

泽漆水提物对香烟烟雾诱导小鼠慢性阻塞性肺病及肺组织癌前病变相关蛋白的影响

周子也^{1,2}, 马惠苗^{1,2}, 陈兰英^{1,2,3*}, 段文彬^{1,2}, 林丽华¹, 刘鹏^{1,2}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

3. 江西中医药大学中药药效(扶正祛邪抗肿瘤)评价重点实验室, 南昌 330006)

[摘要] 目的:探究泽漆水提物对香烟烟雾(CS)所致的慢性阻塞性肺病(COPD)的保护作用及肺组织癌前病变相关蛋白的影响。方法:通过建立CS所致的COPD小鼠模型(60只),随机分为正常组、模型组、阳性药组(地塞米松 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)及泽漆水提物低、中、高剂量组($1.875, 3.75, 7.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用高效液相色谱法(HPLC)测定泽漆水提物中相关成分;动物肺功能仪检测小鼠呼气末期暂停(EEP)、气道阻力(Penh)、50%肺活量呼吸时的呼气流量(EF50)等肺功能指标变化;高通量液相蛋白芯片技术检测小鼠肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素(IL)-2、IL-5、IL-18、IL-17A、IL-27等炎性因子水平变化;苏木素-伊红(HE)染色检测小鼠肺组织的病理变化;比色法测定小鼠肺组织中的丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量变化;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9及MMP-12细胞因子mRNA相对表达量变化;免疫组化(IHC)测定小鼠肺组织中肿瘤蛋白(P53)及增殖细胞相关抗原(Ki67)表达水平变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肺组织中多重肿瘤抑制蛋白(P16)、DNA甲基转移酶(DNMT1)及脆性组氨酸三联体(FHIT)相对表达量变化。结果:泽漆水提物中化合物主要含有酚类成分没食子酸和原儿茶酸及黄酮类成分金丝桃苷、芦丁、杨梅素、柚皮素、槲皮素、木犀草素、山柰酚和甘草查尔酮A,其中没食子酸和芦丁含量最高;与正常组比较,模型组小鼠EEP、EF50、Penh水平明显升高($P<0.05$),MDA及MPO水平显著升高($P<0.01$),GSH-Px显著降低($P<0.01$),IL-2、IL-5、IL-18、IL-17A、IL-27、TNF- α 、TGF- β 、MMP-2、MMP-9及MMP-12水平明显升高($P<0.05$),小鼠肺组织P53、Ki67、FHIT表达显著上升($P<0.01$),DNMT1、P16表达显著下降($P<0.01$)。与模型组比较,各泽漆水提物组EEP、EF50水平明显降低($P<0.05$);在HE染色下观察可见模型组小鼠肺组织病理损伤明显,泽漆水提物治疗后,肺组织基底细胞增生的病理损伤逐渐改善;泽漆水提物各组MDA及MPO水平显著降低($P<0.01$),GSH-Px显著升高($P<0.01$);泽漆水提物各组IL-2、IL-5、IL-18、IL-17A、IL-27、TNF- α 、TGF- β 、MMP-2、MMP-9及MMP-12水平明显下降($P<0.05$);泽漆水提物治疗后小鼠肺组织Ki67、FHIT明显下降($P<0.05$),P53、DNMT1表达明显上升($P<0.05$)。结论:泽漆水提物对COPD小鼠保护及抑制癌前病变的作用,这可能与抑制炎症及氧化应激反应、调节蛋白酶与抗蛋白酶失衡及调控上皮细胞生长相关。

[关键词] 泽漆水提物; 香烟烟雾; 慢性阻塞性肺病; 炎症; 氧化应激; 癌前病变相关蛋白

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R22;R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0084-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230241

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230203.1427.003.html>

[网络出版日期] 2023-02-03 15:35:13

Effect of *Euphorbia helioscopia* Aqueous Extract on Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Precancerous Lesion-associated Proteins of Lung Tissues in Mice Induced by Cigarette Smoke

ZHOU Ziye^{1,2}, MA Huimiao^{1,2}, CHEN Lanying^{1,2,3*}, DUAN Wenbin^{1,2}, LIN Lihua¹, LIU Peng^{1,2}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

[收稿日期] 2022-12-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82060732)

[第一作者] 周子也,在读硕士,从事中药药效评价与新药研究,E-mail:317347204@qq.com

[通信作者] *陈兰英,博士,教授,从事中药药效评价与新药研究,E-mail:clyxy2513@163.com

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation of Chinese Herbal Medicine,
Nanchang 330006, China;

3. Project of Key Laboratory for Evaluation on Anti-tumor Effect of Chinese Medicine by
Strengthening Body Resistance to Eliminate Pathogenic Factors, Jiangxi University of Chinese Medicine,
Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract (EHE) on mice with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its influence on precancerous lesion-associated proteins in lung tissues induced by cigarette smoke (CS). **Method:** The COPD model was induced by CS in 60 mice and the model mice were randomly divided into control group, model group, positive drug group (dexamethasone, 2 mg·kg⁻¹), and low-, medium-, and high-dose EHE groups (1.875, 3.75, 7.5 g·kg⁻¹). The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the related components in EHE. The changes in end-expiratory pause (EEP), airway resistance (Penh), expiratory flow at 50% vital capacity (EF50), and other pulmonary function indexes were detected by the spirometer. The levels of inflammatory factors, such as interleukin (IL)-2, IL-5, IL-18, IL-17A, and IL-27 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of mice were detected by high-throughput liquid protein chip technology. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes in lung tissues in mice. The content of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in lung tissues was determined by the colorimetric method. The mRNA relative expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of tumor protein (P53) and cell proliferation-associated antigen (Ki67) in lung tissues, and Western blot was used to detect the relative expression of tumor suppressor protein (P16), DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1), and fragile histidine triad (FHIT) in lung tissues. **Result:** The results showed that the main compounds in EHE included phenols (gallic acid and protocatechuic acid) and flavonoids (such as hyperoside, rutin, myricetin, naringenin, quercetin, luteolin, kaempferol, and licorice chalcone A), among which gallic acid and rutin were the highest in content. Compared with normal group, model group showed increased levels of EEP, EF50, and Penh ($P<0.05$), and showed increased MDA and MPO levels ($P<0.01$) and decreased GSH-Px ($P<0.01$), and the model group displayed increased levels of IL-2, IL-5, IL-18, IL-17A, IL-27, TNF- α , TGF- β , MMP-2, MMP-9, and MMP-12 ($P<0.05$). And the model group exhibited up-regulated expression of P53, Ki67, and FHIT in lung tissues ($P<0.01$) and down-regulated expression of DNMT1 and P16 ($P<0.01$). Compared with model group, the EHE groups showed decreased EEP and EF50 levels ($P<0.05$). The pathological injury of lung tissues in mice of the model group was observed under HE staining, and the pathological injury of basal cell hyperplasia of lung tissues was gradually improved after treatment with EHE. The EHE groups showed reduced levels of MDA and MPO ($P<0.01$) and increased GSH-Px ($P<0.01$). The EHE groups displayed decreased levels of IL-2, IL-5, IL-18, IL-17A, IL-27, TNF- α , TGF- β , MMP-2, MMP-9, and MMP-12 ($P<0.05$). And the EHE groups showed down-regulated Ki67 and FHIT in lung tissues ($P<0.05$) and up-regulated expression of P53 and DNMT1 ($P<0.05$). **Conclusion:** EHE can protect mice from COPD and inhibit precancerous lesions, and the mechanism may be related to the inhibition of inflammation and oxidative stress response, regulation of protease and antiprotease imbalance, and regulation of epithelial cell growth.

