· 论著 ·

补肺益肾方对单核细胞条件培养基刺激下肺泡上皮细胞炎症反应的影响

秦燕勤 董浩然 李建生 陈玉龙 毛筱宁 吴明明

450046 河南郑州，河南中医药大学呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心（秦燕勤、董浩然、李建生、毛筱宁、吴明明）；分子生物学实验中心（陈玉龙）

通讯作者：陈玉龙，Email：cyl72621@163.com

DOI：10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.018

【摘要】 目的 观察补肺益肾方对单核细胞条件培养基刺激肺泡上皮细胞炎症反应的影响，探讨补肺益肾方治疗慢性阻塞性肺疾病（COPD）的抗炎机制。**方法** 复制人髓系白血病单核细胞（THP-1）细胞株条件培养基刺激 A549 细胞炎症模型，分为空白对照组（20% 空白兔血清）、模型组（20% 空白兔血清 + 25.0% THP-1 细胞条件培养基）、核转录因子激活蛋白酶 -1（AP-1）通路抑制剂 T-5224 组（20% 空白兔血清 + 25.0% THP-1 细胞条件培养基 + 100 μmol/L T-5224）、补肺益肾组（20% 含补肺益肾方兔血清 + 25.0% THP-1 细胞条件培养基）。用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测细胞培养上清液中白细胞介素（IL-6、IL-8）、肿瘤坏死因子 -α（TNF-α）、基质金属蛋白酶 -9（MMP-9）等细胞因子的含量，用硫代巴比妥酸（TBA）法检测上清液中丙二醛（MDA）含量，用羟胺法检测总超氧化物歧化酶（T-SOD）活性，用凝胶迁移率实验（EMSA）检测 AP-1 通路的活性。**结果** 与空白对照组比较，25.0% 条件培养基作用 24 h、48 h A549 细胞增殖活性均明显增加〔吸光度（*A*）值：24 h 为 0.41±0.02 比 0.37±0.04，48 h 为 1.30±0.09 比 1.15±0.19〕；模型组 IL-6、IL-8、TNF-α、MMP-9、MDA 含量及 AP-1 表达均增多〔IL-6（ng/L）：35.00±3.63 比 23.15±1.72，IL-8（ng/L）：273.09±164.36 比 231.45±33.90，TNF-α（ng/L）：51.61±9.51 比 28.87±3.34，MMP-9（ng/L）：442.85±78.86 比 235.60±14.62，MDA（μmol/L）：6.90±0.11 比 6.01±0.12，AP-1 表达（*A* 值）：2.260±0.062 比 1.000±0.000〕。MDA/T-SOD 比值增大（4.43±0.05 比 3.96±0.06）。与模型组比较，T-5224 组 IL-8（ng/L：100.29±17.03）、TNF-α（ng/L：25.13±0.46）、AP-1 表达（*A* 值：1.38±0.02）、MDA/T-SOD 比值（4.23±0.23）和补肺益肾组 MMP-9（ng/L：195.44±9.80）、MDA（μmol/L：5.86±0.30）、MDA/T-SOD（3.56±0.41）、AP-1 表达（*A* 值：0.76±0.01）均明显降低（均 $P<0.05$）。**结论** 补肺益肾方可通过调控肺泡上皮细胞 AP-1 信号通路，以抑制炎症反应。

【关键词】 肺疾病，阻塞性，慢性；补肺益肾方；条件培养基；核转录因子激活蛋白酶 -1 通路

基金项目： 国家自然科学基金（81130062）；河南省中医临床学科领军人才培育计划资助项目（HNZYLJ201301001）

The effects of nourishing lung and kidney formulas on inflammatory response of alveolar epithelial cells stimulated by monocytes conditioned medium *Qin Yanqin, Dong Haoran, Li Jiansheng, Chen Yulong, Mao Xiaoning, Wu Mingming*

Henan University of Chinese Medicine, Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment&Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China (Qin YQ, Dong HR, Li JS, Mao XN, Wu MM); Molecular Biological Experiment Center of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046 Henan, China (Chen YL)

