

## 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

谢文英, 王俊月, 包永生\*, 尚立芝\*, 李进京, 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:** 观察二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠血管内皮生长因子(VEGF)及其受体2(VEGFR2), 白细胞介素(IL)-4, 内皮素-1(ET-1)及核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的影响。**方法:** 将50只SD大鼠随机分为5组, 每组10只, 组别为正常组、模型组、二陈汤加味低、中、高剂量组(10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。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蒸馏水。光镜观察大鼠肺血管的病理变化, 并测定肺血管壁厚度。酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清、支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织匀浆液中IL-4的含量, 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测ET-1 mRNA表达; 免疫组化检测肺组织VEGF, ET-1及VEGFR2的表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组大鼠血清, BALF及肺组织匀浆液中IL-4含量均显著降低( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组IL-4含量均有程度不等的上升( $P < 0.01$ )。与正常组比较, 模型组肺组织ET-1 mRNA表达量显著升高( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组肺组织ET-1 mRNA表达量均显著降低( $P < 0.01$ )。与正常组比较, 模型组大鼠肺组织中的VEGF, VEGFR2表达增多, ET-1蛋白表达显著上升( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 二陈汤加味低、中、高剂量组VEGF, VEGFR2表达降低, ET-1蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ )。**结论:** 二陈汤加味可能通过提升IL-4的含量, 抑制VEGF, VEGFR2及ET-1的蛋白表达, 从而减轻COPD大鼠肺组织炎症及肺血管重构的进程, 减缓COPD及其并发症的进展。

**[关键词]** 慢性阻塞性肺疾病; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 核转录因子- $\kappa$ B; 血管内皮生长因子(VEGF); VEGF受体2(VEGFR2)

**[中图分类号]** R2-0; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)23-0048-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20192336

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190816.1344.009.html>

**[网络出版时间]** 2019-08-16 15:31

### Effect of Modified Erchentang on VEGF, VEGFR2, IL-4, ET-1 in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats

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

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Erchen on vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor R2 (VEGFR2), interleukin (IL) -4 and endothelin-1 (ET-1) in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** The 50 SD rats were randomly divided into 5 groups, 10 rats in each group, which were normal group, model group, Erchentang low, medium and high dose group (10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). COPD rat model was established by smoking combined with lipopolysaccharide (LPS) intratracheal drip. After successful modeling, the treatment group was given intragastric administration, and the normal group and the

**[收稿日期]** 20181015(006)

**[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, 硕士生导师, 从事中医药作用机制研究, Tel:0371-86253082, E-mail: lzshang2014@163.com

model group were given intragastric distilled water of equal volume. The pathological changes of pulmonary vessels in rats were observed by light microscopy, and the thickness of pulmonary vascular wall was measured. The concentration of IL-4 in rat serum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung homogenate was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression of ET-1 and immunohistochemistry was used to detect the expression of VEGF, VEGFR2 and ET-1 in lung tissue. **Result:** Compared with normal group, the concentration of IL-4 in serum, BALF and lung homogenate of model group rats decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the concentration of IL-4 in low, medium and high dose Erchentang group increased in varying degrees ( $P < 0.05$ ). Compared with normal group, the expression of ET-1 in lung tissue of model group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the expression of ET-1 in lung tissue of low, medium and high dose Erchentang group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with normal group, the expression of VEGF, VEGFR2, ET-1 protein in the lung tissue of model group increased ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the expression of VEGF, VEGFR2 and ET-1 protein in the low, medium and high dose Erchentang group decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Modified Erchentang can alleviate the process of pulmonary inflammation and pulmonary vascular remodeling in COPD rats, and slow down the progress of COPD and its complications by increasing the content of IL-4, inhibiting the expression of VEGF, VEGFR2, ET-1.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease; interleukin-4; endothelin-1; vascular endothelial growth factor (VEGF); vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)

慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 是一种以不完全可逆的气流受限为特征的慢性呼吸系统疾病,严重影响患者的生活质量及寿命<sup>[1]</sup>。目前,其发病机制仍不十分清楚,研究发现,吸烟是诱发 COPD 的关键因素之一,而气管、肺实质与肺血管的炎症反应及结构重塑是 COPD 的典型病理变化<sup>[2]</sup>。肺血管内皮不仅在调节血管壁细胞生长中起到关键作用,而且在神经-体液因素调节下不断释放血管舒张因子参与维持肺循环的稳定,血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种可增加血管通透性、促进血管内皮细胞分裂及诱发血管形成的细胞因子,在缺氧、炎症以及血管内皮损伤等刺激后其表达则明显增加,贯穿于 COPD 发生发展的全过程,与肺组织炎症及肺血管重塑密切相关,并参与 COPD 并发肺动脉高压的形成<sup>[3]</sup>。而 ET-1 是一种具有促进细胞增殖的生长因子,能促使肺血管平滑肌细胞增殖肥厚,出现管壁增厚和管腔狭窄,进而导致血管功能的衰减<sup>[4]</sup>。其中,IL-4 能够与多种引起炎症的细胞因子互相作用,促使 COPD 炎症反应进一步加重,并抑制 VEGF 的表达<sup>[5]</sup>。目前治疗 COPD 的方法,仍以抗炎、祛痰、扩张支气管等为主,但只能使症状暂减,无法有效阻止 COPD 的病程进展。近年来,中医药在治疗 COPD 方面优势明显,本课题组前期临床和实验研究证实,以二陈汤为基础方进行加减的爱罗咳喘宁方对 COPD 可以起到抗炎作用<sup>[6-11]</sup>,但是内在的抗炎机

制及与血管重构相关的研究仍然比较缺乏。本研究在光镜下观察大鼠肺血管的变化,并采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测 COPD 大鼠血清,支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织匀浆液中 IL-4 的含量,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 ET-1 的 mRNA 表达,免疫组化检测其肺组织 VEGF 及其受体 VEGFR2 的表达。二陈汤出自成书于北宋的《太平惠民和剂局方》,由姜半夏、橘皮各 5 两,茯苓 3 两,炙甘草 1 两半,生姜 7 两,乌梅 1 个组成,有健脾化痰,和中理气之功效。通过前期研究,发现无论是历代医家在医论医话中做的阐述,还是名医医案中的实际应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<sup>[12-13]</sup>。因此本次实验研究仍以二陈汤加味为主,探讨其对 COPD 患者的治疗机制,旨在为二陈汤加味治疗 COPD 提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 50 只雄性 SD 大鼠,SPF 级,2 月龄,体质量 ( $200 \pm 20$ ) g,合格证号 SCXK (鲁)2014-0007,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供;实验场地为河南省中医药研究院动物实验中心,许可证号为 SYXK (豫)2012-0009,动物实验伦理审查批准编号 DWLL20130018。由江苏省协同医药生物工程有限责任公司提供动物生长饲料。

**1.2 药物及试剂** 二陈汤加味方组成为姜半夏 10 g (批号 1505001S),陈皮 10 g (批号 1509002S),

白术 15 g (批号 1407001W), 茯苓 20 g (批号 1405002W), 党参 25 g (批号 1407007W), 枳壳 10 g (批号 1510002W), 山药 20 g (批号 1509003S), 地龙 10 g (批号 1511002 S), 桂枝 3 g (批号 1510002S), 炒苏子 20 g (批号 1512001S), 炙麻黄 6 g (批号 1508001S), 苦杏仁 10 g (批号 1404002S), 葶苈子 15 g (批号 1506001W), 均为华润三九医药公司提供的中药配方颗粒; 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司, 批号 025M40400V); 大鼠 IL-4 ELISA 试剂盒, 兔抗大鼠 VEGF 一抗, 兔抗大鼠 VEGFR2 一抗, DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物有限公司, 批号分别为 12812591008, 13CM409B, 12J24, 11118B22); 兔多抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 杭州贤至生物科技有限公司, 批号 AB-P-R001); 小鼠单克隆抗体 ET-1 (英国 Abcam 公司, 批号 GR270664-3); 苏木素染色液, 伊红染色液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 G1140, G1100); 红旗渠过滤嘴香烟 (河南中烟工业有限责任公司, 烤烟型, 焦油含量 14 mg/支, 尼古丁含量 1.1 mg/支)。PCR 引物序列由北京擎科新业生物技术有限公司设计合成, 见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'	253
	下游 5'-TTTGAGGGTGCACGGAACCTT-3'	
ET-1	上游 5'-TCTTCTCTCTGCTGTTTGTG-3'	171
	下游 5'-TAGTTTTCTCCCTCCACC-3'	

