

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

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

[摘要] **目的:** 观察二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺组织锌指蛋白 3(GATA3), T 盒转录因子(T-bet)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, 二陈汤加味低、中、高剂量组(5, 10, 20 g·kg⁻¹), 消咳喘组(5 g·kg⁻¹), 二陈汤组。以烟熏合并脂多糖(LPS)气管滴注的方法制备 COPD 大鼠模型。成功造模后, 治疗组灌胃给药, 正常组及模型组灌胃等体积生理盐水。酶联免疫吸附测定(ELISA)测定大鼠血清中白细胞介素-10(IL-10), 白细胞介素-12(IL-12)的含量。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 GATA3, T-bet mRNA 表达, 免疫组化(IHC)检测其肺组织 GATA3, T-bet 的蛋白表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 IL-10 水平显著降低, IL-12 显著升高($P < 0.01$); 肺组织 GATA3 的蛋白和 mRNA 表达显著降低, T-bet 的表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 各治疗组血清中 IL-10 水平均有不同程度的升高, IL-12 则不同程度的降低($P < 0.05$)。各治疗组大鼠肺组织 GATA3 mRNA 和蛋白表达均明显增多, T-bet 则受到了抑制($P < 0.05$)。**结论:** 二陈汤加味可能是通过降低 IL-12, 增加 IL-10 的含量, 并抑制 T-bet, 兴奋 GATA3 的蛋白和 mRNA 表达, 来减轻 COPD 大鼠肺组织炎症, 改善肺功能的, 并阻止 COPD 的免疫紊乱。

[关键词] 二陈汤; 慢性阻塞性肺疾病; 锌指蛋白 3(GATA3); T 盒转录因子(T-bet); 白细胞介素-10; 白细胞介素-12

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0019-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191701

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190515.1649.005.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 9:09

Effect of Modified Erchentang on GATA3 and T-bet mRNA Expressions in Lung Tissue of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats

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

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of modified Erchentang on GATA-binding protein-3 (GATA3) and T-box expressed in T cells (T-bet) in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** Seventy SD rats were randomly divided into seven groups, namely normal group, model group, low, medium and high-dose modified Erchentang group (5, 10, 20 g·kg⁻¹), Xiaokechuan group (5 g·kg⁻¹) and Erchentang group (5 g·kg⁻¹), with 10 in each group. The rat model of COPD was established by smoking combined with intratracheal dripping of lipopolysaccharide (LPS). After successful modeling, the treatment group was given intragastric administration, and the normal group and the model group were given intragastric administration of equal volume of saline. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to

[收稿日期] 20190305(021)

[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] 包永生,在读硕士,从事中医药治疗肺系疾病的临床研究,E-mail:85651402@qq.com

[通信作者] * 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;

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

determine the concentrations of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12) in rat serum. The expressions of GATA3 and T-bet were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expressions of GATA3 and T-bet in lung tissue were detected by immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with the control group, the serum levels of IL-10 in the model group was significantly decreased, while the IL-12 level was significantly increased ($P < 0.01$). The protein and gene expressions of GATA3 in lung tissue were significantly decreased, whereas the expression of T-bet was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the serum level of IL-10 in each treatment group was increased to varying degrees, while the level of IL-12 was decreased to varying degrees ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of GATA3 in lung tissue of rats in each treatment group were increased significantly, while T-bet was inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion:** Modified Erchentang may reduce the inflammation of lung tissue and improve lung function in COPD rats by reducing IL-12, increasing the content of IL-10, inhibiting the protein and gene expressions of T-bet, and stimulating the protein and gene expressions of GATA3.

