

二陈汤加味对 COPD 患者缺氧诱导因子-1 α 及 沉默信息调节因子 1 的影响

谢文英¹, 季书¹, 尚立芝^{1*}, 薛红莉², 刘志勇³, 张静¹, 赵献敏¹,
刘晓蕙¹, 孙春阳¹, 卢长青³, 张森¹, 梁娟娟¹, 王祎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)患者的肺功能、氧化应激、缺氧诱导因子-1 α (Hif-1 α)及沉默信息调节因子 1(Sirt1)的影响,评价二陈汤加味对 COPD 患者抗氧化损伤及抗炎的作用与机制。**方法:**选取符合纳入标准的急性加重期和稳定期 COPD 患者各 120 例,各期分成对照组和治疗组。各组均在西药治疗的基础上,治疗组给予二陈汤加味,疗程 14 d。检测肺功能,测定血液酸碱度(pH),氧分压(PaO₂),二氧化碳分压(PCO₂),氧饱和度(SaO₂)。紫外分光光度计检测血清还原型谷胱甘肽(GSH),超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆白细胞介素(interleukin)-6,IL-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 C 反应蛋白(CRP)含量,实时荧光定量 PCR 检测外周血单个核细胞(PBMCs)中 Hif-1 α 和 Sirt1 mRNA 表达,ELISA 法测定 PBMCs 中 Hif-1 α 和 Sirt1 含量,荧光酶联免疫吸附法测定 PBMCs 中 Sirt1 活性。**结果:**急性加重期和稳定期治疗后,与对照组比较,治疗组 1 s 用力呼气容积(FEV₁),1 s 用力呼气量/用力肺活量(FVC)均显著增大($P < 0.01$),治疗组总有效率明显高于对照组($P < 0.05$),治疗组 PaO₂,SaO₂ 均显著增加,PCO₂ 显著降低($P < 0.01$),SOD,GSH-Px 活性均显著升高($P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$),治疗组 PBMCs 中 Sirt1 mRNA 表达,Sirt1 含量及其活性均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),IL-1 β ,IL-6,TNF- α ,CRP,Hif-1 α 含量,Hif-1 α mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$)。**结论:**二陈汤加味对 COPD 有抗氧化损伤、抗炎作用。其机制可能为增强 Sirt1 基因的表达,提高 Sirt1 活性,抑制 Hif-1 α mRNA 表达,减少 IL-1 β ,IL-6,TNF- α ,CRP 合成与释放,以保护肺组织、改善肺功能。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 肺功能; 氧化应激; 二陈汤; 缺氧诱导因子-1 α ; 沉默信息调节因子 1

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0155-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017100155

Effect of Modified Erchentang on Hif-1 α and Sirtuins 1 in Patients with COPD

XIE Wen-ying¹, JI Shu¹, SHANG Li-zhi^{1*}, XUE Hong-li², LIU Zhi-yong³, ZHANG Jing¹, ZHAO Xian-min¹,
LIU Xiao-hui¹, SUN Chun-yang¹, LU Chang-qing³, ZHANG Miao¹, LIANG Juan-juan¹, WANG Yi¹

(1. School of Basic Medicine, 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 observe the effect of modified Erchentang on lung function, oxidative stress, Hif-1 α and Sirtuins1 (Sirt1) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), in order to evaluate the effect and mechanism of modified Erchentang on oxidative damage and anti-inflammation in patients of COPD.

[收稿日期] 20160826(003)

[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);河南省科技重点攻关项目(152102310337);河南中医学院大学生创新学习项目(CXXM[2016]0019,CXXM[2016]0041);河南省中医药科学研究专项(2013ZY02070)

[第一作者] 谢文英, 硕士, 教授, 从事中医药临床研究, E-mail: xiewenying1963@163.com

[通讯作者] * 尚立芝, 硕士, 教授, 从事中医药作用机制研究, E-mail: lzshang2014@163.com

Method: A multicenter, randomized single blind and placebo-controlled study was carried out. Totally 120 cases of COPD patients in acute exacerbation stage and 120 cases patients in stable stage were selected. Patients were randomly divided into modified Erchentang group and placebo-controlled group. In addition to the western medicine, modified Erchentang was additionally used in modified Erchentang group, and placebo was additionally used in control group for 14 days. The lung function was detected, and pH, PaO₂, PCO₂ and SaO₂ were measured. Ultraviolet spectrophotometer was used to detect glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). Euzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and C-reactive protein (CRP) in patients plasma of all groups before and after treatment. Real-time PCR was used to determine the expressions of Hif-1 α and Sirt-1 mRNA, and content of Hif-1 α and Sirt-1 in PBMCs was measured by ELISA method. The activity of Sirt1 was determinate by Enzyme-linked immune fluorescence. **Result:** Compared with the control group, forced expiratory volume in one second (FEV₁), forced expiratory volume in one second to forced vital capacity ratio (FEV₁%), PaO₂, SaO₂, SOD, GSH-Px, the activity of Sirt1 in treatment group were higher significantly. However, the levels of PCO₂, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP in plasma, the total number of neutrophils, inflammatory cells, the expressions of Hif-1 α mRNA and the content of Hif-1 α were significantly lower in COPD treatment group with modified Erchentang in acute exacerbation and stable stages than those in control group. **Conclusion:** Modified Erchentang has anti-oxidative damage and anti-inflammatory effect on COPD. It may weaken the oxidation damage, reduce levels of inflammation medium IL-1 β , IL-6, TNF- α and CRP, prevent inflammatory progress, adjust the expressions of Hif-1 α and Sirt-1 mRNA, so as to treat COPD and improve the structure and function of the lung through multiple targets and in multiple ways.

