

· 基础研究 ·

舒尼替尼、保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病合并糖尿病小鼠肺血管重构的影响

杨宏宽^{1,2} 王芳¹ 张佳颖¹ 潘俊杰¹ 童卫泉¹ 夏婷婷¹ 陈芳²

摘要 **目的** 探讨舒尼替尼、保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)合并糖尿病小鼠肺血管重构的影响及其是否通过调节低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)在肺组织的表达而发挥作用。**方法** 将40只ob/ob小鼠随机分为4组:对照组、模型组、保肺定喘汤组和舒尼替尼组,每组10只。除对照组外,各组小鼠在自制熏烟箱内被动吸烟14周,并在第1、14天于气道内滴入脂多糖。造模结束后舒尼替尼组予苹果酸舒尼替尼胶囊30 mg/(kg·d)灌胃,保肺定喘汤组予保肺定喘汤9.3 g/(kg·d)灌胃,均干预2周。于第0、14、16周检测空腹血糖水平。肺组织HE染色,观察气道重构并测量小气道基底膜单位长度的管壁面积(WAt/Pbm),肺血管重构并测量管壁厚度与血管外径比(WT%)、管壁面积与血管总面积比(WA%);Masson染色观察支气管周胶原沉积并测量小气道基底膜单位长度的胶原面积(WAc/Pbm);CD31/ α -SMA/DAPI免疫荧光染色观察肺血管平滑肌层变化。酶联免疫吸附测定法检测肺组织匀浆HIF-1 α 及VEGF含量。实时荧光定量PCR法检测肺组织HIF-1 α 、VEGF mRNA相对表达水平。**结果** 与对照组比较,模型组第16周空腹血糖水平差异无统计学意义($P > 0.05$),WAt/Pbm、WAc/Pbm、WT%及WA%均增大($P < 0.01$),肺血管平滑肌层明显增厚,肺组织HIF-1 α 、VEGF蛋白表达和mRNA表达均增加($P < 0.01$)。与模型组比较,舒尼替尼组第16周空腹血糖水平降低($P < 0.01$),保肺定喘汤组差异无统计学意义($P > 0.05$);保肺定喘汤组及舒尼替尼组WAt/Pbm、WAc/Pbm、WT%及WA%均减小($P < 0.01$, $P < 0.05$),肺血管平滑肌层重构均有所减轻,肺组织HIF-1 α 、VEGF蛋白表达和mRNA表达均减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 舒尼替尼、保肺定喘汤可通过下调肺组织HIF-1 α 、VEGF表达进而减轻COPD合并糖尿病小鼠肺血管重构。

关键词 舒尼替尼;保肺定喘汤;慢性阻塞性肺疾病;糖尿病;肺血管重构;低氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子

Effect of Sunitinib and Baofei Dingchuan Decoction on Pulmonary Vascular Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Complicating Diabetes Mice Model YANG Hong-kuan^{1,2}, WANG Fang¹, ZHANG Jia-ying¹, PAN Jun-jie¹, TONG Wei-quan¹, XIA Ting-ting¹, and CHEN Fang² 1 First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053); 2 Respiratory Physiology Laboratory, First Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310006)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Sunitinib and Baofei Dingchuan Decoction (BDD) on pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) complicating diabetes mice model, and to study if its mechanism is relevant with the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial grow factor(VEGF) in lung tissue. **Methods** Totally 40 ob/ob mice were randomly divided into 4 groups i.e., the control group, the model group, the BDD group, and the sunitinib group, 10 in each group. All the mice except the control group were exposed to cigarette smoke in a homemade box for 14 weeks. At day 1 and 14, lipopolysaccharide(LPS) was dripped into the airway

基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(No. 81302934)

作者单位:1. 浙江中医药大学第一临床医学院(杭州 310053); 2. 浙江中医药大学附属第一医院呼吸生理研究室(杭州 310006)

通讯作者:陈芳, Tel: 13867130008, E-mail: funchen@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20180719. 211