[Key words] Erchentang; chronic obstructive pulmonary disease; GATA-binding protein-3 (GATA3); T-box expressed in T cells (T-bet); interleukin-10; interleukin-12

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 以进行性发展的气流受限为主要特征, 并发症包括肺动脉高压、肺纤维化、慢性肺源性心脏病、右心衰竭等^[1-2], 因此致残率和致死率极高^[3]。在 COPD 的治疗中, 西医较常使用的支气管舒张剂、糖皮质激素等药物, 虽可短期缓解症状, 但远期疗效有待确定, 长期服药又容易引发耐药性, 甚至多会引发严重的不良反应^[4]。而中医药对 COPD 的防治作用已被大量的临床试验和药理学研究证实, 虽然关于中医药防治 COPD 的研究已逐渐丰富, 本课题组已通过实验研究证实爱罗咳喘宁、二陈汤加味对 COPD 的治疗作用, 常通过多个信号通路的协同作用来改善肺功能, 阻止气道重塑并减轻肺组织炎症^[5-9]。虽然前期研究已逐渐丰富, 尤其是关于气道重塑的研究, 但 COPD 与免疫反应的关系以及二陈汤加味对免疫反应的干预机制尚未曾涉及。二陈汤出自《太平惠民和剂局方》, 此方半夏化痰, 陈皮行气, 茯苓利水, 因此具有健脾化痰, 和中理气之功效。自宋以降, 二陈汤在临床各科的诸多病证中都有广泛的应用, 且疗效确切。因此本次实验选取与免疫反应相关的信号通路, 藉以探索二陈汤加味的多靶点治疗作用。

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 药物及试剂 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), 苏木素染液 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 025M40400V, H9627); 锌指蛋白 3 (GATA3) 一抗, T 盒转录因子 (T-bet) 一抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗, DAB 显色试剂盒, 白细胞介素 (IL)-10 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 BM5108, BA1711, BA1054, 111I8B22, EK0418); trizol (美国 Ambion 公司, 批号 15596-026); IL-12 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 E-EL-R0064c)。

1.3 仪器 RM 2016 型病理切片机 (德国 Leica 公司); BX53 型显微镜 (日本 Olympus 公司); R35 型切片刀 (日本羽毛公司); QuantStudio 6 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (美国 ABI 公司); JY300 型水平电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); HW-SY11-K P2 型电热恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表有限公司); DHG 9203A 型电热恒温鼓风干燥箱, DNP-9082 型电热恒温培养箱 (上海精宏实验设备有限公司); AJY-0501 型超级纯水仪 (美国艾科浦公司); H1650-W 型高速离心机

(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), Multiskan MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司), DEM-3 型自动洗板机(北京拓朴公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药 随机分配 70 只 SD 大鼠为 2 组,分别 10 只正常组和 60 只造模组,并对造模组进行造模实验^[10-12],使用自制亚克力透明箱,作为烟熏工具,将造模组大鼠置于烟熏箱内,30 min 内将 10 支香烟共同点燃,1 日 2 次。并于第 1 天和第 13 天麻醉造模组,气管内滴注 LPS (1 g·L⁻¹),正常组则在气管内滴入等量生理盐水。模型制造成功之后,再将造模组随机分为 6 组,分别模型组、消咳喘组、二陈汤组、二陈汤加味高、中、低剂量组,每组 10 只。并分别进行灌胃治疗,其中二陈汤加味高、中、低剂量组分别按照 20, 10, 5 g·kg⁻¹·d⁻¹ 给药,消咳喘组按照 5 g·kg⁻¹ 给药,二陈汤组按照 5 g·kg⁻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 mL·d⁻¹,给药过程持续进行 14 d。(动物体质量/人的体质量)×人用药量×6.3 计算,确定中剂量后,低、高剂量再依等比数列进行设置^[13]。

2.2 指标观测

2.2.1 一般状况观察 分别观察 5 组大鼠食量、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一只大鼠的情况。

