

## 清金化痰汤通过调节 p62 对 AECOPD 炎症因子的影响

潘瑾<sup>1,2</sup>, 赵媚<sup>1,2</sup>, 王光耀<sup>1,2</sup>, 许光兰<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001;

2. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

**[摘要]** 目的:通过清金化痰汤调节慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)大鼠气道上皮细胞的自噬蛋白 p62,探讨其对白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白三烯 B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)以及白三烯 C<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>)的影响。方法:原代培养气道上皮细胞和 AECOPD 气道上皮细胞,另将 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 6 组清金化痰汤高、中、低剂量组、罗红霉素组、模型组以及正常组,各 10 只。除正常组外,其余各组采用脂多糖(LPS)气管滴入法+烟熏联合方法构建 AECOPD 模型。造模后清金化痰汤高、中、低剂量组分别灌胃给予 30, 15, 7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量,罗红霉素组灌胃给予 0.0175 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 剂量,模型组和正常组灌胃生理盐水,灌胃体积为 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。给药 2 周后提取血清,用含药血清干预细胞,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> 和 LTC<sub>4</sub> 的含量变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺气道上皮细胞中 p62 mRNA 及蛋白的表达。结果:ELISA 结果显示,与正常组比较,模型组中的 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> 显著升高(P<0.01),与模型组比较,各给药组细胞上清液中的 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> 显著降低(P<0.01);p62 mRNA 和蛋白表达结果显示,与正常组比较,模型组 p62 mRNA 和蛋白表达显著降低(P<0.01),与模型组比较,各给药组 p62 mRNA 和蛋白表达显著升高(P<0.01),清金化痰汤高剂量组与罗红霉素组自噬表达相当。结论:清金化痰汤能降低气道上皮细胞中炎症反应的机制可能与调节自噬蛋白 p62 有关。

**[关键词]** 清金化痰汤;慢性阻塞性肺疾病急性加重期;自噬;p62;慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD);中药

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0064-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201102

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200302.1739.004.html>

**[网络出版日期]** 2020-3-3 10:28

### Effect of Qingjin Huatantang on AECOPD Inflammatory Factors by Regulating p62

PAN Jin<sup>1,2</sup>, ZHAO Mei<sup>1,2</sup>, WANG Guang-yao<sup>1,2</sup>, XU Guang-lan<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** To regulate autophagy protein p62 of airway epithelial cells in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) rats with Qingjin Huatantang, in order to explore its effect on interleukin (IL) -1 $\beta$  and tumor necrosis, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), and leukotriene C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). **Method:** Airway epithelial cells and AECOPD airway epithelial cells were cultured. Sixty SPF male SD rats were randomly divided into 6 groups, namely high, medium and low-dose Qingjin Huatantang groups, western medicine group, model group and normal group. Except for the normal group, the remaining groups were included into the AECOPD model by lipopolysaccharide (LPS) tracheal instillation method + fumigation method. After modeling, the dosage of the high-dose traditional Chinese medicine group was 30 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, that of the middle-dose group was 15 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, that of the low-dose group

**[收稿日期]** 20191009(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(8176150124)

**[第一作者]** 潘瑾,在读硕士,医师,从事中西医结合呼吸系统疾病防治研究,E-mail:805234214@qq.com

**[通信作者]** \*许光兰,主任医师,从事呼吸系统疾病研究,Tel:0771-4733943,E-mail:xg119592@126.com

was  $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , the positive control group was given luo erythromycin ( $0.0175 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), the model group and the blank control group were orally given normal saline with the volume of  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Serum was extracted two weeks after administration, and the cells were intervened with drug-containing serum. The content of interleukin IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , and LTB $_4$  in cell supernatants were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). And LTC $_4$  content, p62 mRNA and protein expressions in lung airway epithelial cells were detected by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with the normal group, ELISA results showed that IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB $_4$ , and LTC $_4$  in the model group were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB $_4$ , LTC $_4$  in cell supernatants in each administration group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), mRNA and protein expressions in p62 showed that compared with the normal group, mRNA and protein expressions in p62 of model group significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the mRNA and protein expressions of p62 in each administration group significantly increased to different degrees ( $P < 0.01$ ). The expression of autophagy in Qingjin Huatantang high-dose group and western medicine group was comparable. **Conclusion:** Qingjin Huatantang can reduce the inflammatory response in airway epithelial cells, which may be related to the regulation of autophagy protein p62.