of the mice. After the model was established, mice in the sunitinib group were administered Sunitinib malate at dosage of 30 mg/(kg · d) by gastrogavage and mice in the BDD group were administered with BDD at dosage of 9.3 g/(kg · d) by gastrogavage, for consecutive 2 weeks. The levels of fasting blood glucose (FBG) was measured at week 0, 14 and 16. The airway remodeling was observed by HE staining and quantified by total bronchial wall area/basement membrane perimeter (WAt/Pbm), the pulmonary vascular remodeling was quantified by vessel wall thickness / total vascular diameter (WT%) and vessel wall area / total vascular area (WA%). The collagen deposition in peribronchus was observed by Masson staining and quantified by collagen wall area/basement membrane perimeter (WAc/Pbm), the pulmonary vascular smooth muscle layer remodeling was observed by CD31/ α -SMA/DAPI immunofluorescence staining. The protein level of HIF-1 α and VEGF in lung tissue homogenate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Relative expressions of HIF-1 α and VEGF mRNA in lung tissue were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. Results Compared with the control group, the model group showed no significant difference in level of FBG at week 16 ($P > 0.05$), WAt/Pbm, WAc/Pbm, WT% and WA% level increased ($P < 0.01$), thicker pulmonary vascular smooth muscle layer, and increased HIF-1 α and VEGF protein level and mRNA level in lung tissue ($P < 0.01$). Compared with the model group, the level of FBG decreased, in the Sunitinib group at week 16 ($P < 0.01$) when the BDD group showed no significant difference ($P > 0.05$), both the Sunitinib group and the BDD group showed decreased WAt/Pbm, WAc/Pbm, WT% and WA% level ($P < 0.01$, $P < 0.05$), thinner pulmonary vascular smooth muscle layer, protein and mRNA expressions of HIF-1 α and VEGF were decreased in lung tissue ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion Sunitinib and BDD could alleviate the pulmonary vascular remodeling in COPD complicating diabetes mice model by down-regulation of the HIF-1 α and VEGF expression in lung tissue.

KEYWORDS Sunitinib; Baofei Dingchuan Decoction; chronic obstructive pulmonary disease; diabetes mellitus; pulmonary vascular remodeling; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial grow factor

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 合并糖尿病的情况日益增多, COPD 是 2 型糖尿病的危险因素, COPD 患者中约有 18.7% 人群同时患有糖尿病^[1], 高血压、高甘油三酯血症可作为 COPD 患者并发 2 型糖尿病的预测因子^[2]。糖尿病会使 COPD 肺功能下降速率加快, 具有更差的预后, 增加 COPD 相关的死亡率^[3]。因此 COPD 合并糖尿病患者病理机制的研究具有重要的临床意义。肺血管重构是 COPD 的一个重要的病理改变, 与肺功能的恶化及肺动脉高压等有直接联系。在糖尿病大鼠模型中同样发现存在肺毛细血管内皮细胞基底膜增厚的病理结构改变^[4]。肺动脉重构在 COPD 合并糖尿病患者的病理机制中扮演何种角色及具体与哪些因子相关, 仍亟待探索。

慢性缺氧在 COPD 肺血管重构及糖尿病的多种并发症的发生中扮演重要角色。低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是机体在缺氧条件下产生的可以调节多种基因转录, 进而维持细胞、机体在缺氧条件下保持稳态的物质。血管内皮生长因子 (vascular endothelial grow factor, VEGF) 具有强大的促血管新生、促进血管平滑肌细胞肥大、增

殖的作用, 是机体促进血管重构的关键物质。因此猜想这两种物质在 COPD 合并糖尿病患者的肺血管重构过程中可能发挥重要作用。舒尼替尼是一种以 VEGF 受体为靶点的酪氨酸激酶抑制剂, 临床上多应用于抑制肿瘤血管新生, 但其在 COPD 合并糖尿病肺血管重构的作用研究尚缺乏。保肺定喘汤是全国名老中医王会仍主任的经验方, 在前期动物实验中被证实能降低 COPD 大鼠血清肿瘤坏死因子- α 表达并增加瘦素及脂联素等脂肪因子表达进而发挥抗炎作用^[5], 同时也能下调基质金属蛋白酶-9 的表达抑制气道重塑^[6], 但在 COPD 合并糖尿病肺血管重构的作用仍有待探究。本实验旨在利用先天性糖尿病小鼠 ob/ob 小鼠构建 COPD 合并糖尿病模型, 以探讨舒尼替尼、保肺定喘汤对其肺血管重构的影响, 并揭示是否通过调节 HIF-1 α 及 VEGF 的表达进而发挥作用。

材料与方法

1 动物 SPF 级 ob/ob 小鼠 40 只, 雄性, 12 周龄, 体重 (57.3 \pm 3.9) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 质量合格证号: SCXK (沪) 2012-0002。每笼 3~4 只饲养于浙江中医药大学动物实验中心, 室

温(20±2)℃,湿度40%~70%,12 h 交替采光,标准饲料喂养,自由饮水进食。实验过程中对动物的处置符合浙江中医药大学动物伦理学委员会审查批准通过(No. ZSLL-2016-19)。

