

· 二陈汤加味治疗 COPD 专题 ·

[专题介绍] 随着社会老龄化的加速和大气污染的加重,阻塞性肺疾病(COPD)的发病率、复发率逐年增高。COPD 的发病机制复杂,探索对 COPD 有效的药物及方法,具有重要的社会意义和临床价值。二陈汤源于宋代《太平惠民和剂局方》,具有燥湿化痰,理气和中等功效。本研究团队由教授、副教授、讲师和研究生组成,基于二陈汤加减,对二陈汤加味治疗 COPD 进行连续近 20 年的文献、临床与实验研究,受国家自然科学基金项目、河南省重点科技攻关项目、河南省高等学校重点科研项目、河南省中医管理局中医专项、郑州市科技领军人才项目、河南中医药大学大学生创新项目等资助,依托于河南中医药大学医学分子生物中心实验室和中医内科重点开放实验室,分析测试中心、电镜室、基础医学院科研实验中心等科研实验室,拥有该研究所需的主要仪器和设备。研究发现二陈汤加味对 COPD 患者和实验动物有抗氧化损伤、抗炎作用,并具有保护肺组织、改善肺功能作用。实验研究进一步证实,二陈汤加味治疗 COPD 抗炎、抑制细支气管及肺组织结构重塑的分子机制。本研究成果省级鉴定 6 项、科研获奖 5 项、发明专利 2 项、已公开发表论文 15 篇,后续研究结果,将陆续报道。

二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠信号转导蛋白 Smad3,4,6,7 基因表达的影响

尚立芝¹, 季书¹, 刘坦¹, 张静¹, 谢文英^{1*}, 薛红莉², 刘志勇³, 赵献敏¹,
刘晓蕙¹, 孙春阳¹, 卢长青³, 梁娟娟¹, 张淼¹, 王祎¹, 陈婷婷¹

(1. 河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046; 2. 河南医学高等专科学校, 郑州 451191;
3. 河南中医药大学第二附属医院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**观察二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织中信号转导蛋白 Smads 的影响,探讨二陈汤加味对 COPD 作用的机制。**方法:**将 50 只 SD 大鼠随机分 5 组,每组 10 只动物,包括正常组、模型组、二陈汤加味低、中、高剂量(5,10,20 g·kg⁻¹·d⁻¹)组。以烟熏加气管滴注脂多糖(LPS)的方法制备 COPD 大鼠模型。建模后,治疗组灌胃给药,正常组及模型组灌胃等量生理盐水。评价肺功能,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肺组织中 Smad3, Smad4, Smad6 和 Smad7 mRNA 表达,免疫组织化学检测大鼠肺组织中 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组用力肺活量(forced vital capacity, FVC),第 1 秒末时间肺活量(FEV₁)和 FEV₁/FVC 均显著降低($P < 0.01$);模型组肺组织 Smad3 和 Smad4 mRNA 的表达量升高($P < 0.05$),Smad6 和 Smad7 mRNA 表达均降低($P < 0.05$);Smad3 和 Smad4 蛋白的表达显著增强($P < 0.01$),Smad6 和 Smad7 蛋白的表达显著减弱($P < 0.01$)。与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组 FVC, FEV₁ 和 FEV₁/FVC 均显著提高($P < 0.01$);Smad3 和 Smad4 mRNA 的表达量均下降($P < 0.05$),Smad6 和 Smad7 mRNA 的表达量升高($P < 0.05$);Smad3, Smad4 蛋白的表达显著减弱($P < 0.01$),Smad6, Smad7 蛋白的表达显著增强($P < 0.01$)。**结论:**二陈汤加味能有效抑制细支气管结构重塑作用。其机制可能是通过降低 Smad3,提高 Smad6 和 Smad7,协调 Smad4 基因表达,抑制细支气管及肺组织结构重塑。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 二陈汤加味; 信号转导; Smads

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0139-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100139

[收稿日期] 20160826(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573881);郑州市科技领军人才项目(121PLJRC535);河南省高等学校重点科研项目(15A360030);河南省科重点技攻关项目(152102310337);河南省中医药科学研究专项课题(2013ZY02070);河南中医学院大学生创新学习项目(CXXM[2016]0019,CXXM[2016]0041)

[第一作者] 尚立芝, 硕士, 教授, 从事中医药作用机制研究, Tel:0371-65835119, E-mail:lzshang2014@163.com

[通讯作者] * 谢文英, 硕士, 教授, 从事中医药治疗肺系疾病的临床研究, Tel:0371-65835119, E-mail:xiewenyi1963@163.com

Mechanism of Modified Erchentang on Expression of Smad 3, 4, 6, 7 Genes in Lung Tissue of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

