

## 二陈汤加味对 COPD 大鼠转化生长因子- $\beta_1$ , 组蛋白去乙酰化酶 2 基因表达的影响

陈四清, 季书, 尚立芝\*, 谢文英, 张良芝, 刘坦, 张静, 胡文豪, 张森, 王祎  
(河南中医药大学基础医学院, 郑州 450046)

**[摘要]** 目的:观察二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织中转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )及其受体(TGF- $\beta$ RII)基因表达,外周血单个核细胞(PBMCs)中组蛋白去乙酰化酶2(HDAC2)基因表达及活性的影响。方法:采用烟熏加脂多糖方法制备 COPD 大鼠模型。随机分为正常组、模型组、二陈汤加味高、中、低剂量组(20,10,5 g·kg<sup>-1</sup>)。正常组、模型组灌胃生理盐水(10 g·kg<sup>-1</sup>),二陈汤加味高、中、低剂量组分别灌胃,连续 14 d。荧光酶联免疫法测定 PBMCs 中 HDAC2 活性,酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  及 PBMCs 中 HDAC2 含量;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  mRNA 及 PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达;免疫组化检测 TGF- $\beta_1$  与 TGF- $\beta$ RII 蛋白在肺组织的原位表达,光镜观察组织结构。结果:与正常组比较,模型组大鼠肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  含量升高( $P < 0.05$ );肺组织中 TGF- $\beta_1$  mRNA, TGF- $\beta_1$  与 TGF- $\beta$ RII 蛋白表达均显著增强( $P < 0.01$ );模型组大鼠 PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性均明显减低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),差异均有统计学意义。与模型组比较,二陈汤加味高、中剂量组肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达( $P < 0.01$ )和 TGF- $\beta_1$  蛋白含量均显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),免疫组化检测肺组织中 TGF- $\beta_1$  与 TGF- $\beta$ RII 蛋白表达均显著弱于模型组( $P < 0.01$ ),PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性均升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),肺组织结构明显改善。结论:二陈汤加味对 COPD 有抗炎作用。其机制可能与增强 PBMCs 中 HDAC2 基因表达,提高 HDAC2 活性,抑制 TGF- $\beta_1$  及其受体基因的表达有关。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病;肺功能;二陈汤加味;转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ );组蛋白去乙酰化酶 2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0147-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100147

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170308.0932.014.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-08 9:32

### Mechanism of Modified Erchentang on Expression of Transforming Growth Factor-beta 1 (TGF- $\beta_1$ ) and Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Gene in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CHEN Si-qing, JI Shu, SHANG Li-zhi\*, XIE Wen-ying, ZHANG Ling-zhi,  
LIU Tan, ZHANG Jing, HU Wen-hao, ZHANG Miao, WANG Yi

(School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of modified Erchentang on gene expression of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) and its receptor TGF- $\beta$ RII in lung tissue, the expression of mRNA and activity of histone deacetylase 2 (HDAC2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of rats with chronic obstructive

**[收稿日期]** 20160831(011)

**[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);河南省科技重点科技攻关项目(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课题(2013ZY02070)

**[第一作者]** 陈四清,副教授,从事中医药基础研究, Tel:0371-65934070, E-mail:hn890320@163.com

**[通讯作者]** \*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

pulmonary disease (COPD). **Method:** The method of smoke combined with lipopolysaccharide (LPS) was used to prepare COPD model in rats. The experimental animals were randomly divided into normal control group, model group, high, middle and low-dose modified Erchentang groups (20, 10, 5 g·kg<sup>-1</sup>). Normal group and model group were orally given normal saline (10 g·kg<sup>-1</sup>), and high, middle and low-dose modified Erchentang groups were orally given the drug for consecutively 14 days. The activity of HDAC2 was determinate by Enzyme-linked immune fluorescence. Euzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the levels of TGF-β<sub>1</sub> in lung homogenates and histone deacetylase 2 (HDAC2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of all groups before and after treatment. Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) method was used to detect the expression of TGF-β<sub>1</sub> mRNA and HDAC2 mRNA. Immunohistochemical (IHC) detection was performed for the expression of TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β<sub>R</sub> II protein in lung tissues. **Result:** Compared with the normal group, the levels of TGF-β<sub>1</sub> was significantly increased ( $P < 0.05$ ), expression of TGF-β<sub>1</sub> mRNA, and TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β<sub>R</sub> II protein expressions in lung homogenates were significantly higher ( $P < 0.01$ ), while the expression of mRNA, content and activity of HDAC2 in PBMCs were decreased significantly in model group, with statistically significant differences. Compared with the model group, expressions of TGF-β<sub>1</sub> mRNA ( $P < 0.01$ ) and TGF-β<sub>R</sub> II protein in lung tissue of the rats treated with high and middle-dose modified Erchentang (20, 10 g·kg<sup>-1</sup>) were decreased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β<sub>R</sub> II protein expressions were lower than model group ( $P < 0.01$ ), the expression of HDAC2 mRNA, content and activity of HDAC2 were higher significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), with statistical significance and obvious improvement in lung tissue structures. **Conclusion:** Modified Erchentang has an anti-inflammatory effect on COPD. Its mechanism may be correlated with inhibition of expression of TGF-β<sub>1</sub> and TGF-β receptor II genes, improvement of the expression and activity of HDAC2 in PBMCs, and inhibition of the inflammatory response.