2 药物 苹果酸舒尼替尼胶囊(12.5 mg/粒,意大利 Pfizer 公司,批号:H20130258)。保肺定喘汤(党参 30 g 黄芪 30 g 当归 12 g 桔梗 10 g 甘草 6 g 广地龙 15 g 仙灵脾 10 g 丹参 15 g 熟地黄 15 g 麦冬 12 g 红景天 12 g),由浙江省中医院中药制剂室制成流浸膏,含生药 3.1 g/mL。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:雄狮牌过滤嘴香烟(浙江中烟工业有限责任公司)。脂多糖(美国 Sigma 公司,批号:L2880);小鼠 HIF-1 α 、VEGF 酶联免疫吸附测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml063640、ml057559);TRIzol Plus RNA Purification Kit(美国 Invitrogen 公司,批号:12183-555)、SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR(美国 Invitrogen 公司,批号:11752-050);RNase-Free DNase Set(德国 Qiagen 公司,批号:79254);Power SYBR Green PCR Master Mix(美国 Applied Biosystems 公司,批号:4367659);HIF-1 α 上游引物:5'-AGATGACG-GCGACATGGTTTAC-3'、下游引物:5'-CTCACT-GGGCCATTTCTGTGT-3',156 bp;VEGF 上游引物:5'-GCTGTACCTCCACCATGCCAAGT-3'、下游引物:5'-GGCAGTAGCTTCGCTGGTAGAC-3',110 bp;GAPDH 上游引物:5'-CATGTAGACCATGTAGTT-GAGGTCA-3'、下游引物:5'-GAAGGTCGGTGT-GAACGATTTG-3',127 bp(上海生工生物工程股份有限公司)。兔抗小鼠 CD31 抗体(英国 Abcam 公司,批号:Ab28364)、小鼠抗 α -SMA 抗体(丹麦 DAKO 公司,批号:M0851)。

主要仪器:ACCU-CHEK Performa 型血糖仪(瑞士 Roche 公司),Multiscan FC 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司),CXF384 型多重实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),TCS SP8 STED 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)。

4 动物分组及造模方法 将 40 只 ob/ob 小鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、舒尼替尼组、保肺定喘汤组,每组 10 只。参考李征途等^[7]的造模方法,除对照组外,各组小鼠均置于自制熏烟箱中进行被动吸烟(第 1、14 天除外),熏烟处理为每天 2 次,上下午各 1 次(间隔 3~4 h),每次 1 h(每 30 min 换气 5 min),20 支/h,6 天/周,连续 14 周。在造模第 1、

14 天吸烟组小鼠于异氟烷呼吸麻醉下行脂多糖气道滴入,每只 7.5 μ g/50 μ L。对照组小鼠不作任何处理。参照参考文献[7],14 周后从 4 组中各随机选取 2 只小鼠,行小鼠肺功能测定及肺组织病理染色以确定造模成功,各组造模成功率均为 100%。

5 动物干预方法 造模结束后,参考卢平等^[8,9]方法的剂量及给药途径,舒尼替尼组予苹果酸舒尼替尼 30 mg/(kg·d),生理盐水稀释至 0.7 mL/(只·天)灌胃;参考骆仙芳等^[10]的剂量,保肺定喘汤组予保肺定喘汤 9.3 g/(kg·d),生理盐水稀释至 0.7 mL/(只·天)灌胃,相当于临床成人用药量的 6 倍;模型组每日胃饲 0.7 mL 的生理盐水。各组灌胃均连续 14 天。

6 检测指标及方法

6.1 一般情况观察 实验过程中观察小鼠的毛色、活动,每周称量并记录小鼠体重。

6.2 空腹血糖水平 分别于 0、14、16 周测量各组小鼠空腹血糖水平。过夜禁食 12 h,剪尾法采集血液标本,血糖仪测量血糖。

6.3 肺组织病理检查 颈椎脱臼法处死小鼠后,分离左肺组织上叶,10%中性甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋。HE 染色切片,厚 5 μ m,100 倍视野下观察肺组织结构变化、炎症细胞浸润及管腔变形狭窄等方面,选取典型视野并拍照。使用 Image-ProPlus 6.0 图像分析软件测量细支气管的基底膜周长(basement membrane perimeter, Pbm)、气道管壁总面积(total bronchial wall area, WAt),以 WAt/Pbm 评价气道重构程度。200 倍视野下测量细支气管伴行的小动脉的腔面积和总面积及周长,以管壁厚度与血管外径比(vessel wall thickness / total vascular diameter, WT%)、管壁面积与血管总面积比(vessel wall area / total vascular area, WA%)评价肺血管重构程度。Masson 染色切片,100 倍视野下测定气道壁胶原的面积(collagen wall area, WAc),以小气道基底膜单位长度的胶原面积(WAc/Pbm)评价胶原沉积的程度。CD31/ α -SMA/DAPI 免疫荧光染色切片,使用激光共聚焦扫描显微镜 400 倍视野下观察肺血管形态及评价血管平滑肌层增厚程度。

