

## • 基础研究 •

## 补肺益肾方联合运动改善慢性阻塞性肺疾病大鼠骨骼肌功能及对 PKA-CREB 通路的影响

吴明明<sup>1,2</sup> 田燕歌<sup>1,2,3</sup> 张蓝熙<sup>1,2</sup> 刘学芳<sup>1,2,3</sup> 马锦地<sup>1,2</sup> 朱丽华<sup>1,2</sup>  
刘 帅<sup>1,2</sup> 李君子<sup>1,2</sup> 李建生<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 观察补肺益肾方联合运动康复对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠骨骼肌结构和功能的影响,并从 PKA-CREB 通路方面初步探讨其机制。方法 将 72 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、补肺益肾组、运动组、补肺益肾联合运动组(简称联合组)、氨茶碱组,每组 12 只。采用香烟暴露联合细菌感染方法制备 COPD 稳定期大鼠模型,空白组、模型组给予生理盐水灌胃,补肺益肾组给予补肺益肾方[11.61 g 生药/(kg·d),每天 2 次]灌胃,运动组置实验跑台跑步(8 m/min,20 min/次,每天 1 次),联合组给予两者联合,氨茶碱组给予氨茶碱[54 mg/(kg·d),每天 2 次]灌胃。用 BL420 生物信号采集系统记录大鼠股四头肌肌肉收缩力;光镜下观察肺组织和股四头肌组织病理变化,电镜下观察股四头肌肌细胞超微结构变化;qPCR 方法检测股四头肌 PKA、CREB、FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达;Western Blot 法检测股四头肌中 PKA、CREB、pCREB 蛋白表达。结果 与空白组比较,模型组大鼠肺组织大量炎症浸润,肺泡断裂融合,肺泡腔增大,股四头肌肌节肌丝排列紊乱,线粒体减少,骨骼肌收缩力降低( $P<0.01$ ),股四头肌中 PKA、CREB mRNA 和蛋白表达降低( $P<0.01$ ),FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各干预组肺组织和股四头肌病理损伤不同程度减轻,联合组改善显著,各干预组肌肉收缩力升高( $P<0.01$ ),PKA mRNA 表达升高,CREB mRNA 表达除补肺益肾组外均升高( $P<0.01$ ),FOXO1、Atrogin-1、MuRF1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ ),各干预组 PKA、CREB 和 pCREB 蛋白表达升高( $P<0.01$ );与氨茶碱组比较,联合组肌肉收缩力及 PKA mRNA 表达升高( $P<0.01$ ),Atrogin-1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ ),补肺益肾组和运动组 CREB mRNA 降低、FOXO1 mRNA 升高( $P<0.01$ ),补肺益肾组 PKA、CREB 和 pCREB 蛋白表达降低( $P<0.01$ ),运动组 PKA 蛋白表达降低( $P<0.01$ );联合组较补肺益肾和运动组 PKA 和 CREB mRNA 表达升高( $P<0.01$ ),FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ ),PKA 蛋白表达升高( $P<0.01$ ),较补肺益肾组 CREB、pCREB 蛋白表达升高( $P<0.01$ )。结论 补肺益肾方、运动康复及其联合均可减轻肺组织和股四头肌病理损伤,缓解大鼠骨骼肌功能障碍,以联合尤为显著,其机制可能与调控 PKA-CREB 通路调节蛋白合成分解平衡有关。

**关键词** 慢性阻塞性肺疾病;补肺益肾方;运动康复;骨骼肌功能障碍;PKA-CREB 通路

**Bufei Yishen Recipe Combined with Exercise Alleviate Skeletal Muscle Function Via Regulation of PKA-CREB Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats**WU Ming-ming<sup>1,2</sup>, TIAN Yan-ge<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Lan-xi<sup>1,2</sup>, LIU Xue-fang<sup>1,2,3</sup>, MA Jin-di<sup>1,2</sup>, ZHU Li-hua<sup>1,2</sup>, LIU Shuai<sup>1,2</sup>, LI Jun-zi<sup>1,2</sup>, and LI Jian-sheng<sup>1,2</sup>  
1 Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P.R., Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); 2 Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); 3 Academy of Chinese Medicine Sciences, Henan Uni-

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(No. 81973822);河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(No. 192102310427)

作者单位:1. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心(郑州 450046);2. 河南中医药大学河南省中医药防治呼吸病重点实验室(郑州 450046);3. 河南中医药大学中医药科学院(郑州 450046)