[Key words] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); pulmonary function; oxidative stress; Erchentang; hypoxia-inducible factor-1 α (Hif-1 α); Sirtuins1 (Sirt1)

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是以持续气流受限为特征的呼吸系统常见病和多发病。COPD 的发病伴有氧化/抗氧化失衡、炎症等病理过程。缺氧诱导因子-1 (Hif-1 α) 是细胞内介导低氧应答的转录因子, 沉默信息调节因子 1 (Sirt1) 参与调控氧化应激, DNA 修复, 细胞衰老等多种病理生理过程, 近年发现, Hif-1 α 和 Sirt1 在 COPD 病理机制中起重要作用^[1-2]。二陈汤源自宋代《太平惠民和剂局方》, 具有化痰燥湿、和中理气的功效。本课题组前期临床和实验研究证实, 基于二陈汤加减的爱罗咳喘宁对 COPD 的疗效显著^[3-8], 但其药理机制有待探究。本研究检测 COPD 患者肺功能、血气指标、血清还原型谷胱甘肽 (GSH) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA) 含量, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定外周血单个核细胞 (PBMCs) 中 Hif-1 α , Sirt1 含量, 荧光酶联免疫吸附法检测 Sirt1 活性, 实时荧光定量 PCR 检测 PBMCs 中 Hif-1 α , Sirt1 mRNA 表达。以期阐明二陈汤加味治疗 COPD 的药理机制, 为临床治疗 COPD 提供有效的治疗药物及新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例来源于河南中医药大学第一

附属医院、河南中医药大学第三附属医院、河南省中医院、郑州市新华中医院呼吸科 2012 年 10 月至 2016 年 3 月门诊及住院的 COPD 急性加重期、稳定期患者各 120 例。120 例急性加重期患者随机分为治疗组与对照组, 各 60 例。治疗组男 32 例, 女 28 例, 年龄 62 ~ 74 岁, 平均 (68.12 \pm 5.07) 岁, 平均病程 (30.10 \pm 5.05) 月。对照组男 30 例, 女 30 例, 年龄 60 ~ 75 岁, 平均 (68.11 \pm 6.06) 岁, 平均病程 (31.03 \pm 5.08) 月。120 例稳定期患者随机分为治疗组与对照组, 各 60 例。治疗组男 33 例, 女 27 例, 年龄 59 ~ 71 岁, 平均 (65.05 \pm 5.07) 岁, 平均病程 (30.03 \pm 4.05) 月。对照组男 31 例, 女 29 例, 年龄 58 ~ 80 岁, 平均 (68.07 \pm 6.15) 岁, 平均病程 (28.73 \pm 4.07) 月。急性加重期 2 组之间、稳定期 2 组之间在性别、年龄、肺功能等, 经 Ridit 检验, 差异均无统计学意义, 具有可比性。

1.2 诊断标准 参照中华医学会呼吸系统疾病学会《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 年修订版)》^[9] 和 2013 年对急性加重期 COPD (AECOPD) 诊断标准^[10]; 中医辨证分型参照《实用中医内科学》^[11] 和《中药新药临床研究指导原则》^[12] 标准。

COPD 诊断应根据临床表现(包括慢性咳嗽、咳痰、气短,进行性呼吸困难),体征(桶状胸、紫绀、伴右心衰竭者肝脾肿大、双下肢水肿,叩诊过清音,两肺听诊呼吸音减低,闻及干、湿性啰音),既往史(呼吸系统疾病家族史、哮喘、低体重)和危险因素接触史(长期吸烟史、职业、环境有害物质接触史等),及实验室检查[存在不完全可逆性气流受限是诊断 COPD 的必备条件;用支气管舒张剂后 1 s 用力呼气容积(FEV_1)/用力肺活量(FVC) < 70% 可确定为不完全可逆性气流受限;胸部 X 射线肺过度充气,胸部 CT 检查有肺气肿,血气检查在海平面静息状态呼吸空气条件下,氧分压(PaO_2) < 60 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)和(或)氧饱和度(SaO_2) < 90%,提示呼吸衰竭;并发感染时痰涂片可见大量中性粒细胞,痰培养可检出各种病原菌,肺炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌、流感嗜血杆菌、卡他摩拉菌等]等资料综合分析并诊断。

