

清金化痰汤通过调节自噬对 COPD 大鼠炎症反应的影响

吴林娜, 赵媚, 许光兰*

(广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

[摘要] **目的:** 通过观察清金化痰汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的自噬调节作用,探讨其对 COPD 大鼠的炎症反应的影响。**方法:** 采用 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分成 5 组,分别为正常组、模型组、清金化痰汤高、低剂量组(30, 10 g·kg⁻¹),罗红霉素组(0.017 5 g·kg⁻¹),每组 10 只,除正常组 10 只外,余 40 只用单纯烟熏方法建立 COPD 大鼠动物模型 28 d。苏木素-伊红(HE)染色鉴定模型成立后,5 组分别灌胃给药 14 d,1 次/d,模型组、正常组同体积生理盐水灌胃。末次灌胃 1 h 后处死大鼠提取气道,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测其自噬相关蛋白微管相关蛋白轻链 3(LC3),Beclin-1 表达;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6),IL-8 的含量变化。**结果:** Real-time PCR 分析显示,与正常组比较,模型组自噬因子 Beclin-1,LC3 mRNA 表达均有不同程度升高($P < 0.05$);与模型组比较,清金化痰汤处理后能够明显改善 COPD 大鼠气道上皮细胞自噬反应,自噬表达明显减少($P < 0.05$),高剂量组与罗红霉素组比较差异不显著。Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组自噬蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,清金化痰汤药物处理组自噬蛋白 Beclin-1,LC3 表达下降($P < 0.05$);清金化痰汤高剂量组与罗红霉素组比较差异不显著。ELISA 结果显示,模型组大鼠的炎症水平升高,用药处理后大鼠气道上皮细胞内的炎症因子 IL-6,IL-8 含量均明显下降($P < 0.05$)。**结论:** 清金化痰汤能够减轻 COPD 大鼠支气管的炎症反应,其机制可能与清金化痰汤抑制气道上皮的自噬水平有关。

[关键词] 清金化痰汤;慢性阻塞性肺疾病(COPD);自噬

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)18-0030-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191801

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190603.1859.006.html>

[网络出版时间] 2019-06-04 14:40

Effect of Qingjin Huatan Tang on COPD of Rat Inflammatory Response by Regulating Autophagy

WU Lin-na, ZHAO Mei, XU Guang-lan*

(The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of Qingjin Huatan Tang (QJHTD) on the inflammatory response of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats by observing the autophagy regulating effect of QJHTD on COPD rats. **Method:** The 50 SPF grade male rats were randomly divided into 5 groups, with 10 rats in each group. In addition to the normal group, the remaining 40 male rats were randomly divided into 5 groups. After the establishment of the hematoxylin and eosin (HE) staining identification model, the drugs were given to the 5 groups by gavage for 2 weeks, high and low-dose QJHTD groups were give the drug at 30, 10 g·kg⁻¹. Roxithromycin positive control group was given the drug at 0.017 5 g·kg⁻¹. The model control group and the normal group were given the same volume of normal saline. At 1 h after the last gavage, the rats were put to death to extract the airway, and the expressions of autophagy microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), Beclin-

[收稿日期] 20190313(017)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81760848)

[第一作者] 吴林娜,硕士,医师,从事中西医结合呼吸系统疾病防治研究,Tel:0771-4733943,E-mail:1090551254@qq.com

[通信作者] *许光兰,教授,主任医师,从事呼吸系统疾病防治研究,Tel:0771-5848615,E-mail:momo60807@icloud.com

1 were detected by Real-time quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot. Changes of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Real-time PCR analysis showed that compared with the normal group, Beclin-1 and LC3 mRNA expressions of autophagy factors in the model group were increased to varying degrees ($P < 0.05$). QJHTD could significantly improve the autophagy response of airway epithelial cells in COPD rats, and the autophagy expression was significantly reduced compared with the model control group ($P < 0.05$), with no significant difference between the high-dose group and the positive control group. Western blot results show that compared with the normal group, the expression of autophagy protein in the model group was significantly increased ($P < 0.05$). compared with model control group, autophagy protein Beclin 1, LC3 expressions of the QJHTD treatment group were decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference between the high-dose QJHTD group and the Roxithromycin positive control group. ELISA results showed that the inflammatory level of mice in the model group was increased, while the contents of inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 in the airway epithelial cells of mice were decreased after treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** QJHTD can alleviate the bronchial inflammation in COPD rats, and its mechanism may be related to the inhibition of autophagy in airway epithelium by QJHTD.