Corresponding author: Chen Yulong, Email: cyl72621@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of nourishing lung and kidney formulas on inflammatory response of alveolar epithelial cells stimulated by monocytes conditioned medium and study the anti-inflammatory mechanism of the formulas for the treatment of chronic obstructive pulmonary diseases (COPD). **Methods** The reproduction of inflammation models of A549 cells were stimulated by monocyte THP-1 cell strain conditioned medium. A549 cells were randomly divided into blank control group (20% blank rabbits serum), model group (20% blank rabbits serum+25.0% THP-1 cell conditioned medium), nuclear transcription factor activator protein-1 (AP-1) pathway inhibitor T-5224 group (20% blank rabbits serum+25.0% THP-1 cells conditioned medium+100 μmol/L T-5224), nourishing lung and kidney group (20% rabbits serum with nourishing lung and kidney formulas+25.0% THP-1 cells conditioned medium). The contents of interleukins (IL-6, IL-8), tumor necrosis factor -α (TNF-α), matrix metalloprotein-9 (MMP-9) in cell culture supernatant were detected with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), the supernatant content of malondialdehyde (MDA) was detected with thibabituric acid (TBA) method, the total activity of superoxide dismutase (T-SOD) was detected with hydroxylamine method, and the activity of AP-1 pathway was detected with electrophoretic mobility shift assay (EMSA) method. **Results** Compared with the blank control group, the A549 cell proliferation were significantly increased at 24 hours, 48 hours stimulation by 25.0% cell conditioned medium (*A* value: 24 hours was 0.41 ± 0.02 vs. 0.37 ± 0.04, 48 hours was 1.30 ± 0.09 vs. 1.15 ± 0.19). Compared with the blank control group, the contents of IL-6, IL-8, TNF-α, MMP-9, MDA, AP-1 expression were significantly increased in model group [IL-6 (ng/L): 35.00 ± 3.63 vs. 23.15 ± 1.72, IL-8 (ng/L): 273.09 ± 164.36 vs. 231.45 ± 33.90, TNF-α (ng/L): 51.61 ± 9.51 vs. 28.87 ± 3.34, MMP-9 (ng/L): 442.85 ± 78.86 vs. 235.60 ± 14.62, MDA (μmol/L): 6.90 ± 0.11 vs.

万方数据

6.01 ± 0.12, AP-1 expression (*A* value): 2.260 ± 0.062 vs. 1.000 ± 0.000], MDA/T-SOD ratio was increased (4.43 ± 0.05 vs. 3.96 ± 0.06). Compared with model group, the levels of IL-8 (ng/L: 100.29 ± 17.03), TNF-α (ng/L: 25.13 ± 0.46), AP-1 expression (*A* value: 1.38 ± 0.02), and the MDA/T-SOD ratio (4.23 ± 0.23) in T-5224 group, and MMP-9 (ng/L: 195.44 ± 9.80), MDA (μmol/L: 5.86 ± 0.30), MDA/T-SOD ratio (3.56 ± 0.41), AP-1 expression (*A* value: 0.76 ± 0.01) in nourishing lung and kidney group were all reduced significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Nourishing lung and kidney formulas can suppress the inflammatory response through regulating the alveolar epithelial cells AP-1 signaling pathways.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary diseases; Nourishing lung and kidney formulas; Conditioned medium; Nuclear transcription factor activator protein-1 pathway