[ **Key words** ] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); lung function; modified Erchentang; transforming growth factor-beta 1 (TGF-β<sub>1</sub>); histone deacetylase 2 (HDAC2)

随着大气污染和老龄化日益加重,目前慢性阻塞性肺疾病(COPD)的患病率、复发率和死亡率呈递增趋势<sup>[1-3]</sup>,探究有效治疗COPD的药物及其药理机制是目前研究的热点。基于COPD慢性炎症过程中气道及肺组织内浸润的炎细胞及其释放的细胞因子如转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-8(IL-8),IL-6等对肺组织的损伤机制<sup>[4-6]</sup>,组蛋白去乙酰化酶(HDAC)对细胞因子基因表达的调节作用<sup>[7]</sup>,结合中医方证相关理论,本课题组选用《太平惠民和剂局方》中的二陈汤,拟定基于二陈汤加减的爱罗咳喘宁方,前期临床观察和实验研究发现其对COPD的效果显著<sup>[8-13]</sup>,但其药理机制有待揭示。本研究制备COPD大鼠模型,观察二陈汤加味对参与COPD炎症反应的TGF-β<sub>1</sub>及其受体(TGF-β<sub>R</sub> II)基因表达,外周血单个核细胞(PBMCs)中HDAC2基因表达与活性的影响,为临床应用二陈汤加味治疗COPD提供分子依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 6月龄SD雄性大鼠50只,SPF级,体重230~270g。河南省动物实验中心出售,许可证

号SCXK(豫)2010-0002,河南省动物质量监督监测站(质量合格证41003100001905),实验单位使用许可证号SYXK(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** 二陈汤加味方药物组成:麻黄(蜜)6g(批号1403125s),半夏(姜)10g(批号1309001H),葶苈子10g(批号1308001s),茯苓15g(批号1309001H),地龙10g(批号1103001S),陈皮10g(批号1302001H),党参10g(批号1407007w),白术10g(批号1407001W),苦杏仁10g(批号1304002S),山药10g(批号1210007H),干姜5g(批号1303001H),甘草6g(批号1302001S)等均为三九医药生产的中药配方颗粒。脂多糖(LPS,美国Solarbio公司,批号L8880,701c034)。TGF-β<sub>1</sub>酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号m1002856);HDAC2 ELISA检测试剂盒(美国Epigentek公司,批号P-4006-96);HDAC2活性检测试剂盒(美国Biovision公司,批号K341-25);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) 试剂及 Oligo 合成试剂 (南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 RNA-50, R211-01, Q141-02, D12540); TGF- $\beta_1$  兔抗大鼠一抗, TGF- $\beta$ R II 兔抗大鼠一抗, ABC 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物公司, 批号分别为 1714116, 89111S458, SA1022, AR1022)。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
HDAC2	上游 5'-AGCCCATGGCGTACAGTCAA-3'	245
	下游 5'-GGGATGACCCTGGCCATAATAA-3'	
TGF- $\beta_1$	上游 5'-GAAGGACCTGGGTTGGAAGT-3'	138
	下游 5'-CGGGTTGTGTTGTTGTAGAG-3'	
GAPDH	上游 5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'	223
	下游 5'-AGCCACCAATCCACACAG-3'	

