

· 药理 ·

补肺益肾方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌及肺组织 Notch3, HES1 的影响

梅晓峰¹, 吴婉柳¹, 肖振亚¹, 任周新¹, 余海滨^{1,2*}

(1. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的: 观察补肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠气道黏液高分泌及 Notch 信号通路相关蛋白 Notch3, HES 家族发状分裂相关增强子 1(HES1)的影响, 探讨其作用机制。方法: 将 48 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、补肺益肾方组和氨茶碱组, 每组 12 只。第 1~12 周, 采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染方法制备 COPD 稳定期大鼠模型; 第 13~20 周, 空白组和模型组给予生理盐水灌胃, 治疗组给予相应药物灌胃(补肺益肾方组 $3.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 氨茶碱组 $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。第 20 周灌胃结束后取材, 观察肺组织病理, 检测大鼠肺功能, 肺泡灌洗液肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6), 黏蛋白 5AC(MUC5AC)和肺组织 Notch3, HES1, MUC5AC mRNA 与蛋白表达水平。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠肺功能显著降低($P < 0.05, P < 0.01$), 平均肺泡数显著降低($P < 0.01$), 肺泡平均截距显著升高($P < 0.01$), 肺泡灌洗液 TNF- α , IL-6 和 MUC5AC 显著升高($P < 0.01$), 肺组织 Notch3, HES1 和 MUC5AC 基因与蛋白表达显著升高($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 补肺益肾方组和 APL 组肺功能和肺病理损伤显著改善($P < 0.05, P < 0.01$), 肺泡灌洗液 TNF- α , IL-6 和 MUC5AC 显著降低($P < 0.01$), 肺组织 Notch3, HES1 和 MUC5AC 基因与蛋白表达显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 补肺益肾方抑制 COPD 大鼠气道黏液高分泌, 其机制与调控 Notch3, HES1 蛋白有关。

[关键词] 补肺益肾方; 慢性阻塞性肺疾病(COPD); Notch3; HES 家族发状分裂相关增强子 1(HES1); 气道黏液高分泌

[中图分类号] R22; R242; R285.5; R2-031; R256.1; R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)03-0068-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220397

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211206.2143.002.html>

[网络出版日期] 2021-12-07 14:17

Effect of Bufei Yishen Prescription on Airway Mucus Hypersecretion and Notch3 and HES1 Expression in Lung Tissues of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

MEI Xiao-feng¹, WU Wan-liu¹, XIAO Zhen-ya¹, REN Zhou-xin¹, YU Hai-bin^{1,2*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R. , Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Bufei Yishen prescription on airway mucus hypersecretion and Notch signaling pathway related protein Notch3 and enhancer of split homologue 1 (HES1)

[收稿日期] 20210519(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473650);河南省中医管理局河南省中医药科学研究专项(2017ZY2043)

[第一作者] 梅晓峰, 在读博士, 从事中医药防治呼吸系统疾病研究, E-mail: 18790261665@163.com

[通信作者] * 余海滨, 博士, 主任医师, 从事慢性阻塞性肺疾病、心肺循环系统疾病等老年病的临床与基础研究, E-mail: yhbzzz@163.com

in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and to explore its action mechanism. **Method:** Forty-eight SD rats were randomly divided into the control group, model group, Bufei Yishen prescription group, and aminophylline (APL) group, with 12 rats in each group. The stable COPD rat model was established via cigarette smoking exposure combined with Klebsiella bacterial infection for 12 weeks, and the corresponding drugs ($3.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Bufei Yishen prescription and $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ APL) were administered by gavage during the next eight weeks. After the last administration at week 20, the lung tissue was sampled for observing the pathological changes and the rat lung function was detected. The tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and mucoprotein 5AC (MUC5AC) in bronchial alveolar lavage fluid and the mRNA and protein expression levels of Notch3, HES1, and MUC5AC in lung tissues were assayed. **Result:** Compared with the control group, the model group exhibited significantly weakened pulmonary function ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced average number of alveoli ($P < 0.01$), elevated mean linear intercept ($P < 0.01$), and up-regulated TNF- α , IL-6, and MUC5AC in bronchial alveolar lavage fluid and Notch3, HES1, and MUC5AC mRNA and protein expression in lung tissue ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, Bufei Yishen prescription and APL remarkably enhanced pulmonary function, alleviated its pathological injury ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated TNF- α , IL-6, and MUC5AC in bronchial alveolar lavage fluid and the mRNA and protein expression levels of Notch3, HES1, and MUC5AC in lung tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The mechanism of Bufei Yishen prescription in inhibiting airway mucus hypersecretion of COPD rats was related to its regulation of Notch3 and HES1.