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 免疫组化法检测 GATA3, T-bet 的蛋白表达

将切片脱蜡水化,以双氧水封闭,抗原修复后,滴入一抗 GATA3, T-bet 工作液, DAB 显色,并苏木素复染,消咳喘组用已知阳性片,阴性组用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,稀释比均为 1:100。PBS 冲洗切片 3 次, 3 min, 擦干切片之后滴加二抗, 37 °C 20 min。冲洗切片 4 次 3 min, 甩去 PBS 液, 擦干切片, 滴加 DAB 显色液, 镜下观察, 阳性标志为棕黄色或棕褐色。苏木素复染 30 s, 水洗后, 1% 的盐酸乙醇分化, 再用自来水水洗返蓝。水中冲洗之后, 切片脱水透明放置 2 min, 风干切片。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, 计算阳性显色的平均积分吸光度 IA, 整理数据并进行分析。

2.2.4 Real-time PCR 法检测 GATA3, T-bet mRNA 表达 于 -80 °C 冰箱中取出新鲜的冰冻组织, 质量约 100 mg, 加入 trizol 试剂 1 mL, 并研磨成浆, 再移至 1.5 mL 离心管内裂解。加入三氯甲烷 200 μL, 剧烈混匀颠倒数次后, 室温下静置 5 min。4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 可见形成三相。转移上层入一新 1.5 mL 离心管内, 加异丙醇 400 μL, 10 min 室温静置。4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 管底可见 RNA 的白色沉淀。弃上清, 加 75% 乙醇 1 mL, 涡旋混匀后, 4 °C, 1 万 r·min⁻¹, 离心 5 min。弃上清, 空气中干燥 RNA 沉淀 5 ~ 10 min, 将沉淀溶于 DEPC 水 20 μL 中。计算 RNA 纯度、浓度。根据吸光度 A_{260 nm}/A_{280 nm}, 估测 RNA 的质量。根据 A 按下列公式计算样品 RNA 的浓度: 总 RNA 浓度 (g·L⁻¹) = A_{260 nm} × 40 × 10⁻³。将总 RNA 放于 -80 °C 冰箱内保存以备用。根据 A 计算样品 RNA 的浓度。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参, 引物序列见表 1。逆转录成 cDNA, 反应条件为 25 °C 5 min, 50 °C 15 min, 85 °C 5 min, 4 °C 10 min。Real-time PCR 检测, cDNA 做 10 倍稀释, 反应条件为 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 循环。绘制熔解曲线, 最终数据以 2^{-ΔΔC_t} 进行分析。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGAC-3'	253
	下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'	
GATA3	上游 5'-ACTCCAGTCCGCATCTCTTC-3'	240
	下游 5'-AGGGCCGATAGGTGTAATG-3'	
T-bet	上游 5'-TCCGGGAGAACTTGAGTCC-3'	237
	下游 5'-TCACTGCTCGGAAGCTCTGTT-3'	

2.2.5 ELISA 测定大鼠血清中 IL-10, IL-12 的含量

在标准孔、空白孔、待测样品孔中加样, 37 °C 孵育 90 min, 弃液甩干并加入抗体工作液, 并孵育 60 min。弃液, 洗板 3 次, 加酶结合物工作液 100 μL, 37 °C 30 min, 弃液甩干, 洗板 5 次。加显色剂 90 μL, 酶标板加覆膜, 避光孵育 37 °C 15 min。加终止液, 终止反应, 此时蓝色转为黄色。以酶标仪在 450 nm 波长, 测量各孔 A, 并经转化, 计算出

IL-10, IL-12 的含量。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 11.5 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 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

