

二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型 肺组织 PPAR γ 信号通路的影响

谢文英, 包永生*, 王俊月, 尚立芝*, 吴珂, 张良芝, 李亮, 王肖艳, 宋倩红
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:** 探索二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型肺组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)蛋白和 mRNA 表达的影响,以及血清、肺组织匀浆液和支气管肺泡灌洗液中白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-10(IL-10),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。**方法:** 将 70 只 SD 大鼠随机分为 7 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、二陈汤加味高、中、低剂量(40,20,10 g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)组,消咳喘组(5 g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$),二陈汤组(5 g \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)。以烟熏与脂多糖(LPS)气管滴注并用的方法来制备大鼠 COPD 模型。成功后,治疗组灌胃给药,正常及模型组则灌等量的生理盐水。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清、肺组织匀浆液和支气管肺泡灌洗液(BALF)中 IL-6,IL-10 和 TNF- α 的含量。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 PPAR γ mRNA 表达,免疫组化(IHC),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织 PPAR γ 的蛋白表达。**结果:** 与正常组比较,模型组大鼠血清、肺组织匀浆液和 BALF 中 IL-6,TNF- α 水平显著升高($P < 0.01$),IL-10 水平显著降低($P < 0.01$)。模型组大鼠肺组织 PPAR γ mRNA 水平显著降低($P < 0.01$),蛋白表达也明显受抑制($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组血清、肺组织匀浆液及 BALF 中 IL-6,TNF- α 水平均不同程度的降低($P < 0.01$),IL-10 则不同程度升高,其中二陈汤加味中剂量组 IL-10 的兴奋和 IL-6,TNF- α 的抑制尤为显著。各治疗组大鼠肺组织 PPAR γ mRNA 和蛋白水平均有不同程度的升高($P < 0.01$)。**结论:** 二陈汤加味可能通过升高 PPAR γ 的表达,并以此降低 IL-6,TNF- α 的含量,提升 IL-10 的含量,来对抗 COPD 大鼠的炎症反应,改善肺功能。

[关键词] 二陈汤加味;慢性阻塞性肺疾病;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ);白细胞介素-6(IL-6);白细胞介素-10(IL-10);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0026-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191501

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190417.1344.011.html>

[网络出版时间] 2019-04-18 17:29

Effect of Modified Erchentang on PPAR γ Expression in Lung Tissue of Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease

XIE Wen-ying, BAO Yong-sheng*, WANG Jun-yue, SHANG Li-zhi*, WU Ke, ZHANG Liang-zhi,
LI Liang, WANG Xiao-yan, SONG Qian-hong
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of modified Erchentang on peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) protein and gene expressions in lung tissue of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rat model, and the expressions of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in serum, lung homogenate and bronchoalveolar lavage fluid. **Method:** Seventy SD rats were randomly divided into seven groups: normal group, model group, high, medium and low-dose modified Erchentang

[收稿日期] 20181230(001)

[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)

[第一作者] 谢文英,教授,从事中医药治疗肺系疾病的临床研究,E-mail: xiewenying1963@163.com

[通信作者] *包永生,从事中医药治疗肺系疾病的临床研究,E-mail: 85651402@qq.com;

*尚立芝,教授,从事中医药作用机制研究,Tel:0371-86253082,E-mail: lzshang2014@163.com

groups ($40, 20, 10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), Xiaokechuan group ($5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and Erchentang group ($5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The rat COPD model was established through smoking and intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). After successful modeling, the treatment group was given drug by gavage, while the normal group and the model group were given the same amount of saline. The concentrations of IL-6, IL-10 and TNF- α in serum, lung homogenate and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) was used to detect the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), and immunohistochemistry (IHC) and Western blot were used to detect the expression of PPAR γ in lung tissue. **Result:** Compared with the normal group, the levels of IL-6 and TNF- α in serum, lung homogenate and BALF of the model group rats increased significantly ($P < 0.01$), while IL-10 decreased significantly ($P < 0.01$). The expressions of PPAR γ mRNA in lung tissue of rats in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression of PPAR γ protein was significantly inhibited ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of IL-6 and TNF- α in serum, lung homogenate and BALF of each treatment group decreased to varying degrees ($P < 0.01$), while IL-10 increased to varying degrees. The excitation of IL-10 and the inhibition of IL-6 and TNF- α in the middle-dose Erchentang group were particularly significant. The PPAR γ mRNA and protein expressions in lung tissue of rats in each treatment group were increased to varying degrees ($P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Erchentang may improve pulmonary inflammation and pulmonary function in COPD rats by increasing the expression of PPAR γ and the content of IL-10 and decreasing the contents of IL-6 and TNF- α .

