

· 经典名方 ·

清肺化痰汤通过抑制 JAK2/STAT3 通路上调 CFTR 的表达治疗 COPD

屈飞¹, 邱沙英¹, 张明月¹, 黄俊浩¹, 曾杰², 刘婕², 崔艳茹^{2*}

(1. 江西中医药大学药学院, 江西省中药药理学重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的:探索清肺化痰汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)的治疗作用及其机制研究。方法:应用烟雾吸入联合脂多糖(LPS)灌肺复合素的方法,建立 COPD 大鼠模型,造模成功后将大鼠随机分为6组,分别为正常组,COPD模型组,清肺化痰汤低、中、高剂量组和氨溴索组。造模28 d后开始给药,清肺化痰汤低、中、高剂量7.5,15,30 g·kg⁻¹,氨溴索35 mg·kg⁻¹,连续给药14 d。免疫组化和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)蛋白和mRNA的表达。应用LPS诱导NCI-H292细胞建立黏液高分泌模型,实验分为8组,分别为空白组,LPS组,LPS+10%胎牛血清,LPS+生理血清,LPS+5%含药血清,LPS+10%含药血清,LPS+20%含药血清,LPS+AG490组。免疫荧光、蛋白免疫印迹法(Western blot)和Real-time PCR观察LPS刺激后的NCI-H292细胞中CFTR蛋白和mRNA的表达,Western blot检测LPS刺激后的NCI-H292细胞中Janus激酶2/信号转导与转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路表达。结果:正常组大鼠肺组织管腔周围有大量棕褐色颗粒,COPD表达升高,与正常组比较,模型组大鼠肺组织管腔周围的棕褐色颗粒极少,COPD表达较低。与正常组比较,COPD模型组大鼠肺组织中CFTR mRNA和蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,清肺化痰汤低、中、高剂量组明显升高大鼠肺组织CFTR mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$)。与空白组比较,LPS组NCI-H292细胞CFTR mRNA和蛋白表达显著降低($P<0.01$),p-JAK2,p-STAT3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,清肺化痰汤5%,10%,20%含药血清组明显升高CFTR mRNA和蛋白表达,明显降低p-JAK2,p-STAT3蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:清肺化痰汤通过抑制JAK2/STAT3通路来上调CFTR治疗COPD。

[关键词] 清肺化痰汤; 囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR); Janus激酶2(JAK2); 信号转导与转录激活因子3(STAT3)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)18-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201602

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200605.1015.001.html>

[网络出版日期] 2020-6-5 16:31

Efficacy of Qingfei Huatantang in Treatment of COPD by Up-regulating Expression of CFTR Through JAK2/STAT3 Pathway

QU Fei¹, QIU Sha-ying¹, ZHANG Ming-yue¹, HUANG Jun-hao¹, ZENG Jie², LIU Jie², CUI Yan-ru^{2*}

(1. Key Laboratory of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine (TCM) in Jiangxi, School of Pharmacology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;

2. School of Physiology, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the efficacy and mechanism of Qingfei Huatan Tang on chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** The rat model of COPD was established through smoke

[收稿日期] 20191211(026)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760744);江西省教育厅科技重点项目(GJJ190633)

[第一作者] 屈飞,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,E-mail:quf0917@163.com