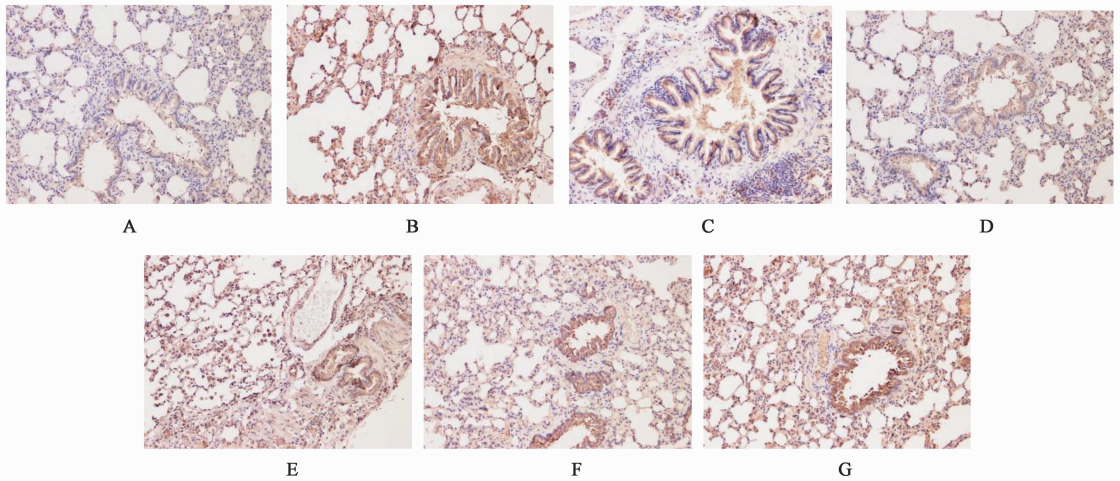
3 结果

3.1 大鼠一般状况观察 直到实验结束之时, 正常组大鼠的一般状况良好, 且动作敏捷, 无异常情况, 无死亡。模型组大鼠的体质量均较造模前严重下降, 精神状态较差, 呼吸频率加快, 鼻腔可见黏性分泌物, 且死亡 2 只。各治疗组也都有上述症状, 但通过治疗皆有不同程度的改善。二陈汤加味低剂量组, 二陈汤组的大鼠体质量较造模前略有增加, 各死亡 1 只。二陈汤加味高、中剂量组, 消咳喘组的大鼠体质量较前增加, 共死亡 1 只。

3.2 对 COPD 大鼠肺功能的影响 与正常组比较, 模型组大鼠的呼气流量峰值, 潮气量均有程度不等的降低; 给药后, 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、

高剂量组的呼气流量峰值, 潮气量均有程度不等的升高。

3.3 对 COPD 大鼠的肺组织中 GATA3, T-bet 蛋白表达的影响 GATA3, T-bet 在阳性表达时, 可在镜下表现为棕黄色颗粒, 表达部位主要在肺泡巨噬细胞的细胞核和支气管上皮细胞的细胞核等。T-bet 在模型组大鼠中呈阳性表达, 镜下观察可见气管有大量分泌物, 细支气管管壁的上皮多处脱落, 黏液下层有黏液腺增生, 且管壁各层存在炎细胞浸润, 部分细支气管的周围可见肺大泡, 肺血管管壁增厚, 肺间质增厚。与模型组比较, 各治疗组都有不同程度降低 T-bet 蛋白表达 ($P < 0.05$), 其中以二陈汤加味中剂量最为明显。见图 1, 表 2。GATA3 在模型组呈弱阳性表达, 镜下观可见肺大泡和炎细胞浸润, 气管官腔有大量分泌物, 肺血管壁和肺间质增厚十分明显。与模型组比较, 各治疗组的肺组织 GATA3 的表达明显增加 ($P < 0.05$), 其中以二陈汤加味中剂量组的表达增多情况最为明显。见图 2, 表 2。



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 T-bet 蛋白表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of modified Erchentang on expression of T-bet in lung tissue of COPD rats(IHC, $\times 200$)

3.4 对 COPD 大鼠的肺组织中 GATA3, T-bet mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组 GATA3 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组, 消咳喘组, 二陈汤组的 GATA3 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 T-bet mRNA 表达明显增强 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组, 消咳喘组, 二陈汤组的 T-bet mRNA 表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 对 COPD 大鼠的血清中 IL-10, IL-12 含量的

影响 与正常组比较, 模型组 IL-10 的含量显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组, 消咳喘组, 二陈汤组的 IL-10 含量均程度不等地升高 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组 IL-12 含量显著增强 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组, 消咳喘组, 二陈汤组的 IL-12 含量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