通讯作者:李建生, Tel: 0371-65676568, E-mail: li\_js8@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20201101.051

versity of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of Bufei Yishen Recipe (BYR) combined with exercise on skeletal muscle structure and function in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats, and to investigate its potential mechanism via regulation of PKA-CREB pathway. **Methods** A total of 72 SPF SD rats were randomly divided into the control group, model group, BYR group, exercise rehabilitation group, BYR combined with exercise (combined) group, and aminophylline (APL) groups, 12 rats in each group. COPD rat model was established by cigarette smoking exposure combined with bacterial infection. Rats in control and model groups were administrated with normal saline by gavage. Rats in BYR group were treated with BYR ( $11.61 \text{ g crude drug} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , twice daily) by gavage. Rats in exercise group were ordered to run on an experimental treadmill ( $8 \text{ m/min}$ ,  $20 \text{ min/d}$ , once daily). Rats in combined group was treated with BYR combined with running training, and rats in APL group was given aminophylline ( $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , twice daily) intragastrically. The BL420 biosignal acquisition system was used to record rat quadriceps muscle contractility; pathological techniques were used to observe the pathological changes of lung tissue and quadriceps muscle tissue under light microscope, and electron microscopy was used to observe the ultramicroscopic structural changes of quadriceps muscle cell. PKA, CREB, FOXO1, Atrogin-1 and MuRF1 mRNA expression in quadriceps femoris were measured by qPCR method, PKA, CREB, pCREB protein expression in quadriceps femoris were measured by Western Blot. **Results** Compared with control group, lung tissues of rats in model group showed massive inflammation infiltration, rupture and fusion of alveoli, enlarged alveolar cavity; muscular tissue showed disordered arrangement of quadriceps sarcomere filaments, reduced mitochondria, and decreased skeletal muscle contractility ( $P < 0.01$ ), and expressions of PKA and CREB mRNA and protein in quadriceps muscle were decreased ( $P < 0.01$ ), while expressions of FOXO1, Atrogin-1 and MuRF1 mRNA were increased ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the pathological damage of the lung tissues and the quadriceps muscle in each intervention group was alleviated with varying degrees, and combined group improved significantly, meanwhile the muscle contractility of rats in each intervention group was increased ( $P < 0.01$ ); the expression of PKA mRNA was increased, and the expression of CREB mRNA was increased ( $P < 0.01$ ) in each intervention group except for BYR group; expressions of FOXO1, Atrogin-1 and MuRF1 mRNA were decreased ( $P < 0.01$ ), while protein expressions of PKA, CREB and pCREB were increased ( $P < 0.01$ ) in each intervention group. Compared with the aminophylline group, muscle contractility and PKA mRNA expression were increased in combined group ( $P < 0.01$ ), while Atrogin-1 mRNA expression was decreased ( $P < 0.01$ ). CREB mRNA was decreased and FOXO1 mRNA were increased in BYR group and exercise group ( $P < 0.01$ ), the protein expression of PKA, CREB and pCREB were decreased in BYR group ( $P < 0.01$ ), and the protein expression of PKA in the exercise group was decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with BYR group and exercise group, the expression of PKA, CREB mRNA increased ( $P < 0.01$ ), the expression of FOXO1, Atrogin-1, MuRF-1 mRNA decreased ( $P < 0.01$ ), the protein expression of PKA increased in combined group ( $P < 0.01$ ); the protein expression of CREB and pCREB in combined group was higher than that in the BYR group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** BYR, exercise and their combination can improve the lung function, reduce the pathological damage of lung tissues and quadriceps muscles, and alleviate the skeletal muscle dysfunction in COPD rats, especially for the combinational treatment. The potential mechanism may be related to regulating protein synthesis and decomposition balance via regulation of PKA-CREB pathway.

**KEYWORDS** chronic obstructive pulmonary disease; Bufei Yishen Recipe; exercise rehabilitation; skeletal muscle dysfunction; PKA-CREB pathway

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续性呼吸道症状和气流受限为特征的可预防和治疗的疾病, 常伴有

多种肺外效应和并发症<sup>[1]</sup>。骨骼肌功能障碍 (skeletal muscle dysfunction, SMD) 是 COPD 常见的肺外表现, 蛋白合成分解失衡是 COPD 合并 SMD 的主

要机制之一。肌蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)-环磷酸腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)通路作为 G 蛋白信号转导通路,是介导蛋白合成分解来改善肌肉功能的重要途径。