**1.3 仪器** TopScan 型小动物肺功能测量系统 (吉安德尔科技有限公司); inspira 型小动物用呼吸机 (日本光电公司); DU640 型紫外分光光度计 (美国 BECKMAN); DHP-260 型电热恒温培养箱 (金坛市白塔新宝仪器厂); TGL-16GA 型低温高速离心机 (上海安亭仪器厂); Powerwave XS 型波长扫描酶标仪 (美国 Bio-tek 公司); 1575 型全自动酶标洗板机 (美国伯乐公司); Micro 17R 型小型台式冷冻高速离心机 (美国热电公司); 272007028 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied biosystems 公司); TP1020 型全自动组织处理机, EG1150 ST5020 型自动包埋机, RM 2265 型全自动轮转切片机, RM2245 型高精度的电动进样切片机, EM UC7 型超薄切片机, HI1210 型摊片机及 HI1220 型烘片机 (德国 Leica 公司); U-CMAD3 型显微镜, 20486 显微摄像仪, BX51 + CCD 病理图像分析系统 (日本 Olympus 公司); Motic 数字切片扫描系统 (香港 MOTIC 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组、模型制备与给药** 大鼠随机分为 5 组, 分别为正常组、模型组、二陈汤加味 20, 10, 5 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组, 每组 10 只。参照文献 [14-15] 制备熏香烟加注 LPS 诱导 COPD 大鼠模型: 在造模第 1, 14 天, 所有动物均经气管注入溶于生理盐水的脂多糖 200  $\mu$ L (1 g·L<sup>-1</sup>), 除第 14 天外, 第 2 至第 30 天将大鼠置入熏箱内 (50 cm × 50 cm × 40 cm), 熏香烟烟雾染毒, 2 次/d (8 支/次), 30 min/次, 正常组不熏

烟。模型制备成功后, 参考文献 [16-18], 正常组、模型组给予生理盐水 (10 mL·kg<sup>-1</sup>) 灌胃 (ig), 二陈汤加味 20, 10, 5 g·kg<sup>-1</sup>, 将药物溶于 6 mL 生理盐水中, 每次 3 mL, 每天上午 10:00, 下午 6:00 各 ig 一次。连续 14 d。

## 2.2 指标观测

**2.2.1 大鼠一般状态观察** 观察实验中各组大鼠的生活状态及死亡情况。

**2.2.2 Ficoll-Hypaque 密度分离法分离外周血单个核细胞** 取肝素抗凝、离心后的外周血沉淀物 1 mL 放入与等量生理盐水充分混合, 沿管壁缓慢叠加于淋巴细胞分离液液面上, 注意保持清楚的界面。3 000 r·min<sup>-1</sup> 水平离心 15 min。离心后管内分为 3 层, 上层为血浆和生理盐水, 下层主要为红细胞和粒细胞, 中间层为淋巴细胞分离液, 在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的白色云雾层狭窄带, 单个核细胞包括淋巴细胞和单核细胞。用毛细吸管插入到云雾层, 吸取单个核细胞, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 5 倍以上生理盐水, 1 万 r·min<sup>-1</sup> 离心 1 min, 洗涤细胞 2 次。

**2.2.3 PBMCs 中 HDAC2 活性检测** 使用活性荧光分析试剂盒, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

**2.2.4 ELISA 法检测肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  及 PBMCs 中 HDAC2 含量** 按照试剂盒说明书进行操作。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 A, 通过标准曲线计算样品中大鼠肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$ , PBMCs 中 HDAC2 含量。

**2.2.5 Real-time PCR 法检测肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$ , PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达** 用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 逆转录试剂盒反转录合成 cDNA。按逆转录试剂盒配制 cDNA 合成所需反应液: Hiscript II Enzyme MIX 2  $\mu$ L, 2 × RT Mix 10  $\mu$ L, Oligo dT 1  $\mu$ L, Random hexamers 1  $\mu$ L, 提取的总 RNA 3  $\mu$ L, 双蒸水 (配) 3  $\mu$ L, 共 20  $\mu$ L, 混匀 30 s, 离心 30 s, 普通 PCR 仪中 25  $^{\circ}$ C 5 min, 42  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 min。把 Real-time PCR 染料和引物、内参于 4  $^{\circ}$ C 混匀、离心, 放入 Real-time PCR 仪, 按说明书两步法程序进行反应。取得扩增曲线、扩增产物溶解曲线及 C<sub>t</sub> 值。用 Real-time PCR 仪进行扩增。采用 20  $\mu$ L 反应体系。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 共 40 个循环。采用仪器自带软件进行数据和溶解曲线分析, 计算各组 TGF- $\beta_1$ , HDAC2 mRNA 相对表达量。

**2.2.6 肺组织病理标本制备及染色** 取右下肺组织,10% 甲醛固定,常规包埋,4~5  $\mu\text{m}$  厚切片,苏木素-伊红(HE)染色。

**2.2.7 免疫组化检测肺组织 TGF- $\beta_1$  及 TGF- $\beta\text{R II}$  蛋白表达** ①切片脱蜡至水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶。②羊血清封闭,加第一抗工作液。③加生物素化二抗工作液,链霉亲素-过氧化物酶复合物,DAB 显色,苏木素复染。PBS 替代一抗作阴性。免疫组化结果判断以棕黄色颗粒为阳性表达,随即选取 10 个高倍视野,用全自动图像分析系统,取阳性染色积分吸光度 IA 平均值。

