

清金化痰颗粒对 COPD 急性期(痰热郁肺型) 大鼠肺组织 STAT1, STAT3 的调控作用

许光兰^{1*}, 赵媚², 钟云青¹, 陈平¹, 李娇¹, 黄志健¹

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

[摘要] 目的:研究清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性期(痰热郁肺型)大鼠肺组织中信号转导与转录激活因子1,3(STAT1, STAT3)的调控作用。方法:采用烟熏+脂多糖(LPS)气管注射方法建立 COPD 痰热郁肺证大鼠模型(正常组除外),随机分为正常组,模型组,罗红霉素组(0.031 5 g·kg⁻¹),清金化痰颗粒低、高剂量组(9.4, 37.6 g·kg⁻¹),每组8只。每日 ig 给药1次,连续给药2周。观察各组大鼠的一般行为活动和病理学变化特点,采用大鼠肺功能检测仪测定各组大鼠相关肺功能指标:0.3 s 用力肺活量(FEV_{0.3}),用力肺活量(FVC),FEV_{0.3}/FVC,肺活量(VC),采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法测定肺组织白细胞介素-6(IL-6),STAT1 及 STAT3 mRNA 表达,免疫组化法检测肺组织 IL-6, STAT1 及 STAT3 蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组肺组织中 IL-6, STAT1 及 STAT3 mRNA 表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,罗红霉素组、清金化痰颗粒低、高剂量组均能显著降低大鼠肺组织 IL-6, STAT1 及 STAT3 mRNA 表达(P<0.01),罗红霉素组和清金化痰高剂量组减低更明显,二者之间无明显差异。各组大鼠肺组织中 IL-6, STAT1 及 STAT3 蛋白的表达中,与正常组比较,模型大鼠肺组织中的 IL-6, STAT1 及 STAT3 平均积分吸光度 IA 值显著升高(P<0.01);与正常组比较,模型组大鼠肺功能参数 FEV_{0.3}, FVC, FEV_{0.3}/FVC, VC 值均降低(P<0.01);与模型组比较,各给药组肺功能参数 FEV_{0.3}, FVC, VC 值均有升高(P<0.01, P<0.05);与模型组比较,罗红霉素组、清金化痰颗粒低、高剂量组能显著降低大鼠肺组织 IL-6, STAT1 及 STAT3 平均 IA 值(P<0.01),罗红霉素组和清金化痰颗粒高剂量组减低更明显,二者之间差异无统计学意义。结论:清金化痰颗粒可下调 JAK/STAT 信号通路中 STAT1, STAT3 的过度表达和持续活化,来抑制 IL-6 的水平升高,减轻气道炎症,抑制 COPD 急性发作与加重。

[关键词] 清金化痰颗粒;慢性阻塞性肺疾病;痰热郁肺;白细胞介素-6;信号转导与转录激活因子1(STAT1);STAT3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0091-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020091

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0921.022.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:21

Effect of Qingjin Huatan Granule on Regulation of STAT1, STAT3 in Rat Models with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Phlegm-Heat Stagnating in Lung)

XU Guang-lan^{1*}, ZHAO Mei², ZHONG Yun-qing¹, CHEN Ping¹, LI Jiao¹, HUANG Zhi-jian¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Qingjin Huatan granule (QJHTG) on regulation of transcriptional activator and signal transducer STAT1 and STAT3 in lung tissues of rat models with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (phlegm-heat stagnating in lung). **Method:** COPD rat models with phlegm-heat stagnating in lung were established by smoking and intratracheal injection of LPS

[收稿日期] 20151108(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81360534)

[通讯作者] *许光兰,教授,医师,从事中西医结合呼吸系统疾病的基础与临床研究, Tel:13877168028, E-mail: xgl9592@126.com