SHANG Li-zhi¹, JI Shu¹, LIU Tan¹, ZHANG Jing¹, XIE Wen-ying^{1*}, XUE Hong-li², LIU Zhi-yong³, ZHAO Xian-min¹, LIU Xiao-hui¹, SUN Chun-yang¹, LU Chang-qing³, LIANG Juan-juan¹, ZHANG Miao¹, WANG Yi¹, CHEN Ting-ting¹
(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of modified Erchentang on expression of Smad3, 4, 6, 7 genes in the lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** Fifty SD rats were randomly divided into normal group, model group, and low, middle and high-dose modified Erchentang groups (5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹). COPD model in rats was prepared by using cigarette smoke and dripping lipopolysaccharide (LPS) in trachea. After the modeling, normal and model groups were given normal saline solution through intragastric administration, while other groups were given corresponding herbal drugs intragastrically (5, 10, 20 g·kg⁻¹·d⁻¹) for 14 days. The pulmonary function was evaluated [forced vital capacity (FVC), at the end of the first seconds forced expiratory volume (FEV₁)]. The expressions of Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 mRNA were detected by quantitative real time PCR (Real-time PCR) method, and immunohistochemistry (IHC) method was used to detect the expression of Smad3, Smad4, Smad6, Smad7, TGF-β₁ and it's receptor (TGF-beta RI) protein in the lung tissue of all of the groups. **Result:** Compared with normal group, FVC, FEV₁ and FEV₁/FVC of the model group were decreased significantly ($P < 0.01$); the expression of Smad3 and Smad4 mRNA and was increased ($P < 0.05$), the expression of Smad4 and Smad3 protein was increased significantly ($P < 0.01$), the expression of Smad6 and Smad7 mRNA was decreased ($P < 0.05$), the expression of Smad7 and Smad6 protein was decreased significantly ($P < 0.01$) in model group. Compared with model group, FVC, FEV₁ and FEV₁/FVC index were increased significantly ($P < 0.01$), the expression of Smad3 and Smad4 mRNA was decreased ($P < 0.05$), the expression of Smad3 and Smad4 protein was decreased significantly ($P < 0.01$), but the expression of Smad6 and Smad7 mRNA was increased ($P < 0.05$), Smad6 and Smad7 protein was increased significantly ($P < 0.01$), in modified Erchentang of 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ and 20 g·kg⁻¹·d⁻¹ groups. **Conclusion:** Modified Erchentang can effectively inhibit bronchial remodeling, and improve pulmonary ventilation of COPD. Its mechanism may be correlated with reduction of Smad3 gene expression, increase of the expression of Smad6 and Smad7 genes, coordination of Smad4 gene expression and inhibition of the expression of bronchioles and pulmonary tissue remodeling.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); modified Erchentang; signal transduction; Smads

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以气流受限为特征的慢性呼吸系统的炎症性疾病^[1-3]。COPD 气道和肺部的炎症、损伤/修复失衡, 可通过 Smads 信号转导调控导致气道重塑^[4-7], 即细胞外基质的合成/降解失衡, 气道壁胶原沉积、管腔狭窄、呼气阻力增加, 形成肺气肿^[8-10]; 后期并发肺动脉高压及肺源性右心衰竭, 严重影响患者的生存质量^[11-14]。故采取有效抗炎、阻止 COPD 气道重塑及并发症的治疗, 具有重要的临床意义。近年中医药在调整 COPD 气道重塑方面优势明显^[15-16]。本课题组基于 COPD 气道重塑机

制, 选用宋代《太平惠民和剂局方》中具有燥湿化痰, 理气和中功效的二陈汤加减方药, 前期观察效果显著^[17-18], 但其作用机制不清。本研究采用烟熏加脂多糖方法制备 COPD 大鼠模型, 观察二陈汤加味对 COPD 大鼠信号转导蛋白 Smad3, 4, 6, 7 基因表达的影响, 探讨二陈汤加味对 COPD 气道重塑的作用及其分子机制, 为探寻治疗 COPD 的新药提供新的治疗靶点与思路。

1 材料

1.1 动物 50 只 6 月龄 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体重 230 ~ 270 g, 由河南省动物实验中心提供, 动物实

验许可证号 SYXY(豫)2010-0001。本研究所涉及的动物相关操作均在河南中医药大学动物伦理委员会的批准下进行(批准号 DWLL20130018)。

1.2 药物及试剂 二陈汤加味方药组成:半夏(姜) 10 g(批号 1303001S), 陈皮 10 g(批号 1302001H), 麻黄(蜜) 6 g(批号 1409001S), 苦杏仁 10 g(批号 1304002S), 葶苈子 10 g(批号 1308001S), 党参 10 g(批号 1407007W), 白术 10 g(批号 1407001W), 地龙 10 g(批号 1103001S), 茯苓 10 g(批号 1405002W), 山药 10 g(批号 1210007H), 甘草 5 g(批号 1302001S), 干姜 5 g(批号 1303001H)等均为中药配方颗粒,由华润三九医药生产。饲料由郑州大学河南省动物实验中心提供,合格证号 SCXK(豫)2010-0002。脂多糖(LPS,北京索莱宝科技有限公司,批号 701C036);总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、染料法实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂、引物序列合成(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为 086001, 119041, 112141, D12540);兔抗大鼠 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 一抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 12CM464, 12CM471, Y-B2-07K06A, 12F81)。其他实验试剂由河南中医药大学科研实验中心提供。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

