

· 药理 ·

二陈汤加味通过 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路对慢性阻塞性肺疾病的抗炎机制

尚立芝¹, 季书¹, 李耀洋¹, 胡文豪², 谢文英^{1*}, 陈壮¹, 刘高阳¹, 尚皓梵^{1,2}, 王红伟^{1*}
(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 河南省第二人民医院, 郑州 451191)

[摘要] 目的: 观测二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织中 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路中关键分子表达的影响, 探讨二陈汤加味通过 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路对 COPD 抗炎的作用及分子机制。方法: 将 60 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 分别为正常组、模型组、二陈汤加味低、中、高剂量(5、10、20·kg⁻¹)和 γ -分泌酶抑制剂(DAPT)组, 每组 10 只。以烟熏联合气管滴注脂多糖(LPS)的方法制备 COPD 大鼠模型。二陈汤加味各干预组灌胃(ig)给药; DAPT 组 ig DAPT(0.02 g·kg⁻¹); 正常组及模型组 ig 等体积生理盐水。采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定各组血清中 Notch1、可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、白细胞活化黏附分子(ALCAM)和可溶性血管黏附分子-1(sVCAM-1)的含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织中 Jagged1、Notch1 和 Hes1 mRNA 表达, 免疫组织化学(IHC)法检测大鼠肺组织中 Jagged1、Notch1、Notch1 胞内段(NICD1)和 Hes1 蛋白表达。结果: 与正常组比较, 模型组血清中 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 含量均显著升高($P<0.01$); 肺组织 Jagged1、Notch1 和 Hes1 mRNA 表达显著增加($P<0.01$); Jagged1、Notch1、NICD1 和 Hes1 蛋白的表达显著增强($P<0.01$)。与模型组比较, 二陈汤加味中、高剂量和 DAPT 组血清中 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 含量均明显减少($P<0.05$, $P<0.01$); Jagged1、Notch1 和 Hes1 mRNA 表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$); Jagged1、Notch1、NICD1 和 Hes1 蛋白表达均明显减弱($P<0.05$, $P<0.01$)。结论: 二陈汤加味能有效减弱 COPD 肺部炎症反应。其机制可能是通过下调 Jagged1、Notch1、Hes1 mRNA 表达, 抑制 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 释放, 对抗炎症对 COPD 肺组织的损伤有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 二陈汤; Notch1 信号通路; 黏附分子

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0109-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230109

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20221220.1322.001.html>

[网络出版日期] 2022-12-22 13:30:14

Anti-inflammatory Mechanism of Modified Erchentang on Chronic Obstructive Pulmonary Disease Through Jagged1/Notch1/Hes1 Signaling Pathway

SHANG Lizhi¹, JI Shu¹, LI Yaoyang¹, HU Wenhao², XIE Wenyong^{1*}, CHEN Zhuang¹,
LIU Gaoyang¹, SHANG Haofan^{1,2}, WANG Hongwei¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

2. Henan Second Provincial People's Hospital, Zhengzhou 451191, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Erchentang on the expression of key molecules in the Jagged1/Notch1/Hes1 signaling pathway in lung tissues of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and explore its anti-inflammatory effect and molecular mechanism on COPD through the Jagged1/

[收稿日期] 2022-08-16

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573881); 河南省科技攻关项目(182102311163); 2021年河南中医药大学重点学科建设项目(15102040-2021-19); 河南省研究生教育改革与质量提升工程项目(29104011-2)

[第一作者] 尚立芝, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药作用机制研究, Tel: 0371-86253082, E-mail: lzshang2014@163.com

[通信作者] * 谢文英, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药治疗肺系疾病的临床研究, E-mail: xiewenyong1963@163.com;

* 王红伟, 副教授, 从事中西医结合治疗肺系疾病的基础研究, E-mail: 156119506@qq.com

Notch1/Hes1 signaling pathway. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, low-, medium-, and high-dose modified Erchentang groups ($5, 10, 20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and γ -secretase inhibitor DAPT group ($0.02 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 10 rats in each group. The COPD model was induced in rats by cigarette smoking combined with intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). Rats were treated with corresponding drugs by gavage, while those in the normal group and the model group were treated with the same amount of normal saline by gavage. The serum levels of Notch1, soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), and soluble vascular adhesion molecule-1 (sVCAM-1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expression of Jagged1, Notch1, and Hes1 was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression of Jagged1, Notch1, Notch1 intracellular domain (NICD1), and Hes1 in lung tissues of rats was detected by immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased serum content of Notch1, sICAM-1, ALCAM, and sVCAM-1 ($P < 0.01$), increased mRNA expression of Jagged1, Notch1, and Hes1 in lung tissues ($P < 0.01$), and increased protein expression of Jagged1, Notch1, NICD1, and Hes1 ($P < 0.01$). Compared with the model group, the medium- and high-dose modified Erchentang groups and the DAPT group showed decreased serum content of Notch1, sICAM-1, ALCAM, and sVCAM-1 ($P < 0.05, P < 0.05$), down-regulated mRNA expression of Jagged1, Notch1, and Hes1 ($P < 0.05, P < 0.01$), and reduced protein expression of Jagged1, Notch1, NICD1, and Hes1 ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Erchentang may inhibit the inflammatory response in the lung of COPD rats, and its mechanism may be related to the resistance of inflammatory injury in the lung by decreasing the mRNA expression of Jagged1, Notch1, and Hes1 and inhibiting the release of Notch1, sICAM-1, ALCAM, and sVCAM-1.