长久以来, COPD 都是影响我国国民健康的

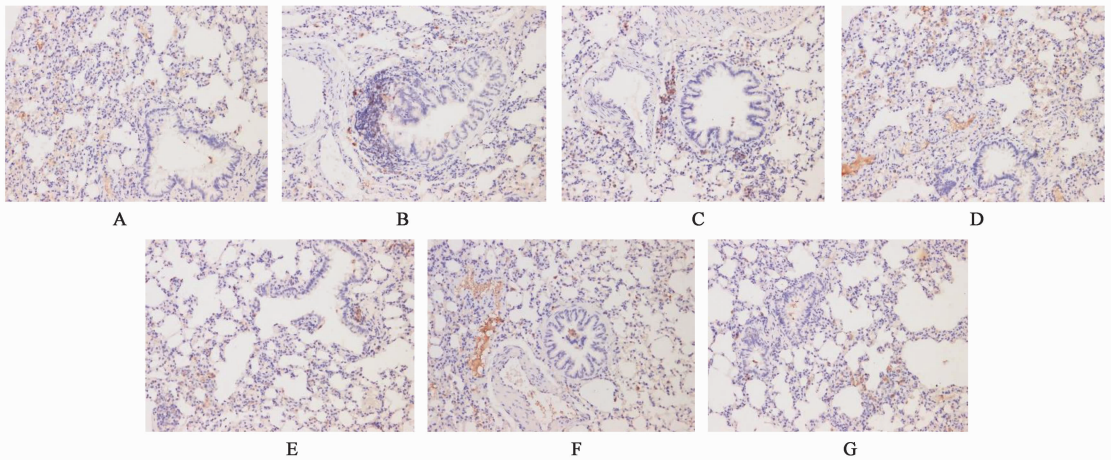


图 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 GATA3 蛋白表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 2 Effect of modified Erchentang on expression of GATA3 in lung tissue of COPD rats (IHC, ×200)

表 2 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 GATA3, T-bet 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of modified Erchentang on GATA3, T-bet protein expression in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GATA3	T-bet
正常	-	5.58 ± 0.11	5.43 ± 0.16
模型	-	1.81 ± 0.10 ¹⁾	9.40 ± 0.17 ¹⁾
二陈加味	40	4.05 ± 0.06 ^{1,2,3)}	7.29 ± 0.09 ^{1,2,3)}
	20	4.84 ± 1.11 ^{1,2,3,4)}	6.48 ± 0.19 ^{1,2,3,4)}
	10	3.44 ± 0.11 ^{1,2,4)}	7.91 ± 0.09 ^{1,2,4)}
消咳喘	5	4.20 ± 0.07 ^{1,2,3)}	7.19 ± 0.09 ^{1,2,3)}
二陈汤	5	3.31 ± 0.07 ^{1,2,4)}	8.13 ± 0.14 ^{1,2,4)}

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

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织中 GATA3, T-bet mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of modified Erchentang on expression of GATA3, T-bet mRNA in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GATA3	T-bet
模型	-	0.33 ± 0.03 ¹⁾	4.35 ± 0.27 ¹⁾
二陈汤加味	20	0.62 ± 0.01 ^{2,4)}	2.50 ± 0.18 ^{2,3)}
	10	0.83 ± 0.03 ^{2,3,4)}	1.73 ± 0.23 ^{2,3,4)}
	5	0.52 ± 0.04 ^{2,3,4)}	3.05 ± 0.12 ²⁾
消咳喘	5	0.70 ± 0.02 ^{2,4)}	2.50 ± 0.17 ^{2,3)}
二陈汤	5	0.42 ± 0.05 ³⁾	3.37 ± 0.10 ^{2,4)}

注:设正常组 mRNA 相对表达为 1;与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与二陈汤组比较³⁾ $P < 0.05$;与消咳喘组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

