



(扫描二维码查看原文)

· 中西医结合研究 ·

基于核转录因子 κB 信号通路探讨益气固表丸治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效研究

罗建江¹, 张艳丽¹, 刘珊²

【摘要】 背景 慢性阻塞性肺疾病(COPD)发病率高且严重影响患者的生活质量, 益气固表丸治疗 COPD 患者具有较好的疗效, 但其具体作用机制目前尚未明确。目的 探讨基于核转录因子 κB (NF- κB) 信号通路的益气固表丸治疗 COPD 的疗效, 以期对益气固表丸治疗 COPD 提供科学依据。方法 本实验时间为 2017 年 7 月—2018 年 6 月, 选取鼠龄为 8 周的 SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 按照随机数字表法分为空白对照组、模型组、益气固表丸高剂量组、益气固表丸低剂量组, 每组 12 只。适应性喂养 1 周后, 除空白对照组外的大鼠均建立 COPD 模型。益气固表丸高剂量组给予益气固表丸 200 丸进行治疗, 益气固表丸低剂量组给予益气固表丸 100 丸进行治疗, 持续治疗 14 d; 空白对照组和模型组大鼠使用相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液和灌胃频率处理。观察大鼠肺组织病理变化情况。比较四组大鼠血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 (IL)-6 水平和 RelA (p65)、NF- κB 1 (p53) 基因相对表达量及 I $\kappa B\alpha$ 、p-I $\kappa B\alpha$ 蛋白相对表达量。结果 (1) HE 染色结果显示, 空白对照组大鼠肺组织大体结构基本正常; 模型组大鼠肺组织肺泡壁增生、增厚, 伴细胞增大、增多, 间质较多慢性炎症细胞浸润, 部分肺泡萎缩, 部分肺泡扩张, 支气管上皮细胞部分增生及缺损, 黏膜下大量慢性炎症细胞浸润, 较多出血、坏死区; 与模型组相比, 益气固表丸低剂量组大鼠肺组织病改变改善不明显; 与模型组相比, 益气固表丸高剂量组大鼠肺泡增生、增厚及间质炎症细胞浸润程度均有所改善, 肺泡萎缩及肺泡壁断裂、扩张程度均减轻, 支气管病变有所好转。(2) 模型组、益气固表丸低剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平及益气固表丸高剂量组血清 TNF- α 水平高于空白对照组 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平低于模型组及益气固表丸低剂量组 ($P < 0.05$)。 (3) 模型组、益气固表丸低剂量组大鼠 RelA (p65)、NF- κB 1 (p53) 基因相对表达量高于空白对照组 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠 RelA (p65)、NF- κB 1 (p53) 基因相对表达量低于模型组, RelA (p65) 基因相对表达量低于益气固表丸低剂量组 ($P < 0.05$)。 (4) 模型组、益气固表丸低剂量组 p-I $\kappa B\alpha$ 蛋白相对表达量高于空白对照组 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠 p-I $\kappa B\alpha$ 蛋白相对表达量低于模型组及益气固表丸低剂量组 ($P < 0.05$)。结论 高剂量益气固表丸可通过调控 COPD 大鼠体内的 NF- κB 信号通路及其下游 RelA (p65) 基因相对表达量、p-I $\kappa B\alpha$ 蛋白相对表达量来降低炎症细胞水平, 进而减轻气道炎症反应。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; 益气固表丸; NF- κB 信号通路; 大鼠

【中图分类号】 R 563.9 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2021.00.124

罗建江, 张艳丽, 刘珊. 基于核转录因子 κB 信号通路探讨益气固表丸治疗慢性阻塞性肺疾病的疗效研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29 (6): 87-92, 98. [www.syxnf.net]

LUO J J, ZHANG Y L, LIU S. Effect of Yiqigubiao pill on chronic obstructive pulmonary disease based on NF- κB signal pathway [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2021, 29 (6): 87-92, 98.

Effect of Yiqigubiao Pill on Chronic Obstructive Pulmonary Disease Based on NF- κB Signal Pathway LUO Jianjiang¹, ZHANG Yanli¹, LIU Shan²

1. Department of Respiration, Institute of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830000, China

2. Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: ZHANG Yanli, E-mail: 171179265@qq.com

【Abstract】 **Background** The incidence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is high and seriously impact quality of life of patients. Yiqigubiao pill has a good therapeutic effect, but the specific mechanism is not clear at present.

