

· 基础研究 ·

补肺益肾组分方联合针刺对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺小血管的影响

苗玉芳^{1,2} 张蓝熙^{1,2} 金凡力^{1,2} 闫鑫华^{1,2} 田燕歌^{1,2,3} 李建生^{1,2}

摘要 **目的** 观察补肺益肾组分方联合针刺不同治疗时期对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺小血管的影响。**方法** 将 240 只大鼠随机分为空白对照组(空白组)、模型组、补肺益肾组分方组(组分方组)、针刺组、补肺益肾组分方联合针刺组(联合组)和氨茶碱组,每组 40 只。1~12 周采用香烟熏吸联合细菌感染法制备 COPD 稳定期大鼠模型。13~20 周组分方组、针刺组、联合组及氨茶碱组分别给予补肺益肾组分方、针刺、补肺益肾组分方联合针刺和氨茶碱干预,空白组和模型组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃,停止干预后继续观察至第 28 周,分别在第 14、16、20、24 和 28 周取材。观察不同治疗时期血管壁厚度占血管外径百分比(WT%)、管壁面积占血管总面积百分比(WA%)及管腔面积占血管总面积百分比(LA%)的变化,检测肺组织中血管内皮生长因子(VEGF)和内皮素-1(ET-1)表达,并采用 R 值综合评价法对各指标进行综合评价。**结果** 与空白组比较,模型组 14~28 周 WT%、VEGF、ET-1 均升高,16~28 周 WA% 升高、LA% 降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,氨茶碱组 14、24、28 周 WT% 降低,16~24 周 VEGF 降低,16、28 周 ET-1 降低,16、24、28 周 R 综合降低;组分方组 14~28 周 WT% 降低,16、20 周 WA% 降低、LA% 升高,14~24 周 VEGF 降低,16~28 周 ET-1 降低, R 综合第 16、24、28 周降低;针刺组 14~28 周 WT%、R 综合降低,20 周 WA% 降低、LA% 升高,14、20 周 VEGF 降低,20、24 周 ET-1 降低;联合组 14~28 周 WT%、VEGF 降低,16、20、28 周 WA% 和 ET-1 降低、LA% 升高,16~28 周 R 综合降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与针刺组比较,组分方组 16 周 VEGF、ET-1 降低,28 周 R 综合降低;联合组 16 周 VEGF 降低,ET-1、R 综合 24 周升高,28 周降低($P<0.05$, $P<0.01$)。与氨茶碱组比较,组分方组 14、20 周 VEGF 降低,20、24 周 ET-1、R 综合降低;针刺组 16 周 VEGF、ET-1 升高,14、20 周 VEGF 降低,20、24 周 ET-1 降低,20、28 周 R 综合降低;联合组 14、20 周 VEGF 降低,20、24 周 ET-1、R 综合降低($P<0.05$, $P<0.01$)。综合所有时间点显示,与模型组比较,各治疗组 R 综合均降低($P<0.01$);与氨茶碱组比较,组分方、针刺及联合组 R 综合降低($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 补肺益肾组分方、针刺及其联合治疗可明显改善 COPD 肺组织肺血管重构,针刺起效早,组分方及其联合针刺作用时间长,以联合为优。

关键词 慢性阻塞性肺疾病;补肺益肾组分方;针刺;氨茶碱

Effect of Effective-component Compatibility of Bufeiyishen Formula Combined with Acupuncture on Small Pulmonary Vessels in COPD Rats

MIAO Yu-fang^{1,2}, ZHANG Lan-xi^{1,2}, JIN Fan-li^{1,2}, YAN Xin-hua^{1,2}, TIAN Yan-ge^{1,2,3}, and LI Jian-sheng^{1,2} 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 Medical Sciences, Henan

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81973822);河南省高等学校重点科研项目(No.360003);河南省自然科学基金资助项目(No.202300410262);河南中医药大学研究生科研创新类项目(No.2019KYCX006)

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:田燕歌, Tel: 0371-66248624, E-mail: yange0910@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210604.174

University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046)