基因名称	引物序列	引物长度 /bp
Smad3	上游 5'-AGACACCAGTGTCTACCTCCA-3'	108
	下游 5'-CCAGCGGGGAAGTTAGTGT-3'	
Smad4	上游 5'-AGAGAGCAAGTTGCACATAG-3'	289
	下游 5'-CGGGTAGATCTTGTGGACGG-3'	
Smad6	上游 5'-AAGCCACTGGATCTGTCCGA-3'	195
	下游 5'-ATTCACCCGGAGCAGTGATG-3'	
Smad7	上游 5'-GGGGCTTTCAGATCCCAAC-3'	176
	下游 5'-GCCATCCACTTCCCTTGTC-3'	
GAPGH	上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	223
	下游 5'-TTGAGGCTGCAGCGAACTT-3'	

1.3 仪器 MAX II 型非束缚小动物肺功能测量仪(美国 BUXCO 公司);DHP-9050B 型电热恒温培养箱(上海琅轩实验设备有限公司);iofuge startos 型多用途 4 ℃ 离心机(美国电热);PT2100 型匀浆机(Hartono Istanan Teknologi 公司);CX21FS1 型普通光学显微镜及 BX51 + CCD + 照相装置病理图像分

析系统(日本 Olympus 公司);Image-Pro Plus 6.0 (IPP)显微镜图像分析软件,272007028 型 Real-time PCR 仪(美国爱普拜斯 Applied Biosystem 公司);BS210S 型电子天平(德国 Sartorius 公司);Pico 17 型高速离心机,BioMate 3S 型紫外-可见分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司);TP1020-1 型自动组织脱水处理机,EG1150C 型冷台,ST5020 型全自动染色机(徕卡显微系统上海有限公司)。

2 方法

2.1 分组、模型制备与给药 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为正常组、模型组、二陈汤加味高、中、低剂量组。参照文献[19-20]制备“肺气虚证”型 COPD 大鼠模型,除正常组外,其余各组均于第 1 和 14 天,腹腔麻醉,沿颈部中线切开、暴露气管,预装 200 μL 内毒素(LPS,1 g·L⁻¹)于无菌注射器内,迅速注入气管内,并立即将大鼠垂直立起迅速均匀晃动,使 LPS 散布两肺,以防窒息。实验进行的第 2~13 天,第 15~28 天将大鼠放入密封烟熏箱中,每日烟熏 30 min。正常不烟熏,仅用上述方法气管内滴入等量 0.9% 氯化钠注射液。以大鼠肺功能和肺组织病理学改变来作为判定造模成功与否的依据。造模成功后,二陈汤加味高、中、低剂量组分别以 20,10,5 g·kg⁻¹·d⁻¹灌胃(ig),2 次/d,10:00 与 16:00 各给药 1 次。正常组及模型组给予相同用量的生理盐水 ig。以上各组连续 14 d ig。

2.2 Real-time PCR 法检测 Smad3, Smad4, Smad6 和 Smad7 mRNA 表达 肺匀浆液的制备:取新鲜大鼠右肺组织 1.0 g,于冰上操作,生理盐水冲洗血液,肺组织与生理盐水混合于离心管中匀浆,制成 10% 的肺匀浆液,4 ℃,3 000 r·min⁻¹离心 5 min 后取上清于无菌离心管中,-80 ℃ 冰箱储存。本实验检测的目的基因是 Smad3,Smad4,Smad6 和 Smad7 基因,内参选用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因。(提取组织总 RNA:将组织放入灭酶离心管中,加入组织裂解液 250 μL 研磨后,再重复操作研磨 1 次、加入 CCl₄ 40 μL 混匀,3 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上清液 300 μL,置于 1.5 mL 的 Tube 管中,加等体积(300 μL)无水乙醇,将匀液加入 Spin column 管中,3 000 r·min⁻¹离心 5 min,弃滤液,抽取已备好的 Wash Buffer 600 μL 加入 Spin column 管中离心,弃滤液(重复用 Wash Buffer 洗 2 次),弃滤液后空 Spin column 管离心,彻底去除废液,将 Spin 管放入新的无酶 1.5 mL Tube 管中,抽取焦碳酸二乙酯(DEPC)水 40 μL 至白色膜状 RNA 中,室温静置 1~2 min

后, 12 000 r·min⁻¹离心 5 min, 收集滤液即 RNA 提取液。按逆转录试剂盒说明配制 cDNA 合成所需反应液: Hiscript II Enzyme Mix 2 μL, 2 × RT Mix 10 μL, Oligo dT 1 μL, Random hexamers 1 μL, 提取的总 RNA 3 μL, 双蒸水(配)3 μL, 共 20 μL 为 1 份, 按需配置后涡旋混匀 30 s, 离心 30 s, 在普通 PCR 仪中参照 25 °C 5 min, 42 °C 15 min, 85 °C 5 min 的条件进行 cDNA 合成反应, 完成后将全部 cDNA 置于 -20 °C 冰箱保存。荧光定量 PCR: 把样本从 -20 °C 冰箱拿出, 离心混匀, 把染料和目的基因扩增引物、内参(GADPH)于 4 °C 冰箱融化。每个 cDNA 样本分别配制 2 种反应体系, 一种加目的基因特异性扩增引物; 另一种加 GAPDH 特异性扩增引物。按说明书计算配比量, 将各反应体系一次加入无酶 8 联排中, 混匀、瞬时离心后, 将 8 联排放入实时荧光定量 PCR 仪, 盖上 PCR 仪的盖子, 按说明书 2 步法程序进行 PCR 反应。取得扩增曲线、扩增产物熔解曲线及 C_t 值, 以同一样本中的 GAPDH C_t 值作为内参, 用软件分析 Smad3 (Smad4, Smad6, Smad7) 和 GAPDH 基因的扩增曲线, 得到各实验孔的 C_t 值, 按照公式 2^{-ΔΔC_t} = 2^{-[(实验组 Smads C_t - 实验组 GAPDH C_t) - (对照组 Smads C_t - 对照组 GAPDH C_t)]}。计算各实验组的 2^{-ΔΔC_t} 值, 将对照组的 2^{-ΔΔC_t} 值设为 1。实验组与之比较, 得到目的基因相对于 GAPDH 基因的相对定量。