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是以气流受限为主,并不完全可逆为特征的慢性进展性疾病。炎症反应贯穿其整个病理过程,COPD 与系统性炎症、蛋白酶-抗蛋白酶失衡、氧化应激、免疫损伤等关系密切[1]。中医学认为,COPD 稳定期的病机为肺肾气虚兼痰瘀阻滞,补肺益肾方是在此病机基础上总结的治疗 COPD 的方剂,在治疗 COPD 稳定期方面疗效显著。本课题组前期研究结果表明,补肺益肾方在改善 COPD 模型大鼠一般情况及患者稳定期症状,降低急性加重次数,抑制炎症反应方面疗效显著[2-4]。本课题组前期研究多采用单层细胞模型,与多细胞相互作用的人体内环境差别较大,条件培养基培养法属于间接共培养法的一种,与单层细胞培养相比,可以较好地模拟人体内环境,更适宜建立模型[5]。为了深入探讨补肺益肾方的抗炎机制,本研究采用人髓系白血病单核细胞(THP-1)条件培养基作为刺激物,将肺泡上皮细胞与单核细胞间接共培养,以肺泡上皮细胞为研究对象,观察补肺益肾方对炎性因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-8(IL-8)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及氧化应激相关产物丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)水平的影响和对核转录因子激活蛋白酶-1(AP-1)信号通路的调控作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器:AP-1 通路抑制剂 T-5224(美国 MedChem Express 公司);荧光倒置相差显微镜(美国 ZESS 公司);垂直电泳槽(Mini-PROTEAN)、湿转仪(美国 Bio-Rad 公司);ELx-800 型酶标仪(BIO-TEK 公司);CL-1000s 型紫外交联仪(美国 Upland, CA 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞传代培养:将肺泡上皮细胞(A549)、THP-1 细胞株(购于中国科学院上海生命科学院细胞资源中心)置于含 10% 胎牛血清(美国 Gbico 公司)RPMI 1640 的完全培养基中,在 37 ℃、5% CO_2 培养箱(德国 Eppendorf 公司)中静置培养,A549 隔天更换 1 次培养基,隔 2 d 1∶3 传代 1 次,2~4 代细胞用于实验(保证细胞在对数生长期);THP-1 细胞每 3 d 补充 1 次培养基,保持 2~5×10^5 个/mL 的细胞密度,每 5~6 d(细胞密度约为 1×10^6 个/mL)1∶2 传代 1 次,传代时,收集培养基备用。

1.2.2 筛选 THP-1 条件培养基刺激 A549 细胞制备体外炎症模型

1.2.2.1 四甲基偶氮唑盐(MTT,北京 Solarbio 公司)比色法检测细胞生长情况:用 0%、12.5%、25.0%、50.0%、75.0%、100.0% 浓度 THP-1 细胞条件培养基刺激 A549 细胞 6、12、24、48 h,用 MTT 法测定其对细胞生长情况的影响。

1.2.2.2 凝胶迁移率实验(EMSA)检测 AP-1 的活化情况:EMSA 试剂盒由碧云天生物技术有限公司合成提供,AP-1 探针序列为 5'-CGCTTG-ATGACTCAGCCGGAA-3',3'-GCGAACTACT-GAGTCGGCCTT-5'。条件培养基及药物干预 24 h 后,提取细胞核蛋白备用。首先制备 5% 的聚丙烯酰氨凝胶,设置 EMSA 结合反应(核蛋白上样量为每孔 10 μg),再进行凝胶电泳,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)湿转膜装置将电泳条带转移至带负电荷的尼龙膜上,紫外交联仪进行交联,交联结束后用化学发光法检测生物素标记的 AP-1 探针。条带经美国 Bio-Rad 公司全能凝胶系统成像分析仪扫描,计算吸光度(*A*)值,通过 *A* 值比值分析 25.0% THP-1 条件培养基刺激 A549 细胞 24 h AP-1 的活化情况。

1.2.3 含药血清制备:普通级日本大耳白兔 40 只,雌雄各半,体质量 2~2.5 kg,由河南康达实验动物有限公司提供,动物许可证号:SYXK 豫 2010-0001。动物饲养于河南中医药大学动物实验中心普通级饲养室,每笼 1 只,室温为(25±2) ℃,相对湿度为(50±10)%,噪声≤60 dB,通风良好,灭菌饲料喂养,每天更换垫料,保持环境安静。稳定家兔应激状态,饲养 1 周后称体质量,按随机数字表法分为对照组、

万方数据

补肺益肾组。补肺益肾组给予补肺益肾方(由人参、山茱萸、淫羊藿、黄芪、五味子、枸杞子、浙贝母、赤芍、地龙、紫苏子、矮地茶和陈皮组成,由河南中医药大学药学院提供。具有挥发油的药材用水蒸馏,收集挥发油备用;药渣与其他药材用 80% 乙醇回流、减压,回收乙醇,浓缩备用;乙醇回流后的药渣,用水煎煮过滤减压浓缩,混合 2 次浸膏和挥发油,加水制成 1 g/mL 悬乳液)。以家兔体质量 / 人体质量 × 每副生药量 × 出膏率 ×9/ 每毫升含膏量计算灌胃量(兔和人系数为 3∶1,乘血清稀释倍数 3),对照组灌胃等量生理盐水,每日 2 次,每次间隔 12 h,于第 7 次灌胃后 1 h 腹主动脉取血,静置 4 h 后离心 15 min 分离血清,56 ℃、30 min 灭活,过滤除菌,保存于 -80 ℃备用。