ABSTRACT Objective To observe the effect of effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula (ECC-BYF) combined with acupuncture on small pulmonary vessels in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) at different treatment time points. **Methods** A total of 240 rats were randomly divided into blank control, model, ECC-BYF, acupuncture, ECC-BYF+acupuncture (combined), and aminophylline (APL) groups, 40 in each group. The stable phase COPD model was prepared by cigarette smoke exposure combined with bacterial infection during week 1-12. In week 13-20 rats of ECC-BYF, acupuncture, combined, and APL groups received ECC-BYF, acupuncture, ECC-BYF+acupuncture, and APL, respectively. Rats in the blank control group and the model group were administered with 0.5% CMC-Na by gastrogavage. After stopping the intervention, rats were observed until the 28th week. The rats were sacrificed at week 14, 16, 20, 24, and 28, respectively. The morphological changes of small pulmonary vessels were observed by the changes of vascular wall thickness percentage (WT%), wall area percentage (WA%), and lumen area percentage (LA%) in different treatment periods. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 (ET-1) in lung tissue were observed. The R value comprehensive evaluation method was used to evaluate each index. **Results** Compared with the blank control group, WT%, VEGF, and ET-1 at week 14-28 all increased, WA% increased and LA% decreased in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, WT% decreased at week 14, 24, and 28, VEGF decreased at week 16-24, ET-1 decreased at week 16 and 28, the comprehensive evaluation of R value decreased at week 16, 28 in the APL group. WT% decreased at week 14-28, WA% decreased and LA% increased at week 16 and 20, VEGF decreased at week 14-24, ET-1 decreased at week 16-28, the comprehensive evaluation of R value decreased at week 16, 24, and 28 in the ECC-BYF group. WT% and the comprehensive evaluation of R value decreased at week 14-28, WA% decreased and LA% increased at week 20, VEGF decreased at week 14 and 20, ET-1 decreased at week 20 and 24 in the acupuncture group. WT% and VEGF decreased at week 14-28, WA% and ET-1 decreased at week 16, 20, and 28, LA% increased and the comprehensive evaluation of R value decreased at week 16, 24, and 28 in the combined group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with acupuncture group, VEGF and ET-1 decreased at week 16, the comprehensive evaluation of R value decreased at week 28 in the ECC-BYF group. VEGF decreased at week 16, ET-1 and the comprehensive evaluation of R value increased at week 24 and decreased at week 28 in the combined group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with APL group, VEGF decreased at week 14 and 20, ET-1 and the comprehensive evaluation of R value increased at week 20 and 24 in the ECC-BYF group. VEGF and ET-1 increased at week 16, VEGF decreased at week 14 and 20, ET-1 decreased at week 20 and 24, the comprehensive evaluation of R value decreased at week 20 and 28 in the acupuncture group. VEGF decreased at week 14 and 20, ET-1 and the comprehensive evaluation of R value decreased at week 20 and 24 in the combined group ($P<0.05$, $P<0.01$). Results of all the time points showed, compared with the model group, the comprehensive evaluation of R value all decreased in each treatment group ($P<0.01$). **Conclusions** The results showed that treatment in ECC-BYF, acupuncture and their combination groups significantly improved pulmonary vascular remodeling of lung tissue in COPD rats. Acupuncture had an earlier effect, and the combination of the ECC-BYF and acupuncture had longer effective time, especially for the combinational treatment.

KEYWORDS chronic obstructive pulmonary disease; effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula; acupuncture; aminophylline

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 发病过程复杂, 其发病机制主要与炎症、氧化应激、黏液高分泌和蛋白酶/抗蛋白酶失衡有关, 且在疾病发生早期, 肺部即出现小血管的病变^[1]。肺血管重构是指肺血管在烟雾、炎症和低氧等因素的刺激下发生血管结构和功能的改变, 表现为血