**1.3 仪器** DL-5-B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂); BA210 型生物显微镜 (北京麦克奥迪实业集团有限公司); BSA124S-CW 型电子天平 (北京麦多利斯仪器有限公司); DB-B1 型烤片机 (常州国华电器有限公司); DHP-9050B 型智能型电热恒温培养箱 (上海琅实验设备有限公司); TP1020-1 型自动组织脱水处理机, ST5020 型全自动染色机 (上海徕卡显微系统有限公司); SW-CJ-2FD 型洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); DY CZ-40 型电转仪 (北京六一仪器厂); QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 ABI 公司); Nano-100 型微量分光光度计 (杭州奥盛仪器有限公司); JY300 型水平电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司); DHG 9203A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组、模型制备与给药** 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、二陈汤加味低、中、高剂量组 (10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)。制备 COPD 大鼠模型<sup>[14-16]</sup>, 于第 1 天和第 14 天, 对除之外的 40 只大鼠逐一进行麻醉 (腹腔注射 10% 水合氯醛溶液进行麻醉, 给药剂量为 0.03 mL·kg<sup>-1</sup>), 并气管内滴注 LPS (1 g·L<sup>-1</sup>) 0.2 mL。正常组大鼠气管内注入等量生理盐水。除第 14 天外, 第 2~30 天将造模大鼠置入自制的密封烟熏箱内被动吸烟, 进行香烟烟雾染毒, 2 次/d, 中间间隔 4 h, 香烟 10 支/次, 30 min/次。最终以病理组织及肺功能的改变为标准判断模型是否制备成功<sup>[17]</sup>。模型制备成功之后, 对各组大鼠进行灌胃, 各组大鼠每日用药分别按照二陈汤加味低、中、高剂量每日 10, 20, 40 g·kg<sup>-1</sup> 换算出免煎颗粒用量, 用纯水稀释后于每天上午 10:00 及下午 4:00 分别灌胃给药。模型组和正常组灌胃相同体积的纯水, 给药全程持续 14 d。灌胃剂量换算, 二陈汤加味中剂量组用药量按照 70 kg 的成年人每日常规服用药量换算, 体表面积系数为 0.018, 确定中剂量后, 低剂量为中剂量的 0.5 倍, 高剂量为中剂量的 2 倍<sup>[18]</sup>。

**2.2 苏木素-伊红 (HE) 染色观察大鼠肺组织病理形态学变化** 用浓度为 4% 的多聚甲醛固定大鼠右肺上叶组织; 选取厚度约 1~2 cm 的右肺上叶组织横截面放入包埋盒中, 自动组织脱水机脱水; 先在石蜡包埋机上手动完成石蜡包埋, 保存于 4 °C 环境下, 6 μm 厚切片使用自动染色机进行 HE 染色, 封片后光镜下观察大鼠的肺组织结构。

**2.3 测定肺血管壁厚度** 每组 HE 染色切片中随机选取 6 个直径在 200~350 μm 与呼吸性细支气管、肺泡管伴行的肺小动脉, 并测定其肺血管外径、管壁厚度、血管总面积及管壁面积, 计算出管壁厚度占外径的百分比 (WT%) 和管壁面积占血管总面积的百分比 (WA%), 以此反映肺小动脉管壁增厚程度。

**2.4 ELISA 测定 IL-4 含量** 于空白孔、标准孔、待测样品孔中加样并 37 °C 孵育 90 min, 弃孔内液体并甩干, 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 μL, 37 °C 温育 30 min, 弃液甩干并洗板 5 次。每孔加显色剂 90 μL, 酶标板上加覆膜, 37 °C 避光孵育 15 min。加终止液 50 μL 终止反应, 在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔吸光度 A。