1.2.4 补肺益肾方对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激下 A549 细胞炎症反应及 AP-1 的影响

1.2.4.1 补肺益肾方对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激下上清液中 IL-6、IL-8、TNF-α、MMP-9、MDA 含量及 T-SOD 活性的影响:用 MTT 比色法筛选不同浓度(20%、40%)含药血清对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激 A549 细胞的影响。根据以上模型筛选结果将细胞分为空白对照组(20% 空白兔血清)、模型组(20% 空白兔血清 + 25.0% THP-1 细胞条件培养基)、T-5224 组(20% 空白兔血清 + 25.0% THP-1 细胞条件培养基 + 100 μmol/L T-5224)、补肺益肾组(20% 含补肺益肾方兔血清 + 25% THP-1 细胞条件培养基),干预 24 h 后,用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测上清液中 IL-6、IL-8、TNF-α、MMP-9 等的含量,试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司;硫代巴比妥酸(TBA)法检测上清液中 MDA 的含量,羟胺法检测 T-SOD 活力,试剂盒均购于南京建成生物工程有限公司。

1.2.4.2 补肺益肾方对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激下 AP-1 水平的影响:分组方法同 1.2.4.1,各组干预 24 h 后,提取细胞核蛋白,用 EMSA 法检测 AP-1 通路活性。电泳条带经美国 Bio-Rad 公司全能凝胶系统成像分析仪扫描,计算 *A* 值,通过实验组与对照组 *A* 值比值分析各组细胞 AP-1 通路活化情况。

1.3 统计学处理:使用 SPSS 21.0 统计软件分析数据,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 THP-1 细胞条件培养基对 A549 细胞生长情况的影响(表 1):与浓度为 0 的 THP-1 条件培养基比较,25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激 A549 细胞 24 h、48 h 后细胞生长情况良好,A549 细胞活性均明显增加($P<0.05$)。

表 1 不同浓度 THP-1 细胞条件培养基对 A549 细胞生长情况的影响($\bar{x} \pm s$)

THP-1 浓度	样本数(孔)	A549 细胞活性(*A* 值)			
		刺激 6 h	刺激 12 h	刺激 24 h	刺激 48 h
0%	6	0.47±0.06	0.48±0.05	0.37±0.04	1.15±0.19
12.5%	6	0.36±0.05	0.39±0.06	0.37±0.02	1.28±0.10
25.0%	6	0.33±0.05	0.38±0.05	0.41±0.02[a]	1.30±0.09[a]
50.0%	6	0.30±0.06	0.33±0.03	0.36±0.04	1.23±0.13
75.0%	6	0.22±0.05	0.19±0.04	0.21±0.01	0.99±0.12
100.0%	6	0.15±0.04	0.14±0.07	0.14±0.01	0.58±0.19

注:与浓度为 0 的 THP-1 条件培养基比较,[a]$P<0.05$

2.2 不同浓度含药血清对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激下 A549 细胞生长情况的影响(表 2):与模型组比较,20%、40% 补肺益肾方血清作用 24 h、48 h 后 A549 细胞活性显著降低($P<0.01$);其中 20% 补肺益肾方血清作用 24 h 效价更高,因此后续实验使用 20% 的含药血清。

表 2 不同浓度补肺益肾方含药血清对 A549 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	A549 细胞活性(*A* 值)	
		刺激 24 h	刺激 48 h
空白对照组	6	1.219±0.332	1.390±0.272
模型组	6	1.898±0.336[a]	2.136±0.317[b]
20% 补肺益肾组	6	1.038±0.176[c]	1.620±0.361[c]
40% 补肺益肾组	6	1.114±0.226[c]	1.507±0.471[c]

注:与空白对照组比较,[a]$P<0.05$,[b]$P<0.01$;与模型组比较,[c]$P<0.01$

2.3 THP-1 细胞条件培养基及补肺益肾方对 A549 细胞分泌炎性因子的影响(表 3):与空白对照组比较,模型组 TNF-α、MMP-9 含量显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,T-5224 组 IL-8、TNF-α 含量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),补肺益肾组 MMP-9 显著降低($P<0.05$)。