[**Key words**] Qingjin Huatan Tang (QJHTD); chronic obstructive pulmonary disease (COPD); autophagy

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 在呼吸系统疾病中常见, 是一种造成全身功能障碍的疾病, 在我国该病患病率仍在持续上升^[1]。其发病机制仍不明确, 慢性气道炎症是其主要的病理特征, 而气道上皮细胞受损是 COPD 重要的病理基础。气道上皮损伤激活炎症反应导致支气管狭窄、水肿。被激活的气道上皮细胞可作为一种效应细胞, 产生大量炎症细胞因子及炎症介质加重气道炎症反应。近年来对于自噬与 COPD 相关研究层出不穷^[2-3], 与其气道炎症性反应的关系更是备受关注, 有研究发现自噬影响炎症介质的表达^[4], 认为在 COPD 疾病中受损的气道上皮细胞可能通过自噬自我修复, 减少炎症介质及炎症因子的释放, 阻碍炎症介质的过度表达从而减轻气道炎症。因此在治疗 COPD 疾病过程中, 调节细胞自噬或许可成为更为有效的新的治疗方法。众多研究显示中医药对 COPD 患者临床症状的改善、提高患者预后及生活质量均有一定的疗效, 同时联合用药时又可降低化学合成药物的副作用。清金化痰汤 (Qingjin Huatan Tang, QJHTT) 出自《医学统旨》, 有清肺化痰、祛热止咳的功效, 是治疗 COPD 的有效方剂, 研究小组前期研究证实其对改善 COPD 疾病症状有一定疗效^[5-6]。本实验通过研究 QJHTT 干预 COPD 大鼠后, 观察其自噬相关因子的变化及其炎症因子的改变, 探讨清金化痰汤在自噬方面对 COPD 大鼠气道炎症反应的影响。

1 材料

1.1 动物 本课题采用健康 SPF 级 SD 雄性大鼠

50 只, 10 ~ 20 周, 体质量 (200 ± 20) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (湘) 2016-0002, 本实验动物及条件符合《实验动物管理条件》要求。

1.2 药物及试剂 清金化痰汤方由黄芩片 15 g, 栀子 15 g, 知母 12 g, 桑白皮 12 g, 瓜蒌仁 15 g, 浙贝母 10 g, 陈皮 15 g, 茯苓 10 g, 麦冬 10 g, 桔梗 15 g, 炙甘草 10 g 组成, 所有药材经广西中医药大学罗耽副教授鉴定为正品, 符合 2015 年版《中国药典》规范, 由广西中医药大学第一附属医院购进, 江阴天江药业有限公司中药配方颗粒, 按比例配制, 以生成药量 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 用蒸馏水充分溶解, 并收集在干净玻璃瓶中, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷藏备用; 真龙牌香烟 (南宁卷烟厂); 罗红霉素 (江苏联环药业有限公司, 批号 20171201); 4% 多聚甲醛固定液 (武汉博士德生物工程公司, 批号 11D28C68); 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1120); trizol (上海拜力生物科技有限公司, 批号 15596-026); 逆转录试剂盒 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 批号 #K1622); TB Green 嵌合荧光实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 试剂盒 [宝日医生物技术 (北京) 有限公司, 批号 v201801w]; 兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体 (杭州贤至生物科技有限公司, 批号 0211009); Beclin-1 抗体 (美国 Affinity Biosciences 公司, 批号 9613j15); 轻链 3A (LC3A) 兔单抗, 兔抗免疫球蛋白 (Ig) G 二抗 (美国 Cell Signaling Technology

