

临床与基础  
桥接研究Clinical and Basic  
Bridging Research盐酸班布特罗对慢性阻塞性肺疾病大鼠的  
作用机制研究Effect and mechanism of bambuterol hydrochloride in rats with chronic obstructive  
pulmonary disease张志大<sup>1a</sup>, 黄 健<sup>1a</sup>, 李希玖<sup>1a</sup>,  
李飞妹<sup>1b</sup>

(1. 江西省胸科医院, a. 呼吸与危重症科; b. 病理科, 江西 南昌 330006)

ZHANG Zhi - da<sup>1a</sup>, HUANG Jian<sup>1a</sup>,  
LI Xi - jiu<sup>1a</sup>, LI Fei - mei<sup>1b</sup>(1. a. Department of Respiratory and  
Critical Care; b. Department of  
Pathology, Jiangxi Chest Hospital,  
Nanchang 330006, Jiangxi Province,  
China)

收稿日期: 2021 - 10 - 02

定稿日期: 2021 - 11 - 09

基金项目: 江西省卫生计生委科技计划基金资助项目(20185470)

作者简介: 张志大(1976 - ), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事慢性阻塞性肺病、支气管哮喘、肺癌和肺部感染性疾病等研究

通信作者: 张志大

MP: 13767150580

E - mail: zzd8362020@163.com

**摘要:** 目的 研究盐酸班布特罗对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的作用机制。方法 用烟熏法建立 COPD 大鼠模型。按照体重将大鼠随机分为 4 组: 正常组(10 只)、模型组(15 只)、班布特罗组(15 只)、激动剂组(15 只)。造模后,班布特罗组灌胃盐酸班布特罗  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 激动剂组在班布特罗组基础上腹腔注射脂多糖  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 正常组和模型组给予同体积生理盐水, 1 次/天, 连续 45 d。苏木精-伊红染色测量气道重构指标; 用酶联免疫吸附法检测白细胞介素-8(IL-8)含量; 用免疫印迹法检测肺组织 Toll 样受体 4(TLR4)蛋白表达量、磷酸化核转录因子  $\kappa\text{B}$  p65(p-NF- $\kappa\text{B}$  p65)/NF- $\kappa\text{B}$  p65 蛋白表达(灰度值)。**结果** 正常组、模型组、班布特罗组和激动剂组的管壁厚度/外径分别为  $(6.27 \pm 0.83) \%$ ,  $(13.89 \pm 1.26) \%$ ,  $(8.17 \pm 1.10) \%$  和  $(11.29 \pm 1.25) \%$ ; 这 4 组的 IL-8 水平分别为  $(95.56 \pm 10.28)$ ,  $(212.67 \pm 29.67)$ ,  $(145.87 \pm 23.63)$  和  $(180.66 \pm 20.54) \text{ pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ; 这 4 组的 TLR4 蛋白表达量分别为  $0.15 \pm 0.03$ ,  $0.70 \pm 0.08$ ,  $0.36 \pm 0.04$  和  $0.53 \pm 0.06$ ; 这 4 组的 p-NF- $\kappa\text{B}$  p65/NF- $\kappa\text{B}$  p65 分别为  $0.18 \pm 0.03$ ,  $0.77 \pm 0.08$ ,  $0.35 \pm 0.05$  和  $0.61 \pm 0.07$ 。模型组与正常组比较, 或班布特罗组与模型组比较, 或激动剂组与班布特罗组比较, 上述指标的差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。**结论** 盐酸班布特罗可减少 COPD 大鼠炎症介质的释放, 抑制气道重构, 这可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa\text{B}$  信号通路来实现。

**关键词:** 慢性阻塞性肺疾病; 盐酸班布特罗; 气道重构; 炎症介质; 基质金属蛋白酶-9

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.01.006

中图分类号: R97 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2022)01-0023-04

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of bambuterol hydrochloride on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats. **Methods** The rats were established a COPD model by smoking method. The rats were randomly divided into four groups according to their body weight: normal group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 15$ ), bambuterol group ( $n = 15$ ), and agonist group ( $n = 15$ ). After modeling the bambuterol group was gavage with bambuterol hydrochloride  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , the agonist was gavage with bambuterol hydrochloride  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS)  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . The normal group and the model group were given the same volume of normal saline, once a day, for consecutive 45 d. The airway remodeling indexes were detected by HE staining. The interleukin - 8