前期多中心临床研究显示,补肺益肾方(专利号 ZL. 201110117578. 1)可以改善 COPD 的病理改变,提高患者 6 min 步行距离和运动能力,后期随访发现补肺益肾方能提高患者的自我效能感和满意度<sup>[2,3]</sup>。运动康复是肺康复的核心,可以提高患者肺功能、骨骼肌功能,增强活动能力,提高生活质量<sup>[4-6]</sup>。本研究旨在探讨补肺益肾方联合运动康复是否可改善 COPD 合并骨骼肌功能障碍,其机制是否与调控 PKA-CREB 通路调节蛋白分解合成平衡有关,为临床治疗提供实验依据。

## 材料与方法

1 动物和细菌 SPF 级 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重(200±20) g。由河南省实验动物中心提供[许可证编号:SCXK(豫)2015-0004],实验大鼠均饲养于河南中医药大学第一附属医院 IVC 实验室,保持室温 21~23 ℃,自由饮水进食,3 天更换 1 次垫料。本研究通过河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理审查委员会批准(No.YFYDW2019031)。肺炎克雷伯杆菌(46117),购自中国食品药品检定研究院。使用前调整浓度  $6 \times 10^8$  菌落形成单位(colony-forming unit, CFU)/mL。

2 药物 补肺益肾方:人参 9 g 黄芪 15 g 枸杞子 12 g 山茱萸 12 g 五味子 9 g 淫羊藿 9 g 浙贝母 9 g 陈皮 9 g 等 12 味药物组成,由河南中医药大学药学院提供;制备方法:制成流浸膏,减压干燥,1 g 含生药量 3.14 g。氨茶碱片(0.1 g/片,购自山东新华制药股份有限公司,批号:H37020630)。

3 主要试剂及仪器 主要试剂:总 RNA 提取试剂盒(批号:R1200, Solarbio), cDNA 逆转录试剂盒(批号:R211-01/02, Solarbio), SYBR GREEN 试剂盒(批号:Q111-02, Vazyme), 相关引物及 GAPDH 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:PC0020-500, Solarbio), PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号:022A1082, EpiZyme), PKA 抗体(目录号:ab211265, Abcam), CREB 抗体(目录号:GTX112846, GeneTex), pCREB 抗体(目录号:GTX32166, GeneTex); 主要仪器:动物实验跑台(安徽正华生物设备有限公司), TEM 1400 型透射

电镜(JEOL, 日本), 7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国), Trans-Blot Turbo System 蛋白转印系统(Bio-Rad, NC, 美国)。

4 动物分组及模型制备 将大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、补肺益肾组、运动组、补肺益肾方联合运动组(简称联合组)、氨茶碱组, 每组 12 只, 雌雄各半。采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染的方法制备 COPD 稳定期大鼠模型<sup>[7]</sup>, 鼻腔滴入肺炎克雷伯杆菌菌液 0.1 mL (菌液浓度:  $6 \times 10^8$  CFU/mL), 5 天 1 次, 持续 8 周。大鼠置于烟熏箱中, 点燃香烟使箱内烟雾浓度达到  $(3\ 000 \pm 500)$  ppm, 每天 2 次, 30 min/次, 2 次烟熏间隔 3 h 以上, 持续 12 周。造模过程中模型组大鼠第 8 周死亡 1 只, 解剖后发现肺组织膨胀且可见暗红斑块, 考虑肺气肿和炎症。第 12 周结束后, 分析肺功能结果并随机抽取两只造模大鼠进行肺组织病理观察, 以判断模型成功与否。

5 干预方法 第 13~20 周, 空白组和模型组大鼠给予生理盐水灌胃(2 mL/只), 补肺益肾组给予补肺益肾方[11.61 g 生药/(kg·d), 每天 2 次]灌胃, 氨茶碱组给予氨茶碱[54 mg/(kg·d), 每天 2 次]灌胃; 运动组置实验跑台跑步(经前期预实验观察比较, 拟定时间为 20 min, 速度 8 m/min, 每天 1 次)。联合组给予补肺益肾方灌胃联合运动。治疗 8 周, 第 20 周结束后取材。每周根据大鼠体重调整灌胃剂量, 采用等效剂量换算公式, 公式为  $D_{\text{大鼠}} = D_{\text{人}} \times (HI_{\text{大鼠}}/HI_{\text{人}}) \times (W_{\text{大鼠}}/W_{\text{人}})^{2/3}$ ,  $D$  为剂量,  $HI$  为折算系数,  $W$  为体重<sup>[8]</sup>。

## 6 检测指标及方法

6.1 肺组织和股四头肌病理形态 10% 中性甲醛固定组织, 梯度脱水, 石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察病理形态变化。