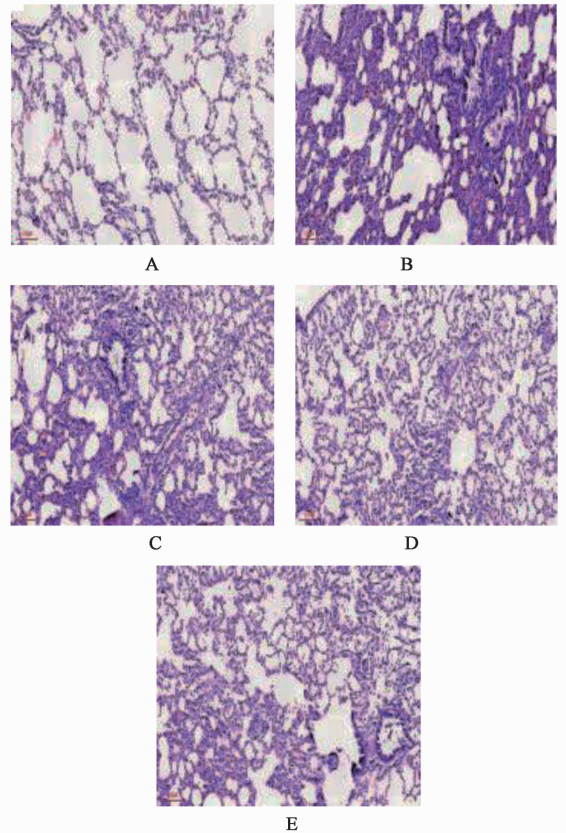
**2.3 统计学分析** 采用 SPSS 11.5 进行数据处理,计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间均数比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 大鼠一般状况** 实验结束时,正常组,一般状况好,体重增长,无死亡。模型组和低剂量组体重较造模前下降或略有增加,各死亡 2 只。二陈汤加味高、中剂量组体重增加,各死亡 1 只。

**3.2 对 COPD 大鼠肺组织病理变化的影响** 肉眼观察正常组气管、支气管和肺脏呈粉红色,气道腔内无分泌物;肺脏表面光滑,无斑点,柔软富有弹性,边缘锐。模型组气管、支气管及细支气管腔内有过多黄绿色黏稠分泌物,气道黏膜红肿;两侧肺脏体积明显膨大,颜色深红偏暗,弹性差,指压后压痕不易消退,边缘钝圆,表面粗糙,部分区域有斑点,可见局部灰白色隆起,肺切面可见大小不等、分布不均的囊肿。高、中、低剂量治疗组气道分泌物少、黏膜完整;肺脏颜色较正常组加深,体积略大,部分肺脏可见表面不光滑且有灰白色隆起、边缘钝圆。镜下观察正常组气管、支气管和细支气管管腔内未见异常渗出物,气道黏膜结构完整,纤毛细胞和杯状细胞有序排列,固有层结缔组织无纤维化改变,黏膜下各层均未见炎细胞浸润及腺体增生;肺泡壁结构完整,肺泡腔内及肺泡间隔未见炎细胞浸润,未见肺气肿。模型组气道腔内有黏液、脓性渗出物,其中含有浆液、纤维素、炎细胞、巨噬细胞和脱落的黏膜等,气道管腔呈不规则扩张,管壁黏膜上皮细胞不均匀脱落,管壁各层有大量炎细胞浸润,局部小血管充血,血管周围水肿,间质成纤维细胞和纤维细胞增生、细胞外基质增多,细支气管管壁明显增厚;肺泡内渗出物中可见大量炎症细胞聚集,肺泡间质明显增厚,有大量炎细胞浸润,远端肺泡可见局部肺不张及周围肺大泡。与模型组比较,二陈汤加味中剂量组细支气管管腔

内分泌物少,黏膜上皮变性、坏死较轻,黏膜有修复改变,近于完整,炎细胞减少,间质变薄;肺组织极少见充血,部分血管外周围的水肿减轻,肺组织结构趋向正常;二陈汤加味高、低剂量组恢复均差于中剂量组,少量炎细胞浸润,部分肺泡轻度扩张。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 二陈汤加味 5  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;D. 二陈汤加味 10  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组;E. 二陈汤加味 20  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组(图 2,3 同)

图 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织病理变化的影响(HE,  $\times 100$ )

Fig.1 Effect of modified Erchentang on lung tissue pathology in COPD rats(HE,  $\times 100$ )