[Keywords] Bufei Yishen prescription; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Notch3; enhancer of split homologue-1 (HES1); airway mucus hypersecretion

慢性阻塞性肺疾病(COPD)严重危害公众健康,气道黏液高分泌是其重要病理特征^[1]。气道黏液分泌过多会导致肺功能迅速恶化,与非气道黏液分泌过多COPD患者相比,伴有气道黏液分泌过多的患者死亡风险增加3.5倍^[2]。Notch信号通路参与调控气道黏液分泌,其中,Notch3在哮喘患者气道上皮中高度表达,阻断Notch3可抑制气道上皮中黏液的分泌^[3]。

COPD治疗以缓解临床症状、降低急性加重次数和提高生活质量为主,临床常用药物包括支气管扩张剂、糖皮质激素、抗生素和化痰剂等。这些药物在一定程度上可改善患者症状、减少急性加重次数,但不能有效逆转患者肺功能下降和病情进展。因此,亟需加强该病的防治研究。前期多中心随机对照研究采用西药常规治疗和补肺益肾方干预COPD临床患者,观察患者急性加重的频率,肺功能,6 min步行距离和呼吸困难量表等,发现补肺益肾方可以改善COPD稳定期患者临床症状、减缓肺功能下降速度、减少急性加重次数、提高生活质量等^[4-5],但其在COPD气道黏液高分泌中的作用机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨补肺益肾方对COPD气道黏液高分泌的影响及对Notch3, HES1家族发状分裂相关增强子1(HES1)等信号蛋白的调

控作用,为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠(SPF级)48只,雌雄各半,体重(200±20)g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,动物质量合格证编号1107261911000162,合格证号SCXK[鲁]20140007,本研究通过河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理审查委员会批准,编号YFYD2016027。

1.2 细菌 肺炎克雷伯杆菌,购自中国食品药品检定研究院,货号46114,使用前将细菌浓度调整为 $6 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 药物 补肺益肾方(专利号ZL201110117578.1,院内制剂批号Z20120006)组成为人参9g(安徽亳州市广源堂中药饮片有限公司,批号190101),淫羊藿9g,矮地茶15g(江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,批号分别为1711005,1709005),黄芪15g,山茱萸12g,枸杞子12g,五味子9g,浙贝母9g,赤芍9g,地龙12g,紫苏子9g,陈皮9g(郑州瑞龙制药股份有限公司,批号分别为20110101,17090103,17120301,17090102,20120106,17030101,17080105,17110101,20120102)。补肺益肾方制备方法为取黄芪,枸杞子,淫羊藿,赤芍,地龙适量,采用水煎煮滤过,滤液

浓缩;取矮地茶,山茱萸,浙贝母,紫苏子,五味子,陈皮适量,采用70%乙醇回流提取,滤过,滤液回收乙醇至无醇味,与上述浓缩液合并;人参粉碎为最细粉,与上述合并液浓缩成浸膏,干燥后制成药粉备用,1g药粉中含生药3.45g,所有中药经河南中医药大学陈随清教授鉴定符合2015年版《中华人民共和国药典》相关规定;氨茶碱片(山西太原药业有限公司,国药准字H14020283)。

1.4 试剂 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒, DAB显色试剂盒, ECL Plus超敏发光液(北京Solarbio公司,货号分别为G1120, DA1010, PE0010-B); SABC免疫组化染色试剂盒(美国Boster公司,货号SA1020), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), Notch3抗体, 山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国Proteintech公司,货号分别为10494-1-AP, 55114-1-AP, SA00001-2); HES1抗体(美国Gene Tex公司,货号GTX108356); 大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定试验(ELISA)试剂盒, 黏蛋白5AC(MUC5AC)抗体(中国伊莱瑞特公司,货号分别为E-EL-R2856c, E-EL-R0015c, E-AB-40037); 大鼠MUC5AC ELISA试剂盒(中国华美生物工程有限公司,货号CSB-E16223r); HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, AceQ[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(中国南京诺唯赞生物科技有限公司,货号分别为R211-01, Q111-02)。

