

补肺益肾方对脂多糖刺激细胞分泌细胞因子的影响*

□吴耀松 陈玉龙 李建生** 刘学芳 郝丽丽 田燕歌 李 亚
(河南中医学院老年医学研究所 郑州 450008)

摘 要 :目的 :从补肺益肾方药对脂多糖 (LPS) 刺激细胞分泌细胞因子变化的影响,揭示补肺益肾方药治疗 COPD 分子机理。方法 :LPS 刺激肺泡上皮细胞 A549、气道上皮细胞 H292、单核巨噬细胞 THP-1,每种细胞均分为正常组 (20%正常大鼠血清)、LPS 组 (20%正常大鼠血清和 $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS)、用药组 (20%补肺益肾方药大鼠血清和 $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS),ELISA 法检测细胞因子,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,LPS 组 THP-1 细胞分泌 MMP-9、TGF- β 增多,分泌 TNF- α 、PPAP2B 减少 ;A549 细胞分泌 TIMP 增多,分泌 IL-3、TGF- β 减少 ;H292 细胞分泌 IL-8 增多。与 LPS 组比较,用药组 THP-1 细胞分泌 TNF- α 、TGF- β 、TIMP-1、MMP-9 ($P<0.01$) 及 GM-CSF、SOD、CD36 ($P<0.05$) 增加, TGF- β 分泌减少 ($P<0.01$) ;H292 细胞分泌 IL-8 减少 ($P<0.01$),TNF- α 、TIMP-1、PPAP2B ($P<0.05$) 和 TGF- β ($P<0.05$) 分泌增加 ;A549 细胞分泌 TIMP-1、TNF- α ($P<0.01$) 和 PPAP2B ($P<0.05$) 减少, MMP-9、IL1B 增加 ($P<0.01$)。与 LPS 组比较,用药组有改变细胞因子的转录因子 :THP-1 细胞的 AP1、NFKB1、STAT3、SMAD3 和 PPARG,A549 细胞的 STAT3 和 PPARG 满足激活条件。结论 :LPS 对单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子影响最大,补肺益肾含药血清对 LPS 引起的细胞因子分泌变化有一定调节作用。

关键词 :COPD 补肺益肾方药 LPS 细胞因子 体外实验

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2013.01.013

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,肺泡巨噬细胞、淋巴细胞、肺上皮细胞

等多种细胞参与其中***。脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁主要糖脂成分,也是香烟烟雾的活性成分之一,是重要的前炎性物质^[1]。补肺益肾方药治疗肺功能 I~III 级的 COPD 稳定期具有明显效果,随访 6 个月的效果明显,其机制可能为调节患者细胞免疫功能、改善细胞外基质损伤、减低炎症细胞和炎症因子及黏附

收稿日期 :2012-06-24

修回日期 :2013-02-18

* 国家自然科学基金重点项目 (81130062) :调补肺肾三法调控多维分子网络治疗 COPD 的作用及远后效应,负责人 :李建生 ;教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-11-0946) :中医药与免疫/炎症细胞信号转导研究,负责人 :陈玉龙。

** 通讯作者 李建生,博士,教授,主要研究方向 :中医药治疗老年病和证候标准建立与疗效评价体系研究。

*** Roberto Rodriguez Roisin, Jørgen Vestbo. The Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2010: <http://www.goldcopd.org/>

分子水平等^[2]。为进一步研究补肺益肾方药的作用机制,本文以 LPS 作为刺激物,参与 COPD 炎症反应的巨噬细胞和肺泡上皮及气道上皮细胞作为对象,观察补肺益肾方对 LPS 刺激单核巨噬细胞和肺泡上皮及气道上皮细胞分泌细胞因子的影响。

一、材料和方法

1. 材料

(1) 受试药物。

补肺益肾方主要由人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 9 g、山茱萸 (*Cornus officinalis*) 12 g、五味子 (*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill) 9 g、陈皮 (*Pericarpium Citri Reticulatae*) 9 g 等组成,所有药物经河南中医学院药学院陈随清教授鉴定为正品。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。补肺益肾方制备方法:五味子粉、陈皮水蒸馏 5 h,收集挥发油,备用;五味子、陈皮的药渣与人参粉、山茱萸 80%乙醇回流提取,减压回收乙醇,浓缩,备用;乙醇回流后的五味子、陈皮的药渣与人参粉、山茱萸药渣水煎煮 1 h,过滤减压浓缩,混合 2 次浸膏,喷雾干燥成粉,备用;将挥发油与 1 β -环糊精研磨包合,减压干燥,粉碎成粉,与浸膏粉合并即得。