[Keywords] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Erchentang; Notch1 signaling pathway; adhesion molecule

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是以不可逆气流受限为主要特征的呼吸系统慢性炎症性疾病。预计到2030年,将上升至全球第3位死亡原因,已成为不容忽视的全球公共卫生问题^[1-2]。在我国,COPD患病率高,致残致死率高和高疾病负担^[3-4]。COPD的病因复杂,发病机制不清。在感染、空气污染、吸烟、免疫等多因素作用下,引起气道、肺实质和肺血管的慢性炎症,参与的炎症细胞(主要是淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞)释放炎症介质,趋化和募集更多的炎细胞释放蛋白酶,破坏小气道、肺泡壁结构,导致肺气肿及肺源性心脏病,甚至呼吸衰竭而威胁患者生命^[5]。

Notch信号通路为进化上高度保守的细胞间信息传递机制。在哺乳动物中,Notch胞外的5种配体(Delta1、Delta3、Delta4、Jagged1和Jagged2)和4种Notch受体(Notch1~Notch4)广泛分布于肺组织^[6]。Notch信号通路参与气道和肺组织细胞的存活、生长、增殖、分化与凋亡,调节单核细胞、巨噬细胞,自然杀伤(NK)细胞、T细胞及树突状细胞的功能,在肺发育和呼吸系统炎症性疾病中发挥重要的作

用^[7-8]。Jagged1/Notch1通路的关键分子由Jagged1、Notch1、Hes1蛋白组成,他们在肺组织中分布广泛。主要表达于气道上皮细胞^[9-10]、肺泡上皮细胞^[11-12]、血管内皮^[13]、血管周围及肺间质中的间充质细胞^[14]、巨噬细胞^[15]、成纤维细胞^[16]及多种成熟免疫细胞^[17]。在多种病变肺组织中,Jagged1/Notch1通路表达上调^[18-19]。

COPD炎症刺激与Jagged1/Notch1/Hes-1信号通路过度激活,二者互为因果,共同参与COPD的病理进程^[20-21]。COPD炎症过程中释放的炎症介质作为Notch1的活化剂,激活Jagged1/Notch1/Hes-1信号通路,过表达的Jagged1/Notch1又引发炎症介质的表达及释放增加,循环作用,进而加重COPD的病理性损伤与异常修复^[21]。可溶性细胞间黏附分子-1(sICAM-1)、白细胞活化黏附分子(ALCAM)和可溶性血管黏附分子-1(sVCAM-1)是具有黏附效应的炎症介质,其主要作用是促进炎症细胞与血管内皮的粘附,激活和聚集浸润的炎症细胞,介导炎症反应及组织损伤^[22]。研究证实,阻断Jagged1/Notch1信号通路后,Jagged1和Notch1表达均显著降低^[23]。

γ -分泌酶的抑制剂(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸酯-L-2-苯基甘氨酸叔丁酯(DAPT)是Notch信号通路的特异性阻断剂, γ -分泌酶抑制剂DAPT可有效抑制Notch信号通路的激活,减少炎症介质的释放,控制炎症反应^[24-25]。

本研究采用烟熏联合脂多糖方法制备COPD大鼠模型,以二陈汤加味(由宋代《太平惠民和剂局方》中的二陈汤为基础加减而成)进行干预。前期研究发现二陈汤加味对COPD具有抗炎作用^[26-27]。但有关二陈汤加味能否通过Jagged1/Notch1/Hes1信号通路对COPD发挥抗炎作用,鲜见报道。本文以Notch通路抑制剂DAPT作为阳性药,观测Jagged1/Notch1/Hes1在COPD中表达的变化,并验证二陈汤加味可能有效抑制COPD肺组织中Jagged1/Notch1/Hes1通路关键分子的表达,以及黏附分子(ICAM-1、ALCAM和sVCAM-1)分泌的假设,为明确二陈汤加味治疗COPD的作用靶点提供新的思路。

1 材料

1.1 药物与动物 二陈汤加味方药组成为姜半夏10 g、麻黄6 g、陈皮10 g、炒苦杏仁10 g、葶苈子10 g、党参10 g、茯苓10 g、麸炒白术10 g、地龙10 g、山药10 g、甘草5 g等均为中药配方颗粒(华润三九医药公司,批号分别为2109005c、2103001s、2106002w、2107001w、1912002c、2110001w、2108006w、2004010c、2108002c、2106006w、2104015c)。6月龄雄性SD大鼠,SPF级,由河南省动物实验中心提供,生产合格证号SCXK(豫)2017-0001,实验动物质量合格证编号410975211100014838,实验动物使用单位河南中医药大学,使用许可证号SYXK(豫)2020-0004,河南中医药大学实验动物伦理批号DWLL201903015。

1.2 药品和试剂 脂多糖(LPS)、DAPT、RIPA组织/细胞裂解液、DAB显色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为701C036、419C031、20190928、20190628);红旗渠过滤嘴香烟(河南中烟工业有限责任公司,烤烟型,烟气烟碱量0.8 mg,烟气一氧化碳量12 mg,焦油量10 mg);二甲基亚砜(DMSO)、苏木素染液(美国Sigma公司,批号分别为RNBF0274、H9627);大鼠Notch1、ALCAM、sVCAM-1酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海雅吉生物科技有限公司,货号分别为YS07222B、YS03579B、YS03459B);大鼠sICAM-1 ELISA试剂盒(英国Abcam公司,批号ab100763);兔抗大鼠一

抗Notch1、Jagged1、Hes1(上海艾比玛特医药科技有限公司,批号分别为PA4126、T55726、TD7569);兔抗大鼠NICD1一抗(美国CST公司,批号4147);辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白免疫球蛋白(Ig)G(北京转基因生物技术公司,批号K31105);伊红染液(国药集团化学试剂有限公司,批号71014544);总RNA提取试剂盒,cDNA合成试剂盒(北京天根生物科学技术有限公司,批号分别为DP431、KR106),染料法实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号112141)。引物的合成由宝生物工程(大连)有限公司完成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Jagged1	上游 TGCCGAACCCCTGTCATAAT	176
	下游 TTCGCACCGGTACCAGTTAT	
Notch1	上游 CTGCCTTCGTGCTCCTGTTCTTT	137
	下游 GAGGGGTTCTCTCCGCTTCTTCT	
Hes1	上游 CAACACGACACCGGACAAAC	85
	下游 TCTTGCCCTTCGCCTCTTCT	
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	