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2017D01C169)

1.830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学附属中医医院呼吸科 2.830000 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学

通信作者: 张艳丽, E-mail: 171179265@qq.com

Objective To explore the effect of Yiqigubiao pill on COPD based on nuclear transcription factor κB (NF- κB) signal pathway, in order to provide scientific basis for treating COPD with Yiqigubiao pill. **Methods** The experiment time was from July 2017 to June 2018, 48 SPF male SD rats aged 8 weeks were selected and divided into blank control group, model group, high-dose group and low-dose group according to random number table method, 12 rats in each group. After adapted feeding for 1 week, all rats was established COPD model except the rats in blank control group. The high-dose group was treated with Yiqigubiao pill 200 pills, while the low-dose group was treated with Yiqigubiao pill 100 pills, both groups were treated for 14 days; and rats in the blank control group and the model group were treated with the same dose of 0.9% sodium chloride solution and gastric perfusion frequency. The pathological changes of lung tissue in rats were observed. Serum tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-6 levels and relative expression of RelA (p65), NF- κB 1 (p53) gene and I $\kappa B\alpha$, p-I $\kappa B\alpha$ protein were compared in the four groups. **Results** (1) Hematoxylin-eosin staining showed that, the general structure of lung tissue in blank control group was basically normal; in model group, the alveolar wall of lung tissue proliferated and thickened, accompanied by enlargement and increase of cells, infiltration of chronic inflammatory cells in interstitial tissue, atrophy of partial alveoli, expansion of partial alveoli, partial proliferation and defect of bronchial epithelial cells, infiltration of a large number of chronic inflammatory cells under mucosa, and more bleeding and necrosis areas. Compared with model group, the low-dose group had no significant difference in pathological changes, and the alveolar hyperplasia, thickening and interstitial inflammatory cell infiltration in the high-dose group were improved, and the alveolar atrophy, alveolar wall rupture and expansion were reduced, and the bronchial lesions were improved. (2) The serum levels of TNF- α , IL-6 in model group and low-dose group and serum TNF- α level in high-dose group were higher than those in blank control group ($P < 0.05$); serum levels of TNF- α , IL-6 in high-dose group were lower than those in model group and low-dose group ($P < 0.05$). (3) Relative gene expression of RelA (p65), NF- κB 1 (p53) in model group and low-dose group were higher than those in blank control group ($P < 0.05$); relative gene expression of RelA (p65), NF- κB 1 (p53) in high-dose group were lower than those in model group, relative gene expression of RelA (p65) was lower than that in low-dose group ($P < 0.05$). (4) Relative protein expression of p-I $\kappa B\alpha$ in model group and low-dose group was higher than that in blank control group ($P < 0.05$); relative protein expression of p-I $\kappa B\alpha$ in high-dose group was lower than that in model group and low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** High-dose Yiqigubiao pill can reduce the level of inflammatory cells by regulating the relative expression of NF- κB signal pathway and its downstream RelA (p65) gene and p-I $\kappa B\alpha$ protein in COPD rats, and then alleviate the airway inflammatory reaction.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; Yiqigubiao pill; NF- κB signal pathway; Rats

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是临床常见的一种慢性呼吸系统疾病, 以气道、肺实质和肺血管慢性炎症为主要特征, 患病率较高, 且病情易反复加重, 严重影响患者的劳动能力和生活质量^[1-2]。炎症是 COPD 的主要机制^[3]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 可黏附于支气管黏膜的上皮细胞, 进而刺激中性粒细胞及单核细胞释放白介素 (interleukin, IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 等细胞因子, 激活信号通路释放各种自由基、水解酶等, 进而导致肺损伤, 造成炎症级联反应^[4-5]。既往研究发现, 中药复方制剂——益气固表丸可有效降低 COPD 患者 IL-6、TNF- α 水平^[6]。核因子激活的核转录因子 κB (nuclear transcription factor κB , NF- κB) 是 IL-6 和 TNF- α 基因的调控信号途径, 但 LPS 是如何通过 NF- κB 信号通路来诱导 COPD 尚不明确。基于此, 本研究旨在探讨益气固表丸通过阻断 LPS/NF- κB 信号通路来抑制 COPD 的分子机制, 以期对益气固表丸治疗 COPD 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验时间 2017 年 7 月—2018 年 6 月。

1.2 实验动物 本实验选取了 8 周龄的 SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只, 平均体质量 (190 ± 10) g, 均于 2017 年 7 月购于新疆医科大学实验动物中心, 动物质量合格证书: SCXK (新) 2016-0002。饲养环境: 模拟自然昼夜条件, 室温 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50%~65%, 环境安静, 定时换窝。通过气管滴注弹性蛋白酶、LPS 以建立 COPD 大鼠模型, 并通过检查其炎症因子和肺功能进一步确定建模是否成功。按照随机数字表法将所有 COPD 大鼠分为空白对照组、模型组、益气固表丸高剂量组、益气固表丸低剂量组, 每组 12 只。本研究经新疆医科大学伦理委员会审核批准。

1.3 试剂与仪器 试剂: 益气固表丸 (新疆制药厂生产, 生产批号: 20121212) 购于新疆医科大学附属中医医院中心药房; LPS 购于美国 Sigma 公司; IL-6、TNF- α 均采用酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测, 试剂盒购于上海联科生物医药有限公司; 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA 反转录试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司; I $\kappa B\alpha$ 、p-I $\kappa B\alpha$ 抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司。仪器: 多功能酶标仪购于 Bio-RadBio-Rad (伯乐生命医学产品) 有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪购于

