

肺虚痰阻大鼠肺组织核因子- B 和环氧合酶-2 mRNA 的表达

王平¹, 吴秀艳², 张茂林¹, 田代志³, 刘松林⁴

(1 湖北中医学院中医基础理论教研室, 湖北 武汉 430061; 2 湖北中医学院中医内科教研室, 湖北 武汉 430061; 3 湖北中医学院中心实验室, 湖北 武汉 430061; 4 湖北中医学院伤寒论教研室, 湖北 武汉 430061)

[摘要] 目的:探讨核因子- B(nuclear factor-kappa B, NF- B)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在肺虚痰阻大鼠发病中的意义和化痰 1 号作用的机制。方法:采用二氧化硫烟熏和寒冷刺激建立 SD 大鼠肺虚痰阻模型,应用免疫组化法检测正常组、肺虚痰阻模型组及化痰 1 号治疗组大鼠支气管上皮细胞 NF- B 的表达及 RT-PCR 检测肺组织 COX-2 mRNA 的表达。结果:模型组 NF- B 和 COX-2 mRNA 的表达高于正常组($P < 0.01$),中药治疗后, NF- B 和 COX-2 mRNA 的表达明显降低,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$)。结论: NF- B 和 COX-2 mRNA 的表达升高在痰邪致病中起着重要作用,化痰 1 号可能通过调节 NF- B 和 COX-2 mRNA 的表达而起到化痰作用。

[关键词] 肺虚痰阻; 核因子- B; 环氧合酶-2

[中图分类号] R256.1; R971.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)02-0119-04

Expression of NF- B and COX-2 mRNA in rats with phlegm obstruction due to lung-deficiency

WANG Ping¹, WU Xiu-Yan², ZHANG Mao-Lin¹, TIAN Dai-Zhi³, LIU Song-Lin⁴

(1 .Department of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China; 2 .Department of Traditional Chinese Internal Medicine, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China; 3 .Central Laboratory, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China; 4 .Department of Exogenous Febrile Diseases, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan, Hubei Province 430061, China)

ABSTRACT Objective: To study the role of nuclear factor-kappa B (NF- B) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the onset of phlegm obstruction due to lung-deficiency in rats and the therapeutic mechanism of Huatan Recipe . Methods: Twenty-four SD rats were randomly divided into normal group, model group and treatment group, with 8 rats in each group . The rats in the model group and treatment group were exposed to sulfur dioxide and cold wind to establish the rat model of phlegm obstruction due to lung-deficiency, and the rats in the treatment group were also treated with Huatan Recipe, a compound traditional Chinese medicine . The expression of NF- B in the bronchial epithelial cells of the rats was tested with the method of immunohistochemistry, and the COX-2 mRNA in the lung tissues of the rats was measured by using reverse transcription-polymerase chain reaction . Results: The expressions of NF- B and COX-2 mRNA in rats of the model group were higher than those of the normal group ($P < 0.01$), and the expressions of NF- B and COX-2 mRNA in rats of the treatment group were obviously lower than those of the model group ($P < 0.01$) . Conclusion: The NF- B and COX-2 play an important role in the onset of phlegm obstruction in rats . Huatan Recipe may prevent the development of phlegm obstruction by down-regulating the expressions of NF- B and COX-2 mRNA .

KEY WORDS phlegm obstruction due to lung-deficiency; nuclear factor-kappa B; cyclooxygenase-2

J Chin Integr Med, 2005, 3(2):119-122

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30271566)

[作者简介] 王平(1962-), 男, 博士, 教授 .