1.3 仪器 IVC-N型笼具(苏州冯氏有限公司),BS210S型电子天平(德国Sartorius公司);iofuge startos型多用途4℃离心机(美国电热);BioMate 3S型紫外-可见分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司);Powerwave型XS型全波长扫描酶标仪(美国BioTek公司);RM型2016轮转式切片机(德国Leica公司);JK-6型生物组织摊烤片机(武汉俊杰电子有限公司);TP1020-1型组织脱水机、ST5020型全自动染色机(均为徕卡显微系统上海有限公司);BX61+DP72+型显微摄像装置(日本Olympus公司)及病理图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0,IPP);Motic全自动数字切片扫描系统(Motic DSAssistant Lite,Http://192.168.106.169/dse);DYCZ-40型电转仪(北京六一仪器厂);TCP0096型普通PCR仪和272007028型Real-time PCR仪及其检测软件StepOne™ and StepOne plus™ Real-time PCR systems, StepOne Software v2.1(美国爱普拜斯Applied Biosystem公司);其他设备由河南中医药大学中医药科学院提供。

2 方法

2.1 分组 60只SD雄性大鼠随机分为6组,分别为正常组、模型组、二陈汤加味低、中、高剂量(5、10、20 g·kg⁻¹)和DAPT组,每组10只。

2.2 溶液配制 ①4%多聚甲醛溶液配制:40%甲醛10 mL, pH 7.4的磷酸盐缓冲液(PBS) 90 mL,充分溶解,现配现用。②2% DMSO溶液配制:DMSO 2 mL,加超纯水100 mL,混匀后,现配现用。③助悬液配制:2% DMSO 2 mL,加生理盐水至3 mL。④DAPT的配制:在超净工作台配制储存液和工作液,DAPT 5 mg加入DMSO原液1 mL,充分溶解,配制成质量浓度为5 g·L⁻¹(10 mol·L⁻¹)储存液;每次灌胃前根据大鼠体质量取储存液适量,加生理盐水至总体积为3 mL的工作液,现配现用。

2.3 模型制备与给药 参照文献[28-29],采用香烟烟熏联合气管滴注LPS方法制备COPD大鼠模型。实验的第1、14、28、42天,无菌注射器内预装LPS各200 μL(1 g·L⁻¹),迅速注入气管后,晃动大鼠使LPS散布两肺;正常组经气管注入0.9%氯化钠注射液200 μL。于实验的第2~60天(除第14、28、42天)密封烟熏30 min,每日2次;正常组不烟熏。造模成功后,从第61天,二陈汤加味低、中、高剂量组分别以[5、10、20 g·kg⁻¹]剂量灌胃(ig),用助悬液(2% DMSO 2 mL,加生理盐水至3 mL)稀释中药颗粒冲剂;DAPT组灌胃DAPT 0.02 g·kg⁻¹[30]。正常组及模型组ig等量助悬液(2% DMSO 2 mL,加生理盐水至3 mL),各组每日灌胃1次,连续21 d(实验第61~第81天)。实验第82日测定肺功能之后取材。

2.4 取材与标本制备 腹腔注射麻醉,仰卧位固定,腹主动脉取血2.5 mL,离心取血清,放入-20℃冰箱,用于ELISA测定;迅速取右侧上叶肺组织,用于检测Jagged1、Notch1和Hes1 mRNA表达;取右下叶肺组织,4%多聚甲醛固定,用于常规苏木素-伊红(HE)染色法和免疫组织化学(IHC)法染色,光镜下观察。

2.5 ELISA测定血清中Notch1、sICAM-1、ALCAM、VCAM含量 将标准液、样品液分别加入酶标板中的标准孔、样品孔,加抗体工作液,水浴锅37℃孵育1 h,加底物37℃避光孵育15 min,加终止液,操作过程严格按照说明书进行。15 min内用酶标仪检测450 nm波长时的吸光度A,绘制标准曲线,计算各样品浓度。

2.6 Real-time PCR检测肺组织中Jagged1、Notch1和Hes1 mRNA表达 取右肺上叶肺组织与生理盐

水混合,制成10%的肺匀浆液,取上清,-80℃冰箱保存。总RNA提取,逆转录合成cDNA,Real-time PCR扩增,以GAPDH作为内参,用软件分析Jagged1、Notch1和Hes1基因的扩增曲线。计算各组的2^{-ΔΔC_t}值,得到Jagged1、Notch1和Hes1相对于GAPDH mRNA表达水平,以基因扩增条带吸光度比值表示。

2.7 HE染色观察肺组织病理变化 取出4%多聚甲醛中固定的肺组织,常规脱水、石蜡包埋,切片厚6.0 μm,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,蒸馏水冲洗3次,移至苏木素染色液浸泡5 min,蒸馏水冲洗,盐酸乙醇分化,再冲洗,1% NaHCO₃漂洗,伊红液浸泡2 min,梯度乙醇脱水,二甲苯2次透明,中性树脂封片,光镜下观察肺组织病理变化并摄像。

2.8 IHC法检测Notch1、NICD1和Hes1蛋白表达与定位 参照IHC试剂盒说明书,石蜡切片60℃烤5 h,二甲苯I、II、III脱蜡,100%、95%、75%乙醇各5 min;微波修复、暴露抗原,3%双氧水(现用现配)阻断内源性过氧化物酶,山羊血清封闭;加兔抗大鼠一抗(Notch、NICD1 1:100, Hes1 1:50),4℃湿盒过夜孵育;山羊抗兔二抗室温孵育,新鲜配制的DAB显色,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色;苏木素复染细胞核,1%盐酸乙醇分化;乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。以PBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性片作阳性对照。光镜下观察、分析并拍摄。

2.9 统计学处理 数据处理应用统计软件SPSS 25.0,采用 $\bar{x}\pm s$ 描述计量资料,多组间均数比较用单因素方差分析法,两组间均数比较用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状况 正常组精神及活动正常,呼吸平稳,毛白光亮。除正常组外,造模15 d后,大鼠不同程度的毛黄无光、饮食量及饮水量减少、体质量下降、大便稀溏、咳嗽、气喘、呼吸频率增快、呼吸音增粗、有浅黄色浓稠鼻涕流出。药物干预后,DAPT组和二陈汤加味高、中剂量组体质量增加,毛色白有光泽,咳、喘减轻甚至消失。至实验结束,正常和DAPT组均无死亡;模型组和二陈汤加味低剂量组各死亡2只,存活8只用于数据统计;二陈汤加味中、高剂量组各死亡1只,这2组的统计数据来自余下的9只。