6.2 股四头肌超微结构 将肌肉切成 1 mm×1 mm×1 mm 小块, 2.5% 戊二醛前固定, 1% 锇酸后固定, 乙醇系列脱水, Epon812 包埋, 超薄切片。采用 JEM-1400 透射电镜观察骨骼肌细胞超微结构变化。

6.3 骨骼肌收缩力 采用 BL-420 生物信号采集系统记录股四头肌收缩所产生的张力信号峰, 计算峰峰值(Peak-Peak, P-P 值)。

6.4 采用 qPCR 方法检测股四头肌 PKA、CREB、FOXO1、Atrogin-1、MuRF1 mRNA 表达 用 RNA 提取试剂盒提取股四头肌总 RNA, 根据第一链 cDNA 合成试剂盒说明书逆转录, 得到 cDNA 后用 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。计算 mRNA 的相对表达量, 即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物序列见表 1。

6.5 采用 Western Blot 法检测股四头肌中 PKA、

表 1 各指标引物序列

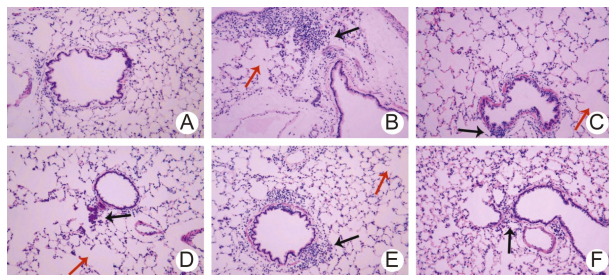
| 基因        | 引物序列                          | 产物长度 (bp) |
|-----------|-------------------------------|-----------|
| PKA       | F 5'-TTTGCCAAGCGTGTGAAAGG-3'  | 73        |
|           | R 5'-GGATAATCTCGGGGGCCAAG-3'  |           |
| CREB      | F 5'-GTATCCATGCCAGCAGCTCA-3'  | 88        |
|           | R 5'-CATGGACCTGGACTGTCTGC-3'  |           |
| FOXO1     | F 5'-CAGCCAGGCACCTCATAACA-3'  | 143       |
|           | R 5'-TCAAGCGGTTTCATGGCAGAT-3' |           |
| Atrogin-1 | F 5'-AGCTTGTGCGATGTTACCCA-3'  | 142       |
|           | R 5'-GGTGAAAGTGAGACGGAGCA-3'  |           |
| MuRF1     | F 5'-CCAAGCTTGTGGAACAGCC-3'   | 90        |
|           | R 5'-CAATGCTCTTGATGAGCGGC-3'  |           |
| GAPDH     | F 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3'  | 252       |
|           | R 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'  |           |

CREB、pCREB 蛋白表达 用总蛋白提取试剂盒提取各组股四头肌总蛋白,并测定浓度,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜后用脱脂奶粉封闭,孵育一抗、二抗后曝光显影并采用凝胶图像分析系统扫描分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。不同时间点比较采用重复测量方差分析;组间比较采用 *One-Way ANOVA*,方差齐者采用最小显著值法 (*Least Significant Difference*),方差不齐者采用 *Dunnett's T3* 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

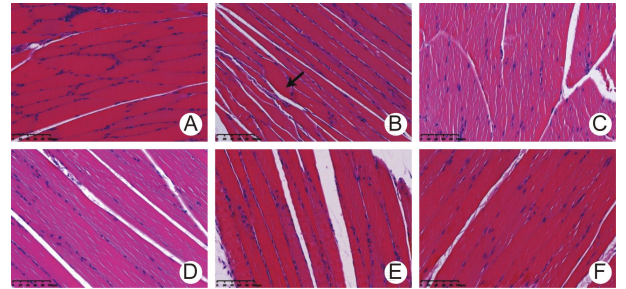
1 各组肺组织病理观察(图 1) 空白组肺泡及间隔形态结构基本正常,未见病理改变;模型组肺泡间质有大量炎性细胞浸润,肺泡扩张,间隔变窄,结构紊乱,肺泡壁破裂融合;补肺益肾组和氨茶碱组炎症细胞浸润减少,但茶碱组气道壁增厚改善不明显;运动组肺泡壁断裂改善明显,但气道周围炎症浸润改善不明显;联合组气道壁增厚减轻,肺泡结构改善,未见明显炎性细胞浸润。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为氨茶碱组;D 为补肺益肾组;E 为运动组;F 为联合组;黑色箭头指炎症部位,红色箭头表示肺泡融合部位