(except normal group). The rats were randomly divided into normal group, model group, roxithromycin (ROX) group ($0.0315 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), QJHTG low dose group and high dose group ($9.40, 37.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), $n = 8$ in each group. The medicines were given once a day by *ig* administration for 2 weeks. General activities and pathological change features were observed in all groups. The lung function indexes of rats were measured by using lung function tester: forced expiratory volume in 0.3 second ($\text{FEV}_{0.3}$), force vital capacity (FVC), $\text{FEV}_{0.3}/\text{FVC}$ and vital capacity (VC). The mRNA expression levels of interleukin-6 (IL-6), STAT1 and STAT3 in lung tissues were determined by Real-time PCR method and the protein expression levels of IL-6, STAT1 and STAT3 in lung tissues were determined by immunohistochemical method. **Result:** As compared with the normal group, the mRNA expression levels of IL-6, STAT1 and STAT3 in lung tissues of model group were significantly increased ($P < 0.01$). As compared with the model group, the mRNA expression levels of IL-6, STAT1 and STAT3 in lung tissues were significantly decreased in ROX group, QJHTG low and high dose groups ($P < 0.01$), and the decrease was more obvious in ROX group and QJHTG high dose group, with no significant difference between these two groups. The average optical density of IL-6, STAT1 and STAT3 protein expression in the model group was significantly higher than that in the normal group ($P < 0.01$); the pulmonary function parameters of rats in model group, including $\text{FEV}_{0.3}$, FVC, $\text{FEV}_{0.3}/\text{FVC}$ and VC were lower than those in normal group ($P < 0.01$). As compared with the model group, $\text{FEV}_{0.3}$, FVC, and VC values were increased in various treatment groups ($P < 0.01, P < 0.05$); the average optical density of IL-6, STAT1 and STAT3 was significantly decreased in ROX group, QJHTG low and high dose groups ($P < 0.01$), and the decrease was more obvious in ROX group and QJHTG high dose group, with no statistical differences between these two groups. **Conclusion:** QJHTG can inhibit the increase of IL-6, reduce airway inflammation, and inhibit COPD acute attack and exacerbation by down-regulating excessive expression and sustained activation of STAT1 and STAT3 in the JAK/STAT signaling pathway.

[Key words] Qingjin Huatan granule; chronic obstructive pulmonary disease; phlegm-heat stagnating in lung; interleukin-6; signal transducer and actuator of transcription 1 (STAT1); STAT3

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续气流受限为主要表现的肺部疾病,其特征性病理变化为慢性持续性气道炎症。COPD 的发病率及致死率逐年增加,患者经济负担严重超荷,预计到 2020 年 COPD 在全球死亡原因中将上升至第 3 位,同时经济负担跃居第 5 位^[1]。在中医学中 COPD 归属于“咳嗽”、“喘病”、“肺胀”等范畴。“痰”、“热”、“瘀”贯穿于 COPD 急性期整个病程,痰热郁肺证型是 COPD 急性期主要证型^[2]。既往研究证实,支气管上皮细胞 STAT1 的持续激活及过度表达可明显加重气道炎症反应^[3]。在肺泡上皮细胞中,信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 可被白细胞介素-6 (IL-6) 激活,导致 STAT3 持续活化和过度表达从而引起肺气道炎症及肺气肿的发生^[4]。细胞因子通过激活 JAK/STAT 途径中 STAT1, STAT3 目的基因的表达,参与多种炎症性疾病的发生发展,正日益受到人们的关注。但其在 COPD 中的表达研究尚少,临床上清金化痰汤加味治疗 COPD 急性期 (痰热郁肺型) 患者有较好的疗效,但对本方基础实验研究较少,清金化痰颗粒是

与清金化痰汤加味处方相当的配方而制成的颗粒剂型,因此,本文运用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 及免疫组化法测定 COPD 大鼠肺组织中 IL-6, STAT1 及 STAT3 的表达水平,探讨清金化痰颗粒干预 COPD 急性期 (痰热郁肺型) 大鼠后肺组织中炎症因子 IL-6 与 STAT1 及 STAT3 之间的关系,尝试从分子水平上揭示 COPD 发病机制,为中医药防治 COPD 气道炎症提供丰富的科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180 ~ 220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物合格证号 SCXK(湘)2011-0003。

1.2 药物及试剂 清金化痰颗粒由黄芩 15 g, 栀子 15 g, 桔梗 15 g, 麦门冬 (去心) 10 g, 贝母 10 g, 橘红 15 g, 茯苓 10 g, 桑皮 12 g, 知母 12 g, 瓜蒌仁 (炒) 15 g, 甘草 10 g, 赤芍 10 g, 丹参 15 g, 川芎 15 g 组成,采用免煎颗粒剂由江西天江药业有限公司生产,广西中医药大学第一附属医院药剂科提供,各药物按照按以上比例配制,蒸馏水溶解,最终调至生药量 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。罗红霉素胶囊 (江苏扬子江药业集团有