3.2 对COPD大鼠中Notch1、sICAM-1、ALCAM和sVCAM含量的影响 与正常组比较,模型组

Notch1、sICAM-1、ALCAM和sVCAM的含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量

和DAPT组中Notch1、sICAM-1、ALCAM和VCAM含量均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

表2 二陈汤加味对COPD大鼠血清中Notch1、sICAM-1、ALCAM和sVCAM含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Notch1	sICAM-1	ALCAM	sVCAM
正常组	10		52.68±15.65	82.56±24.33	54.27±18.62	14.03±0.60
模型组	8		218.54±30.62 ²⁾	226.41±32.95 ²⁾	142.80±12.15 ²⁾	35.18±2.87 ²⁾
二陈汤加味低剂量组	8	5	194.30±42.07	218.67±27.67	125.74±14.36 ³⁾	33.46±1.52
二陈汤加味中剂量组	9	10	125.12±24.36 ⁴⁾	146.83±25.22 ⁴⁾	79.53±8.10 ⁴⁾	32.29±0.77 ³⁾
二陈汤加味高剂量组	9	20	189.37±20.50 ³⁾	157.16±30.48 ⁴⁾	86.24±6.72 ⁴⁾	25.44±1.21 ⁴⁾
DAPT组	10	0.02	115.95±16.83 ⁴⁾	124.53±28.36 ⁴⁾	65.92±9.83 ⁴⁾	20.23±0.74 ⁴⁾

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3和表4同)

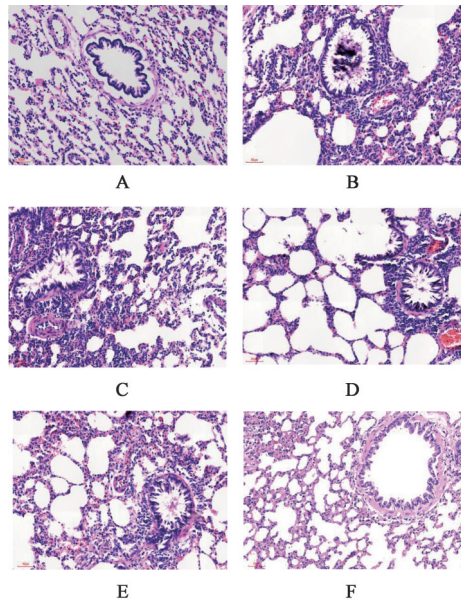
3.3 对COPD大鼠肺组织中Jagged1、Notch1、Hes1 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组肺组织Jagged1、Notch1和Hes1 mRNA的表达均显

著增强($P<0.01$)。与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量和DAPT组Jagged1、Notch1和Hes1 mRNA的表达量均明显减弱($P<0.05, P<0.01$)。见表3。

表3 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织Jagged1、Notch1和Hes1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Jagged1	Notch1	Hes1
正常组	10		0.32±0.05	0.48±0.06	0.25±0.03
模型组	8		1.08±0.14 ²⁾	1.34±0.21 ²⁾	0.56±0.07 ²⁾
二陈汤加味低剂量组	8	5	0.91±0.20	1.17±0.10	0.51±0.04
二陈汤加味中剂量组	9	10	0.89±0.16 ³⁾	0.77±0.16 ⁴⁾	0.42±0.06 ⁴⁾
二陈汤加味高剂量组	9	20	0.84±0.12 ⁴⁾	0.94±0.18 ⁴⁾	0.44±0.11 ³⁾
DAPT组	10	0.02	0.58±0.04 ⁴⁾	0.65±0.13 ⁴⁾	0.39±0.09 ⁴⁾

3.4 对COPD大鼠肺组织结构的影响 光镜下,正常组小、细及终末细支气管腔内无脱落的上皮及炎性渗出物;管壁黏膜上皮结构完整,排列整齐,黏膜以外各层及管周无充血、水肿及炎性细胞浸润。肺泡腔内无渗出物;肺泡壁结构基本完整,无肺泡萎缩、塌陷及肺大泡;肺泡间隔无增厚,无水肿,无明显炎细胞浸润。模型组小、细及终末细支气管管腔狭窄,腔内可见痰栓,尤以终末细支气管内含含有渗出物及脱落上皮组成的痰栓较多;管壁黏膜上皮细胞局部脱落,管壁各层及管围有大量炎细胞浸润,管壁增厚,局部塌陷;管周水肿并有大量炎细胞浸润。肺泡数量明显减少;局部肺泡腔扩大;肺泡壁变薄,可见肺大泡;肺泡间隔局部增厚,炎症细胞浸润明显。各干预组的细支气管及肺上皮细胞稍有脱落;炎细胞浸润及水肿较轻,其中二陈汤加味中、高剂量及DAPT组炎症明显减轻,但仍未恢复至正常。见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.二陈汤加味5g·kg⁻¹组;D.二陈汤加味10g·kg⁻¹组;E.二陈汤加味20g·kg⁻¹组;F.DAPT组(图2-图5同)
图1 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织结构的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of modified Erchentang on lung tissue structure morphology of COPD rats (HE, ×200)

3.5 对COPD大鼠肺组织中Jagged1、Notch1、NICD1和Hes1蛋白表达的影响 Jagged1蛋白阳性

信号定位于细胞浆,呈淡黄、深黄或棕色颗粒,主要分布于气道及肺间质中的巨噬细胞、淋巴细胞,气道上皮和肺泡上皮细胞和血管内皮亦均呈阳性。正常组 Jagged1 蛋白呈弱阳性表达,与正常组比较,模型组肺组织中 Jagged1 蛋白阳性表达量显著增强 ($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量、DAPT 组中 Jagged1 蛋白阳性表达均明显减弱 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 4、图 2。Notch1 蛋白阳性信号定位于细胞膜和细胞浆,阳性着色呈淡黄、深黄或棕色颗粒。主要表达在气道上皮细胞中,肺泡上皮细胞、血管内皮、成纤维细胞及肺间质细胞中也表达阳性。正常组 Notch1 蛋白呈弱阳性。与正常组比较,模型组肺组织中 Notch1 蛋白阳性表达量显著增强 ($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组、DAPT 组中 Notch1 蛋白表达均明显减弱 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 4、图 3。NICD1 蛋白定位于细