表 3 THP-1 细胞条件培养基及补肺益肾方对 A549 细胞分泌炎性因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(孔)	IL-6 (μg/L)	IL-8 (μg/L)	TNF-α (ng/L)	MMP-9 (ng/L)
空白对照组	3	23.15± 1.72	231.45± 33.90	28.87±3.34	235.60±14.62
模型组	3	35.00± 3.63	273.09±164.36	51.61±9.51[c]	442.85±78.86[d]
T-5224 组	3	51.14±12.86	100.29± 17.03[a]	25.13±0.46[b]	297.62±68.41
补肺益肾组	3	67.73± 3.63	212.06± 33.18	42.73±3.09	195.44± 9.80[a]

注:与模型组比较,[a]$P<0.05$,[b]$P<0.01$;与空白对照组比较,[c]$P<0.05$,[d]$P<0.01$

万方数据

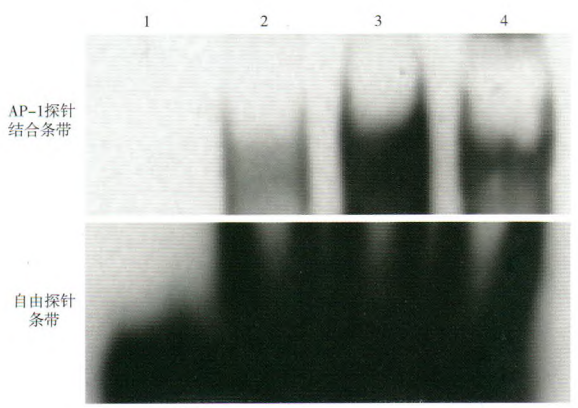
2.4 THP-1 细胞条件培养基及补肺益肾方对 A549 细胞释放 MDA、T-SOD 的影响(表 4)：与空白对照组比较，模型组 MDA 含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，MDA/T-SOD 比值增大，差异有统计学意义($P<0.01$)；与模型组比较，补肺益肾组 MDA 含量显著降低，MDA/T-SOD 比值减小，T-5224 组 MDA/T-SOD 比值减小，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

表 4　THP-1 细胞条件培养基及补肺益肾方对 A549 细胞分泌 MDA、T-SOD 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(孔)	MDA(μmol/L)	T-SOD(kU/L)	MDA/T-SOD
空白对照组	3	6.01±0.12	1.53±0.03	3.96±0.06
模型组	3	6.90±0.11[a]	1.53±0.05	4.43±0.05[b]
T-5224 组	3	6.62±0.37	1.55±0.14	4.23±0.23[c]
补肺益肾组	3	5.86±0.30[c]	1.57±0.08	3.56±0.41[c]

注：与空白对照组比较，[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$；与模型组比较，[c]$P<0.01$

2.5 25.0% THP-1 细胞条件培养基对 A549 细胞 AP-1 通路活性的影响(图 1；表 5)：模型组 AP-1 活性较空白对照组明显增强，差异有统计学意义($P<0.01$)；T-5224 组 AP-1 活性较模型组减弱，差异有统计学意义($P<0.01$)。



注：1 为阴性对照组；2 为空白对照组；3 为模型组；4 为 T-5224 组

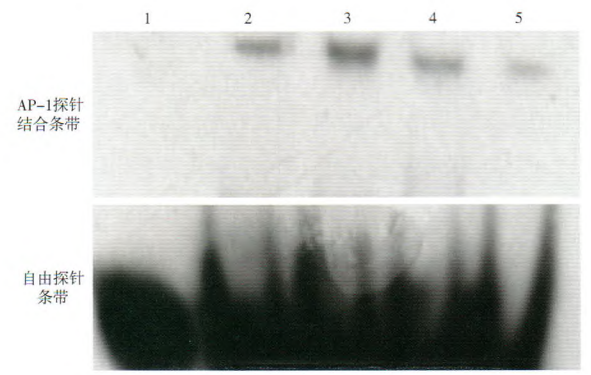
图 1　25.0% THP-1 条件培养基对 A549 细胞 AP-1 通路影响的 EMSA 电泳图

表 5　25.0% THP-1 细胞条件培养基对 A549 细胞 AP-1 通路的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(孔)	AP-1 蛋白(A 值)
空白对照组	3	1.000±0.000
模型组	3	2.260±0.062[a]
T-5224 组	3	1.376±0.022[b]