[通信作者] * 崔艳茹,硕士,副教授,硕士生导师,从事中药药理学研究,Tel:0791-87118930,E-mail:cuiyanru2@163.com

inhalation combined with lipopolysaccharide (LPS) and pulmonary compound injection. After successful modeling, the rats were randomly divided into 6 groups, namely the control group, the COPD model group, low, medium and high-dose Qingfei Huatan Tang groups and the ambroxol group. After 28 days of modeling, the drug was administered. Low, medium and high-dose Qingfei Huatan Tang ($7.5, 15, 30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and ambroxol ($35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were administered continuously for 14 days. Immunohistochemistry and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect protein expression and mRNA expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in pulmonary fibrosis. NCI-H292 cells were induced by LPS to establish a mucus hypersecretion model. The experiment was divided into 8 groups, namely the blank control group, LPS group, LPS+10% fetal bovine serum group, LPS+ physiological serum group, LPS+5% drug serum group, LPS+10% drug serum group, LPS+20% drug serum group and LPS+AG490 group. Immunofluorescence, Western blot and Real-time PCR were used to observe the protein and mRNA expressions of CFTR in NCI-H292 cells after LPS stimulation, and western blot was used to detect the expression of tyrosine kinase 2/transcription factor 3 (JAK2/STAT3) signaling pathway in NCI-H292 cells after LPS stimulation. **Result:** There were a large number of brown particles around the lumen of lung tissues in the normal group, with increased COPD expression. There were a few brown particles around the lumen of lung tissues in the model group compared with the normal group, with decreased COPD expression. Compared with the normal group, mRNA and protein expressions of CFTR in the lung tissues of the COPD model group were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, mRNA and protein expressions of CFTR in the lung tissues of low, medium and high-dose Qingfei Huatan Tang groups ($P<0.05$). Compared with the blank control group, mRNA and protein expressions of CFTR in NCI-H292 cells of the LPS group ($P<0.05$), with significant increases in protein expressions of p-JAK2 and p-STAT3 ($P<0.05$). Compared with the model group, 5%, 10%, 20% Qingfei Huatan Tang-containing serum groups showed significant increases in mRNA and protein expressions of CFTR, but with significant decreases in p-JAK2, p-STAT3 protein expressions ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Qingfei Huatan Tang up-regulated CFTR in the treatment of COPD by inhibiting JAK2/STAT3 pathway.

[Key words] Qingfei Huatan Tang; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR); Janus kinase2 (JAK2); signal transduction and transcription activator 3 (STAT3)

黏液高分泌是慢性阻塞性肺疾病(COPD)的重要病理生理特征之一,促进了COPD的发生和发展^[1-2]。COPD疾病时,气道上皮细胞黏液的生理特性和成分发生了显著改变^[3]。而气道黏液分泌的数量及成分取决一种磷酸化调控的上皮细胞Cl⁻通道囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)^[4]。CFTR主要位于气道上皮细胞顶侧膜,通过对Cl⁻的跨膜转运,在气道上皮盐类物质转运、水分流动中发挥重要作用。抗黏液高分泌治疗是解决COPD反复发作的一个新方向。中医药在治疗COPD中有着较多的研究进展^[5-6]。清肺化痰汤出自《风劳嗽膈》,该方由桑白皮、黄芩、瓜蒌壳、浙贝母、杏仁、苏子、法半夏、茯苓、鱼腥草、瓜蒌仁、甘草片组成。在目前的药理学研究中发现清肺化痰汤具有解热、祛痰、平喘等效应,适用于COPD的治疗^[7]。在前期实验中已发现清肺化痰汤可治疗大鼠COPD模型^[8]。本文建立COPD大

鼠模型和NCI-H292黏液高分泌模型,观察清肺化痰汤通过调控CFTR的表达,治疗COPD的机制研究,该研究将为临床COPD的治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 健康SD大鼠60只,雄性,体质量(200 ± 20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2016-0002。动物实验经江西中医药大学医学伦理委员会批准(201901091)。

1.2 细胞 NCI-H292细胞购自于武汉普诺赛生物科技有限公司,通过支原体检测及STR检测。

1.3 药材 清肺化痰汤:桑白皮20g,黄芩15g,瓜蒌皮15g,浙贝母20g,杏仁15g,苏子15g,法半夏10g,茯苓20g,鱼腥草40g,瓜蒌仁6g,甘草片6g(上述中药均购自深圳市三九现代中药有限公司,江西中医药大学附属中医院药剂科提供,所有药材中药固体制剂制造技术国家工程研究中心饶毅教

授鉴定)。将中药置8倍温水中浸泡0.5 h,沸腾后文火煎煮4 h,取汁后经3层纱布过滤;第2次和第3次煎煮均分别以6倍水文火煎煮2 h,同样方法取汁,合并3次药液,用旋转蒸发仪浓缩至 $5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。药液常温冷却后,至 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