[Keywords] *Euphorbia helioscopia* aqueous extract; cigarette smoke; chronic obstructive pulmonary disease; inflammation; oxidative stress; precancerous lesion-associated protein

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以持续的呼吸道症状和气流受限为特征的异质性疾病,其进展主要与暴露于有毒颗粒或气体所引起的增强慢性炎症反应相关^[1-2]。COPD的发病机制同时也涉及氧化应激失衡、蛋白酶和抗蛋白酶失衡等多种因素^[3]。此外,有证据表明COPD的发病率会增加肺癌的风险到4.5倍^[4]。目前,在COPD向肺癌转化过程中存在的关键性阶段被称为癌前病变,其中局部持续性炎症、肺修复机制异常、基因图谱的异常变化及DNA甲基化的表观遗传变化被认为是导致肺癌发生的最重要的潜在因素^[5-7]。因此,寻找一种治疗COPD并抑制癌前病变进展的药物在预防与治疗肺癌发生与发展上具有重要意义。

中药泽漆为大戟科植物,其味辛、苦,性微寒,主归肺、小肠、大肠经。现代药理研究表明,泽漆具有行水消肿、化痰止咳、解毒杀虫、抗肿瘤等功效,临床上被用于肺炎、急慢性支气管炎、癌症等方面^[8-9]。本课题前期研究表明泽漆水提物可通过下调c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)蛋白表达,以及降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 的分泌,从而减轻脂多糖(LPS)所致的急性肺损伤小鼠炎症反应。此外,泽漆水提物可能通过抑制辅助性T细胞1(Th1)中IL-12/信号传导及转录激活蛋白(STAT)4通路的激活并促进Th2中IL-4/STAT6通路的激活来调节Th1/Th2之间的平衡关系,从而对香烟联合LPS所致的COPD大鼠起抗炎作用而具有保护作用^[10-11]。目前临床上治疗COPD的药物主要是糖皮质激素或支气管扩张剂等,其取得的治疗效果不佳,而中药在COPD的防治方面疗效显著,具有明显的优势^[12],泽漆能通过纠正炎症与抗炎症的不平衡而治疗COPD,具有明显疗效且不良反应小,但其对COPD向肺癌前病变转化等影响仍不明确。因此,本文通过建立香烟烟雾所致的COPD小鼠模型,探讨泽漆水提物对COPD小鼠及其肺组织癌前病变相关蛋白的作用,以期泽漆不仅能为COPD临床患者治疗提供更多的实验依据,而且为预防与治疗COPD向肺癌转化提供新思路。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6小鼠(SPF级)60只,体质量18~20 g。购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004。适应性喂养3 d后用于后续实验。本研究所涉及的动物实验均经江

西中医药大学实验动物科技中心动物实验伦理委员会审查批准(伦理审查批号JZLLSC2018-0116)。

1.2 药物 泽漆购自浙江丽水,经江西中医药大学刘荣华教授鉴定为大戟科大戟属草本植物泽漆*Euphorbia helioscopia*的干燥地上部分(安徽人民中药饮片有限公司,批号211001);醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号170203);庐山牌香烟(江西中烟工业有限责任公司)。

1.3 试剂 髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20201019、20201021、20201020);苏木精染色液、伊红染色液(北京Solarbio科技有限公司,批号分别为G1140、G1100);免疫组化试剂盒、蛋白定量(BCA)测定试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号分别为30528、70538);TRIzol裂解液、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国Thermo Scientific公司,批号分别为03877/20533、00621709、00710493);兔来源一抗增殖细胞相关抗原(Ki67)、肿瘤蛋白(P53)、DNA甲基转移酶(DNMT1)、多重肿瘤抑制蛋白(P16)(英国Abcam公司,批号分别为ab16667、ab131442、ab188453、ab211542);兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(北京康为世纪生物科技有限公司,批号01227/10344);鼠来源一抗脆性组氨酸三联体(FHIT)、HSP90AB1小鼠单克隆抗体(美国OriGene公司,批号分别为TA349983、TA500494)。

1.4 仪器 WPB PLT-UNR-RT-2型动物肺功能检测系统(法国EMKA公司);CKX41型倒置显微镜(日本Olympus公司);RM2016型轮转式切片机(德国Leica公司);SpectraMax I3型多功能酶标仪(奥地利MD公司);Centrifuge5810R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);7500型Real-time PCR仪(美国ABI公司);Luminex 200型多功能流式点阵仪(美国Luminex公司);ChemiDoc XRS⁺型多功能化学发光成像仪(德国BR公司)。

2 方法

2.1 HPLC含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱: COSMOSIL PBr(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流速1 mL·min⁻¹;柱温30 $^{\circ}$ C;流动相A 0.1%甲酸-水,流动相B 甲醇;梯度洗脱0~100 min, 5%~100%B;检测波长254 nm。供试品进样量为10 μ L;混合对照品进样量为20 μ L。

2.1.2 供试品溶液配制 准确称取泽漆干燥粉末

50 g,加水 400 mL,加热冷凝回流提取 2 h/次,回流 2 次,用纱布趁热过滤合并 2 次滤液,取滤液 10 mL,摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得到供试品溶液。

2.1.3 对照品溶液配制 分别精密称取没食子酸、原儿茶酸、金丝桃苷、芦丁、杨梅素、柚皮素、槲皮素、木犀草素、山柰酚和甘草查尔酮 A 10 个对照品,质量分别为 0.769、0.615、0.769、1、0.769、0.846、1.923、1、0.692、1.077 mg,甲醇溶解,定容至 10 mL。吸取适量体积的对照品混匀,制成混合对照品。

2.2 动物分组、造模及给药 泽漆药材粉碎过二号筛,准确称取粉末 1 kg,置于 20 L 烧瓶中,加水 8 L,电热套加热,冷凝回流提取 2 h,共 2 次。用纱布过滤合并滤液,减压回收溶剂浓缩,得稠浸膏(得率为 20%),真空条件下低温干燥,得干燥细粉,加水制成相当于生药质量浓度为 0.75 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的灌胃溶液。