注：与空白对照组比较，[a]$P<0.01$；与模型组比较，[b]$P<0.01$

2.6 补肺益肾方对 25.0% THP-1 细胞条件培养基刺激下 A549 细胞 AP-1 通路活性的影响(图 2；表 6)：模型组 AP-1 活性较空白对照组明显增强，T-5224 组、补肺益肾组 AP-1 活性均较模型组明显减弱，差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。



注：1 为阴性对照组；2 为正常对照组；3 为模型组；4 为 T-5224 组；5 为补肺益肾组

图 2　20% 含药血清对 A549 细胞 AP-1 通路影响的 EMSA 电泳图

表 6　20% 含药血清对 A549 细胞 AP-1 通路的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(孔)	AP-1 蛋白(A 值)
空白对照组	3	1.000±0.000
模型组	3	1.859±0.072[a]
T-5224 组	3	1.075±0.054[b]
补肺益肾组	3	0.760±0.013[b]

注：与空白对照组比较，[a]$P<0.01$；与模型组比较，[b]$P<0.01$

3　讨　论

COPD 归属于中医“咳嗽”、“肺胀”、“喘证”等范畴，主要病机为正虚积损，兼痰瘀闭阻，补肺益肾方从虚入手，补肺肾之气以扶正，活血化痰以驱邪，治疗 COPD 稳定期疗效显著。炎症反应贯穿 COPD 病理反应的全过程，涉及多种炎性细胞。其中，肺泡上皮细胞是肺部炎症反应的靶细胞，在调节炎症对肺损伤的反应方面发挥着重要作用[6]，且在体外培养时，性能稳定，可复制性好[7]。在炎症过程中，巨噬细胞、淋巴细胞、中性粒细胞等的活化，释放一系列炎性因子。如炎前因子 TNF-α、促炎细胞因子 IL-6 介导炎症反应，在刺激情况下表达增加[8]。归属于明胶酶类的 MMP-9 通过特异性降解基底膜中的Ⅳ型胶原，破坏基底膜的完整性[9]。趋化因子 IL-8 等参与炎性因子的募集，这些因子共同作用于肺泡上皮细胞，使其产生更多的炎性因子，加重炎症反应的发展[10-11]。

炎症反应是由多条信号通路介导的[12-13]，其中 AP-1 起重要作用。AP-1 在应激因素如缺血、

万方数据

缺氧、炎性因子等刺激下，通过丝裂素活化蛋白激酶（MAPK）信号转导途径的磷酸化和其他如蛋白激酶（PKC）和酪氨酸激酶的作用，使 c-fos 和 c-jun 激活，AP-1 活化。活化的 AP-1 能与许多炎性因子如 IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8、TNF-α 等基因启动子上的 AP-1 位点结合，调节其表达。T-5224 作为该通路抑制剂，可以特异性抑制其活性[14]。

为研究补肺益肾方是否可干预 THP-1 细胞所产生因子对上皮细胞的影响，本研究制备了 THP-1 细胞条件培养基，采用条件培养基共培养法，培养体系中的细胞可以进行单向交流，从炎前细胞因子 TNF-α、促炎因子 IL-6、趋化因子 IL-8、MMP-9、过氧化脂质降解产物 MDA、T-SOD 含量变化以及 AP-1 通路的活性进行研究，以揭示补肺益肾方是否可干预 THP-1 细胞所产生的因子对 A549 参与炎症反应的影响。

本研究显示，25.0% 的 THP-1 细胞条件培养基作用 24 h，可以明显促进 A549 细胞的增殖，这与条件培养基中含有大量细胞因子有关，这些细胞因子成分复杂，尚不能对各因子进行定量研究。低浓度及较高浓度条件培养基对 A549 细胞影响较小，可能是由于低浓度条件培养基体系中细胞因子含量较少，而高浓度体系中营养物质被 THP-1 消耗而减少。本研究表明，与空白对照组比较，模型组 IL-6、IL-8、TNF-α、MMP-9 分泌量均增多，其中 TNF-α、MMP-9 增多最为显著；MDA 含量增多，MDA/T-SOD 比值明显升高。与模型组比较，T-5224 组、补肺益肾方组均有使 IL-8、TNF-α、MMP-9 下降的趋势，但 IL-6 的含量升高与以往研究[15-16]中的降低有所不同，可能与刺激物和作用时间不同有关，这有待于进一步研究。补肺益肾方能在一定程度上降低 IL-8、TNF-α、MMP-9 等炎性因子含量，可以认为补肺益肾方能通过抑制炎症反应治疗 COPD。