Correspondence to: WANG Ping, MD, Professor . E-mail: pwang54@yahoo .com .cn

痰邪是水液代谢障碍所形成的病理产物,亦是重要致病因素。但其致病机制复杂,目前尚未阐述清楚。为此,笔者拟以有形之痰为突破口,建立了肺虚痰阻慢性支气管炎模型,并从核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)表达来探讨痰邪致病机制,同时以临床观察化痰作用肯定的中药化痰 1 号方反证模型,并观察其作用机制。

1 材料与方

1.1 试剂、药物和仪器 (1)试剂: NF- κ B p65 兔抗鼠多克隆抗体、多聚甲醛液、DAB、SABC 试剂盒、山羊血清、羊抗兔 IgG 均购自武汉博士德生物工程有限公司; Trizol 和反转录 PCR 试剂盒购自 Gibco 公司。(2)药物:化痰 1 号由党参 15 g,黄芪 20 g,陈皮 10 g,法半夏 10 g,茯苓 15 g,杏仁 10 g,白芥子 15 g,制南星 6 g,炙甘草 6 g 组成。生药由湖北中医学院专家门诊部中药房提供,湖北中医学院中药研究所协助煎煮成汤剂。硫磺粉,天津市河北区海晶精细工厂生产(批号: 20010405)。(3)仪器: Sigma 2mk 型高速冷冻离心机;德国 Eppendorf 5331 型 PCR 扩增仪, DYY-3 型电泳仪(北京六一科学仪器厂),紫外反射透射成像系统(上海天能科技有限责任公司)。

1.2 动物分组与模型制备 健康 SD 大鼠 24 只,体重 180 ~ 220 g。随机分为 3 组:肺虚痰阻组(模型组)、化痰 1 号组(治疗组)、生理盐水组(正常组),每组 8 只。

模型制备参照文献^[1, 2]。模型组予二氧化硫烟熏和寒冷刺激,每次用 6 g 硫磺粉均匀洒布于清艾条中点燃烟熏,熏 40 min 后再用低于大鼠生活环境 5 的冷风刺激 10 min, 2 次/d。治疗组在二氧化硫烟熏和寒冷刺激的同时,每天 10 ml/kg 灌胃“化痰 1 号”;模型组和正常组每天灌胃同体积生理盐水,连续 50 d。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 一般情况观察 每天观察记录大鼠咳嗽、气喘、口鼻分泌物、呼吸、毛发、饮食等。

1.3.2 病理切片 取实验大鼠气管及左、右肺叶,放入多聚甲醛中固定,切片观察镜下改变。

1.3.3 核转录因子检测 取下左、右肺叶浸泡于 4% 多聚甲醛液中固定 12 h;取右肺常规石蜡包埋、切片。NF- κ B p65 的检测用免疫组织化学染色法,按 SABC 试剂盒说明书将切片常规脱蜡至水后,用新鲜 3% H₂O₂ 灭活内源性酶 10 min,蒸馏水洗 2 min × 3 次;置于枸橼酸缓冲液中(pH 6.0)微波修复抗原 5 min × 2 次,蒸馏水洗 2 min × 3 次;正常山

羊血清封闭 10 min, 37 孵育 20 min, PBS 洗 2 min × 3 次;滴加一抗(兔抗 NF- κ B p65 亚单位的多克隆抗体,经预实验定为稀释度 1 : 100),冰箱 4 过夜, PBS 洗 2 min × 3 次;滴加二抗(羊抗兔 IgG), 37 孵育 30 min, PBS 洗 2 min × 3 次;滴加 SABC 试剂 30 min, PBS 洗 2 min × 3 次;DAB 显色,显微镜观察,自来水充分冲洗;苏木素轻度复染;梯度乙醇脱水,中性树脂封片。

每张切片随机选取结构完整的 1 支主支气管和直径在 100 ~ 200 μ m 之间的细支气管 5 支,计数每支支气管上皮细胞中胞核染色阳性(呈棕黄色)的细胞数,以其胞核阳性数占该支气管上皮细胞总数的百分比作为该支气管上皮细胞 NF- κ B 表达的阳性率,取该主支气管和 5 支细支气管阳性率的平均值分别作为该切片主、细支气管上皮细胞 NF- κ B 表达阳性率。