一大顽疾,《Lancet》预测称,2003 年至 2033 年这 30 年间我国将有 6 500 万人死于 COPD^[14],不仅 COPD 的患病人数,死亡率都在逐年攀升,其给患者和家庭

表 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠血清中 IL-10, IL-12 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of modified Erchentang on expression of IL-10 and IL-12 in serum of COPD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-10	IL-12
正常	10	-	18.04 ± 1.19	7.18 ± 0.34
模型	8	-	2.79 ± 0.28 ¹⁾	18.50 ± 0.41 ¹⁾
二陈汤加味	10	20	10.77 ± 1.05 ^{2,3)}	12.78 ± 0.26 ^{2,3)}
	10	10	14.98 ± 0.94 ^{2,3,4)}	9.12 ± 0.13 ^{2,3,4)}
	9	5	7.26 ± 0.58 ⁴⁾	13.16 ± 0.42 ^{2,4)}
消咳喘	9	5	12.11 ± 0.61 ^{2,3)}	11.14 ± 0.35 ^{2,3)}
二陈汤	9	5	4.94 ± 0.72 ⁴⁾	14.79 ± 0.67 ^{2,4)}

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⁾ $P < 0.01$;与消咳喘组比较⁴⁾ $P < 0.05$ 。

带来的痛苦尤其严重,疾病的恶化风险、肺功能的持续下降以及对西药的严重依赖性,都是患者心头扫不去的阴霾。

诸如 COPD 般的进行性疾病对患者带来的痛苦是显而易见的,研究显示 COPD 患者常伴有高度的焦虑症和抑郁症。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心头抹不去的乌云^[15-16],因此深入开展 COPD 的研究就尤显紧迫,然而西医的常规治疗虽可以在一定程度缓解症状,但因为 COPD 发病机制的复杂性,常规的种种治疗措施并不能阻止患者诸般症状的持续恶化。而较强的药物依赖性和毒副作用,也使患者在接受治疗前就畏之如虎,对其情绪造成了较强的干扰。中医学的优势恰可以补充西医学的不足,而本课题组的前期实验也证实了爱罗咳喘宁、二陈汤加味可以较好的针对 COPD 的

种种复杂病机,达到缓解气道重塑,改善肺功能的目的,而且中医药对 COPD 的干预是多通路、多靶点的,也正因为中医药,特别是二陈汤加味的治疗优势,才能消弭因为使用西药而产生的依赖性,并提高患者生活质量。

咳嗽、痰饮以及喘息是 COPD 的主要症状,也正因症状之相类,常被归于中医的“肺胀”范畴。肺主宣发肃降,且主皮毛兼有卫外之能,因而每当外邪侵袭皮肤腠理,肺便会因之宣肃失常,喘咳也由此而生,随后子病及母,脾胃因为肺气不足而逐渐虚损,最终肺脾两虚。运化失常就会导致水液不化津而化痰,肺又为贮痰之器,气虚痰阻的长期胶固,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^[17]。有鉴于此,化痰和理气就理所当然的是 COPD 的治疗大法。而两种功效兼而有之,且为历代医家所赞颂的祛痰准绳二陈汤就成为治疗 COPD 的必要基本方。二陈汤自问世以来,受到了历代医家的交口称赞,如《活人书》中讲道“二陈汤,治痰之准绳也”,陈念祖其为“痰饮之通剂也”。正因其殊胜之功效,二陈汤常被历代医家化裁运用于多种疑难。然而考虑到临床病机的复杂性,历代医家在临床应用二陈汤的时候多以其加味和合方为主^[18],这一观念影响至深,即便时至今日的临床研究或者是药理学研究也都是以二陈汤加味和合方为主要研究对象^[19]。有鉴于此,为了能够逐一对 COPD 的种种病机多靶点攻克,本课题组也在重用二陈汤之时,适当的加减化裁,因此又加麻黄、苦杏仁药对,一宣一降方能收犁庭扫穴之功。COPD 的发病多以气机上逆的喘息为主,单凭杏仁之降气深恐不能平肃肺气,因此又加葶苈子、苏子,体现出本方宣降有度且以降为先之妙。长期的进行性气流受限就会导致肺脾之气的损耗,补气健脾药的加入就能攻补兼施。也正因为全方配伍的精妙,才能在临床上展示出确切的疗效^[20],包括对二陈汤加味的药理学研究也证实了这一点^[21-22]。而本次的实验仍以对二陈汤加味的研究为主,探索其对 COPD 的多靶点治疗作用。

