

· 基础研究 ·

健脾益肺 II 号方对烟草烟雾暴露联合脂多糖气道滴注诱导大鼠膈肌损伤的影响

于旭华¹ 胡涛² 陈远彬¹ 吴蕾¹ 范龙¹ 伍思亮¹ 许银姬¹ 林琳¹

摘要 **目的** 探讨健脾益肺 II 号方对烟草烟雾暴露联合脂多糖(LPS)气道滴注大鼠膈肌的保护作用及其机制。**方法** 58 只 8 周龄 SD 大鼠,根据出生时间均衡分配为正常组、模型组、健脾益肺 II 号高剂量组[20 g/(kg·d)]、健脾益肺 II 号低剂量组[10 g/(kg·d)]。模型组及药物干预组给予熏烟 12 周,并于熏烟第 7、21 天分别滴注 200 μL LPS。正常组暴露于空气,气道滴注生理盐水。用药组于第 9 周开始灌胃给药,正常组及模型组给予相应生理盐水灌胃,至第 12 周。记录并比较大鼠体重变化;HE 染色方法观察肺部病理和膈肌病理改变;检测跨膈压和膈肌肌电;免疫组化法观察膈肌中 Bax 表达;通过 qPCR 方法检测泛素蛋白酶体通路 C2 蛋白亚基、E2/14k、MRuf-1、MAFbx mRNA 表达。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠体重增长较少($P<0.01$),单位视野内肺泡个数减少($P<0.01$),跨膈压增高($P<0.05$),膈肌炎症细胞浸润增多,Bax 蛋白表达和 MRuf-1 mRNA 表达增多($P<0.01$);与模型组比较,健脾益肺 II 号高、低剂量组大鼠体重增长未见增加($P>0.05$),健脾益肺 II 号高剂量组大鼠肺泡数量明显增多,跨膈压明显降低($P<0.05$);膈肌纤维间炎症细胞的浸润减少;膈肌组织中 Bax 的蛋白表达减少($P<0.01$);健脾益肺 II 号高、低剂量组膈肌组织中泛素 E3 连接酶 MRuf-1 的 mRNA 表达降低($P<0.01$)。**结论** 健脾益肺 II 号方可减少膈肌细胞凋亡,其机制可能与减轻模型大鼠肺泡扩张程度和胸腔压力,减少膈肌炎症浸润和抑制泛素—蛋白酶体通路的激活有关。

关键词 健脾益肺 II 号;慢性阻塞性肺病;膈肌

Effect of Jianpi Yifei Formula II on Diaphragm Injury Induced by Cigarette Smoke Exposure Combined with Lipopolysaccharide Intratracheal Instillation YU Xu-hua¹, HU Tao², CHEN Yuan-bin¹, WU Lei¹, FAN Long¹, WU Si-liang¹, XU Yin-ji¹, and LIN Lin¹ 1 Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou (510120); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou (510120)

ABSTRACT Objective To investigate the protective effect and mechanism of Jianpi Yifei Formula II (JY II) on diaphragm injury induced by cigarette smoke exposure combined with lipopolysaccharide (LPS) intratracheal instillation. **Methods** Totally 58 SD rats aged 8 weeks were divided into control group, model group, high dose JY II group (20 g·kg⁻¹·d⁻¹), and low dose JY II group (10 g·kg⁻¹·d⁻¹) based on the birth date. Rats in model group and medicated groups were exposed to cigarette smoke for 12 weeks, and were intratracheal-instilled with 200 μL LPS at day 7 and 21. Rats in control group were exposed to the air, and were intratracheal-instilled with saline instead. Rats in medicated groups were administered with JY II by gastrogavage from week 9 to week 12. Equal volume of normal saline was given by gastrogavage to rats in control group and model group. Body weight changes were recorded and compared before culling. Histology of lungs and diaphragm were observed using HE stain. Transdiaphragmatic pressure and electro-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81373566, No. 81573895, No. 81673897, No. 81603554)

作者单位:1. 广州中医药大学第二附属医院呼吸与危重症科(广州 510120); 2. 广州市第一人民医院中医科(广州 510120)