(IL-8) content were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression (gray value) of Toll-like receptor 4 (TLR4) protein and phosphorylated nuclear transcription factor  $\kappa$ B p65 (p-NF- $\kappa$ B p65)/NF- $\kappa$ B p65 were detected by Western blotting. **Results** The wall thickness/outer diameter of the normal group, model group, bambuterol group, agonist group were ( $6.27 \pm 0.83$ )%, ( $13.89 \pm 1.26$ )%, ( $8.17 \pm 1.10$ )%, ( $11.29 \pm 1.25$ )%. The IL-8 levels of the 4 groups were ( $95.56 \pm 10.28$ ), ( $212.67 \pm 29.67$ ), ( $145.87 \pm 23.63$ ) and ( $180.66 \pm 20.54$ )  $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$ . The TLR4 protein expression levels of the 4 groups were  $0.15 \pm 0.03$ ,  $0.70 \pm 0.08$ ,  $0.36 \pm 0.04$  and  $0.53 \pm 0.06$ . The ratio of p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 of the 4 groups were  $0.18 \pm 0.03$ ,  $0.77 \pm 0.08$ ,  $0.35 \pm 0.05$  and  $0.61 \pm 0.07$ . Comparison between the model group and the normal group, or between the bambuterol group and the model, or the agonist group and bambuterol group, the differences of the factors were significant (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bambuterol hydrochloride can reduce the release of inflammatory mediators in COPD rats, inhibit airway remodeling, and reduce lung pathological changes, which may be achieved by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**Key words:** chronic obstructive pulmonary disease; bambuterol hydrochloride; airway remodeling; inflammatory mediators; matrix metallo-proteinase-9

气道重构是慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 气道管腔狭窄、气流受限、肺功能进行性下降的病理基础,与慢性炎症关系密切<sup>[1-2]</sup>。盐酸班布特罗是肾上腺素  $\beta_2$  受体激动剂特布他林的前体药物,可松弛支气管平滑肌,改善 COPD 症状<sup>[3]</sup>。本研究观察盐酸班布特罗对 COPD 大鼠气道重构的影响及可能的作用机制。

## 材料与方法

### 1 材料

**动物** 6 周龄 Wistar 雄性大鼠,体重 ( $190 \pm 20$ ) g,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司。动物许可证号: SCXK(沪) 2017-0012。

**药品与试剂** 盐酸班布特罗片,规格:每片 10 mg,批准文号:国药准字 H20030382,批号: 81732-46-9,湖南亚大制药有限公司生产。Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4)、核转录因子  $\kappa$ B (nuclear transcription factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路激动剂脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS),上海裕平生物科技有限公司生产;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-8 (IL-8)、白三烯 B4 (leukotriene B4, LTB4) 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒,南京卡米洛生物工程有限公司生产。

**仪器** 大鼠烟熏箱,上海玉研科学仪器有限公司产品; HF4500 酶标仪,北京华安麦科生物技术有限公司产品; BX53 光学显微镜,日本 Olympus 株式会社产品。

### 2 实验方法

#### 2.1 以烟熏法建立 COPD 模型<sup>[4]</sup>

将大鼠置入烟熏箱,每次放进 10 只点燃的香烟,持续烟熏 30 min,每天 3 次,连续 90 d。烟熏过程中模型组、班布特罗组、激动剂组分别死亡 2, 2 和 3 只。以 HE 染色结果显示出现明显病理变化为建模成功标准。

#### 2.2 分组与给药<sup>[5-6]</sup>

按照体重将大鼠随机分为 4 组: 正常组 (10 只)、模型组 (15 只)、班布特罗组 (15 只)、激动剂组 (15 只)。造模后,班布特罗组灌胃盐酸班布特罗 ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  溶于生理盐水),激动剂组在灌胃盐酸班布特罗  $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的基础上腹腔注射 LPS  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,正常组、模型组给予同体积生理盐水。每天干预 1 次,连续干预 45 d。