1.4 试剂 氨溴索(成都恒瑞制药有限公司,批号20170501);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号019M4009V);香烟(庐山)购于江西中烟烟草公司;CFTR抗体(美国Abcam公司,批号GR3261279-1);磷酸化Janus激酶2(p-JAK2),磷酸化信号转导与转录激活因子3(p-STAT3),内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,批号分别为13,34,26);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗,山羊抗兔IgG(H+L)(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为01325/20348,01334/10412);免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号WK102706-1);BCA试剂盒,磷酸化抑制剂(康为世纪生物科技有限公司,批号分别为30350,60413);keyFluor 488标记山羊抗小鼠IgG(H+L)(江苏凯基生物有限公司,批号20190724);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,安徽雷根生物技术有限公司,批号0920A17);cDNA第一链合成试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix(SYBR Green)(日本Takara公司,批号分别为AJ10741A,AIF2368A);DAB染色试剂盒(博士德生物工程有限公司,批号11G11B22);ECL显色液(美国Proteintech公司,批号132201910);其他试剂均为国产分析纯。

1.5 仪器 Heal Force Neofuge 13R型离心机(上海力申科学仪器有限公司);Light Cycler 96型Real-time PCR仪(瑞士Roche公司);EG1150H型包埋机,HI1220型烤片机,RM2550型手动石蜡切片机(德国Leica公司);BX43F型显微镜(日本Olympus公司);VE-386型蛋白垂直电泳槽,转移电泳槽(上海天能科技有限公司);FluorChem M型全能型凝胶成像系统(美国Proteinsimple Santa Clara公司)。

2 方法

2.1 NCI-H292细胞培养 NCI-H292细胞采用含10%胎牛血清的BI1640培养液培养,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ $5\%\text{CO}_2$ 培养箱培养,待细胞生长到80%~90%时传代用于后续实验。

2.2 COPD模型建立及给药 参照文献及本课题组前期研究^[8-9],运用烟雾吸入,LPS灌肺复合因素大鼠COPD造模方法。在造模的第1,14天在大鼠

麻醉后,于胸骨上1 cm处进行气管切开。向大鼠气管内注入LPS $200\text{ }\mu\text{g}(1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$,将大鼠固定板直立旋转,使LPS能够均匀分布于两肺。假手术组注入生理盐水。第2~13天,第15~25天,将大鼠放入吸烟箱中,每次燃烧10支香烟(庐山牌香烟),约0.5 h,2次/d,2次间隔4~6 h。造模28 d结束。清肺化痰汤用量相当于临床等效剂量(根据人和动物按表面积折算的等效剂量比率表计算),清肺化痰汤低、中、高剂量分别为 $(7.5, 15, 30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$,造模开始后第29~42天给药,1次/d,共14 d。

2.3 清肺化痰汤含药血清制备 将20只SD大鼠分为2组,正常组5只,清肺化痰汤组15只。正常组给予生理盐水1 mL灌胃,清肺化痰汤组给予清肺化痰汤 $7.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃,连续灌胃3 d,于第3次给药60 min后,水合氯醛麻醉后与无菌条件下,行腹主动脉取血,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存过夜,待凝血坚实,血清析出后,转速 $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min(离心半径13 cm),将上层淡黄血清吸出,分装后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 分组和给药方法 根据预实验的结果将NCI-H292细胞分为8组,分别为空白组,LPS组($10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),生理血清组(LPS+10%生理血清),胎牛血清组(LPS+10%胎牛血清),清肺化痰汤低剂量组(LPS+5%含药血清),清肺化痰汤中剂量组(LPS+10%含药血清),清肺化痰汤高剂量组(LPS+20%含药血清),AG490组(LPS+ $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.5 免疫组化检测清肺化痰汤对COPD大鼠肺组织CFTR表达 链亲和素-生物素SP法操作步骤:切片常规脱蜡至水,PBS洗涤;热抗原修复,PBS洗涤1~2次;3%过氧化氢20~30 min阻断内源性氧化酶,蒸馏水洗3次;用3%BSA封闭液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱湿盒内孵育30 min;用滤纸吸干后,分别滴加CFTR一抗(1:200),置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。加辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG(H+L)二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱湿盒内孵育50 min,PBS洗涤;滴加试剂辣根酶标记链霉卵白工作液,在室温下孵育15 min。PBS洗5 min,3次,DAB显色,镜下控制反应时间,蒸馏水洗涤,苏木素轻度复染,常规脱水,透明,封片。