1.5 仪器 FinePointe PFT型动物肺功能检测系统(美国DSI公司); Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo公司); QuantStudio 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国ABI公司), ChemiDoc MP型全能型成像系统, Mini Trans-Blot[®]型转膜仪, Mini-PROTEAN[®]-Tetra电泳仪(美国Bio Rad公司); TS100型倒置显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 COPD大鼠模型制备 采用香烟烟雾熏吸联合反复细菌感染制备COPD大鼠模型^[6]。第1~12周香烟烟雾熏吸,熏烟箱烟雾浓度为(3 000±500) ppm,每天2次,40 min/次。第1~8周联合肺炎克雷伯杆菌液经鼻滴注,0.1 mL/只,5 d/次。造模成功标准见参考文献^[6],通过肺功能、肺病理等检测,即可确定。

2.2 分组与给药 将48只大鼠随机分为空白组、模型组、补肺益肾方组、氨茶碱组,每组12只。第13~20周,空白组和模型组给予生理盐水

(2 mL/只)灌胃,补肺益肾方组给予补肺益肾方(3.7 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,氨茶碱组给予氨茶碱混悬液(54 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,第20周结束后取材。采用等效剂量系数换算公式计算灌胃剂量^[7]为 $D_{\text{大鼠}}=D_{\text{人}}\times(HI_{\text{大鼠}}/HI_{\text{人}})\times(W_{\text{大鼠}}/W_{\text{人}})^{2/3}$, D 为剂量, HI 为体型系数, W 为体质量。

2.3 检测指标

2.3.1 肺功能 分别在第0, 4, 8, 12, 16, 20周结束后,采用动物肺功能检测系统检测大鼠潮气量(V_T),呼气峰流速(PEF)。在取材时检测用力肺活量(FVC)和0.3 s用力呼气容积($FEV_{0.3}$),计算 $FEV_{0.3}/FVC$ 。

2.3.2 肺组织病理 采用10%中性甲醛固定肺组织,72 h后进行石蜡包埋及HE染色。每张肺组织切片随机截取6个肺泡视野图片,在图片中央画出“十”字,计算每个视野的肺泡数(Na),肺泡隔膜数(Ns),测量长度(L),面积(S),计算公式如下^[8],肺泡平均截距($MLI, \mu\text{m}$)= L/Ns ,平均肺泡数($MAN, \text{个}/\text{mm}^2$)= Na/S 。

2.3.3 免疫组化(IHC)检测肺组织病理 切取肺组织石蜡切片,脱蜡后抗原修复,然后滴加过氧化氢,一抗MUC5AC(1:200)4℃过夜,二抗室温30 min, DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片后,采用Image-Pro Plus 6.0软件进行图像分析。

2.3.4 ELISA检测肺泡灌洗液IL-6, TNF- α 和MUC5AC水平 将肺泡灌洗液离心后取上清,在检测孔内加入样品或标准品100 μL ,然后根据ELISA试剂盒说明书的孵育时间和条件,依次加入生物素化抗体工作液、酶结合物工作液、底物溶液和终止液,最后在酶标仪450 nm波长处检测积分吸光度 IA 。

2.3.5 Real-time PCR检测肺组织Notch3, HES1和MUC5AC mRNA表达 采用RNA提取试剂盒提取肺组织总RNA并测定其浓度和纯度,根据第一链cDNA合成试剂盒将RNA逆转录为cDNA,根据SYBR试剂盒说明书进行如下操作,预变性95℃30 s,PCR扩增40个循环,95℃变性10 s,60℃退火30 s;然后根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算每个样本mRNA的相对表达量。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成设计,序列如下,Notch3上游引物5'-CCCTGGCACA CTGGGAGTTC-3',下游引物5'-GACAGATGCAGCGGAAGTGC-3'(257 bp); HES1上游引物5'-TGAAAGCCAAGTAAAGGGGACG-3',下游引物5'-TTGGAATGCCGGGAGCTATCTT-3'(324 bp); MUC5AC上游引物5'-ACTGTGACGTTGAACCTGGG-3',下游引物5'-

AAGAAGGTAGCGTTGGCTGT-3'(119 bp);GAPDH 上游引物 5'-CCGCATCTTCTTGTGCAGTG-3',下游引物 5'-CGATACGGCCAAATCCGTTTC-3'(79 bp)。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 Notch3, HES1 蛋白表达 取肺组织 50 mg 剪碎后加入高效 RIPA 裂解液,经组织破碎仪破碎后,12 000 r·min⁻¹离心 15 min(离心半径 5 cm)取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度,进行蛋白变性,上样,60 V 电泳 30 min,100 V 电泳 1 h,200 mA 下湿转 2 h,5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,Notch3, HES1 一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜后,将膜在 TBST 中洗膜 4 次,每次 10 min,室温下孵育二抗(1:5 000)1 h,然后将膜在 TBST 中洗膜 4 次,每次 10 min,最后采用全能型成像系统扫描并分析。