管内皮细胞功能紊乱、平滑肌细胞增生肥大、成纤维细胞表型改变以及细胞外基质沉积等, 导致肺血管管壁增厚、僵硬, 管腔狭窄甚至闭塞, 促进疾病进展^[2]。中医药治疗 COPD 具有一定的优势, 李建生教授综合多年临床经验及研究成果, 提出“正虚积损”为 COPD 的主要病机^[3], 并拟定了具有补肺益肾、止

咳平喘佐以化痰活血功效的补肺益肾方(专利号: ZL201110117578.1), 临床疗效确切^[4]。前期研究表明, 补肺益肾方可改善 COPD 大鼠肺功能, 减轻炎症反应, 改善右心室重构^[5,6]。课题组在补肺益肾方的基础上经过多次体内外实验, 涉及多个细胞模型及反复体内验证筛选出成分清楚、与原方等效的补肺益肾组分方(专利号: ZL201811115372.3)。而针刺也是中医治疗疾病的有效手段之一, 有研究表明针刺可增加 COPD 患者的运动耐量, 改善患者的肺功能和生活质量^[7]。针刺可通过改善血管重构以延缓高血压大鼠的血压持续上升^[8]。本研究以 COPD 大鼠模型为研究对象, 观察补肺益肾组分方、针刺及其联合对其肺小血管的影响, 探讨其作用, 为进一步机制研究提供依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 240 只, 雌雄各半, 月龄 2 个月, 体重(250 ± 20)g; 动物质量合格证号: 1107261911000081, 购于济南朋悦实验动物繁育有限公司, 许可证号: SCXK(鲁)20140007。饲养于河南中医药大学第一附属医院 IVC 实验室 SPF 级动物房[SYXK(豫)2017-0001]。适应环境 7 天, 实验室室温为(25 ± 1)℃, 相对湿度(50 ± 10)%, 换气量 10~15 次/h, 氨浓度 ≤ 14 mg/m³, 噪声 ≤ 60 db。灭菌饲料喂养, 自由饮用灭菌水, 定期检查净化操作系统, 保持环境安静。本实验已通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审批(No.YFYDW2019031)。

2 主要试剂及仪器 SABC 免疫组化染色试剂盒(Boster, SA1022), DBA 显色试剂盒(Solarbio, AR1022), VEGF 抗体(Proteintech, 00070191); ET-1 抗体(Abcam, ab2786)。非束缚小动物肺功能测量仪(Buxco, USA); Leica-DM6000B 光学显微镜及 LAS V4.7 照相系统(Leica, Germany); Image-Pro Plus(IPP)6.0 专业图像分析系统(Media Cybernetics, USA); 华佗牌电子针疗仪器(苏州医疗用品厂有限公司)。

3 细菌 肺炎克雷伯杆菌(46117)购自中国药品生物制品检定院中国医学细菌保藏管理中心, 使用前将细菌浓度调整为 6 × 10⁸ CFU/mL。

4 红旗渠香烟 由河南中烟工业有限责任公司提供。焦油量 11 mg, 烟气烟碱量 0.9 mg, 烟气一氧化碳量 11 mg。

5 针灸针 由苏州针灸用品有限公司提供, 环

球牌, 规格: 0.30 × 13 mm, 100 个/盒。

6 药物 补肺益肾组分方: 由人参皂苷 Rh1、黄芪甲苷、淫羊藿苷、川陈皮素等组成, 单体由成都曼斯特生物科技有限公司提供; 氨茶碱片: 山东新华制药股份有限公司, 0.1 g/片, 批号: 1905027; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na): 由天津恒兴化学试剂制造有限公司提供, 500 g/瓶, 批号: 201905。

7 动物分组及模型制备 240 只大鼠, 雌雄各半, 在大鼠尾部标号, 按随机数字表法分为空白对照组(简称空白组)、模型组、补肺益肾组分方组(简称组分方组)、针刺组、补肺益肾方联合针刺组(简称联合组)和氨茶碱组, 每组 40 只。采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染法制备 COPD 大鼠模型^[9], 第 1~8 周, 经大鼠鼻腔滴入肺炎克雷伯杆菌液 6 × 10⁸ CFU/mL, 0.1 mL, 5 天 1 次。第 1~12 周香烟熏吸, 每次使熏烟箱烟雾浓度达到(3 000 ± 500) ppm, 每天 2 次, 40 min/次, 两次熏烟时间间隔至少 3 h(早晚各 1 次), 造模时间总计 12 周。根据大鼠的症状体征、肺功能、肺组织病理判定模型成功与否。