公司,批号分别为 17AV0207,17AV0314);大鼠白细胞介素(IL)-6,IL-8 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 201708,201712)。

1.3 仪器 TS100 型荧光倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司);RM2125 型切片机,TPHIZO 型全自动封闭式组织脱水机(德国徕卡公司);KH-BL 型生物组织包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司);Step One Plus 型 Real-time PCR 仪(美国 Thermal 公司);Nano Drop ONE 型超微量紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DDYY-7C 型电泳仪电源,DY CZ-24DH 型电泳仪,DY CZ-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 建立 COPD 大鼠模型 随机抽取 SPF 级健康大鼠 40 只,参照王骏等^[7]采用单纯烟熏法进行造模。模型大鼠烟熏 4 周,每周 5 d,每天被动吸烟 2 次,每次约燃 15 g 香烟 20 min。

2.2 分组给药 造模成功后将 40 只模型大鼠按照随机数字法分为 4 组每组 10 只,实验大鼠给药用量及方法参照《现代医学实验动物学》中的标准方程进行计算。灌胃液浓度及等效剂量均参照贺式计量-体表面积 $D_2 = D_1 X r_2 / R_1$ 进行合理折算。大鼠灌胃体积按照大鼠体质量进行换算为 $14 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验动物给药时间分别为每日上午 9 点、下午 16 点分 2 次进行灌胃。具体按照以下剂量灌胃 2 周,每日 1 次,QJHTT 高剂量组 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;QJHTT 低剂量组 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,罗红霉素组 $0.175 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,模型组与正常组灌胃等容积 0.9% 氯化钠溶液。末次给药 1 h 后,取其支气管进行目的指标检测。

2.3 指标检测

2.3.1 HE 染色观察肺组织病理学变化 给药周期结束 24 h 内,取 5 组造模大鼠肺组织,按照脱水、透明、包埋、切片、脱蜡、染色、封片的步骤,制作病理组织切片,并摄片。依据尚立芝等^[8]研究方法,进行 HE 染色,鉴定 COPD 大鼠模型成立。

2.3.2 Real-time PCR 检测药物干预后自噬相关因子表达 取 trizol 1 mL 裂解样本组织 50 ~ 100 mg,经萃取测定 RNA 质量浓度($500 \sim 1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)计算加样量,逆转录为 cDNA,以其为模板进行 Real-time PCR 扩增 95 °C 预变性 30 s,1 循环;PCR 反应 95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 循环;融解曲线分析 95 °C

15 s,60 °C 60 s,1 循环)。引物序列见表 1。以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak)法分析目的基因相对表达量。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Beclin-1	GGAGGTGCCGTTGTACTYGTCT	22
	TCCTTTTTCACCTCTTCTTTG	
LC3	TGTCCTGGATAABGACCAAGTTT	22
	CCTGTTTCATAGATGTCAGCGAT	
β -actin	AACRACCCCTTCATTGAC	18
	TCCACGACATACTCAGCA	

2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测药物干预后自噬相关蛋白表达 用含 1% 苯甲基磺酰氟(PMSF)的 RIPA 裂解液 100 ~ 150 μL 裂解样本组织 20 mg,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后测定蛋白质含量($15 \sim 25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)调节浓度,以蛋白 50 ng 上样,于 10% ~ 15% SDS-PAGE 电泳,转于 PVDF 膜上,根据分子量选择相应条带,封闭后以 Beclin-1 一抗(1:1 000),LC3A 兔单抗(1:1 000),GAPDH 为内参(1:500),4 °C 孵育过夜,暗室兔抗免疫球蛋白(Ig)G 二抗(1:4 000)孵育 1 h,用双色红外荧光扫描成像仪器 Odyssey 扫描成像,用 Image J 软件测定目的条带与内参 β -actin 灰度值,以两者比值表达其相对含量并计算 LC3 II/LC3 I。