**[Key words]** Qingjin Huatantang; acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease; autophagy; p62; acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD); traditional Chinese medicine

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是全球发病率和死亡率的主要原因,每年超过12万人死于该疾病,香烟烟雾是造成大多数病例的原因<sup>[1]</sup>。COPD的主要病理特征是慢性气道炎症,而气道上皮损伤是COPD的重要病理基础<sup>[2]</sup>。被激活的气道上皮细胞可作为一种效应细胞,刺激以中性粒细胞和巨噬细胞为主的炎性细胞释放出大量炎症介质在气道内募集,加重气道炎症<sup>[3]</sup>。越来越多的证据表明自噬参与COPD的发病机制<sup>[4-6]</sup>,其在气道炎症中的作用尤为突出。在COPD中受损的气道上皮细胞可以通过诱导自身细胞内外自噬的发生抑制炎症因子及炎症介质的释放从而减轻气道炎症反应。自噬在炎症介质中具有重要作用,其关系既有诱导性又有抑制性<sup>[7-8]</sup>,一方面自噬通过降解炎症小体,抑制炎症因子的分泌,使炎症因子分泌减少。另一方面,抑制自噬能诱导细胞凋亡以及激活炎症因子。众所周知,中医药治疗疾病的效果越来越显著,特别是在改善呼吸系统症状和降低COPD急性加重期发生率方面占有优势。本课题组前期研究发现,在慢性阻塞性肺疾病急性加重期(AECOPD)中,痰热郁肺证占首位<sup>[9]</sup>。清金化痰汤来源《医学统旨》,具有清肺化痰的功效,是治疗痰热郁肺型AECOPD的常用方。前期研究表明清金化痰汤对AECOPD具有一定抗炎的疗效,能改善气道炎症<sup>[10-11]</sup>,本研究探讨清金化痰汤是否可以通过调节自噬来实现抗炎的

作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠60只,体质量( $200 \pm 20$ )g,来自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2016-0002。饲养于广西中医药大学SPF动物实验,实验经广西中医药大学伦理委员会批准,批件号2016-KY-NSFC-148,实验室室内温度( $21 \pm 3$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度适中,室内整洁,采光、通风良好,自由饮食与摄取。

**1.2 药物** 清金化痰汤组成:黄芩15g(批号1710223),桔梗15g(批号20160912),麦冬(去心)10g(批号20170321),栀子15g(批号20161205),浙贝母10g(批号20160605),茯苓10g(批号20171128),桑白皮12g(批号20170804),橘红15g(批号1607155),川芎15g(批号1609236),知母12g(批号1704191),瓜蒌仁(炒)15g(批号20171113),赤芍10g(批号20170603),丹参15g(批号1605284),甘草片10g(批号1707247),各药采用免煎颗粒剂,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以上剂量配制,蒸馏水溶解,最终调至含药量 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。罗红霉素分散片(成都泰合健康科技集团股份有限公司华神制药厂,批号H20010401)。

**1.3 试剂** 真龙牌香烟(南宁卷烟厂);脂多糖(LPS),链霉菌蛋白酶粉(美国Sigma公司,批号分

别为 L2880, SLBW4719); DMEM/F-12, 高糖 DMEM, 胎牛血清(美国赛默飞世尔公司, 批号分别为 8759352, 1828728, AC13714266); 青-链霉素溶液, 0.25%的胰蛋白酶(杭州吉诺生物医药技术有限公司, 批号分别为 GNM15140, GNM15400); D-Hanks液, DAPI染色液, 内参 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)小鼠单克隆抗体, 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔二抗, HRP-羊抗小鼠二抗(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 14A26C79, 13K22C77, BM0627, BA1054, BA1050); p62 兔单克隆抗体(美国 Abcam 公司, 批号 ab109012); trizol(美国 Invitrogen 公司, 批号 182805); 逆转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 #K1622); TB Green 嵌合实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒[宝日生物技术(北京)有限公司, 批号 v201801w]; 大鼠白细胞介素(IL)-1 $\beta$ , 肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), 白三烯 B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)以及白三烯 C<sub>4</sub>(LTC<sub>4</sub>)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(武汉华美生物工程有限公司, 批号分别为 201709, 201710, 201714, 201715)