#### 2.3 组织取材<sup>[7]</sup>

末次给药后 4 h 麻醉处死大鼠,开胸取左肺上叶, PBS 冲洗干净血液后,留取左肺门  $1 \text{ mm}^3$  大小的组织块,在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,顺垂直支气管走向最大横径位置切取厚度为 4 mm 的组织,流水充分冲洗后,乙醇梯度脱水、透明、包埋,切片机切片。其余的左肺上叶组织冷冻保存。

#### 2.4 以 ELISA 检测肺组织匀浆中炎症介质含量<sup>[8]</sup>

取冷冻保存的肺组织,研磨匀浆,用 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 LTB4 含量,根据试剂盒说明书方法,用酶标仪检测 570 nm 波长时的光密度 (OD) 值,根据标准曲线计算浓度。

#### 2.5 用苏木精-尹红 (HE) 染色测量气道重构指标并观察肺组织病理变化及其病理组织学评分<sup>[9]</sup>

取肺组织切片,常规脱蜡至水,HE 染色,脱水、透

明、晾干,中性树胶封片。每张切片随机选取 5 个不相邻视野,数码相机拍照,测量直径 750 至 1100  $\mu\text{m}$ ,长径/短径 $\geq 0.7 \mu\text{m}$ 的膜性细支气管管壁厚度、外径、面积,以及气管总面积。计算管壁厚度/外径(MT%);管壁面积/气管总面积(MA%)。

每张切片随机选取 5 个不相邻视野,光学显微镜下观察海马组织病理变化。从肺泡水肿、出血、炎性细胞浸润、肺泡间隔厚度增加 4 个方面评分,正常、轻度、中度、重度分别为 0,1,2,3 和 4 分,总分 0~16 分。

## 2.6 以免疫组织化学染色检测基质金属蛋白酶-9(matrix metallo-proteinase-9, MMP-9)表达<sup>[10]</sup>

取肺组织切片,常规脱蜡至水。根据免疫组化试剂盒说明书进行染色。滴加 MMP-9 一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBS 充分洗涤,滴加二抗,室温孵育 1 h,PBS 充分洗涤,二氨基联苯胺显色,分别以阳性染色切片、PBS 代替一抗作为阳性、阴性对照,显微镜下可观察到棕黄色或棕色细胞为阳性。每张切片随机选取 5 个不相邻视野进行观察,Image-ProPlus 图像分析软件分析累积光密度值,取均值。

## 2.7 以蛋白质印迹法检测 TLR4、髓样细胞分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、核转录因子 $\kappa\text{B}$ p65(nuclear transcription factor $\kappa\text{B}$ p65, NF- $\kappa\text{B}$ p65)和 p-NF- $\kappa\text{B}$ p65 蛋白表达

取冷冻保存的肺组织,研磨匀浆,放射免疫沉淀

法细胞裂解液裂解,二喹啉甲酸试剂盒测定蛋白浓度,取样本 50  $\mu\text{g}$ ,按比例与上样缓冲液混合,沸水浴 10 min,离心取上清,80 V 电泳后湿转至膜,封闭液封闭 2 h,参照参考文献[11]操作,洗涤后加入增强化学发光法显影液曝光、显影,凝胶成像系统分析灰度值。

## 3 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行分析与统计,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本计量资料用单因素方差分析比较,两两比较用 LSD- $t$  检验。

## 结 果

### 1 4 组大鼠肺组织匀浆中炎症介质含量比较

模型组与正常组比较,TNF- $\alpha$ 、IL-8 和 LTB4 含量均显著升高,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );班布特罗组与模型组比较,上述指标的差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );激动剂组与班布特罗组比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),见表 1。