2.3 取材与病理标本制备 4% 多聚甲醛固定肺组织, 常规包埋、切片厚 5 μm, 苏木素-伊红(HE)染色, 按照试剂盒说明书进行操作。

2.4 免疫组化法检测 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 表达 烤片后常规脱蜡水化加入 3% 双氧水进行抗

原热修复再加一抗 4 °C 过夜, 加生物素化山羊抗兔 IgG, 加 SABC, DAB 进行染色, 苏木素复染, 最后封片。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照, 以已知阳性片作阳性对照。以组织呈现棕黄色显色为阳性判断。各组切片随机选取 5 个高倍(4 × 100)视野, 采用 Image-ProPlus (IPP) 显微图像分析软件, 检测阳性显色平均积分吸光度 IA, 将所得数据整理并进行统计学分析。

2.5 统计学处理 采用统计软件 SPSS 19.0 进行数据分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析法, 组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls q 检验法, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 COPD 大鼠一般状况的影响 正常组大鼠无死亡, 精神状况佳, 活动灵敏, 毛色乳白有光泽, 大、小便无异常。造模初期, 第 1 ~ 14 天时, 造模的大鼠出现不同程度的抵抗及烦躁, 第 15 天后神情倦怠, 体型消瘦, 毛色略黄无光泽, 体重下降, 饮食量及饮水量减少, 大便稀而致垫料潮湿, 可闻及呼吸音增粗、呼吸频率增快、咳嗽、气喘、鼻部可见浅黄色分泌物等。灌胃后, 治疗组的以上症状呈不同程度的改善, 其中二陈汤加味中剂量组的症状改善最为明显。模型组、低剂量组各死亡 2 只, 中、高剂量组各死亡 1 只。

3.2 对 COPD 大鼠肺功能的影响 与正常组比较, 模型组大鼠用力肺活量(FVC), 第 1 秒末时间肺活量(FEV₁)和 FEV₁/FVC 均显著降低(P < 0.01); 与模型组比较, 中、高剂量治疗组 FVC, FEV₁ 和 FEV₁/FVC 均不同程度升高(P < 0.01)。见表 2。

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of modified Erchentang on lung function in COPD rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	FVC/mL	FEV ₁ /mL	FEV ₁ /FVC/%
正常	10	-	7.62 ± 0.11 ¹⁾	6.36 ± 0.21 ¹⁾	83.44 ± 2.11 ¹⁾
模型	8	-	4.77 ± 0.09	2.44 ± 0.26	51.37 ± 6.21
二陈汤加味	8	5	5.72 ± 0.15	3.78 ± 0.17	66.05 ± 2.42
		10	6.51 ± 0.10 ¹⁾	5.20 ± 0.13 ¹⁾	79.92 ± 2.46 ¹⁾
		20	6.17 ± 0.14 ¹⁾	4.32 ± 0.20 ¹⁾	70.02 ± 3.37 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾P < 0.01。

3.3 对 COPD 大鼠肺组织中 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组肺组织 Smad3, Smad4 mRNA 的表达量升高(P < 0.05),

Smad6, Smad7 mRNA 表达均降低(P < 0.05); 与模型组比较, 二陈汤加味高、中剂量组 Smad3, Smad4 mRNA 的表达量均减弱(P < 0.05), Smad6, Smad7

mRNA 的表达量增高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 对 COPD 大鼠肺组织 Smad3, Smad4, Smad6 和 Smad7 蛋白表达的影响 正常组 Smad3, Smad4 有极少阳性显色, Smad6, Smad7 可见阳性显色; Smad3, Smad4 表达于 I 型肺泡上皮细胞胞浆阳性表达, II 型肺泡上皮细胞阴性表达, 细支气管上皮细胞胞浆阳性表达、管壁黏膜下间质阳性表达, 巨噬细胞胞浆、胞核阳性表达。见图 1, 2。Smad6, Smad7 的阳性显色主要位于 I 型肺泡上皮细胞阳性表达, II 型肺泡上皮细胞阳性表达, 细支气管上皮细胞阳

性表达, 巨噬细胞阳性表达。见图 3, 4。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中 Smad3, Smad4 蛋白的表达增强 ($P < 0.01$), Smad6, Smad7 蛋白的表达显著减弱 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组 Smad3, Smad4 蛋白的表达明显减弱 ($P < 0.05, P < 0.01$), Smad6, Smad7 蛋白的表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与二陈汤加味中剂量组比较, 除正常组外, 其他各组 Smad3, Smad4 蛋白表达均高于中剂量组, Smad6, Smad7 蛋白表达均低于中剂量组。见表 4。