表 1 补肺益肾方对 COPD 大鼠 V_T 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	4周	8周	12周	16周	20周
空白		1.36±0.10	1.84±0.06	1.96±0.24	2.15±0.16	2.37±0.22	2.54±0.32
模型		1.43±0.12	1.68±0.03	1.46±0.26 ²⁾	1.18±0.18 ²⁾	1.26±0.19 ²⁾	1.23±0.18 ²⁾
补肺益肾方	3.7	1.44±0.03	1.74±0.36	1.59±0.36	1.19±0.11	1.92±0.24 ⁴⁾	2.31±0.17 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	1.44±0.15	1.68±0.32	1.63±0.26	1.26±0.12	2.09±0.13 ⁴⁾	2.14±0.08 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表 2~8 同)。

表 2 补肺益肾方对 COPD 大鼠 PEF 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0周	4周	8周	12周	16周	20周
空白		16.17±2.29	17.22±3.81	17.82±2.12	18.65±2.81	19.66±1.47	20.42±2.82
模型		16.14±5.78	15.26±2.95	14.71±3.46 ¹⁾	12.46±0.89 ²⁾	12.90±5.02 ²⁾	13.81±0.92 ²⁾
补肺益肾方	3.7	15.65±1.52	15.43±1.50	14.90±1.45 ¹⁾	12.80±1.71 ²⁾	16.00±1.34	18.86±0.63 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	16.29±2.86	14.93±2.92	14.60±0.75 ¹⁾	11.96±0.73 ²⁾	15.67±1.75	18.05±1.77 ⁴⁾

表 3 补肺益肾方对 COPD 大鼠 FEV_{0.3}, FVC 和 FEV_{0.3}/FVC 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FEV _{0.3} /mL	FVC/mL	FEV _{0.3} /FVC/%
空白		17.97±1.47	21.09±1.28	85.92±6.60
模型		11.76±1.43 ²⁾	15.85±1.37 ²⁾	74.37±8.55 ¹⁾
补肺益肾方	3.7	15.72±1.67 ⁴⁾	18.62±1.29 ⁴⁾	85.09±13.43 ³⁾
氨茶碱	0.054	15.83±0.89 ⁴⁾	18.37±0.94 ⁴⁾	86.36±6.28 ³⁾

3.2 对 COPD 大鼠肺组织病理形态的影响 研究显示,空白组大鼠镜下肺组织结构正常,未见病理改变;模型组大鼠镜下炎症细胞浸润,肺泡腔扩张,肺泡壁断裂;两治疗组均可以减少炎症细胞浸润,改善肺泡结构。与空白组比较,模型组 MAN 显著降低(P<0.01),MLI 显著升高(P<0.01);与模型

2.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐者采用最小显著差法,方差不齐者采用 Dunnett's T3 法,显著性水准取 $\alpha=0.05$,以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 COPD 大鼠肺功能的影响 与空白组比较,模型组大鼠 V_T 和 PEF 从第 8 周开始显著降低(P<0.01);与模型组比较,补肺益肾方组和 APL 组第 16~20 周 V_T 显著升高,第 20 周 PEF 显著升高(P<0.01)。与空白组比较,模型组大鼠 FVC, FEV_{0.3} 和 FEV_{0.3}/FVC 明显降低(P<0.05, P<0.01);与模型组比较,补肺益肾方组和氨茶碱组 FVC, FEV_{0.3} 和 FEV_{0.3}/FVC 明显升高(P<0.05, P<0.01),见表 1~3。

组比较,补肺益肾方组和氨茶碱组 MAN 显著升高(P<0.01),MLI 显著降低,差异具有统计学意义(P<0.01)。见表 4,图 1。

3.3 对 COPD 大鼠肺组织 MUC5AC 的影响 MUC5AC 在气道组织中高度表达,与空白组比较,模型组 MUC5AC 表达显著增高(P<0.01);与模

表4 补肺益肾方对COPD大鼠MAN和MLI的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Effect of BYP on levels of MAN and MLI in COPD rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MAN/个/mm ²	MLI/μm
空白		284.24±10.58	44.81±1.29
模型		123.16±10.70 ²⁾	86.92±3.27 ²⁾
补肺益肾方	3.7	262.59±14.48 ⁴⁾	53.46±2.84 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	247.72±27.29 ⁴⁾	52.23±3.19 ⁴⁾