Bio-Rad 有限公司; 化学发光成像仪系统 (Chemiscope 3000) 购于上海勤翔科学仪器有限公司。

1.4 模型制备及治疗 大鼠适应性喂养 1 周后, 气道滴注弹性蛋白酶联合 LPS 以建立 COPD 大鼠模型^[7], 具体方法如下: 大鼠均予以 10% 水合氯醛进行腹腔麻醉, 而后模型组、益气固表丸高剂量组、益气固表丸低剂量组大鼠均于气道内给予猪胰弹性蛋白酶 4.2 U, 1 周后再气道滴注 LPS 100 μ l, 1 次/10 d, 持续给药 10 次。空白对照组大鼠仅于气道内喷相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液。

确定建模成功后, 益气固表丸高剂量组大鼠给予益气固表丸 200 丸 +0.9% 氯化钠溶液 500 ml 进行治疗; 益气固表丸低剂量组大鼠给予益气固表丸 100 丸 +0.9% 氯化钠溶液 500 ml 进行治疗, 大鼠均按照 1.5 ml : 100 g 的比例进行灌胃, 2 次/d, 持续治疗 14 d; 空白对照组和模型组大鼠则给予相同剂量的 0.9% 氯化钠溶液, 且采用相同的灌胃频率处理。

1.5 观察指标

1.5.1 肺组织病理变化情况 观察大鼠肺组织病理变化情况。建模后第 2 天, 四组大鼠均予以 10% 水合氯醛进行腹腔麻醉, 而后迅速开胸剥离肺组织, 在垂直于支气管的左侧肺矢状面最大周径处取厚约 5 mm 的肺组织, 用 10% 甲醛溶液固定, 制作石蜡组织切片, 用苏木精-伊红 (HE) 染色后在显微镜下观察四组大鼠肺组织病理变化情况。

1.5.2 血清 TNF- α 、IL-6 水平 比较四组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平。抽取四组大鼠血液, 4 000 r/min 离心 10 min (离心半径 6 cm), 取上清液, 采用 ELISA 检测血清 TNF- α 、IL-6 水平, 具体操作严格按试剂盒说明书进行, 具体操作步骤如下: (1) 准备好所有需要的试剂及工作浓度标准品。(2) 将不需要的板条拆卸下来, 放回装有干燥剂的铝箔袋, 重新封口。(3) 加入 300 μ l 洗液静置、浸泡 30 s, 弃掉洗液后, 在吸水纸拍干微孔板; 洗板完成后, 立即使用微孔板, 不要让微孔板干燥。(4) 标准孔加入 100 μ l 2 倍比稀释的标准品, 空白孔加入 100 μ l 标准品稀释液。(5) 样本孔加入 100 μ l 血清样本。(6) 每孔加入 50 μ l 稀释的检测抗体。保证步骤 4、5、6 连续加样, 不间断。加样过程在 15 min 内完成。(7) 使用封板膜封板。300 r/min 振荡, 室温孵育 2 h。(8) 弃掉液体, 每孔加入 300 μ l 洗液洗板, 洗涤 6 次。每次洗板在吸水纸上拍干。(9) 每孔加入 100 μ l 稀释的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素。(10) 使用新的封板膜封板。300 r/min 振荡, 室温孵育 45 min。(11) 重复步骤 8。(12) 每孔加入 100 μ l TMB 底物显色试剂盒, 避光, 室温孵育 5~30 min。(13) 每孔加入 100 μ l 终止液。(14) 在 30 min 内, 使用酶标仪进行双波长检测, 测定 450 nm 最大吸收波长和 570 nm 参考波长下的 OD 值。校准后 OD 值为 450 nm 处 OD 值与 570 nm 处 OD 值的差。

1.5.3 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量 比较四组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量。麻醉处死大鼠后, 快速采集肺组织, 组织样本经液氮研磨后取 100 mg 置于离心管中, 加入 1 ml TRIZOL 将组织吹打、混匀, 室温放置 15 min 以上; 而后加入 200 μ l 的氯仿, 颠倒

混匀后室温放置 2~5 min, 再在 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 r/min 的转速离心处理 15 min (离心半径 10 cm), 而后取上清液置于一个新的离心管中, 加入等体积的异丙醇混匀, 并于 -20 $^{\circ}$ C 环境下静置 30 min 以上, 再在 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 r/min 的转速离心处理 15 min (离心半径 10 cm), 倒掉上清液; 加入 75% 乙醇, 使沉淀漂浮起来洗涤; 再在 4 $^{\circ}$ C 环境下以 12 000 r/min 的转速离心处理 15 min (离心半径 10 cm), 倒掉上清液, 吸尽液体, 晾干; 用无 RNA、DNA 酶的水溶解沉淀。进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 150 V, 10 min, 电泳完毕后应用凝胶成像仪进行观察。剩余 RNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 环境下保存或直接反转录成 cDNA, 再进行实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应 (rRT-PCR), 实时荧光定量 PCR 引物序列见表 1, 观察四组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	序列	引物大小 (bp)
RelA (p65)	正向引物: 5'-TCGCCACCGGATTGAAGAAA-3' 反向引物: 5'-CTCGGAAGGCACAGCAATA-3'	128
NF- κ B1 (p53)	正向引物: 5'-TGAGTCCCGCCCTTCTAA-3' 反向引物: 5'-GGCTGCCTGGATCACTTCAAT-3'	125
β -actin	正向引物: 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3' 反向引物: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	150