1.3.4 COX-2 mRNA 的检测 大鼠放血处死后,取 100 mg 肺组织提取 RNA, RNA 的提取采用 Trizol 一步法,参照试剂盒的说明进行。1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定,紫外分光光度计测定纯度并定量。

逆转录 PCR:采用逆转录试剂盒,取 3 μ g RNA 作 cDNA 的模板,以 Oligdt 为引物,按试剂盒操作顺序依次加样,总反应体积为 20 μ l,反应复合物 42 孵育 1 h。取 3 μ l cDNA 用于 PCR 扩增。引物序列针对大鼠 COX-2,上游 CTGTATCCCGC-CCTGCTGGTG,下游 ACTTGCGTTGATGGTG-GCTGTCTT;内参 β -actin:上游 TGAGACCT-TCAACACCCCAG,下游 GCCATCTCTTGCTCG-AAGTC。反应条件:首轮:94 变性 1 min, 60 退火 1 min, 72 延伸 1 min;后续:94 变性 1 min, 60 退火 1 min, 72 延伸 1 min;末轮:94 变性 1 min, 60 退火 1 min, 72 延伸 10 min,共循环 35 次。取 10 μ l 扩增产物在含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下照相,GIS 凝胶电泳分析系统扫描分析,以 COX-2 的净面积/ β -actin 净面积进行半定量分析。

1.4 统计学方法 实验数据应用 SPSS 软件行方差分析和 Q 检验。

2 结果

2.1 造模后大鼠症状表现 正常组大鼠活泼好动,强壮肥大,食欲旺盛,皮毛光泽发亮;模型组大鼠普遍出现鼻部潮湿,咳嗽,气喘,逆毛,无光泽,拱背蜷睡,反应迟钝,食少;中药治疗组偶有咳嗽,气喘,皮毛有光泽,无逆毛,饮食基本正常。

2.2 病理组织学所见 正常组大鼠气管、支气管纤毛柱状上皮细胞排列整齐,纤毛排列规则;模型组大鼠杯状细胞增生,腺体肥大、增生,分泌旺盛,管腔内充满大量中性粒细胞、肺泡巨噬细胞及黏液,纤毛稀少;中药组大鼠气管、支气管纤毛柱状上皮细胞部分剥脱,少量黏液腺肥大,杯状细胞增生较模型组明显减少。

2.3 NF- κ B 表达的变化 模型组与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.01$),治疗组与模型组有显著性差异($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组大鼠气道上皮细胞 NF- κ B 检测结果

Tab 1 NF- κ B level in bronchial epithelial cells

($\bar{x} \pm s$)		
Group	n	NF- κ B (%)
Normal	8	22 \pm 5**
Model	8	53 \pm 4
Treatment	8	27 \pm 5**

** $P < 0.01$, vs model group

2.4 COX-2 mRNA 表达的变化 模型组大鼠 COX-2 mRNA 的表达与正常组比较有非常显著性差异($P < 0.01$);治疗组 COX-2 mRNA 表达与模型组有显著性差异($P < 0.01$)。见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠肺组织 COX-2 mRNA 相对表达量

Tab 2 Relative expression of COX-2 mRNA in lung tissue

($\bar{x} \pm s$)		
Group	n	COX-2 mRNA
Normal	8	0.91 \pm 0.11**
Model	8	2.22 \pm 0.28
Treatment	8	1.22 \pm 0.16**