通讯作者:林琳, Tel: 020-81887233, E-mail: drlinlin620@163.com

DOI: 10.7661/j. cjm. 20191210. 391

myography were tested. Bax expression was tested using immunohistochemical staining. The mRNA expressions of C2, E2/14K, MRuf-1, MAFbx in Ub-proteasome pathway were detected by qPCR. **Results** Compared with the control group, body weight gain was significantly decreased ($P < 0.01$), the number of pulmonary alveolus decreased ($P < 0.01$), and transdiaphragmatic pressure increased ($P < 0.01$) in the model group. Additionally, inflammatory cells influx, Bax protein expression and MRuf-1 mRNA expression in diaphragm increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, body weight gain was not changed in both JY II groups ($P > 0.05$), the number of pulmonary alveolus were increased ($P < 0.05$), transdiaphragmatic pressure ($P < 0.05$), inflammatory cells influx, and Bax protein expression decreased in high dose JY II group ($P < 0.01$). The mRNA expression of MRuf-1 suppressed in diaphragm decreased in both JY II groups ($P < 0.01$). **Conclusion** JY II could reduce apoptosis of skeletal muscle cells in diaphragm, and its mechanism might reduce pressure in chest, alleviate influx of inflammatory cells in diaphragm and suppress the activation of Ub-proteasome pathway.

KEYWORDS Jianpi Yifei II Formula; chronic obstructive pulmonary disease; diaphragm

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 呼吸肌疲劳是 COPD 最主要的并发症之一^[1], 同时也是导致呼吸衰竭的常见原因^[2]。膈肌是呼吸肌最主要的组成部分, 而烟草烟雾暴露的大鼠膈肌是研究 COPD 呼吸肌疲劳的重要工具之一^[3]。既往研究表明, COPD 膈肌损伤的机制与泛素-蛋白酶体途径的激活关系密切^[4]。健脾益肺 II 号方 (简称健脾益肺 II 号) 是林琳教授临床经验方。前期临床研究表明, 健脾益肺 II 号可改善呼吸肌肌力^[5]并增加 COPD 患者 6 min 步行距离^[6], 提示健脾益肺 II 号对于改善患者运动功能及心肺功能可能具有一定作用。为了验证健脾益肺 II 号对膈肌的药理其作用及其机制, 本研究通过烟草烟雾暴露联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 气道滴注建立 COPD 大鼠模型, 并观察健脾益肺 II 号对大鼠体重、肺部及膈肌病理、电生理及膈肌细胞凋亡的影响, 并对泛素蛋白酶体信号通路的主要功能蛋白 mRNA 表达进行了检测。拟通过本次实验, 为临床用药提供理论依据。

材料与方法

1 动物 58 只清洁级 Sprague Dauley (SD) 雄性大鼠, 鼠龄 8 周, 体重 (200±20) g, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物许可证号: SCXK (粤) 2013-0034。饲养温度: (24±3) °C, 相对湿度: (40±5) %, 光照: 明暗交替, 噪声 <55 Db, 自由摄水摄食, 每周更换垫料 2 次。本实验经过广东省中医院动物伦理委员会批准 (No. 2014036)。

2 健脾益肺 II 号的制备 健脾益肺 II 号中药饮片 (康美药业、江中中药饮片有限公司), 包括黄芪、党参、

白术、柴胡、升麻、牡荆子、桃仁及锁阳组成, 质量比例为: 6:6:3:2:2:3:2:3。制备方法为以 10 倍水量, 重复煎煮 2 次, 每次 90 min, 并将水提物 40 °C 旋蒸浓缩获得浓缩药液。最终动物给药量为浓缩液所含生药量表示。主要成分比例及所含有效物质参见既往报道^[7,8]。

3 主要试剂及仪器 主要试剂: 脂多糖 (Sigma, 批号: L2880), 过滤嘴烟草 (大前门, 上海烟草集团有限责任公司出品), TRIzol Reagent (life technologies, 批号: 15596026), PrimeScript RT reagent Kit 反转录试剂盒 (Takara, 批号: RR036A), SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量 PCR 试剂盒 (Takara, 批号: RR820A), Bax 抗体 (Santa Cruz, 批号: SC-493)。主要仪器: 多功能台式冷冻离心机 (Allegra X-22R), PCR 扩增仪 (Applied Biosystem), 荧光定量 PCR 仪 (V II A7), BL-420A 生物机能实验系统, 显微镜 (BX61+DP720, Olympus)。

4 动物的分组及造模 58 只大鼠分为正常组、模型组、健脾益肺 II 号高剂量组、健脾益肺 II 号低剂量组。其中, 正常组、模型组、健脾益肺 II 号高剂量组每组 6 只, 用于膈机电生理检测; 其余每组 10 只用于病理、蛋白及核酸检测。