**3.3 对 COPD 大鼠肺组织中 TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta\text{R II}$  表达的影响** 免疫组化结果显示,TGF- $\beta_1$  蛋白的表达以棕黄色作为阳性表达,I 型及 II 型肺泡上皮细胞胞浆、胞核均阳性表达,细支气管上皮胞浆阳性表达;TGF- $\beta\text{R II}$  的阳性显色位于 I 型肺泡上皮细胞膜阳性表达,II 型肺泡上皮细胞膜阳性表达,细支气管上皮细胞膜阳性表达。见图 2,3。模型组 TGF- $\beta_1$  与 TGF- $\beta\text{R II}$  共同表达于肺泡上皮细胞,中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞。与正常组比较,模型组肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达及含量均显著升高( $P < 0.01$ ),TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta\text{R II}$  蛋白在肺组织中的原位表达显著增强( $P < 0.01$ )。与模型组比较,二

陈汤加味中、高剂量组 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ), TGF- $\beta_1$  含量明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), TGF- $\beta_1$  原位表达显著减弱 ( $P < 0.01$ ), TGF- $\beta R II$  蛋白在肺组织中的原位表达显著减弱 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

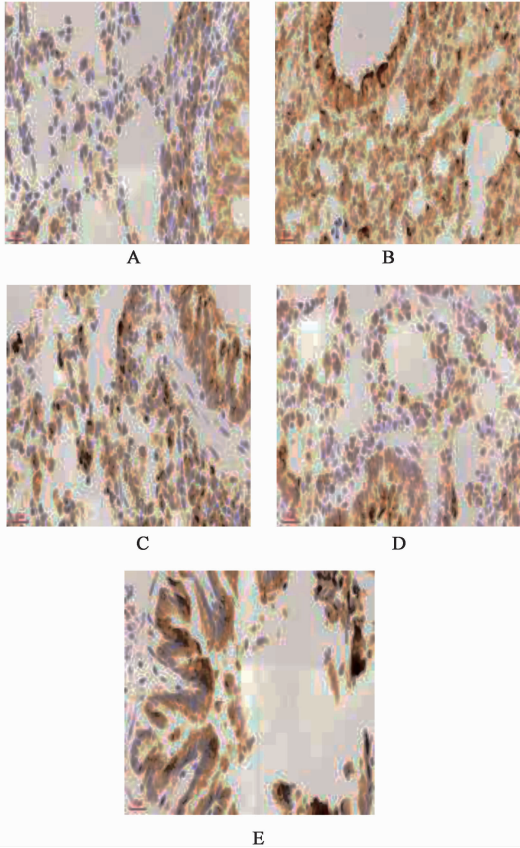


图 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Effect of modified Erchentang on expression of TGF- $\beta_1$  protein in lung tissue of COPD rats (IHC,  $\times 400$ )

表 1 二陈汤加味对各组大鼠肺组织 TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta R II$  表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of modified Erchentang on expression of TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta R II$  genes of rats lung tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肺匀浆		肺组织 (IA)	
			TGF- $\beta_1$ mRNA	TGF- $\beta_1 / ng \cdot g^{-1}$	TGF- $\beta_1$	TGF- $\beta R II$
正常	10	-	0.46 $\pm$ 0.24	105.31 $\pm$ 0.47	0.55 $\pm$ 0.13	0.67 $\pm$ 0.31
模型	8	-	6.59 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>	246.58 $\pm$ 1.47 <sup>2)</sup>	9.06 $\pm$ 0.57 <sup>2)</sup>	9.36 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>
二陈汤加味	8	5	5.35 $\pm$ 0.23 <sup>3)</sup>	205.17 $\pm$ 1.82 <sup>3)</sup>	7.45 $\pm$ 0.25 <sup>3)</sup>	6.27 $\pm$ 0.41 <sup>3)</sup>
	9	10	3.21 $\pm$ 0.11 <sup>4)</sup>	157.15 $\pm$ 1.57 <sup>4)</sup>	3.87 $\pm$ 0.30 <sup>4)</sup>	5.03 $\pm$ 0.25 <sup>4)</sup>
	9	20	3.65 $\pm$ 0.41 <sup>4)</sup>	195.14 $\pm$ 1.21 <sup>3)</sup>	4.70 $\pm$ 0.16 <sup>4)</sup>	5.21 $\pm$ 0.36 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