1.3 纳入标准 符合诊断标准;肺功能属 I ~ IV 级,患者短期内咳嗽、咳痰、气短和(或)喘息加重,痰量增多,呈脓性或黏脓性,可伴发热等炎症明显加重的表现,确定为 AECOPD;稳定期 COPD (STCOPD)患者咳嗽、咳痰、气短等症状稳定或症状轻微,肺功能检查证实有不完全可逆的气道阻塞,不伴有其他肺部疾病,用支气管舒张剂后, FEV_1 < 80% 预计值及 FEV_1/FVC < 70% 可确定为不完全可逆性气流受限;年龄 58 ~ 81 岁;患者均经过医学伦理委员会批准,签署知情同意书;无明显过敏疾病史。

1.4 排除标准 ①合并肺部其他疾患(肺结核、肺部肿瘤、真菌感染、肺间质纤维化、气胸、胸腔积液、肺栓塞者等);②合并严重心功能不全(心功能 III 级及以上)者;③合并全身其他系统疾病(消化系统、心血管系统、泌尿系统、造血系统、内分泌系统、神经系统等)者;④排除其他部位的慢性炎症、肿瘤、结缔组织病、糖尿病等消耗性疾病,近 1 个月内未用过免疫抑制剂、激素等影响免疫状态药物者;⑤神志不清、痴呆、各种精神病患者,依从性差未按规定服药者,病例脱落者、临床资料不全及其他不符合纳入标准者。

1.5 治疗 各组在常规治疗的基础上(支气管扩张剂、抗生素控制感染、吸氧等,必要时行机械性通气),治疗组给予二陈汤加味,方药组成:麻黄(炙) 6 g (批号 1409001S),陈皮 10 g (批号 1302001H),党参 10 g (批号 1407007W),白术 10 g

(批号 1407001W),葶苈子 10 g (批号 1501001W),姜半夏 10 g (批号 1301001S),苦杏仁 10 g (批号 1410004S),山药 10 g (批号 1310007H),地龙 10 g (批号 1103001S),茯苓 10 g (批号 1405004W),甘草 5 g (批号 1302001S)等,均为华润三九医药生产的中药配方颗粒。2 次/d。疗程 14 d。对照组给予安慰剂。

1.6 疗效检测 临床有效率,参照诊断标准^[12],综合评价疗效,共分为 4 个等级,临床控制、显效、有效、无效。将前三者合称为有效,计算总有效率。

1.7 测肺功能检测 采用 MasterScreen 型 PFT 肺功能仪(德国 Jaeger 公司)测定患者治疗前后 FEV_1 , FVC。

1.8 血常规及相关因子检测 治疗前后,取患者肘静脉血,3 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min,取上层血清,检测血气分析指标,测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX, 比色法),丙二醛(MDA, TBA 法),超氧化物歧化酶(SOD, WST-1 法),试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号分别为 wi80521, A005, A003-1。取肘静脉血放入含有二乙胺四乙酸钠(EDTA)离心管中,测血常规。取肘静脉血于肝素抗凝管中,800 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,ELISA 法测定血浆 IL-6, TNF- α , IL-1 β 和 CRP 水平,ELISA 试剂盒均购自博士德生物工程有限公司,批号分别为 K4143-100, 589201-96, EK1316, EK0392;沉淀物采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度分离法,分离人外周血单个核细胞(PBMCs)。

1.9 实时荧光定量 PCR 检测相关基因表达 取 PBMCs 总 RNA 提取试剂盒(Total RNA Isolation Kit, 批号 086001)提取 PBMCs 中总 RNA,用逆转录试剂盒(HiScript[®] II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 批号 119041)逆转录为 cDNA,反应条件:25 $^{\circ}C$ 5 min, 42 $^{\circ}C$ 15 min, 85 $^{\circ}C$ 5 min。进行 PCR 反应,PCR 反应条件:94 $^{\circ}C$ 5 min, 94 $^{\circ}C$ 45 s, 57 $^{\circ}C$ 30 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 30 个循环。取得扩增曲线、扩增产物熔解曲线及 C_t , 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司, Hif-1 α (173 bp): 上游 5'-GAAAGCGCAAGTCTTCAAAG-3', 下游 5'-TGGGTAGGAGATGGAGATGC-3'; Sirt-1 引物(136 bp): 上游 5'-CAAAGGAGCAGATTAGTAGGCG-3', 下游 5'-CTCTGGCATGTCCCACTATCAC-3'; GAPDH (108 bp): 上游 5'-AGGGCTGTTCTGAGCACA-3', 下游 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'。

1.10 ELISA 法测定 PBMCs 中 Hif-1 α , Sirt1 含量 按 Hif-1 α (人源, 艾美捷科技有限公司, 批号

KA1247) 和 Sirt1 (人源, 上海恪敏生物科技有限公司, 批号 H1546) 试剂盒说明书执行。

1.11 外周 PBMCs 中 Sirt1 活性测定 严格按照 Sirt1 活性荧光定量检测试剂盒 (上海杰美基因医药科技有限公司, 批号 GMS50289) 说明书执行。