[**Key words**] modified Erchentang; chronic obstructive pulmonary disease; peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ); interleukin-6 (IL-6); IL-10; tumor necrosis factor- α (TNF- α)

慢性阻塞性肺病(COPD)是以不完全可逆气流受限为特征的慢性呼吸系统常见病^[1]。最新研究发现,我国未来将面临极高的 COPD 发病率,无症状以及早期的 COPD 患者也逐年增高,因此目前几乎没有人再质疑 COPD 的全球负担性,因其已经成为伤残率和死亡率最高的疾病之一^[2]。COPD 的研究进展缓慢,这不仅困扰我国患者的身心健康,即便是在全球范围内,COPD 都未见突破性的成果^[3]。据本课题组前期研究发现,肺实质的慢性炎症以及气道结构的破坏会导致肺气肿的形成和气流阻力的增加,这是 COPD 的病理基础^[4-10]。众所周知,中医和中药不能步入国际大舞台的关键原因就在于目标靶点的模糊,因而有效、多角度靶点的发现和确立自始至终都是中医药走向现代化的瓶颈,也正因为多靶点研究的持续发现,才使得临床功效和方药机制逐渐的透明化和科学化^[11]。有鉴于此,本课题组再次选择了二陈汤加味对 COPD 的干预研究,二陈汤出自成书于北宋的《太平惠民和剂局方》,通过前期的文献研究发现,历代医家无论是在医论医话中的阐述,还是名医医案中的实际运用都是以二陈汤的加减为主,以达成多角度治疗疾病的目的^[12-13]。本次实验与以往不同的是,此次的研究内容为此前尚未涉及的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 及

其相关细胞因子,以使研究内容和成果更加丰满,并多方位体现二陈汤加味的实际价值。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 70 只,7~8 周龄,SPF 级,提供方为济南的朋悦实验动物公司,体质量(200 ± 20) g;动物实验中心为河南省中医药研究院,许可证号 SYXK(豫)2012-0009;生长饲料是由江苏协同生物工程有限公司提供,许可证号为苏饲证(2014)01008。本次实验伦理审查批准编号 DWLL20130018。

1.2 药物与试剂 二陈汤加味的药物构成:陈皮 10 g(批号 1509002S),姜半夏 10 g(批号 1501001S),茯苓 20 g(批号 1509006W),炙麻黄 6 g(批号 1509001S),苦杏仁 10 g(批号 1512002S),桂枝 3 g(批号 1510002S),葶苈子 15 g(批号 1510001S),炒苏子 20 g(批号 1512001S),地龙 10 g(批号 1511002S),枳壳 10 g(批号 1510002W),山药 20 g(批号 1509003S),白术 15 g(批号 1510004S),党参 25 g(批号 1511003W),以上药物为颗粒剂,皆由华润三九提供;脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司,批号 025M40400V);trizol(美国 Ambion 公司,批号 15596-026);兔 PPAR γ 多克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号 16643-1-AP);大鼠白细胞介素-

6(IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒, DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 EK0412, EK0526, 11H18B22); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所, 批号 P0010); 逆转录试剂盒, 总 RNA 提取试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号分别为 119041, 086001)。