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of modified Erchentang on expression of Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 mRNA in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Smad3	Smad4	Smad6	Smad7
正常	10	-	1.48 ± 0.08 ¹⁾	1.13 ± 0.05 ¹⁾	2.96 ± 0.19 ¹⁾	3.89 ± 0.22 ¹⁾
模型	8	-	6.77 ± 0.08	6.12 ± 0.21	0.88 ± 0.06	1.82 ± 0.08
二陈汤加味	8	5	5.32 ± 0.10	4.89 ± 0.09	1.85 ± 0.20	2.93 ± 0.15
	9	10	2.69 ± 0.08 ¹⁾	2.23 ± 0.06 ¹⁾	2.44 ± 0.03 ¹⁾	3.22 ± 0.07 ¹⁾
	9	20	3.55 ± 0.10 ¹⁾	2.85 ± 0.91 ¹⁾	2.18 ± 0.07 ¹⁾	2.73 ± 0.09 ¹⁾

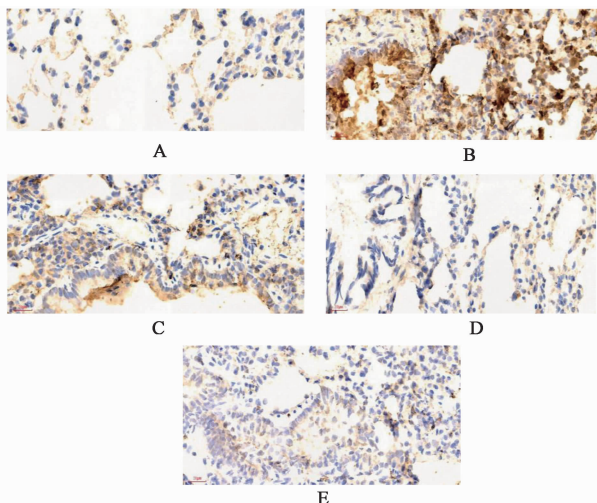
注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of modified Erchentang on expression of Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 protein in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Smad3	Smad4	Smad6	Smad7
正常	10	-	1.52 ± 0.07 ²⁾	1.86 ± 0.06 ²⁾	6.39 ± 0.19 ²⁾	7.44 ± 0.17 ²⁾
模型	8	-	3.70 ± 0.87	5.63 ± 0.21	1.86 ± 0.08	0.44 ± 0.20
二陈汤加味	8	5	3.04 ± 0.06	3.81 ± 0.06 ¹⁾	4.36 ± 0.12 ¹⁾	4.44 ± 0.23 ¹⁾
	9	10	2.04 ± 0.12 ²⁾	2.32 ± 0.08 ²⁾	5.36 ± 0.22 ²⁾	6.37 ± 0.08 ²⁾
	9	20	2.31 ± 0.11 ²⁾	3.06 ± 0.16 ²⁾	5.03 ± 0.25 ²⁾	5.81 ± 0.14 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 模型组; C. 二陈汤加味 5 g·kg⁻¹ 组; D. 二陈汤加味 10 g·kg⁻¹ 组; E. 二陈汤加味 20 g·kg⁻¹ 组 (图 2~4 同)

图 1 各组大鼠肺组织 Smad3 蛋白的表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Expression of Smad3 protein in lung tissue of each group rats (IHC, ×400)

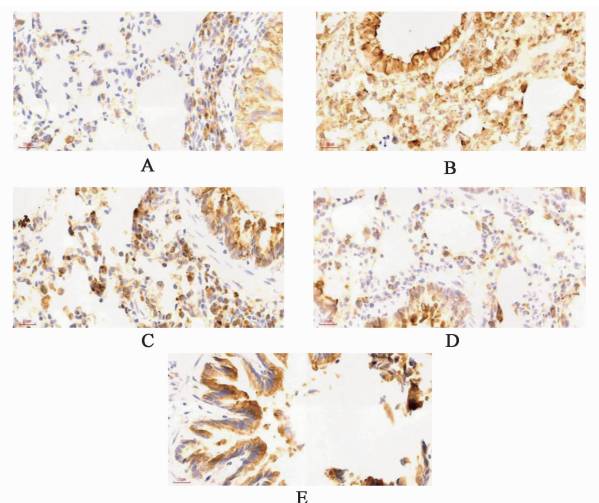


图 2 各组大鼠肺组织 Smad4 蛋白的表达 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Expression of Smad4 protein in lung tissue of each group rats (IHC, ×400)

3.5 Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 mRNA 表达和

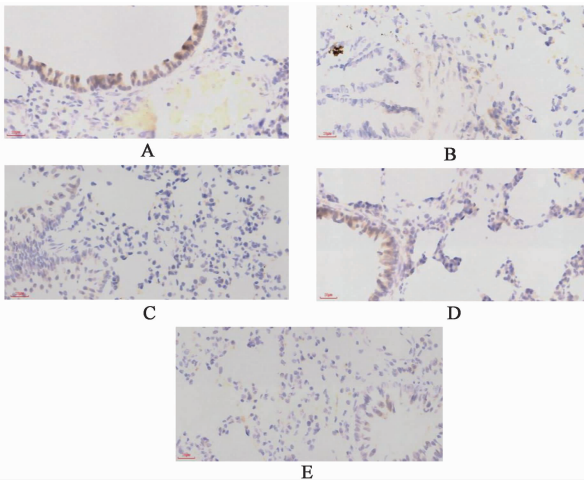


图 3 各组大鼠肺组织 Smad6 蛋白的表达(免疫组化, ×400)
Fig. 3 Expression of Smad6 protein in lung tissue of each group rats (IHC, ×400)