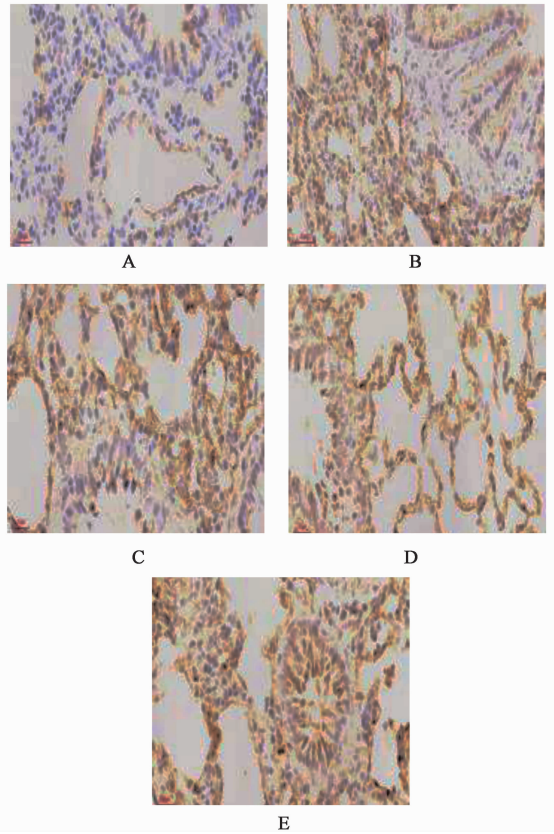


图 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 TGF- $\beta R II$  蛋白表达 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 3 Effect of modified Erchentang on expression of TGF- $\beta R II$  protein in lung tissue of COPD rats (IHC,  $\times 400$ )

3.4 对外周血单个核细胞中 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性的影响 与正常组比较,模型组 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组 HDAC2 mRNA 表达、含量及活性明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

#### 4 讨论

COPD 是由炎症继发的不可逆气流受限为特征

的呼吸系统常见病。其临床表现属中医“咳嗽”、“痰饮”、“喘证”等范畴,中医认为其标在肺,其本在

表 2 二陈汤加味对外周血单个核细胞中 HDAC2 含量, HDAC2 mRNA 表达及其活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of modified Erchentang on expression of content, mRNA and activity of HDAC2 of rats lung tissue in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	HDAC2 含量	HDAC2 mRNA	HDAC2 活性 RFU·(h·μg) <sup>-1</sup>
正常	10	-	1.40 ± 1.78	0.69 ± 0.07	1.52 ± 0.34
模型	8	-	0.61 ± 0.57 <sup>1)</sup>	0.29 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.36 ± 0.41 <sup>2)</sup>
二陈汤加味	8	5	0.50 ± 1.54 <sup>3)</sup>	0.31 ± 0.09	0.57 ± 0.12 <sup>3)</sup>
	9	10	1.32 ± 0.22 <sup>3)</sup>	0.45 ± 0.06 <sup>3)</sup>	1.32 ± 0.37 <sup>4)</sup>
	9	20	1.37 ± 0.43 <sup>4)</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>3)</sup>	1.39 ± 0.43 <sup>3)</sup>

脾、肾。二陈汤源于宋代《太平惠民和剂局方》，由半夏、陈皮、茯苓、甘草组成。方中半夏燥湿化痰，主治脾湿痰壅之痰多咳喘气逆；陈皮燥湿化痰，理气健脾、和胃止呕；以茯苓健脾渗湿，宁心安神之功用；甘草补脾益气、润肺止咳。诸药合用共奏燥湿和中，理气化痰之功。本方在二陈汤基础上加麻黄（蜜）、苦杏仁以祛痰止咳平喘；加葶苈子以泻肺降气，加干姜、党参、白术、山药、地龙温肺祛寒、健脾和胃、固肾益精、活血祛瘀。诸药合用，共奏宣肺降气、燥湿化痰、止咳平喘、健脾固肾、活血通络之功。前期临床观察疗效显著，但其作用机制有待研究<sup>[8-13]</sup>。

COPD 的病理基础主要是炎症，气道与肺实质的持续炎症涉及炎症细胞及其释放的各种细胞因子。细胞外多种刺激如病原微生物成分 LPS，葡萄球菌的蛋白聚糖等<sup>[19-20]</sup>，促进细胞因子 TGF-β<sub>1</sub>，白细胞介素 (IL)-8, IL-6, 肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 等的转录、翻译与释放，这些细胞因子诱导中性粒细胞等炎细胞的渗出和激活，活化的炎细胞释放更多的细胞因子、过氧化物酶、蛋白溶解酶等，进而加重肺部炎症和组织损伤<sup>[8, 10, 13, 21]</sup>。TGF-β<sub>1</sub> 与 TGF-βR II 结合形成二聚体后，参与多种炎症因子的释放<sup>[22]</sup>。特异性 TGF-β<sub>1</sub> 受体阻断剂能够减轻炎症反应，抑制脂多糖诱导的 IL-1, TNF-α 等细胞因子的释放，发挥抗炎作用<sup>[23]</sup>。TGF-β<sub>1</sub> 参与对 LPS 诱导肺巨噬细胞释放细胞因子的调控<sup>[24]</sup>。本研究显示，模型组大鼠肺组织 TGF-β<sub>1</sub>, TGF-βR II 蛋白的表达明显高于正常对照组，提示 TGF-β<sub>1</sub> 与 TGF-βR II 参与 COPD 的炎症反应。模型组肺匀浆中 TGF-β<sub>1</sub> mRNA, TGF-β<sub>1</sub> 含量均显著增高，提示 COPD 过程中 TGF-β<sub>1</sub> 基因表达增强并分泌增多。与模型组比较，二陈汤加味 10, 20 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组 TGF-β<sub>1</sub> mRNA, TGF-β<sub>1</sub> 及 TGF-βR II 蛋白表达均显著降低，提示二陈汤加味可能通过抑制 TGF-β<sub>1</sub>, TGF-βR II 基因表达，发挥抗炎作用，肺组织病理变化予以佐证。

