陈宋程,周向东,等.整合应激反应在呼吸系统疾病中的作用[J].临床肺科杂志,2023,28(1):132-136.
 [19]石伊宁,金永梅,杨进,等.细胞焦亡在呼吸系统疾病中作用的研究进展[J].中国病理生理杂志,2021,37(5):956-960.
 [20]BARNES P J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Allergy Clin Immunol, 2016, 138(1): 16-27.
 [21]MAHALANOBISH S, DUTTA S, SAHA S, et al. Melatonin induced suppression of ER stress and mitochondrial dysfunction inhibited NLRP3 inflammasome activation in COPD mice [J]. Food Chem Toxicol, 2020, 144: 111588.
 [22]邵峰.细胞焦亡、炎症和肿瘤免疫[J].科学新闻,2023,25(5):20-23.
 [23]FENG Y, LI M, YANGZHONG X, et al. Pyroptosis in inflammation-related respiratory disease [J]. J Physiol Biochem, 2022, 78(4): 721-737.
 [24]SUN J, LI Y. Pyroptosis and respiratory diseases: A review of current knowledge [J]. Front Immunol, 2022, 13: 920464.
 [25]LEE Y, RYU Y J. Morphologically and karyotypically atypical cells of 'normal' human bronchial epithelial cell line (Beas-2B) [J]. Ultrastruct Pathol, 2023, 47(6): 470-477.

(收稿日期:2024-01-07)

(本文编辑:蒋艺芬)