限公司生产,批号 H10970291),脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 L2880),真龙牌香烟(南宁卷烟厂,焦油含量 8 mg/支,尼古丁含量 0.8 mg/支),Revert Aid First Stand cDNA Synthesis 试剂盒(宝生物工程有限公司,批号 K4302);SYBR Premix EX Taq™ II, STAT1, STAT3 及 IL-6 一抗,通用型二抗, DAB(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 AK6042, BS4178, BS4180, BS6419, 12167A06, 12196A11)。

1.3 仪器 AniRes 2005 型动物肺功能检测分析仪(北京贝兰博公司),220 型多通道 PCR 扩增仪(美国 MJ 公司),Gel Doc 200 型凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司),DMR + Q550 型病理图像分析仪(德国 Leica 公司),5810R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf Centrifuge 公司),LAMB DA BIO 20 型双光束紫外分光光度计(美国 PE 公司)。

2 方法

2.1 COPD 痰热郁肺证模型复制 大鼠适应性 Real-time PCR 方法喂养 1 周后采用宋一平等^[5]方法并改良建立 COPD 模型。

2.1.1 AECOPD 大鼠模型的建立 大鼠第 1 天,第 14 天,将 LPS 按质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 配制,先采用 4% 戊巴比妥钠($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉大鼠,然后将麻醉后的大鼠固定在鼠板上,予细绳圈套固定大鼠门牙,颈部备皮消毒后,行颈部正中切口,切开皮肤约 1.5 cm,逐层剥离组织,直至暴露气管,抬高头部鼠板使其与桌面成 45 度,采用 1 mL 无死腔连体注射器穿刺气管,经气管注入 LPS($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 200 μL ,注射后由助手立即将动物直立并轻轻晃动约 2 min 使药液均匀分布于双肺,然后缝合颈部皮肤,局部消毒,整个手术过程严格执行无菌操作。第 2~30 天(第 14 天除外)将大鼠置入 50 cm × 40 cm × 40 cm 玻璃熏烟染毒箱内,置锯末适量加 20 支香烟烟丝混合点燃烟熏,每天上、下午各 30 min,每周休息 2 d。

2.1.2 痰热阻肺证模型的建立 实验第 26 天气管加滴 LPS 1 次,COPD 模型成功标准依据组织形态学改变及生物学体征变化。

2.2 分组及给药 造模 28 d 后将大鼠随机分为正常组,模型组,罗红霉素组(西药组),清金化痰颗粒低剂量组,清金化痰颗粒高剂量组,每组 8 只。各组给药剂量为罗红霉素胶囊按 $0.0315 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$,清金化痰颗粒低、高剂量分别按 9.4,37.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$,正常组、模型组 ig 等体积生理盐水,每天 ig 给药 1 次,连续给药 2 周。

2.3 观察指标

2.3.1 一般情况及生命体征观察 每天观察大鼠的皮毛的光泽、进食、精神、活动、大小便、死亡等情况,同时观察大鼠呼吸是否快慢,节律是否整齐,咳嗽、气喘及痰鸣音等是否加重,呼吸道分泌物颜色变化等体征。

2.3.2 大鼠体重变化情况 每 2 周测量 1 次各组大鼠的体重,并记录相关数据。

2.3.3 大鼠肺功能检测 采用大鼠肺功能检测仪测定各组大鼠相关肺功能指标,包括 0.3 s 用力肺活量($\text{FEV}_{0.3}$),用力肺活量(FVC), $\text{FEV}_{0.3}/\text{FVC}$,肺活量(VC)。

2.3.4 大鼠肺组织形态学观察 末次用药 1 d 后,取大鼠右肺组织经 4% 甲醛固定,将肺组织进行常规石蜡包埋、切片;然后切片进行二甲苯脱蜡、乙醇脱水、苏木素-伊红(HE)染色、中性树胶封片,光镜观察支气管与肺组织形态学变化并摄片。