参照宋小莲等^[9]的方法建立被动吸烟大鼠模型。除正常组外, 其余大鼠每天 (7、21 天除外) 置入自制熏烟染毒箱 (70 cm×50 cm×40 cm, 145 L, 每侧各有 1.5 cm×1.5 cm 大小小孔, 每个熏烟箱分组放置不超过 10 只大鼠), 每天 2 批次予以被动吸烟, 每批次 16 支大前门烟草 (20 支/包, 烟碱含量 0.8 mg, 焦油量 11 mg/支, 一氧化碳含量 13 mg/支), 分两次给予, 每次持续 30 min, 持续 12 周, 造模过程中无大鼠死亡。正常大鼠普通饲养不做任何处理。

LPS 气管内滴入: 在实验开始的第 7、21 天,除正常组外每只大鼠麻醉后经气管滴注 200 μ L LPS (1 mg/mL)。具体方法:以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,将其仰卧固定于鼠板,暴露声门,同时用止血钳向外上牵拉大鼠舌头,用去除球头的小鼠灌胃针经气管快速插入气管滴注,然后将大鼠固定板直立旋转,使 LPS 液能够均匀分布于两肺。正常组大鼠给予等体积的生理盐水气管内滴入。

5 药物干预 熏烟 8 周后给予中药干预,每天药物干预 1 h 后继续被动熏烟。中药干预共 4 周。正常组及模型组:予生理盐水灌胃,每天 1 次。健脾益肺 II 号用药组:分别给予健脾益肺 II 号高剂量组[20 g/(kg·d)]及健脾益肺 II 号低剂量组[10 g/(kg·d)]灌胃^[10,11],每天 1 次。其中 10 g/kg 剂量相当于成人用量。

6 样本制备 大鼠用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,经 PBS 心脏灌流后,取出左肺,用 4% 多聚甲醛固定,室温放置 36 h,用于后续石蜡包埋和 HE 染色。膈肌完整取出,顺肌肉纤维走向剪切,1/4 用吸水纸滤干水分,用 4% 多聚甲醛固定,用于后续石蜡包埋和 HE 染色;3/4 迅速投入液氮,之后转移至-80 $^{\circ}$ C 保存,用于 qPCR 检测。

7 检测指标及方法

7.1 体重变化 每天记录大鼠体重,12 周后比较各组大鼠体重变化。体重增加量(g)=实验前体重(g)-实验后体重(g)。

7.2 HE 染色 固定好的肺组织和膈肌组织,经石蜡包埋,切片(3 μ m)后,逐级乙醇脱水,1% 苏木素着色,分化,伊红着色,脱水,透明封片后进行光镜下观察。记录每个视野($\times 200$)中肺泡个数,进行组间比较。

7.3 膈肌电生理检测 参照阎锡新等^[12]实验方法,对正常组、模型组和健脾益肺 II 号高剂量组进行电生理检测。鉴于电生理检测技术难度较高,耗时较长的原因,本次研究仅观察了健脾益肺 II 号高剂量组对烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注大鼠跨膈压和膈肌肌电的影响。跨膈压的测定:将大鼠麻醉固定后,经口将一端连接压力传感器一端用橡胶薄膜封好的胃管插入食道,并于剑突处做一极小开口,将另一传感胃管插入膈肌之下,用于测定腹腔压力。记录压力差即为 Pdi。肌电图测定:将引导膈肌放电的铂丝电极置于大鼠剑突下的膈肌腹面,将电极接于 BL-420 生物系统采样,分析膈肌肌电低频电活动(20~40 Hz)、高频电活动(150~350 Hz)和平均频率。

7.4 检测膈肌组织中 Bax 表达 采用免疫组化染色。采用免疫组织化学过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(SP)测定,一抗为 1:250

Bax 多克隆抗体,二抗为生物素山羊抗兔 IgG。阳性反应为胞浆中出现棕褐色颗粒为阳性表达,每张切片随机选取 5 个完整而不重叠的高倍镜视野($\times 200$)进行观察比较。

7.5 检测膈肌组织中 C20s、E2-14K、MAFbx、MRuf-1 mRNA 表达 采用 qPCR 检测法。使用 TRIzol 试剂提取肺组织中的总 RNA 后,用随机引物逆转录合成 cDNA。按照 Takara 扩增试剂盒说明书要求操作,根据 $-2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算 RNA 的相对表达量。引物分别为 C20s、E2-14K、MAFbx、MRuf-1、GAPDH,引物序列如下表。