**2.5 Real-time PCR 检测 ET-1 mRNA 含量** 取新鲜冰冻组织约 100 mg,加 trizol 试剂,并研磨裂解。加入三氯甲烷 200  $\mu\text{L}$ ,混匀后静置 5 min。4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心 15 min,转移上层至 1.5 mL EP 管中,加入异丙醇 400  $\mu\text{L}$ ,混匀后静置 10 min。离心,弃上清,加入 75% 乙醇 1 mL,混匀后离心 5 min。弃上清后,于空气中干燥 RNA 沉淀,将其溶于 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水中,取溶解后的 RNA 2  $\mu\text{L}$  用微量分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度。根据 A 计算样品 RNA 的浓度。逆转录成 cDNA,反应条件:25  $^{\circ}\text{C}$  5 min,50  $^{\circ}\text{C}$  15 min,85  $^{\circ}\text{C}$  5 min,4  $^{\circ}\text{C}$  10 min。Real-time PCR 检测,cDNA 做 10 倍稀释,反应条件:50  $^{\circ}\text{C}$  2 min,95  $^{\circ}\text{C}$  10 min;95  $^{\circ}\text{C}$  30 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环。绘制溶解曲线,最终以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示。

**2.6 免疫组化检测 VEGF,ET-1 及 VEGFR2 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 VEGF,VEGFR2,ET-1 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。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 计算平均积分吸光

度 IA,整理数据并进行分析。

**2.7 统计学处理** 统计软件采用 SPSS 22.0 进行数据分析,符合正态分布,组间比较采用 One-way ANOVA 进行描述,采用 SNK-q 检验法描述组间两两比较,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对 COPD 大鼠一般情况的影响** 实验结束时,正常组大鼠毛皮仍然呈白色并有光泽、呼吸均匀、反应迅速。模型组大鼠呼吸浅快,呼吸困难,易烦躁激惹,毛发干燥发黄,精神差。二陈汤加味高、中、低剂量组分别以相应的药物灌胃后,大鼠体质量增加,二陈汤加味中剂量组效果最明显。二陈汤加味低剂量组在动物实验进行期间死亡 1 只,模型组死亡 2 只,经解剖观察,发现肺气肿及肺部感染可能是致死的主要原因。

**3.2 对 COPD 大鼠血清,BALF 及肺组织匀浆液中 IL-4 含量的影响** 与正常组比较,模型组大鼠血清,BALF 及肺组织匀浆液中 IL-4 含量均显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,二陈汤加味低、中、高剂量组 IL-4 均显著升高 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 二陈汤加味对大鼠血清,BALF 及肺组织匀浆液中 IL-4 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of modified Erchentang on level of IL-4 in serum, BALF and lung homogenate of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	IL-4/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
			血清	BALF	肺组织匀浆液
正常	10	-	54.71 $\pm$ 4.59	134.21 $\pm$ 9.13	106.77 $\pm$ 5.89
模型	8	-	22.05 $\pm$ 1.09 <sup>2)</sup>	52.28 $\pm$ 2.69 <sup>2)</sup>	26.05 $\pm$ 2.99 <sup>2)</sup>
二陈汤加味	9	10	28.97 $\pm$ 1.38 <sup>4)</sup>	68.83 $\pm$ 5.62 <sup>4)</sup>	42.27 $\pm$ 2.27 <sup>4)</sup>
	10	20	42.55 $\pm$ 2.20 <sup>4)</sup>	111.38 $\pm$ 3.43 <sup>4)</sup>	75.57 $\pm$ 5.01 <sup>4)</sup>
	10	40	33.08 $\pm$ 1.81 <sup>4)</sup>	76.59 $\pm$ 4.61 <sup>4)</sup>	54.74 $\pm$ 3.83 <sup>4)</sup>

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

**3.3 对 COPD 大鼠肺组织中 ET-1 mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组肺组织 ET-1 mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,二陈汤加味低、中、高剂量组肺组织 ET-1 mRNA 表达量均显著降低 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.4 对 COPD 大鼠肺血管组织组织病理学的影响** 正常组大鼠肺脏呈肉色,表面光滑,弹性良好,无斑点。模型组大鼠双肺体积增大明显,呈暗红色,边缘圆钝,肺脏表面可见苍白色斑点,弹性较差,有粗糙隆起;支气管管腔中有大量黏液状分泌物。各治疗组肺脏增大,色红,部分肺脏边缘钝圆,表面不