1.3 仪器 HI650 型高速离心机 (湖南湘仪公司); Multiskan MK3 型全自动酶标仪 (美国 Thermo 公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳槽及转膜仪 (北京六一仪器厂); T8-1 型磁力搅拌器 (江苏中大仪器厂); TS-1 型水平摇床 (江苏其林贝尔公司); Nano-100 型微量分光光度计 (杭州奥盛公司); JY300 型水平电泳仪, JY02S 型紫外分析仪 (北京君意东方公司); TopScan 型小动物肺功能测量系统 (吉安德尔公司); inspira 型小动物用呼吸机 (日本光电公司); QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 ABI 公司); LP115 型 pH 计 (德国 Metter-Toledo GmbH 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药 随机挑选 70 只 SD 大鼠分为 2 组, 分别为模型组 (10 只) 和造模组 (60 只)。按参考文献 [14-16] 的造模方法, 制备 COPD 肺气虚大鼠模型, 自制亚克力材质透明烟熏箱, 并以此为器材, 在 0.5 h 内一同点燃 10 支实验香烟, 烟熏 60 只造模组大鼠, 每日 2 次。并于实验的第 1 天和第 13 天对造模组麻醉, 并于气管内滴注 LPS ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 正常组大鼠在气管内滴注和造模组等量的生理盐水。造模成功标准参照文献 [17], 模型制造成功后, 将造模组随机分为 4 组, 分别为模型组, 二陈汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。然后分别灌胃治疗 4 组治疗组大鼠, 其中二陈汤加味高、中、低剂量组分别按照 $40, 20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 消咳喘组和二陈汤组按照 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药, 每日的 10 点和 16 点分别灌胃, 每次 3 mL。模型组与正常组则灌同体积生理盐水, 以上的用量皆稀释为 $6 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$, 给药过程持续进行 14 d。(动物体质量/人的体质量) \times 人用药量 $\times 6.3$ 计算, 确定中剂量后, 低、高剂量再依等比数列进行设置 [18]。

2.2 指标检测

2.2.1 一般状况观察 分别观察五组大鼠的食量和色泽以及体质量、咳喘情况、鼻腔分泌物, 如果大鼠出现死亡, 及时研究死因, 并详实的跟踪记录每 1 只大鼠的情况。

2.2.2 肺功能检测 大鼠在 COPD 的发病过程中, 肺功能会随着气流的逐渐阻塞而降低, 因此肺气虚证的诊断标准以肺功能检测为主。具体检测的方法为每只大鼠都分别放置与连接有感应器的体积描记箱里, 并计算出潮气量和呼气峰流速。

2.2.3 Real-time PCR 检测 PPAR γ mRNA 表达 取保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中的新鲜冰冻组织, 约 100 mg, 并加入 trizol 试剂 1 mL, 匀浆器将其研磨成浆, 移动至无核酸酶 1.5 mL 离心管中, 并进行 10 min 的裂解。将研碎肺组织放入到离心管内, 并加入组织裂解液、三氯甲烷萃取剂, 待其充分混匀及多次离心并提取洗脱后, 以总 RNA 提取试剂盒来提取肺组织中的总 RNA。用逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA, 逆转录反应条件为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min, $85 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。并用 Real-time PCR 仪运行 PCR 扩增, 扩增条件为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环。PPAR γ 引物为上游 5'-AGGGCGATCTTGACAGGAAA-3', 下游 5'-CGAAACTGGCACCCTTGAAA-3', 长度 164 bp; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 引物为上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3', 长度 253 bp。然后计算各组 PPAR γ mRNA 相对表达量。绘制熔解曲线, 最终数据以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行分析。

2.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 PPAR γ 蛋白的表达 取冰冻新鲜组织 100 mg 置于 2 mL 匀浆器中, 并剪碎肺组织, 加入裂解液并裂解 30 min 后移入离心管中, 离心后取上清液分装并稀释。将稀释后的样品分别放置于 96 孔板内, 按 50:1 的比例将 BCA 试剂盒中 A 液与 B 液混合, 加入至 96 孔板内, 并避光孕育 30 min, 根据标准蛋白浓度与相应的吸光度 A 计算直线回归方程。取蛋白样品, 凝胶电泳, 转膜 GAPDH (200 mA 90 min), PPAR γ (200 mA 120 min)。5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 PPAR γ , GAPDH (1:1 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 静置过夜。洗涤 3 次, 加入二抗 (1:5 万), $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗涤 5 次; ECL 显色曝光。晾干胶片并扫描, 用 BandScan 分析胶片灰度值。

2.2.5 免疫组化法检测 PPAR γ 蛋白的表达 将切片脱蜡水化, 以双氧水封闭, 抗原修复后, 滴入一抗 PPAR γ 工作液, DAB 显色, 并苏木素复染, 阳性对照用已知阳性片, 阴性对照用 PBS 代替一抗, 均 1:100 稀释。磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 吸水纸擦干后, 滴加二抗, 室温孵育 20 min。加显色剂并复染

1 min,水洗后分化,再用 PBS 水洗返蓝。脱水后封片,进行镜检并拍照。免疫组化呈现棕黄色为阳性判定依据。每组切片均随机选取 6 个高倍镜下的视野,使用图像分析软件 Image-Pro Plus(IPP),计算阳性显色的平均积分吸光度 IA,整理数据并进行分析。