6.4 检测肺组织匀浆 HIF-1 α 、VEGF 含量 称取左肺组织下叶 0.5 g,加入生理盐水 5 mL,冰上制作肺组织匀浆,3 000 r/min 4℃离心 15 min,取上清液保存于 -80℃冰箱备用。酶联免疫吸附测定法测定各组肺组织匀浆 HIF-1 α 、VEGF 含量,严格按照说明书操作。

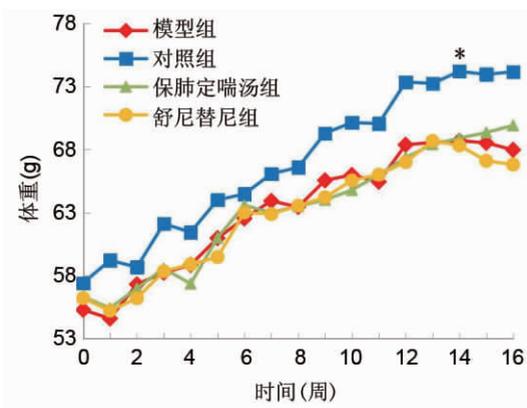
6.5 检测肺组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 水平

分离右肺组织按试剂说明书要求抽提总 RNA 并测定其含量、纯度及质量。采用 20 μL 反应体系,按 25 ℃ 10 min,50 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min 条件进行逆转录反应合成 cDNA 第一链。实时荧光定量 PCR 检测 HIF-1α、VEGF mRNA 相对表达水平。采用 20 μL 反应体系,反应条件为 95 ℃ 1 min 后进行 40 个循环(95 ℃ 15 s,63 ℃ 25 s),每个样品重复测量 3 次。扩增的 PCR 产物进行溶解曲线分析,获取 CT 值。以 GAPDH 为内参基因,HIF-1α、VEGF mRNA 相对表达水平以 $2^{-(Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})}$ 进行统计分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据正态检验和方差齐性分析,若符合正态分布和方差齐性,则进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,若方差不齐则采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般情况比较(图 1) 与对照组比较,模型组小鼠毛发失去光泽、枯燥,行动迟缓,易激惹。随熏烟时间延长,各组小鼠的体重均有增加,模型组体质量增加相对缓慢,并随时间的延长与对照组间的差异愈发明显。熏烟 14 周后,对照组体重(74.15 ± 3.71) g,模型组体重(67.97 ± 4.18) g,差异有统计学意义($P < 0.05$)。药物干预 2 周后,与模型组比较,保肺定喘汤组毛色无明显变化,行动较活泼,不易激惹;舒尼替尼组毛色、活动均无明显改变。与模型组比较,保肺定喘汤组及舒尼替尼组 16 周体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与模型组比较, * $P < 0.05$

图 1 各组小鼠不同时段体重变化

2 各组小鼠空腹血糖含量比较(表 1) 随着时间的增长,各组小鼠的空腹血糖均出现下降。烟熏 14 周后,模型组与对照组比较,差异无统计学意义

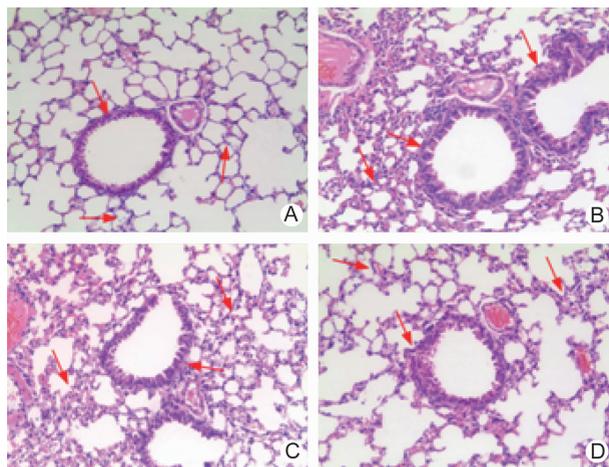
($P > 0.05$)。16 周时与模型组比较,舒尼替尼组空腹血糖降低($P < 0.01$),保肺定喘汤组各时段血糖水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠空腹血糖含量比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	0 周	14 周	16 周
对照	8	13.54 ± 3.05	9.06 ± 1.24	8.61 ± 1.74
模型	8	12.69 ± 2.95	10.18 ± 2.15	9.28 ± 1.26
保肺定喘汤	8	14.09 ± 2.31	9.56 ± 1.64	7.98 ± 1.33
舒尼替尼	8	13.98 ± 3.49	8.80 ± 2.33	6.83 ± 1.13*