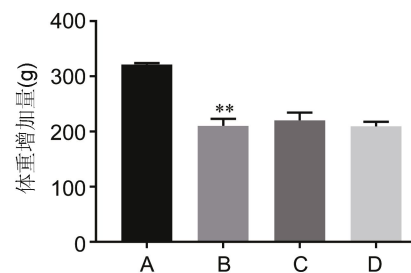
表 1 引物序列

引物名称	引物序列	引物大小 (bp)
C20s	Forward Primer: 5'-ATGGTGTGGGCTGCTCATT-3'	20
	Reverse Primer: 5'-CCGATGGACATAGCTCTGCA-3'	20
E2-14K	Forward Primer: 5'-ATCCTGCAGAACCGATGGAG-3'	20
	Reverse Primer: 5'-GGCTATTGGCCGGACTGTTT-3'	20
MAFbx	Forward Primer: 5'-TGTTGGGCAACATCAACATG-3'	20
	Reverse Primer: 5'-TCGGTGATCGTGAGACCTTTG-3'	21
MRuf-1	Forward Primer: 5'-CATCTCGCAGCTGGAGGACT-3'	20
	Reverse Primer: 5'-TCGTCCAGGATGGCGTAGAG-3'	20
GAPDH	Forward Primer: 5'-AGGGGTGCCTTCTCTTGTA-3'	20
	Reverse Primer: 5'-AACTTGCCGTGGGTAGAGTCA-3'	21

8 统计学方法 采用 Prism 5.0 软件包分析统计,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用 One-way ANOVA 方法进行比较,进一步两两比较,采用 Dunnett 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠体重变化(图 1) 与正常组比较,12 周烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注明显降低了大鼠体重增加的幅度($P < 0.01$)。与模型组比较,健脾益肺 II 号高、低组大鼠体重增加差异无统计学意义($P > 0.05$)。

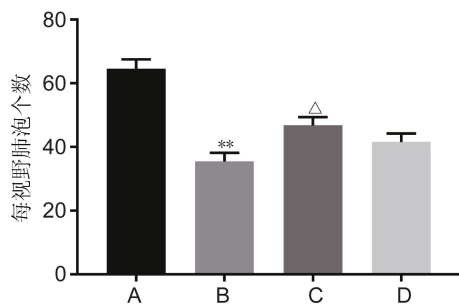
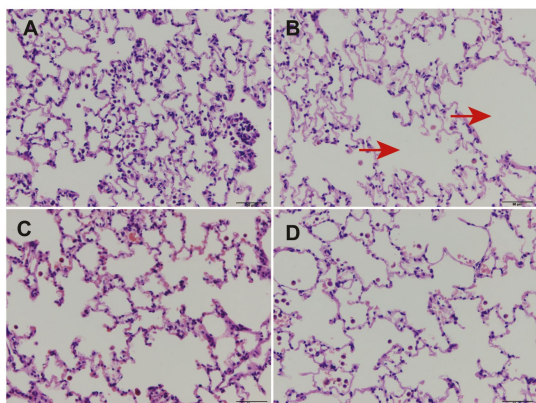


注: A 为正常组;B 为模型组;C 为健脾益肺 II 号高剂量组;D 为健脾益肺 II 号低剂量组;与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 下图同

图 1 各组大鼠体重变化

2 各组大鼠肺部病理变化(图 2) 与正常组比较,模型组肺组织出现明显损伤,表现为肺泡壁及间隔的断裂,肺泡融合,肺泡扩张;部分区域肺泡间隔增厚。模型大鼠的肺泡腔及肺间质浸润的炎症细胞主要为单核—巨噬细胞,偶见淋巴细胞,但与正常组比较,未见更多炎症细胞的浸润。与模型组比较,健脾益肺Ⅱ号高、低剂量组大鼠肺泡壁及间隔的断裂明显减少,肺泡融合及肺泡扩张减轻;健脾益肺Ⅱ号高、低剂量组部分区域肺泡间隔增厚。肺泡腔内及肺间质浸润炎症细胞未见差别。

与正常组比较,模型组大鼠肺泡数量明显减少($P<0.01$);与模型组比较,健脾益肺Ⅱ号高剂量组大鼠肺泡数量较多($P<0.05$),健脾益肺Ⅱ号低剂量组大鼠肺泡数量相对较多,但差异无统计意义($P>0.05$)。