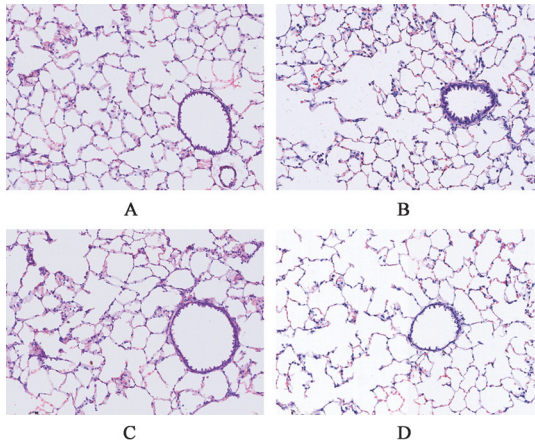


图1 补肺益肾方对COPD大鼠肺组织病理形态的影响(HE, ×200)
A. 空白组; B. 模型组; C. 补肺益肾方组; D. 氨茶碱组(图2,3同)

Fig. 1 Effect of BYP on Pathological changes in lung tissues of COPD rats (HE, ×200)

型组比较,补肺益肾方组和APL组MUC5AC表达显著降低($P<0.01$)。见表5,图2。

3.4 对COPD大鼠肺泡灌洗液TNF-α, IL-6和

表6 补肺益肾方对COPD大鼠肺泡灌洗液TNF-α, IL-6和MUC5AC的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 6 Effect of BYP on levels of TNF-α, IL-6 and MUC5AC in BALF of COPD rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF-α/ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	MUC5AC/μg·L ⁻¹
空白		52.22±10.83	212.26±63.02	0.80±0.16
模型		115.94±32.99 ²⁾	506.97±139.28 ²⁾	2.42±0.59 ²⁾
补肺益肾方	3.7	65.10±21.03 ⁴⁾	316.34±101.36 ⁴⁾	1.03±0.23 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	67.14±18.33 ⁴⁾	326.28±88.48 ⁴⁾	1.02±0.15 ⁴⁾

3.5 对COPD大鼠肺组织Notch3, HES1和MUC5AC mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组Notch3, HES1和MUC5AC mRNA表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,补肺益肾方组和氨茶碱组Notch3, HES1和MUC5AC mRNA表达显著降低($P<0.01$)。见表7。

3.6 对COPD大鼠肺组织Notch3, HES1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组Notch3和HES1蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,补肺益肾

表5 补肺益肾方对COPD大鼠肺组织MUC5AC的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 5 Effect of BYP on MUC5AC level of COPD rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
空白		13.42±0.97
模型		23.73±2.70 ²⁾
补肺益肾方	3.7	14.38±1.83 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	15.14±1.65 ⁴⁾

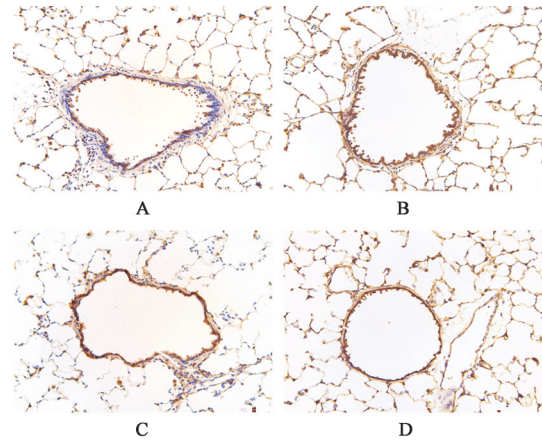


图2 补肺益肾方对COPD大鼠肺组织MUC5AC的影响(IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of BYP on MUC5AC level of COPD rats(IHC, ×200)

MUC5AC的影响 与空白组比较,模型组大鼠肺泡灌洗液中TNF-α, IL-6和MUC5AC显著增高($P<0.01$)。与空白组比较,补肺益肾方组和氨茶碱组大鼠肺泡灌洗液中TNF-α, IL-6和MUC5AC显著降低($P<0.01$)。见表6。