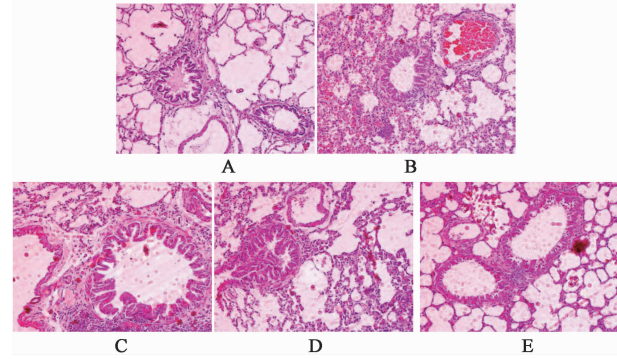
2.3.4 ELISA 测定各组药物干预后 IL-6,IL-8 含量变化 按 2.3.3 项所述提取气道上皮细胞的蛋白。按照 ELISA 试剂盒指南操作,将不同浓度标准品与样本各 50 μL 加入检测孔,并加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的检测抗体 100 μL ,37 °C 恒温箱温育 60 min。洗涤终止后酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的吸光度 A,计算 IL-6,IL-8 细胞炎症因子含量。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据统计分析,计量所得数据并以 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布的数据采用表示,计量资料多组间比较前先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,如果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 对 COPD 大鼠肺组织病理学的影响 正常组大鼠肺脏少许炎性细胞浸润,黏膜未见充血,各级

支气管管腔基本完整,肺泡未见充血水肿;模型大鼠肺组织可见肺泡壁薄,有断裂,有肺大泡形成,支气管壁增厚,周边可见大量炎症细胞浸润,与参照模型结果一致^[8];QJHTT 处理后,COPD 大鼠的炎症反应减轻。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. QJHTT 低剂量组;D. QJHTT 高剂量组;E. 罗红霉素组(图 2 同)

图 1 QJHTT 对 COPD 大鼠肺组织病理学影响(HE, ×200)
Fig. 1 Effect of QJHTT on lung histopathology of COPD rats (HE, ×200)

3.2 对 COPD 大鼠气道自噬相关基因 Beclin-1, LC3 mRNA 表达影响 与正常组比较,模型组自噬因子 Beclin-1, LC3 mRNA 表达均有不同程度升高($P < 0.05$);与模型组比较,QJHTT 处理后气道上皮 Beclin-1, LC3 mRNA 表达水平均有所下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);QJHTT 低剂量组明显高于罗红霉素组($P < 0.05$);高剂量组与罗红霉素组比较差异不显著。见表 2。

表 2 QJHTT 对 COPD 大鼠气道自噬因子 Beclin-1, LC3 mRNA 表达水平影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of QJHTT on Beclin-1 and LC3 mRNA expression levels of airway autophagy factors in COPD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Beclin-1	LC3
正常	-	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
模型	-	0.45 ± 0.11 ¹⁾	0.68 ± 0.13 ¹⁾
QJHTT	10	0.38 ± 0.18 ²⁾	0.60 ± 0.27 ²⁾
	30	0.26 ± 0.08 ²⁾	0.27 ± 0.10 ²⁾
罗红霉素	0.017 5	0.22 ± 0.07 ²⁾	0.17 ± 0.07 ²⁾

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

3.3 对 COPD 大鼠气道自噬相关 Beclin-1, LC3 II / LC3 I 蛋白表达的影响 与正常组比较,COPD 大鼠自噬相关因子 Beclin1, LC3II/LC3I 的蛋白表达水平升高;与模型组比较,QJHTT 及罗红霉素处理后,均能够

明显降低 COPD 大鼠气道上皮细胞内 Beclin1, LC3II / LC3I 的蛋白表达水平($P < 0.05$);QJHTT 低剂量组略高于罗红霉素组;QJHTT 高剂量组与罗红霉素处理组比较,差异无统计学意义。见表 3。