### 2 4 组大鼠气道重构指标比较

模型组与正常组比较,MT%、MA% 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );班布特罗组与模型组比较,MT%、MA% 降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );激动剂组与班布特罗组比较,MT%、MA% 升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 1 各组大鼠肺组织匀浆中炎症介质含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the contents of inflammatory mediators in lung tissue homogenates in each group of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group      | Dose( mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) | n  | TNF- $\alpha$ ( pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) | IL-8( pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) | LTB4( pg $\cdot$ mg <sup>-1</sup> ) |
|------------|-------------------------------------|----|-----------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Normal     | 0                                   | 10 | 42.58 $\pm$ 14.21                             | 95.56 $\pm$ 10.28                   | 21.28 $\pm$ 5.74                    |
| Model      | 0                                   | 10 | 205.56 $\pm$ 34.19 <sup>#</sup>               | 212.67 $\pm$ 29.67 <sup>#</sup>     | 46.85 $\pm$ 5.91 <sup>#</sup>       |
| Bambuterol | 2.0                                 | 10 | 97.74 $\pm$ 11.09 <sup>Δ</sup>                | 145.87 $\pm$ 23.63 <sup>Δ</sup>     | 29.54 $\pm$ 6.33 <sup>Δ</sup>       |
| Agonist    | 2.0 + 0.5                           | 10 | 143.62 $\pm$ 22.45 <sup>*</sup>               | 180.66 $\pm$ 20.54 <sup>*</sup>     | 37.29 $\pm$ 4.58 <sup>*</sup>       |

Model: Chronic obstructive pulmonary disease; Bambuterol: Was given Bambuterol; Agonist: Was given bambuterol and lipopolysaccharide; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-8: Interleukin-8; LTB4: Leukotriene B4; Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; Compared with bambuterol group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$

表 2 各组大鼠气道重构指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the airway remodeling indexes in each group of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group      | Dose( mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> ) | n  | MT( % )                       | MA( % )                       |
|------------|-------------------------------------|----|-------------------------------|-------------------------------|
| Normal     | 0                                   | 10 | 6.27 $\pm$ 0.83               | 9.98 $\pm$ 1.02               |
| Model      | 0                                   | 10 | 13.89 $\pm$ 1.26 <sup>#</sup> | 22.67 $\pm$ 3.15 <sup>#</sup> |
| Bambuterol | 2.0                                 | 10 | 8.17 $\pm$ 1.10 <sup>Δ</sup>  | 13.74 $\pm$ 2.01 <sup>Δ</sup> |
| Agonist    | 2.0 + 0.5                           | 10 | 11.29 $\pm$ 1.25 <sup>*</sup> | 17.32 $\pm$ 1.59 <sup>*</sup> |

MT: Tube wall thickness/outer diameter; MA: Tube wall area/total area of trachea; Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; Compared with bambuterol group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$

### 3 4 组大鼠肺组织 MMP-9 表达比较

正常组、模型组、班布特罗组和激动剂组的 MMP-9 表达量分别为 0.09  $\pm$  0.01, 0.54  $\pm$  0.07, 0.28  $\pm$  0.04 和 0.39  $\pm$  0.05。模型组与正常组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );班布特罗组与模型组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );激动剂组与班布特罗组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示模型组气道重构明显,班布特罗的使用可抑制气道重构,而激动剂的使用将减弱其效果。

#### 4 3组大鼠肺组织病理组织学评分比较

模型组、班布特罗组和激动剂组的病理组织学评分分别为(5.26 ± 0.71)、(2.93 ± 0.45)和(4.12 ± 0.62)分。班布特罗组与模型组比较,病理组织学评分降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );激动剂组与班布特罗组比较,病理组织学评分升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

#### 5 4组大鼠的TLR4、MyD88蛋白表达量和p-NF-κB p65/NF-κB p65比较

与正常组比较,模型组TLR4、MyD88蛋白表达量和p-NF-κB p65/NF-κB p65均显著升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ );班布特罗组与模型组比较,上述指标的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );激动剂组与班布特罗组比较,上述指标的差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。提示模型组肺组织TLR4/NF-κB信号通路活性异常增强,班布特罗的使用可抑制TLR4/NF-κB信号通路活性,而激动剂的使用将减弱其效果,见表3。