2.2.6 ELISA 测定 IL-6,IL-10,TNF- α 的含量 于空白孔、标准孔、待测样品孔中加样并 37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min,弃孔内液体并甩干并加入抗体工作液并孵育 60 min。弃液并洗板 3 次,每孔加酶结合物工作液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 30 min,弃液甩干并洗板 5 次。每孔加显色剂 90 μ L,酶标板上加覆膜,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。加终止液 50 μ L,终止反应,此时蓝色立即转为黄色。立刻以酶标仪在 450 nm 波长,测量各孔吸光度 A,经转化,计算 IL-6,IL-10,TNF- α 含量。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 21.0 进行数据处理,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,据原始数据是否满足正态分布而分别采用方差分析或非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状况观察 实验结束时,正常组大鼠一般状况好,动作敏捷,未发现异常情况,无死亡。模型组体质量较造模前下降,精神略差,呼吸频率加快,鼻腔可见分泌物,死亡 2 只。各治疗组上述症状有不同程度的改善。二陈汤加味低剂量组、消咳喘组、二陈汤组体质量较造模前下降或略有增加,各死亡 1 只。二陈汤加味高、中剂量组体质量较前增加,无死亡。

3.2 对 COPD 大鼠的肺组织中 PPAR γ 表达的影响 PPAR γ 的阳性表达可在镜下于肺组织周围

见棕黄色颗粒,正常组 PPAR γ 呈阳性表达,血管内皮细胞、细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和平滑肌细胞可见较深色棕黄色颗粒,与正常组比较,模型组中 PPAR γ 蛋白的表达明显呈现出弱阳性特征。随着各种治疗方法的使用,治疗组的蛋白表达均有所上升,尤以二陈汤加味中剂量组最明显。见图 1。

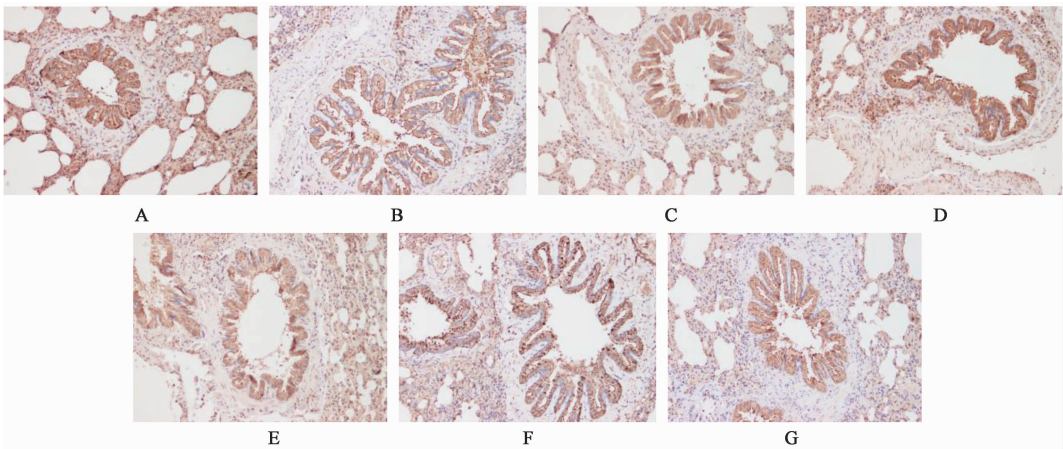
3.3 对 COPD 大鼠肺组织蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠的肺组织中 PPAR γ 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$);而与模型组比较,二陈汤加味高、中、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组中的 PPAR γ 蛋白的表达提升 ($P < 0.01$)。其中二陈汤加味中剂量组中 PPAR γ 的蛋白表达提升最为显著,与消咳喘组、二陈汤组比较提升明显 ($P < 0.05$)。见表 1,图 2。

表 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 PPAR γ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of modified Erchentang on PPAR γ protein expression in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PPAR γ
正常	-	0.59 \pm 0.03
模型	-	0.15 \pm 0.01 ¹
二陈汤加味	40	0.32 \pm 0.02 ²⁾
	20	0.47 \pm 0.03 ^{2,3,4)}
	10	0.28 \pm 0.02 ²⁾
消咳喘	5	0.38 \pm 0.01 ^{2,3)}
二陈汤	5	0.21 \pm 0.01 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与二陈汤组比较³⁾ $P < 0.05$;与消咳喘组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。