**1.4 仪器** SHZ-82A 型恒温振荡器(苏州国华企业); 311 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司); TG16G 型台式离心机(上海医用分析仪器厂); TS100 型荧光倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司); StepOnePlus 型 Real-time PCR 仪, NanoDrop ONE 型超微量紫外-可见光分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DDYY-7C 型电泳仪电源, DYCZ-24DH 型电泳仪, DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司); Odyssey 型双色红外荧光扫描成像(美国 LI-COR 公司)。

## 2 方法

**2.1 AECOPD 模型大鼠的建立** 采用烟熏染毒+LPS 联合经典制备方法<sup>[10-12]</sup>, 将大鼠置于 50 cm×40 cm×40 cm 玻璃缸中进行烟熏, 每天被动吸烟 2 次, 上午下午各 1 h, 总周期时间为 30 d。分别在大鼠烟熏第 1 天和第 14 天进行 LPS 的注射。首先将 LPS 按 2 g·mL<sup>-1</sup> 质量浓度配制, 用 4% 戊巴比妥钠(40 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射大鼠使大鼠麻醉, 把麻醉后的大鼠固定在鼠板上, 用细绳圈套固定大鼠门牙, 用 75% 乙醇在大鼠颈部消毒备皮, 用剪刀在颈部正中剪 1.5 cm 的切口, 逐层剥离组织, 直至暴露气管。抬高鼠板与操作台成 45 度, 用注射器经气管注入 LPS(1 g·L<sup>-1</sup>) 200  $\mu$ g, 立即将大鼠直立轻度摇晃 2 min, 使药物能够均匀进入肺中, 最后缝合伤口,

全过程需在无菌环境下进行。大鼠痰热郁肺模型建立需在实验 26 d 加滴 1 次 LPS。

**2.2 原代细胞培养** 参照 DIVIDSON 等<sup>[13]</sup>的方法加以改进, 采用酶消化组织块贴壁方法培养正常气道上皮细胞和 AECOPD 型气道上皮细胞。4% 戊巴比妥钠(40 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉大鼠, 置于 75% 乙醇中浸泡 5 min, 翘起头部, 使口鼻免受乙醇刺激。钝性分离 AECOPD 大鼠气管, 在气管分叉位置和环状软骨下缘截取气道放入培养皿中, 用含有 10% 双抗的高糖培养基清洗, 纵向分离气管成为数个细小的环状组织, 在恒温 37  $^{\circ}$ C 摇床用含 4% 的链霉菌蛋白酶溶液消化 30 min, 倒入过滤网中过滤出碎组织, 提取碎组织置于培养瓶中, 加入含 20% 的胎牛血清的 F-12 培养基培养, 7 d 后可见沿组织周围爬出大量纤毛上皮细胞。

**2.3 分组给药** 60 只 SD 大鼠随机分组, 分别为清金化痰汤高、中、低剂量组, 罗红霉素组, 模型组以及正常组, 每组 10 只。给药用量及方法参照《药理实验方法学》<sup>[14]</sup>中的标准进行计算, 根据人与大鼠间药物剂量换算方法, 除正常组外, AECOPD 大鼠清金化痰汤高、中、低剂量分别灌胃给予 30, 15, 7.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 罗红霉素组 0.017 5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃, 模型组与正常组给予 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>生理盐水灌胃, 给药疗程为 2 周。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 细胞鉴定** 对已经培养出的细胞利用差速贴壁法去掉成纤维细胞<sup>[15]</sup>, 成纤维细胞在 1 h 内贴壁, 上皮细胞 3 h 贴壁, 得到更为纯化的上皮细胞。

**2.4.2 ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> 含量** 把二次贴壁的气道上皮细胞接种于 96 孔板上, 用无血清培养基培养 24 h, 再用含 10% 的药物血清干预 24 h, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液, 其他步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

**2.4.3 Real-time PCR 检测气道上皮细胞中 p62 mRNA 的表达水平** 对已经干预后的细胞消化, 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min 去掉上清液, 加 trizol 300  $\mu$ L 分装入 1.5 mL 的离心管中, 加入三氯甲烷 200  $\mu$ L, 震荡后置于 4  $^{\circ}$ C 的离心机中, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸出上清液置于新的离心管中按 1:1 的比例加异丙醇, 在 -20  $^{\circ}$ C 冰箱内静置 30 min, 4  $^{\circ}$ C 离心 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清液加 75% 乙醇 1 mL 震荡, 4  $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 弃上清液挥发, 待完全挥发后加入 PCR 专用