表 3 二陈汤加味对 COPD 大鼠 ET-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

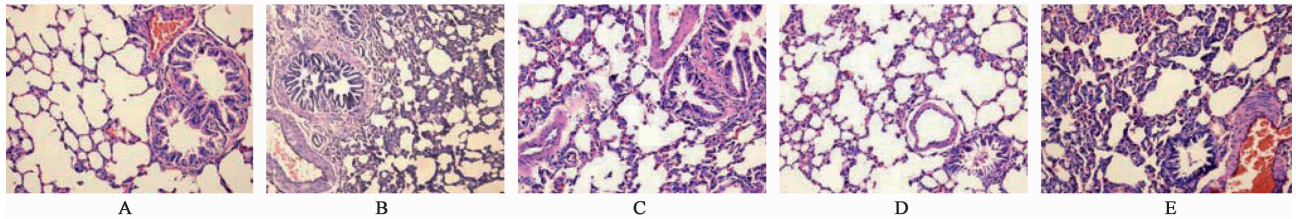
Table 3 Effect of modified Erchentang on mRNA expression of ET-1 in COPD rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	ET-1
正常	-	0.16 $\pm$ 0.03
模型	-	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>
二陈汤加味	10	0.28 $\pm$ 0.02 <sup>4)</sup>
	20	0.25 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>
	40	0.34 $\pm$ 0.03 <sup>4)</sup>

甚光滑,但没有模型组变化明显。

镜下观察肺组织,正常组肺泡结构完整,肺血管管壁无增厚,支气管黏膜结构基本完整,上皮细胞排列均匀整齐,无变性、坏死,管壁各层无炎性细胞浸润、无纤维组织增生。模型组细支气管管壁上皮有多处脱落,黏液下层存在黏液腺增生,管壁各层有大量炎细胞浸润,管腔内有较多渗出物,部分细支气管

周围可见肺大泡,与之伴行的肺血管可见管壁增厚,局部肺间质增厚,局限性肺不张;高剂量组肺间质增厚比较模型组减轻;与模型组比较,中剂量组病理学改变较轻,细支气管黏膜破坏较轻浅,上皮变性及坏死不明显,管腔内渗出物少,肺泡内少量巨噬细胞、部分肺泡扩张,少量炎细胞浸润,血管管壁增厚不明显;低剂量组病理学变化接近模型组。见图 1。



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(图 2~4 同)

图 1 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺血管组织结构的影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of modified Erchentang on pulmonary vasculature in COPD rats(HE, ×200)

**3.5 对大鼠肺血管厚度的影响** COPD 模型组中肺小动脉的内皮细胞胞质小泡增多、肺血管内皮细胞胞核的固缩明显、内质网也显著扩张,模型组 WT%, WA% 的值显著增大( $P < 0.01$ ),表明模型组大鼠肺小动脉管壁厚度显著增加、管壁面积显著增大;各治疗组 WT%, WA% 的值均程度不等的降低( $P < 0.01$ ),表明经二陈汤加味治疗后,肺小动脉管壁厚度及管壁面积均有程度不等的改善;其中以二陈汤加味中剂量组降低显著,提示二陈汤加味方可通过阻止肺血管的管壁增厚及管腔狭窄,阻止和延缓 COPD 的发病进程。见表 4。

表 4 二陈汤加味对 COPD 大鼠肺血管厚度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of modified Erchentang on pulmonary vascular thickness in COPD rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ ) %

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	WT	WA
正常	10	-	23.80 ± 2.89	43.97 ± 2.59
模型	8	-	48.79 ± 6.01 <sup>1,3)</sup>	78.75 ± 6.96 <sup>1,3)</sup>
二陈汤加味	9	10	37.37 ± 3.12	66.94 ± 1.86
	10	20	29.72 ± 2.54 <sup>3)</sup>	54.90 ± 2.64 <sup>3)</sup>
	10	40	37.66 ± 4.01	62.46 ± 5.12

**3.6 对大鼠肺组织中 VEGF, VEGFR2, ET-1 蛋白表达的影响** 正常组 VEGF, VEGFR2 可出现有较浅阳性显色,模型组 VEGF, VEGFR2 可见阳性显色为棕黄色染色,其中 VEGF 的阳性染色主要是支气管上皮、血管平滑肌细胞、浸润的炎性细胞、巨噬细胞以及血管内皮细胞。而在支气管上皮细胞、毛细血管内皮细胞和少量血管平滑肌细胞中发现 VEGFR2 阳性表达。ET-1 阳性表达表现为镜下细胞浆中呈现出棕黄色颗粒,模型组的表达部位在肺泡壁的毛细血管内皮细胞胞浆和上皮细胞,正常组肺血管表达呈阴性或者仅在肺泡壁内皮细胞中有弱阳性表达。见图 2~4。