1.12 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用

方差分析; 相关性检验用 Spearman 等级相关分析; 计数资料以 % 表示, 采用 Radit 进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者总有效率比较 与对照组比较, 急性加重期和稳定期的治疗组总有效率均高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者总有效率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 1 Comparison of total effective rate between two groups ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	控制/例	显效/例	有效/例	无效/例	总有效率/%
AECOPD	治疗	16	30	10	4	93 ¹⁾
	对照	12	16	20	12	80
STCOPD	治疗	18	29	10	3	95 ¹⁾
	对照	12	27	14	7	88

注: 与同期对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 各组患者肺功能比较 AECOPD 患者与治疗前比较, 治疗后治疗组 FVC, FEV₁, FEV₁ 占预计值 % 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。STCOPD 患者与治疗前比较, 两组治疗后 FEV₁, FEV₁ 占预计

值 % 水平均明显升高 ($P < 0.05$)。治疗后与同期对照组比较, 急性加重期和稳定期的患者治疗组 FEV₁, FEV₁ 占预计值 % 均高于相应对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗前后两组患者肺功能比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 2 Comparison of lung function between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	FVC/L	FEV ₁ /L	FEV ₁ 占预计值 %
AECOPD	治疗	治疗前	2.05 ± 0.06	1.08 ± 0.01	50.23 ± 0.16
		治疗后	2.66 ± 0.08 ¹⁾	1.56 ± 0.02 ^{1,2)}	66.11 ± 0.25 ^{1,2)}
	对照	治疗前	2.01 ± 0.03	1.02 ± 0.05	50.75 ± 1.67
		治疗后	2.16 ± 0.05	1.18 ± 0.02 ¹⁾	54.63 ± 0.40 ¹⁾
STCOPD	治疗	治疗前	3.01 ± 0.03	1.54 ± 0.04	51.12 ± 1.33
		治疗后	3.12 ± 0.07	1.97 ± 0.02 ^{1,2)}	63.14 ± 0.29 ^{1,2)}
	对照	治疗前	2.96 ± 0.08	1.47 ± 0.05	49.67 ± 0.63
		治疗后	3.01 ± 0.04	1.61 ± 0.02 ¹⁾	53.48 ± 0.50 ¹⁾

注: 与同期治疗前比较¹⁾ $P < 0.05$; 治疗后与同期对照组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

2.3 各组患者 pH, PaO₂, SaO₂ 和 PCO₂ 水平比较 与同期患者治疗前比较, 两组患者治疗后 PaO₂, SaO₂ 水平均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), PCO₂ 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。治疗后与同期对照组比较, 急性加重期和稳定期的治疗组 PaO₂, SaO₂ 均明显增大 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

2.4 各组患者血清中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量比较 与同期患者治疗前比较, 两组患者治疗后 SOD, GSH-Px 水平均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$)。治疗后与同期对照组比较, 急性加重期和稳定期治疗组 SOD, GSH-Px 均明显升高 ($P < 0.05$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 4。

2.5 各组患者外周血中炎症细胞计数和分类比较 与同期患者治疗前比较, 两组患者治疗后炎症细胞总数、中性粒细胞数、单核细胞和淋巴细胞明显减少 ($P < 0.05$)。治疗后与对照组比较, STCOPD 治疗组炎症细胞总数明显减少 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.6 各组患者血浆 IL-6, TNF- α , IL-1 β , CRP 含量比较 与同期患者治疗前和同期对照组治疗后比较, 治疗组 IL-6, TNF- α , IL-1 β , CRP 均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 6。

2.7 各组患者 PBMCs 中 Hif-1 α , Sirt1 比较 与本组同期治疗前比较, 两组患者治疗后 Hif-1 α mRNA 表达, Hif-1 α 含量均明显降低 ($P < 0.05$); 治疗后与同期对照组比较, AECOPD 治疗后 Hif-1 α 含量明显

表 3 治疗前后两组患者 pH, PaO₂, SaO₂ 和 PCO₂ 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 3 Comparison of pH, PaO₂, SaO₂ and PCO₂ between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	pH	PaO ₂ /mmHg	SaO ₂ /%	PCO ₂ /mmHg
AECOPD	治疗	治疗前	7.16 ± 0.02	48.25 ± 1.29	80.24 ± 0.23	60.61 ± 1.24
		治疗后	7.34 ± 0.02 ¹⁾	80.27 ± 1.23 ^{2,3)}	96.21 ± 0.36 ^{1,3)}	52.14 ± 1.31 ¹⁾
	对照	治疗前	7.17 ± 0.03	49.18 ± 1.41	81.13 ± 0.36	59.76 ± 1.43
		治疗后	7.30 ± 0.01	53.26 ± 1.41 ¹⁾	93.32 ± 0.27 ¹⁾	48.13 ± 1.34 ¹⁾
STCOPD	治疗	治疗前	7.25 ± 0.04	50.15 ± 1.33	82.36 ± 0.31	59.49 ± 1.05
		治疗后	7.32 ± 0.03 ¹⁾	82.31 ± 1.41 ^{1,3)}	99.13 ± 0.52 ^{1,3)}	51.32 ± 1.27 ²⁾
	对照	治疗前	7.23 ± 0.06	51.17 ± 1.35	84.54 ± 0.42	56.51 ± 1.43
		治疗后	7.28 ± 0.02	55.35 ± 1.62 ¹⁾	92.41 ± 0.19 ¹⁾	50.16 ± 1.42 ¹⁾