表 3 QJHTT 对 COPD 大鼠气道自噬相关蛋白 Beclin-1, LC3 II / LC3 I 表达影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of QJHTT on Beclin-1 and LC3 II/LC3 I expression of autophagy related proteins in airway of COPD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Beclin-1/GAPDH	LC3 II / LC3 I
正常	-	0.64 ± 0.13	0.71 ± 0.11
模型	-	1.11 ± 0.13 ¹⁾	0.99 ± 0.13 ¹⁾
QJHTT	10	1.03 ± 0.13 ²⁾	0.92 ± 0.08 ²⁾
	30	0.90 ± 0.14 ²⁾	0.82 ± 0.12 ²⁾
罗红霉素	0.017 5	0.87 ± 0.12 ²⁾	0.81 ± 0.14 ²⁾

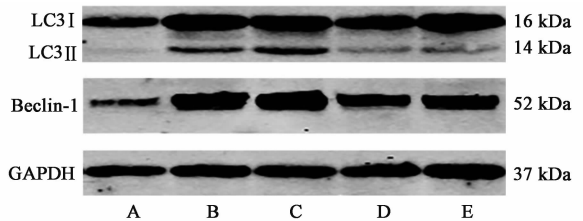


图 2 大鼠气道自噬相关 LC3, Beclin-1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of airway autophagy related LC3 and Beclin-1 proteins in rats

3.4 对 COPD 大鼠气道炎症因子的影响 与正常组比较,模型组大鼠气道炎症因子 IL-6, IL-8 含量均有升高($P < 0.05$)。与模型组比较,QJHTT 处理后,COPD 大鼠气道上皮细胞内 IL-6, IL-8 的表达明显降低($P < 0.05$);QJHTT 高剂量组与罗红霉素处理组比 COPD 大鼠气道上皮细胞内 IL-6, IL-8 的表达差异无统计学意义。见表 4。

表 4 QJHTT 对 COPD 大鼠气道炎症因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of QJHTT on airway inflammatory factors in COPD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-8	IL-6
正常	-	100.39 ± 9.06	53.56 ± 5.07
模型	-	213.01 ± 9.54 ¹⁾	102.25 ± 7.80 ¹⁾
QJHTT	10	157.80 ± 7.40 ²⁾	77.35 ± 5.44 ²⁾
	30	113.56 ± 9.02 ²⁾	61.44 ± 4.80 ²⁾
罗红霉素	0.017 5	116.37 ± 9.27 ²⁾	58.05 ± 5.12 ²⁾

4 讨论

中医药是我国特色及传统医学的一部分,具有多效、多因、多靶点的优势,能改善慢性病变的临床

症状和防治靶器官受损的作用,对 COPD 的预防与治疗领域具有较大的优势^[9]。罗红霉素是治疗 COPD 疾病常用药,多与中药方剂在 COPD 疾病治疗中作用作比较^[10-11],本实验清金化痰汤方中橘红理气化痰,故气顺则痰降;茯苓可健脾利湿,湿去则痰消;再以瓜蒌仁、桔梗、贝母宽胸开结、清热涤痰;麦门冬、知母润肺止咳,养阴清热;黄芩、桑白皮、栀子可清泻肺热,炙甘草补土而和中。故全方有化痰止咳,清热润肺之功,气畅则痰化,热清则痰消,痰消则热无,邪祛则正安,适用于痰浊不化,蕴而化热之证^[6]。有药理研究发现清热化痰类中药可杀菌抑菌、抵抗内毒素并缓解气管、支气管痉挛,从而治疗炎症性呼吸系统疾病。同时有研究表明自噬作用的过程与中医的阴阳自和平衡理论相通,细胞自噬为维持细胞的代谢和能量平衡,需要降解细胞内的长寿蛋白质和受损的细胞器,一旦自噬太过或者不及就会造成细胞自身发生病理性改变,细胞瓦解死亡,这个过程与中医的阴阳自和平衡理论相通^[12]。且诸多研究表明,中药通过激活自噬途径,调节自噬活性^[13]从而影响疾病发展。