#### 4 讨论

COPD 可以依据其咳嗽、咯痰、胸闷等临床症状,而归属于中医“肺胀”“咳嗽”“喘证”等范畴,病机以肺气虚为本,以痰气交阻于肺为标,本虚标实。二陈汤作为祛痰剂的代表方,以燥湿化痰,理气和中功效著称,方中姜半夏燥湿化痰、和胃降逆,姜制之后更适于脾虚痰盛及寒痰咳逆;陈皮理气健脾,茯苓健脾渗湿以助化痰,甘草健脾和中、润肺止咳、调和诸药。二陈汤加味方是在二陈汤的药味基础上,

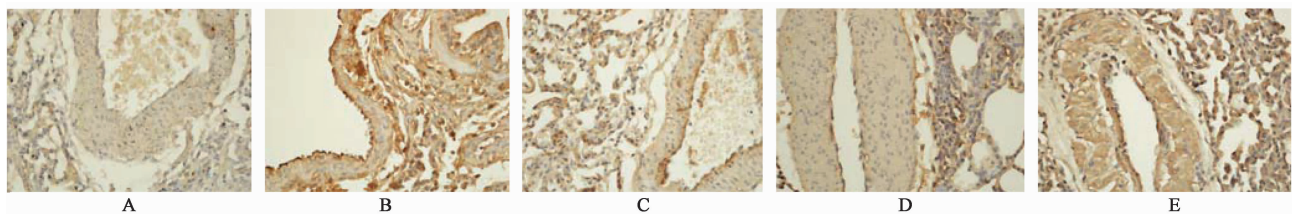


图 2 二陈汤加味对大鼠肺组织中 VEGF 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

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

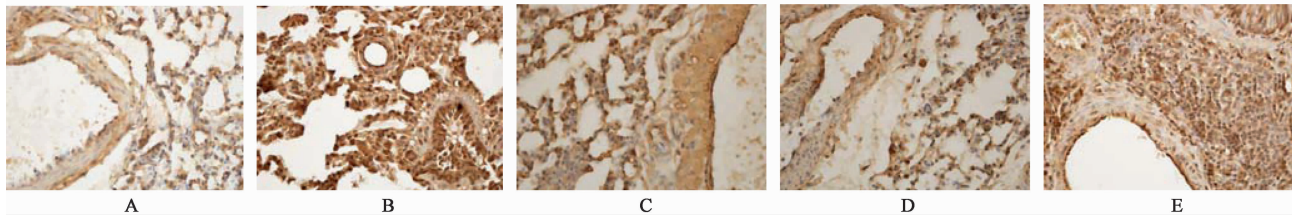


图 3 二陈汤加味对大鼠肺组织中 VEGFR2 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of modified Erchentang on expression of VEGFR2 in lung tissue of rats (IHC, ×400)

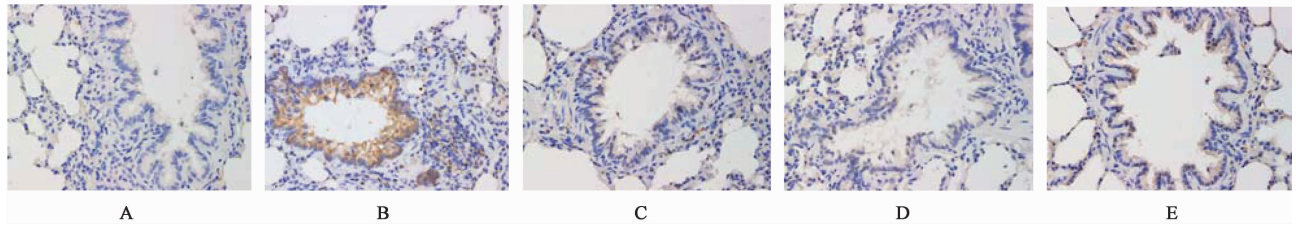


图 4 二陈汤加味对大鼠肺组织中 ET-1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Erchentang on expression of ET-1 in lung tissue of rats (IHC, ×400)

