

· 药理 ·

全真一气汤对 COPD 模型小鼠 Nrf2 通路及对炎性细胞因子和肺组织超微结构的影响

杨晓鹏¹, 李秀娟¹, 梁金宇¹, 林勇平², 张大鹏², 张志敏^{2*}

(1. 广州医科大学 研究生院, 广州 511436; 2. 广州医科大学 附属第一医院, 广州 510120)

[摘要] **目的:**研究全真一气汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型小鼠炎性细胞因子及肺组织超微结构的影响。**方法:**实验小鼠分为正常组、模型组、全真一气汤低、高剂量(4.3, 8.6 g·kg⁻¹)组、氨茶碱(2.3 mg·kg⁻¹)组,采用熏香烟联合气道内细菌脂多糖(LPS)滴入法制作 COPD 稳定期小鼠模型,熏烟于 16 周结束。观察小鼠的一般情况,检测小鼠肺功能,计算肺泡灌洗液炎性细胞总数,肺组织白细胞介素-6(IL-6)和趋化因子(KC)表达量,免疫组化法检测肺组织细胞外调节蛋白激酶(ERK),核转录因子 NF-E2 相关因子(Nrf2),血红素加氧酶(HO-1)蛋白表达,透射电镜观察肺组织超微结构改变。**结果:**模型组小鼠一般状态较正常组差,全真一气汤低剂量组及高剂量组小鼠状态较模型组好转。与模型组比较,全真一气汤可降低 COPD 模型小鼠气道阻力($P < 0.05$),降低肺静态顺应性($P < 0.05$)和功能残气量;降低肺炎细胞数($P < 0.05$),降低炎症介质 IL-6 和 KC 表达量($P < 0.05$),降低 ERK 和 Nrf2 蛋白表达量,增高 HO-1 蛋白表达量,肺组织电镜结果显示全真一气汤能减轻肺组织超微损害。**结论:**全真一气汤可改善 COPD 模型小鼠一般状态,减少炎症细胞因子表达,保护肺功能,减轻肺组织超微结构损害,能降低 ERK 和 Nrf2 蛋白表达量,上调 HO-1 蛋白表达,起到抗炎作用。

[关键词] 全真一气汤; 慢性阻塞性肺疾病小鼠; 炎性细胞因子; Nrf2 通路; 白细胞介素-6; 趋化因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0086-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016220086

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1358.062.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:58

Effect of Quanzhen Yiqi Tang on Inflammatory Cytokines and Pulmonary Ultrastructure of Mice with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

YANG Xiao-peng¹, LI Xiu-juan¹, LIANG Jin-yu¹, LIN Yong-ping²,
ZHANG Da-peng², ZHANG Zhi-min^{2*}

(1. Graduate School, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Quanzhen Yiqi Tang on inflammatory cytokines and pulmonary ultrastructure of mice with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** COPD mouse model were built by cigarette smoking and lipopolysaccharides (LPS) instillation in airway. They were divided into five groups, namely control group, model group, Quanzhen Yiqi Tang low-dose and high-dose groups (4.3, 8.6 g·kg⁻¹), and aminophylline group. After 16 weeks, lung function were tested, the total number of alveolar lavage inflammatory cells, expressions of lung tissue interleukin-6 (IL-6) and cutin chemotactic cytokines (KC) were counted. The immunohistochemistry method was used to detect extraeellular regulated protein kinase (ERK), Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) protein expressions. The lung tissue ultrastructure changes were observed by

[收稿日期] 20160124(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202674)

[第一作者] 杨晓鹏, 硕士, 从事中西医结合临床呼吸方向研究, Tel:020-83062042, E-mail: yangxiaopeng126@126.com

[通讯作者] * 张志敏, 博士, 主任医师, 从事呼吸系统疾病中西医结合诊治和研究, Tel:020-83062042, E-mail: zhangzhimin51666@163.com

transmission electron microscope (TEM). **Result:** Compared with normal control group, Quanzhen Yiqi Tang low-dose group and high-dose group showed recovery in mice state. Compared with model group, Quanzhen Yiqi Tang reduced COPD airway resistance in model mice ($P < 0.05$), the static lung compliance ($P < 0.05$), functional residual capacity, the number of alveolar inflammatory cells ($P < 0.05$), inflammation medium IL-6 ($P < 0.05$) and KC ($P < 0.05$) expression, Nrf2 and ERK protein expressions, and increased HO-1 protein expression. The electron microscope results showed that Quanzhen Yiqi Tang can reduce the lung tissue ultrastructural damage. **Conclusion:** Quanzhen Yiqi Tang could improve the general state of mice with COPD, reduce inflammatory cytokines, protect lung function, reduce the lung tissue ultrastructural damage and the amount of Nrf2 and ERK protein expression, and up-regulate HO-1 protein expression.