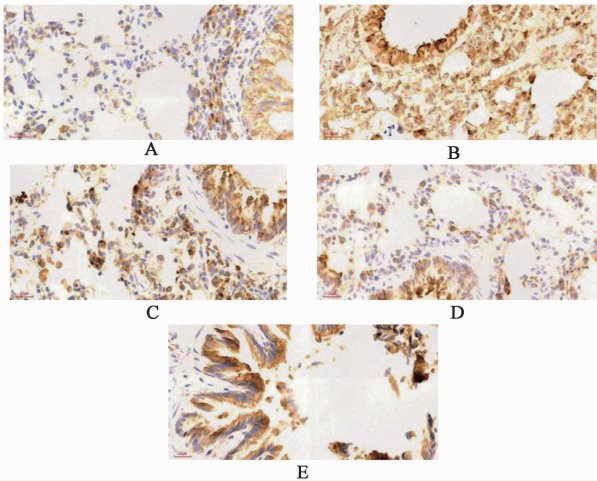


图 4 各组大鼠肺组织 Smad7 蛋白的表达(免疫组化, ×400)
Fig. 4 Expression of Smad7 protein in lung tissue of each group rats (IHC, ×400)

Smad3, Smad4, Smad6, Smad7 蛋白表达相关性分析经 Spearman 等级相关分析显示,模型组肺组织中 Smad3 mRNA 与 Smad3 蛋白的表达呈正相关($P < 0.05$), Smad4 mRNA 与 Smad4 蛋白的表达呈显著正相关($P < 0.01$), Smad6 mRNA 含量与 Smad6 蛋白的表达呈正相关($P < 0.05$), Smad7 mRNA 含量与 Smad7 蛋白表达呈显著正相关($P < 0.01$)。

4 讨论

COPD 是以小气道气流循环受限为主要病理特点的疾病。在 COPD 发病及病程中其主要病机为本虚标实。COPD 主要症状为咳、痰,重者伴喘。属于中医学“久咳”、“肺胀”^[21]、“喘证”等范畴。COPD 病机未明,多因久咳久喘而至肺气亏虚,脾虚津亏、痰瘀阻滞为 COPD 的主要病机^[22]。肺气亏虚,导致

宣降功能减弱,内外上下通利不及,痰浊集聚;脾气亏虚,水液不得化,导致湿聚成痰;肺气向上逆行,出现咳嗽、咳痰,痰浊瘀阻,肺气不能正常宣降,则胸闷兼咳喘;COPD 的发生多累及肺、脾、肾三脏^[23]。本研究发现,COPD 稳定期以肺气亏虚为主兼见痰、瘀阻滞,临床辨证多见肺气亏虚患者,证见胸闷气促,声低喘咳,痰灰白或稀白,面色白,舌淡暗苔薄白,脉弱等,治疗以补肺气、健脾气、化痰平喘为主;二陈汤加味方中除本身方义之外更兼有二陈汤与四君子汤加减的方义,对 COPD 进行治疗,疗效较好^[23-24]。二陈汤加味组成:半夏(姜)、陈皮、麻黄(蜜)、苦杏仁、葶苈子、党参、白术、茯苓、山药、干姜、甘草等。半夏(姜)燥湿化痰;陈皮、麻黄、苦杏仁宣降肺气;党参、白术补肺健脾不滋腻^[25];茯苓、山药、干姜、葶苈子、地龙健脾渗湿、逐瘀通肺、平喘通络;甘草和中健脾。全方注重补益肺脾之气,化痰兼平喘;补泄兼施,补而不滞,健脾祛痰兼利水,逐水祛痰使痰湿有所走,对慢性阻塞性肺疾病的疗效甚佳。

COPD 病位主要在肺,由于肺气虚损夹杂痰浊阻滞而表现咳喘等症状,整体病变以虚和痰贯穿始终^[26-27]。本实验结果显示,模型组大鼠体型瘦弱、精神差、目光不灵敏,呼吸明显增快、活动减少,说明肺气不足;鼻腔分泌物增多、有浅黄色黏稠分泌物溢出,伴见呼吸音明显增大、显然呼吸不畅;饮食减量,大便稀薄等,表明模型大鼠有肺气虚症状,并累及脾肾导致饮食和二便异常;经二陈汤加味灌胃治疗后,治疗组大鼠各种症状、体征明显改善,其中以二陈汤加味中剂量组症状改善最明显。提示二陈汤加味方对 COPD 肺气虚证治疗较佳。