注: NF- κ B= 核转录因子 κ B

1.5.4 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达量 采用 Western blotting 法检测四组大鼠 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达量。麻醉处死大鼠后, 快速提取肺组织, 匀浆, 经液氮研磨后取约 100 mg 的肺组织加入到预冷的 1.5 ml 离心管中, 然后加入 400 μ l RIPA 裂解液 (已加入蛋白酶抑制剂和广谱磷酸酶抑制剂) 充分混匀, 在 4 $^{\circ}$ C 环境下放置 60 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min (离心半径 10 cm), 取上清液, 提取白蛋白。用蛋白质定量法测定蛋白浓度。将已电泳后的聚丙烯酰胺凝胶用考马斯亮蓝染色 60 min。蛋白样本中加入适量十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 试剂 loading buffer (含 β -巯基乙醇), 100 $^{\circ}$ C 沸水中加热 5 min, 使蛋白充分变性, 12 000 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm), 取上清液备用。配制 12%、15% 分离胶与 5% 浓缩胶, 依次进行制胶、加样、电泳、转膜、一抗抚育、二抗抚育、曝光, 显影、定影。结果扫描后, 经光密度分析系统计算灰度值。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组大鼠肺组织病理变化情况 HE 染色结果显示, 空白对照组大鼠肺组织大体结构基本正常; 模型组大鼠肺组织肺泡壁增生、增厚, 伴细胞增大、增多, 间质炎症细胞浸润, 部分肺泡萎缩或扩张, 支气管上皮细胞部分增生及缺损, 黏膜下大量慢性炎症细胞浸润, 有较多出血、坏死区; 与模型

组相比, 益气固表丸低剂量组大鼠肺组织改善并不明显, 而益气固表丸高剂量组大鼠肺泡增生、增厚, 支气管病变有所好转, 见图 1。

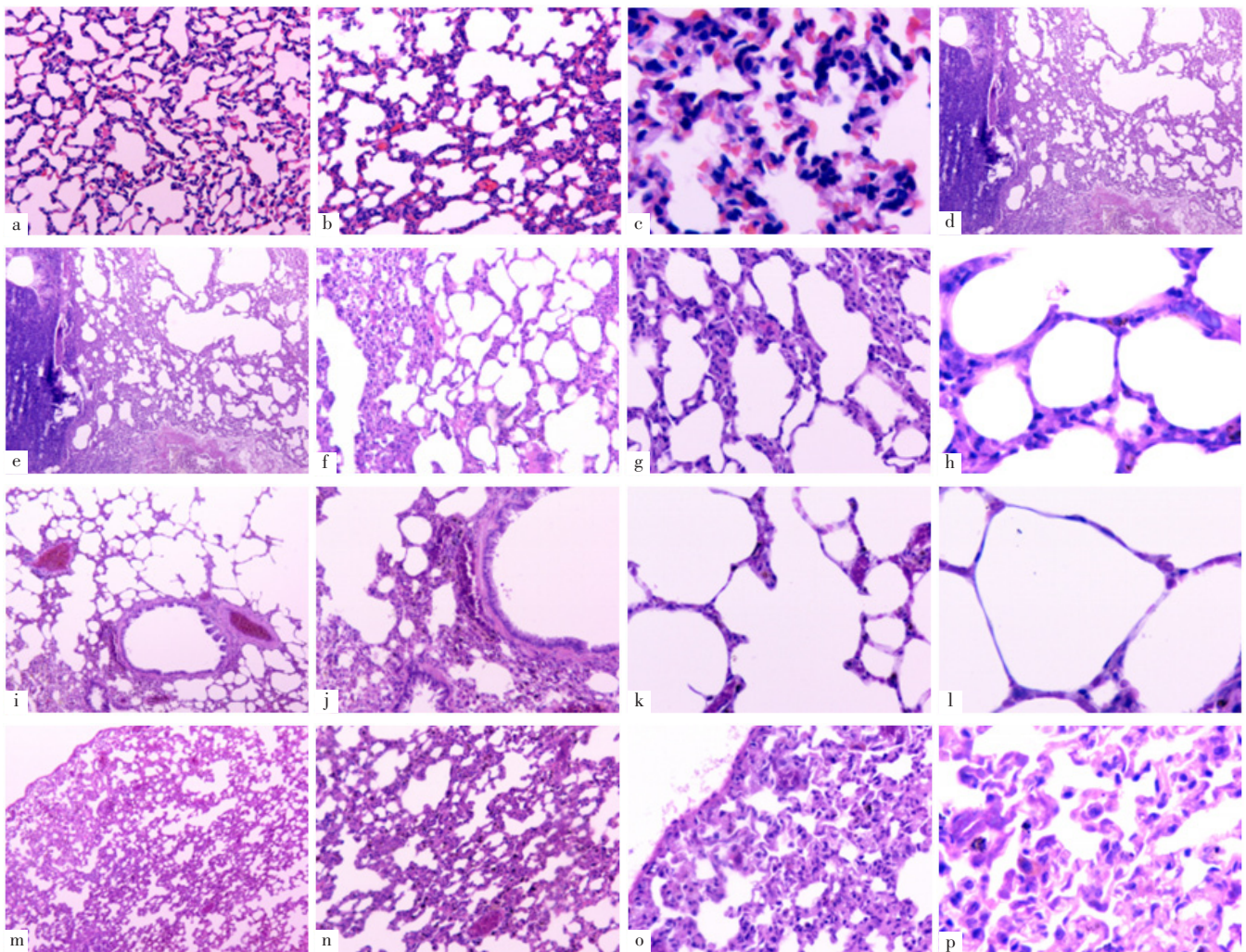
2.2 四组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平比较 四组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组、益气固表丸低剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平及益气固表丸高剂量组血清 TNF- α 水平高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平低于模型组及益气固表丸低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 四组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量比较 四组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组、益气固表丸低剂量组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因