胞浆和细胞核, NICD1 蛋白阳性着色呈黄色、或棕色颗粒。正常组 NICD1 蛋白表达水平偏低。与正常组比较,模型组肺组织中 NICD1 蛋白阳性表达量显著增强 ($P<0.01$)。模型组主要表达于气道上皮和肺泡上皮细胞、血管内皮、成纤维细胞及肺间质免疫细胞中;与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组、DAPT 组中 NICD1 蛋白表达均明显减弱 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 4、图 4。Hes1 蛋白阳性信号定位于细胞核,着色呈黄色或棕色颗粒。正常组 Hes1 蛋白表达微弱阳性,主要表达于气道上皮和肺泡上皮细胞,气道及肺间质巨噬细胞、淋巴细胞等免疫细胞核中。与正常组比较,模型组肺组织中 Hes1 蛋白阳性表达量显著增强 ($P<0.01$);与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量、DAPT 组中 Hes1 蛋白表达均显著减弱 ($P<0.05, P<0.01$)。见表 4、图 5。

表 4 二陈汤加味对 COPD 肺组织中 Jagged1、Notch1、NICD1 和 Hes1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of modified Erchentang on expression of Jagged1, Notch1, NICD1 and Hes1 protein in lung tissue of COPD rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Jagged1	Notch1	NICD1	Hes1
正常组	10		0.36±0.05	0.45±0.02	0.31±0.01	0.18±0.03
模型组	8		1.02±0.16 ²⁾	1.24±0.21 ²⁾	1.06±0.13 ²⁾	0.85±0.15 ²⁾
二陈汤加味低剂量组	8	5	0.97±0.18	1.18±0.15	0.89±0.17 ⁴⁾	0.80±0.12
二陈汤加味中剂量组	9	10	0.86±0.04 ³⁾	0.75±0.26 ⁴⁾	0.92±0.08 ³⁾	0.62±0.09 ⁴⁾
二陈汤加味高剂量组	9	20	0.74±0.07 ⁴⁾	0.96±0.19 ³⁾	0.58±0.10 ⁴⁾	0.67±0.18 ³⁾
DAPT 组	10	0.02	0.59±0.03 ⁴⁾	0.66±0.08 ⁴⁾	0.47±0.12 ⁴⁾	0.41±0.16 ⁴⁾

4 讨论

COPD 的临床表现主要为反复发作的咳嗽、咳痰、喘息等,属于中医学“肺胀”“喘证”范畴。“肺胀”始载于《黄帝内经·灵枢·经脉》:“肺手太阴之脉,……是动则病肺胀满膨膨而喘咳。”《黄帝内经·灵枢·胀论》:“肺胀者,虚满而喘咳”。COPD 以外感六淫为主要诱发因素,如《丹溪心法·喘》:“六淫七情所感伤,饱食动作,脏气不和,呼吸之息,不得宣畅而为喘急。亦有脾肾俱虚体弱之人,皆能发喘。”其病位主要责之于肺,肺为娇脏,易感外邪,迁延失治,日久气虚,失之宣肃,痰浊内生,久而不愈,脾肾虚损,致使机体正虚而卫外不固,外邪反复侵袭,加剧喘咳等症。其病机的特点是本虚标实,本虚以肺脾肾虚为主,标实以外邪、痰浊、血瘀为主,治宜燥湿化痰逐瘀、补肺健脾固肾。二陈汤出自北宋《太平惠民和剂局方》,由半夏、陈皮、茯苓、甘草组成,有燥湿化痰、理气和中之效是公认的祛痰祖方^[31]。二陈汤加味方是在原方基础上添加蜜麻黄、苦杏

仁、葶苈子、地龙、干姜、党参、白术、山药而成,目的在于取蜜麻黄、苦杏仁、葶苈子降肺止咳平喘之用;取地龙、干姜温肺通络祛瘀之功;取党参、白术、山药健脾补肺、培土生金之意。诸药合用,不仅加强原方燥湿健脾、化痰止咳之功,而兼补肺脾肾、祛瘀通络,临床上治疗慢阻肺疗效突出^[27,32-33]。

COPD 过程中存在 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路的过度激活,二陈汤加味对 COPD 中 Jagged1/Notch1/Hes1 基因表达有下调作用。Notch1 受体和配体表达于各种成熟的免疫细胞,包括单核细胞、巨噬细胞和抗原提呈细胞、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞等。Notch1 受体和配体均为典型的单链跨膜蛋白,其构成包括胞外功能段(NECD)、跨膜结构域(NTM)和胞内域(NICD)3 部分。在 COPD 炎症刺激下,Notch1 信号通路的经典途径由配体与邻近细胞上的受体相互作用而启动。相邻细胞间 Jagged1 与 Notch1 受体相互结合,细胞膜上的 Notch1 受体通过解聚素和金属蛋白酶切割 Notch 受体细胞外亚

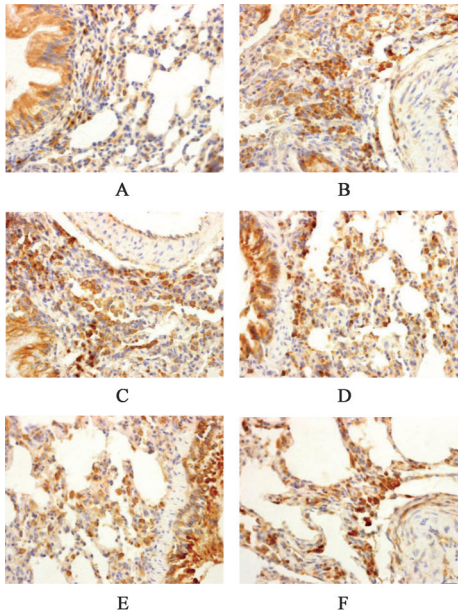


图2 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织中Jagged1蛋白的表达(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of modified Erchentang on expression of Jagged1 protein in lung tissue of COPD rats (IHC, ×400)