水 5  $\mu\text{L}$ , 采用双光束紫外分光光度计对 RNA 样本纯度测定, 根据试剂盒要求将 RNA 逆转录为 cDNA, 置于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  保存。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , cDNA 1  $\mu\text{L}$ , TB green 10  $\mu\text{L}$ , ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , 上游和下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , Nucleasa-free Water 7  $\mu\text{L}$ 。反应条件为  $95\text{ }^\circ\text{C}$  预变性 30 s,  $95\text{ }^\circ\text{C}$  变性 5 s,  $60\text{ }^\circ\text{C}$  退火延伸 34 s, 共 40 个循环。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供合成, 以  $\beta$ -actin 为内参, 其上游引物为 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游引物为 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3', 扩增长度为 149 bp, p62 的上游引物为 5'-GGGGCTTTGGTTTCGTGGA-3', 下游引物为 5'-ACAGTAGGTGGGGGTGGC-3', 扩增长度为 85 bp。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因相对表达量。

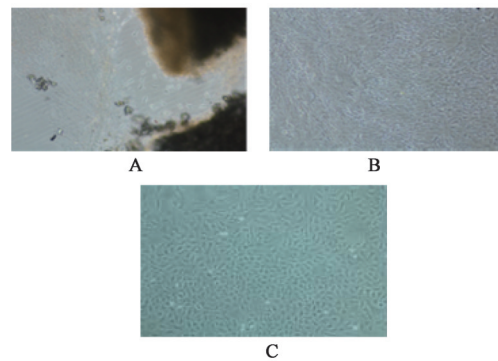
**2.4.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测气道上皮细胞中 p62 的蛋白表达** 消化干预后的细胞后  $1\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min 去掉上清液, 加入细胞裂解液 (RIPA-PMSF 100:1) 100  $\mu\text{L}$ , 振荡后按照 (SDSPAGE-样本量 1:4) 的比例加上样缓冲液, 开水煮沸 5 min, 置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中。按照 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶电泳 2 h 转于 PVDF 膜上 70 min, 用 5% 的脱脂奶粉封闭, 以一抗 p62 (1:8 000), 内参 (1:2 000), 置  $4\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜。洗膜 3 次, HRP-羊抗兔 (1:5 000), HRP-羊抗小鼠 (1:5 000) 于 5% 脱脂奶粉溶于 TBS-T 中孵育 2 h, 洗膜, ECL 发光显色, 用软件 Image J 分析蛋白条带灰度值。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较前先进进行正态分布及方差齐性检验, 满足方差齐性的采

用单因素方差分析, 检验结果有统计学意义, 则进一步采用 SNK 法进行多重比较, 方差不齐的资料使用非参数检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 细胞培养结果** 组织贴壁 7 d 后, 细胞沿组织爬出, 正常气道上皮细胞生长速度快, 细胞如铺石路生长, 细胞间隙小, 体积大。AECOPD 型气道上皮细胞, 生长速度慢, 细胞形态多样, 有梭形、不规则形, 细胞间隙大, 体积小。见图 1。



A. 7 d 后从组织爬出的细胞; B. 正常气道上皮细胞; C. AECOPD 型气道上皮细胞

图 1 细胞培养结果(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 Result of cell culture (inverted microscope,  $\times 100$ )

**3.2 对 AECOPD 大鼠气道上皮细胞上清液中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LTB $_4$ , LTC $_4$  含量的影响** 与正常组比较, 模型组中细胞上清液中的 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LTB $_4$ , LTC $_4$  含量均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 药物干预后的细胞上清液中的炎症因子均显著降低 ( $P < 0.01$ ), 罗红霉素组与清金化痰汤高剂量组效果相当。见表 1。

表 1 清金化痰汤对细胞上清液中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LTB $_4$ , LTC $_4$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	LTB $_4$	LTC $_4$
正常	-	0.18 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01
模型	-	0.30 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>
清金化痰汤	7.5	0.25 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>
	15	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>
	30	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.18 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>
罗红霉素	0.017 5	0.20 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.17 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.21 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>

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

**3.3 对 AECOPD 大鼠气道上皮细胞中自噬蛋白 p62 mRNA 表达的影响** 与正常组比较, 模型组中的自噬蛋白 p62 mRNA 含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组均显著升高 p62 mRNA 表