注:与同期本组治疗前比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 治疗后与同期对照组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01 (表 4 ~ 7 同)。

表 4 治疗前后两组患者血清中 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 4 Comparison of activity of SOD and GSH-Px, content of MDA between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	SOD/U · mg ⁻¹	GSH-Px/U · mg ⁻¹	MDA/μmol · g ⁻¹
AECOPD	治疗	治疗前	81.27 ± 1.52	20.37 ± 1.29	14.61 ± 0.17
		治疗后	188.21 ± 1.12 ^{2,3)}	36.42 ± 1.14 ^{1,3)}	3.19 ± 0.43 ^{2,4)}
	对照	治疗前	82.19 ± 1.52	20.33 ± 3.42	15.18 ± 1.27
		治疗后	167.32 ± 1.41 ¹⁾	30.04 ± 1.05 ¹⁾	5.16 ± 0.72 ²⁾
STCOPD	治疗	治疗前	78.52 ± 1.31	20.15 ± 1.29	15.69 ± 0.46
		治疗后	165.31 ± 1.22 ^{1,3)}	32.35 ± 1.32 ^{1,3)}	2.24 ± 0.35 ^{2,4)}
	对照	治疗前	80.68 ± 1.37	18.46 ± 1.36	16.31 ± 1.52
		治疗后	146.23 ± 1.34 ¹⁾	24.04 ± 1.03 ¹⁾	6.23 ± 0.51 ²⁾

表 5 治疗前后两组患者外周血中炎症细胞计数和分类比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 5 Comparison of inflammatory cells in peripheral blood count and classification between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	炎细胞计数/×10 ⁹ 个/L	N/%	M/%	L/%
AECOPD	治疗	治疗前	12.13 ± 0.28	88.31 ± 1.37	17.27 ± 1.31	57.33 ± 1.42
		治疗后	8.31 ± 0.32 ¹⁾	79.31 ± 1.82 ¹⁾	8.21 ± 0.35 ¹⁾	36.53 ± 0.32 ¹⁾
	对照	治疗前	11.81 ± 0.43	87.63 ± 1.70	16.72 ± 0.41	56.85 ± 0.21
		治疗后	8.23 ± 0.51 ¹⁾	81.35 ± 2.45 ¹⁾	9.65 ± 0.36 ¹⁾	30.46 ± 0.22 ¹⁾
STCOPD	治疗	治疗前	11.13 ± 0.23	83.42 ± 1.37	15.14 ± 1.62	55.82 ± 1.36
		治疗后	7.52 ± 0.62 ^{1,3)}	71.22 ± 1.53 ¹⁾	7.56 ± 0.27 ¹⁾	30.12 ± 0.32 ¹⁾
	对照	治疗前	11.41 ± 0.37	75.63 ± 1.56	14.65 ± 0.39	56.73 ± 0.31
		治疗后	10.51 ± 0.25	76.63 ± 1.54	8.12 ± 0.71 ¹⁾	30.31 ± 0.51 ¹⁾

降低 (P < 0.05)。

与同期本组治疗前比较, 两组患者治疗后 Sirt1 mRNA 表达, Sirt1 含量, Sirt1 活性均明显增加 (P < 0.05)。治疗后与同期对照组比较, AECOPD 患者 Sirt1 含量明显增加 (P < 0.05), STCOPD 患者 Sirt1 mRNA 表达, Sirt1 含量, Sirt1 活性均明显增加 (P <

0.05)。见表 7。

2.8 STCOPD 患者肺功能, 氧化应激, 细胞因子, Hif-1α, Sirt1 相关性 经 Spearman 等级相关分析显示, COPD 稳定期治疗组治疗后, FEV₁ 与 SaO₂ 呈正相关 (P < 0.05); FEV₁ 与 SOD, GSH-Px 均呈正相关 (P < 0.05); FEV₁ 与 Hif-1α 含量呈负相关 (P < 0.05);

表 6 治疗前后两组患者血浆 IL-6, TNF- α , IL-1 β , CRP 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 6 Comparison of modified Erchentang on level of IL-6, TNF- α , IL-1 β and CRP in plasma between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	IL-6	TNF- α	IL-1 β	CRP
AECOPD	治疗	治疗前	0.51 \pm 0.13	1.46 \pm 0.36	0.53 \pm 0.12	0.63 \pm 0.43
		治疗后	0.35 \pm 0.13 ^{1,3)}	0.87 \pm 0.40 ^{1,3)}	0.41 \pm 0.10 ^{1,3)}	0.73 \pm 0.32 ^{1,3)}
	对照	治疗前	0.55 \pm 0.12	1.42 \pm 0.28	0.57 \pm 0.16	0.58 \pm 0.21
		治疗后	0.47 \pm 0.04 ¹⁾	1.28 \pm 0.25 ¹⁾	0.48 \pm 0.12 ¹⁾	0.43 \pm 0.22 ¹⁾
STCOPD	治疗	治疗前	0.46 \pm 0.16	1.27 \pm 0.42	0.47 \pm 0.52	1.45 \pm 0.31
		治疗后	0.25 \pm 0.15 ^{1,3)}	0.76 \pm 0.52 ^{1,3)}	0.35 \pm 0.32 ¹⁾	0.68 \pm 0.22 ^{1,3)}
	对照	治疗前	0.51 \pm 0.14	1.31 \pm 0.23	0.48 \pm 0.43	1.48 \pm 0.31
		治疗后	0.35 \pm 0.02 ¹⁾	0.69 \pm 0.36 ¹⁾	0.36 \pm 0.22 ¹⁾	0.54 \pm 0.35 ¹⁾