表7 补肺益肾方对COPD大鼠肺组织Notch3, HES1和MUC5AC mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of BYP on expression of Notch3, HES1 and MUC5AC mRNA in lung tissues of COPD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Notch3	HES1	MUC5AC
空白		1.00±0.06	1.00±0.09	1.00±0.08
模型		3.02±0.34 ²⁾	3.07±0.10 ²⁾	2.53±0.22 ²⁾
补肺益肾方	3.7	1.49±0.15 ⁴⁾	1.33±0.25 ⁴⁾	1.23±0.08 ⁴⁾
氨茶碱	0.054	1.72±0.16 ⁴⁾	1.83±0.15 ⁴⁾	1.21±0.10 ⁴⁾

方组 Notch3 和 HES1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$)。见表 8, 图 3。

表 8 补肺益肾方对 COPD 大鼠肺组织 Notch3, HES1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of BYP on expression of Notch3 and HES1 protein in lung tissues of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Notch3/GAPDH	HES1/GAPDH
空白		0.31±0.05	0.42±0.08
模型		0.52±0.12 ¹⁾	0.78±0.22 ¹⁾
补肺益肾方	3.7	0.32±0.10 ³⁾	0.49±0.13 ³⁾
氨茶碱	0.054	0.37±0.09	0.51±0.03 ³⁾

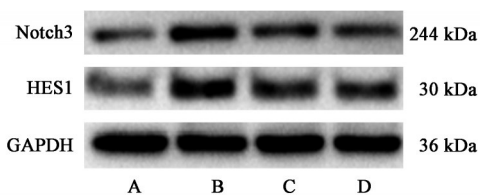


图 3 COPD 大鼠肺组织 Notch3, HES1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Notch3 and HES1 in lung tissues of COPD rats

4 讨论

COPD 属中医“肺胀”“喘病”“咳嗽”等范畴。COPD 病理因素主要为素体正虚,复感外邪,其病理变化为本虚标实^[9]。“正虚积损”为 COPD 主要病机,正虚是指肺脾肾虚损而以肺虚为始、以肾虚为基,气虚为本、时或及阴阳;积损是指痰瘀及其互结成积、胶痼积蓄难除,日益损伤正气,正气逐渐虚损而积损难复,治以“扶正祛积”^[10]。肺肾气虚证为 COPD 稳定期主要证候^[11],治以补肺益肾佐以化痰祛瘀,基于此拟定补肺益肾方,方中以人参为君,甘平而大补元气;黄芪甘温可补益肺脾之气,助人参补气之功;山茱萸、枸杞子滋补肾之精气,五味子滋补肺肾之气,淫羊藿温肾助阳,使肾之阴精化生肾气;再配以化痰活血化瘀等佐药,全方共奏补肺益肾兼化痰祛瘀之效。该方可以改善 COPD 稳定期大鼠肺功能,减轻肺组织病理损伤,减轻炎症反应,降低肺组织胶原沉积和基质金属蛋白酶水平等^[12-17]。现代药理研究发现,贝母通过舒张气管平滑肌、减少炎症细胞浸润、增加气管腺体组织分泌,发挥化痰、止咳、平喘等作用^[18-19];人参提取物可通过调控核转录因子- κ B(NF- κ B)信号,改善 COPD 大鼠炎症反应及气道重塑,并增强免疫功能^[20-21];黄芪甲苷是黄芪中的主要皂苷类成分,具有抗炎、抗衰老、调节免疫等功效,可抑制 COPD 大鼠气道炎症反应及内质网应激引起的细胞凋亡,减缓 COPD 进

程^[22];淫羊藿苷具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎等药理作用,可减轻 COPD 大鼠局部炎症细胞浸润和氧化应激水平,改善肺功能及肺组织损伤^[23];丹皮酚可抑制细胞外基质合成,改善血管通透性,抗氧自由基损伤,从而延缓气道重构等病理环节抑制 COPD 发生发展^[24]。

COPD 发病机制复杂,气道黏液高分泌是其重要病理特征。气道黏液的主要构成部分是黏蛋白,其中分泌型黏蛋白主要包括 MUC5AC^[25]。正常情况下,气道表面的黏液由黏膜下腺和气道上皮细胞(主要是杯状细胞)分泌,在保护先天免疫反应中起关键作用^[26]。香烟烟雾等长期刺激,导致气道的持续炎症反应、黏液分泌腺增大和杯状细胞增多,大量的黏液积聚于管腔,尤其是小气道管腔中,造成气流阻塞,引起肺通气功能障碍;同时气道黏液纤毛系统结构和功能也发生异常,过量黏液滞留,导致感染次数增多,引起炎症反应,加重气道病变,形成恶性循环^[27]。本研究结果显示,模型组大鼠肺组织肺泡断裂融合,上皮细胞脱落明显,气管壁增厚、管腔狭窄伴大量炎症细胞浸润,肺泡灌洗液中炎症因子 TNF- α , IL-6 显著升高, MUC5AC 分泌显著增加,肺功能 V_T , PEF, FEV_{0.3}, FVC, FEV_{0.3}/FVC 显著降低,过量的黏液阻塞气道,导致肺通气功能障碍,一方面证明 COPD 模型制备成功,另一方面提示 COPD 大鼠气道黏液高分泌。补肺益肾方显著改善 COPD 大鼠的肺功能、肺组织病理损伤、炎症反应,降低肺泡灌洗液和肺组织中 MUC5AC 的表达,降低黏液分泌量,表明补肺益肾方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌有治疗作用。