2.3.5 Real-time PCR 方法测定肺组织 IL-6, STAT1 及 STAT3 mRNA 表达 称取肺组织 50 mg 按照说明书提取 RNA,利用紫外可见分光光度计对 RNA 定性及定量分析,按照 RT-PCR 试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA,SYBR Green Real-time PCR 法检测肺组织 IL-6, STAT1 及 STAT3 mRNA 表达。引物设计如下, STAT1 上游 5'-AGACCACCTCTCTTCCTGTCGT-3',下游 5'-AAACTGCCAACTCAACACCTCT-3'; STAT3 上游 5'-GAGGAGGCATTCGGAAG-3',下游 5'-TCGTTGTTGTCACACAGAT-3'; IL-6 上游 5'-GAGGATACCACTCCCAACAGCC-3',下游 5'-AAGTGCATCATCGTTGTCATACA-3'; GAPDH 上游 5'-GTGTTCTACCCCAATGT-3',下游 5'-TGTCATCTTGGCAGGTTTCT-3'。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,共 40 个循环。提取循环结束后的 ΔC_t 值,然后利用 Excel 表格进行相关数据分析。

2.3.6 肺组织中 IL-6, STAT1 及 STAT3 蛋白表达的检测及结果判定 采集标本后立即使用 4% 甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度为 5 μm ,然后进行 SP 法免疫组化染色,具体步骤参照说明书。阳性染色为棕黄色,特异性主要集中于胞浆和胞质。采用病理图像分析仪对切片进行拍照,在相同视野下对每张切片随机选取 5 个高倍镜视野,然后利用 Image Proplus 6.0 软件测定每个视野下平均积分吸光度 IA,以每片 5 个视野的平均 IA 值作为该片测量值。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件分析, 计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对所有数据做正态性分布检验, 两样本间均数比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 COPD 大鼠生物学特性及体重变化的影响 模型大鼠逐渐出现急躁易怒, 多动, 毛暗淡无光泽, 发黄, 脱毛, 食量减少, 大便质硬; 呼吸急促, 节

律不齐, 可闻及咳嗽、气喘及痰鸣音, 呼吸道有分泌物浓稠色黄, 上述情况随着造模时间的延长逐渐加重, 罗红霉素组、清金化痰颗粒高剂量组及低剂量组症状较模型组明显减轻; 从第 3 周起, 与正常组比较, 模型组大鼠体重增明显降低, 各给药组大鼠体重也明显降低 ($P < 0.01$), 第 7 周与模型组比较, 各给药组大鼠体重明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠体重变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	第 1 周	第 3 周	第 5 周	第 7 周
正常	-	211 \pm 7.54	260 \pm 4.71	285 \pm 3.66	308 \pm 5.93
模型	-	210 \pm 6.41	227 \pm 3.76 ¹⁾	234 \pm 5.26 ¹⁾	248 \pm 3.69 ¹⁾
罗红霉素	0.031 5	210 \pm 6.53	228 \pm 5.77 ¹⁾	234 \pm 4.43 ¹⁾	262 \pm 4.33 ^{1,2)}
清金化痰颗粒	9.4	208 \pm 7.08	232 \pm 6.94 ¹⁾	235 \pm 5.22 ¹⁾	256 \pm 5.50 ^{1,2)}
	37.6	210 \pm 6.54	225 \pm 5.54 ¹⁾	236 \pm 5.01 ¹⁾	258 \pm 4.94 ^{1,2)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对 COPD 大鼠肺功能的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肺功能参数 $FEV_{0.3}$, FVC, $FEV_{0.3}/FVC$, VC 均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组肺功能参数 $FEV_{0.3}$, FVC, VC 均有升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与罗红霉素组比较, 清金化痰颗粒低剂

量组 $FEV_{0.3}$, FVC, VC 均降低 ($P < 0.01$); 与清金化痰颗粒低剂量组比较, 清金化痰颗粒高剂量组肺功能参数 $FEV_{0.3}$, FVC, VC 均有升高 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 各组大鼠肺脏组织病理学观察 正常组大鼠