表 7 治疗前后两组患者治疗前后 PBMCs 中 Hif-1 α 和 Sirt1 mRNA 相对表达量, Hif-1 α 和 Sirt1 含量, Sirt1 活性变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

Table 7 Comparison of expressions of Hif-1 α and Sirt1 mRNA, content of Hif-1 α and Sirt1, activity of Sirt1 in PBMCs between two groups before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 60$)

分期	组别	时间	Hif-1 α mRNA	Sirt1 mRNA	Hif-1 α 相对含量	Sirt1 相对含量	Sirt1 活性/fu \cdot μ g ⁻¹
AECOPD	治疗	治疗前	1.98 \pm 0.12	0.97 \pm 0.12	1.58 \pm 0.16	0.42 \pm 0.15	0.12 \pm 0.02
		治疗后	1.03 \pm 0.04 ¹⁾	1.42 \pm 0.11 ¹⁾	0.57 \pm 0.02 ^{1,3)}	0.88 \pm 0.12 ^{1,3)}	0.67 \pm 0.05 ¹⁾
	对照	治疗前	1.87 \pm 0.21	0.89 \pm 0.21	1.62 \pm 0.18	0.43 \pm 0.11	0.08 \pm 0.03
		治疗后	1.12 \pm 0.14 ¹⁾	1.31 \pm 0.12 ¹⁾	0.95 \pm 0.05	0.59 \pm 0.02	0.64 \pm 0.14 ¹⁾
STCOPD	治疗	治疗前	1.53 \pm 0.12	1.11 \pm 0.11	1.27 \pm 0.12	0.61 \pm 0.13	0.82 \pm 0.02
		治疗后	1.01 \pm 0.02 ¹⁾	1.72 \pm 0.15 ^{1,3)}	0.54 \pm 0.02 ¹⁾	1.57 \pm 0.16 ^{1,3)}	1.87 \pm 0.03 ^{1,3)}
	对照	治疗前	1.45 \pm 0.14	1.08 \pm 0.17	1.33 \pm 0.11	1.03 \pm 0.11	0.79 \pm 0.04
		治疗后	1.13 \pm 0.03 ¹⁾	1.42 \pm 0.14 ¹⁾	0.66 \pm 0.03 ¹⁾	1.22 \pm 0.12 ¹⁾	1.41 \pm 0.01 ¹⁾

Hif-1 α , Sirt1 二者含量呈负相关 ($P < 0.05$); Hif-1 α 含量与 TNF- α , IL-6 水平均呈正相关 ($P < 0.05$); Hif-1 α 含量与 Sirt1 含量呈负相关。FEV₁ 与 Sirt1 含量, 活性呈正相关 ($P < 0.05$); IL-6 与 SOD, GSH 均呈负相关 ($P < 0.05$); TNF- α 与 SOD, GSH 均呈负相关 ($P < 0.05$); Sirt1 含量与 TNF- α , IL-6 均呈负相关 ($P < 0.05$), Sirt1 含量与 SOD, GSH 均呈正相关 ($P < 0.05$)。

3 讨论

COPD 是以不可逆气流受限为特征的呼吸系统非特异性炎症性疾病^[1]。中医认为, 长期慢性肺系疾病反复迁延, 久病肺虚, 宿痰着肺, 肺失布津; 脾虚失运, 聚湿成痰, 痰湿阻肺^[13], 该病其表在肺, 而本在脾、肾。本课题组针对痰湿阻肺病机, 结合前期研究^[3-8], 拟定二陈汤加味, 方中麻黄、陈皮、杏仁祛痰止咳平喘; 姜半夏、葶苈子泻肺降气, 茯苓温肺化湿, 燥湿化痰, 党参、白术、山药、甘草、地龙益气活血、健脾和胃、固肾益精、通络祛瘀。合用诸药, 共奏止咳平喘、宣肺降气、燥湿化痰、健脾固肾、活血化瘀

之功。

本研究结果显示, 急性加重期和稳定期二陈汤加味治疗组 FVC, FEV₁, FEV₁%/FVC 较对照组均升高, 提示二陈汤加味能改善 COPD 患者肺通气功能。与对照组比较, 急性加重期二陈汤加味治疗组 PaO₂, SaO₂ 升高, PCO₂ 降低, 提示二陈汤加味能改善 COPD 患者肺通气和换气功能。氧化应激可致组织过氧化损伤, MDA 是脂质过氧化的产物, 而 SOD 和 GSH-Px 都是机体内清除氧自由基的酶, 测定 MDA, SOD, GSH-Px 可以反映细胞的氧化应激水平^[14]。本研究发现, 与对照组比较, 急性加重期和稳定期二陈汤加味治疗组, 治疗后 SOD 和 GSH-Px 活性均增高, MDA 含量降低, 提示二陈汤加味可能通过抗氧化损伤而发挥保护肺组织的作用。