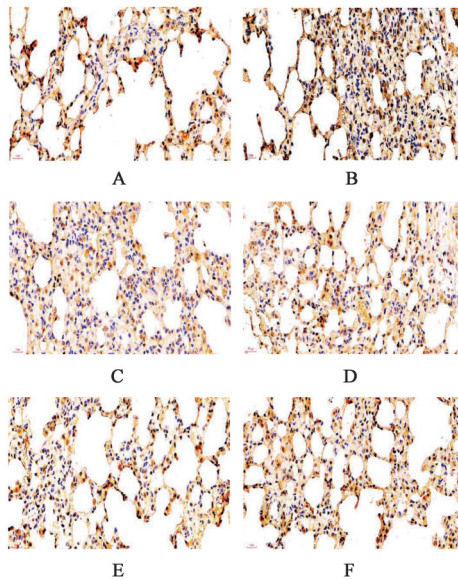


图3 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织中Notch1蛋白的表达(IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Erchentang on expression of Notch1 protein in lung tissue of COPD rats (IHC, ×400)

基, 释放部分胞外片段, 粘连在细胞膜上; Notch胞内部分经 γ -分泌酶裂解释放胞内段(NICD)入胞质, NICD转入核内, NICD与CSL转录因子复合物特异性结合, 形成转录复合物NICD-CSL, 启动其下游关键靶基因Hes1与核转录因子 κ B(NF- κ B)等的激活与表达^[34-35], 启动靶基因白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-5及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、ICAM-1, 活

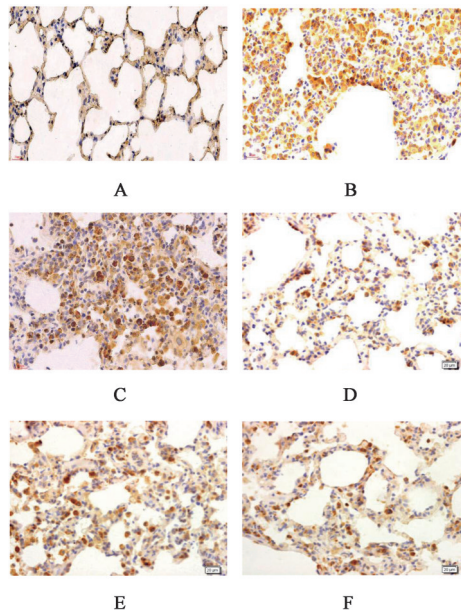


图4 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织中NICD1蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Erchentang on expression of NICD1 protein in lung tissue of COPD rats (IHC, ×400)

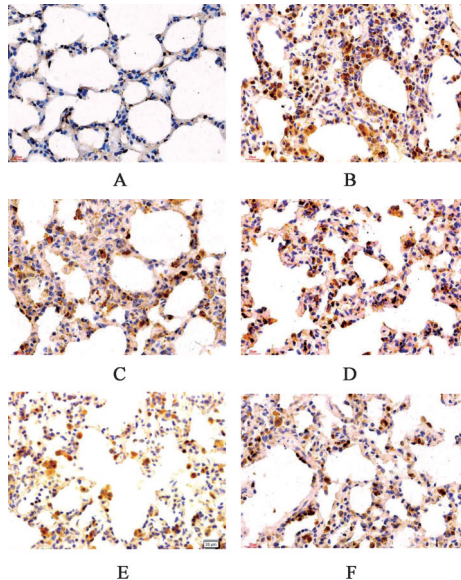


图5 二陈汤加味对COPD大鼠肺组织中Hes1蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 5 Effect of modified Erchentang on expression of Hes1 protein in lung tissue of COPD rats (IHC, ×400)

化的ALCAM、sVCAM-1等炎症介质的表达与释放^[21,36], 并通过反馈环路促进炎症过程持续^[37]。同时, 生成的炎症介质又作为Notch1的活化剂, 进一步激活Notch1/Jagged1/Hes1信号通路, 如此循环使炎症持续放大和扩散, 不断加重气道和肺组织的炎症性损伤与病理性修复, 参与慢阻肺的病理过程^[38-39]。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组肺

组织 Jagged1、Notch1 和 Hes1 mRNA 的表达显著增强, Jagged1、Notch1、NICD1 和 Hes1 蛋白表达亦均显著增强,与文献报道一致^[40-41]。提示 COPD 过程中存在 Jagged1/Notch1/Hes1 通路激活。与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量和 DAPT 组中 Jagged1、Notch1 和 Hes1 mRNA,以及 Jagged1、Notch1、NICD1 和 Hes1 蛋白表达量均显著减弱。DAPT 是 Notch 信号通路中 γ -分泌酶的抑制剂,可有效阻断由 γ -分泌酶介导的酶切环节,使受体胞内段无法转变成活性片段,低水平的 NICD1 对其靶基因 Hes1 的启动作用减弱,从而抑制 Notch 信号通路的激活^[22-25]。同理说明二陈汤加味下调 Jagged1、Notch1 和 Hes1 基因表达。