表 2 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	$FEV_{0.3}/mL$	FVC/mL	$FEV_{0.3}/FVC/\%$	VC/mL
正常	-	5.15 \pm 0.35	5.77 \pm 0.20	89.18 \pm 5.15	2.91 \pm 0.41
模型	-	3.15 \pm 0.13 ¹⁾	3.90 \pm 0.09 ¹⁾	80.92 \pm 3.13 ¹⁾	1.81 \pm 0.11 ¹⁾
罗红霉素	0.031 5	4.35 \pm 0.22 ³⁾	5.08 \pm 0.31 ³⁾	85.59 \pm 2.48 ³⁾	2.51 \pm 0.67 ³⁾
清金化痰颗粒	9.4	3.82 \pm 0.07 ^{3,4)}	4.60 \pm 0.30 ^{3,4)}	82.71 \pm 3.15	2.24 \pm 0.08 ^{3,4)}
	37.6	4.33 \pm 0.15 ^{3,6)}	5.13 \pm 0.15 ^{3,6)}	84.32 \pm 2.74 ²⁾	2.54 \pm 0.06 ^{3,6)}

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与罗红霉素组比较⁴⁾ $P < 0.01$; 与清金化痰颗粒低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

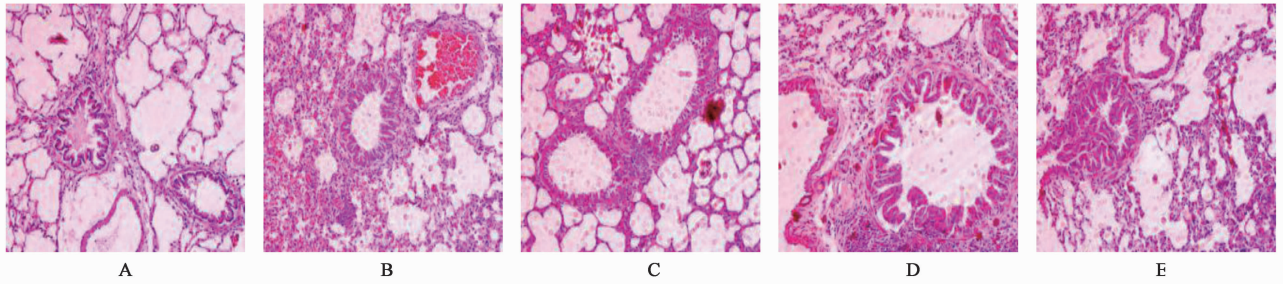
肺脏可见少许炎性细胞浸润, 支气管壁基本完整, 黏膜未见充血水肿, 肺泡未见明显破坏扩大。模型组大鼠肺组织可见支气管壁增厚, 周围有大量炎症细胞浸润, 肺泡壁变薄断裂, 肺大泡形成。罗红霉素组、清金化痰颗粒高、低剂量组大鼠肺组织病理表现明显改善, 支气管壁变薄、充血水肿减轻, 炎症细胞浸润减少, 且肺泡腔破坏扩大有所减轻。表明清金化痰颗粒加味方可以改善 COPD 大鼠气道炎症反

应情况。见图 1。

3.4 对 COPD 大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 大鼠肺组织中的 IL-6, STAT1, STAT3 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 罗红霉素组、清金化痰颗粒低、高剂量组均能显著降低大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 与罗红霉素组比较, 清金化痰颗粒低剂量组 IL-6, STAT1, STAT3

mRNA 表达具有显著差异性 ($P < 0.01$); 与清金化痰颗粒低剂量组比较, 清金化痰颗粒高剂量组 IL-6,

STAT1, STAT3 mRNA 表达具有差异性 ($P < 0.05$)。见表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C. 罗红霉素 $0.0315 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 清金化痰颗粒 $9.40 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 清金化痰颗粒 $37.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组 (图 2~4 同)
图 1 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺组织病理形态学变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of QJHTG on pathological morphology of lung tissue in rat model with COPD (HE, $\times 200$)