Hif 包括 Hif-1, Hif-2, Hif-3, 均由 α , β 两个亚基组成异二聚体^[15]。Hif-1 α 是低氧环境中对细胞起调控作用的关键基因, 常氧状态下 Hif-1 α 在细胞内几乎不表达。细胞缺氧时, Hif-1 α 聚积并转运至细胞核, 激活其靶基因的转录, 包括增加炎症介质的

表达、免疫应答、细胞增殖与凋亡,血管新生与重建、缺氧性肺动脉高压等,启动各种适应性反应,以应对氧分压降低^[16]。近年研究表明氧浓度并非是调节 Hif-1 α 的唯一因素,在常氧条件下,Hif-1 α 与炎症介质有密切的联系。COPD 患者伴有缺氧及肺部炎症反应,由炎细胞产生的细胞因子 CRP,IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 等水平增加,这些细胞因子对 Hif-1 α 的蛋白积聚,DNA 活性以及下游基因的表达有重要的调节作用^[17-20]。本研究发现,急性加重期和稳定期患者治疗后 IL-6,TNF- α ,IL-1 β ,CRP 水平低于治疗前,与文献报道一致^[21-22],提示二陈汤加味有抗炎作用。COPD 患者缺氧和炎症介质集聚,共同刺激 Hif-1 α mRNA 表达与 Hif-1 α 释放增加。AECOPD 和 STCOPD 患者 PBMCs 中,治疗组治疗后与治疗前比较,Hif-1 α mRNA 表达与 Hif-1 α 含量均降低,可能与治疗后 PBMCs 数目减少有关。相关性分析显示,COPD 稳定期治疗组治疗后,FEV₁ 与 SaO₂ 呈正相关,FEV₁ 与 SOD,GSH-Px 均呈正相关;FEV₁ 与 Hif-1 α 含量呈负相关;Hif-1 α 含量与 TNF- α ,IL-6 均呈正相关;提示二陈汤加味可改善缺氧,提高 SOD,GSH-Px 活性,保护肺组织;抑制 Hif-1 α 基因转录与释放,阻止下游 IL-1 β ,CRP,TNF- α ,IL-6 基因的表达,从而发挥抗炎作用。在 AECOPD 肺气肿患者,肺组织以及肺动脉内皮细胞和肺泡间隔细胞中 Hif-1 α mRNA 及 Hif-1 α 蛋白表达明显降低,可能为肺实质结构遭到明显损坏在分子水平上的体现^[23-24]。关于中医药对 COPD 患者肺组织、外周血单个核细胞中 Hif-1 α 表达水平的研究,目前报道较少。

Sirtuins 是近年来发现的组蛋白去乙酰化酶,Sirt1 是 Sirtuins 家族主要成员,Sirt1 通过组蛋白的赖氨酸残基去乙酰化,稳定核小体的结构,使炎症介质的基因转录被抑制而致基因沉默,炎症介质的合成减少,抑制炎症反应^[25-27]。提高 Sirt1 活性成为治疗 COPD 新的靶点^[28-29]。过氧化物使 Sirt1 活性降低甚至失去活性,对炎症因子基因的抑制作用减弱,炎症介质基因的转录、合成与释放增多,导致 COPD 的发生发展^[30-31]。Sirt1 激活剂能减少氧自由基生成、增强心脏 SOD 活性,缓解心肌氧化损伤和心室重塑^[32-33]。肾脏组织 Sirt1 表达与氧化损伤产物呈负相关^[34]。Vinciguerra 等^[35]发现,Sirt1 可通过抑制心肌氧化应激而阻止心力衰竭进程,保护心功能。本研究中经二陈汤加味治疗后 PBMCs 中 Sirt1 mRNA 表达,Sirt1 含量及其活性均显著增加,与文献报道一致^[36-37]。提示二陈汤加味可提高 COPD

患者 PBMCs 中 Sirt1 的表达与活性,对抗氧化损伤和炎症。

相关性分析结果显示,COPD 稳定期治疗组治疗后,Hif-1 α ,Sirt1 含量呈负相关;Sirt1 含量与 TNF- α ,IL-6 均呈负相关;Sirt1 含量与 SOD,GSH 均呈正相关。提示二陈汤加味可能通过增强 Sirt1,抑制 Hif-1 α 基因的表达与释放,发挥抗氧化损伤、抗炎的作用,从而保护肺组织。

[参考文献]