注:与模型组比较, * $P < 0.01$

3 各组气道重构评价(图 2,表 2) 对照组小鼠支气管黏膜上皮完整,肺泡结构有序大小均匀,肺组织无炎症渗出。与对照组比较,模型组支气管黏膜上皮脱落,支气管管壁增厚明显,管壁及周围出现大量炎症细胞浸润;肺泡结构紊乱,肺泡壁变薄或断裂,呈囊状扩张,肺泡腔扩大,部分融合成肺大泡。保肺定喘汤组及舒尼替尼组气道与肺泡改变较模型组均有所改善。与对照组比较,模型组 WAt/Pbm 增大($P < 0.01$);保肺定喘汤组及舒尼替尼组较模型组均减小(均 $P < 0.05$)。



注: A 为对照组;B 为模型组;C 为保肺定喘汤组;D 为舒尼替尼组;箭头指示支气管及肺泡结构

图 2 各组小鼠细支气管 HE 染色病理切片 (×100)

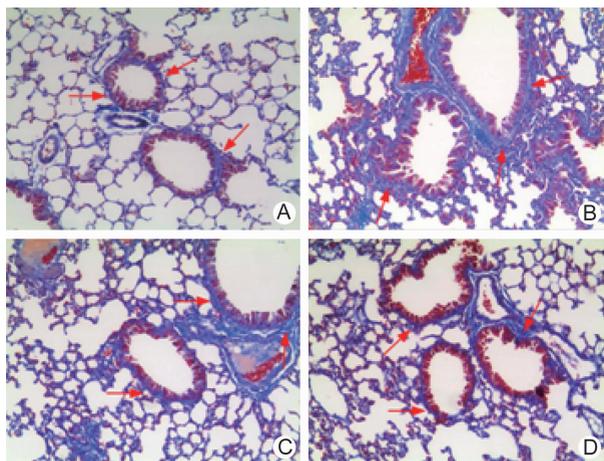
表 2 各组小鼠 WAt/Pbm 比较 ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	WAt/Pbm
对照	8	78.26 ± 15.84
模型	8	99.34 ± 22.24*
保肺定喘汤	8	85.76 ± 19.64 [△]
舒尼替尼	8	81.10 ± 14.98 [△]

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$

4 各组胶原沉积评价(图 3,表 3) 对照组小鼠细支气管周围少量胶原,厚度均匀。与对照组比较,

模型组细支气管周胶原沉积显著增多且厚度不均。保肺定喘汤组及舒尼替尼组较模型组胶原沉积均明显减少。与对照组比较,模型组 WAc/Pbm 增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较,保肺定喘汤组及舒尼替尼组 WA/Pbm 均减小 ($P < 0.05, P < 0.01$)



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为保肺定喘汤组;D 为舒尼替尼组;箭头指示气道下胶原沉积(胶原蛋白被染色蓝色)

图3 各组小鼠肺组织 Masson 染色病理切片 (×100)

表3 各组小鼠支气管 WAc/Pbm 比较 ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}, \bar{x} \pm s$)

组别	n	WAc/Pbm
对照	8	6.13 ± 2.76
模型	8	10.02 ± 3.55*
保肺定喘汤	8	7.01 ± 1.35 [△]
舒尼替尼	8	6.29 ± 1.76 ^{△△}

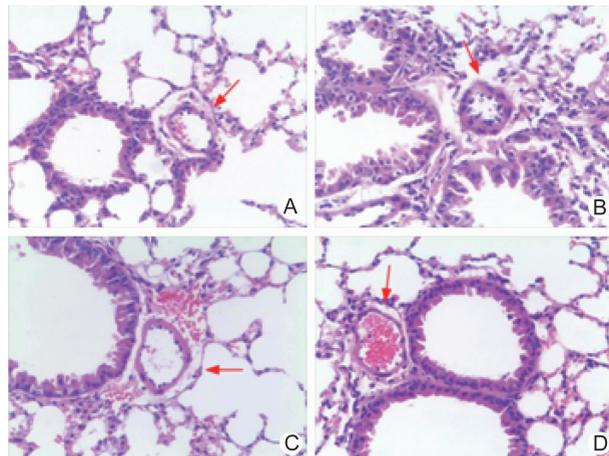
注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

5 各组肺血管重构评价(图4,表4) 对照组小鼠细支气管伴行小动脉管壁厚度正常,管腔大小正常、形状规则。模型组出现显著的肺血管重构,表现为细支气管伴行小动脉管壁明显增厚,管腔明显狭窄。保肺定喘汤组及舒尼替尼组较模型组肺血管重构均有所减轻。模型组 WT% 及 WA% 较对照组均增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较,保肺定喘汤组和舒尼替尼组 WT% 及 WA% 均减小 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