免疫反应在患有 COPD 的患者及动物模型中起到重要作用^[23]。活化的 CD4⁺T 淋巴细胞可经不同转录因子的激活分化为 Th1 细胞和 Th2 细胞,两种细胞在机体的免疫反应中发挥着重要作用^[24]。Th1 细胞和 Th2 细胞可通过分泌相关的淋巴因子,引发机体的一系列促炎与抗炎反应^[25]。Th1 细胞主要分泌 IL-12 等促炎性细胞因子,T-bet 是其特征性转录因子,参与细胞免疫和局部炎症反应有关的免疫

应答^[26]。Th2 细胞可分泌 IL-10 等抗炎细胞因子,主要参与体液免疫和过敏性反应^[27]。Th1 细胞和 Th2 细胞既相互调节,又相互制约。转录因子 T-bet 和 GATA-3 对 Th1/Th2 细胞分化起着重要作用。T-bet,GATA-3 可分别对 Th1 和 Th2 细胞进行调控^[28]。T-bet 是 Th1 细胞特征性转录因子,在 Th1 细胞的分化中起着决定性的作用。Dutta 等^[29]研究发现,Th1 细胞发展的早期 T-bet 的表达迅速增高,在 Th2 细胞发展过程中 T-bet 则不表达或低表达。GATA-3 是 Th2 特异的转录因子,能促使 Th 合成 Th2 细胞因子,GATA-3 在 Th2 细胞的分化调控中发挥关键的作用。GATA-3 能促使正在分化或已分化的 Th 合成 Th2 细胞因子,诱导 Th1 细胞向 Th2 方向分化。同时,GATA-3 的过表达可以抑制转录因子 T-bet 的表达。因此,T-bet,GATA-3 能直接反映机体 Th1,Th2 细胞平衡状态^[30]。

结果显示,模型组大鼠的 IL-10 明显降低,IL-12 显著升高,提示模型组大鼠存在 Th1 细胞极化的现象,证实 COPD 免疫紊乱的特征性表现之一^[31]。经药物治疗后,各组大鼠的 IL-10 均有不同程度的升高,IL-12 则均有下降,其中以二陈汤加味中剂量组升高最显著,说明二陈汤加味中剂量组能够对 COPD 起到明显的治疗作用。模型组 GATA-3 蛋白及 mRNA 表达显著低于正常组,T-bet 则显著高于正常组,在经过药物治疗后各组肺组织中 GATA-3 的蛋白和 mRNA 表达均有程度不等地升高,T-bet 则受到了明显的抑制,其中二陈汤加味方中剂量组对 GATA-3 的促进和对 T-bet 的抑制作用最为明显,表明二陈汤加味方能够明显增强 COPD 大鼠肺组织中 GATA-3 的表达,抑制 T-bet 的表达,进而发挥其对抗 COPD 炎症反应及改善免疫紊乱的作用。

综上所述,二陈汤加味方能有效改善 COPD 大鼠的免疫反应,通过增强肺组织中 GATA-3 的蛋白及基因表达,抑制肺组织中 T-bet 的蛋白和基因表达,并通过影响 Th1 细胞,Th2 细胞标志物 IL-10,IL-12 的表达,达到改善和治疗 COPD 大鼠的肺组织炎症,并减轻机体的免疫紊乱的目的。

[参考文献]