[Key words] Quanzhen Yiqi Tang; chronic obstructive pulmonary disease (COPD); inflammatory cytokine; Nrf2 signal channel; interleukin-6 (IL-6); cutin chemotactic cytokines (KC)

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种以持续气流受限为特征的可以预防和治疗的疾病。其气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与气道和肺组织对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒引起的异常慢性炎症有关。COPD 目前尚无完全治愈的方法,因肺功能进行性减退,严重影响患者的劳动能力和生活质量^[1-2]。全真一气汤为清代名医冯兆张创立,方由熟地黄、麦冬、白术、人参、淡附片、牛膝、五味子组成。临床上,该方广泛用于治疗各种老年虚损性疾病,如慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、肺癌等辨证属气血阴阳俱虚者。本课题组自 2005 年开始采用全真一气汤治疗 COPD 及 COPD 急性加重期患者,疗效显著^[3-4],但其作用机制不明。目前关于全真一气汤治疗 COPD 机制研究甚少,仅有李大治等^[5]研究发现全真一气汤能使 COPD 模型大鼠肺、肾、肾上腺、睾丸组织结构破坏程度不同程度得到减轻;维持肾上腺髓质素 (ADM) 水平,延缓 COPD 的进展^[6]。本研究拟以“炎症”为切入点,研究全真一气汤通过核转录因子 NF-E2 相关因子 (Nrf2) 通路调控 COPD 模型小鼠炎性细胞因子及肺组织超微结构的影响,探讨全真一气汤治疗 COPD 的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 C57 小鼠 75 只,4~6 周龄,体重 18~22 g,购自广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,自由饮水和进食 7 d 以适应环境。

1.2 药物 脂多糖 (LPS, Sigma 公司,批号 L3024);全真一气汤(熟地黄 30 g,麦冬 10 g,白术 10 g,党参 10 g,淡附片 10 g,五味子 6 g,由广州医科大学附属第一医院中药房提供);红玫牌香烟(广东中烟工业有限责任公司(每根香烟焦油含量 13 mg,

烟碱含量 1.3 mg,一氧化碳含量 15 mg);氨茶碱(山东新华制药股份有限公司,批号 1403279,100 mg/片)。白细胞介素-6 (IL-6) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (eBioscience 公司,批号 554400);趋化因子 (KC) ELISA 试剂盒 (Absin 公司,批号 abs45152337);肺组织细胞外调节蛋白激酶 (ERK), Nrf2,血红素加氧酶 (HO-1) 一抗 (Proteintech 公司,批号分别为 11257-1-AP,16396-1-AP,10701-1-AP);羊抗兔、兔抗羊、羊抗鼠二抗 (Millipore 公司,批号分别为 SN134,SN847,SN763);山羊血清封闭液 (武汉博士德公司,批号 AR0009);DAB 显色试剂盒 (中杉金桥公司,批号 ZLI-9018);红细胞裂解液 (武汉博士德公司,批号 AR118)。

1.3 仪器 FinePointe™ PFT 型小动物肺功能仪 (美国 Buxco 公司,广州呼吸疾病研究所提供);自制熏烟箱 (50 cm × 60 cm × 90 cm);RM2016 型轮转式石蜡切片机 (上海徕卡仪器有限公司);BX41TF 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司);JEM1400 型透射电镜 (日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 全真一气汤制备 按照动物数及给药时间计算药量,淡附片先煎 1 h 后,取其他药同煎 0.5 h,继续煎煮 1 次,合并 2 次煎液,用脱脂棉和纱布过滤,滤液加热浓缩至含生药 1 g·mL⁻¹,将水煎液灭菌冷却后置 4℃ 冰箱保存。