表 2 四组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=12$)
Table 2 Comparison of serum levels of TNF- α , IL-6 in the four groups of rats

组别	TNF- α	IL-6
空白对照组	1.52 \pm 1.09	5.02 \pm 3.43
模型组	9.13 \pm 1.66 ^a	37.64 \pm 13.06 ^a
益气固表丸低剂量组	9.19 \pm 1.61 ^a	24.17 \pm 8.31 ^a
益气固表丸高剂量组	4.14 \pm 1.78 ^{abc}	5.17 \pm 3.94 ^{bc}
F 值	35.923	22.994
P 值	< 0.001	< 0.001

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与益气固表丸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$; TNF- α = 肿瘤坏死因子 α , IL-6 = 白介素 6



注: a~d 为空白对照组大鼠肺组织变化, 镜下放大倍数分别为 40 \times 、100 \times 、200 \times 、400 \times , 显示肺组织大体结构基本正常; e~h 为模型组大鼠肺组织变化, 镜下放大倍数分别为 40 \times 、100 \times 、200 \times 、400 \times , 显示肺组织肺泡壁增生、增厚, 伴细胞增大、增多, 间质炎症细胞浸润, 部分肺泡萎缩或扩张, 支气管上皮细胞部分增生及缺损, 黏膜下大量慢性炎症细胞浸润, 有较多出血、坏死区; i~l 为益气固表丸低剂量组大鼠肺组织变化, 镜下放大倍数分别为 40 \times 、100 \times 、200 \times 、400 \times , 显示其与模型组大鼠肺组织病变无明显差异; m~p 为益气固表丸高剂量组大鼠肺组织变化, 镜下放大倍数分别为 40 \times 、100 \times 、200 \times 、400 \times , 显示肺组织肺泡增生、增厚, 支气管病变有所好转

图 1 四组大鼠肺组织病理变化情况
Figure 1 Pathological changes of lung tissue in the four groups of rats

相对表达量高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量低于模型组, RelA (p65) 基因相对表达量低于益气固表丸低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 四组大鼠 RelA (p65)、NF- κ B1 (p53) 基因相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 3 Comparison of the gene relative expression of RelA (p65) and NF- κ B1 (p53) in the four groups of rats

组别	RelA (p65)	NF- κ B1 (p53)
空白对照组	1.02 \pm 0.22	1.01 \pm 0.11
模型组	1.66 \pm 0.14 ^a	1.76 \pm 0.19 ^a
益气固表丸低剂量组	1.48 \pm 0.25 ^a	1.59 \pm 0.31 ^a
益气固表丸高剂量组	1.21 \pm 0.21 ^{bc}	1.19 \pm 0.16 ^b
F 值	10.003	17.249
P 值	< 0.001	< 0.001

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与益气固表丸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

2.4 四组大鼠 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达量比较
四组大鼠 I κ B α 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。四组大鼠 p-I κ B α 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组、益气固表丸低剂量组大鼠 p-I κ B α 蛋白相对表达量高于空白对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 益气固表丸高剂量组大鼠 p-I κ B α 蛋白相对表达量低于模型组及益气固表丸低剂量组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4、图 2。

表 4 四组大鼠 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 4 Comparison of the protein relative expression of I κ B α and p-I κ B α in the four groups of rats

组别	I κ B α 蛋白相对表达量	p-I κ B α 蛋白相对表达量
空白对照组	0.54 \pm 0.04	0.31 \pm 0.07
模型组	0.56 \pm 0.01	0.74 \pm 0.04 ^a
益气固表丸低剂量组	0.56 \pm 0.02	0.63 \pm 0.10 ^a
益气固表丸高剂量组	0.54 \pm 0.04	0.43 \pm 0.05 ^{bc}
F 值	0.794	24.935
P 值	0.530	< 0.001

注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与益气固表丸低剂量组比较, ^c $P < 0.05$

3 讨论

COPD 气道慢性炎症发生的中心环节是炎症细胞局部活化、激活以及大量相关炎性递质的释放^[8], 长期反复发作可导致患者肺损伤及肺功能恶化, 最终引发呼吸衰竭甚至死亡。研究表明, 西药虽可控制 COPD 患者现有症状、缓解急性加重症状, 但均不能逆转肺损伤^[9], 目前传统中医药治疗 COPD 逐渐得到重视。