8 干预方法 自第 13 周第 1 天起, 空白组及模型组给予 0.5% CMC-Na 灌胃(雄鼠 2 mL/次, 雌鼠 1.5 mL/次, 每天 2 次)组分方组给予补肺益肾组分方灌胃(5.5 mg/kg, 每天 1 次); 氨茶碱组给予氨茶碱灌胃(54 mg/kg, 每天 1 次); 针刺组选用大椎、肺俞和肾俞进行针刺, 连接电针(频率 1 Hz, 电流 1 mA, 20 min/次), 针刺规范及穴位定位参考《实验针灸学》^[10]; 联合组给予补肺益肾组分方灌胃及针刺疗法, 灌胃剂量和针刺方法同组分方组和针刺组。药物剂量采用等效剂量系数换算公式计算^[11]。公式为 $D_{大鼠} = D_{人} \times (HI_{大鼠}/HI_{人}) \times (W_{大鼠}/W_{人})^{2/3}$ 。D: 剂量, HI: 体型系数, W: 体重。大鼠每周称重以调整灌胃量, 共给药 8 周。停药后常规饲养至 28 周, 并于第 14、16、20、24、28 周分批取材。

9 检测指标及方法

9.1 肺组织病理形态学观察 取肺组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察肺小动脉形态学改变, 利用病理图文分析系统采集图像, 测量外径为 100~300 μm 之间的肺小动脉管壁厚度(wall thickness, WT)、血管直径(vessel diameter, VD)、管腔面积(luminal area, LA)、血管总面积(total area, TA)和管壁面积(wall area, WA), 然后计算管壁厚度占血管外径百分比(WT%)、管壁面积占血管总面积百分比(WA%)及管腔面积占血管总面积百分比(LA%), 以此作为大鼠的肺血管形态

计量学指标,对血管重构程度进行分析。

9.2 肺组织免疫组化 取肺组织,常规石蜡包埋切片,采用免疫组织化学 SABC 法检测血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、内皮素 -1 (endothelin-1, ET-1) 的表达。采用 IPP 6.0 分析显微镜下 400 倍照片,采集阳性表达的积分光密度 (integrated optical density, IOD)。

10 R 值综合评价 采用 R 值综合评价法^[12-13] (著作权号:国作登字-2013-A-00096833)对肺小血管 WT%、WA%、LA%、VEGF、ET-1 进行综合评价。以模型组为参考,R 值越接近模型组,治疗效果越差,即纠正强度越小。反之,效果越好,纠正强度越大。

11 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,符合正态分布但方差不齐者采用 *Dunnett's T3* 检验,齐者采用 *LSD*,不符合正态分布者将数据转化后再分析或采用非参数检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