2.2 小鼠分组与 COPD 模型复制 按随机数字表法将小鼠随机分为空白组, COPD 模型组,全真一气汤高、低剂量组,氨茶碱组,每组 15 只。采用熏香烟联合气道内脂多糖 (LPS) 滴入法制作 COPD 稳定期小鼠模型^[7]:将小鼠置于自制熏烟箱中进行被动吸烟,熏烟处理为 4 次/d,上下午各 2 次,每次 1 h (每 1 h 间换气 10~15 min),上、下午间隔 3~4 h,10 支

香烟/h,6 d/周,熏烟于 16 周结束(第 1,14 天小鼠鼻腔内滴注 LPS,用量为 0.15 g/L/只,不予熏烟处理)。小鼠在熏烟同时,模型组每天灌服蒸馏水 1 次,0.4 mL/d/次;全真一气汤低、高剂量组灌服全真一气汤水煎液(4.3,8.6 g·kg⁻¹·d⁻¹,相当于 0.5,1 倍临床剂量);氨茶碱组灌服氨茶碱水溶液(2.3 mg·kg⁻¹·d⁻¹,1 倍临床剂量);共 16 周。空白组自由进水进食。

2.3 检测指标

2.3.1 一般情况 观察小鼠的活动度、对外界反应的灵敏度及皮毛光泽、饮食、饮水、体重、死亡情况。

2.3.2 肺功能测定 熏烟期间,每个月用无创肺功能仪对各组小鼠检测肺功能。熏烟满 16 周后,直接用有创肺功能仪检测小鼠肺功能,测量吸气阻力(RI),肺静态顺应性(Cchord),功能残气量(FRC)等指标。具体操作如下,用 1%戊巴比妥钠(空白组按 100 mg·kg⁻¹,熏烟组按 70 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉小鼠,于颈部甲状腺处切开气管(切口尽可能小),插入气管插管,放入体描箱,连接小动物通气机进行机械通气,潮气量(10 mL·kg⁻¹),吸气压力 8~12 cm H₂O,呼吸 120 次/min,吸呼比 10:15。待动物与呼吸机完全协调后,测定肺通气功能。

2.3.3 肺组织 ERK, Nrf2, HO-1 蛋白表达 开胸取小鼠左下肺,放入 4%多聚甲醛中固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片。免疫组化检测肺组织 ERK, Nrf2, HO-1 蛋白在肺组织中的表达。切片脱蜡至水,微波修复,洗涤,滴加山羊血清封闭,滴加一抗(ERK, 1:100; Nrf2, 1:100; HO-1, 1:200),洗涤,滴加二抗(1:500),洗涤, DAB 显色,流水冲洗,苏木精复染,流水冲洗,脱水,树胶封片,镜检。

2.3.4 肺泡灌洗液中炎性细胞计数总数及其 IL-6 和 KC 表达量检测 小鼠麻醉后,暴露气道,行留置

针气管内插管结扎,用生理盐水冲洗支气管肺泡,回收得到肺泡灌洗液(BALF),每只小鼠尽量回收到相同体积的 BALF, 800 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清,-80℃保存。往沉淀中加入红细胞裂解液 200 μL,混匀,常温中反应 3~5 min,离心弃上清,加入磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL,混匀,取 10 μL 于血细胞计数板上进行炎性细胞计数。-80℃保存的上清液采用 ELISA 试剂盒检测,于 450 nm 处检测吸光度 A。