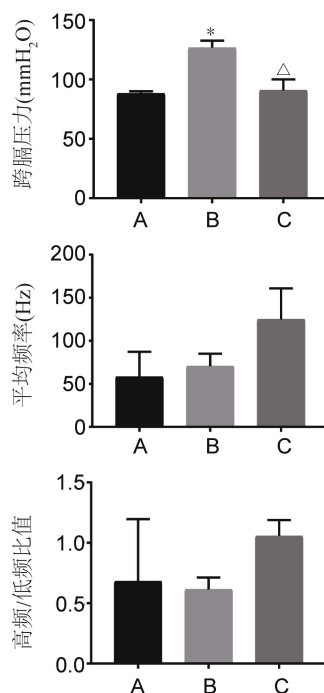


注:红色箭头所指为扩大的肺泡腔

图 2 各组大鼠肺组织病理形态 (HE, ×200)

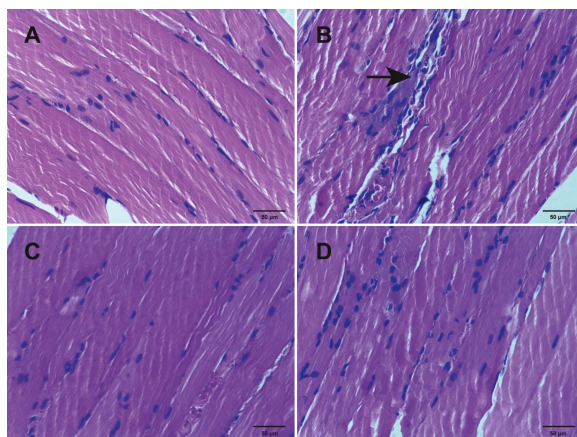
3 各组大鼠膈肌电生理比较(图 3) 与正常组大鼠比较,模型组大鼠跨膈压力,即胸腔压力-腹腔压力差明显增大($P<0.05$),平均频率及高频与低频比值差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,健脾益肺Ⅱ号高剂量组大鼠跨膈压明显减小($P<0.05$),平均频率及高频与低频比值有升高的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 各组膈肌病理变化(图 4) 正常组、模型组、健脾益肺Ⅱ号高、低剂量组膈肌肌纤维大小均匀,排列整齐,各组间未见明显差异。与正常组比较,模型组大



注:箭头所指为炎症细胞浸润

图 3 各组大鼠膈肌电生理比较

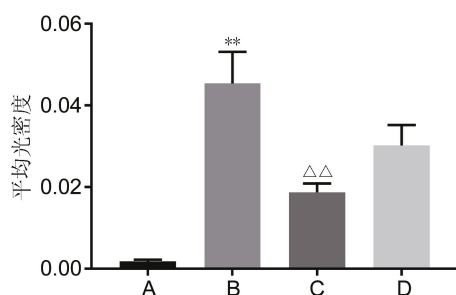
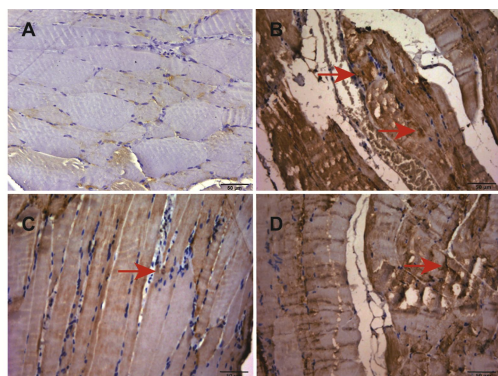


注:箭头所指为炎症细胞浸润

图 4 各组大鼠膈肌组织病理变化 (HE, ×200)

鼠肌纤维间呈现较明显的炎症细胞浸润(箭头所指处);与模型组比较,健脾益肺Ⅱ号治疗组大鼠肌纤维间炎症细胞浸润相对较少,其中健脾益肺Ⅱ号高剂量组炎症细胞浸润减少明显。

5 各组大鼠膈肌凋亡变化(图 5) 与正常组比较,模型组大鼠膈肌组织 Bax 表达明显增加($P<0.01$);与模型组大鼠比较,健脾益肺Ⅱ号高剂量组大鼠膈肌 Bax 表达明显减少($P<0.01$),健脾益肺Ⅱ号低剂量组大鼠膈肌 Bax 表达有减少的趋势,差异无统计意义($P>0.05$)。