气道黏液高分泌主要发病机制为杯状细胞化生增加及黏膜纤毛清除功能受损,由多条信号通路调控^[28-29]。Notch 信号通路活化与气道黏液高分泌密切相关,其中 Notch3 是参与气道分化的关键蛋白,在调控纤毛细胞和黏液细胞数量方面起重要作用^[30-31];HES1 作为 Notch 信号下游关键靶点,其表达是 Notch 通路活化的标志^[32-33]。香烟烟雾激活 Notch3,与配体结合,释放 Notch 受体的胞内部分,进入细胞核,结合转录因子,激活下游靶基因 HES1,促进人气管上皮细胞中杯状细胞分化,引起气道黏液细胞增多、纤毛细胞减少,导致 MUC5AC 表达增高^[34-36]。本研究结果显示, COPD 模型大鼠肺组织中 Notch3, HES1 基因和蛋白表达显著升高;补肺益肾方显著降低 Notch3, HES1 基因和蛋白表达。因此, Notch3、HES1 均与黏蛋白有关,补肺益

肾方可能通过抑制 Notch 信号活化,下调 MUC5AC 表达,改善 COPD 大鼠气道黏液高分泌。

综上所述,补肺益肾方治疗 COPD 大鼠效果明显,可改善大鼠肺功能、肺组织损伤和炎症反应,降低肺泡灌洗液和肺组织 MUU5AC 水平,具有较好的抑制气道黏液高分泌的作用,其机制与阻抑 Notch 信号的活化有关。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, 2020 report [EB/OL]. [2021-05-19]. <http://www.goldcopd.org>.
- [2] SHEN Y, HUANG S, KANG J, et al. Management of airway mucus hypersecretion in chronic airway inflammatory disease: Chinese expert consensus (English edition) [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2018, 13:399-407.
- [3] REID A T, NICHOL K S, CHANDER VEERATI P, et al. Notch3 signaling abolishes MUC5AC production in airway epithelial cells from individuals with asthma [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2020, 62 (4) : 513-523.
- [4] LI S Y, LI J S, WANG M H, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 29(12):197.
- [5] YU X Q, WANG M H, LI J S, et al. Effect of comprehensive therapy based on chinese medicine patterns on self-efficacy and effectiveness satisfaction in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *Front Med*, 2014, 8(3):368-375.
- [6] LI Y, LI S Y, LI J S, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35 (10) : 1752-1760.
- [7] 张蓝熙,田燕歌,朱丽华,等.补肺益肾方通过调控 Nrf2 通路抗氧化应激治疗慢性阻塞性肺疾病机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5):2374-2379.
- [8] 田燕歌,李亚,李建生,等.调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2):621-624.
- [9] 世界中医药学会联合会.国际中医临床实践指南 慢性阻塞性肺疾病 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(7):1084-1092.
- [10] 李建生.正虚积损为慢性阻塞性肺疾病的主要病机 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(8):710-713.
- [11] 李建生,王至婉,李素云,等.慢性阻塞性肺疾病稳定期常见证候及特征的临床调查 [J]. *河南大学学报:医学版*, 2010, 29(3):155-159.
- [12] TIAN Y, LI Y, LI J, et al. Bufeiyishen granule combined with acupoint sticking improves pulmonary function and morphometry in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:266.
- [13] LI J, ZHAO P, YANG L, et al. System biology analysis of long-term effect and mechanism of Bufeiyishen on COPD revealed by system pharmacology and 3-omics profiling [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:25492.
- [14] LI Y, TIAN Y G, LI J S, et al. Bufeiyishen granules combined with acupoint sticking therapy suppress oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease rats: Via regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193:354-361.
- [15] LI Y, LI J S, LI W W, et al. Long-term effects of three Tiao-Bu Fei-Shen therapies on NF- κ B/TGF- β ₁/smad2 signaling in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 4:140.
- [16] ZHAO P, LI J, YANG L, et al. Integration of transcriptomics, proteomics, metabolomics and systems pharmacology data to reveal the therapeutic mechanism underlying Chinese herbal Bufeiyishen formula for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4) : 5247-5257.
- [17] 吴明明,田燕歌,张蓝熙,等.补肺益肾方联合运动改善慢性阻塞性肺疾病大鼠骨骼肌功能及对 PKA-CREB 通路的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(12):1495-1501.
- [18] FAN B, LI T, XU S, et al. Efficient, accurate and comprehensive evaluation of polysaccharides from *Fritillaria* and their inhibitory responses to mouse inflammation [J]. *Food Funct*, 2019, 10(12) : 7913-7925.
- [19] LIU S, YANG T, MING T W, et al. Isosteroid alkaloids from *Fritillaria cirrhosa bulb* as inhibitors of cigarette smoke-induced oxidative stress [J]. *Fitoterapia*, 2020, 140:104434.