图 1 各组大鼠肺组织病理观察结果 (HE, ×200)

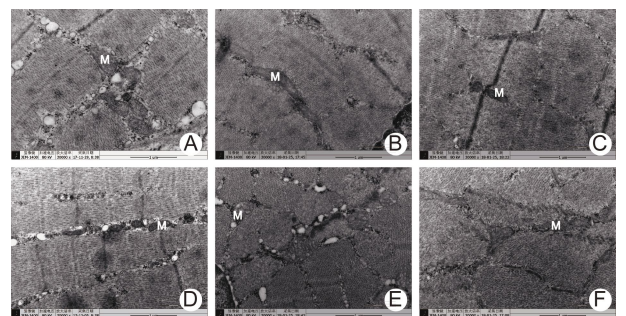
2 各组股四头肌病理变化(图 2) 空白组骨骼肌组织结构完整,肌纤维排列紧密清晰,整齐有序,肌细胞核呈卵圆形,肌纤维呈红色,无断裂或水肿;模型组骨骼肌组织肌纤维排列紊乱,局部肌束纤维扭曲;各治疗组肌纤维排列较模型组均有所改善,肌束横纹清晰可见,未见明显萎缩现象,以联合组改善尤为明显。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为氨茶碱组;D 为补肺益肾组;E 为运动组;F 为联合组;黑色箭头指肌纤维排列紊乱部位

图 2 各组大鼠股四头肌病理观察结果 (HE, ×200)

3 各组股四头肌肌细胞超微结构(图 3) 空白组肌原纤维可见清晰的明暗带相间排列,线粒体沿 Z 线排列整齐,数目多,大小正常,线粒体嵴清晰;模型组肌原纤维排列混乱,Z 线模糊流变,线粒体减少,并出现肿胀、空泡化,线粒体嵴不清晰;各干预组可不同程度改善肌原纤维结构,使肌小节结构完整,明暗带清晰,线粒体增多,嵴清晰,无肿胀,以联合组改善尤为显著。



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为氨茶碱组;D 为补肺益肾组;E 为运动组;F 为联合组;M 表示线粒体

图 3 各组大鼠股四头肌超微结构观察结果 (TEM, ×30 000)

4 各组股四头肌收缩力比较(表 2) 与空白组比较,模型组股四头肌收缩力降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各干预组收缩力升高 ( $P < 0.01$ );分别与补肺益肾组、运动组、茶碱组比较,联合组收缩力升高 ( $P < 0.01$ )。

5 各组股四头肌中 PKA、CREB、FOXO1、Atrogin-1、MuRF1 mRNA 表达(表 3) 与空白组比较,模

表 2 各组大鼠骨骼肌收缩力 P-P 值比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | 收缩力 P-P 值                |
|------|---|--------------------------|
| 空白   | 6 | 2.17±0.20                |
| 模型   | 6 | 1.14±0.11*               |
| 补肺益肾 | 6 | 1.42±0.11 <sup>△</sup> ▲ |
| 运动   | 6 | 1.51±0.15 <sup>△</sup> ▲ |
| 联合   | 6 | 1.87±0.10 <sup>△</sup>   |
| 氨茶碱  | 6 | 1.41±0.10 <sup>△</sup> ▲ |

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$ ;与联合组比较,▲ $P<0.01$

型组大鼠 PKA、CREB mRNA 表达降低( $P<0.01$ ), FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达升高( $P<0.01$ );与模型组比较,各干预组 PKA mRNA 表达升高,FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ ),除补肺益肾组外各干预组 CREB mRNA 均升高( $P<0.01$ );与氨茶碱组比较,联合组 PKA mRNA 升高,Atrogin-1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ ),补肺益肾组和运动组 CREB mRNA 表达降低,FOXO1 mRNA 表达升高( $P<0.01$ );分别与补肺益肾和运动组比较,联合组 PKA 和 CREB mRNA 升高,FOXO1、Atrogin-1 和 MuRF1 mRNA 表达降低( $P<0.01$ )。

6 各组股四头肌中 PKA、CREB、pCREB 蛋白表达比较(表 4,图 4) 与空白组比较,模型组股四头肌 PKA、CREB 和 pCREB 蛋白表达降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各干预组蛋白表达升高( $P<0.01$ );与