表4 各组小鼠细支气管伴行小动脉 WT%、WA% 比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	n	WT%	WA%
对照	8	34.74 ± 9.16	44.22 ± 15.21
模型	8	50.32 ± 8.36*	63.51 ± 13.15*
保肺定喘汤	8	41.22 ± 10.08 [△]	47.49 ± 8.97 [△]
舒尼替尼	8	37.00 ± 10.84 ^{△△}	46.86 ± 14.04 [△]

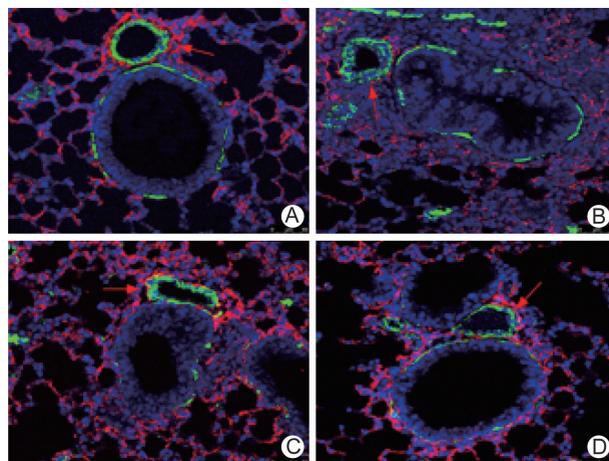
注:与对照组比,* $P < 0.01$;与模型组比,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为保肺定喘汤组;D 为舒尼替尼组;箭头指示细支气管伴行小动脉

图4 各组小鼠细支气管伴行小动脉 HE 染色病理切片 (×200)

织 CD31/ α -SMA/DAPI 免疫荧光显示(CD31 染色将血管内皮细胞、肺泡上皮细胞染成红色, α -SMA 染色将平滑肌细胞染成绿色,DAPI 染色将细胞核染成蓝色),对照组肺血管平滑肌层厚度均匀,形状规则。与对照组比较,模型组肺血管平滑肌层明显增厚,形状不规则,保肺定喘汤组及舒尼替尼组肺血管平滑肌层重构比模型组均有所减轻。



注:A 为对照组;B 为模型组;C 为保肺定喘汤组;D 为舒尼替尼组;箭头指示肺血管平滑肌层(平滑肌细胞被染成绿色,血管内皮细胞、肺泡上皮细胞被染成红色,细胞核被染成蓝色)

图5 各组小鼠肺组织 CD31/ α -SMA/DAPI 免疫荧光染色病理切片 (×400)

7 各组肺组织 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达水平比较(表5) 与对照组比较,模型组肺组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较,保肺定喘汤组和舒尼替尼组 HIF-1 α 、VEGF 表达均减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

6 各组肺血管平滑肌层重构评价(图5) 肺组

表 5 各组小鼠肺组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α	VEGF
对照	8	19.45 \pm 2.29	255.65 \pm 27.58
模型	8	27.65 \pm 4.38 *	320.71 \pm 30.44 *
保肺定喘汤	8	24.54 \pm 1.29 Δ	275.91 \pm 18.79 Δ
舒尼替尼	8	22.87 \pm 1.96 $\Delta\Delta$	266.43 \pm 28.04 Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

8 各组肺组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达水平(表 6) 与对照组比较,模型组肺组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达增加($P < 0.01$)。与模型组比较,保肺定喘汤组和舒尼替尼组 HIF-1 α 、VEGF mRNA 均减少(均 $P < 0.05$)。

表 6 各组小鼠肺组织 HIF-1 α 、VEGF mRNA 相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α mRNA	VEGF mRNA
对照	8	9.93 \pm 1.60	14.10 \pm 8.11
模型	8	22.03 \pm 1.48 *	28.29 \pm 5.78 *
保肺定喘汤	8	17.55 \pm 2.70 Δ	20.41 \pm 3.30 Δ
舒尼替尼	8	16.66 \pm 2.41 Δ	18.21 \pm 3.94 Δ

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

本实验采用先天性糖尿病 ob/ob 小鼠,通过脂多糖联合烟熏法造 COPD 合并糖尿病模型,病理结果显示明显的气道狭窄、肺泡结构紊乱、气道周围炎性渗出与胶原沉积。在肺血管重构方面,模型组细支气管伴行的小动脉显示管腔变形、狭窄。血管平滑肌在 COPD 肺血管重构中扮演重要角色,主要表现为肺动脉平滑肌细胞增殖、肌型血管中膜增厚以及非肌型血管肌化。本实验 CD31/ α -SMA/DAPI 免疫荧光发现在 COPD 合并糖尿病模型中存在肺血管平滑肌明显肥大与增厚。模型组肺组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白及基因表达水平均较单纯糖尿病对照组明显增多。由此看来,合并 COPD 提高了糖尿病小鼠血清中的低 HIF-1 α 、VEGF 水平,并加重了肺血管的重构。