为了进一步研究补肺益肾方调节炎症反应的机制，我们采用 EMSA 法对介导炎症反应的 AP-1 通路活性进行研究，结果表明，与空白对照组比较，模型组 AP-1 活性明显增强，T-5224 组活性减弱；与模型组比较，20% 含补肺益肾方组 AP-1 活性明显减弱，且较 T-5224 组效价稍高。这说明补肺益肾方降低炎症反应的机制可能与调控 AP-1 通路的活性有关。

综上，THP-1 细胞条件培养基可刺激 A549 细胞产生炎性因子，激活 AP-1 引起炎症反应。补肺益肾方能降低 THP-1 细胞条件培养基刺激下 A549 细胞炎性因子的分泌及 AP-1 活性。但条件培养基成分复杂，具体含量尚不明确，具体哪些因子可刺激 A549 细胞产生炎性因子尚有待研究。

参考文献

[1] Hassett DJ, Borchers MT, Panos RJ. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): evaluation from clinical, immunological and bacterial pathogenesis perspectives [J]. J Microbiol, 2014, 52(3): 211-226.

[2] 李建生，李素云，余学庆，等. “补肺益肾方联合穴位贴敷治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的多中心随机、双盲、阳性药平行对照临床试验”的研究方案[J]. 中西医结合学报, 2011, 9(12): 1312-1318.

[3] Li Y, Li JS, Li WW, et al. Long-term effects of three Tiao-Bu Fei-Shen therapies on NF-κB/TGF-β 1/smad2 signaling in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14: 140.

[4] Lu X, Li Y, Li J, et al. Sequential treatments with tongsai and bufei yishen granules reduce inflammation and improve pulmonary function in acute exacerbation-risk window of chronic obstructive pulmonary disease in rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 1359105.

[5] 秦燕勤，陈玉龙，李建生. 细胞共培养方法的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(8): 765-768.

[6] Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2009, 234(4): 361-371.

[7] 刘雨晴，刘博，姚玲，等. 不同液体培养对脂多糖刺激后人Ⅱ型肺泡上皮细胞 A549 产生凝血及纤溶因子的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(3): 294-298.

[8] 牛占丛，段国辰，刘军肖，等. 血红素加氧酶-1 对脓毒症小鼠肺损伤炎症反应的调节作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(4): 373-377.

[9] 丁瑞敏. 联合检测外周血 CEA、CA125、VEGF、MT 及 MMP-9 在晚期非小细胞肺癌诊断中的意义[J]. 实用检验医师杂志, 2015, 7(1): 42-43, 24.

[10] 刘芬，赵宁，李东海，等. 乙酰胆碱对脂多糖诱导肺泡巨噬细胞炎症反应的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(10): 811-815.

[11] 任宏生，丁敏，马海红，等. 阿托伐他汀联合低分子肝素对脓毒症大鼠炎症反应及肺脏的保护作用[J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(5): 427-432.

[12] Chen W, Hong YQ, Meng ZL. Bioinformatics analysis of molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18(23): 3557-3563.

[13] Yuan YP, Shi YH, Gu WC. Analysis of protein-protein interaction network in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Genet Mol Res, 2014, 13(4): 8862-8869.

[14] Ishida M, Ueki M, Morishita J, et al. T-5224, a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1, improves survival by inhibiting serum high mobility group box-1 in lethal lipopolysaccharide-induced acute kidney injury model [J]. J Intensive Care, 2015, 3: 49.

[15] 吴耀松，陈玉龙，李建生，等. 补肺益肾方及其拆方含药血清对烟雾和脂多糖刺激细胞分泌细胞因子的影响[J]. 中药材, 2013, 36(6): 961-966.

[16] Li J, Yang L, Yao Q, et al. Effects and mechanism of bufei yishen formula in a rat chronic obstructive pulmonary disease model [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 381976.

（收稿日期：2016-10-27）

万方数据