中医学理论认为, COPD 属“肺胀”范畴。COPD 是本虚

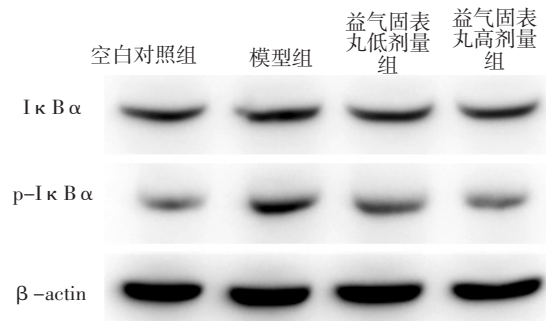


图 2 Western blotting 法检测 I κ B α 、p-I κ B α 蛋白相对表达量的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Figure 2 SDS-PAGE of relative expression of I κ B α and p-I κ B α protein detected by Western blotting

标实, 日久肺气亏虚, 病及脾肾, 故益气固表、健脾燥湿是其主要治疗原则。本院研制的复方制剂——益气固表丸是由茯苓、陈皮、(炒)白术、法半夏、浮小麦、薏苡仁、蜜枇杷叶、黄芩、防风、紫苏子、伊贝母、党参、蜜款冬花 13 味中药构成的丸剂, 具有抗炎、抗氧化、调节机体免疫力的作用, 能有效缓解 COPD 患者喘、咳、痰、胀等不适, 减少患者急性加重, 降低再住院率^[10-11]。

COPD 的主要致病菌是革兰阴性菌^[12]。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分, 具有广泛生理活性, 可与巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞膜上的 CD14/TLR4/MD2 复合物结合并通过 MyD88/TAK1 等激活 NF- κ B 通路, 促进细胞分泌促炎因子、一氧化氮 (NO) 等多种细胞因子, 而弹性蛋白酶作用于气道弹性蛋白时可激活肺泡巨噬细胞, 引起炎性因子表达增加^[13]。本研究在建模过程中不仅对大鼠气管滴注弹性蛋白酶, 还结合 LPS 反复刺激气道产生慢性炎症反应, 从而成功建立 COPD 大鼠模型, 结果显示, 空白对照组大鼠肺组织大体结构基本正常; 模型组大鼠肺组织肺泡壁增生、增厚, 伴细胞增大、增多, 间质较多慢性炎症细胞浸润, 部分肺泡萎缩或扩张, 支气管上皮细胞部分增生及缺损, 黏膜下大量慢性炎症细胞浸润, 较多出血、坏死区, 表明 COPD 大鼠建模成功。另外, 益气固表丸低剂量组较模型组肺组织病变差异不明显; 益气固表丸高剂量组与模型组比较, 肺泡增生、增厚及间质炎症细胞浸润程度均有所改善, 肺泡萎缩及肺泡壁断裂、扩张程度均减轻, 支气管病变有所好转, 表明高剂量益气固表丸可有效减轻 COPD 大鼠肺组织损伤程度, 改善炎症细胞浸润程度。本研究结果还显示, 模型组、益气固表丸低剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平及益气固表丸高剂量组血清 TNF- α 水平高于空白对照组; 益气固表丸高剂量组大鼠血清 TNF- α 、IL-6 水平低于模型组及益气固表丸低剂量组, 表明益气固表丸高剂量治疗较低剂量可更有效地减轻 COPD 大鼠炎症反应。金晶等^[14]研究表明, 益气固表丸可抑制 JKA/STAT 通路及其下游炎症蛋白的活化与表达, 改善 COPD 大鼠肺内炎症反应。另有研究表明, 益气固表丸可改善肺脾气虚型 COPD 稳定期患者机体免疫功能^[15], 但其具体机制尚未明确。

NF- κ B 是人体重要的转录调节因子, 是由多个多肽亚

单位组成的蛋白家族^[16]。RelA (p65)、I κ B、p-I κ B皆是NF- κ B家族的重要成员。当无活化刺激信号时, RelA可与细胞质内的I κ B结合形成复合物; 支气管上皮细胞在LPS刺激下释放的炎性因子如IL-1、IL-6可激活NF- κ B通路, I κ B激酶复合物IKK可使I κ B磷酸化, 生成p-I κ B, 进而激活RelA/I κ B复合物使其分离, 游离的RelA进入细胞核内调节相关炎性因子表达^[17]。本研究结果显示, 模型组、益气固表丸低剂量组大鼠RelA (p65)、NF- κ B1 (p53)基因相对表达量高于空白对照组; 益气固表丸高剂量组大鼠RelA (p65)、NF- κ B1 (p53)基因相对表达量低于模型组, RelA (p65)基因相对表达量低于益气固表丸低剂量组; 模型组、益气固表丸低剂量组大鼠p-I κ B α 蛋白相对表达量高于空白对照组; 益气固表丸高剂量组大鼠p-I κ B α 蛋白相对表达量低于模型组及益气固表丸低剂量组, 表明益气固表丸高剂量治疗可更有效地降低COPD大鼠RelA (p65)基因相对表达量及p-I κ B α 蛋白相对表达量, 推测益气固表丸可通过抑制NF- κ B信号通路中p-I κ B α 来阻断RelA (p65)进入细胞核激活基因的转录, 减少炎性递质释放, 从而减轻炎症反应。研究表明, COPD患者IL-1、IL-6与NF- κ B基因相对表达量呈正相关, 表明NF- κ B与炎性因子可相互影响而加速局部炎症的发展^[18-19], 本研究结果与之一致。