在临床中,肺功能的检查是 COPD 诊断的金标准^[28-31]。小气道不同程度的阻塞而引发肺通气功能障碍;肺泡出现不同程度的扩张、融合,肺的顺应性降低,肺内气体残留增加,进而导致肺的换气功能障碍^[32-33]。本研究结果显示,模型组大鼠 FVC, FEV₁, FEV₁/FVC 低于正常组,与文献报道一致^[33],证明模型组大鼠出现明显肺气不足。与模型组比较,二陈汤加味治疗组的 FVC, FEV₁, FEV₁/FVC 明显升高。提示二陈汤加味可提升 COPD 肺气虚证大鼠的肺换气和通气功能,改善肺气虚症状。

抑制 Smads 信号转导系统是防治气道重塑的有效途径之一。TGF- β (TGF- β_{1-3})是一类重要的细胞因子,TGF- β_1 与 TGF- β R1 结合,能促进某些间质细胞增殖、调节胶原生成,促进 ECM 沉积^[34],调节免疫活性细胞增殖、分化和细胞因子的产生。Smads

蛋白(Smad 1 ~ Smad 8)是 TGF- β 的受体后信使蛋白^[35]。根据 Smads 的功能不同分为 3 类:①受体调节性 Smads(R-Smads),可被活化的 T β R 识别,包括 Smad1,2,3,5 和 8;②通用 Smads(Co-Smads),主要是 Smad4,同 R-Smads 结合;③抑制性 Smads(I-Smads),主要包括 Smad6,7 可与 R-Smads 竞争 TGF- β 受体,对 TGF- β 信号传递起负调控作用^[36]。TGF- β_1 /Smads 信号通路的基本过程:TGF- β_1 与其受体(T β R)结合,磷酸化激活 R-Smads 中的 Smad2/3,磷酸化后的 Smad2/3 与胞浆中的 Smad4 形成复合物并转入核内,激活的复合物和 2 类 DNA 结合辅助因子(共抑制子、共激活子)结合调控靶基因表达^[37-38]。TGF- β_1 /Smads 信号转导系统影响胶原蛋白表达与 ECM 沉积,是研究药物作用的分子靶标^[39-41]。ECM 的产生和上皮细胞间质转化(EMT)致 COPD 结构重塑^[42-43]。减少组织 Smad3,Smad4 含量或降低其活性,增加 Smad7 的含量或提高其活性,能抑制肝纤维化的发生与发展^[44-46]。本实验研究结果显示,与正常组比较,模型组肺组织中 Smad3,Smad4 基因表达升高,然而 Smad6,Smad7 基因表达降低,与文献报道一致^[42-46]。提示 Smad 蛋白家族对 ECM 具有双向调节作用,即 Smad3,Smad4 基因表达增强,Smad6,Smad7 基因表达减弱,导致 ECM 沉积,气道胶原表达增强,细支气管管壁增厚,气流受限,通气功能减弱。与模型组比较,治疗组肺组织中 Smad3,Smad4 基因表达减弱,而 Smad6 蛋白,Smad7 基因表达增强,提示二陈汤加味通过减弱 Smad3,Smad4 表达,增强 Smad6,Smad7 表达,发挥对 ECM 沉积的抑制作用,降低细支气管胶原合成,阻止气道狭窄,提升肺通气功能。

综上所述,二陈汤加味能有效抑制细支气管结构重塑,改善肺的结构与功能。其机制可能是通过抑制 Smads 信号转导系统,即降低 Smad3 的基因表达,协调 Smad4 的基因表达,提高 Smad6,Smad7 的基因表达,阻止或延缓细支气管结构重塑。

[参考文献]

[1] 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):321-323.
[2] 程艳慧,何东初. COPD 发病机制分子生物学的最新研究进展[J]. 临床肺科杂志,2010,15(2):232-233,267.
[3] Vlahos R,Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD[J]. Clin Sci,2014,126(4):253-256.
[4] Hinz B,Phan S H,Thanniclal V J, et al. The

myofibroblast:one function,multiple origins[J]. Am J Pathol,2007,170(6):1807-1816.
[5] Roberts A B,Mecune B K,Sporn M B. TGF- β : regulation of extracellular matrix[J]. Kidney Int,1992,41(3):557-559.
[6] Zandvoort A,Postma D S,Jonker M R,et al. Smad gene expression in pulmonary fibroblasts: indications for defective ECM repair in COPD[J]. Respir Res,2008,16(9):83-92.
[7] 冯淬灵,刘治坤,侯雅静,等. 芪蛭益肺颗粒药物血清对 TGF- β_1 刺激下肺成纤维细胞 Smad3、Smad4、Smad7 mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2014,37(1):18-21.
[8] Qaseem A,Snow V,Shekelle P, et al. Diagnosis and management of stable chronic obstructive pulmonary disease: a clinical practice guideline from the American College of Physicians [J]. Ann Intern Med,2007,147(9):633-638.
[9] 冯淬灵. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气虚血瘀痰阻证评价[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(8):39-41.
[10] JIANG M D,ZHENG S M,XU H, et al. An experimental study of extracellular signal-regulated kinase and its interventional treatments in hepatic fibrosis [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2008,7(1):51-57.
[11] 张伟,谷明明,孙璐璐,等. 活血化痰中药对 COPD 血管重塑的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):254-257.
[12] Rabe K F,Hurd S,Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease; GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med,2011,176(6):532-555.
[13] 朱健峰. COPD 患者肺功能易感性与感染严重程度的相关性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2013,23(6):1253-1255.
[14] 王少飞,张庆,王聪颖,等. 450 例 COPD 患者基本情况回顾分析[J]. 基础医学与临床,现代预防医学,2013,40(18):3511-3513.
[15] 冯淬灵,张前,刘治坤,等. 芪蛭益肺颗粒对 COPD 模型大鼠肺组织 TGF- β_1 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(4):238-241.
[16] 宫静,陈宁,郝小梅,等. 培土生金方对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者营养状态和免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(5):534-536.
[17] 谢文英,司春婴,尚立芝. 爱罗咳喘宁对老年 COPD 急性加重期痰湿阻肺证患者血清中细胞因子及肺功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(12):