(2) 试剂。

DMEM 培养基 (Gibco),胎牛血清 (Hyclone),MTT (Sigma),DMSO (Amresco),台盼蓝 (Sigma),LPS (Sigma),PMA (Amresco),TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、GM-CSF、TGF- β 、MMP-9、IL-3、TIMP-1、SOD、CD36、PPAP2B

ELISA 试剂盒 (上海信然生物技术有限公司)。

(3) 实验动物。

SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,4 月龄,体重 200~220 g,共 20 只,由河北省实验动物中心提供 (合格证号:1104072)。

(4) 细胞株。

肺泡上皮细胞 A549、气道上皮细胞 H292、单核细胞 THP-1 购于中国科学院上海细胞所。

(5) 主要仪器设备。

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

2. 方法

(1) 含药血清制备。

大鼠随机分为正常对照组、补肺益肾方组,每组 10 只。补肺益肾方组以 18 g $\cdot$ kg⁻¹ 连续灌胃 3 天,每天 2 次,两次相隔 12 h,连续灌胃 7 次;正常组灌胃给予等量生理盐水。末次给药后 2 h (灌药前禁食不禁水 12 h) 腹主动脉采血,3000 rpm 离心 15 min,无菌分离血清,同组血清相混合,经 56 $^{\circ}$ C 灭活 30 min 后,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(2) 细胞培养。

肺泡上皮细胞 A549、气道上皮细胞 H292、单核细胞 THP-1 培养于含 10% 胎牛血清、100 U $\cdot$ mL⁻¹ 青霉素、100 U $\cdot$ mL⁻¹ 链霉素的培养基中,THP-1 培养基还含有 0.05 mM β -巯基乙醇,置于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养,每 2 天更换一次培养液,约每 3 天按 1:3 比例传代一次。

表 1 含药血清对 LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子作用 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

细胞因子	正常组	LPS 组	用药组
GM-CSF (ng $\cdot$ L ⁻¹)	15.22 $\pm$ 1.12	14.12 $\pm$ 1.30	17.11 $\pm$ 1.37 ^{Δ}
TNF- α (ng $\cdot$ L ⁻¹)	75.11 $\pm$ 8.15	38.73 $\pm$ 3.12**	61.25 $\pm$ 6.03* ^{$\Delta\Delta$}
IL-3 (ng $\cdot$ L ⁻¹)	3.57 $\pm$ 0.56	3.30 $\pm$ 0.29	3.81 $\pm$ 0.34
MMP-9 (μ g $\cdot$ L ⁻¹)	106.41 $\pm$ 12.36	140.13 $\pm$ 13.72*	255.10 $\pm$ 25.10** ^{$\Delta\Delta\Delta$}
TIMP-1 (μ g $\cdot$ L ⁻¹)	12.60 $\pm$ 1.23	11.14 $\pm$ 1.02	20.42 $\pm$ 2.11** ^{$\Delta\Delta$}
IL1B (pg $\cdot$ L ⁻¹)	3.49 $\pm$ 0.98	3.84 $\pm$ 0.42	2.95 $\pm$ 0.25
SOD (U $\cdot$ mL ⁻¹)	8.04 $\pm$ 1.21	7.74 $\pm$ 0.62	10.66 $\pm$ 1.45* ^{Δ}
TGF- β (ng $\cdot$ L ⁻¹)	72.84 $\pm$ 6.56	114.65 $\pm$ 10.89**	64.24 $\pm$ 6.72 ^{$\Delta\Delta$}
PPAP2B (pg $\cdot$ L ⁻¹)	28.91 $\pm$ 2.33	14.99 $\pm$ 1.07**	23.42 $\pm$ 2.73* ^{$\Delta\Delta$}
CD36 (ng $\cdot$ L ⁻¹)	1.43 $\pm$ 0.24	1.46 $\pm$ 0.09	1.90 $\pm$ 0.24* ^{Δ}