2.3.5 肺组织超微结构 肺功能检测后处死小鼠,迅速取其右肺上叶组织,2.5%戊二醛预固定后,1%锇酸固定,环氧树脂浸透和包埋,Leica 超薄切片机切片,乙酸双氧铀、枸橼酸铅双层染色,置 JEM1400 型透射电镜下观察肺组织超微结构的变化。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 软件,计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间差异显著性检验采用单因素方差分析,多组间两两比较采用最小显著差数法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 全真一气汤对小鼠一般情况的影响 造模期间模型组小鼠死亡 3 只,高剂量组死亡 1 只,氨茶碱组死亡 2 只,其他组未见死亡情况。空白组小鼠活泼好动,皮毛柔顺有光泽,饮食摄水正常,营养良好,动作灵活,反应敏捷。模型组小鼠皮毛枯槁无光泽,撮毛,行动迟缓,呼吸急促,精神萎靡,进食进水量减少,体重较空白组明显减轻($P < 0.05$)。全真一气汤低、高剂量组体型偏瘦,活动较自如,皮毛欠润泽,气促不明显,活动、饮食尚可,稍有气促;体重较模型组增加,以高剂量组增加明显。与模型组比较,全真一气汤高剂量组在第 8 周开始体重明显增加,并一直持续到 16 周($P < 0.05$)。氨茶碱组小鼠形体消瘦,活动一般,皮毛欠润泽,精神萎靡,稍气促。见表 1。

表 1 全真一气汤对各组小鼠体重变化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	第 1 天	第 4 周	第 8 周	第 12 周	第 16 周
空白	-	15	24.8 ± 1.3	26.6 ± 1.0	31.2 ± 0.8	33.1 ± 0.8	33.6 ± 1.9
模型	-	12	24.3 ± 1.5	22.9 ± 1.4 ¹⁾	22.9 ± 1.3 ¹⁾	21.2 ± 1.9 ¹⁾	21.8 ± 1.6 ¹⁾
全真一气汤	4.3	15	24.9 ± 1.0	24.0 ± 1.0	24.0 ± 1.3	22.0 ± 1.9	22.3 ± 1.2
	8.6	14	24.0 ± 0.9	24.0 ± 1.0	24.8 ± 1.2 ²⁾	24.5 ± 1.0 ²⁾	25.3 ± 1.1 ²⁾
氨茶碱	2.3	13	24.1 ± 1.3	24.0 ± 1.0	23.1 ± 1.4	23.3 ± 1.9	23.4 ± 2.2

注:与空白比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.2 全真一气汤对小鼠肺功能的影响 模型组小鼠气道阻力(RI)较空白组明显增高($P < 0.05$),肺静态顺应性(Cchord)较空白组明显增大($P < 0.05$),功能残气量(FRC)较空白组有增高趋势。

各用药组 RI 较模型组明显降低($P < 0.05$);全真一气汤组较模型组肺静态顺应性有所减少;功能残气量有所减低。见表 2。

3.3 全真一气汤对小鼠肺组织 ERK, Nrf2, HO-1 蛋

表 2 全真一气汤对各组小鼠肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Quanzhen Yiqi Tang on lung function in each group of mice ($\bar{x} \pm s$)

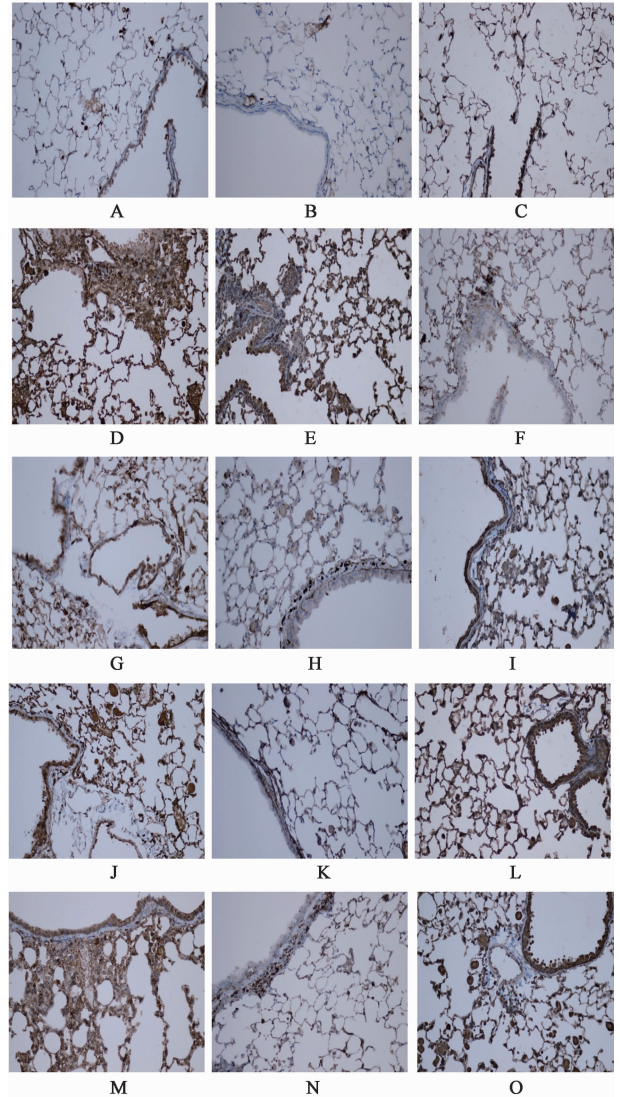
组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	RI/cm H ₂ O·mL ⁻¹ ·s ⁻¹	Cchord/cm H ₂ O·mL ⁻¹	FRC/mL
空白	-	15	0.610 ± 0.042	0.072 ± 0.009	0.318 ± 0.075
模型	-	12	0.735 ± 0.044 ¹⁾	0.084 ± 0.009 ¹⁾	0.359 ± 0.040
全真一气汤	4.3	15	0.634 ± 0.048 ²⁾	0.074 ± 0.018	0.348 ± 0.040
	8.6	14	0.634 ± 0.026 ²⁾	0.076 ± 0.008	0.354 ± 0.047
氨茶碱	2.3	13	0.641 ± 0.032 ²⁾	0.075 ± 0.013	0.354 ± 0.097