达水平 ( $P < 0.01$ ), 罗红霉素组与清金化痰汤高剂量组效果相当。见表 2。

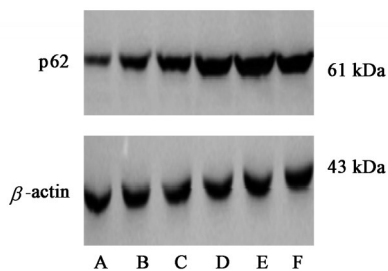
**3.4 对 AECOPD 大鼠气道上皮细胞中自噬蛋白 p62 中蛋白表达的影响** 与正常组相比较, 模型组

表 2 清金化痰汤对各组气道上皮细胞中 p62 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Effect of Qingjin Huatantang on p62 mRNA in airway epithelial cells of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p62
正常	-	0.214±0.003
模型	-	0.003±0.002 <sup>1)</sup>
清金化痰汤	7.5	0.127±0.006 <sup>2)</sup>
	15	0.135±0.003 <sup>2)</sup>
	30	0.176±0.015 <sup>2)</sup>
罗红霉素	0.017 5	0.181±0.015 <sup>2)</sup>

中的自噬蛋白 p62 中蛋白含量均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组显著升高 p62 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ ), 罗红霉素组与清金化痰汤高剂量组效果相当。见图 2, 表 3。



A. 模型组; B. 清金化痰汤低剂量组; C. 清金化痰汤中剂量组; D. 清金化痰汤高剂量组; E. 罗红霉素组; F. 正常组

图 2 大鼠气道自噬蛋白 p62 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of rat airway autophagy protein p62 protein expression

表 3 清金化痰汤对各组气道上皮细胞中 p62 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Effect of Qingjin Huatantang on p62 protein in airway epithelial cells of each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p62/ $\beta$ -actin
正常	-	0.95±0.11 <sup>1)</sup>
模型	-	0.32±0.09
清金化痰汤	7.5	0.54±0.06 <sup>2)</sup>
	15	0.57±0.05 <sup>2)</sup>
	30	0.75±0.07 <sup>2)</sup>
罗红霉素	0.017 5	0.77±0.06 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

中医认为慢性阻塞性肺疾病属于“肺胀”“咳嗽”“痰饮”“喘证”等范畴。其主要发病机制为本虚标实, 实证多以热、痰、瘀为主, 而 AECOPD 主要与痰、热相关, 痰邪郁阻于肺, 热邪易伤肺络, 痰热互结形成痰浊, 易阻塞气道, 气机不利, 表现出各种症

状。清金化痰汤具有清热化痰、宣肺止咳的效果, 方中黄芩、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。自噬是细胞将其自身的细胞质中的物质以及细胞器转运至溶酶体以进行降解和再循环的过程。一方面, 自噬的激活能清除 COPD 中受损的细胞在疾病中发挥保护作用, 另一方面当自噬受损或过量时会导致细胞凋亡、衰老和纤毛丢失, 加重肺气肿的进程<sup>[16]</sup>。相关研究发现, 中医药可以通过调节自噬来影响疾病<sup>[17-20]</sup>。

p62 蛋白全称 Sequestosomel, 是 SQSTM1 编码的泛素结合蛋白, 在细胞自噬过程中作为自噬底物<sup>[21]</sup>, 也是检测自噬活性的一个标志蛋白, 其在通过自噬摄取泛素化蛋白聚合物的过程中具有关键作用。p62 能够使蛋白轻链 3 (LC3) 与多聚泛素化蛋白连接, 通过泛素信号通路将受损的细胞器或蛋白转运到自噬体中, 最终被降解<sup>[22]</sup>。因此, p62 水平与自噬水平呈负相关。本实验研究结果中显示, 在模型组中 p62 的蛋白以及 mRNA 的水平降低, 说明在 COPD 中自噬蛋白 p62 被激活。通过用清金化痰汤干预之后, 干预组中的 p62 的表达水平明显升高, 说明清金化痰汤能升高 AECOPD 中气道上皮细胞中的 p62 从而抑制自噬反应。