2.6 Real-time PCR检测大鼠肺组织CFTR mRNA和NCI-H292细胞中CFTR mRNA的表达 肺组织经trizol充分消化、裂解后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min弃去沉淀,每1 mL的trizol试剂匀浆的样品中加入的三氯甲烷 $200\text{ }\mu\text{L}$,盖紧管盖。将NCI-H292细胞接种于六孔板,依照不同分组进行实验处

理。孵育24 h后,每孔加入 trizol 1 mL。手动剧烈振荡管体 15 s后,冰上静置 5 min,4 °C条件下 12 000 r·min⁻¹离心 15 min。离心后混合液体将分为下层的红色酚三氯甲烷相,中间层和上层的无色的水相。RNA全部被分配于水相中。水相的体积大约是匀浆时加入的 trizol 试剂的 60%。将水相转移到新离心管中,水相与等体积的异丙醇混合以沉淀其中的 RNA。混匀后 15~30 °C 孵育 10 min后,于 4 °C,12 000 r·min⁻¹离心 10 min。移去上清液,每 1 mL trizol 试剂匀浆样品中加入 75% 乙醇 1 mL,清洗 RNA 沉淀。振荡后,4 °C 条件下 7 500 r·min⁻¹离心 5 min,去除乙醇溶液,空气中干燥 RNA 沉淀 5~10 min。溶解 RNA 时,加入无 RNA 酶的水 20~30 μL 反复吹打数次,获得 RNA 溶液于 -80 °C 保存。大鼠肺组织 CFTR (176 bp),上游 5'-TTAG TGCACCACGGAGACAT-3',下游 5'-TCCAAG TGGTGTCTGTACCC-3'; GAPDH (77 bp),上游 5'-AAGATGGTGAAGGTCGGTGT-3',下游 5'-AGCT TCCATTCTCAGCCTT-3'。NCI-H292 细胞 CFTR (132 bp),上游 5'-GCGAAGATCTTGCTGCTTGA-3',下游 5'-GAATCGTACTGCCGCACTTT-3'; GAPDH (213 bp),上游 5'-CTCCTCCTGTTC GACAGTCA-3',下游 5'-CGACCAAATCCGT TGACTCC-3'。Real-time PCR 扩增条件为 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,循环 50 次。采用 2^{-ΔΔC_t} 方法表示 mRNA 相对表达量。

2.7 免疫荧光检测 NCI-H292 细胞中 CFTR 表达

将 NCI-H292 细胞接种于细胞爬片,依照不同分组进行实验处理。孵育 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定细胞, Triton X-10 穿孔后 5% BSA 封闭, CFTR 抗体 (1:100) 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次,抗小鼠荧光二抗 (1:1 000) 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 次,加入 DAPI 10 min, PBS 清洗 3 次,防淬灭剂封片后荧光显微镜观察拍照。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 NCI-H292 细胞中 CFTR 表达和 JAK2/STAT3 信号通路表达

将 NCI-H292 细胞接种于六孔板,依照不同分组进行实验处理。孵育 24 h 后,加入裂解液与蛋白酶抑制剂裂解细胞提取总蛋白,采用 BCA 法测定各组蛋白浓度。5% BSA 封闭,加 CFTR 抗体 (1:500), p-JAK2 抗体 (1:1 000), p-STAT3 抗体 (1:2 000) 一抗 4 °C 过夜;二抗室温孵育 1 h。ECL 发光液显色,采用 Image J 软件进行灰度值分析。以目的蛋白与 GAPDH 灰度比值表示各目的蛋白的相对表达量。

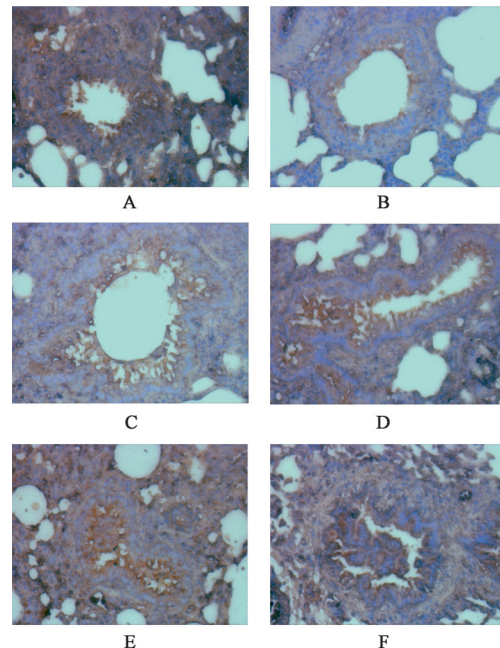
2.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件处理数据,所得计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较用 *t* 检验,组间差异的比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 清肺化痰汤对 COPD 大鼠模型肺组织 CFTR 蛋白表达的影响