COPD 的主要发病引起气道炎症和肺实质损伤,其病理基础是慢性气道炎症。COPD 气道慢性炎症表现为多种炎症细胞,如中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等的聚集和多种生物活性物质,如 IL-1, IL-6, IL-8, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等过度释放^[14]。当受外界刺激吸烟或感染等首先激活气道上皮细胞释放大量炎性介质如 IL-1 β , 白三烯 B₄ (LTB₄), TNF- α , IL-6, IL-8 等,导致炎症细胞在气道内募集、活化,刺激炎症介质再释放趋化募集更多的炎症细胞,并以此为恶性循环导致 COPD 加重^[15]。自噬作为一种新的细胞程序化死亡方式,在调节细胞环境稳态中作用巨大,自噬与 COPD 的研究屡见不鲜^[16-17],特别是针对自噬与 COPD 气道慢性炎症反应两者间关系的研究越来越被重视。自噬是经过溶酶体依赖的降解途径,对细胞生长、变异和体内平衡都具有很重要的意义^[18]。Beclin-1 和 LC3 是自噬的标志因子^[19-20],一旦激活 Beclin-1,就会发生从 I 型 LC3 向 II 型 LC3 转变的过程,标志着自噬的发生。本研究中,清金化痰汤处理后,COPD 大鼠气道上皮细胞 Beclin-1 和 II 型 LC3 的表达减少,说明清金化痰汤能抑制 COPD 大鼠气道上皮细胞的自噬反应。

对于自噬与炎症因子的研究发现二者存在双向关系^[21]。一方面,自噬可通过清除炎性蛋白聚集体

和下调组织损伤的促炎性细胞因子来对抗炎症反应;另一方面,自噬可通过激活炎性体产生大量炎症因子而加快炎症进程。即是某些急性或慢性的刺激可以导致自噬途径的紊乱,最终导致某些疾病的发生^[22]。Deretic 等^[23]研究表明炎症反应与细胞自噬之间存在密切的联系,机体产生炎症时,可诱导细胞发生自噬,同时细胞的自噬还参与炎症反应的精细调节,从而避免过度的炎症反应损伤和刺激机体,故推测 COPD 疾病前期炎症诱导发生自噬。但 Nakahira 等^[24]也发现异常自噬可以促进微生物生长繁殖,从而增加炎症反应。在 ATG16L1 基因敲除大鼠, β 干扰素 TIR 结构域衔接蛋白 (TRIF) 依赖的半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) -1 途径被激活,IL-6 和 IL-8 等炎性因子的含量迅速增加^[25],表明当细胞自噬作用异常时,会加速炎性因子的生成,从而引发炎症,加快炎症进程,包括炎性体激活产生大量炎症因子。吸烟是引发 COPD 疾病的重要因素,Jae 等^[26]发现,长期吸烟者的肺泡巨噬细胞中自噬和吞噬过程存在缺陷^[27],阻碍细菌转移到溶酶体,所以吸烟者常反复发生感染。推测 COPD 疾病过程中发生自噬异常,并且异常自噬是加重气道慢性炎症的原因之一。

本次实验中,给予吸烟刺激后,模型组自噬水平与炎症因子含量明显高于正常组;而清金化痰汤干预后气道上皮细胞的自噬程度能明显降低,并且药物干预后其炎症因子 IL-6, IL-8 的含量也随之降低,提示清金化痰汤能调节自噬,并有效降低 COPD 气道上皮细胞的炎症反应。而本研究清金化痰汤干预 COPD 大鼠后自噬程度与炎性因子的含量呈正相关,结合本实验前期研究结果,推测清金化痰汤治疗 COPD 可能通过调节自噬水平及自噬活性降低炎症因子水平,以达到减轻 COPD 炎症反应等症状的目的。而目前诸多研究表明 COPD 气道上皮细胞自噬水平在疾病不同时期,有相应改变,所以本实验还应深入研究自噬对于 COPD 在不同时期的作用方向,以及其对疾病愈后的影响等重要意义,为 COPD 疾病的治疗提供新的实验基础。