A. 正常组;B. 模型组;C. 二陈汤加味高剂量组;D. 二陈汤加味中剂量组;E. 二陈汤加味低剂量组;F. 消咳喘组;G. 二陈汤组(图 2 同)

图 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 PPAR γ 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig.1 Effect of modified Erchentang on PPAR γ protein expression in lung tissue of COPD rats(IHC, $\times 200$)

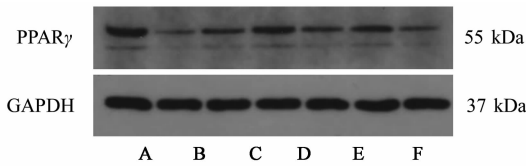


图 2 大鼠肺组织中 PPAR γ 蛋白表达电泳

Fig.2 Electrophoresis of PPAR γ protein expression in lung tissue of rats

3.4 对 COPD 大鼠的肺组织中 PPAR γ mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组 PPAR γ mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,二陈汤加味高、中、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组中 PPAR γ 的基因表达均程度不等地升高 ($P < 0.01$)。其中二陈汤加味中剂量组与消咳喘组、二陈汤组比较提升显著 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 PPAR γ mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of modified Erchentang on PPAR γ mRNA expression in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PPAR γ
正常	-	1.07 ± 0.05
模型	-	0.34 ± 0.02 ¹⁾
二陈汤加味	40	0.58 ± 0.02 ²⁾
	20	0.80 ± 0.04 ^{2,3,4)}
	10	0.53 ± 0.03 ²⁾
消咳喘	5	0.66 ± 0.03 ^{2,3)}
二陈汤	5	0.42 ± 0.04 ⁴⁾

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠血清中 IL-6,IL-10,TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of modified Erchentang on IL-6,IL-10 and TNF- α expression in serum of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	TNF- α	IL-10
正常	10	-	16.09 ± 1.13	3.90 ± 0.19	17.52 ± 1.23
模型	8	-	80.39 ± 0.88 ¹⁾	7.25 ± 0.37 ¹⁾	3.12 ± 0.72 ¹⁾
二陈汤加味	10	40	32.18 ± 2.23 ^{2,3,4)}	5.21 ± 0.25 ^{2,3,4)}	10.60 ± 0.89 ^{2,3)}
	10	20	24.26 ± 0.55 ^{2,3,4)}	4.66 ± 0.13 ^{2,3,4)}	11.94 ± 0.73 ^{2,3,4)}
	9	10	39.96 ± 2.61 ^{2,3,4)}	5.68 ± 0.10 ²⁾	8.59 ± 0.44 ²⁾
消咳喘	9	5	52.76 ± 3.95 ^{2,3)}	5.98 ± 0.13 ²⁾	8.43 ± 1.01 ²⁾
二陈汤	9	5	64.50 ± 0.87 ^{2,4)}	6.05 ± 0.10 ²⁾	6.43 ± 1.01 ²⁾

炎症反应和免疫应答,有效的缓解疾病的进行性发展,减少药物的依赖性,提高患者的生活质量,并减轻疾病恶化的风险^[24-26]。

COPD 因其症状为咳嗽、痰饮以及喘息等,常被

3.5 对 COPD 大鼠的血清中 IL-6,IL-10,TNF- α 表达的影响 与正常组比较,模型组 IL-6,TNF- α 的表达升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,二陈汤加味高、中、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组中 IL-6,TNF- α 的表达均显著降低 ($P < 0.01$)。其中二陈汤加味中剂量组与二陈汤加味高、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组比较降低显著 ($P < 0.01$)。见表 3。与正常组比较,模型组 IL-10 的表达降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,二陈汤加味高、中、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组中 IL-10 的表达均显著的提升 ($P < 0.01$)。其中二陈汤加味中剂量组与二陈汤加味高、低剂量组、消咳喘组、二陈汤组比较提升显著 ($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

诸如 COPD 般的进行性疾病给患者带来的痛苦显而易见,研究显示 COPD 患者常伴有高度的焦虑症和抑郁症^[19]。不仅如此,肺功能的持续下降、疾病的恶化风险,以及生活质量的降低和西医治疗产生的依赖性都是患者个人和家庭痛苦的根源^[20-21],因此 COPD 的研究尤显紧迫。COPD 持续发展的关键与气道重塑密不可分,其病理基础亦为不可逆的气流受限^[22-23],西医常规治疗虽然可以一定程度缓解症状,但因为 COPD 发病机制的复杂性,种种常规治疗措施常不能阻止患者诸种症状的持续恶化。而且较强的药物依赖性和毒副作用也使得患者在接受治疗前就畏之如虎,对患者的情绪造成较强的干预。西医学的不足恰可以用中医学弥补,前期实验已经证实二陈汤加味能够通过多种信号通路干预机体的