白表达的影响 空白组呼吸道及肺泡结构正常,肺泡结构完整,无代偿性肺气肿形成,肺泡腔未见炎症。模型组血管及支气管炎症细胞浸润,肺泡间隔增宽,部分肺泡壁断裂融合形成肺泡气肿,代偿性肺气肿形成。全真一气汤低、高剂量组肺泡结构完整,无代偿性肺气肿形成,肺泡腔少量炎症浸润。氨茶碱组肺泡结构基本完整,肺泡间隔增宽,无代偿性肺气肿形成,可见炎症细胞浸润。

空白组 ERK, Nrf2 检测基本未见棕黄色颗粒, ERK, Nrf2 蛋白仅少量表达;模型组可见大量棕黄色颗粒, ERK, Nrf2 蛋白表达明显增多;全真一气汤低、高剂量组 ERK, Nrf2 检测见少量棕黄色颗粒,与模型组比较 ERK, Nrf2 蛋白表达明显减少。氨茶碱组 ERK, Nrf2 蛋白表达与模型组比较有所减少,但比全真一气汤组多。空白组 HO-1 检测基本未见棕黄色颗粒, HO-1 蛋白仅少量表达;模型组 HO-1 检测见少量棕黄色颗粒, HO-1 少量蛋白表达;全真一气汤低剂量组和高剂量组 HO-1 检测见较多棕黄色颗粒,与模型组比较 HO-1 蛋白表达增多。氨茶碱组 HO-1 检测可见较多棕黄色颗粒, HO-1 蛋白表达增多。见图 1。

3.4 全真一气汤对小鼠肺泡灌洗液中炎性细胞计数总数及其 IL-6 和 KC 表达量的影响 模型组细胞计数总数较空白组明显增多 ($P < 0.05$)。全真一气汤水煎液低、高剂量组较模型组细胞计数总数明显降低 ($P < 0.05$)。氨茶碱组较模型组细胞计数总数稍有增多。模型组中 IL-6 和 KC 水平较正常组明显增高 ($P < 0.05$)。全真一气汤低、高剂量组较模型组 IL-6 和 KC 水平明显降低 ($P < 0.05$)。氨茶碱组较模型组 KC 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 全真一气汤对小鼠肺组织超微结构改变的影响 空白组 I 型肺泡细胞边缘完整,细胞质均匀,内含吞饮小泡,细胞器少,核膜完整,异染色质呈团块状分布于核膜下(A)。II 型肺泡细胞游离面可见少量微绒毛,细胞质内有较多的半层小体及线粒体,细胞核呈不规则形(B)。毛细血管内皮完整,基膜无增厚(C)。模型组 I 型肺泡细胞胞质可见散在小空