综上所述, 高剂量益气固表丸可通过调控COPD大鼠体内的NF- κ B信号通路及其下游RelA (p65)基因相对表达量、p-I κ B α 蛋白相对表达量而降低炎性细胞水平, 进而减轻气道炎症反应。

作者贡献: 罗建江进行文章的构思与设计, 研究的实施与可行性分析, 结果分析与解释, 撰写论文, 进行论文的修订; 刘珊进行数据收集、整理、分析; 张艳丽负责文章的质量控制及审校, 并对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] MOSTAFAVI-POUR-MANSHADI S M, NADERI N, BARRECHEGUREN M, et al. Investigating fractional exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma-COPD overlap (ACO): a scoping review [J]. COPD, 2018, 15 (4): 377-391. DOI: 10.1080/15412555.2018.1485637.
- [2] ABDALRAZIK F, EL-SOROUGI W. Assessment of coronary artery diseases in COPD [J]. Egyptian Journal of Bronchology, 2018, 12 (4): 391-398. DOI: 10.4103/ejb.ejb_39_18.
- [3] NAKAMOTO K, WATANABE M, SADA M, et al. Pseudomonas aeruginosa-derived flagellin stimulates IL-6 and IL-8 production in human bronchial epithelial cells: a potential mechanism for progression and exacerbation of COPD [J]. Exp Lung Res, 2019, 45 (8): 255-266. DOI: 10.1080/01902148.2019.1665147.
- [4] 徐蒙蒙, 张妍蓓, 李锋. COPD小鼠模型的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37 (21): 1654-1658. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.21.012.
- XU M M, ZHANG Y B, LI F. Research progress of COPD mouse models [J]. International Journal of Respiration, 2017, 37 (21): 1654-1658. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2017.21.012.
- [5] CELLI B R. Targeting dyspnoea in patients with very severe COPD: practical precision medicine [J]. Respiratory, 2018, 23 (12): 1086-1087. DOI: 10.1111/resp.13359.
- [6] LI F S, ZHANG Y L, LI Z, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled superiority trial of the Yiqigubiao pill for the treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease at a stable stage [J]. Exp Ther Med, 2016, 12 (4): 2477-2488. DOI: 10.3892/etm.2016.3680.
- [7] KOBAYASHI S, FUJINAWA R, OTA F, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49 (6): 971-977. DOI: 10.1165/rmb.2013-00740C.
- [8] MOAYERI F, HSUEH Y S, CLARKE P, et al. Health state utility value in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): the challenge of heterogeneity: a systematic review and meta-analysis [J]. COPD, 2016, 13 (3): 380-398. DOI: 10.3109/15412555.2015.1092953.
- [9] 朱凌云, 吕晓东. 中西医结合治疗COPD稳定期45例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2019, 51 (11): 27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2019.11.010.
- ZHU L Y, LYU X D. A clinical study of integrated Chinese and western medicine treatment to 45 cases of COPD at the stable phase [J]. Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine, 2019, 51 (11): 27-30. DOI: 10.3969/j.issn.1672-397X.2019.11.010.
- [10] 李凤森, 徐丹, 高振, 等. 益气固表丸联合平喘敷贴膏治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24 (6): 22-26. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.06.006.
- LI F S, XU D, GAO Z, et al. Clinical study on Yiqi Gubiao pill combined with Pingchuan external application ointment for treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease at stable stage [J]. Chinese Journal of Information on Traditional Chinese Medicine, 2017, 24 (6): 22-26. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2017.06.006.
- [11] 马红霞, 罗建江. 益气固表丸对慢性阻塞性肺疾病稳定期吸烟患者外周血Th17/Treg免疫平衡的影响 [J]. 河北中医, 2018, 40 (8): 1146-1150. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2619.2018.08.006.
- MA H X, LUO J J. Effect of Yiqi Gubiao pill on Th17/Treg immune balance in peripheral blood of smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease in stable stage [J]. Hebei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 40 (8): 1146-1150. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2619.2018.08.006.
- [12] 佟玉峰, 刘文曲, 周青青. 160例慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者病原菌分布及耐药分析 [J]. 重庆医学, 2016, 45 (17): 2400-2402. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.033.
- [13] 陈文祥, 王雍立, 谢子昂, 等. 应用弹性蛋白酶诱导构建新型慢性阻塞性肺疾病合并骨质疏松症的动物模型 [J]. 中国骨伤, 2020, 33 (4): 356-362. DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.04.013.