CFTR 蛋白阳性表达表现为管腔周围有棕褐色颗粒,正常组管腔周围有大量棕褐色颗粒,与正常组比较,模型组管腔周围的棕褐色颗粒极少 ($P < 0.01$);与模型组比较,清肺化痰汤低、中、高剂量组管腔周围的棕褐色颗粒明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 氨溴索组; D. 清肺化痰汤低剂量组; E. 清肺化痰汤中剂量组; F. 清肺化痰汤高剂量组

图 1 清肺化痰汤对 COPD 大鼠肺组织 CFTR 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 1 Effect of Qingfei Huatan Tang on expression of CFTR in lung tissue of COPD rats (IHC, ×400)

3.2 清肺化痰汤对 COPD 大鼠模型肺组织 CFTR mRNA 表达的影响

与正常组比较, COPD 模型组大鼠肺组织中 CFTR mRNA 明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,清肺化痰汤低、中、高剂量组明显升高 CFTR mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

3.3 清肺化痰汤含药血清对 LPS 刺激后的 NCI-H292 细胞中 CFTR 表达的影响

CFTR 主要分布在胞膜和胞浆,少量分布于细胞核。CFTR 为绿色荧光,细胞核为蓝色荧光。与空白组比较, LPS 处理后

表 1 清肺化痰汤对 COPD 大鼠肺组织 CFTR 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Qingfei Huatan Tang on expression of CFTR in lung of COPD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CFTR
正常	-	0.449±0.027
模型	-	0.248±0.020 ¹⁾
氨溴索	0.035	0.309±0.015
清肺化痰汤	7.5	0.337±0.041 ²⁾
	15	0.402±0.027 ³⁾
	30	0.394±0.069 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与 COPD 模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 2 同)。