注:箭头所指为阳性染色颗粒

图5 各组大鼠膈肌组织 Bax 表达情况 (IHC 染色, $\times 200$)

6 各组大鼠膈肌蛋白泛素-蛋白酶体信号通路比较(图6) 与正常组比较,模型组大鼠膈肌中 MRuf-1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$),健脾益肺 II 号高、低剂量组明显减少了模型组大鼠膈肌中 MRuf-1 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注未能改变膈肌中组织中 C2 蛋白酶体、MAFbx、E2/14K mRNA 的表达 ($P > 0.05$)。

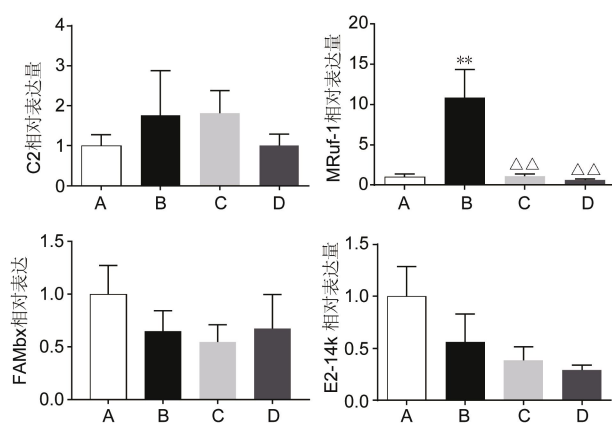


图6 各组大鼠膈肌蛋白泛素-蛋白酶体信号通路比较

讨 论

膈肌疲劳是 COPD 重症患者重要的病理生理改

变之一。长期 COPD 状态下,膈肌变薄,出现低平、萎缩,其活动幅度、肌力及耐力亦明显降低,并表现为膈神经动作电位波幅下降^[13]。加之 COPD 气道阻力增加,导致机体通气功能障碍,CO₂ 潴留,最终出现呼吸衰竭。

体重减轻是 COPD 的重要特征。体重减轻的原因主要为全身骨骼肌萎缩。烟草中含有尼古丁,其可以抑制骨骼肌的再生,促进骨骼肌的能量代谢和消耗,目前被认为是导致骨骼肌萎缩的主要成分^[14,15]。体重是反映骨骼肌容量的重要指标,而膈肌属于骨骼肌范畴,因此观察健脾益肺 II 号对体重的影响,是研究健脾益肺 II 号对呼吸肌代谢影响的重要内容之一。在实验中正常组大鼠体重 12 周增加 (321.9 ± 15.25) g,而模型大鼠体重增加 (220.4 ± 14.9) g。说明烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注导致大鼠体重增加量减少,其原因可能与尼古丁促进骨骼肌代谢的作用有关。尚未观察到健脾益肺 II 号明显增加烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注大鼠的体重,推测健脾益肺 II 号并未通过抑制尼古丁对骨骼肌代谢的促进作用发挥骨骼肌的保护作用。

膈肌疲劳的另一主要原因为通气障碍,胸腔压力增大,对膈肌的压迫增加,膈肌负荷长期加重所致。本实验中熏烟大鼠肺泡破裂融合,其可能是由于气道狭窄,肺内压力长期增高所致。健脾益肺 II 号改善了熏烟大鼠的肺泡融合情况,提示健脾益肺 II 号可能减轻了肺部压力,从而减轻膈肌的负荷。这一推测,也在跨膈压的结果中证实。熏烟组大鼠跨膈压力明显增高,而健脾益肺 II 号明显减轻了熏烟大鼠的跨膈压力。膈肌病理切片提示,熏烟大鼠膈肌肌纤维排列整齐,未见明显肌纤维损伤或肌肉断裂,或肌容量减少,说明肺内高压尚未造成膈肌形态的改变。而熏烟大鼠膈肌肌纤维间炎症细胞(淋巴细胞)浸润增多,炎症细胞可能来源于系统炎症^[16]。健脾益肺 II 号组膈肌肌纤维间炎症细胞浸润较少,可能与其抗炎功能有关^[7]。膈肌电生理的改变,可反映其收缩功能的变化。与病理结果一致,熏烟大鼠的膈肌电生理也未发生改变,说明熏烟 3 个月并未改变大鼠膈肌形态和功能。该结果与以往报道不同^[3],可能与急性炎症的诱导方式不同有关。