** $P < 0.01$, vs model group

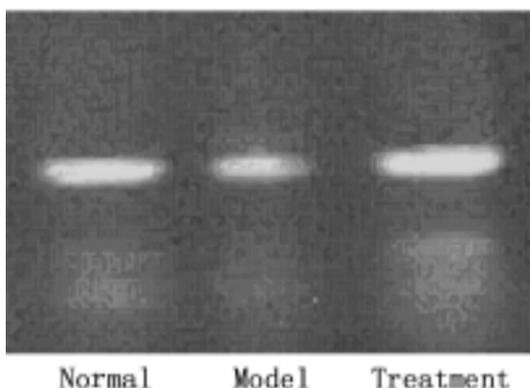


图 1 各组大鼠肺组织 COX-2 基因表达的 RT-PCR 电泳图

Fig 1 RT-PCR of COX-2 mRNA in lung tissue

3 讨论

二氧化硫是一种有毒的刺激性气体,近年来,采用其烟薰复制肺气虚模型,已被中医研究者所公认。本实验发现模型组出现了咳嗽、气急、逆毛、

鼻部潮湿、拱背蜷睡,反应迟钝等肺虚的表现。痰液主要是由杯状细胞和腺体分泌的黏液所组成,其排出主要通过纤毛的运动。病理切片发现模型组杯状细胞和腺体增生,说明了痰液生成增加。痰液的排出依靠纤毛的协调运动,纤毛稀少,造成纤毛黏附能力下降及纤毛摆动能力降低,导致清除功能障碍^[3],痰液排出受阻,致痰液蓄积,因此病理切片是衡量痰阻的客观指标。由此,可以看出通过薰吸二氧化硫可建立肺虚痰阻模型。

关于 NF- κ B 的检测,传统上采用凝胶电泳迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测分离细胞和组织的 NF- κ B 活性,此方法不能提供表达 NF- κ B 活化的细胞起源及其数量,以及 p65 在细胞内的分布情况^[4]。免疫组化染色的方法可以弥补其不足,通常将细胞核染色阳性作为 NF- κ B 活化的标志^[5]。因 NF- κ B 成分 p65 (NF- κ B p65)在肺组织中表达,尤其是 p65 在细胞核内的表达可间接反映 NF- κ B 活性,故检测了肺组织中 NF- κ B p65 的表达。研究发现模型组大鼠 NF- κ B p65 表达水平明显升高,且核表达阳性细胞也增加。这说明痰证模型中存在 NF- κ B 的活化,NF- κ B 活化可能参与了痰证病理损害的发生发展。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素(prostaglandin, PG)合成的限速酶,它在肺疾病的发生发展过程中起着很重要的病理生理作用。COX 有两种同工酶,即 COX-1 和 COX-2。COX-1 主要存在于血管、肾、胃等组织中,在细胞中持续表达,对维持正常生理功能起重要作用,而目前发现 COX-2 主要与炎症反应有关^[6]。虽然多数细胞 COX-2 为诱导性表达,但是有实验显示,气道上皮、肺泡上皮细胞可结构性表达 COX-2 mRNA^[7,8]。故本实验采用逆转录聚合酶链反应法(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR),同时测定了三组 COX-2 mRNA 在肺组织中的表达。结果表明,模型组 COX-2 mRNA 表达水平升高,说明 COX-2 参与了痰证的发生过程。已经发现在 COX-2 基因的 5'端 flanking 区域存在两处 NF- κ B 结合位点^[9]。我们推测 COX-2 基因的表达受多功能核转录因子 κ B 的调控。因此,通过激活 NF- κ B 进而促进 COX-2 表达可能是痰邪作用的中间环节,其具体机制及 NF- κ B 的激活信号传导途径值得进一步探讨。

本模型痰之形成责之于肺虚,针对气虚痰阻,治疗以化痰 1 号方益气化痰、标本兼治。化痰 1 号是由经典化痰中药二陈汤加味而成,主要成分为陈皮、法半夏、茯苓、炙甘草、党参、黄芪、杏仁、白芥子、制