[参考文献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2014,6(2),68-79.
- [2] Russell K E, Chung K F, Clarke C J, et al. The MIF antagonist ISO-1 attenuates corticosteroid-insensitive

- inflammation and airways hyperresponsiveness in an ozone-induced model of COPD [J]. *PLoS One*, 2016, 11:e0146102.
- [3] Husebo G R, Bakke P S, Gronseth R, et al. Macrophage migration inhibitory factor, a role in COPD [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311: L1-L7.
- [4] Saitoh T, Fujita N, Jang M H, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production [J]. *Nature*, 2008, 456 (7219): 264-268.
- [5] 许光兰,赵媚,钟长青,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.
- [6] 许光兰,李国生.清热化痰法在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的应用研究[J]. *时珍国医国药*, 2018, 29 (4): 950-952.
- [7] 王骏,李春盈,刘治坤,等.慢性阻塞性肺疾病气道粘液高分泌大鼠模型的建立[J]. *心脑血管病杂志*, 2014, 33 (4): 592-595.
- [8] 尚立芝,谢文英,张良芝,等.爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠白三烯 B4、白细胞介素-6 及肺组织病理形态的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 (12): 170-173.
- [9] 鹿振辉.中医药对 COPD 多靶点作用的研究进展[J]. *江苏中医*, 2006, 27 (7): 61-63.
- [10] 邹琴,王博龙.长期小剂量罗红霉素对稳定期慢性阻塞性肺疾病疗效作用的 Meta 分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2018, 43 (10): 1312-1320.
- [11] 卫娜,王晓晓,王映棋,等.玉屏风散加味方对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症微环境的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27 (5): 457-461.
- [12] 朱静,尚广彬,张洁,等.自噬在中医药治疗肿瘤中的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191321.
- [13] 李欢,苗明三.自噬及中医药调控自噬在治疗和防治疾病中的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (20): 200-207.
- [14] YAO H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254 (2): 72-85.
- [15] Vogelmeier F C, Criner J G, Martinez J F, et al. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report [J]. *Respirology*, 2017, 22 (3): 575-601.
- [16] Bodas M, Patel N, Silverberg D, et al. Master autophagy regulator Transcription factor-EB (TFEB) regulates cigarette smoke induced autophagy-impairment and COPD-emphysema pathogenesis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, doi:10.1089/ars.2016.6842.
- [17] Roscioli E, Hamon R, Lester S E, et al. Airway epithelial cells exposed to wildfire smoke extract exhibit dysregulated autophagy and barrier dysfunction consistent with COPD [J]. *Respir Res*, 2018, 19 (1): 234.
- [18] Jeffrey A H, Augustine M K. Autophagy A core cellular process with emerging links to pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184, 1066: 259-271.
- [19] 陈丹丹,彭成,李梦婷,等.自噬参与氢溴酸樟柳碱对缺氧状态下 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (20): 144-149.
- [20] 刘晨阳,白宽,于顾然.梓醇对纤维状 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的 bEnd.3 细胞凋亡及过度自噬的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (20): 108-113.
- [21] Beth L, Noboru M, Herbert W V. Autophagy in immunity and inflammation [J]. *Nature*, 2011, 469 (7330): 323-335.
- [22] Hwang J W, Sangwoon C, Isaac K, et al. Cigarette smoke-induced autophagy is regulated by SIRT1-PARP-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 500: 203-209.
- [23] Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptor [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24 (1): 21-31.
- [24] Nakahira K. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20 (3): 474-494.
- [25] Hammada D R, Elgazzara A G, Essawya T S, et al. Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients [J]. *Egyptian J Chest Dis Tuberc*, 2015, 64: 347-352.
- [26] Jae W H, Sangwoon C, Isaac K S, et al. Cigarette smoke induced autophagy is regulated by SIRT1-PAPR-1-dependent mechanism: implication in pathogenesis of COPD [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, 500 (2): 203-209.
- [27] 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.

[责任编辑 周冰冰]