表3 各组大鼠TLR4、MyD88蛋白表达量和p-NF-κB p65/NF-κB p65比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of the protein expression of TLR4, MyD88, and ratio of p-NF-κB p65/NF-κB p65 in each group of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group      | TLR4                     | MyD88                    | p-NF-κB p65 / NF-κB p65  |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal     | 0.15 ± 0.03              | 0.27 ± 0.03              | 0.18 ± 0.03              |
| Model      | 0.70 ± 0.08 <sup>#</sup> | 0.86 ± 0.09 <sup>#</sup> | 0.77 ± 0.08 <sup>#</sup> |
| Bambuterol | 0.36 ± 0.04 <sup>Δ</sup> | 0.41 ± 0.05 <sup>Δ</sup> | 0.35 ± 0.05 <sup>Δ</sup> |
| Agonist    | 0.53 ± 0.06 <sup>*</sup> | 0.59 ± 0.06 <sup>*</sup> | 0.61 ± 0.07 <sup>*</sup> |

Dose and n: Refer to table 1; TLR4: Toll like receptor 4; MyD88: Myeloid differentiation factor 88; NF-κB p65: Nuclear transcription factor κB p65; Compared with normal group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model group, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; Compared with bambuterol group, <sup>\*</sup> $P < 0.05$

## 讨 论

TLR4是介导炎症反应的跨膜受体,通过MyD88介导的MyD88信号通路以及非依赖性MyD88信号通路两条传导途径激活NF-κB,诱导其转入细胞核,调节下游炎症因子及纤维相关因子转录,引发炎症反应。COPD患者外周血单个核细胞TLR4及NF-κB水平显著高于健康受试者,且与TNF-α、IL-6水平

呈正相关,TLR4/NF-κB信号通路参与COPD发病,且可反应病情严重程度<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,模型组TLR4、MyD88蛋白表达量和p-NF-κB p65/NF-κB p65高于正常组,经盐酸班布特罗干预后均有所降低,进一步用TLR4/NF-κB信号通路激动剂LPS干预后发现,盐酸班布特罗对COPD的治疗效果降低,提示该通路在COPD进程中发挥重要作用,且盐酸班布特罗可能通过抑制该通路改善COPD病情。

## 参考文献:

- [1] BERTOLINI F, CARRIERO V, BULLONE M, et al. Correlation of matrix-related airway remodeling and bradykinin B1 receptor expression with fixed airflow obstruction in severe asthma [J]. *Allergy*, 2021, 76(6): 1886-1890.
- [2] MEHTA M, SATIJA S, PAUDEL K R, et al. Incipient need of targeting airway remodeling using advanced drug delivery in chronic respiratory diseases [J]. *Future Med Chem*, 2020, 12(10): 873-875.
- [3] 刘艳辉, 李洪荣, 范永会, 等. 班布特罗联合噻托溴铵粉治疗慢性阻塞性肺气肿的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(5): 1374-1378.
- [4] 张迪, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(2): 83-88.
- [5] 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): 1069-1072.
- [6] 艾合提热木·塔力甫, 刘基红. 班布特罗联合莫西沙星治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(10): 1555-1558.
- [7] SOKAR S S, AFIFY E H, OSMAN E Y. Dexamethasone and losartan combination treatment protected cigarette smoke-induced COPD in rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(2): 284-296.
- [8] LIU Y, XU J, LIU T, et al. FSTLI aggravates cigarette smoke-induced airway inflammation and airway remodeling by regulating autophagy [J]. *BMC Pulm Med*, 2021, 21(1): 45.
- [9] 常威, 王家吉, 汪林军, 等. 西地那非对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(22): 164-167.
- [10] KAMYAB-HESARY K, GHANADAN A, BALIGHI K, et al. Immunohistochemical staining in the assessment of melanoma tumor thickness [J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(2): 885-891.
- [11] WU N, WU Z, SUN J, et al. Small airway remodeling in diabetic and smoking chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Aging*, 2020, 12(9): 7927-7944.
- [12] ZUO Z T, MA Y, SUN Y, et al. Role of TLR4/NF-κB signalling pathway in pulmonary arterial hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(6): 568-573.

(本文编辑 权菊香)