炎症伴随 COPD 病变的全过程，组蛋白乙酰化

酶 (histone acetyl transferase, HAT) 和组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 是调节炎症介质基因表达的关键酶。在细胞核内，HAT/HDAC 的动态平衡控制着组蛋白乙酰化与去乙酰化，从而调控染色质的结构和基因表达<sup>[25]</sup>，影响炎症的进程与结局。HAT 使组蛋白乙酰化，使炎症介质的基因由关闭变为开放状态，促进炎症介质基因的转录和翻译<sup>[26]</sup>。HDAC 使组蛋白去乙酰化，恢复组蛋白正电荷，与带负电荷的 DNA 紧密结合，稳定核小体的结构，染色质更加卷曲致密，阻碍转录因子与 DNA 结合，基因的转录受到抑制而使基因沉默<sup>[27]</sup>。HDAC 抑制细胞因子的转录和合成，抑制炎症反应<sup>[28-30]</sup>。HDAC2 属于 HDAC 家族成员，HDAC2 直接参与 COPD 的炎症过程<sup>[31-33]</sup>。HDAC2 是糖皮质激素介导的抗炎活性所必需的酶，糖皮质激素通过诱导组蛋白去乙酰化酶基因表达、增加 HDAC2 的活性<sup>[34]</sup>。本研究显示，与正常组比较，模型组 PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性均显著减低，与文献报道一致<sup>[35-36]</sup>。HDAC2 的下降使得组蛋白去乙酰化减弱，HAT/HDAC 失衡导致组蛋白乙酰化活性增强，引起 DNA 双链打开，使得炎症介质的转录因子易与 DNA 结合，启动炎症介质基因的转录，从而炎症介质 TGF-β<sub>1</sub> 等基因的转录、翻译与释放增加<sup>[37]</sup>。与模型组比较，二陈汤加味中、高剂量组 PBMCs 中 HDAC2 mRNA 表达、含量及其活性均显著增加，提示二陈汤加味可能通过上调 HDAC2 而抑制炎症基因的表达。

综上所述，二陈汤加味可能通过上调 PBMCs 中 HDAC2 基因表达、含量及其活性，抑制 TGF-β<sub>1</sub> 基因的转录与翻译、同时抑制 TGF-βR II 基因的表达，从而对抗炎症，发挥保护肺组织的作用。有关其详细机制，有待深入研究。