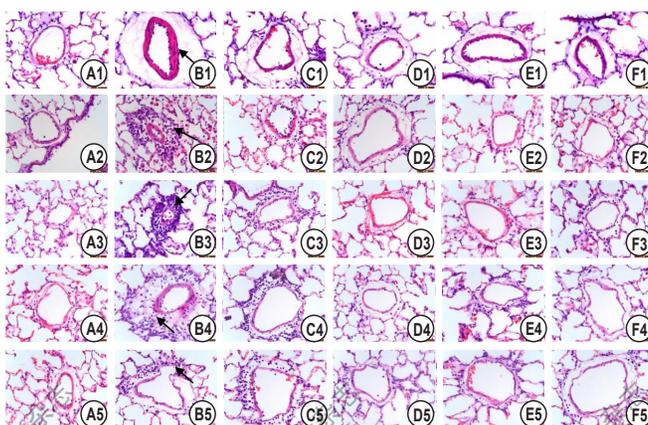
1 各组大鼠肺小动脉病理形态学变化 (表 1, 图 1) 各个时间点空白组大鼠肺小动脉管壁厚度及管腔形态正常;模型组大鼠肺小动脉管壁增厚,管腔狭窄,周围有炎性细胞浸润,且随时间推移逐渐加重。各治疗组大鼠肺小动脉血管壁厚度和形态较模型组均有不同程度的改善。与空白组比较,模型组 14~28 周 WT% 均升高,16~28 周 WA% 升高、LA% 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,组分方、针刺及联合组 14~28 周 WT% 均降低,联合组第 16、20、28 周 WA% 降低、LA% 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),组分方组第 16、20 周 WA% 降低、LA% 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),针刺组仅第 20 周 WA% 降低、LA% 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),氨茶碱组第 14、24、28 周 WT% 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2 各组肺组织 VEGF、ET-1 表达比较 (表 2, 图 2、3) 与空白组比较,各时间点模型组 VEGF、ET-1 均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,氨茶碱组 VEGF 第 16~24 周降低,ET-1 第 16、28 周降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);组分方组 VEGF 第 14~24 周降低,ET-1 第 16~28 周降低 ($P < 0.01$);针刺组 VEGF 在第 14、20 周降低,ET-1 第 20、24 周降低 ($P < 0.01$);联合组 VEGF 各个时间点均降低,ET-1 第 16、20、28 周降低 ($P < 0.01$)。与氨茶碱组比较,组分方组第 14、20 周 VEGF 降低,20、24

表 1 各组大鼠不同时间点 WT%、WA% 和 LA% 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间(周)	WT%	WA%	LA%
空白	6	14	16.55 ± 1.83	60.20 ± 8.56	39.80 ± 8.56
		16	14.32 ± 0.95	54.52 ± 6.11	45.48 ± 6.11
		20	17.22 ± 2.47	59.85 ± 6.87	40.15 ± 6.87
		24	16.55 ± 2.26	61.01 ± 5.15	38.99 ± 5.15
		28	16.61 ± 1.19	63.97 ± 4.92	36.03 ± 4.92
模型	6	14	23.02 ± 3.18*	67.82 ± 7.19	32.18 ± 7.19
		16	22.59 ± 3.51**	69.22 ± 14.02**	30.78 ± 14.02*
		20	24.95 ± 7.29**	73.71 ± 14.39*	26.29 ± 14.39*
		24	24.47 ± 4.24**	73.15 ± 7.85*	26.85 ± 7.85*
		28	24.37 ± 5.87**	74.78 ± 10.50*	25.22 ± 10.50*
氨茶碱	6	14	19.39 ± 2.23 [△]	65.73 ± 8.35	34.27 ± 8.35
		16	19.88 ± 1.81	65.20 ± 11.76	34.80 ± 11.76
		20	21.12 ± 3.17	68.92 ± 6.99	31.08 ± 6.99
		24	18.35 ± 5.35 ^{△△}	67.35 ± 9.57	32.65 ± 9.57
		28	19.12 ± 3.01 [△]	71.97 ± 4.10	28.03 ± 4.10
组分方	6	14	18.87 ± 3.35 [△]	65.30 ± 9.42	34.70 ± 9.42
		16	16.01 ± 1.20 [△]	57.52 ± 7.60 [△]	42.48 ± 7.60 [△]
		20	17.78 ± 3.22 ^{△△}	62.40 ± 6.08 [△]	37.60 ± 6.08 [△]
		24	17.68 ± 1.85 ^{△△}	62.33 ± 6.70	37.67 ± 6.70
		28	18.43 ± 2.17 ^{△△}	67.50 ± 3.31	32.50 ± 3.31
针刺	6	14	18.32 ± 2.53 ^{△△}	63.00 ± 4.97	37.01 ± 4.97
		16	17.24 ± 1.97 [△]	59.03 ± 7.23	40.97 ± 7.23
		20	18.37 ± 2.54 ^{△△}	62.91 ± 7.70 [△]	37.09 ± 7.70 [△]
		24	17.72 ± 1.59 ^{△△}	65.91 ± 12.34	34.09 ± 12.34
		28	18.26 ± 1.83 [△]	71.61 ± 3.61	28.40 ± 3.61
联合	6	14	19.50 ± 3.19 [△]	66.25 ± 6.49	33.75 ± 6.49
		16	15.86 ± 1.16 [△]	56.53 ± 8.81 [△]	43.47 ± 8.11 [△]
		20	17.46 ± 3.74 ^{△△}	61.71 ± 10.32 [△]	38.29 ± 10.32 [△]
		24	17.42 ± 0.86 ^{△△}	62.34 ± 5.42	37.66 ± 5.42
		28	17.50 ± 1.69 ^{△△}	66.49 ± 3.16 [△]	33.51 ± 3.16 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$