- 143-146.
- [18] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对稳定期和急性加重 COPD 抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(1):134-139.
- [19] 李泽庚,彭波,张杰根,等. 肺气虚证模型大鼠的建立[J]. 北京中医,2005,24(1):53-55.
- [20] 张伟,宫静,张靖轩,等. 一种肺脾两虚证 COPD 动物模型的建立[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(1):142-143.
- [21] 朱文峰. 中医诊断与鉴别诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:124-134.
- [22] 陈志斌,刘中友,连林辉,等. 补肺一号方治疗 COPD 肺气虚证的临床研究[J]. 中医临床研究,2011,3(19):14-16.
- [23] 谢文英,尚立芝,胡文豪等. 慢性阻塞性肺疾病的发病机制及中医药治疗进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):227-230.
- [24] 谢文英,常学辉,张良芝. 爱罗咳喘宁方对支气管哮喘患者 IL-4、IL-5 影响的临床研究[J]. 新中医,2008,40(7):40-41.
- [25] 柳西河,李朝晖,董印宏,等. 重订医学衷中参西录[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:108.
- [26] 于丽丽,王天芳,徐雯洁,等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期证候及证候要素分布特点的临床研究[J]. 北京中医药大学学报,2010,10(33):699-702.
- [27] 葛建军. 体质指数与 COPD 患者生存预后关系的回顾性队列研究[J]. 实用医学杂志,2013,10(29):1686-1688.
- [28] 顾丹,朱兰. 上海市徐汇区全科医师及居民慢性阻塞性肺疾病认知程度调查[J]. 中国医学工程,2015,11(23):64-65.
- [29] 戎冬冬,李坤成,杜祥颖,等. 慢性阻塞性肺疾病气道病变的 64 层 MSCT 与肺功能的相关性研究[J]. 医学影像学杂志,2009,10(19):1241-1245.
- [30] 贾旭,钟相根,李宇航,等. “从肠论治”对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织病理学影响[J]. 辽宁中医杂志,2011,38(7):1439-1440.
- [31] 李配,邓秀兰,钟相根,等. 健脾益肺化痰方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺组织病理的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(6):1330-1332.
- [32] 赵华. 小气道病变在慢性阻塞性肺疾病的意义[J]. 中外医疗,2013,19(7):188-190.
- [33] 瞿波,周维,毛兵. 慢性阻塞性肺疾病稳定期中证型与肺功能的关系探讨[J]. 华西医学,2015,30(10):1853-1856.
- [34] 俞蕾敏,吕宾. TGF β /smad 信号转导通路与肝纤维化的关系[J]. 国际消化病杂志,2008,28(5):397-400.
- [35] SHI Y. Structural insights on Smad function in TGF- β Signaling[J]. Bioessays,2001,23(3):223-232.
- [36] 杨小燕,郑勇. Smad7 对 TGF- β /SMAD 的调节及其在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志,2007,23(6):467-469.
- [37] Massague J, Blain S W, Lo R S. TGF- β Signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000,103(2):295-309.
- [38] Massague J, CHEN Y G. Controlling TGF-beta signaling[J]. Genes Dev,2000,14(6):627-644.
- [39] 黄越龙,周春光,陈燕. TGF/Smad 信号通路与肝纤维化的研究进展[J]. 实用医学杂志,2011,27(10):1883-1884.
- [40] 杨雅茹,黄艳,李俊. TGF- β _1 介导的 Smads 与 ERK 通路在肺纤维化中的作用及相互关系[J]. 中国药理学通报,2010,26(5):561-563.
- [41] 李少春,马丽娜,陈坚,等. 大蒜辣素对大鼠心肌梗死后纤维化的影响及与 TGF β /Smads 信号通路的关系[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2517-2521.
- [42] Okano K, Hibi A, Miyaoka T, et al. Inhibitory effects of the transcription factor Ets-1 on the expression of type I collagen in TGF- β _1-stimulated renal epithelial cells. [J]. Mol Cell Biochem,2012,369(7):247-254.
- [43] 全贞雪,钟相根,李宇航,等. “通利大肠”对 COPD 大鼠气道重构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(19):157-161.
- [44] Latella G, Vetusch A, Sferra R, et al. Targeted disruption of Smad3 confers resistance to the development of dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in mice[J]. Liver Int,2009,29(7):997-1009.
- [45] 徐新保,冷希圣,杨晓. 反义 Smad4 基因转染对抗昆明小鼠肝脏纤维化发展的效果观察[J]. 中华普通外科杂志,2004,19(1):50-52.
- [46] Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, et al. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats[J]. Gastroenterology,2003,125(1):178-191.

[责任编辑 周冰冰]