A ~ C. 空白组 (ERK, Nrf2, HO-1); D ~ F. 模型组 (ERK, Nrf2, HO-1); G ~ I. 全真一气汤低剂量组 (ERK, Nrf2, HO-1); J ~ L. 全真一气汤高剂量组 (ERK, Nrf2, HO-1); M ~ O. 氨茶碱组 (ERK, Nrf2, HO-1) (图 2 同)

图 1 全真一气汤对小鼠肺组织 ERK, Nrf2, HO-1 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Quanzhen Yiqi Tang on ERK, Nrf2, HO-1 protein expressions in each group of mice (IHC, ×400)

泡 (D); II 型肺泡细胞游离面微绒毛部分脱落,排列紊乱,部分板层体可见空泡化,线粒体肿胀,细胞核染色质分布不均匀(E);肺泡间薄层结缔组织、基膜

表 3 全真一气汤对小鼠细胞计数、IL-6 和 KC 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Quanzhen Yiqi Tang on cell counting, IL-6 and KC in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	细胞总数计数/×10 ⁴ 个·mL ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	KC/ng·L ⁻¹
空白	-	15 ± 0.8	7.411 ± 0.879	44.35 ± 0.595
模型	-	130 ± 23.7 ¹⁾	15.562 ± 2.560 ¹⁾	155.75 ± 9.438 ¹⁾
全真一气汤	4.3	46 ± 1.0 ²⁾	10.826 ± 1.017 ²⁾	54.397 ± 8.047 ²⁾
	8.6	56 ± 2.5 ²⁾	12.764 ± 1.055 ²⁾	69.86 ± 10.456 ²⁾
氨茶碱	2.3	135 ± 18.8	14.008 ± 1.860	73.347 ± 7.345 ²⁾

明显增厚(F)。全真一气汤低、高剂量组 I 型肺泡细胞边缘欠完整,细胞质分布欠均匀,可见小空泡(G,J); II 型肺泡细胞游离面微绒毛少量脱落,排列尚整齐,线粒体轻微肿胀,板层体少许空泡化;细胞核呈不规则形,染色质分布均匀(H,K);肺泡间薄层结缔组织、基膜轻微增厚(I,L)。氨茶碱组 I 型肺泡细胞分布不均匀,可见散在小空泡(M); II 型肺泡细胞游离面微绒毛少量脱落,排列不整齐,部分线粒体肿胀,部分板层体空泡化;细胞核呈不规则形,染色质分布不均匀(N);肺泡间薄层结缔组织、基膜增厚(O)。见图 2。

4 讨论

COPD 长期反复发作导致呼吸功能严重受损,生活质量下降。目前我国 40 岁以上患病率为 8.2%^[8],且其随年龄的增长患病率随之增长,超过 70 岁则患病率高达 20%^[9]。据世界卫生组织预计,到 2020 年 COPD 将占全世界疾病经济负担的第 5 位^[10],因此有必要选择有效的治疗手段降低 COPD 所带来的双重负担。

COPD 属于中医“咳嗽”、“肺胀”、“哮病”、“喘证”等范畴,属本虚标实之证,本虚主要为肺、脾、肾三脏之虚,早期多为肺气虚,继而累及脾肾,致肺、脾、肾俱虚;标实则痰、热、瘀交互错杂致病,病情迁延难愈,其稳定期又以肺脾肾虚衰为主^[11]。全真一气汤为清代名医冯兆张所创立,由熟地黄、麦冬、白术、人参、淡附片、牛膝、五味子组成^[12],诸药配伍,补中有泻,有大补真元、温肾健脾、补气利水之功,临床上广泛用于治疗各种老年虚损性疾病,如慢性心力衰竭、慢性阻塞性肺疾病、肺癌等辨证属气血阴阳俱虚者。

本实验模型组肺病理见肺毛细血管及支气管周围中性粒细胞、吞噬细胞浸润,肺泡间隔增宽,部分肺泡壁断裂融合形成肺泡气肿,代偿性肺气肿形成;肺功能显示模型组小鼠 RI 较空白组增高,说明气道不完全可逆狭窄;模型组较空白组 Cchord 增大,说明肺组织弹性下降;模型组较空白组 FRC 有所增