表 3 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of QJHTG on STAT1, STAT3 and IL-6 mRNA expressions in lung tissue of rat model with COPD ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-6	STAT1	STAT3
正常	-	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.33 ± 0.02
模型	-	$2.32 \pm 0.13^{1)}$	$1.49 \pm 0.17^{1)}$	$1.35 \pm 0.28^{1)}$
罗红霉素	0.0315	$0.52 \pm 0.03^{3)}$	$0.56 \pm 0.03^{3)}$	$0.43 \pm 0.02^{3)}$
清金化痰颗粒	9.4	$0.59 \pm 0.04^{3,4)}$	$0.66 \pm 0.04^{3,4)}$	$0.46 \pm 0.02^{3,4)}$
	37.6	$0.54 \pm 0.04^{3,5)}$	$0.60 \pm 0.04^{3,5)}$	$0.44 \pm 0.01^{3,5)}$

3.5 对 COPD 大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白表达的影响 与正常组比较, 大鼠肺组织中的 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 罗红霉素组、清金化痰颗粒低、高剂量组均能明显降低大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白表达 ($P < 0.01$); 与罗红霉素组比较, 清金化

痰颗粒低剂量组 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白具有显著差异性 ($P < 0.01$), 清金化痰颗粒高剂量组 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白无显著差异; 与清金化痰颗粒低剂量组比较, 清金化痰颗粒高剂量组 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白具有差异性 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 2~4。

表 4 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺组织 IL-6, STAT1, STAT3 蛋白 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of QJHTG on average optical density of STAT1, STAT3 and IL-6 protein IA expression in lung tissue of rat model with COPD ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-6	STAT1	STAT3
正常	-	0.13 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.04
模型	-	$0.68 \pm 0.07^{1)}$	$0.49 \pm 0.01^{1)}$	$0.83 \pm 0.09^{1)}$
罗红霉素	0.0315	$0.31 \pm 0.01^{3)}$	$0.24 \pm 0.03^{3)}$	$0.20 \pm 0.01^{3)}$
清金化痰颗粒	9.4	$0.35 \pm 0.02^{3,4)}$	$0.28 \pm 0.02^{3,4)}$	$0.24 \pm 0.02^{3,4)}$
	37.6	$0.32 \pm 0.02^{3,5)}$	$0.25 \pm 0.02^{3,5)}$	$0.21 \pm 0.02^{3,5)}$

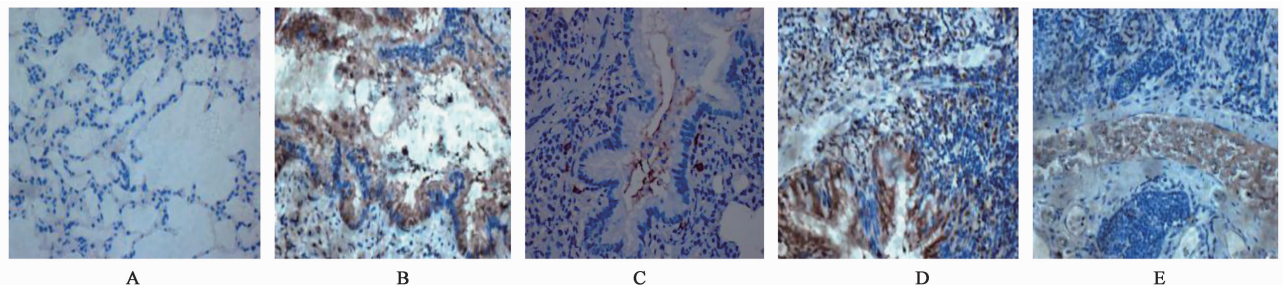


图 2 清金化痰颗粒对 COPD (痰热郁肺型) 大鼠肺组织 IL-6 表达的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of QJHTG on expression of IL-6 in lung tissue of rat model with COPD (IHC, $\times 400$)