再加蜜炙麻黄、炒苦杏仁以宣降肺气、止咳平喘,加葶苈子以泻肺降逆,加党参、白术、山药以健脾补肺,寓培土生金之意;又加干姜温肺祛寒,地龙通络祛瘀。诸药并用,燥湿化痰、止咳平喘通络,以使肺气得宣,兼健脾固肾,以培护根本。本课题组基于 COPD 肺虚痰阻的病机组方,临床应用时常根据患者肺虚及痰阻的侧重不同而调整方中具体药味用量,但总以二陈汤为基础进行加减。本次实验中组方为临床加减变化时的基本方,已在前期做了大量临床观察证实疗效显著,但其中治疗的作用机制仍待现代研究证实。

COPD 是以肺实质和小气道结构改变导致气流的循环运行障碍为主要特征,常伴有血管重构,而炎症反应是导致 COPD 气道重塑及血管重构的关键机制之一,在 COPD 的发生发展过程中起着重要作用,多种细胞因子参与 COPD 的炎症反应过程<sup>[19]</sup>。炎症可激活肺血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞以及巨噬细胞、单核和 T、B 淋巴细胞等各种炎症细胞,释放大量的细胞因子如血管 ET-1, VEGF 等,作用于血管内皮细胞和血管平滑肌细胞,促进其增殖分裂,使细胞外基质沉积加快,引起血管管壁重塑和肺动脉高压,最终导致肺源性心脏病<sup>[20]</sup>。VEGF 是一种关键的血管内皮细胞丝裂原和通透因子,与 COPD 肺血管重构关系密切,吸烟、低氧、炎性因子均能刺激 VEGF 的分泌。VEGF 可通过激活血管平滑肌细胞内的活性氧(ROS)信号及促进 NF- $\kappa$ B 转录,致使血管平滑肌细胞迁移,参与肺血管重

构<sup>[21-22]</sup>。ET-1 属于内源性血管的收缩因子<sup>[23]</sup>,可促使血管的平滑肌增殖和血管强烈收缩,而 ET-1 发挥作用最敏感靶器官、以及合成、代谢的主要场所都在肺<sup>[24]</sup>,因此 ET-1 在呼吸系统疾病的发病中尤为重要。在缺氧、吸烟以及炎症的刺激下,ET-1 的表达增多,同时因为内皮细胞和肺泡壁的伤害,ET-1 灭活抑制,使 ET-1 在肺组织中表达增多<sup>[25]</sup>。肺内 ET-1 的升高可直接作用血管的平滑肌细胞,引起血管的收缩增强,且因为 ET-1 属具有促进细胞发生增殖的生长因子,也能促使平滑肌细胞的增殖肥厚,出现管腔狭窄和管壁增厚,导致肺血管重构。ET-1 同样属机体全身重要炎症标志之一<sup>[26]</sup>,COPD 长期慢性炎症、缺氧等可使 ET-1 分泌增加,清除、代谢能力减弱,促使炎症因子表达和释放增多,肺损害加剧<sup>[27]</sup>。故而,ET-1 在 COPD 的肺血管平滑肌细胞增殖和肺血管结构重建中起着重要的作用<sup>[28-29]</sup>。本研究证实,二陈汤加味方可能通过促进 IL-4 的合成与分泌,升高 COPD 大鼠血清、肺组织匀浆液和 BALF 中 IL-4 的含量,从而对抗 COPD 大鼠的肺组织炎症;通过降低大鼠肺组织中 ET-1 mRNA 的表达,从而阻断部分炎症级联反应;通过降低大鼠肺组织中的 VEGF, VEGFR2, ET-1 的蛋白表达,从而抑制血管内皮细胞和血管平滑肌细胞的过度增殖分裂,使细胞外基质沉积减缓,减轻 COPD 大鼠的肺组织重构。在对肺组织病理形态的观察中,与模型组比较,二陈汤加味中、高剂量组大鼠肺组织炎性改变有所减轻,佐证其抗炎及减轻肺组织重构以保护肺组