南星。方中党参、黄芪,性味甘平,有补中益气之功,为治疗肺脾气虚的要药;半夏辛温而燥,为燥湿化痰之要药,善治各种痰湿病证;陈皮辛散苦燥,有较好的行气、燥湿化痰之效;茯苓味甘淡、性平,为利水除湿之要药;制南星燥湿化痰;杏仁味苦、性微温,有化痰降气止咳平喘作用;白芥子辛温,能温肺去痰,利气散结;甘草具有良好的镇咳去痰作用,且能“和诸药,解百毒”。临床大量病例观察表明,此方化痰作用肯定。从本实验中药组大鼠出现的临床表现较模型组明显减轻,可以看出诸药合用达到了益气化痰,止咳平喘之效。同时中药组病理切片仅见少量黏液腺肥大,杯状细胞增生较模型组明显减少,因而客观证实了中药具有化痰作用。同时治疗效果是检验模型是否正确的一个重要参数。通过对实验大鼠各项指标的综合分析,证明了化痰 1 号对各项指标改善明显。通过治疗反证,使模型的可行性得到进一步验证。同时本研究发现模型组肺组织 NF- κ B p65、COX-2 mRNA 表达升高,而中药治疗则下调 NF- κ B p65、COX-2 mRNA 表达。提示 NF- κ B 活化参与了痰证的发生、发展,而中药则抑制 NF- κ B 活化,部分阻断 COX-2 mRNA 产生,从而减轻痰证的病理损害。NF- κ B 活化可能是痰证发展的关键点,这也许为从转录水平作为靶点治疗痰证提供了理论依据。

[参考文献]

1 王九林,姜 惟,卞慧敏.肺虚痰阻病理模型的研制

[J].中国中医基础医学杂志,1996,2(4):44-45.

- 2 陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.314.
- 3 Houtmeyers E, Gosselink R, Gayan-Ramirez G, *et al*. Regulation of mucociliary clearance in health and disease [J]. *Eur Respir J*, 1999, 13(5): 1177-1188.
- 4 许建英,杜永成,李冬艳,等.核因子- κ B、细胞间黏附分子 1 在吸烟大鼠气道上皮细胞中的表达[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(8):493-496.
- 5 Wilson SJ, Leone BA, Anderson D, *et al*. Immunohistochemical analysis of the activation of NF- κ B and expression of associated cytokines and adhesion molecules in human models of allergic inflammation[J]. *J Pathol*, 1999, 189(2): 265-272.
- 6 王建春,毛宝龄.环氧合酶 2 研究进展[J].国外医学生理、病理科学与临床分册,1998,18(1):30-33.
- 7 Walenga RW, Kester M, Coroneos E, *et al*. Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthetase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells in vitro[J]. *Prostaglandins*, 1996, 52(5): 341-359.
- 8 Asano K, Lilly CM, Drazen JM. Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(1 Pt 1): L126-L131.
- 9 Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, *et al*. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene[J]. *Biochem J*, 1994, 302(Pt 3): 723-727.

[收稿日期] 2004-05-18 [本文编辑] 白玉金

博士后招聘启事

上海中医药大学肝病研究所位于上海市浦东张江高科技园区,是我国中西医结合肝病研究的重要基地。研究所长期致力于中西医结合防治慢性肝病与抗器官纤维化的基础研究,曾获得国家科技进步二等奖与省部级多项奖励。目前承担国家自然科学基金重点项目与面上项目、国家科委攻关项目、上海市科委重大基础项目、上海市教委重点项目等多项课题,主要研究方向包括肝硬化中医治疗基本方剂的方证病态蛋白质组生物信息模式的探索性研究、中医药抗器官纤维化作用机制、中药影响细胞信号转导的抗肝纤维化作用机制、酒精性肝病与脂肪肝的中医药防治机制等。博士后协作导师刘平教授现任中国中西医结合学会肝病专业委员会主任委员、中华医学会肝病分会副主任委员、国家中医药管理局中医肝病重点研究室主任、上海高校中医内科学 E-研究院首席研究员。研究所现有实验室面积 500 m²,仪器设备价值 1 000 余万元,并可共享使用上海中医药大学科技中心多项大型设备。现拟招聘博士后研究人员 2 名。应聘者请将详细工作简历与博士学位论文(如果已有)寄至上海中医药大学肝病研究所。联系人:徐列明所长。邮政编码:201203; E-mail: xulieming@chinatcm.net。

上海中医药大学肝病研究所