[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 ] 葛均波,徐永健.内科学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2013:21-25.
- [ 3 ] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会.慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011版)[J].中医杂志,2012,53(2):177-178.
- [ 4 ] Fisman E Z, Motro M, Tenenbaum A. Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification the bad the good and the aloof Cardiovasc[J]. Diabetology,2003,2(1):11-15.
- [ 5 ] Utsugi M, Dobashi K, Kaga Y, et al. Glnthione redox regulates lipolysaccharideinduced IL-12 production through p38 mitogen activated protein kinase activation in human monocytes role of glutathi one redox in IFN-gamma prining of IL-12 productioy [J]. Leukoo Biol, 2002,71:339-347.
- [ 6 ] 刘经义,李德光,李素萍. COPD 急性发作期和缓解期血清细胞因子水平的变化[J]. 山东医药,2010,50(33):87-88.
- [ 7 ] 陈延伟,艾文,李一禄,等. 1-磷酸鞘氨醇在慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部炎症作用的研究[J]. 武汉大学学报:医学版,2015,36(1):11-14.
- [ 8 ] 尚立芝,王峰,谢文英,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠可溶性细胞间黏附分子-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-6 及炎症细胞的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(17):4762-4763.
- [ 9 ] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠 p38MAPK、TNF- $\alpha$  及 AQP5 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):174-179.
- [ 10 ] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠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):168-171.
- [ 11 ] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠白三烯 B4、白细胞介素-6 及肺组织病理形态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):170-173.
- [ 12 ] 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):127-132.
- [ 13 ] 尚立芝,张紫娟,谢文英,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-2、髓过氧化物酶及肺组织病理变化的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(20):5705-5708.
- [ 14 ] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease: experimental animalmodels of ulmonary emphysema[J]. Thorax,2002,57(10):908-914.
- [ 15 ] 宋小莲,王昌惠,白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型比较[J]. 第二军医大学学报,2010,31(3):246-249.
- [ 16 ] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾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):556-557.
- [ 17 ] 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):127-133.
- [ 18 ] 尚立芝,张紫娟,谢文英,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-2、髓过氧化物酶、炎细胞及肺组织病理变化的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(20):5705-5708.
- [ 19 ] 黄建华,李理,袁伟锋,等. 肺表面活性物质对 LPS 诱导的急性肺损伤小鼠的肺保护作用及可能机制[J]. 免疫学杂志,2013,29(7):583-587.
- [ 20 ] 李亚清,严建平,许武林,等. 核因子  $\kappa$ B 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶调节脂多糖诱导的气道上皮细胞白介素 8 的表达[J]. 中国药理学通报,2011,27(2):182-186.
- [ 21 ] 彭红星,杨荣时,曾玉兰,等. 吸烟诱导的慢性支气管炎大鼠模型巨噬细胞炎性蛋白-2 及髓氧化物酶研究[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(12):10-13.
- [ 22 ] 王今越,丁树哲,王小虹,等. p38, NF- $\kappa$ B, IL-6 在长期大强度运动诱导大鼠骨骼肌发生中的作用[J]. 体育科学,2010,30(2):75-82.
- [ 23 ] Schiffer M, von Gersdorff G, Bitzer M, et al. Smad proteins and transforming growth factor-beta signaling [J]. Kidney Int Suppl,2000,77(2):45-52.
- [ 24 ] Ten Dijke P, Hill C S. New insights into TGF-beta-Smad signaling [J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(5):265-273.
- [ 25 ] Adcock I M. Glucocorticoid-regulated transcription factors [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2001, 14(3):211-219.
- [ 26 ] 王洁,张心怡,郝彩丽,等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂的研究进展. 现代生物医学进展,2014,14(14):2783-2785.
- [ 27 ] Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer [J]. Mol Oncol,2007,1(1):19-25.
- [ 28 ] ZHOU L, Ruvolo V R, McQueen T. HDAC inhibition by SNDX-275 (Entinostat) restores expression of silenced leukemia-associated transcription factors Nur77 and Nor1 and of key pro-apoptotic proteins in AML [J]. Leukemia,2013,27(6):1358-1368.
- [ 29 ] WANG X, SONG Y, Jennifer J L, et al. Inhibition of histone deacetylases antagonized FGF2 and IL-1 $\beta$  effects on MMP expression in human articular chondrocytes [J]. Growth Factors,2009,27(1):40-49.
- [ 30 ] Espallergues J, Teegarden S L, Veerakumar A, et al.

- HDAC6 regu-lates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(13):4400-4416.
- [31] To M, Takagi D, Akashi K, et al. Sputum plasminogen activator inhibitor-1 elevation by oxidative stress-dependent nuclear factor- $\kappa$ B activation in COPD [J]. *Chest*, 2013, 144(2):515-521.
- [32] Ito K, Ito M, Elliott W M. Deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(19):1967-1976.
- [33] Barnes P J. Histone deacetylase-2 and airway disease [J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2009, 3(5):235-243.
- [34] Pace E, Ferraro M, Di Vincenzo S, et al. Comparative cytoprotective effects of carbocysteine and fluticasone propionate in cigarette smoke extract-stimulated bronchial epithelial cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18(6):733-743.
- [35] 王玉梅, 黄琼, 罗鹏, 等. 香烟对大鼠肺白介素-8、谷胱甘肽及组蛋白去乙酰化酶 2 的影响 [J]. *中国医学创新*, 2014, 11(22):18-23.
- [36] Cosio B G, Tsaprouni L, Ito K, et al. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(5):689-695.
- [37] Barnes P J. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD [J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71(3):451-464.
- [责任编辑 周冰冰]

## 《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)  
刘春生教授(北京中医药大学)  
沈祥春教授(贵阳医学院药学院)  
王长虹教授(上海中医药大学)  
倪艳教授(山西省中医药研究院)  
倪健教授(北京中医药大学)  
赵艳玲研究员(解放军 302 医院)  
李孝栋教授(福建中医药大学)  
康文艺教授(河南大学)  
张艳教授(辽宁中医药大学)  
任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)  
蔡宇教授(暨南大学药学院)  
王冰副教授(上海中医药大学)  
袁子民副教授(辽宁中医药大学)  
张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。