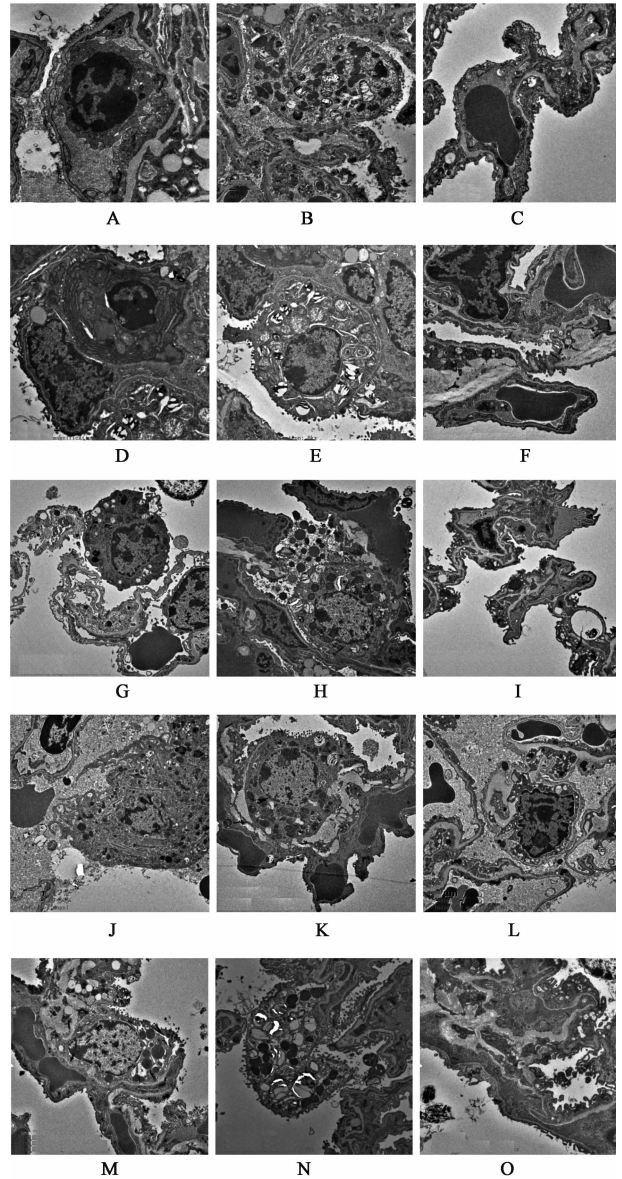


图 2 全真一气汤对小鼠肺组织超微结构的影响(电镜,×8 000)
Fig. 2 Effect of Quanzhen Yiqi Tang on lung ultrastructure of mice (TEM, ×8 000)

高,综合以上结果可判断造模成功。COPD 发病与气道和肺组织对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常慢性炎症有关,而炎症与氧化应激关系非常密切,炎症可以引起氧化应激,氧化应激也可引起炎症介质的表达^[13]。ERK 包括 ERK1 和 ERK2,是细胞

将信号从表面受体传导至细胞核的关键信号转导蛋白,炎症介质激活 ERK,活化 ERK 促进 Nrf2 核转位。Nrf2 是体内重要的内源性抗氧化应激通路,其缺失或激活障碍可引起细胞对应激源的敏感性增高,炎症修复过程延长^[14]。HO-1 是哺乳动物体内血红素代谢途径的关键酶和限速酶,在病理状态下可受多种与氧化应激和炎症相关的刺激物如炎症细胞因子、氧化剂、紫外线、重金属、热休克和 NO 诱导,为体内保护基因,高表达后具有抗氧化、抗炎作用,而且 HO-1 及其催化产物-胆绿素,胆红素,CO 均有显著的抗炎作用^[15]。

本课题组前期研究发现,全真一气汤多糖可增强免疫力,对正常小鼠及环磷酰胺免疫抑制小鼠的非特异性免疫功能有不同程度的增强作用,可提高环磷酰胺抑制的体液免疫功能,具有肠道黏膜免疫调节作用^[16-18]。自 2005 年开始本课题组采用全真一气汤治疗 COPD 及 COPD 急性加重期患者疗效显著,但其作用机制不清楚。细究处方,未见明显可以镇咳、祛痰、平喘之药,本课题组推测全真一气汤治疗 COPD 作用机制不在“咳、痰、喘”等表症缓解上,而是通过对体内某一信号通路调节,从而改善患者缺氧、慢性气道炎症、氧化失衡,缓解“咳、痰、喘”等状态。