注:A为空白组;B为模型组;C为氨茶碱组;D为组分方组;E为针刺组;F为联合组;1为14周;2为16周;3为20周;4为24周;5为28周;箭头所指处为病理改变或阳性表达点;图2~3同

图 1 各组大鼠肺血管病理图片 (HE, ×400)

表 2 各组大鼠肺组织不同时间点 VEGF 和 ET-1 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间(周)	VEGF	ET-1
空白	6	14	9.68 ± 0.97	8.04 ± 0.85
		16	2.34 ± 1.30	6.93 ± 1.69
		20	5.44 ± 1.89	4.12 ± 2.98
		24	2.01 ± 0.84	3.95 ± 1.19
		28	10.34 ± 2.15	11.14 ± 1.86
模型	6	14	12.29 ± 2.78*	10.28 ± 1.19**
		16	8.31 ± 1.81**	11.47 ± 2.21**
		20	8.81 ± 2.36**	10.44 ± 3.83**
		24	6.37 ± 0.99**	7.71 ± 1.87**
		28	15.29 ± 5.30**	21.76 ± 3.18**
氨茶碱	6	14	11.21 ± 3.44	9.88 ± 1.13
		16	3.17 ± 1.14 ^{△△}	5.24 ± 1.31 ^{△△}
		20	10.74 ± 1.71 [△]	10.12 ± 2.02
		24	3.41 ± 1.25 ^{△△}	7.99 ± 0.42
		28	11.38 ± 2.80	12.11 ± 1.13 ^{△△}
组分方	6	14	7.56 ± 1.68 ^{△△△}	9.67 ± 1.56
		16	3.81 ± 1.26 ^{△△}	5.44 ± 2.80 ^{△△}
		20	6.10 ± 1.48 ^{△△△}	6.13 ± 1.97 ^{△△△}
		24	4.29 ± 0.52 ^{△△}	5.38 ± 0.68 ^{△△△}
		28	11.98 ± 2.39	12.49 ± 1.95 ^{△△}
针刺	6	14	6.34 ± 1.33 ^{△△△}	9.28 ± 1.02
		16	6.72 ± 2.41 ^{△○}	8.60 ± 1.22 ^{△○}
		20	6.40 ± 0.82 ^{△△△}	6.05 ± 1.54 ^{△△△}
		24	4.89 ± 0.64	4.94 ± 0.79 ^{△△△}
		28	13.10 ± 1.99	16.87 ± 1.51
联合	6	14	6.19 ± 1.10 ^{△△△}	9.37 ± 1.41
		16	4.67 ± 1.92 ^{△△●}	7.40 ± 1.79 ^{△△}
		20	5.06 ± 1.25 ^{△△△}	4.81 ± 2.43 ^{△△△}
		24	4.11 ± 1.17 ^{△△}	6.23 ± 1.63 ^{△●●}
		28	11.33 ± 2.46 ^{△△}	10.14 ± 2.95 ^{△△●●}

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与氨茶碱组比较,[△] $P < 0.01$;与组分方组比较,[○] $P < 0.01$;与针刺组比较,[●] $P < 0.05$,^{●●} $P < 0.01$