尽管如此,熏烟导致大鼠膈肌细胞凋亡已经发生。Bax 是组织凋亡的生物标志物, Bax 表达升高,说明膈肌细胞凋亡的发生,这可能是膈肌萎缩的早期病理改变。免疫组化结果提示,模型大鼠膈肌组织 Bax 表达升高,但健脾益肺 II 号灌胃的模型大鼠膈肌组织 Bax 表达相对较少。说明健脾益肺 II 号减少了膈肌凋

亡的发生。据报道,泛素蛋白酶体系统的过度激活导致 COPD 骨骼肌降解^[17]。其中 E3 连接酶抑制剂可以减少骨骼肌凋亡蛋白 Bax 的表达和骨骼肌萎缩^[18]。因此本次实验用 qPCR 方法检测了膈肌中泛素蛋白酶体系统中的主要蛋白 C2 蛋白亚基, E2 连接酶 E2/14K 以及 E3 链接酶 MRuf-1 和 MAFbx。结果发现,烟草暴露烟雾联合 LPS 气道滴注大鼠骨骼肌中 MRuf-1 的表达明显升高,健脾益肺 II 号高、低剂量明显抑制了 MRuf-1 mRNA 的表达。由于泛素蛋白酶体系统也是炎症激活的重要环节^[19],并且膈肌病理显示健脾益肺 II 号有效减少骨骼肌炎症细胞浸润,因此健脾益肺 II 号减少膈肌凋亡的发生可能亦与其抗炎作用相关,并可能通过其抗炎作用进一步延缓了膈肌疲劳的进展。

现代药理研究表明,黄芪联合丹参对于坐骨神经损伤导致的腓肠肌早期萎缩具有一定抑制作用,可减少骨骼肌凋亡^[20]。张崇民^[21]研究表明,黄芪单味药可以通过减少氧化应激反应缓解骨骼肌损伤。有研究表明,锁阳可以增加小鼠的运动耐力,减少骨骼肌氧化应激反应^[22]。复方中其他药物对于骨骼肌的作用报道较少,提示健脾益肺 II 号中发挥骨骼肌保护作用的主要药物可能为黄芪和锁阳,而抗氧化,抗凋亡作用可能是其重要的作用机制。既往研究表明,健脾益气药物存在着广泛的抗炎作用^[23-25],但目前中药通过抗炎作用,减少骨骼肌凋亡的研究较少。国外有研究表明, Toll 样受体 2 介导了缺血骨骼肌纤维的炎症和凋亡^[26],因此说明骨骼肌的凋亡与炎症的激活密切相关。健脾益肺 II 号可能通过抑制炎症减少骨骼肌凋亡,而其抗氧化作用,可能成为今后研究健脾益肺 II 号对骨骼肌作用的重要方向。

本实验尚有缺陷和不足:(1)未进行肺功能检测。肺功能检测是 COPD 诊断的金标准,但在动物实验中,肺功能的检测需要专门设备,条件要求比较严格,且需要较大样本量。本实验采用肺部病理切片观察和跨膈压检测,从病理改变和胸腔压力改变两方面说明烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注诱导了类似 COPD 的病理改变。(2)本实验未设阳性药对照组,原因在于目前临床上尚无有效治疗膈肌疲劳的药物。在本次实验的基础上,未来实验可选用 MRuf-1 抑制剂作为阳性对照药,并深入探讨健脾益肺 II 号发挥作用的机制。

综上所述,本实验通过烟草烟雾暴露联合 LPS 气道滴注诱导了膈肌的凋亡,并且证明健脾益肺 II 号减少膈肌凋亡的作用,其机制与健脾益肺 II 号减轻肺泡扩张程度和胸腔压力,减少膈肌炎症浸润和抑制泛