气道慢性炎症是 COPD 气道重构和肺实质破坏的病理基础, 其中数种炎症相关细胞及炎症因子参与了这个过程。当气道上皮细胞被激活后产生的 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  都是一种内源性热原质, IL-1 $\beta$  可促进中性粒细胞从骨髓中释放到炎症部位, 诱导大量细胞产生 IL-6, IL-8 和 TNF- $\alpha$ , 并可诱导血管内皮细胞黏附分子、细胞间黏附分子-1 和血管细胞黏附分子-1 表达, 从而促使中性粒细胞和嗜酸性粒细胞黏附血管内皮细胞和呼吸道上皮细胞。LTB<sub>4</sub> 与 LTC<sub>4</sub> 能使中性粒细胞活化并在气道上募集, 产生过量的炎性物质, 从而扩大局部炎症反应<sup>[11]</sup>。其还具有增加支气管黏膜炎性细胞浸润, 导致支气管平滑肌收缩和增加气道微血管渗透性等作用<sup>[23]</sup>。这些炎症因子长期存在引起的炎症反应可导致肺组织局部蛋白酶和抗蛋白酶失衡, 细胞外基质降解过程活跃, 组织结构破坏及重塑; 这一过程又反过来诱发炎症细胞的募集, 释放炎性介质, 加重并使炎症反应持续, 形成恶性循环<sup>[24]</sup>。在本实验中, COPD 模型组中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> 等炎症因子显著的升高, 这

与前期研究一致,通过清金化痰汤干预后,炎症因子降低。因此,清金化痰汤能降低气道上皮细胞中的炎症因子,降低气道炎症反应。

众多研究表明,自噬能调节COPD中炎症机制。有研究发现在吸烟者的肺巨噬细胞中发现了自噬的缺陷,因无法顺利地将细菌转移至溶酶体,故吸烟者常发生反复的感染<sup>[25]</sup>。感染是COPD患者病情急性加重的主要原因,无论是细菌感染还是病毒感染,都使COPD患者气道内细菌负荷增加,炎症介质如LTB<sub>4</sub>, IL-6, TNF- $\alpha$ 等也显著增加,这样就加重了COPD患者气道炎症。自噬与炎症因子存在双向调节作用。FUJII等<sup>[26]</sup>发现抑制自噬能增加p62和泛素化蛋白在气道上皮细胞中的积累,导致细胞衰老,柳氮磺胺吡啶(SASP)分泌与IL-8分泌增加。在自噬缺陷的细胞中,效应蛋白重组人死骨片1(SQSTM1)的降解受到影响水平积聚,通过肿瘤坏死因子受体相关分子6(TRAFF6)的泛素化激活转录因子核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B),能导致炎症因子的释放<sup>[27]</sup>,加重疾病的进展。LEE等<sup>[28]</sup>研究发现,在角化细胞中,应用三甲基腺嘌呤(3-MA)抑制酯酰肌醇3激酶(PI3K)途径,抑制自噬体形成后, TNF- $\alpha$ 和IL-6分泌水平明显增加。相关研究发现自噬对炎症的调节是自噬与炎症小体之间的关系,自噬蛋白Beclin 1, LC3B的缺失会引起线粒体活性氧(ROS)产生的增强,并通过调节激活半胱氨酸天冬氨酸酶-1(Caspase-1)使NOD样受体(NLR)家族与连接蛋白结合而产生炎症小体如IL-1 $\beta$ , IL-18, 促进其成熟与分泌<sup>[29-30]</sup>。因此自噬可调节炎症因子影响疾病的发生发展。在本实验中,当模型组中p62被激活后,炎症因子也随之增多;相反,通过中药干预后抑制自噬的同时炎症因子也随之减少。因此,可以推测p62能调节气道炎症中的炎症因子。

本研究结果表明,当CSE刺激下,模型组中的气道上皮细胞自噬与炎症反应增强,通过清金化痰汤的干预后自噬减弱,炎症因子TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>也相继减少,清金化痰汤在调节自噬的同时能降低气道炎症反应。在前期研究中已经发现清金化痰汤对气道炎症的影响,因此,推测清金化痰汤治疗AECOPD痰热郁肺型疾病减少气道炎症这一机制是通过调节自噬水平来实现的。自噬影响着COPD的发生发展,且与其发病机制相关,本实验仅从其中一个机制做了研究,所以应深入探讨其对COPD不同发病机制的影响,从而为COPD提供更多新的治疗方案。