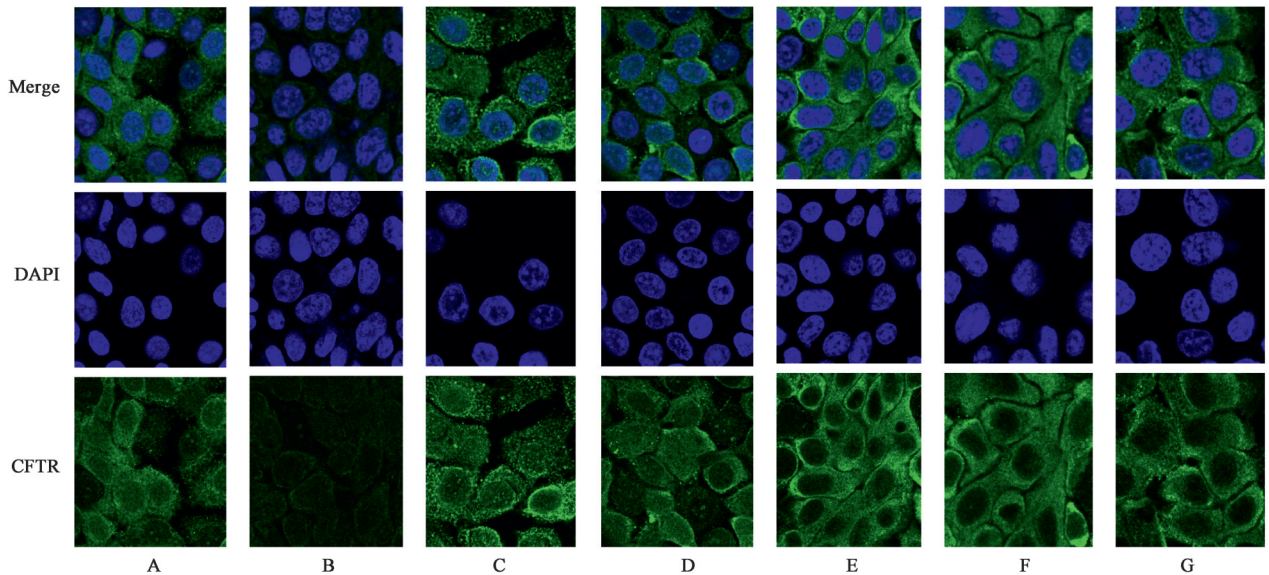
胞膜和胞浆中绿色荧光明显减弱和减少,经过清肺

表 2 清肺化痰汤对 COPD 大鼠模型肺组织 CFTR mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Qingfei Huatan Tang on expression of CFTR mRNA in lung tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CFTR
正常	-	1
模型	-	0.822±0.161 ¹⁾
氨溴索	0.035	0.861±0.172
清肺化痰汤	7.5	1.217±0.211 ²⁾
	15	1.590±0.250 ³⁾
	30	1.272±0.261 ²⁾

化痰汤含药血清的处理后,与 LPS 组比较,清肺化痰汤含药血清低、中、高组均能增强和增加绿色荧光。见图 2。



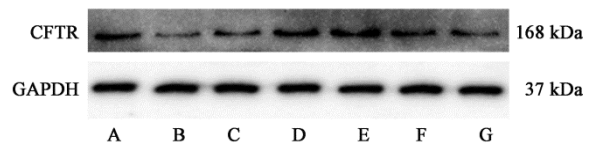
A. 空白组;B.LPS组;C.LPS+生理血清组;D.LPS+胎牛血清组;E.LPS+5%清肺化痰汤含药血清组;F.LPS+10%清肺化痰汤含药血清组;G.LPS+20%清肺化痰汤含药血清组

图 2 清肺化痰汤含药血清对 LPS 刺激后的 NCI-H292 细胞中 CFTR 表达的影响(免疫荧光, × 800)

Fig. 2 Effect of Qingfei Huatan Tang contains drug serum on expression of CFTR in NCI-H292 cells stimulated by LPS (IF, × 800)

3.4 清肺化痰汤含药血清对 LPS 刺激后的 NCI-H292 细胞中 CFTR 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组 CFTR 表达下降($P<0.01$);经过清肺化痰汤含药血清的干预后,与 LPS 组比较,清肺化痰汤含药血清中、高组均显著升高 CFTR 的表达($P<0.01$)。见图 3,表 3。

3.5 清肺化痰汤含药血清对 LPS 刺激后的 NCI-H292 细胞 CFTR mRNA 表达的影响 与空白组比较,LPS 组显著降低 CFTR mRNA 表达($P<0.01$);与 LPS 组比较,清肺化痰汤含药血清低、中剂量组明显上升 CFTR mRNA 的表达水平($P<0.05$)。见表 4。



A. 空白组;B.LPS组;C.5%清肺化痰汤含药血清组;D.10%清肺化痰汤含药血清组;E.20%清肺化痰汤含药血清组;F.胎牛血清;G.生理血清组

图 3 LPS 刺激后的 NCI-H292 细胞中 CFTR 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of CFTR protein expression in NCI-H292 cells stimulated by LPS

3.6 清肺化痰汤含药血清对 LPS 刺激 NCI-H292 细胞中 JAK2/STAT3 信号通路蛋白表达的影响 与空

表3 清肺化痰汤含药血清对LPS刺激后的NCI-H292细胞中CFTR蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 3 Effect of Qingfei Huatan Tang contains drug serum on CFTR expression in NCI-H292 cells stimulated by LPS($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	体积分数/%	CFTR
空白	-	1.403±0.105
LPS	-	0.897±0.040 ¹⁾
LPS+胎牛血清	-	1.430±0.090
LPS+生理血清组	-	1.207±0.070
LPS+清肺化痰汤	5	0.983±0.055
	10	1.403±0.135 ²⁾
	20	1.673±0.136 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与LPS组比较²⁾ $P<0.01$ 。