作为机体对缺氧环境进行调节的关键物质, HIF-1 α 在机体缺氧状态下被大量生成,并与 HIF-1 β 结合生成 HIF-1,后者与缺氧反应元件结合从而激活一系列基因如促红细胞生成素、VEGF 的转录,在维持缺氧条件下机体稳态和血管新生重构方面起着重要作用^[11]。糖尿病的持续高血糖状态会通过丙酮醛等晚期糖基化末端产物、线粒体活性氧等相互作用进而降低 HIF-1 α 的稳定性,有研究发现糖尿病患者或动物

模型的心脏、肾、皮肤伤口、肌肉、视网膜等糖尿病靶器官中的 HIF-1 α 表达均明显下降^[12]。COPD 导致的气流受限使机体处于长期缺氧状态, Jiang H 等^[13]发现在 COPD 大鼠肺组织中存在核因子- κ B 通路激活及 HIF-1 α 表达上调,促使一系列炎症因子的表达及诱导肺动脉高压形成。而本实验则显示 COPD 合并糖尿病时肺组织 HIF-1 α 表达增加,可能是慢性缺氧导致对 HIF-1 α 表达的激活作用高于高血糖状态对其的抑制作用。VEGF 作为 HIF-1 α 的诱导靶基因之一,是强大的促血管新生因子,拥有诱导内皮细胞增殖、迁徙,增加血管渗透性、促进血管新生等作用,在机体血管重构过程中扮演重要角色^[14]。有研究发现 VEGF 在糖尿病大鼠的视网膜及肾脏中表达均增加,且与相关脏器的糖尿病并发症的产生密切相关^[15,16],但目前尚缺乏其在糖尿病肺组织中的研究。吕倩等^[17]发现在 COPD 大鼠中 VEGF 表达增加,并且与肺血管重构相关。本实验显示模型组 VEGF 表达有所上调,且导致了细支气管伴行小动脉的血管平滑肌明显肥大增厚、血管管腔狭窄等血管重构的病理表现。

舒尼替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂,主要靶点包括 VEGF 受体、血小板源性生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)、FMS 样酪氨酸激酶 3 受体等,具有抑制血管生成和抗肿瘤细胞生长的作用,目前多应用于胃肠道间质肿瘤、转移性肾细胞癌等。本实验将舒尼替尼用于 COPD 合并糖尿病小鼠模型中,下调了空腹血糖水平,这与 Demirci A 等^[18]在服用舒尼替尼的癌症患者中的发现相类似。尽管随着时间的增长, ob/ob 小鼠的空腹血糖出现生理性的下降^[19],但是舒尼替尼组下降幅度明显较大。本实验同时发现舒尼替尼下调了 HIF-1 α 及 VEGF 的水平,病理显示气管、肺血管重构相对较轻,显示出其良好的抑制肺血管重构作用。具体机制上,有研究发现舒尼替尼通过阻断 VEGF 受体及 PDGFR 等靶点受体,减少下游磷酸化蛋白激酶 B 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 表达水平,进而下调了 HIF-1 α 的转录水平^[20];另外一项关于髓母细胞瘤的研究发现,舒尼替尼下调信号转导与转录激活因子 3 磷酸化水平从而减少了 HIF-1 α 的转录,进而减少 VEGF 等 HIF-1 α 依赖性基因的表达^[21]。本实验舒尼替尼对肺组织的 HIF-1 α 及 VEGF 的水平下调作用的具体机制仍需进一步探究。

COPD 可属中医学理论“肺胀”的范畴。国家级名老中医王会仍主任认为肺胀病因为外感邪气、久病体虚,其基本病机为咳嗽咳痰日久以致肺气亏虚,痰

浊、水饮和血瘀渐生,复损肺、脾、肾三脏正常生理功能,以致病程缠绵迁延。基于此,扶正祛邪,标本同治乃本病之根本大法。保肺定喘汤由党参、黄芪、当归、桔梗、甘草、广地龙、仙灵脾、丹参、熟地黄、麦冬、红景天等组成,诸药相伍,重点针对肺胀患者肺、脾、肾三脏,起到宣肺止咳、健脾化痰、温肾纳气的作用,兼活血、化痰、祛湿,标本兼顾,使气血津液得畅,阴阳自调,起到扶正固本、祛邪通络的作用。本实验显示,保肺定喘汤能明显改善 COPD 合并糖尿病小鼠气道重构及气管周胶原沉积。中医学理论认为糖尿病病机为气阴两虚,方中党参、黄芪大补肺气,当归、熟地、麦冬、红景天、仙灵脾水火共济、调和阴阳,本实验显示保肺定喘汤一定程度上降低了 COPD 合并糖尿病小鼠的血糖水平,但差异无统计学意义,分析原因可能是服药时间不足或者剂量不足,具体尚待进一步研究。王老认为肺血管重构属于中医瘀血阻络症范畴,方中广地龙、丹参搭配活血化瘀,配伍党参、黄芪大补肺气,气为血之帅,气行则血行,实验结果显示,保肺定喘汤对 COPD 合并糖尿病小鼠肺血管重构具有良好的疗效。