注 与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 LPS 组比较, ^{Δ} $P<0.05$, ^{$\Delta\Delta$} $P<0.01$ 。

(3) 分组。

以每孔 1×10^4 气泡上皮细胞 A549、气管上皮细胞 H292, 单核细胞 THP[加入 $20 \mu\text{M}$ 佛波酯 (PHA)] 接种培养 24 h 后, 以孔为单位, 分为正常组 (加入含 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 正常大鼠血清)、LPS 组 (加入 $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 和 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 正常大鼠血清组)、治疗组 (加入 $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 和 $200 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 含药大鼠血清), 每组设 4 个复孔, 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养 24 h 后收集细胞上清液, -80°C 保存备用, 重复 3 次。

(4) ELISA 法检测细胞因子。

严格按照 ELISA 说明书, 检测肺泡上皮细胞、气道上皮细胞、单核巨噬细胞培养基上清中 GM-CSF、TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、IL-3、MMP9、TIMP-1、TGF- β 、SOD、CD36、PPAP2B。

(5) 转录因子分析。

采用 Essaghir A's 法^[3]在线进行转录因子分析*。

(6) 统计学方法。

SPSS 17.0 For Windows 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 (One-Way ANOVA) 的 SNK 法, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性水准取 $\alpha=0.05$ 。

二、结 果

1. 含药血清对 LPS 刺激 THP-1 细胞分泌细胞因子的影响

与正常组相比, LPS 组 THP-1 细胞分泌 TGF-

β ($P<0.01$) 和 MMP-9 ($P<0.05$) 明显增多, TNF- α 和 PPAP2B 分泌明显减少 ($P<0.01$); GM-CSF、TIMP-1、SOD 有减少趋势。与 LPS 组相比, 用药组 THP-1 细胞分泌 TNF- α 、TGF- β 、TIMP-1、MMP-9 ($P<0.01$) 及 GM-CSF、SOD、CD36 ($P<0.05$) 明显增加, TGF- β 分泌明显减少 ($P<0.01$)。见表 1。

2. 含药血清对 LPS 刺激 A549 细胞分泌细胞因子的影响

与正常组相比, LPS 组 A549 细胞分泌 TIMP-1 明显增多 ($P<0.05$), 分泌 IL-3、TGF- β 明显减少 ($P<0.01$), SOD、CD36 有减少趋势 ($P>0.05$)。与 LPS 组相比, 用药组 A549 细胞分泌 TIMP-1、TNF- α ($P<0.01$) 和 PPAP2B ($P<0.05$) 明显减少, MMP-9、IL1B 明显增加 ($P<0.01$), SOD、CD36、IL-3 有增加趋势 ($P>0.05$)。见表 2。

3. 含药血清对 LPS 刺激 H292 细胞分泌细胞因子的影响

与正常组相比, 除 IL-8 分泌增加外 ($P<0.05$), LPS 组细胞分泌各种细胞因子变化不大; 与 LPS 组相比, 用药组 H292 细胞分泌 IL-8 明显减少 ($P<0.01$), TNF- α 、TIMP-1、PPAP2B ($P<0.05$) 和 TGF- β 、IL-8 ($P<0.01$) 分泌增加, IL-3 有减少趋势 ($P>0.05$), 见表 3。

4. 通过所调控分泌因子分析含药血清对转录因子影响

把含药血清对它有影响的分泌因子输入在线工

表 2 含药血清对 LPS 刺激 A549 细胞分泌细胞因子作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

细胞因子	正常组	LPS 组	用药组
GM-CSF ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	27.73 ± 3.21	27.25 ± 2.87	30.15 ± 3.17
TNF- α ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	58.23 ± 5.51	59.39 ± 6.02	$37.68 \pm 2.97^{**\Delta\Delta}$
IL-3 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.38 ± 0.78	$2.47 \pm 0.31^{**}$	$2.51 \pm 0.29^{**}$
MMP-9 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	144.65 ± 11.23	142.73 ± 13.79	$207.18 \pm 19.98^{**\Delta\Delta}$
IL-8 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	183.28 ± 11.65	183.47 ± 18.06	196.08 ± 18.79
TIMP-1 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	8.05 ± 0.98	$11.41 \pm 1.09^{**}$	$8.78 \pm 0.91^{\Delta\Delta}$
IL1B ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.88 ± 0.56	3.58 ± 0.29	$6.70 \pm 0.54^{**\Delta\Delta}$
SOD ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	10.10 ± 1.65	8.04 ± 0.49	9.50 ± 0.81
TGF- β ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	116.67 ± 9.78	$57.77 \pm 5.02^{**}$	$56.00 \pm 4.91^{**}$
PPAP2B ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)	15.61 ± 1.82	14.57 ± 1.39	$11.49 \pm 0.97^{\Delta\Delta}$
CD36 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.53 ± 0.21	1.32 ± 0.21	1.65 ± 0.19