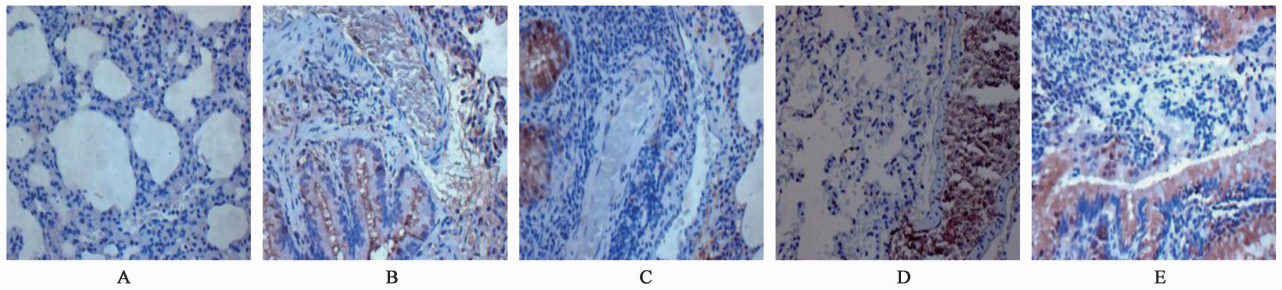


图 3 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺组织 STAT1 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of QJHTG on expression of STAT1 in lung tissue of rat model with COPD(IHC, ×400)

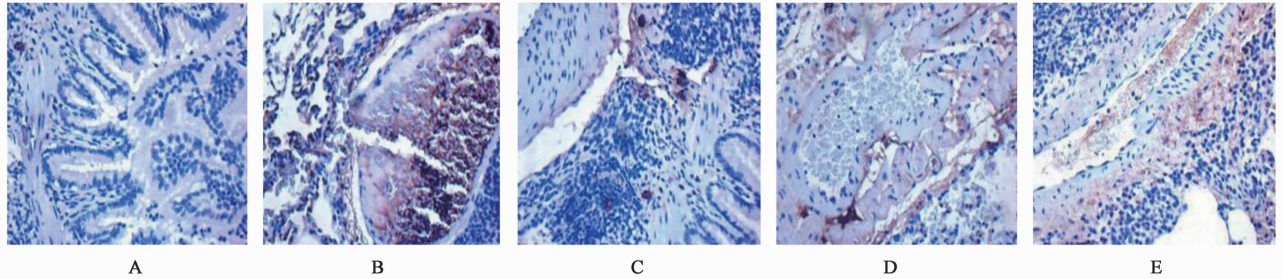


图 4 清金化痰颗粒对 COPD 大鼠肺组织 STAT3 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of QJHTG on expression of STAT3 in lung tissue of rat model with COPD(IHC, ×400)

4 讨论

COPD 是临床上常见的呼吸系统疾病之一,严重影响着患者的生活质量及生命安全,其重要的病理特征是持续的气道炎症反应。炎症因子在 COPD 发生发展中占据主导地位,其中 IL-6 作为 COPD 气道炎症中的复杂的炎症细胞-细胞因子网络中的重要的促炎因子,它通过加速 T, B 细胞成熟,可促进和加速局部炎症的发生与发展。已有研究表明, COPD 患者痰液、肺实质和血液中都存在 IL-6 不同程度的升高^[6-7]。气道上皮细胞中 STAT1 及 STAT3 持续激活及过度表达与气道炎症密切相关^[8],其广泛参与介导炎性细胞因子的表达与调控。有研究发现 LPS 刺激后, STAT1, STAT3 酪氨酸磷酸化, JAK/STAT 通路被激活,促进 IL-6 的生成,抑制 STAT3 生成后,能够导致 LPS 诱导的 IL-6 的基因及蛋白量的表达显著减少^[9]。

“痰”、“热”、“瘀”是 COPD 急性期中医发展的重要要素,是“痰、热”之邪发展到一定程度的产物,清金化痰颗粒具有“清热化痰,活血化瘀”的功效。清金化痰颗粒各组成药均有杀菌或抗炎等作用。其中经研究证实,黄芩、栀子、知母、桑白皮等中药具有一定的抑杀细菌或抗内毒素的作用,能增强抗生素的疗效;具有改善肺组织的功能,促进免疫细胞的吞噬作用;有增加气管、支气管上皮纤毛摆动,扩张支气管平滑肌,缓解其痉挛之功。也有实验表

明^[10],丹参注射液可以抑制 BALF 中 IL-6 的升高,使气道炎症细胞聚集,趋化减轻,可以减少 BALF 中白细胞总数,中性粒细胞绝对数与百分比,起到积极防治气道炎症、减轻 COPD 大鼠模型肺组织形态学损伤的作用。赤芍、川芎具有降低继发性肺动脉高压,升高血氧分压,降低二氧化碳分压,减少炎症因子形成等作用^[11-12]。