表 4 各组股四头肌中 PKA、CREB、pCREB 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | PKA/GAPDH                 | CREB/GAPDH                | pCREB/GAPDH                |
|------|---|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 空白   | 6 | 0.70±0.03                 | 0.61±0.02                 | 0.57±0.02                  |
| 模型   | 6 | 0.36±0.04*                | 0.23±0.02*                | 0.47±0.01*                 |
| 补肺益肾 | 6 | 0.48±0.03 <sup>△</sup> ▲○ | 0.27±0.01 <sup>△</sup> ▲● | 0.56±0.01 <sup>△</sup> ▲○● |
| 运动   | 6 | 0.49±0.02 <sup>△</sup> ▲○ | 0.52±0.01 <sup>△</sup>    | 0.64±0.01 <sup>△</sup>     |
| 联合   | 6 | 0.66±0.01 <sup>△</sup>    | 0.55±0.01 <sup>△</sup>    | 0.72±0.05 <sup>△</sup>     |
| 氨茶碱  | 6 | 0.63±0.02 <sup>△</sup>    | 0.51±0.02 <sup>△</sup>    | 0.63±0.03 <sup>△</sup>     |

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$ ;与氨茶碱组比较,▲ $P<0.01$ ;与联合组比较,○ $P<0.01$ ;与运动组比较,● $P<0.01$

表 3 各组股四头肌中 PKA、CREB、FOXO1、Atrogin-1、MuRF1 mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n | PKA                      | CREB                     | FOXO1                     | Atrogin-1                | MuRF1                    |
|------|---|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 空白   | 6 | 1.00±0.04                | 1.00±0.07                | 1.00±0.11                 | 1.00±0.15                | 1.00±0.08                |
| 模型   | 6 | 0.41±0.02*               | 0.42±0.02*               | 2.02±0.10*                | 2.47±0.12*               | 2.27±0.17*               |
| 补肺益肾 | 6 | 0.60±0.04 <sup>△</sup> ○ | 0.47±0.03 <sup>△</sup> ○ | 1.80±0.06 <sup>△</sup> ▲○ | 1.88±0.09 <sup>△</sup> ○ | 1.73±0.12 <sup>△</sup> ○ |
| 运动   | 6 | 0.63±0.08 <sup>△</sup> ○ | 0.50±0.03 <sup>△</sup> ○ | 1.68±0.07 <sup>△</sup> ▲○ | 1.82±0.16 <sup>△</sup> ○ | 1.69±0.06 <sup>△</sup> ○ |
| 联合   | 6 | 0.83±0.03 <sup>△</sup> ▲ | 0.65±0.03 <sup>△</sup>   | 1.46±0.08 <sup>△</sup>    | 1.64±0.10 <sup>△</sup> ▲ | 1.51±0.13 <sup>△</sup> ▲ |
| 氨茶碱  | 6 | 0.63±0.05 <sup>△</sup>   | 0.62±0.04 <sup>△</sup>   | 1.50±0.13 <sup>△</sup>    | 1.91±0.07 <sup>△</sup>   | 1.64±0.07 <sup>△</sup>   |

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$ ;与氨茶碱组比较,▲ $P<0.01$ ;与联合组比较,○ $P<0.01$

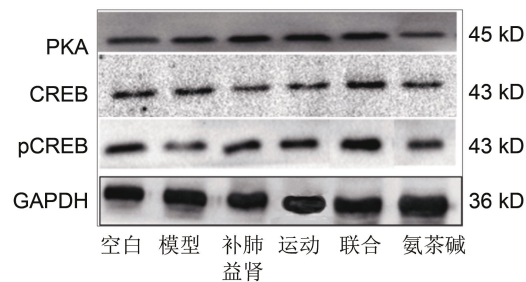


图 4 各组大鼠股四头肌 PKA、CREB、pCREB 蛋白表达

氨茶碱组比较,补肺益肾组 PKA、CREB 和 pCREB 蛋白表达降低( $P<0.01$ ),运动组 PKA 蛋白表达降低( $P<0.01$ );联合组 PKA 蛋白表达较补肺益肾组、运动组均升高( $P<0.01$ ),联合组和运动组 CREB、pCREB 蛋白表达较补肺益肾组升高( $P<0.01$ )。

## 讨 论

COPD 发病率、致残率均高,患者早期即出现肌肉功能减弱,后期由于通气功能下降、身体活动水平较低、焦虑抑郁等原因,会选择减少体力活动以缓解锻炼带来的呼吸不适等情况,但运动量减少又会加重骨骼肌功能障碍,患者出现肌肉萎缩,生活质量下降,存活率降低<sup>[9]</sup>。临床上也发现 COPD 患者 6 min 步行距离降低,活动能力下降<sup>[2]</sup>。因此,治疗 COPD 同时改善骨骼肌功能将有利于患者减轻临床症状、提高活动能力,进而增加患者自信心,提升生活质量。