注 与正常组比较, $*P<0.05$, $**P<0.01$; 与 LPS 组比较, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

* www.tfacts.org.

表 3 含药血清对 LPS 刺激 H292 细胞分泌细胞因子作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

细胞因子	正常组	LPS 组	用药组
GM-CSF ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	25.96 $\pm$ 2.98	27.32 $\pm$ 2.55	26.06 $\pm$ 2.54
TNF- α ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	54.54 $\pm$ 5.14	65.55 $\pm$ 6.31	79.50 $\pm$ 8.01** Δ
IL-3 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	3.26 $\pm$ 0.85	4.08 $\pm$ 0.39	3.72 $\pm$ 0.36
MMP-9 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	154.06 $\pm$ 10.20	169.79 $\pm$ 15.89	165.25 $\pm$ 16.02
TIMP-1 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	12.36 $\pm$ 1.45	12.16 $\pm$ 1.11	15.15 $\pm$ 1.38* Δ
IL1B ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.12 $\pm$ 1.10	7.08 $\pm$ 0.68	6.19 $\pm$ 0.55
SOD ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	9.87 $\pm$ 1.36	10.33 $\pm$ 1.91	12.46 $\pm$ 1.30
TGF- β ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	118.73 $\pm$ 12.10	120.98 $\pm$ 11.84	188.93 $\pm$ 17.94** $\Delta\Delta$
PPAP2B ($\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.81 $\pm$ 0.45	2.99 $\pm$ 0.25	3.68 $\pm$ 0.31* Δ
CD36 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.75 $\pm$ 0.32	2.00 $\pm$ 0.17	1.97 $\pm$ 0.18
IL-8 ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	176.46 $\pm$ 9.27	198.00 $\pm$ 18.83*	138.85 $\pm$ 12.92** $\Delta\Delta$

注 与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与 LPS 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

具*, 遵循以下条件: $P<0.05$, $E<0.05$, $Q<0.05$, $\text{FDR}<0.05$, 结果发现含药血清对 LPS 刺激的 THP-1 细胞的 AP1、NFKB1、STAT3、SMAD3 和 PPARG, A549 细胞 STAT3 和 PPARG 符合以上条件。

三、讨论

致病微生物感染占 COPD 加重期患者 50% 以上, 其中多为流感嗜血杆菌、绿脓杆菌、卡他莫拉菌等革兰氏阴性菌感染, LPS 是它们导致炎症的主要成分, 同时也是 COPD 主要危险因素香烟烟雾的活性成分之一。COPD 病理过程中, 肺泡巨噬细胞起中心作用, 肺上皮细胞在其中不但是起保护作用的物理屏障, 而且参与了免疫和炎症反应^[4-6]。因此, 本研究采用 LPS 作为致病因子, 以单核巨噬细胞、肺泡上皮细胞、气道上皮细胞为研究对象, 观察补肺益肾含药血清对他们分泌各种细胞因子的影响。

在整个 COPD 炎症过程中, 被激活的巨噬细胞、上皮细胞和淋巴细胞可释放趋化因子, 如白细胞介素 8 (IL-8)、粘附分子, 炎前细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β), 生长因子如粒细胞单核细胞克隆刺激因子 (GM-CSF)、单核细胞克隆刺激因子 (GM-CSF), 转化生长因子- β 1 (Transform growth factor TGF- β 1), 蛋白酶如基质金属蛋白酶 (matrixmetal proteinase, MMP)、组织蛋白酶 G 及过氧化物等^[7,8], 从而导致炎症加重、蛋白酶-抗蛋白酶失衡, 氧化和抗氧化失衡, 最终导致纤毛粘液系统、上