本研究结果表明全真一气汤能增加小鼠体重,降低 COPD 模型小鼠气道阻力,降低肺静态顺应性和功能残气量;降低肺泡炎症细胞数、炎症介质 IL-6 和 KC 表达量,降低 ERK 和 Nrf2 蛋白表达量,上调 HO-1 蛋白表达,减轻肺组织超微结构损害,表明全真一气汤可改善 COPD 模型小鼠一般状态,减少炎症细胞因子表达,保护肺功能,减轻肺组织超微结构损害,能降低 ERK 和 Nrf2 蛋白表达量,上调 HO-1 蛋白表达而起到抗炎作用。本实验中全真一气汤低、高剂量组各项结果差别不大,可能是由于两者浓度差别太小导致。且本实验用免疫组化法检测了 ERK, Nrf2, HO-1 蛋白的表达,其具体的表达量尚未作进一步检测,有关的氧化应激指标也未检测,有待以后进一步研究。

[参考文献]

[1] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2015:2-27.
[2] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J].中国医学前沿杂志,2014,6(2):67-79.
[3] 张志敏.全真一气汤治疗慢性阻塞性肺气肿 78 例[J].江西中医药,2005,14(7):27-28.

[4] 朱汉平,张志敏,武如通,等.全真一气汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期 36 例[J].中国中医急症,2011,20(1):124-125.
[5] 李大治,阮诗玮,黄河清,等.全真一气汤对肾不纳气证慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺、肾、肾上腺及睾丸组织形态变化的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(8):2073-2075.
[6] 李大治,阮诗玮,黄河清.全真一气汤对肾不纳气证 COPD 模型大鼠血清 ADM 水平的影响影响[J].实用中医内科杂志,2012,26(1):10-11.
[7] 张科东,马冉,李征途,等.一种熏烟小鼠慢性阻塞性肺疾病模型的建立及鉴定[J].国际呼吸杂志,2012,32(21):1607-1611.
[8] Blanco I, Gimeno E, Munoz P A, et al. Hemodynamic and gas exchange effects of sildenafil in patients with chronic obstructive pulmonary disease and pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(3):270-278.
[9] 钟南山.慢性阻塞性肺疾病在中国[J].中国实用内科杂志,2011,31(5):321-322.
[10] Lopez A D, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections [J]. Eur Respir, 2006, 27(2):397-412.
[11] 刘炜,葛正行,李波.慢性阻塞性肺疾病患者中医体质分布特点及其与证候的关系研究[J].中国中药杂志,2013,38(20):3587-3590.
[12] 冯兆张.冯氏锦囊秘录[M].北京:中国中医药出版社,1996:526.
[13] Song C, Kelsen S G. The relationship between oxidative stress responses and lung inflammation with cigarette smoking [J]. Springer New York, 2013, 23(7):99-127.
[14] Sussan T E, Biswal S. Oxidative stress and respiratory diseases: the critical role of Nrf2 [J]. Springer New York, 2014, 17(2):335-348.
[15] Tang J, Li L, Li C M, et al. Upregulation of HO-1 with haemin alleviates LPS-stimulated pro-inflammatory responses through downregulation of p38 signalling pathways in rat liver [J]. Scand J Immunol, 2015, 82(5):399-407.
[16] 张志敏,任培华,陈康,等.全真一气汤总多糖对免疫抑制小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 的影响[J].中国中医急症,2011,20(11):1776-1816.
[17] 张志敏,陈康,张大鹏,等.全真一气汤总多糖对免疫抑制小鼠肠道 SIgA 的影响及其机制研究[J].时珍国医国药,2012,23(2):376-378.
[18] 赵雅,张大鹏,张志敏,等.全真一气汤复方多糖对免疫抑制小鼠体液免疫和细胞免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2015,33(2):302-304.

[责任编辑 张丰丰]