二陈汤加味不仅下调 Jagged1/Notch1/Hes1 基因表达,而且抑制黏附分子(CAM)释放,从而发挥抗炎作用。研究表明,LPS 刺激能上调单核细胞、巨噬细胞中 Notch1 和 Jagged1 的表达,激活的 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路;而 Jagged1/Notch1/Hes1 信号通路又增强 LPS 诱导单核巨噬细胞 NF- κ B 活化,增加巨噬细胞释放多种炎症介质^[37,42-43]。CAM 是促进炎症细胞与血管内皮的黏附、激活和浸润的炎症介质^[23]。气道和肺组织的炎症反应存在于 COPD 的全过程,CAM 引起免疫功能紊乱,介导炎细胞的迁移、刺激炎症反应及炎症介质的释放。COPD 慢性炎症过程中,呼吸上皮细胞、血管内皮细胞、单核/巨噬细胞、成纤维细胞、炎区内活化的淋巴细胞等表达的 ALCAM、VCAM、ICAM 等 CAM 均上调^[44]。炎症过程中的一些细胞因子尤其 TNF- α 、IL-1、IFN- γ ,促进上皮细胞表达更多的 CAM,提高肺泡 I、II 型上皮细胞、毛细血管内皮细胞表达 CAM^[43]。共聚焦显微镜技术显示,在内皮细胞及内皮间的细胞连接上均有 ICAM-1、ALCAM 和 VCAM-1 表达,这与 CAM 介导白细胞的跨细胞及细胞旁途径的迁移相符合^[45]。炎细胞的迁移过程一般先是炎细胞间与内皮细胞或细胞外基质(ECM)间相互接触和分子结合,通过改变血管壁的通透性和介导调节转录的信号通路,导致细胞内钙含量改变、酶的激活、中间微丝和质膜微囊的改变、细胞骨架重排,使外周血白细胞募集、着边、捕获、滚动、活化,与内皮细胞紧密黏附,白细胞经细胞旁和跨细胞途径变形移动通过血管壁实现渗出;渗出的白细胞叫炎细胞,炎细胞被炎症介质趋化定向至炎症病灶,实现吞噬、免疫反应及对组织的损伤^[46]。本研究采用 LPS 联合香烟烟熏制备 COPD 大鼠模型,结果显示,与正常组

比较,模型组 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 的含量均显著升高。高表达的 Notch1 促进黏附分子 sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 的合成与释放,其中高表达的黏附分子 sICAM-1、VCAM-1 和 sVCAM,介导白细胞与内皮细胞之间相互黏附、穿越血管壁而渗出、吸引更多炎症细胞趋化、聚集和过度活化,形成瀑布效应,持续存在的炎症反应刺激气道和肺组织中继续炎性渗出、组织损伤与病理修复^[47-48]。ICAM-1 在体内有 2 种存在形式,一种为膜 ICAM-1,另一种为 sICAM-1,sICAM-1 是由膜 ICAM-1 经蛋白水解酶分解的胞外区片段,游离存在血液中,严重炎症时机体血液 sICAM-1 水平明显升高^[49],介导对白细胞的捕获和黏附,加剧肺部炎症,从而导致气道和肺组织损伤。ICAM-1 的临床应用价值可用于预测肺部炎症疾病预后,判断吸烟或感染的致病过程^[50-51]。本研究结果发现,二陈汤加味中、高剂量和 DAPT 组中 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 含量均显著降低,DAPT 是 γ -分泌酶抑制剂,DAPT 使 Notch1 被 γ -分泌酶水解释放的 NICD1 减少,Hes1 转录活性减弱,下游靶基因细胞因子^[43]ICAM-1、ALCAM、sVCAM-1 等表达与释放减少,炎症反应被抑制。同理提示二陈汤加味通过抑制 Notch1 的激活,下调 Notch1、sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 水平,进而发挥抗炎作用。肺组织病理改变予以佐证。

总之,二陈汤加味能有效对抗 COPD 炎症反应。其机制可能通过下调 Jagged1/Notch1/Hes1 信号转导系统中关键分子的基因表达,抑制黏附分子 sICAM-1、ALCAM 和 sVCAM 的合成与释放,阻滞炎细胞的迁移及趋化,减轻白细胞主导的炎症反应,进而减弱炎症对肺组织的病理损伤。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LÓPEZ-CAMPOS J L, TAN W, SORIANO J B. Global burden of COPD [J]. *Respirology*, 2016, 21(1):14-23.
- [2] 席玉婕,唐璇,唐仕欢,等. 基于多靶标药效评价体系的经典方治疗慢性阻塞性肺疾病用药规律解析[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(21):5710-5718.
- [3] 李薇,杨汀,王辰. 中国慢性阻塞性肺疾病防治现状及进展[J]. *中国研究型医院*, 2020, 7(5):1-5, 78-84.
- [4] VESTBO J, MATHIOUDAKIS A G. The emerging Chinese COPD epidemic [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131):1642-1643.