归于中医的“肺胀”范畴,肺主一身之气,主司呼吸,又主皮毛而有卫外之能^[27]。每当外邪侵袭皮毛,肺都会因之而宣降失常,喘咳也由此而生,随后子盗母气,脾胃也会因为肺气的不足而逐渐虚损,以至肺脾

两虚,脾的运化失常就会使水液不化津而化痰,肺又是众所周知的贮痰之器,长期的气虚痰阻就会导致痰瘀互结,并深伏脉络之下,最终阻塞气道的正常运行^[28]。有鉴于此,COPD 的治疗大法就不外乎化痰和理气,而兼有两种功效,且受到历代医家公认的祛痰之准绳,就是首载于宋代《太平惠民和剂局方》的二陈汤,自二陈汤问世以来,历代医家都对之赞不绝口,如汪昂《本草备要》谈及二陈汤时讲道“治痰通用二陈”,陈念祖盛赞二陈汤“为痰饮之通剂也”。二陈汤也因此被运用于多种临床疾病,值得注意的是,临床疾病病机复杂,因此二陈汤的临床应用以及药理学研究都是以二陈汤的加味和合方为主^[29]。如陈丽平等^[30]分析综合了历代医案,包含古代的名家、以及当代国医大师、名老中医等,由此筛选了主方为二陈汤的医案 341 例,发现二陈汤多用于咯痰、咳嗽、气喘为主要症状的疾病当中,也同时发现二陈汤的运用几乎都是以加减和合方为主。正因如此,为了能够紧密的切合临床,能够针对 COPD 的种种复杂病机,于是选择了二陈汤加味方为研究方向。疾病的病机复杂,单方向的用药往往难建尺寸之功,更不能体现中医药的优越性,因此在半夏、陈皮、茯苓的基础上,稍佐药对麻黄、苦杏仁,赖之一宣一降,直达气机滞涩之窠臼,痰浊胶固之巢穴。又因为 COPD 以气机上逆为主,因此选药时务使宣降有度,并以降为先。除此之外,又少加健脾补气药,以期恢复久耗之正气。全方扶正与祛邪兼顾,因此临床疗效显著,故本实验研究就是以前期药理学及临床研究为基础,来探讨二陈汤加味方的多靶点治疗作用。

PPARs 作为一种细胞核内的受体,共有 α 、 β 、 γ 3 种家族成员,其中 PPAR γ 的研究尤为深入。PPAR γ 可表达在血管平滑肌、内皮细胞以及肾脏的系膜细胞等,可在炎症反应、免疫调节、纤维化、糖代谢、肿瘤中扮演举足轻重的角色,而在肺组织中可表达在血管内皮细胞、细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和平滑肌细胞之中,可通过其对多种细胞因子的兴奋或抑制作用参与炎症反应、免疫调节和气道重塑^[31]。如 PPAR γ 可通过调节 IL-6, TNF- α 等来参与炎症反应^[32],通过调节 IL-4 来介导免疫调节^[33],通过对 MMPs/TIMP-1 的调节作用来干预气道重塑^[34]。PPAR γ 常活跃于多条信号通路,并对多种转录因子的表达和活化产生影响^[35],来达成降低炎症反应和防止气道重塑的目的^[36]。如活化的 PPAR γ 对 TNF- α 有极强的抑制性,作为来源于单核吞噬细胞的 TNF- α ,能够介导多种免疫反应和炎症

反应。因此高表达的 PPAR γ 对 TNF- α 产生抑制作用,就能达到减轻肺损伤的目的^[37],同时也能抑制纤维化的形成^[38]。此外,PPAR γ 能够通过抑制 NF- κ B 的活性来抑制 IL-6 的形成,达成抗炎和减缓气道重塑的目的^[39-41]。中性粒细胞的凋亡也会因 IL-6 的过表达而使炎症反应持续进行。在 IL-6 和 TNF- α 的反复刺激下,炎症反应加深加剧,对肺组织造成损伤,引起气流受限和气道高反应。IL-10 是一种由 Th2 细胞分泌的抗炎性淋巴因子,在 Th1/Th2 的拮抗中发挥着重要的作用^[42-43],正因其对 Th0 细胞向 Th1 细胞分化的过程有抑制作用,才能够减少 Th1 细胞所分泌的细胞因子 TNF- α 达到对 COPD 的治疗目的。因而,PPAR γ , TNF- α , IL-6, IL-10 在 COPD 的发生发展中起到重要的作用,尤其是对炎症反应和气道重塑的影响,对二陈汤加味的治疗效果有重要意义。