将 C57BL/6 小鼠按体质量随机分为 6 组,每组 10 只,分别为正常组,香烟烟雾诱导模型(CS)组,泽漆水提物高、中、低剂量组及地塞米松组,给药体积为 10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,地塞米松组给药剂量为 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,泽漆水提物高、中、低剂量组给药剂量分别为 7.5、3.75、1.875 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,泽漆给药剂量根据临床给药量等效换算设计得出^[13-14]。除正常组吸入新鲜空气外,其余各组采用连续香烟烟雾诱导法^[15-16]构建 COPD 模型,将小鼠放入自制密闭有机玻璃熏烟箱内(30 $\text{cm}\times 40\text{ cm}\times 60\text{ cm}$),8 支香烟(庐山牌,焦油量 11 mg,烟气一氧化碳量 12 mg)同时燃烧 20 min,中间休息 10 min,再燃 8 支,为 1 个循环,2 循环/d,烟雾诱导结束后,以肺功能下降、肺组织病理学改变及肺泡灌洗液炎症水平升高以确认造模成功^[17]。造模第 9 周给予相应药物治疗:正常组和模型组灌胃给予等体积蒸馏水,泽漆水提物低、中、高剂量组分别灌胃给予相应剂量的泽漆水提物,每天 2 次,地塞米松组灌胃给予地塞米松混悬液。熏烟前 1 h 给药,连续给药治疗 4 周。

2.3 药效学研究

2.3.1 一般观察 每天注意观察各组小鼠的毛发、活动和精神状态等情况。

2.3.2 肺功能仪测定小鼠肺功能指标变化 在给药 4 周后,用 20% 的乌拉坦麻醉小鼠,待小鼠麻醉后,将 Emka 动物肺功能测试仪及呼吸机连接小鼠气管,待小鼠呼吸趋于稳定后,对各组小鼠肺功能指标呼气末期暂停(EEP)、气道阻力(Penh)、50%肺活量呼吸时的呼气流量(EF50)进行测定。

2.3.3 蛋白芯片技术测定小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症因子表达水平变化 将各组小鼠进行肺泡灌洗,使用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL 灌入小鼠肺中,缓慢抽吸,重复 3 次,使回收率达 80% 以上,接着采用超滤离心管对抽取的肺泡灌洗液进行浓缩。通过高通量液相蛋白芯片技术进行检测,后采用 Luminex 200 仪器进行测定。

2.3.4 比色法检测小鼠肺组织中氧化应激指标水平变化 MPO 活性测定:通过过氧化物酶的还原能力将过氧化氢还原,利用此原理测定髓过氧化物酶的活性。MDA 含量测定:按照 MDA 试剂盒说明书对试剂进行配置,然后按照说明进行加样处理及测定。GSH-Px 活性测定:按照 GSH-Px 试剂盒说明书对试剂进行配置,按说明进行加样处理及测定。

2.3.5 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肺组织病理变化及肺支气管上皮增生变化 剪取小鼠右肺组织及气管组织,在预冷 PBS 中稍作漂洗,吸水纸吸干,于 4% 多聚甲醛中固定 24 h,脱水处理并包埋于石蜡中,切片厚度为 5 μm ,苏木素及伊红染色、脱水透明、中性树胶封固,显微镜下观察。

2.3.6 Real-time PCR 检测大鼠肺组织中 TNF- α 、TGF- β 、MMP-2、MMP-9、MMP-12 mRNA 表达变化 剪取小鼠左肺组织,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,扩增条件为活化 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 s,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,共 40 个循环,以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各组 mRNA 相对表达。所有引物由金斯瑞生物科技股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
TNF- α	上游 CTCATGCACCACCATCAAGG	96
	下游 ACCTGACCACTCTCCCTTTG	
TGF- β	上游 AGACGAATTCATGGCCCTGGATACC	322
	下游 AGACGGATCCTCAGCTGCACTGCAGG	
MMP-2	上游 TCTGTGTGCATCCAGGAGTT	130
	下游 TCTACTGCCTCTGCTTCTCG	
MMP-9	上游 CCACCGAGCTATCCACTCAT	75
	下游 CCCTAACGCCAGTAGAGAG	
MMP-12	上游 TTTGGAGCTCACGGAGACTT	119
	下游 GTCCACGTTTCTGCCTCATC	
β -actin	上游 CCAGCCTTCTTCTGGGTA	143
	下游 CAATGCCTGGGTACATGGTG	

2.3.7 免疫组化法检测小鼠肺组织中癌变相关蛋白表达水平变化 肺组织石蜡包埋切片后,二甲苯脱蜡,乙醇水化,双氧水猝灭过氧化物酶,乙二胺四乙酸(EDTA)修复抗原,山羊血清封闭,一抗P53(1:50)、Ki67(1:200)4℃孵育,滴加辣根酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(1:100)孵育,并通过二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,脱水,封片,镜下观察。免疫组化半定量分析:使用Image J软件计算每个视野下阳性结果的积分吸光度IA和面积。

2.3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠肺组织中癌变相关蛋白表达水平 将肺组织研磨均匀后加入RIPA裂解液,提取肺组织总蛋白;BCA法进行蛋白定量。采用10% SDS-PAGE凝胶电泳,半干转膜法转膜,室温封闭2 h,分别加相应抗体, DNMT1(1:1 000)、P16(1:2 000)、FHIT(1:1 000), 4℃孵育过夜。TBST洗膜,加二抗(1:8 000),室温孵育1.5 h, TBST洗3次,使用Bio-Rad凝胶成像系统拍照,使用Image J图像分析软件将条带灰度数值化,计算各蛋白相对表达量。

2.4 统计学处理 采用SPSS 26.0和GraphPad Prism Version 8.0进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布且方差齐性者多组数据间比较采用单因素方差分析,非正态分布及方差不齐者采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表2 泽漆水提物化合物含量测定

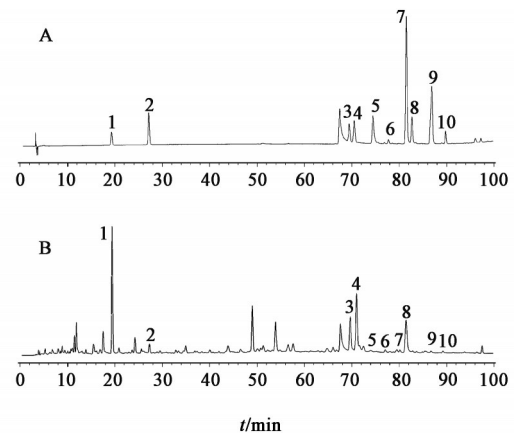
Table 2 Levels of components in *Euphorbia helioscopia* aqueous extract