中医药治疗 COPD 具有明显的疗效,可降低病情加重风险,改善不良预后,提高运动能力<sup>[10,11]</sup>。李建生教授基于多年研究成果及临床经验,提出“正虚积损”为 COPD 的主要病机,并由此拟定的补肺益肾方临床疗效确切<sup>[2]</sup>,该方由人参、黄芪、枸杞子、山茱萸等组成,以补肺益肾为主,时兼化痰祛瘀、纳气平喘。COPD 病机多为肺肾气虚而兼见痰瘀,故方中以人参为君,甘平而补元气,补益肺肾兼止咳平喘。黄芪甘温可补肺脾之气,有助人参补气之功;山茱萸枸杞子平补肺肾,五味子滋补肺肾之气,淫羊藿温肾助阳,促肾

之阴精化生肾气,五味共辅人参而为臣,再配以化痰散结活血化痰等佐药、总方配伍合奏补肺益肾兼化痰祛瘀之效。前期研究表明,补肺益肾方能够改善 COPD 大鼠活动能力,减轻全身及局部炎症反应<sup>[12,13]</sup>,提高机体免疫功能<sup>[14]</sup>等。近年来,肺康复在改善 COPD 合并 SMD 方面取得了较大进展,运动康复是肺康复的核心,也是目前提升 COPD 患者运动能力的最佳选择,主要包括有氧训练、抗阻训练、中医传统功法六字诀、八段锦等。刘笑等<sup>[15]</sup>发现中药补虚法基础上联合太极拳能改善 COPD 患者的肺功能及运动耐力,且临床安全性较高。Jarosch I 等<sup>[16]</sup>也发现康复训练可诱导骨骼肌发生适应性改变,让 COPD 患者的运动能力有所改善。本研究以实验跑台带动 COPD 模型大鼠慢跑模拟有氧运动,联合中药复方治疗评价其疗效,从蛋白代谢失衡方面探讨补肺益肾方联合运动康复改善 COPD 合并 SMD 的可能机制,为临床应用提供依据。

肺组织病理形态可直观观察肺泡、气道结构的异常,以此来比较各治疗方案疗效。从肺组织病理来看,补肺益肾方、运动康复及其联合均能改善肺泡结构及炎症浸润,而补肺益肾方及其联合运动较为显著,运动康复改善支气管周围炎症浸润效果不显著。SMD 常引起肌力减退,肌肉萎缩。本组研究资料表明,COPD 大鼠股四头肌纤维萎缩,线粒体减少,肌力减退,补肺益肾方、运动康复及其联合能明显改善股四头肌肌纤维结构,提高骨骼肌收缩功能,以联合尤为显著,表明补肺益肾方联合运动康复能较大幅度改善 COPD 合并 SMD。

蛋白合成分解失衡是 COPD 合并 SMD 的主要机制之一<sup>[17]</sup>。PKA-CREB 通路在其中起重要作用,其机制为 G 蛋白将 ATP 去磷酸化形成环磷酸腺苷 cAMP 来激活 PKA,PKA 进入细胞核可催化核转录因子 CREB,介导活化因子,促进蛋白合成。同时,cAMP 通过磷酸化 PKA 可以失活叉头转录因子 FOXO1,使其调控两个肌肉萎缩特异性指标 Atrogin-1 和 MuRF1 基因能力降低,从而抑制蛋白质水解<sup>[18-21]</sup>。本研究表明,补肺益肾方、运动及其联合可不同程度的升高 COPD 大鼠骨骼肌中 PKA 和 CREB 的蛋白表达,降低 Atrogin-1、MuRF1 及其上游 FOXO1 基因蛋白表达,联合优于其他两种疗法,而运动康复提高 CREB 及其磷酸化蛋白表达优于补肺益肾方,表明运动康复调节蛋白合成改善骨骼肌功能方面具有一定优势,补肺益肾方联合运动康复改善骨骼肌功能具有明显优势,其机制可能与通过 PKA-CREB 通路调控大鼠体内的蛋白代谢平衡有关。