实验研究结果显示,模型组大鼠的 IL-10 明显降低,IL-6, TNF- α 显著升高,提示模型组肺功能损伤,也表明 COPD 模型复制成功。经药物治疗后,各组大鼠的 IL-10 均有不同程度的升高,IL-6, TNF- α 则均有下降,其中以二陈汤加味中剂量组 IL-10 的兴奋和 IL-6, TNF- α 的抑制最为显著,说明二陈汤加味中剂量组能够明显改善肺功能,达成治疗 COPD 的目的。模型组 PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达显著低于正常组,在经过药物治疗后各组肺组织中 PPAR γ 的蛋白及 mRNA 表达均有程度不等地升高,其中二陈汤加味方中剂量组显著升高了 PPAR γ 在肺组织中的表达,表明二陈汤加味方能够明显增强 COPD 大鼠肺组织中 PPAR γ 的表达,进而发挥其对抗 COPD 炎症反应的作用。

综上所述,二陈汤加味方能有效改善 COPD 大鼠气流受限和肺功能,通过增强肺组织中 PPAR γ 的蛋白及基因表达,并通过其对多通路的干预作用来抑制 IL-6, TNF- α 的表达,促进 IL-10 的表达,达到改善和治疗 COPD 大鼠的肺组织炎症,阻止肺组织气道重塑,减缓 COPD 及其并发症的发病进程。

[参考文献]

- [1] 钟南山. 慢性阻塞性肺疾病在中国[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(5): 321-322.
- [2] Vestbo J, Mathioudakis A G. The emerging Chinese COPD epidemic [J]. Lancet, 2018, 391(10131): 1642-1643.
- [3] Anonymous. UK COPD treatment: failing to progress [J]. Lancet, 2018, 391(10130): 1550.