峰号	化合物	t_R /min	混合对照品		水提物	
			峰面积	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	峰面积	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
1	没食子酸	19.310	153 200	7.69	2 510 111	251.99
2	原儿茶酸	27.161	378 773	6.15	191 739	6.23
3	金丝桃苷	69.445	313 617	7.69	1 159 735	56.87
4	芦丁	70.507	352 488	10.00	1 851 131	105.03
5	杨梅素	74.441	459 665	7.69	41 274	1.38
6	柚皮素	77.741	47 846	8.46	58 323	20.63
7	槲皮素	81.501	1 721 393	19.23	1 217 628	27.20
8	木犀草素	82.688	360 385	10.00	18 258	1.01
9	山柰酚	86.875	1 036 628	6.92	33 717	0.45
10	甘草查耳酮A	89.791	125 755	10.77	36 678	6.28

3.2 一般观察 在造模期间,模型组小鼠易聚堆,精神倦怠萎靡,毛发失去光泽,偶有咳嗽症状,从造模第4周开始出现掉毛现象,且随着造模时间的延长,其背部皮肤较松散无弹力,但正常组小鼠无咳嗽现象,毛

3 结果

3.1 泽漆水提物中化合物HPLC测定结果 采用高效液相色谱法对泽漆水提物进行分析鉴定。结果显示,经混合对照品对比鉴定出泽漆水提物中含有酚类成分,以及黄酮类成分,其中酚类成分主要含有没食子酸和原儿茶酸,质量浓度分别为251.9、6.23 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,黄酮类成分主要含有金丝桃苷、芦丁、杨梅素、柚皮素、槲皮素、木犀草素、山柰酚和甘草查耳酮A,其质量浓度分别为56.87、105.03、1.38、20.63、27.20、1.01、0.45、6.28 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见图1、表2。



注:A.混合对照品;B.泽漆水提物;1.没食子酸;2.原儿茶酸;3.金丝桃苷;4.芦丁;5.杨梅素;6.柚皮素;7.槲皮素;8.木犀草素;9.山柰酚;10.甘草查耳酮A

图1 泽漆水提物的HPLC分析

Fig. 1 HPLC analysis of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract

发有光泽,较活跃,背部皮肤紧致有弹性。与正常组比较,模型组小鼠体质量显著下降且增长不明显,基本趋于稳定;与模型组比较,泽漆水提物组小鼠体质量差异无统计学意义。见表3和表4。

表3 香烟烟雾对小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of cigarette smoke on body weight of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	1周	2周	3周	4周	5周	6周	7周	8周
正常组	10	20.40±3.62	21.78±3.95	22.56±4.15	23.25±4.88	23.30±4.44	23.89±4.73	24.14±4.54	24.20±4.44
模型组	50	19.52±3.46	19.53±3.17	19.78±3.32	19.98±3.61 ¹⁾	20.03±3.46 ²⁾	20.38±3.47 ²⁾	20.63±3.46 ²⁾	20.64±3.41 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

表4 泽漆水提取物对小鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on body weight of mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	9周	10周	11周	12周
正常组		24.65±4.90	24.12±4.16	24.32±5.26	24.40±4.62
模型组		21.14±3.37 ¹⁾	21.74±3.64 ¹⁾	21.67±3.37 ¹⁾	21.68±3.74 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	20.90±3.73	20.82±2.81	21.81±2.55	21.87±2.80
泽漆水提取物中剂量组	3.75	21.21±3.76	21.22±3.25	22.07±3.45	21.71±2.91
泽漆水提取物高剂量组	7.5	21.08±3.82	21.50±3.36	22.33±2.94	21.94±2.67
DEX组	0.002	21.11±3.44	19.89±3.37 ²⁾	20.15±3.59 ²⁾	20.09±3.27 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$

3.3 对 COPD 小鼠肺功能的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺功能指标 EEP、EF50、Penh 显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,泽漆水提取物各剂量组中 EEP、EF50、Penh 明显降低,差异具有明显统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 5。

3.4 对 COPD 小鼠支气管肺泡灌洗液 BALF 中炎症因子表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠 BALF 中 IL-2、IL-5、IL-18、IL-17A、IL-27 等炎症因子表达水平显著升高 ($P<0.01$),说明小鼠存在着明显的气道炎症反应;与模型组比较,泽漆水提取物各剂量组中 IL-2、IL-5、IL-18、IL-17A、IL-27 等炎症因子的表达水平明显降低 ($P<0.05, P<0.01$),说明泽漆水提取物具有改善小鼠气道炎症的作用。见表 6。

3.5 对 COPD 小鼠肺组织中氧化应激指标 MPO、MDA 及 GSH-Px 酶活性的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 MDA 及 MPO 水平显著升高,

表5 泽漆水提取物对 COPD 小鼠肺功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on lung function of COPD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	EEP/s	EF50/mL·s ⁻¹	Penh
正常组		0.17±0.01	10.83±1.31	4.55±0.86
模型组		0.20±0.01 ²⁾	13.88±0.85 ²⁾	6.81±0.76 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	0.17±0.02 ⁴⁾	10.84±2.39 ⁴⁾	5.30±0.81 ³⁾
泽漆水提取物中剂量组	3.75	0.16±0.04 ⁴⁾	10.07±2.99 ⁴⁾	4.95±2.33 ³⁾
泽漆水提取物高剂量组	7.5	0.15±0.04 ⁴⁾	10.76±2.18 ⁴⁾	5.01±0.91 ³⁾
DEX组	0.002	0.18±0.02 ³⁾	11.05±1.60 ³⁾	5.20±1.15

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表8同)

GSH-Px 显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,泽漆水提取物各剂量组和地塞米松组中 MDA 及 MPO 水平

表6 泽漆水提取物对 COPD 小鼠支气管肺泡灌洗液 BALF 中炎症因子表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of inflammatory cytokines in BALF of COPD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-2	IL-5	IL-10	IL-17A	IL-27	IL-18
正常组		10.83±3.63	7.88±1.02	44.49±5.27	4.18±1.38	6.03±1.29	573.35±82.09
模型组		17.13±2.76 ¹⁾	12.37±1.74 ¹⁾	26.45±8.20 ¹⁾	7.69±0.41 ¹⁾	12.89±1.75 ¹⁾	773.04±83.17 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	8.51±2.55 ²⁾	5.55±2.80 ²⁾	28.12±8.82	4.08±3.02	6.08±2.66 ²⁾	459.33±121.39
泽漆水提取物中剂量组	3.75	7.90±4.45 ³⁾	6.28±1.73	28.40±8.43	3.66±2.25	6.37±1.87	484.05±143.65
泽漆水提取物高剂量组	7.5	6.24±0.94 ³⁾	4.24±2.67 ³⁾	13.95±5.66 ³⁾	3.34±1.36 ²⁾	6.46±1.93	355.19±95.89 ³⁾
DEX组	0.002	10.64±0.59	9.65±2.27	28.69±7.73	6.03±1.44	8.12±2.37	499.58±50.41