综上所述,补肺益肾方、运动康复及其联合应用均

能减轻大鼠肺组织损伤,改善骨骼肌结构和功能,其中以联合效果显著,其机制可能与调控 PKA-CREB 通路促进蛋白代谢平衡有关。关于补肺益肾方联合运动改善骨骼肌功能的深入机制有待进一步研究。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 2020 GOLD REPORTS [EB/OL]. <http://www.goldcopd.org>, 2020-11-06/2020-2-20.
- [2] Li SY, Li JS, Wang MH, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12: 197.
- [3] Yu XQ, Wang MH, Li JS, et al. Effect of comprehensive therapy based on Chinese medicine patterns on self-efficacy and effectiveness satisfaction in chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(10): 736-742.
- [4] Fu JJ, Min J, Yu PM, et al. Study design for a randomised controlled trial to explore the modality and mechanism of Tai Chi in the pulmonary rehabilitation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMJ Open, 2016, 6(8): e011297.
- [5] Andrianopoulos V, Klijn P, Franssen FM, et al. Exercise training in pulmonary rehabilitation [J]. Clin Chest Med, 2014, 35(2): 313-322.
- [6] Farris SG, Abrantes AM, Bond DS, et al. Anxiety and fear of exercise in cardiopulmonary rehabilitation: patient and practitioner perspectives [J]. J Cardiopulm Rehabil Prev, 2019, 39(2): E9-E13.
- [7] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [8] 田燕歌, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 621-624.
- [9] Broxterman RM, Hoff J, Wagner PD, et al. Determinants of the diminished exercise capacity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: looking beyond the lungs [J]. J Physiol, 2020, 598

- (3): 599–610.
- [10] Wang HF, Zhang HL, LI JS, et al. Effectiveness and safety of traditional Chinese medicine on stable chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis[J]. Complement Ther Med, 2015, 23(4): 603–611.
- [11] Li Y, Xiong C, Zeng Y, et al. Acupuncture treatment of lung-spleen Qi deficiency in stable chronic obstructive pulmonary disease: a randomized, open-label, controlled trial[J]. J Tradit Chin Med, 2019, 39(6): 885–891.
- [12] Tian YG, Li Y, Li JS, et al. Bufeyishen Granules combined with acupoint sticking therapy suppress inflammation in chronic obstructive pulmonary disease rats; via JNK/p38 signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017; 1768243.
- [13] Li JS, Li SY, Li Y, Wang YY, et al. Long-term effects of Tiaobu Feishen therapies on systemic and local inflammation responses in rats with stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Chin Integr Med, 2012, 10(9): 1039–1048.
- [14] 姜素丽, 李亚, 田燕歌, 等. 调补肺肾三法对 COPD 大鼠 T 淋巴细胞亚群及 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 的影响及远后效应[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(11): 1569–1575.
- [15] 刘笑, 杨楠. 基于补虚法的太极运动对老年人慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的影响研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11): 1584–1587.
- [16] Jarosch I, Gehlert S, Jacko D, et al. Different training-induced skeletal muscle adaptations in COPD patients with and without Alpha-1 antitrypsin deficiency[J]. Respiration, 2016, 92(5): 339–347.
- [17] Jaitovich A, Barreiro E. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. What we know and can do for our patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2018, 198(2): 175–186.
- [18] Kim JM, Choi JS, Kim YH, et al. An activator of the cAMP/PKA/CREB pathway promotes osteogenesis from human mesenchymal stem cells[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(3): 617–626.
- [19] Muhammad AB, Xing B, Liu C, et al. Menin and PRMT5 suppress GLP1 receptor transcript and PKA-mediated phosphorylation of FOXO1 and CREB[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2017, 313(2): E148–E166.
- [20] Lokireddy S, Kukushkin NV, Goldberg AL. cAMP-induced phosphorylation of 26S proteasomes on Rpn6/PSMD11 enhances their activity and the degradation of misfolded proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(52): E7176–7185.
- [21] Machado J, Manfredi LH, Silveira WA, et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits autophagic-lysosomal proteolysis through cAMP/PKA signaling in rat skeletal muscles[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2016, 72: 40–50.
- (收稿: 2020-04-29 在线: 2020-11-30)  
责任编辑: 白 霞

## Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)

2019 年 SCI 影响因子为 1.545

2020 年 6 月 29 日, 科睿唯安公布 2019 年 *Journal Citation Reports*, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (CJIM, 《中国结合医学杂志》英文版) 影响因子为 1.545。

*Chinese Journal of Integrative Medicine* 创办于 1995 年, 2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办, 国家中医药管理局主管, 主编为陈可冀院士。本刊 2012—2019 年连续被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。2019 年入选中国科技期刊卓越行动计划。

期刊以创办国际化期刊为目标, 不断促进结合医学发展为己任, 欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中, 我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!