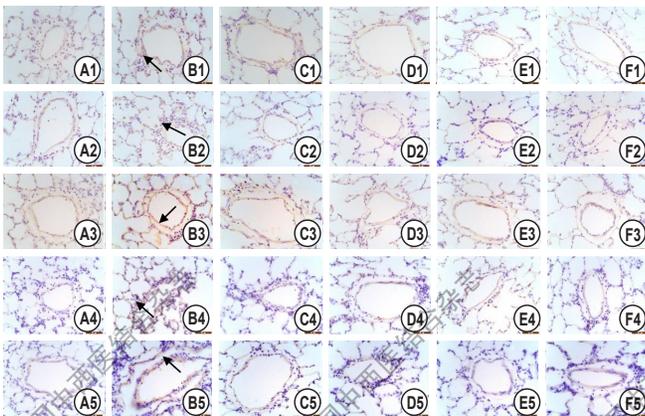


图 2 各组大鼠肺组织 VEGF 表达比较 (免疫组化, ×400)

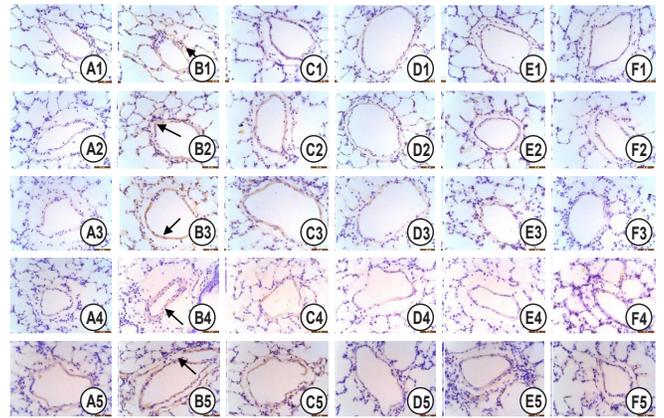


图 3 各组肺组织 ET-1 比表达较 (免疫组化, ×400)

周 ET-1 降低 ($P < 0.01$); 针刺组 VEGF 第 16 周升高, 14、20 周降低, ET-1 第 16 周升高, 20、24 周降低 ($P < 0.01$); 联合组 VEGF 第 14、20 周降低, ET-1 第 20、24 周降低 ($P < 0.01$)。与针刺组比较, 组分方组 VEGF、ET-1 第 16 周降低 ($P < 0.01$)。联合组 VEGF 第 16 周降低, ET-1 第 24 周升高, 第 28 周降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 肺血管指标 R 值综合评价 (表 3) 与模型组比较, 氨茶碱组 R 综合第 16、24、28 周降低, 组分方组 R 综合第 16~28 周降低, 针刺组 R 综合第 14~28 周降低, 联合组 R 综合第 16~28 周降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与氨茶碱组比较, 组分方组、联合组 R 综合第 20、24 周降低, 针刺组 R 综合第 20、28 周降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与针刺组比较, 组分方组 R 综合第 28 周降低 ($P < 0.05$), 联合组 R 综合第 28 周降低 ($P < 0.01$)。综合所有时间显示, 与模型组比较, 各治疗组 R 综合均降低 ($P < 0.01$)。与氨茶碱组比较, 组分方、针刺及联合组 R 综合降低 ($P < 0.01$)。

讨 论

COPD 是一种常见的以持续呼吸症状和气流受限为特征的可预防和治疗的疾病^[1]。COPD 具有高患病率、致残率和病死率, 已经成为全球的公共卫生问题。近年来, 在 COPD 相关研究中, 肺血管重构引起越来越多的关注, 肺血管重构是环境和 (或) 细胞刺激导致的肺血管系统的改变, 是 COPD 发生发展的重要病理基础^[14, 15], 在生理条件下, 血管结构变化可由细胞生长和迁移等过程主动触发^[16]。然而, 由于肺部长期的血管重构失调会导致内皮功能障碍和肺动脉高压^[17]。VEGF 是一种高度保守的肝素结合同二聚体, 是血管生成