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表10同)

显著下降, GSH-Px 显著升高 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 7 泽漆水提取物对 COPD 小鼠肺组织氧化应激指标 MPO、MDA、GSH-Px 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on MPO, MDA, and GSH-Px activity in lung tissues of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MPO /U·L ⁻¹	MDA /nmol·L ⁻¹	GSH-Px /U·L ⁻¹
正常组		110.49±20.01	2.82±0.21	1 798.43±156.08
模型组		355.39±21.65 ¹⁾	7.74±0.16 ¹⁾	1 156.17±45.09 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	99.78±22.27 ²⁾	5.63±0.01 ²⁾	1 715.22±167.02 ²⁾
泽漆水提取物中剂量组	3.75	199.81±20.16 ²⁾	5.51±0.19 ²⁾	1 497.23±156.01 ²⁾
泽漆水提取物高剂量组	7.5	112.52±7.82 ²⁾	4.18±0.08 ²⁾	1 758.20±176.09 ²⁾
DEX 组	0.002	67.42±39.10 ²⁾	5.84±0.24 ²⁾	1 694.17±177.06 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

3.6 对 COPD 小鼠肺组织及支气管上皮病理形态学的影响 正常组小鼠肺组织结构基本完整,肺泡形态正常,肺泡壁结构清晰、完整,肺间隔未见增厚,未见炎性细胞浸润或间质充血现象;与正常组比较,模型组小鼠肺泡结构紊乱,肺泡破裂融合,不规则扩大,肺泡间隔部分断裂,形成肺大泡,部分肺支气管形状发生改变,且有大量炎性细胞浸润现象;与模型组比较,泽漆水提取物不同剂量组具有一定的改善作用。见图 2。此外,与正常组比较,模型组小鼠肺组织支气管出现基底细胞增生且上皮纤毛脱落;与模型组比较,泽漆水提取物组具有抑制基底细胞增生的作用。见图 3。

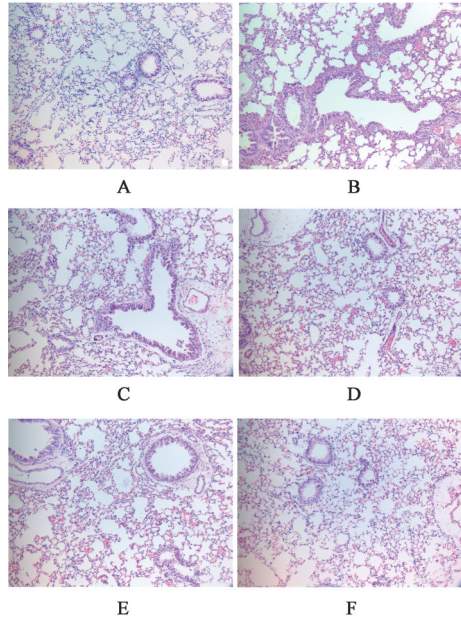
3.7 对 COPD 小鼠肺组织炎症因子 TNF- α 、TGF- β 及 MMP-2、MMP-9、MMP-12 mRNA 表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 TGF- β 、TNF- α 、MMP-12、MMP-2、MMP-9 mRNA 表达水平

表 8 泽漆水提取物对 COPD 小鼠肺组织中炎症因子 TNF- α 、TGF- β 及 MMP-2、MMP-9、MMP-12 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of inflammatory cytokines TNF- α , TGF- β and MMP-2, MMP-9, MMP-12 mRNA in lung tissues of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β	TNF- α	MMP-2	MMP-9	MMP-12
正常组		1.11±0.70	1.20±0.92	1.01±0.15	1.05±0.46	1.03±0.29
模型组		1.93±0.35 ²⁾	7.26±2.33 ²⁾	6.12±2.71 ²⁾	2.24±0.50 ¹⁾	7.39±0.83 ²⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	0.81±0.29 ⁴⁾	2.64±0.55 ³⁾	4.91±1.55	0.59±0.10 ⁴⁾	1.07±0.46 ⁴⁾
泽漆水提取物中剂量组	3.75	1.08±0.08 ⁴⁾	5.64±0.54	1.74±0.37 ⁴⁾	0.44±0.17 ⁴⁾	1.14±0.60 ⁴⁾
泽漆水提取物高剂量组	7.5	0.65±0.21 ⁴⁾	1.91±1.75 ⁴⁾	3.83±0.64 ³⁾	0.97±0.15 ⁴⁾	0.81±0.52 ⁴⁾
DEX 组	0.002	1.06±0.09 ⁴⁾	0.71±0.17 ⁴⁾	0.99±0.16 ⁴⁾	2.43±0.16	0.22±0.10 ⁴⁾



注:A.正常组;B.模型组;C.泽漆水提取物低剂量组;D.泽漆水提取物中剂量组;E.泽漆水提取物高剂量组;F.DEX组(图3-图6同);绿色箭头所示肺泡结构;红色箭头所示炎症细胞

图 2 泽漆水提取物对肺组织的影响 (HE, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on lung tissues (HE, $\times 100$)

明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,泽漆水提取物组及地塞米松组中上述炎症因子表达水平均明显下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 8。

3.8 对 COPD 小鼠肺组织中癌前病变相关蛋白 P53、Ki67 表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织中抑癌蛋白 P53、Ki67 表达水平明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,泽漆水提取物低、高剂量组中 P53 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$),泽漆水提取物中、高剂量组中 Ki67 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$),说明泽漆水提取物具有一定抑制细胞异常增殖的作用。见图 4 和图 5、表 9。

3.9 对 COPD 小鼠肺组织中癌前病变相关蛋白 DNMT1、P16、FHIT 表达水平的影响 与正常组比

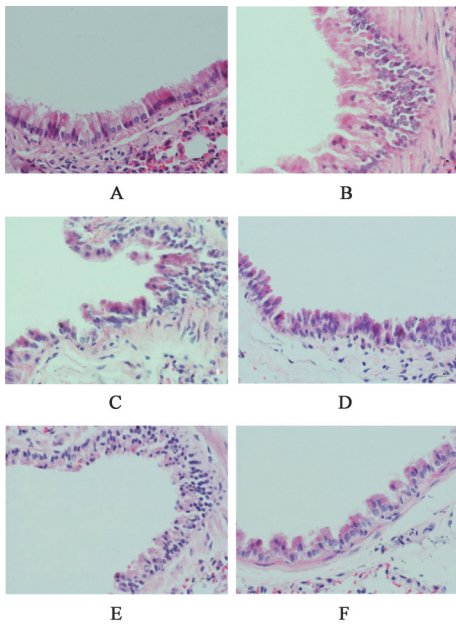


图3 泽漆水提取物对COPD小鼠肺组织支气管上皮增生的影响(HE, ×200)