本实验采取烟熏 + LPS 联合经典制备了 COPD 急性期(痰热郁肺)模型大鼠,证实 STAT1, STAT3 及 IL-6 mRNA 和蛋白显著高表达,这与有关文献报道相一致^[2, 13],表明 COPD 的发生发展与肺组织中 STAT1 及 STAT3 持续活化与过度表达及其信号转导途径异常密切相关,且 STAT1, STAT3 活化水平与 IL-6 表达呈正相关。罗红霉素组、清金化痰颗粒高、低剂量组都能减低肺组织 STAT1, STAT3 及 IL-6 mRNA 和蛋白表达。通过对罗红霉素组、清金化痰颗粒高、低剂量组各组的比较,罗红霉素组与清金化痰颗粒高剂量组效果相当,罗红霉素组与清金化痰颗粒高剂量组效果都高于清金化痰颗粒低剂量组。表明清金化痰颗粒能减轻气道炎症,抑制及预防 COPD 急性期的发生发展。

综上所述, COPD 的发生发展与肺组织中 STAT1 及 STAT3 持续活化与过度表达及其信号转导途径异常密切相关,且 STAT1, STAT3 活化水平与 IL-6 表达呈正相关。本实验验证了清金化痰颗粒可

下调 JAK/STAT 信号通路中 STAT1, STAT3 的过度表达和持续活化,来抑制 IL-6 的水平的升高,减轻气道炎症,抑制 COPD 急性发作与加重。另外,对有 STAT1 及 STAT3 过度活化 COPD 患者的治疗来说, STAT1, STAT3 可以作为主要的靶点,对中医药干预后 STAT1 和 STAT3 进一步的研究将为 COPD 急性加重期的中医药治疗提供基础支撑。

[参考文献]

[1] Bustacchini S, Chiatti C, Furneri G, et al. The economic burden of chronic obstructive pulmonary disease in the elderly: results from a systematic review of the literature [J]. *Curropin Pulm Med*, 2011, 17(4): 35-41.

[2] 许光兰,李娇,韦艾凌.慢性阻塞性肺疾病中医证型相关文献统计分析[J].*山东中医杂志*, 2012, 31(1): 11-12.

[3] 熊瑛,李国平,扬礼腾,等.白介素5与转录激活因子和信号转导子1表达水平及其信号转导对支气管哮喘豚鼠气道炎症影响的研究[J].*中华哮喘杂志*, 2008, 2(1):41-45.

[4] Quinton L J, Jones M R, Robson B E, et al. Alveolar epithelial STAT3, IL-6 family cytokines, and host defense during *Escherichia coli* pneumonia [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(6): 699-706.

[5] 宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J].*中华内科杂志*, 2000, 39(8): 556-559.

[6] 李雯,徐永健,魏华平.白介素-4和白介素-6在慢性

阻塞性肺病肺组织中的表达[J].*中国组织化学与细胞化学杂志*, 2001, 10(4): 425-428.

[7] 何智辉,陈平,伍国宝,等.白细胞介素6在慢性阻塞性肺病患者痰和血清中的浓度变化[J].*中国现代医学杂志*, 2005, 15(2): 1768-1770.

[8] GONG J H, Shin D, HAN S Y, et al. Blockade of airway inflammation by kaempferol via disturbing Tyk-STAT signaling in airway epithelial cells and in asthmatic mice [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/250725.

[9] Samavati L, Rastogi R, DU W, et al. STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(8): 1867-1877.

[10] 岳圆圆,李永春.丹参对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道保护作用的实验研究[J].*临床合理用药*, 2011, 10(32): 15-17.

[11] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等.赤芍药理作用的研究进展[J].*药物评价研究*, 2010, 33(3): 233-236.

[12] 张翠英,章洪,戚琼华.川芎的有效成分及药理研究进展[J].*辽宁中医杂志*, 2014, 41(10): 2264-2265.

[13] 张桂菊,卢立伟,吴金勇,等.加味茵陈蒿汤对湿热哮喘大鼠气道白细胞介素-6、信号转导因子-3 表达的影响及与气道炎症的关系[J].*中国实验方剂学杂志*, 2014, 21(15): 133-137.

[责任编辑 周冰冰]