总之,本实验初步探究了 COPD 合并糖尿病小鼠的肺血管及 HIF-1 α 、VEGF 的变化,发现了舒尼替尼和保肺定喘汤对肺血管重构具有一定的治疗作用,但具体机制仍需进一步探究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Kozhevnikova SA, Budnevskiy AV, Ovsyannikov ES, et al. Chronic obstructive pulmonary disease and diabetes: a look at the epidemiology, pathogenetic mechanisms, treatment [J]. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2016, 60(4): 122 - 127.
- [2] Lee CT, Mao IC, Lin CH, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: a risk factor for type 2 diabetes: a nationwide population-based study [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43(11): 1113 - 1119.
- [3] Aparna. Pulmonary function tests in type 2 diabetics and non-diabetic people-a comparative study [J]. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(8): 1606 - 1608.
- [4] Ali MO. Pulmonary complications in diabetes mellitus [J]. *Mymensingh Med J*, 2014, 23(3): 603 - 605.
- [5] 徐志波,王璐,陈斌,等.保肺定喘汤对 COPD 全身炎症反应及脂质代谢影响的实验研究 [J]. *浙江医学*, 2014, 36(11): 921 - 923, 927.
- [6] 童卫泉,杨宏宽,夏婷婷,等.保肺定喘汤对 COPD 气道重塑大鼠 MMP-9、VEGF 水平的影响 [J]. *江西中医药大学学报*, 2016, 28(6): 67 - 70.
- [7] 李征途,徐小明,巩雪芳,等.应用熏烟联合脂多糖方法建立慢性阻塞性肺疾病相关肺动脉高压小鼠模型 [J]. *国际呼吸杂志*, 2014, 34(1): 27 - 30.
- [8] 卢平,张平.苹果酸舒尼替尼对 LA795 肺腺癌小鼠移植瘤生长凋亡的影响 [J]. *中国医药导刊*, 2009, 11(7): 1170 - 1171.
- [9] 赵奇,胡晓轶,王国民,等. COX-2 抑制剂联合舒尼替尼增强对荷瘤小鼠肾癌抑制作用的机制 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2016, 43(5): 527 - 533.
- [10] 骆仙芳,沈华浩.保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠 VEGF 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(8): 1624 - 1627.
- [11] Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378 - 389.
- [12] Catrina SB. Impaired hypoxia-inducible factor (HIF) regulation by hyperglycemia [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(10): 1025 - 1034.
- [13] Jiang H, Zhu Y, Xu H, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1 α via nuclear factor-kappa B in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2010, 42(7): 483 - 488.
- [14] Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, et al. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2014, 29(2): 144 - 155.
- [15] 李小璐,陈男雄,马雅玲.枸杞多糖对糖尿病大鼠视网膜病理改变及其 VEGF 表达的影响 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2014, 32(4): 334 - 339.
- [16] Carranza K, Veron D, Cercado A, et al. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A [J]. *Nefrologia*, 2015, 35(2): 131 - 138.
- [17] 吕倩,王昌明,蒋明,等. HIF-1 α 和 VEGF 在大鼠 COPD 中的表达及与肺血管重构的关系研究 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(6): 772 - 777.
- [18] Demirci A, Bal O, Durnali A, et al. Sunitinib-induced severe hypoglycemia in a diabetic patient [J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2014, 20(6): 469 - 472.
- [19] Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes [J]. *Curr Diabetes Rev*, 2014, 10(2): 131 - 145.
- [20] Diaz R, Nguewa PA, Redrado M, et al. Sunitinib reduces tumor hypoxia and angiogenesis, and radiosensitizes prostate cancer stem-like cells [J]. *Prostate*, 2015, 75(11): 1137 - 1149.
- [21] Yang F, Jove V, Xin H, et al. Sunitinib induces apoptosis and growth arrest of medulloblastoma tumor cells by inhibiting STAT3 and AKT signaling pathways [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(1): 35 - 45.

(收稿: 2017-05-12 在线: 2018-08-28)

责任编辑: 白霞