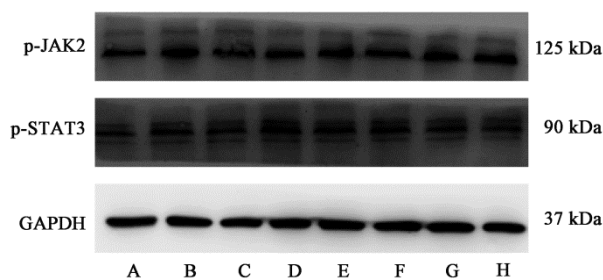
表4 清肺化痰汤含药血清对LPS刺激后的NCI-H292细胞CFTR mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 4 Effect of Qingfei Huatan Tang contains drug serum on expression of CFTR mRNA in NCI-H292 cells stimulated by LPS($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	体积分数/%	CFTR
空白	-	1.000
LPS	-	0.527±0.058 ¹⁾
LPS+胎牛血清	-	0.627±0.157
LPS+生理血清	-	0.415±0.115
清肺化痰汤	5	0.780±0.061 ²⁾
	10	0.857±0.104 ²⁾
	20	0.607±0.201

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与LPS组比较²⁾ $P<0.05$ 。

白组比较,LPS组p-JAK2,p-STAT3蛋白表达明显升高($P<0.05$);与LPS组比较,清肺化痰汤含药血清低、中剂量组和AG490能降低p-JAK2和p-STAT3的表达($P<0.05$)。见图4,表5。



A.空白组;B.LPS组;C.胎牛血清;D.生理血清组;E.AG490组;F.5%清肺化痰汤含药血清;G.10%清肺化痰汤含药血清组;H.20%清肺化痰汤含药血清组

图4 LPS刺激后的NCI-H292细胞中p-JAK2和p-STAT3蛋白的表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in LPS stimulated NCI-H292 cells

表5 清肺化痰汤含药血清对LPS刺激NCI-H292细胞中p-JAK2和p-STAT3信号通路蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Qingfei Huatan Tang contains drug serum on p-JAK2 and p-STAT3 protein expression in NCI-H292 cells stimulated by LPS($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	体积分数/%	JAK2	STAT3
正常	-	1.369±0.107	1.310±0.142
LPS	-	1.551±0.095 ¹⁾	1.620±0.131 ¹⁾
LPS+胎牛血清	-	1.265±0.097	1.375±0.140
LPS+生理血清	-	1.515±0.111	1.581±0.131
LPS+AG490	-	1.126±0.083 ³⁾	1.244±0.136 ²⁾
清肺化痰汤	5	1.234±0.071 ²⁾	1.285±0.136 ²⁾
	10	1.150±0.115 ³⁾	1.236±0.137 ²⁾
	20	1.591±0.121	1.452±0.135

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与LPS组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

黏液高分泌是COPD发病和死亡的重要因素之一,黏液的分泌增加可加重呼吸道内发生气流阻塞,从而引起肺功能下降,气道贮留的黏液容易导致气道内发生感染,而感染及炎症产物又进一步引起黏液高分泌,加速感染,从而形成恶性循环^[10]。近年来对于黏液高分泌的临床治疗主要是通过改变黏液的性状使之易于排出呼吸道从而达到祛痰治疗的目的,不能从根本上解决黏液高分泌。因此需要更多的研究致力于黏液高分泌机制来治疗COPD。

研究发现,清肺化痰汤对COPD患者临床疗效显著,可改善患者血气分析、肺功能,并降低患者血清炎症因子^[11-12]。前期实验已发现清肺化痰汤可抑制黏蛋白分泌来治疗COPD^[9,13]。

气道黏液主要位于宿主和环境的交界面,负责气道上皮细胞的水合作用,是气道先天防御系统的重要保护成分^[14-15]。响应环境信号来调节气道黏液层是CFTR的主要功能,其主要通过调节氯化物和碳酸氢盐的分泌来完成这一任务^[16]。CFTR表达于气道黏膜和黏膜下腺上皮细胞的顶膜。氯的分泌导致纤毛液和黏液层的水合,而碳酸氢盐使细胞外环境碱化^[17-19]。