- [4] 吴珂,尚立芝,谢文英,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病细支气管壁细胞外基质重塑的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):122-127.
- [5] 尚立芝,季书,刘坦,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠信号转导蛋白 Smad3,4,6,7 基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(10):139-146.
- [6] 谢文英,张良芝,常学辉,等.爱罗咳喘宁口服液对慢性阻塞性肺疾病大鼠血清白介素-6 和白细胞介素-8 的影响[J].中国老年学杂志,2016,36(4):786-787.
- [7] 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.
- [8] 谢文英,王俊月,包永生,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠 VEGF, VEGFR2, IL-4, ET-1 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):48-55.
- [9] 谢文英,包永生,王俊月,等.中医药防治慢性阻塞性肺疾病气道重塑相关信号通路的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):1-8.
- [10] 谢文英,王俊月,包永生,等.二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织 GATA3, T-bet mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):19-25.
- [11] 曾克武,屠鹏飞.中药作用靶点方法学研究进展[J/OL].中国科学:化学:1-9[2018-12-12].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5838.06.20180917.1104.009.html>.
- [12] 衣标美,潘桂娟.《明医杂著》治痰浅析[J].中华中医药杂志,2016,31(3):772-775.
- [13] 蔺焕萍,王小平,郝红.《沈芊绿医案》胃脘痛用药分析及规律[J].中国中医基础医学杂志,2016,22(1):117-118.
- [14] 李泽庚,彭波,张杰根,等.肺气虚证模型大鼠的建立[J].北京中医,2005,24(1):53-55.
- [15] 张伟,宫静,张靖轩,等.一种肺脾两虚证 COPD 动物模型的建立[J].辽宁中医杂志,2009,36(1):142-143.
- [16] 尚立芝,张紫娟,谢文英,等.爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- α 、巨噬细胞炎性蛋白-2、髓过氧化物酶及肺组织病理变化的影响[J].中国老年学杂志,2015,35(20):5705-5708.
- [17] 杜全宇,王飞.肺气虚证动物模型造模方法评析[J].山西中医,2015,31(9):56-58.
- [18] 朱艳琴.医学实验基本操作技能[M].北京:人民军医出版社,2007:94-96.
- [19] Johannes A M, Willgoss T G, Baldwin R C, et al. Depression and anxiety in chronic heart failure and chronic obstructive pulmonary disease: prevalence, relevance, clinical implications and management principles[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2010, 25(12): 1209-1221.
- [20] Atlantis E, Fahey P, Cochrane B, et al. Bidirectional associations between clinically relevant depression or anxiety and chronic obstructive pulmonary disease (COPD)[J]. Chest, 2013, 144(3): 766-777.
- [21] Eisner M D, Blanc P D, Yelin E H, et al. Influence of anxiety on health outcomes in COPD[J]. Thorax, 2010, 65(3): 229-234.
- [22] Dominguez-Fandos D, Peinado Victor I, Puig-Pey R, et al. Pulmonary inflammatory reaction and structural changes induced by cigarette smoke exposure in the guinea pig[J]. COPD, 2012, 9(5): 473-484.
- [23] 黄少君,傅汝梅.培土生金方对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者气道重塑机制的观察[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(1):174-179.
- [24] 陈四清,季书,尚立芝,等.二陈汤加味对 COPD 大鼠转化生长因子- β , 组蛋白去乙酰化酶 2 基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(10):147-154.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 孙广仁.中医基础理论[M].北京:中国中医药出版社,2011:108-113.
- [28] 刘嘉琪,阚诗云,朱雪,等.慢性阻塞性肺疾病中医证候演变规律研究概述[J].辽宁中医药大学学报,2019,21(1):1-4.
- [29] 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.
- [30] 陈丽平,李建生,蔡永敏.基于数据挖掘的名老中医应用二陈汤规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):201-207.
- [31] 桂坤,杨俊,龙启忠,等.固肾定喘丸对稳定期肺肾气虚证慢性阻塞性肺疾病患者的康复观察[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(8):89-94.
- [32] GAO D, HAO G, MENG Z, et al. Rosiglitazone suppresses angiotensin II-induced production of KLF5 and cell proliferation in rat vascular smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123724.
- [33] ZHAO Y, HUANG Y, HE J, et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist attenuates airway inflammation by inhibiting the proliferation of effector T cells in a murine model of

- neutrophilic asthma [J]. Immunol Lett, 2014, 157 (1/2):9-15.
- [34] LIU Q, WANG CY, LIU Z, et al. Hydroxysafflor yellow A suppresses liver fibrosis induced by carbon tetrachloride with high-fat diet by regulating PPAR-gamma/p38 MAPK signaling [J]. Pharm Biol, 2014, 52 (9): 1085-1093.
- [35] 马金鹏,熊彬,李赟,等. 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 激动剂与肠纤维化的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(11):2093-2098.
- [36] 李春陵,朱静雯,王里. 丹参酮 II A 磺酸钠对慢性阻塞性肺疾病气道重塑大鼠 PPAR γ 、NF- κ B 的影响研究[J]. 贵州医药, 2016, 40(5):466-468.
- [37] LIU D, GENG Z, ZHU W, et al. 15-deoxy-12, 14-prostaglandin J2 ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127 (5):815-820.
- [38] Pilling D, Vakil V, Cox N, et al. TNF-alpha-stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (38):11929-11934.
- [39] 隋亚那,朱勤伟. 替米沙坦通过激活 PPAR γ 而下调 NF- κ B 通路抑制脂多糖诱导的单核细胞 THP-1 炎症反应 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (12): 1225-1230.
- [40] 韩娟,颜浩,徐淑晖,等. 噻托溴铵联合布地奈德福莫特罗对慢性阻塞性肺疾病的疗效及对 TGF- β , TIMP-1, IL-6 水平的影响[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18 (13):2531-2534,2544.
- [41] 姚孝昆,万玉峰,郑玉龙. 青蒿琥酯抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路和改善大鼠哮喘模型气道炎症及气道重塑关系的研究[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(9): 151-156.
- [42] Cornwell W D, Kim V, Song C, et al. Pathogenesis of inflammation and repair in advanced COPD [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2010, 31(3):257-266.
- [43] 章晓联. Mycobacterial Mannose-capped lipoarabinomannan induces IL-10-producing B cells and promotes CD4⁺ Th2 immunity [C]//第十二届全国免疫学学术大会分会场交流报告集,天津,2017:45.

[责任编辑 周冰冰]