- [1] de Miguel-Diez J, Lopez-de-Andres A, Hernandez-Barrera V, et al. Influence of COPD on outcomes of patients hospitalized with heart failure: analysis of the Spanish National Hospital Discharge Database (2001-2015) [J]. Int J Cardiol, 2018, 269: 213-219.
- [2] Rupak D, Upenkumar P, Sandeep S, et al. The burden

- and impact of arrhythmia in chronic obstructive pulmonary disease; insights from the national inpatient sample[J]. *Int J Cardiol*, 2019, 281:49-55.
- [3] Vestbo J, Mathioudakis, Alexander G. The emerging Chinese COPD epidemic [J]. *Lancet*, 2018, 391(10131):1642-1643.
- [4] Riley C M, Sciruba F C. Diagnosis and outpatient management of chronic obstructive pulmonary disease: a review[J]. *JAMA*, 2019, 321(8):786-797.
- [5] 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细胞介素-6和白细胞介素-8的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(4):786-787.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 谢文英,季书,尚立芝,等. 慢性阻塞性肺疾病结构重塑机制与中医药治疗进展[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(21):5342-5346.
- [10] 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.
- [11] 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 、巨噬细胞炎症蛋白-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):5705-8.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] LIN H H, Murray M, Cohen T, et al. Effects of smoking and solid-fuel use on COPD, lung cancer, and tuberculosis in China; a time-based, multiple risk factor, modelling study[J]. *Lancet*, 2008, 372(9648):1473-1483.
- [15] Atlantis E, Fahey P, Cochrane B, et al. Bidirectional associations between clinically relevant depression or anxiety and copd; a systematic review and meta-analysis[J]. *Chest*, 2013, 144(3):766-677.
- [16] Rupak D, Upenkumar P, Sandeep S, et al. The burden and impact of arrhythmia in chronic obstructive pulmonary disease; insights from the National Inpatient Sample[J]. *Int J Cardiol*, 2019, 281:49-55.
- [17] 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, 46(1):1-4.
- [18] 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.
- [19] 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, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20191636.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 谢文英,包永生,王俊月,等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型肺组织 PPAR γ 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(23):26-33.
- [23] HU Q, QIN X, QIAN G, et al. SOCS1 silencing can break high-dose dendritic cell immunotherapy-induced immune tolerance[J]. *Mol Med Rep*, 2008, 1(1):61-70.
- [24] Sinha S, Boyden A W, Itani F R, et al. CD $^{+}$ 8 T-cells as immune regulators of multiple sclerosis [J]. *Front Immunol*, 2015, doi:10.3389/fimmu.2015.00619.
- [25] Bettelli E, Carrier Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells[J]. *Nature*, 2006, 441(7090):235-238.
- [26] Arellano G, Acuna E, Reyes L I, et al. Th1 and Th17 cells and associated cytokines discriminate among clinically isolated syndrome and multiple sclerosis phenotypes[J]. *Front Immunol*, 2017, doi:10.3389/fimmu.2017.00753.
- [27] Bruchard M, Rebé C, Derangère V, et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation[J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(12):1292.
- [28] GU W, LI C, YIN W, et al. Effects of Ahen-Fuinjection on the expression of T-cell-specific transcription factors T-bet/Gata-3 in porcine postresuscitation lung injury [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/464650.
- [29] Dutta A, Miaw S C, YU J S, et al. Altered T-bet dominance in IFN- γ -decoupled CD4 $^{+}$ T cells with attenuated cytokine storm and preserved memory in influenza[J]. *Immunol*, 2013, 190(8):4205-4214.
- [30] 王成阳,刘向国,王传博,等. COPD大鼠T细胞介导转录因子对Th1/Th2细胞调控的实验研究[J]. *四川大学学报:医学版*, 2014, 45(6):941-945.
- [31] WANG C Y, DING H Z, TANG X, et al. Effect of Liuweibuqi capsules on CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells, helper T cells and lung function in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease complicated with lung Qi deficiency[J]. *J Thoracic Disease*, 2018, 10(5):2700-2711.

[责任编辑 周冰冰]