皮、平滑肌、毛细血管等多组分破坏, 气道重塑, 引起不可逆气流受限。本研究主要从以上所述趋化因子、炎症因子、生长因子和金属蛋白酶几个方面进行了观察。

THP-1 细胞可经过 PMA 诱导成巨噬细胞, 以 LPS 刺激 THP-1 已经成为重要的炎症体外模型^[9]。本研究结果显示, 单核巨噬细胞 THP-1 可以分泌多种细胞因子及 MMP9 和 TIMP-1, LPS 刺激下 TNF- α 、MMP-9、TGF- β 、PPAP2B 分泌有所改变, 而其他细胞因子分泌变化不明显, 其中 TNF- α 分泌下降, 这与其他组研究表现为 LPS 刺激下分泌增加有所不同^[10], 其原因可能与 LPS 用量和作用时间有关, 有待于深入研究。补肺益肾方药能够很好地纠正 LPS 刺激带来的 THP-1 细胞因子分泌变化, 说明纠正 LPS 引起的巨噬细胞炎症因子分泌变化, 可能是其治疗 COPD 机制之一。

人肺腺癌 A549 细胞株作为肺泡 II 型上皮细胞模型、H292 作为气道粘液上皮细胞常用于对 COPD 的研究。本研究显示, 两个细胞系都可以分泌 TNF- α 、IL-3、IL-8 等炎症因子, LPS 刺激下 A549 细胞分泌 IL-3、TGF- β 、TIMP-1 有所变化, 但是 H292 除了 IL-8 分泌增加外, 其他细胞因子分泌变化不明显, 提示两个细胞特性不同, 对 LPS 刺激后反应也不同。补肺益肾方药可以减低 LPS 刺激下 H292 细胞 IL-8 分泌增加, 改善 A549 细胞分泌细胞因子变化。

在 LPS 所引起变化的细胞因子中, TGF- β 在

* www.tfacts.org.

COPD 的发生发展中起重要作用, TGF- β 1 直接或间接参与巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞等多种炎性细胞的激活趋化, 调节 MMP9、MMP12 蛋白激酶和 TIMP1 抗蛋白酶表达, 促进成纤维细胞增殖、胶原蛋白合成、抑制机体的免疫反应, 参与 Tc 的过度凋亡等^[11]。从研究结果看, LPS 对肺泡细胞 A549 分泌 TGF- β 有抑制作用, 但对 THP-1 却有促进作用, 补肺益肾方药能够减少 LPS 引起 THP-1 细胞 TGF- β 分泌, 但对 A549 细胞分泌 TGF- β 作用不明显。

除此之外, 我们还发现与脂肪代谢相关两个酶磷脂酸脂肪酶 2B (PPAP2B) 和脂肪酸转位酶 (CD36) 在 3 个细胞中也有所分泌, 特别是 PPAP2B, 单核巨噬细胞分泌较多, LPS 作用下分泌显著下降, 含药血清对其有一定调节作用。这两种酶分泌改变说明 LPS 干预了细胞的脂肪酸代谢, 或可导致其代谢紊乱, 脂质过氧化, 而含药血清有一定的调节作用。

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对其有所调控作用的细胞因子进行了转录因子分析。很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^[12], 我们采用了 Ahmed Essaghir's 的方法, 此种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, 含药血清对 LPS 刺激下单核巨噬细胞 THP-1 转录因子调控最为明显, 涉及 AP1、NFKB1、STAT3、SMAD3 和 PPARG 多个转录因子, 这些转录因子和炎症感应、氧化应激关系密切。

如上所述, 在 LPS 刺激下 A549、H292 和 THP-1 细胞分泌细胞因子的变化不同, 如 TNF- α 、IL-3 等, 其原因和细胞的类型有很大关系, 单核巨噬细胞 THP-1 细胞为免疫细胞, 细胞因子变化比较明显, 而肺泡上皮细胞 A549 和气道上皮细胞 H292 为上皮细胞。同时, 与 LPS 激活的信号通路有关, 如 LPS 刺激下激活了 THP-1 细胞与炎症反应相关的多种细胞通路, 如 AP1、NFKB1、STAT3 等, 而 A549 和 H292 细胞激活的通路相对较少, 其具体机制尚需要深入研究。