- [20] QI Z, LI W, TAN J, et al. Effect of ginsenoside Rh₂ on renal apoptosis in cisplatin-induced nephrotoxicity *in vivo* [J]. *Phytomedicine*, 2019, 61:152862.
- [21] BAATAR D, SIDDIQI M Z, IM W T, et al. Anti-inflammatory effect of ginsenoside Rh₂-Mix on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells [J]. *J Med Food*, 2018, 21(10):951-960.
- [22] CHEN L, SUN B B, WANG T, et al. Cigarette smoke enhances β -defensin 2 expression in rat airways via nuclear factor- κ B activation [J]. *Eur Respir J*, 2010, 36(3):638-645.
- [23] HU L, LIU F, LI L, et al. Effects of icariin on cell injury and glucocorticoid resistance in BEAS-2B cells exposed to cigarette smoke extract [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1):283-292.
- [24] ZHANG L, LI D C, LIU L F. Paeonol: pharmacological effects and mechanisms of action [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 72:413-421.
- [25] ZHANG Y, TANG H, YUAN X, et al. TGF- β ₃ promotes MUC5AC hyper-expression by modulating autophagy pathway in airway epithelium [J]. *EBioMedicine*, 2018, 33:242-252.
- [26] BOUCHERAT O, BOCZKOWSKI J, JEANNOTTE L, et al. Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(4):207-216.
- [27] RACANELLI A C, KIKKERS S A, CHOI A M K, et al. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2):221-232.
- [28] CURRAN D R, COHN L. Advances in mucous cell metaplasia: a plug for mucus as a therapeutic focus in chronic airway disease [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(3):268-275.
- [29] BOUCHERAT O, BOCZKOWSKI J, JEANNOTTE L, et al. Cellular and molecular mechanisms of goblet cell metaplasia in the respiratory airways [J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(4-5):207-216.
- [30] JING Y, GIMENES J A, MISHRA R, et al. NOTCH3 contributes to rhinovirus-induced goblet cell hyperplasia in COPD airway epithelial cells [J]. *Thorax*, 2019, 74(1):18-32.
- [31] YANG Y Y, LIN C J, WANG C C, et al. Consecutive hypoxia decreases expression of NOTCH3, HEY1, CC10, and FOXJ1 via NKX2-1 downregulation and intermittent hypoxia-reoxygenation increases expression of BMP4, NOTCH1, MKI67, OCT4, and MUC5AC via hif1a upregulation in human bronchial epithelial cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8:572276.
- [32] 赵兰婷. Notch信号通路对慢性阻塞性肺疾病炎症反应的影响及机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2015.
- [33] 杨鑫娜. Notch信号通路在慢性阻塞性肺疾病免疫失衡中的作用及机制研究[D]. 兰州:兰州大学, 2015.
- [34] BODAS M, MOORE A R, SUBRAMANIYAN B, et al. Cigarette smoke activates Notch3 to promote goblet cell differentiation in human airway epithelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 64(4):426-440.
- [35] CHENG Z, TAN Q, TAN W, et al. Cigarette smoke induces the expression of Notch3, not Notch1, protein in lung adenocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2):641-646.
- [36] GUSEH J S, BORES S A, STANGER B Z, et al. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development [J]. *Development Epub*, 2009, 136(10):1751-1759.

[责任编辑 王鑫]