织的作用。

二陈汤加味治疗 COPD 已在前期的临床应用中表现出了减轻咳嗽、咯痰、气喘、胸闷等显著疗效,提示其对 COPD 的治疗作用是多方面的。本研究证实二陈汤加味可能通过促进 IL-4 的合成与分泌,降低 COPD 大鼠血清、肺组织匀浆液及 BALF 中 IL-1 $\beta$  的含量,降低大鼠肺组织 ET-1 mRNA 水平,及大鼠肺组织中的 VEGF, VEGFR2 蛋白表达,从而对抗 COPD 大鼠的肺组织炎症,减轻 COPD 大鼠的肺内组织重构,肺组织病理形态也予以证实。本课题组前期研究发现二陈汤加味对 COPD 的治疗作用在对氧化应激、蛋白酶/抗蛋白酶失衡及免疫失衡的干预方面均有体现<sup>[30-35]</sup>,对于二陈汤加味治疗 COPD 的机制有待进一步更深入全面的研究。

[参考文献]

[1] 肖建,杜春玲. 慢性阻塞性肺疾病病因及发病机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3191-3194.

[2] Rab A, Rowe S M, Raju S V, et al. Cigarette smoke and CFTR: implications in the pathogenesis of COPD[J]. Am J Physiol, 2013, 305(8): 530-541.

[3] 何飞,沈亚青,徐俭朴,等. 保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺血管重构的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(3): 340-344.

[4] Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD[J]. Clin Sci, 2014, 126(4): 253-256.

[5] 牛欢,丁毅鹏. VEGF 在 COPD 发病机制中的研究进展[J]. 海南医学, 2015, 26(8): 1183-1186.

[6] 谢文英,尚立芝,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素-8 和白细胞介素-18 及炎细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(4): 448-451.

[7] 谢文英,尚立芝,潘晓丽,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能、血气指标及病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 117-122.

[8] 谢文英,司春婴,尚立芝. 爱罗咳喘宁对老年 COPD 急性加重期痰湿阻肺证患者血清中细胞因子及肺功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 143-146.

[9] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠肺组织炎症因子及氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 168-171.

[10] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠气道水通道蛋白 5 和黏蛋白 5AC 基因表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(22): 127-138.

[11] 张良芝,谢文英,常学辉. 爱罗咳喘宁口服液对慢性支气管炎大鼠模型 LTb4、IL-8 表达的影响[J]. 中医学报, 2014, 29(9): 1267-1268.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 张伟,宫静,张靖轩,等. 一种肺脾两虚型慢阻肺动物模型的建立[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(1): 142-143.

[15] 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.

[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- $\alpha$ 、巨噬细胞炎性蛋白-2、髓过氧化物酶、炎性细胞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] 李杰,龚民,崔永,等. 白介素 4 通过调节巨噬细胞分化促进野百合碱诱导大鼠肺动脉高压模型的肺血管重塑[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(17): 1399-1402.

[20] 王会娟. 全身炎症反应对慢性阻塞性肺疾病气道、肺血管重构的影响[D]. 桂林:桂林医学院, 2012.

[21] 王璐,宋康,陈芳. VEGF 与 COPD 气道重塑的相关研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(3): 283-285.

[22] Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy[J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34: 1785-1788.

[23] 郭瑛,李燕芹,刘斌. 血管内皮功能变化与慢性阻塞性肺疾病的关系[J]. 上海交通大学学报, 2010, 30(9): 1152-1155.

[24] Tudor R M, Flook B E, Voelkel N F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide[J]. J Clin Invest, 1995, 95(4): 1798-807.

[25] Levy A P, Levy N S, Goldberg M A. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia[J]. J Bio Chem, 1996, 271(5): 2746.

[26] 崔紫阳,戈艳蕾,李丽蕊,等. 肺气肿型与非肺气肿型 COPD 急性加重期患者血浆 periostin、TNF- $\alpha$ 、ET-1 水平变化及其意义[J]. 山东医药, 2017, 57(39): 61-63.

- [27] 封珊,王智勇. 内皮素 1 在急性呼吸窘迫综合征炎症反应中的作用[J]. 国际呼吸杂志,2008,28(23):1468-1472.
- [28] 张晓慧. 炎性细胞因子水平检测对慢性阻塞性肺疾病的临床意义[J]. 海南医学院学报,2016,22(3):240-242.
- [29] 郑晓可. 慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压患者血清 C-反应蛋白和内皮素-1 水平测定及临床意义研究[J]. 中国全科医学,2012,15(25):2899-2901.
- [30] 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 $\alpha$  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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 陈四清,尚立芝,谢文英,等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠转化生长因子- $\beta$ -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):178-184.
- [35] 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 $\gamma$  信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):26-33.

[责任编辑 孙丛丛]