Fig. 3 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on bronchial hyperplasia of lung tissue in COPD mice (HE, ×200)

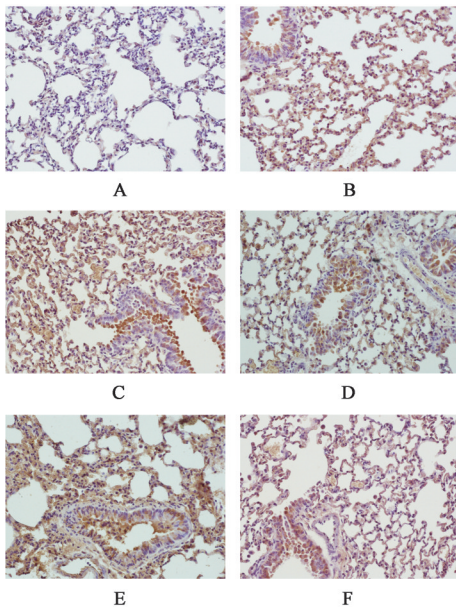


图4 泽漆水提取物对COPD小鼠肺组织中癌变相关蛋白P53表达水平的影响(IHC, ×100)

Fig. 4 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of cancer-related proteins P53 in lung tissues of COPD mice (IHC, ×100)

较,模型组小鼠肺组织中DNMT1及P16蛋白表达显著降低($P<0.01$),FHIT蛋白表达显著上调($P<0.01$);与模型组比较,泽漆水提取物高剂量组DNMT1蛋白表达明显升高($P<0.05$),泽漆水提取物各剂量组及地塞米松组中FHIT蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),但对P16蛋白表达基本无影响。见图6、表10。

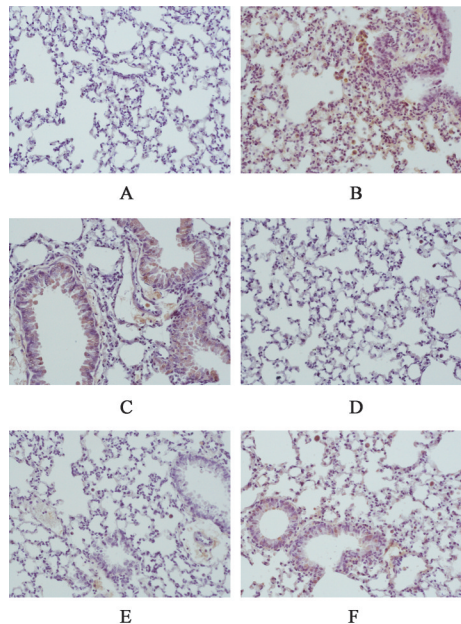


图5 泽漆水提取物对COPD小鼠肺组织中癌变相关蛋白Ki67表达水平的影响(IHC, ×100)

Fig. 5 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of cancer-related proteins Ki67 in lung tissues of COPD mice (IHC, ×100)

表9 泽漆水提取物对COPD小鼠肺组织中癌变相关蛋白P53、Ki67表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of cancer-related proteins P53 and Ki67 in lung tissues of COPD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	P53	Ki67
正常组		1.03±0.17	1.13±0.20
模型组		3.10±0.36 ²⁾	2.45±0.31 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	4.27±0.61 ³⁾	1.92±0.71
泽漆水提取物中剂量组	3.75	3.51±0.41	0.91±0.13 ³⁾
泽漆水提取物高剂量组	7.5	4.59±0.39 ³⁾	1.14±0.21 ³⁾
DEX组	0.002	3.78±0.66	1.81±0.28

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$

4 讨论

COPD是一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎和肺气肿。目前常以肺功能、肺组织形态学及肺泡灌洗液炎症分析等指标评估COPD模型。研究表明肺功能指标Penh和EF50均是反应气道阻力的指标,其表示阻塞性通气障碍的严重程度^[18]。CS是造成COPD的主要危险因素,因此CS诱导动物模型被认为更类似于人类COPD。GUAN及SU等^[15-16]均建立了12周CS诱导COPD小鼠模型,因此本研究同样建立了CS所致的COPD小鼠模型。本文研究结果显示,CS诱导后,小鼠肺功能指标Penh和EF50

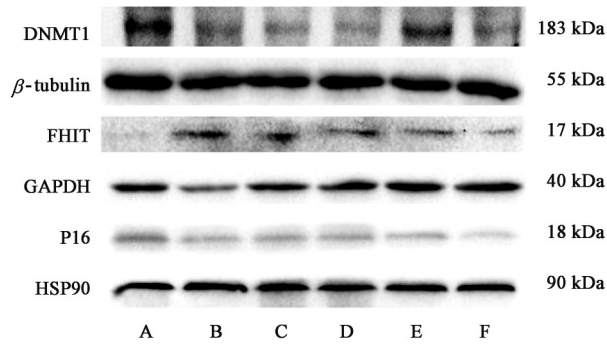


图6 COPD小鼠肺组织中癌前病变相关蛋白DNMT1、P16、FHIT蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of cancer-related proteins DNMT1, P16, FHIT in lung tissues of COPD mice

表10 泽漆水提取物对COPD小鼠肺组织中癌前病变相关蛋白DNMT1、P16、FHIT表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of *Euphorbia helioscopia* aqueous extract on expression of cancer-related proteins DNMT1, P16, FHIT in lung tissues of COPD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	DNMT1 /β-tubulin	FHIT /GAPDH	P16 /HSP90
正常组		0.49±0.01	0.14±0.09	0.43±0.08
模型组		0.39±0.01 ¹⁾	1.21±0.06 ¹⁾	0.17±0.09 ¹⁾
泽漆水提取物低剂量组	1.875	0.39±0.07	0.53±0.08 ³⁾	0.22±0.02
泽漆水提取物中剂量组	3.75	0.37±0.06	0.44±0.09 ³⁾	0.23±0.01
泽漆水提取物高剂量组	7.5	0.52±0.06 ²⁾	0.35±0.02 ³⁾	0.20±0.09
DEX组	0.002	0.42±0.10	0.17±0.03 ³⁾	0.17±0.06

均显著升高,同时小鼠肺组织中肺泡结构紊乱,不规则扩大,形成肺大泡并伴有大量炎症细胞浸润,这均证实CS诱导小鼠具有COPD症状,说明COPD小鼠模型制备成功。泽漆水提取物能够改善CS所致的COPD模型小鼠肺功能降低及肺组织病理损伤,这表明泽漆水提取物对COPD小鼠具有保护作用。