#### [参考文献]

- [1] SAMET J M. Tobacco smoking: the leading cause of preventable disease worldwide[J]. Thorac Surg Clin, 2013, 23(2): 103-112.
- [2] 吴林娜, 赵媚, 许光兰. 清金化痰汤通过调节自噬对COPD大鼠炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(18): 30-35.
- [3] YONG Z, XI C, JIE L, et al. Serum IL-1 $\beta$  and IL-17 levels in patients with COPD: associations with clinical parameters [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2017, 12: 1247-1254.
- [4] RYTER S W, LAM H C, CHEN Z H, et al. Deadly triplex: smoke, autophagy and apoptosis [J]. Autophagy, 2011, 7(4): 436-437.
- [5] RYTER S W, LEE S J, CHOI A M. Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease[J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4(5): 573-584.
- [6] RYTER S W, CHEN Z H, KIM H P, et al. Autophagy in chronic obstructive pulmonary disease: homeostatic or pathogenic mechanism? [J]. Autophagy, 2009, 5(2): 235-237.
- [7] 於海洋, 韩锋. 自噬在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(1): 102-104.
- [8] LEE H M, SHIN D M, YUK J M, et al. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1 [J]. J Immunol, 2011, 186(2): 1248-1258.
- [9] 许光兰, 李娇, 韦艾凌, 等. 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.
- [10] 赵媚, 许光兰, 李娇, 等. 清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热郁肺型大鼠肺组织 JAK/STAT 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(8): 71-75.
- [11] 许光兰, 赵媚, 钟云青, 等. 清金化痰颗粒对慢性阻塞性肺疾病加重期(痰热郁肺)大鼠白三烯 B<sub>4</sub>、白三烯 C<sub>4</sub> 及肺组织病理形态的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017(1): 174-177, 225.
- [12] 许光兰, 赵媚, 钟云青, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 91-97.
- [13] DAVIDSON D J, GRAY M A, KILANOWSKI F M, et al. Murine epithelial cells: isolation and culture [J]. J Cyst Fibros, 2004, 3(S2): 59-62.
- [14] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-203.

- [15] 王达,李煜生. 小鼠原代呼吸道上皮细胞分离培养的新方法[J]. 生理学报,2011,63(6):581-585.
- [16] LIU Y, LEVINE B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy [J]. Cell Death Differ, 2015,22(3):367-376.
- [17] 白俊. 基于PI3K/AKT/mTOR信号通路研究补肾活血法调控大鼠卵巢颗粒细胞自噬的分子机制[D]. 成都:成都中医药大学,2018.
- [18] ZOU Y, SAREM M, XIANG S, et al. Autophagy inhibition enhances matrine derivative MASM induced apoptosis in cancer cells via a mechanism involving reactive oxygen species-mediated PI3K/Akt/mTOR and Erk/p38 signaling [J]. BMC Cancer, 2019, 19(1):949.
- [19] 涂玥,万毅刚,顾一焯,等. 非编码RNA调控自噬的分子机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2019,44(21):4545-4551.
- [20] 刘不悔,何伟明,万毅刚,等. 虫草菌丝抑制自噬相关AMPK/ULK1信号活性改善肾小管上皮细胞衰老的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(6): 1258-1265.
- [21] ROSCIOLI E, TRAN H B, JERSMANN H, et al. The uncoupling of autophagy and zinc homeostasis in airway epithelial cells as a fundamental contributor to COPD[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2017, 313(3):L453-L465.
- [22] 於海洋,李妍,韩锋锋,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织自噬相关蛋白的变化[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2016,15(5):470-476.
- [23] BEEH K M, KORNMAN O, BUHL R, et al. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4[J]. Chest,2003,123(4):1240-1247.
- [24] 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, 2007,176(6):532-555.
- [25] MONICK M M, POWERS L S, WALTERS K, et al. Identification of an autophagy defect in smokers alveolar macrophages [J]. J Immunol, 2010, 185(9): 5425-5435.
- [26] FUJII S, HARA H, ARAYA J, et al. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Oncoimmunology, 2012, 5:630-641.
- [27] MOSCAT J, DIAZ-MECO M T. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer [J]. Cell, 2009, 137(6):1004.
- [28] LEE H M, SHIN D M, YUK J M, et al. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1 [J]. J Immunol, 2011, 186(2):1248-1258.
- [29] NAKAHIRA K, HASPEL J A, RATHINAM V A K, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome [J]. Nat Immunol, 2011, 12(3):222-230.
- [30] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes [J]. Cell, 2010, 140(6):821-832.

[责任编辑 周冰冰]