吸烟是COPD的主要危险因素^[20]。有研究证明,香烟烟雾在体外可阻断CFTR功能,导致CFTR功能障碍,减少了气道上皮细胞Cl⁻分泌,CFTR Cl⁻分泌功能下降将导致液体分泌不足,从而引起气道表面液体含水成分减少,黏液增厚,黏膜下腺管阻塞,发生感染后导致黏膜纤毛清除受损^[21]。本文研

究发现,COPD大鼠模型肺组织中及LPS刺激后的NCI-H292细胞中CFTR的表达明显减少。清肺化痰汤可上调CFTR的表达。

在前期研究中,发现气道高反应性疾病黏液高分泌模型中CFTR表达下降和JAK/STAT通道有关^[22]。本文研究发现,LPS刺激后的NCI-H292细胞中p-JAK2,p-STAT3的表达明显增加。AG490组和清肺化痰汤可下调JAK2/STAT3的表达。

因此,推测清肺化痰汤可能通过抑制JAK2/STAT3通路来上调CFTR,从而治疗COPD,可为临床治疗提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] KHAKBAN A, SIN D D, FITZGERALD J M, et al. The projected epidemic of chronic obstructive pulmonary disease hospitalizations over the next 15 years. A population-based perspective[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2017, 195(3):287-291.
- [3] BARNES P J. Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(5):e112.
- [4] XIE C, TANG X, XU W, et al. A host defense mechanism involving CFTR-mediated bicarbonate secretion in bacterial prostatitis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12):1-7.
- [5] 李建生,王至婉,余学庆,等.中药治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的系统评价[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(2):229-231.
- [6] 彭波,李泽庚,童佳兵,等.慢性阻塞性肺疾病中医药研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(6):36-38.
- [7] 陈斯宁,徐贞,黄美杏.清肺化痰汤对COPD急性加重期痰热郁肺证患者细胞因子的影响[J]. *云南中医中药杂志*, 2008, 29(9):6.
- [8] 屈飞,黄小婷,崔艳茹,等.清肺化痰汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道炎症和黏液分泌的调控作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9):2064-2067.
- [9] 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的比[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31(3):246-249.
- [10] YAN X, SONG Y, SHEN C, et al. Mucoactive and antioxidant medicines for COPD: consensus of a group of Chinese pulmonary physicians [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12:803-812.
- [11] 朱仕兵,许安,张德文.清肺化痰汤对老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期合并呼吸衰竭患者肺功能、炎症因子及血气分析的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(19):4838-4840.
- [12] 余彩云,杜永明,陈国宁,等.清肺化痰汤雾化对慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床运用分析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(5):694-696.
- [13] 屈飞,崔艳茹,李惠兰.清肺化痰汤抗COPD大鼠模型黏蛋白作用研究[J]. *亚太传统医药*, 2016, 12(10):11-13.
- [14] KESIMER M, FORD A A, CEPPE A, et al. Airway mucin concentration as a marker of chronic bronchitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(10):911-922.
- [15] MARTIN C, FRIJA-MASSON J, BURGEL P R. Targeting mucus hypersecretion: new therapeutic opportunities for COPD? [J]. *Drugs*, 2014, 74(10):1073-1089.
- [16] STOLTZ D A, MEYERHOLZ D K, WELSH M J. Origins of cystic fibrosis lung disease [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372:1574-1575.
- [17] PEZZULO A A, TANG X X, HOEGGER M J, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung [J]. *Nature*, 2012, 487:109-113.
- [18] ROY M G, LIVRAGHI-BUTRICO A, FLETCHER A A, et al. Muc5b is required for airway defence [J]. *Nature*, 2014, 505:412-416.
- [19] HOEGGER M J, FISCHER A J, MCMENIMEN J D, et al. Impaired mucus detachment disrupts mucociliary transport in a piglet model of cystic fibrosis [J]. *Science*, 2014, 345:818-822.
- [20] BARNES P J, BURNEY P G, SILVERMAN E K, et al. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1:15076.
- [21] RAJU S V, LIN V Y, LIU L, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator ivacaftor augments mucociliary clearance abrogating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibition by cigarette smoke [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2017, 56(1):99-108.
- [22] QU F, QIN X Q, CUI Y R, et al. Ozone stress down-regulates the expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bronchial epithelial cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 179:219-226.

[责任编辑 周冰冰]