总之, 本研究显示 LPS 刺激下对单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子影响最大, 对肺泡上皮细胞和气道上皮细胞分泌细胞因子也有一定的影响,

补肺益肾含药血清对 LPS 引起的细胞因子分泌变化有一定调节作用, 特别对 THP-1 细胞的调节最为明显。

参考文献

- 1 Kharitonov SA, Sjöbring U. Lipopolysaccharide challenge of humans as a model for chronic obstructive lung disease exacerbations. *Con-trib Microbiol*, 2007,14:83~100.
- 2 Li JS, Li SY, Yu XQ, *et al*. Bu-Fei Yi-Shen granule combined with acupoint sticking therapy in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: A randomized, double-blind, double-dummy, active-controlled, 4-center study. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2):584~591.
- 3 Essaghir A, Toffalini F, Knoop L, *et al*. Transcription factor regulation can be accurately predicted from the presence of target gene signatures in microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res*, 2010,38(11):e120.
- 4 Parameswaran GI, Sethi S, Murphy TF. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest*, 2011,140(3):611~617.
- 5 Korsgren M, Linden M, Entwistle N, *et al*. Inhalation of LPS induces inflammatory airway responses mimicking characteristics of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Physiol Funct Imaging*, 2012,32(1):71~79.
- 6 Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*, 2004,1(1):59~70.
- 7 Barnes PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacol Rev*, 2004,56:515~548.
- 8 Chung KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets*, 2006,7(6):675~681.
- 9 Kim JA, Ahn BN, Kong CS, *et al*. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages. *Inflamm Res*, 2011, 60 (12):1131~1138.
- 10 Essafi-Benkhadir K, Refai A, Riahi I, *et al*. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) peel polyphenols modulate LPS-induced inflammation in human THP-1-derived macrophages through NF- κ B, p38MAPK and Akt inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012,418 (1): 180~185.
- 11 Königshoff M, Kneidinger N, Eickelberg Oliver. TGF- β signalling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimens. *Swiss Med Wkly*, 2009,139 (39-40): 554~563.
- 12 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. *BMC Bioinformatics*, 2008,9:495.

Effect of Invigorating Lung-kidney Prescription on Secretion of Cytokines Induced by

Lipopolysaccharide *In Vitro*

Wu Yaosong, Chen Yulong, Li Jiansheng, Liu Xuefang, Hao Lili, Tian Yange, Li Ya
(Institute of Geriatrics, Henan University of TCM, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: This study was aimed to observe effect of invigorating lung-kidney prescription (ILKP) on secretion of cytokines induced by LPS *in vitro* and reveal molecular mechanism of ILKP treatment on chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Alveolar epithelial cells A549, airway epithelial cells H292, and monocyte macrophage THP-1 were stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Samples were divided into the normal group (normal rat serum), LPS group (20% normal rat serum and $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS), and ILKP group (20%ILKP serum and $75 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS). The cytokines were detected by ELISA and the transcription factors of cytokines were analyzed with the Network tool. The results showed that compared with the normal group, the secretion of MMP-9 and TGF- β by THP-1 cells, secretion of TIMP by A549 cells, and secretion of IL-8 by H292 cells increased, while secretion of TNF- α , PPAP2B by THP-1 cells, and secretion of IL-3, TGF- β by A549 cells decreased in LPS group. Compared with LPS group, the secretion of TGF- β by THP-1 cells, and secretion of TIMP-1, TNF- α and PPAP2B by A549 cells, and secretion of IL-8 by H292 cells decreased, while secretion of TNF- α , TGF- β , TIMP-1, MMP-9 ($P < 0.01$) and GM-CSF, SOD, CD36 ($P < 0.05$) by THP-1 cells, secretion of MMP-9, IL1B by A549 cells, and secretion of TNF- α , TIMP-1, PPAP2B and TGF- β by H292 cells increased in ILKP group. Compared with LPS group, the transcription factors of cytokines changed in ILKP group, AP1, NFkB1, STAT3, SMAD3 and PPARG in THP-1 cells, STAT3 and PPARG in A549 cells met activation criteria. It was concluded that the THP-1 cells cytokines secretion is the most affected by LPS. The ILKP prescription serum can regulate cells secretion of cytokines induced by LPS in some degree.

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, invigorating lung-kidney prescription, LPS, cytokines, *in vitro* experiment

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)