- [1] 谢翠英,刘小虹,钟小文. 中医药对 COPD 患者肺组织缺氧诱导因子 1 α 表达作用的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(3):245-247.
- [2] Mimura T,Kaji Y,Noma H, et al. The role of SIRT1 in ocular aging[J]. Exp Eye Res,2013,116(7):17-26.
- [3] 谢文英,尚立芝,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能、血气指标及病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):117-122.
- [4] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 肺组织炎症因子及氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24):118-122.
- [5] 谢文英,尚立芝,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-8 和白细胞介素-18 及炎细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(4):448-451.
- [6] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠气道水通道蛋白 5 和黏蛋白 5AC 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(22):111-117.
- [7] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对稳定期和急性加重期 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.
- [8] 张良芝,谢文英,常学辉. 爱罗咳喘宁口服液对慢性支气管炎大鼠模型 LTb4,IL-8 表达的影响[J]. 中医学报,2014,29(9):1267-1268.
- [9] 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]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(4):255-264.
- [10] Vestbo J,Hurd S S,Agustí A G, 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,2013,187(4):347-365.
- [11] 黄文东. 实用中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1985:166-176.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:61.
- [13] 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.
- [14] 赵蜀军, 蔡圣荣, 方志斌, 等. 慢性支气管炎肺气虚证大鼠血清 IL-8、MDA、SOD 变化特征[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(2):21-23.
- [15] Semenza G L, WANG G L. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation [J]. Mol Cell Biol, 1992, 12(12):5447-5454.
- [16] 耿书国, 刘频健, 汪建祥, 等. 缺氧诱导因子经典通路的拓展与干细胞调控[J]. 生理科学进展, 2015, 46(4):290-294.
- [17] 张红璇, 魏文婷, 于荣秀. 缺氧诱导因子 1- α 与慢性阻塞性肺疾病的相关研究进展[J]. 中国医药, 2009, 4(10):827-828.
- [18] 李启芳, 戴爱国. 大鼠缺氧性肺动脉高压过程中缺氧诱导因子 1- α 和血红素氧合酶 1 的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(7):1260-1264.
- [19] 陈云荣, 戴爱国, 胡瑞成. 缺氧诱导因子 1- α 与其脯氨酰羟化酶相互调控对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(10):668-673.
- [20] Compennolle V, Brusselmans K, Acker T, et al. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice [J]. Nat Med, 2002, 8(7):702-710.
- [21] 胡瑞成, 戴爱国, 谭双香. 慢性阻塞性肺病患者肺部缺氧诱导因子 1 α 表达研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(8):491-492.
- [22] 李启芳, 戴爱国, 徐平. 慢性阻塞性肺病患者肺小血管低氧诱导因子- α 的表达[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(2):136-139.
- [23] Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D, et al. Hypoxia inducible factor-1 α in human emphysema lung tissue [J]. Eur Respir J, 2011, 37(4):775-783.
- [24] 魏文婷, 李冰, 贾晔然, 等. 慢性阻塞性肺病患者肺组织中缺氧诱导因子 1 α 的表达变化[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(9):1700-1703.
- [25] Roper S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer[J]. Mol Oncol, 2007, 1(1):19-25.
- [26] ZHOU L, Ruvolo V R, McQueen T. HDAC inhibition by SNDX-275 (Entinostat) restores expression of silenced leukemia-associated transcription factors Nur77 and Nr1 and of key pro-apoptotic proteins in AML [J]. Leukemia, 2013, 27(6):1358-1368.
- [27] WANG X, SONG Y, Jennifer J L, et al. Inhibition of histone deacetylases antagonized FGF2 and IL-1 β effects on MMP expression in human articular chondrocytes [J]. Growth Factors, 2009, 27(1):40-49.
- [28] Barnes P J. New therapies for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Med Princ Pract, 2010, 19(5):330-338.
- [29] Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, et al. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the molecular culprit of inflammaging [J]. Ageing Res Rev, 2008, 7(2):83-105.
- [30] Adcock I M, Ito K, Barnes P J. Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases[J]. COPD, 2005, 2(4):445-455.
- [31] Caito S, Hwang J W, CHUNG S, et al. PARP-1 inhibition does not restore oxidant-mediated reduction in RIRT1 activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 39(2):264-270.
- [32] HU Y X, CUI H, FAN L, et al. Resveratrol attenuates left ventricular remodeling in old rats with COPD induced by cigarette smoke exposure and LPS instillation [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(12):1044-1054.
- [33] LI Y G, ZHU W, TAO J P, et al. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438(2):270-276.
- [34] 叶婷, 宁勇. 沉默信息调节因子 1 在肾脏衰老中的作用[J]. 中国老年学, 2014, 34(20):5768-5770.
- [35] Vinciguerra M, Santini M P, Martinez C, et al. IGF-1/JNK1/Sirt1 signaling confers protection against oxidative stress in the heart [J]. Aging Cell, 2012, 11(1):1339-1349.
- [36] Sadarani B N, Majumdar A S. Resveratrol potentiates the effect of dexamethasone in rat model of acute lung inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 28(1):773-779.
- [37] YAO H, Sundar I K, HUANG Y, et al. Disruption of sirtuin 1-mediated control of circadian molecular clock and inflammation in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 53(6):782-792.

[责任编辑 张丰丰]