现有研究表明泽漆中柚皮素、木犀草素、芹菜素可能是其抗COPD的主要药效物质^[19]。泽漆提取物中没食子酸和芦丁等具有抗炎、抗氧化、抗增殖和抗肿瘤作用。本文通过高效液相色谱法分析了泽漆水提取物的酚类成分没食子酸和原儿茶酸及黄酮类成分金丝桃苷、芦丁、杨梅素、柚皮素、槲皮素、木犀草素、山柰酚和甘草查尔酮A,其中泽漆水提取物中没食子酸和芦丁含量最高,这提示泽漆水提取物可能具有抗炎和抗肿瘤活性,可用于预防与治疗COPD。

COPD常与气道慢性免疫炎症反应相联系,常表现为Th1/Th2细胞因子分泌失衡及Th17/Treg细

胞因子分泌失衡,其中Th1细胞通过分泌干扰素-γ(IFN-γ)、IL-2等细胞因子在抗COPD中发挥重要作用^[20]。IFN-γ是一种具备免疫调节功能的细胞因子,在急性加重期COPD患者因肺部感染引发异常的免疫应答和炎症反应,致使其水平会显著上升,并激活中性粒细胞进而加重气道炎症反应^[21];IL-2通过激活信号转导和转录激活子5(STAT5)通路诱导叉头蛋白P3(FoxP3)表达,扩增Treg细胞,且可增强Treg细胞抑制功能^[22]。Th2细胞产生负性调节细胞因子IL-5及IL-10可抑制炎症细胞释放炎症介质,其被确定为COPD中肺部炎症的重要媒介^[23]。Th17细胞分泌的特异性细胞因子IL-17A在COPD患者肺组织悬液中表达增多,致使肺组织小气道阻塞程度明显,肺泡黏膜上皮破坏严重,引起肺部的炎症反应,IL-17A还可诱导肺组织细胞分泌其他细胞因子加重炎症反应^[24-26]。因此通过阻断这些炎症因子分泌来防止CS暴露小鼠的病理损伤至关重要。本研究发现炎症细胞因子IFN-γ、IL-2、IL-27、IL-5、IL-10及IL-17A表达水平在模型小鼠支气管肺泡灌洗液中显著升高,与上述文献报道一致,提示CS组小鼠存在明显细胞因子分泌失衡及炎症反应,符合COPD的特征。泽漆水提取物能够显著降低模型小鼠支气管肺泡灌洗液中上述炎性细胞因子的水平。这说明泽漆水提取物可能通过调节Th1/Th2或Th17/Treg细胞平衡来减轻COPD小鼠的气道炎症。

氧化应激反应与COPD的发生发展也密切相关,氧化应激是由于先天抗氧化机制无法中和内源性或外源性产生的氧化剂,从而导致氧化剂和抗氧化因子之间的失衡。MDA是多不饱和脂肪酸过氧化物的产物,MDA反映COPD时组织脂质过氧化程度损害。MPO是中性粒细胞产生的一种重要的过氧化物酶,MPO活力变化代表着中性粒细胞功能和活性状态,即反映中性粒细胞的浸润情况,又可定量反映炎症损伤的程度。GSH-Px是体内重要的氧自由基清除剂,对肺组织有保护作用^[27]。有研究表明随着COPD严重程度的不断加深,机体氧化/抗氧化反应失衡将导致MDA、MPO水平升高,GSH-Px活性降低,从而损伤肺组织。本文研究发现CS组小鼠中MDA、MPO水平明显升高,GSH-Px活性明显降低,这与文献报道一致,说明在COPD小鼠肺内存在严重的脂质过氧化及中性粒细胞的浸润。这提示CS组小鼠肺内释放过量的MDA、MPO等致使肺组织损伤。而泽漆水提取物可显著改善COPD小鼠体内上述氧化应激指标的表达水平,提示泽漆水提

物可能通过降低氧化应激水平来改善COPD小鼠肺组织损伤。

COPD向肺癌转变常被认为是肺组织形态学的异常改变,主要表现为上皮细胞的异常增生,其机制可能与呼吸道上皮炎症损伤反应及转录因子的表达失调或相互作用所致^[28]。现有研究发现COPD患者小气道上皮TNF- α 、TGF- β mRNA水平明显高于非吸烟者。TGF- β_1 可能促使COPD患者气道中MMPs家族活化而增加患癌概率。例如MMP-2在加速新生血管形成及促进肿瘤生长等方面具有重要作用;MMP-9在肺癌中处于异常上调水平,而且其水平上调程度可能与肿瘤的分化程度、生存时间、患者的预后相关;MMP-12与多种恶性肿瘤的发生发展相关,并且在肺癌中呈高表达。因此,在COPD中转录因子表达失调可能通过促进气道慢性免疫炎症反应及氧化应激反应,从而开启炎症-损伤-炎症的恶性循环并致使抑癌基因失活,最终推动肺癌前病变^[29-31]。本文研究结果显示,CS组小鼠肺组织支气管出现增生的病理变化,提示模型组小鼠处于基底细胞增生的阶段,可能具有癌变的倾向。CS组中TNF- α 、TGF- β 、MMP-2、MMP-9和MMP-12 mRNA表达升高,一方面符合COPD模型特征,另一方面提示COPD小鼠肺内转录因子失调可能致使肺组织病变。泽漆水提物可能通过改善肺组织支气管上皮增生病理形态学变化并抑制炎症水平而具有抑制癌前病变的作用。

肺癌前病变可能通过异常甲基化导致FHIT、P53及P16的失活而介导。研究表明,FHIT在支气管上皮严重发育不良病变中常因存在异常甲基化而失活,其中DNMT1是DNA甲基化过程中不可或缺的一种酶,而FHIT蛋白的缺失是癌前病变最常见的改变^[32]。P53是一种肿瘤抑制蛋白,其在恶性肿瘤中突变率最高可达50%。P53具有调控细胞周期,修复细胞DNA损伤,使异常细胞发生凋亡,防止其癌变的作用。由于其稳定的半衰期,突变型P53可通过免疫组织化学法检测。有研究表明茶多酚可上调3,4-苯并芘诱导的肺癌大鼠中P53的表达,增加P53阳性细胞的百分比,从而缓解癌前病变,延缓肺癌的发生^[33]。当机体达到严重不典型增生及原位癌时也常伴有抑制细胞周期在G₁期的P16蛋白表达缺失。此外,Ki67是一种检测细胞增殖状态的指标,癌变过程中伴随着Ki67表达增加^[34],常以此判断肿瘤的恶性或者是良性程度。因此,其可作为肺癌早期的重要检测指标。本研究结果显示模