- [5] 李锋,周新. 慢性阻塞性肺疾病的发病机制研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2019,18(1):88-92.
- [6] ZONG D, OUYANG R, LI J, et al. Notch signaling in lung diseases: Focus on Notch1 and Notch3[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2016, 10(5):468-484.
- [7] 高云星,蒋莉莉,张倩,等. 吴茱萸次碱通过抑制 Notch1/eIF3a 信号通路保护博来霉素诱导的大鼠肺纤维化[J]. 中国中药杂志,2018,43(17):3530-3538.
- [8] POULSEN L C, EDELMANN R J, KRÜGER S, et al. Inhibition of endothelial NOTCH1 signaling attenuates inflammation by reducing cytokine-mediated histone acetylation at inflammatory enhancers[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(4):854-869.
- [9] 李妮妮,蒋成君,郭艳,等. 基于 Notch 通路研究化痰降气胶囊含药血清对人支气管上皮细胞 MRP1 的影响[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(12):1442-1448.
- [10] LI N N, GUO Y, JIANG C J, et al. Allyl isothiocyanate upregulates MRP1 expression through Notch1 signaling in human bronchial epithelial cells[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2020, 98(5):324-331.
- [11] 汤娟,柯洁,付裕,等. II 型肺泡上皮细胞间质分化中的 Notch-1/Twist-1 信号通路机制[J]. 中国应用生理学杂志,2021,37(6):577-583,682.
- [12] 万峰云,卢红艳,万雪晴,等. Notch1/Hes1 信号调控 C/EBP α 表达对 AEC II 细胞增殖与分化的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(3):495-499.
- [13] 渠景连,杨邯捷,赵惠亮. 补阳还五汤含药血清对人肺动脉内皮细胞间质转化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(19):1-9.
- [14] LI T, YANG X, XIN S, et al. Paraquat poisoning induced pulmonary epithelial mesenchymal transition through Notch1 pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):924.
- [15] WONGCHANA W, PALAGA T. Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages [J]. *Cell Mol Immunol*, 2012, 9(2):155-162.
- [16] ZHOU Y, LIAO S, ZHANG Z, et al. Astragalus injection attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via down-regulating Jagged1/Notch1 in lungs [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(3):389-396.
- [17] MOCHIZUKI K, HE S, ZHANG Y. Notch and inflammatory T-cell response: New developments and challenges [J]. *Immunotherapy*, 2011, 3(11):1353-1366.
- [18] POST L C, TERNET M, HOGAN B L. Notch/Delta expression in the developing mouse lung [J]. *Mech Dev*, 2000, 98(1/2):95-98.
- [19] 董广通,张解玉,侯炜. 复方苦参注射液干预调控放射性肺炎大鼠 Notch1 及 Jagged1 信号通路的机制[J]. 中华中医药杂志,2019,34(9):4278-4282.
- [20] 杨鑫娜,刘晓菊,赵兰婷,等. Notch 信号通路在慢性阻塞性肺疾病免疫失衡中的作用及机制研究[J]. 中华结核和呼吸杂志,2016,39(11):881-885.
- [21] 李彬,甘德堃,王璐璐. 和厚朴酚通过 Notch 信号通路抑制慢性阻塞性肺疾病小鼠免疫失衡并提供肺保护作用[J]. 中国比较医学杂志,2022,32(4):86-93.
- [22] PALENKIĆ H, BAČUN T, ČOŠIĆ A, et al. Serum levels of ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin in early postoperative period and three months after eversion carotid endarterectomy[J]. *Med Glas (Zenica)*, 2014, 11(2):313-319.
- [23] HU B, WU Z, BAI D, et al. Mesenchymal deficiency of Notch1 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(11):3066-3075.
- [24] YIN X, WEI H, WU S, et al. DAPT reverses the Th17/Treg imbalance in experimental autoimmune uveitis in vitro via inhibiting Notch signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79:106107.
- [25] FENDER A W, NUTTER J M, FITZGERALD T L, et al. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(11):2517-2527.
- [26] 尚立芝,季书,谢文英,等. 二陈汤加味对 COPD 急性期患者 CC16, SP-D 及 HAT/HDAC 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):163-170.
- [27] 陈四清,谢文英,尚立芝,等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病急性加重期老年患者免疫功能及 CCL18, CC16, IL-8 和 sICAM-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(10):171-177.
- [28] 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.
- [29] SHU J, LU W, YANG K, et al. Establishment and evaluation of chronic obstructive pulmonary disease model by chronic exposure to motor vehicle exhaust combined with lipopolysaccharide instillation [J]. *Exp Physiol*, 2018, 103(11):1532-1542.
- [30] 曾庆敏. 丹参酮 II_A 联合 DAPT 对 UUO 模型大鼠肾组织 Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达的影响[D]. 遵义:遵义医科大学,2020.
- [31] 包永生,谢文英,王俊月. 二陈汤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):9-18.
- [32] 尚立芝,季书,李耀洋,等. 二陈汤加味对急性加重期 COPD 患者 CXCL8 及 CXCR1/2 蛋白表达的影响[J].

- 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 1-8.
- [33] 谢文英, 季书, 尚立芝, 等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(10): 155-162.
- [34] ZHANG S, LOCH A J, RADTKE F, et al. Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways [J]. *Dev Dyn*, 2013, 242 (6) : 678-686.
- [35] 刘伟, 江蓉星, 陈子锴, 等. 活血通络汤预防激素性股骨头缺血性坏死兔造模过程中对 AKP、Jagged1 表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 3989-3992.
- [36] MAILLARD I, FANG T, PEAR W S. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, 23: 945-974.
- [37] 赵洪伟, 车楠, 黄超, 等. Notch1 信号激活核因子- κ B (NF- κ B) 参与小鼠 RAW264. 7 巨噬细胞炎症介质释放[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(10): 1310-1315.
- [38] RADTKE F, MACDONALD H R, TACCHINI-COTTIER F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (6): 427-437.
- [39] CHONG L, ZHANG W, NIE Y, et al. Protective effect of curcumin on acute airway inflammation of allergic asthma in mice through Notch1-GATA3 signaling pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(5): 1476-1485.
- [40] 王震, 郑之俊, 梁发俊, 等. 基于 Th1/TH2 “漂移”及“触发”sTREM1、CD64 观察针药结合治疗卒中相关性肺炎的临床研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25(12): 1716-1718, 1776.
- [41] 林德华, 王成枫, 余养生. 辛伐他汀通过调控 NOTCH 信号通路来抑制慢阻肺免疫失衡和炎症反应[J]. *临床肺科杂志*, 2019, 24(5): 839-845.
- [42] TSAO P N, WEI S C, HUANG M T, et al. Lipopolysaccharide-induced Notch signaling activation through JNK-dependent pathway regulates inflammatory response [J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18(1): 56.
- [43] BORTHWICK L A. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung[J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(4): 517-534.
- [44] DI BATTISTA A P, RHIND S G, HUTCHISON M G, et al. Inflammatory cytokine and chemokine profiles are associated with patient outcome and the hyperadrenergic state following acute brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13: 40.
- [45] 赖志豪, 谢玉龙, 马超, 等. 细胞黏附分子在单核细胞迁移中的作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31 (11): 1571-1575, 1579.
- [46] MULLER W A. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(4): 886-896.
- [47] HONG S W, JUNG K H, LEE H S, et al. Suppression by fucoidan of liver fibrogenesis via the TGF- β /Smad pathway in protecting against oxidative stress [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2011, 75(5): 833-840.
- [48] 薛艳, 许嘉慧, 高艳荣, 等. 基于网络药理学探讨清肺化痰方改善慢性阻塞性肺疾病的作用机制[J]. *世界中医药*, 2021, 16(4): 558-565.
- [49] 李春盈, 王秀兰, 杨振宇. 麻杏泻白散加减对慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热阻肺型患者 MMP-9、sTREM-1、IL-6 及营养指标的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(4): 2371-2375.
- [50] 滕飞, 徐磊. 吸烟对 COPD 患者瘦素、TNF- α 、sICAM-1 及肺功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41 (23): 5207-5209.
- [51] 刘克琴, 蒋晨露, 刘海霞, 等. 清金化痰汤序贯治疗对慢性阻塞性肺疾病患者预后的影响[J]. *世界中医药*, 2021, 16(6): 955-960.

[责任编辑 周冰冰]