素-蛋白酶体系统 E3 连接酶 MRuf-1 的表达有关。

利益冲突:笔者声明所有作者之间无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Bachasson D, Wuyam B, Pepin JL, et al. Quadriceps and respiratory muscle fatigue following high-intensity cycling in COPD patients [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83432.
- [2] 张丽丽, 薛培丽, 邱立志, 等. 适宜性电刺激膈神经联合抗胆碱能药改善慢性阻塞性肺疾病患者膈肌疲劳和肺功能的临床研究[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(3): 104-107.
- [3] 李素云, 李亚, 李建生, 等. 补肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠膈神经放电和膈肌功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(6): 812-816.
- [4] 季磊, 孙丽华, 谭焰, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠膈肌纤维类型改变和膈肌细胞凋亡的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2012, 32(2): 194-198.
- [5] 汤翠英, 林琳, 许银姬, 等. 培土生金法综合治疗对 COPD 稳定期患者营养状况及肺功能的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2005, 21(1): 16-19.
- [6] 吴蕾, 林琳, 许银姬, 等. 健脾益肺 II 号治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期 178 例临床研究[J]. 中医杂志, 2011, 52(17): 1465-1468.
- [7] Fan L, Chen R, Li L, et al. Protective effect of Jianpiyifei II Granule against chronic obstructive pulmonary disease via NF-kappaB signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018: 4265790.
- [8] 于旭华, 胡涛, 毛峪泉, 等. 健脾益肺 II 号减少香烟暴露联合脂多糖气道滴注诱导的肺组织凋亡的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(4): 165-169.
- [9] 宋小莲, 王昌惠, 白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型的比较[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(3): 246-249.
- [10] 林琳, 于旭华, 许银姬, 等. 健脾益肺 II 号对熏烟联合脂多糖诱导大鼠肺组织氧化/抗氧化失衡的调节及超微结构的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(1): 39-43.
- [11] 林琳, 许银姬, 吴蕾, 等. 健脾益肺 II 号对熏烟联合脂多糖诱导大鼠炎症因子及金属蛋白酶表达的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(6): 342-346.
- [12] 阎锡新, 宋贝贝, 丁立君, 等. 控制性机械通气对大鼠膈肌功能的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(2): 103-106.
- [13] 王宗强, 张红璇. 膈肌起搏器对 COPD 病人的辅助治疗[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(10): 1457-1459.

- [14] Degens H, Gayan-Ramirez G. Smoking-induced skeletal muscle dysfunction: from evidence to mechanisms [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(6): 620-625.
- [15] Chan SM, Cerni C, Passey S, et al. Cigarette smoking exacerbates skeletal muscle injury without compromising its regenerative capacity [J]. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2019, doi:10.1165/rcmb.2019-0106OC.
- [16] Krüger K, Dischereit G, Seimetz M, et al. Time course of cigarette smoke-induced changes of systemic inflammation and muscle structure [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(2): L119-128.
- [17] 韩锋锋, 徐卫国, 罗勇, 等. COPD 大鼠膈肌组织泛素-蛋白酶体途径的研究 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2010, 9(2): 141-144.
- [18] Bowen TS, Adams V, Werner S, et al. Small-molecule inhibition of MuRF1 attenuates skeletal muscle atrophy and dysfunction in cardiac cachexia [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2017, 8(6): 939-953.
- [19] Adams V, Linke A, Wisloff U, et al. Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: Effect on myocardial contractility [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73(1): 120-129.
- [20] 裴艳宏, 刘坤祥. 黄芪丹参联合应用可延缓大鼠失神经骨骼肌萎缩 [J]. *解剖学报*, 2014, 45(2): 278-282.
- [21] 张崇民. 黄芪生药对运动机体骨骼肌自由基损伤的研究 [J]. *北京体育大学学报*, 2009, 32(6): 54-56.
- [22] 王宗兵, 郭层城, 伏育平, 等. 锁阳对小鼠耐力及骨骼肌抗氧化能力的影响 [J]. *西北师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 42(4): 100-102.
- [23] 黄箫娜, 尤建良. 益气健脾汤联合卡培他滨对结直肠癌患者血清炎症细胞因子 IL-6、IL-8 的影响 [J]. *贵州医药*, 2019, 43(9): 1442-1444.
- [24] 孟立锋, 杨端云, 史伟, 等. 健脾益气方改善腹膜透析大鼠微炎症状态诱导腹膜损伤的作用及机制研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(5): 1066-1070, 1120.
- [25] 邓彩春, 曾翠青. 益气健脾补肾法对糖尿病肾病患者炎症因子及肾功能的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(17): 4838-4840.
- [26] Patel H, Yong C, Navi A, et al. Toll-like receptors 2 and 6 mediate apoptosis and inflammation in ischemic skeletal myotubes [J]. *Vasc Med*, 2019, 24(4): 295-305.

(收稿: 2018-09-13 在线: 2020-01-20)

责任编辑: 白霞

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号, 可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、*Chinese Journal of Integrative Medicine* 的热点文章信息, 同时可查看两本期刊的全文信息, 欢迎广大读者订阅。