型组小鼠肺组织中P53、Ki67表达增加,以及DNMT1表达下降,与文献报道一致,这说明模型组小鼠存在异常的细胞增殖及甲基化状态,提示其可能具有癌变趋势。然而CS诱导并没有导致FHIT及P16蛋白的丢失,这可能与文献研究有些不一致。因此,推测模型小鼠暂未达到癌变阶段,仅处于增生的过渡阶段,而此时FHIT、P16仍然发挥抑制异常细胞恶性转化及肿瘤生长等作用。泽漆水提物能够显著降低小鼠肺组织中Ki67、FHIT蛋白相对表达水平,并且显著提高P53、DNMT1蛋白相对表达量,说明泽漆水提物可能通过调控P53、DNMT1、Ki-67及FHIT等癌变相关蛋白而阻断机体DNA损伤,恢复机体正常甲基化水平,抑制上皮细胞生长及恶性转化,对香烟所致的肺组织癌前病变起到一定的抑制作用。

综上所述,泽漆水提物可能通过改善小鼠肺功能和肺组织结构损伤,减轻机体炎症和氧化应激反应并抑制上皮细胞增生,从而可能达到抑制COPD小鼠向早期癌前病变转化的作用。然而,目前对泽漆抑制肺癌的作用机制尚不完全清楚,下一步将建立相关肺癌癌前病变模型,开展泽漆抑制肺癌癌前病变的机制研究,为中医药治疗“未病”理论奠定实验基础和理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] PU X, LIU L, FENG B, et al. Association between ICS use and risk of hyperglycemia in COPD patients: Systematic review and meta-analysis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 201.
- [2] 高恒兴,温中梅,袁海波,等. 慢性阻塞性肺病发病机制研究的最新进展[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(19): 5668-5670.
- [3] BEETCH M, HARANDI-ZADEH S, SHEN K, et al. Dietary antioxidants remodel DNA methylation patterns in chronic disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(6): 1382-1408.
- [4] 高冬青,王家林. 肺癌危险因素研究现状[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2019, 26(21): 1657-1662.
- [5] 李窈,何雪,陈燕. 肺癌与慢性阻塞性肺病共病的发病机制[J]. *中南大学学报:医学版*, 2017, 42(10): 1212-1216.
- [6] CELLI B R. Chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: Common pathogenesis, shared clinical challenges [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2012, 9(2): 74-79.

- [7] 吴漫,徐兴祥.慢性阻塞性肺疾病合并肺癌的研究进展[J].中华肺部疾病杂志:电子版,2019,12(5):646-649.
- [8] 查显进,石强,邵峰,等.泽漆化学成分研究[J].中草药,2021,52(2):341-348.
- [9] YANG Y, CHEN X, LUAN F, et al. *Euphorbia helioscopia* L.: A phytochemical and pharmacological overview[J]. *Phytochemistry*, 2021, 184:112649.
- [10] 刘雅慧,陈兰英,周朦静,等.泽漆水提物对LPS诱导的急性肺损伤的影响[J].中成药,2022,44(3):732-739.
- [11] 王玲玲,陈兰英,马惠苗,等.泽漆水提物对香烟联合LPS所致的COPD大鼠的改善作用[J].中成药,2021,43(10):2644-2653.
- [12] 韩密,邵沛璐,刘学芳,等.中药有效成分治疗慢性阻塞性肺疾病的机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(9):221-232.
- [13] 黄吉赓,王忆勤,朱雷,等.泽漆化痰、峻泻成分的疗效观察[J].新中医,1991,6:51-53.
- [14] 孙玄玄.黄吉赓.泽漆研究与用药经验总结[J].环球中医药,2020,13(10):1772-1774.
- [15] SU X, CHEN J, LIN X, et al. FERMT3 mediates cigarette smoke-induced epithelial-mesenchymal transition through Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Respir Res*, 2021, 22(1):286.
- [16] GUAN R, WANG J, CAI Z, et al. Hydrogen sulfide attenuates cigarette smoke-induced airway remodeling by upregulating SIRT1 signaling pathway[J]. *Redox Biol*, 2020, 28:101356.
- [17] 陈美凤,加慧,夏书月.不同COPD动物模型特点及应用的研究进展[J].中国实验动物学报,2020,28(4):563-569.
- [18] 李树民,张敏,王朋,等.小鼠无创性肺功能的测定及其意义[J].中国实验动物学报,2018,26(5):548-553.
- [19] 范伟森,刘姣,张英杰,等.中医药治疗子宫内膜异位症的相关通路研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2023,29(3):233-243.
- [20] 刘滨,刘雅清,宋红新,等.黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠Th17/Treg、Th1/Th2细胞平衡的影响[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(22):7-15.
- [21] 王洋,邹新梅,李雷,等.血清PCT、INF- γ 、CRP及NT-proBNP水平与慢阻肺患者肺部感染严重程度关系研究[J].浙江中西医结合杂志,2022,32(1):30-33.
- [22] BRABER S, HENRICKS P, NIJKAMP F, et al. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation [J]. *Respir Res*, 2010, 11(1):99.
- [23] OGAWA Y, DURU E, AMEREDES B. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation[J]. *Curr Mol Med*. 2008, 8(5):437-445.
- [24] 沈俊希,刘怀全,于海洋,等.中医药干预慢性阻塞性肺疾病Th17/Treg平衡的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(23):237-244.
- [25] ZHUO S, LI N, ZHENG Y, et al. Expression of the lymphocyte chemokine XCL1 in lung tissue of COPD mice, and its relationship to CD4(+)/CD8(+) ratio and IL-2 [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(2):505-511.
- [26] ZHU X, GADGIL A S, GIVELBER R, et al. Peripheral T cell functions correlate with the severity of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Immunol*, 2009, 182(5):3270-3277.
- [27] 陆包伟,刘露梅,王能,等.龟鹿二仙胶对糖尿病大鼠生殖损伤的保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(19):1-8.
- [28] 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症蛋白-2及髓过氧化物酶研究[J].中国现代医学杂志,2012,22(12):10.
- [29] WANG T, DAI F, LI G H, et al. Trans-4, 4'-dihydroxystilbene ameliorates cigarette smoke-induced progression of chronic obstructive pulmonary disease via inhibiting oxidative stress and inflammatory response [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152:525-539.
- [30] YAMAHANA H, TERASHIMA M, TAKATSUKA R, et al. TGF- β 1 facilitates MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 27:101072.
- [31] AGRAVAL H, YADAV U C. MMP-2 and MMP-9 mediate cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells via EGFR/Akt/GSK3 β /beta-catenin pathway: Amelioration by fisetin [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 314:108846.
- [32] LANTUEJOUL S, SALAMEIRE D, SALON C, et al. Pulmonary preneoplasia-sequential molecular carcinogenic events [J]. *Histopathology*, 2009, 54(1):43-54.
- [33] 顾其华,胡成平,陈琼,等.绿茶对苯并芘诱发大鼠肺癌的预防及其机制初探[J].中国肺癌杂志,2008,11(4):519-523.
- [34] 赖永才,罗志刚,毛炜,等.TIP30与p53、ki67在肺癌中表达的相关性及意义[J].标记免疫分析与临床,2021,28(6):1021-1026.

[责任编辑 孙丛丛]