- YANG J F, WANG H, CHAI K. Highlights of the guidelines for diagnosis and treatment of heart failure in China in 2018 [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Research, 2018, 16 (12): 1057–1060. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2018.12.001.
- [15] HOLLAND A E, SPRUIT M A, TROOSTERS T, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease [J]. Drug Discov Today: Ther Strateg, 2012, 9 (4): e131–139. DOI: 10.1016/j.ddstr.2013.11.002.
- [16] REDFIELD M M, ANSTROM K J, LEVINE J A, et al. Isosorbide mononitrate in heart failure with preserved ejection fraction [J]. N Engl J Med, 2015, 373 (24): 2314–2324. DOI: 10.1056/NEJMoa1510774.
- [17] LANGENICKEL T H, DOLE W P. Angiotensin receptor–neprilysin inhibition with LCZ696: a novel approach for the treatment of heart failure [J]. Drug Discov Today: Ther Strateg, 2012, 9 (4): e131–139. DOI: 10.1016/j.ddstr.2013.11.002.
- [18] BLOCH M J, BASILE J N. Combination angiotensin receptor blocker–neutral endopeptidase inhibitor provides additive blood pressure reduction over angiotensin receptor blocker alone [J]. J Clin Hypertens (Greenwich), 2010, 12 (10): 809–812. DOI: 10.1111/j.1751-7176.2010.00358.x.
- [19] BRAUNWALD E. The path to an angiotensin receptor antagonist–neprilysin inhibitor in the treatment of heart failure [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65 (10): 1029–1041. DOI: 10.1016/j.jacc.2015.01.033.
- [20] 金子安, 陈阳. 沙库巴曲缬沙坦治疗射血分数下降的慢性心力衰竭合并肾功能不全的临床疗效研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2020, 28 (5): 91–95. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2020.05.018.
- JIN Z A, CHEN Y. Clinical efficacy of sacubitril/valsartan in the treatment of chronic heart failure with decreased ejection fraction and renal insufficiency [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2020, 28 (5): 91–95. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2020.05.018.
- [21] ANDERSEN S, AXELSEN J B, RINGGAARD S, et al. Effects of combined angiotensin II receptor antagonism and neprilysin inhibition in experimental pulmonary hypertension and right ventricular failure [J]. Int J Cardiol, 2019, 293: 203–210. DOI: 10.1016/j.ijcard.2019.06.065.
- [22] KOBALAVA Z, KOTOVSKAYA Y, AVERKOV O, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of sacubitril/valsartan (LCZ696) in patients with heart failure and reduced ejection fraction [J]. Cardiovasc Ther, 2016, 34 (4): 191–198. DOI: 10.1111/1755-5922.12183.
- (收稿日期: 2021-02-26; 修回日期: 2021-04-14)
(本文编辑: 李越娜)

(上接第 92 页)

- CHEN W X, WANG Y L, XIE Z A, et al. Establishment of a novel mouse mode of elastase-induced chronic obstructive pulmonary disease related osteoporosis [J]. China Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2020, 33 (4): 356–362. DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2020.04.013.
- [14] 金晶, 王晶, 姚梓平, 等. 益气固表丸对慢性阻塞性肺病模型大鼠 JAK/STAT 通路影响研究 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20 (10): 1828–1833. DOI: 10.11842/wst.2018.10.019.
- JIN J, WANG J, YAO Z P, et al. Effect of yiqigubiao pill regulate inflammatory cytokines through JAK/STAT pathway in COPD rats model [J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2018, 20 (10): 1828–1833. DOI: 10.11842/wst.2018.10.019.
- [15] 金晶, 王晶, 姚梓平, 等. 益气固表丸对 COPD 稳定期患者 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41 (9): 1182–1185, 1189. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.09.030.
- JIN J, WANG J, YAO Z P, et al. Effect of Yiqi Gubiao pill to regulate the balance of Th17/treg in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2018, 41 (9): 1182–1185, 1189. DOI: 10.3969/j.issn.1009-5551.2018.09.030.
- [16] 杨柳柳, 刘小虹, 詹少锋, 等. 肺康颗粒通过 TLR4/NF- κ B 信号通路干预 COPD 大鼠炎症的相关机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29 (6): 687–692. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.06.002.
- YANG L L, LIU X H, ZHAN S F, et al. Feikang granule intervene in inflammation in rat with chronic obstructive pulmonary disease via TLR4/NF- κ B signal pathway [J]. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2018, 29 (6): 687–692. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2018.06.002.
- [17] 周伟, 庾国桢, 刘亚敏, 等. 黄芩苷通过 I κ B α /NF- κ B 通路调节 A β 25–35 诱导的 HT22 细胞凋亡 [J]. 中成药, 2019, 41 (11): 2765–2769. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.11.041.
- [18] PERES A, DORNELES G P, DIAS A S, et al. T-cell profile and systemic cytokine levels in overweight–obese patients with moderate to very–severe COPD [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2018, 247: 74–79. DOI: 10.1016/j.resp.2017.09.012.
- [19] UMI PARTAN R, HIDAYAT R. The relationship between TNF- α gene polymorphism, pro-inflammatory cytokines and bone turnover markers in COPD patients with osteoporosis [J]. J Phys: Conf Ser, 2019, 1246: 012035. DOI: 10.1088/1742-6596/1246/1/012035.
- (收稿日期: 2021-02-16; 修回日期: 2021-05-08)
(本文编辑: 李越娜)