表 3 各组大鼠不同时间点肺小血管各指标综合评价比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	14 周	16 周	20 周	24 周	28 周	综合所有时间点
模型	6	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00
氨茶碱	6	2.70 ± 0.13	2.37 ± 0.58**	2.88 ± 0.43	2.66 ± 0.26*	2.28 ± 0.32**	2.58 ± 0.25**
组分方	6	2.43 ± 0.54	2.19 ± 0.12**	2.15 ± 0.03** $\Delta\Delta$	2.23 ± 0.12** $\Delta\Delta$	2.24 ± 0.09**	2.34 ± 0.21** Δ
针刺	6	2.06 ± 0.66*	2.45 ± 0.21**	2.16 ± 0.09** $\Delta\Delta$	2.41 ± 0.28**	2.52 ± 0.19** $\Delta\Delta$	2.32 ± 0.20** $\Delta\Delta$
联合	6	2.30 ± 0.89	2.25 ± 0.14**	2.07 ± 0.23** $\Delta\Delta$	2.27 ± 0.33** Δ	2.13 ± 0.07** Δ	2.20 ± 0.10** $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与氨茶碱组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与组分方组比较, Δ $P < 0.05$;与针刺组比较, Δ $P < 0.01$

的关键介质,可使血管网络中已存在的内皮细胞分化产生新的血管^[18-20],并且可增加血管通透性、促进血管内皮细胞分裂^[21,22],与肺组织炎症及肺血管重构密切相关,参与 COPD 肺动脉高压的形成,在 COPD 进展中起到重要作用^[23,24]。ET-1 是一种可以促进细胞增殖的生长因子,作用于其受体,诱导肺血管收缩并刺激肺血管平滑肌细胞增殖,出现管壁增厚和管腔狭窄,最终导致血管重塑^[25,26]。R 值综合评价法是基于已提出的中医药疗效评价“三要素”理论^[12],将机体状态因素和药物因素统一于效应因素中,并结合现代科学分析方法和数理分析模型对药物疗效进行综合评价的一种方法,因本研究涉及多时间点和多指标,故本研究对肺血管病理及免疫组化指标进行 R 值综合评价。

中医药治疗 COPD 的研究取得较大进展,不仅能够较好改善患者症状、体征和预后^[27-29],还可减轻气道炎症、缓解氧化应激、减少气道黏液高分泌、抑制蛋白酶/抗蛋白酶失衡及气道重塑等^[30]。针刺可通过刺激穴位,疏通经络,达到调节脏腑的效果。针刺在治疗 COPD 方面取得较好疗效,逐渐受到关注,一项 Meta 分析结果表明,针刺治疗可增加患者的运动耐量,改善患者的肺功能和生活质量^[7]。补肺益肾方是李建生教授基于 COPD 发生发展过程中出现肺肾气虚证所拟定的方药,前期实验表明,补肺益肾方可显著改善 COPD 大鼠肺功能及肺组织病理形态^[31],调节肺泡表面活性物质相关蛋白(surfactant protein, SP) A/D 表达,改善气流受限^[32],降低肺脏炎症细胞浸润、细胞因子水平、胶原沉积和基质金属蛋白酶^[33-35],抑制氧化应激^[36]、同时能调节 T 淋巴细胞亚群和脂肪酸代谢,提高机体免疫力^[37],系统生物学评价及药理学实验分析结果显示,补肺益肾方还可降低 COPD 大鼠肺小血管壁厚度,降低右心室肥大指数,具有良好的远后效应^[38,39]。课题组通过对补肺益肾复方进行药理学分析,得到多个有效成分,基于组分配伍研制现代中药的理论和方剂^[40]及补肺益肾方系统药理学结果,采用细胞和动

物模型,经过反复筛选、鉴定和确认,得到与补肺益肾方初步等效的补肺益肾组分方 I^[41](专利号:ZL201711088757.0)。在此基础上,基于体内外药效的组分配伍优化^[24],得到疗效相当的补肺益肾组分方 II^[42]。基于 COPD 大鼠模型多指标 R 值综合评价疗效和进一步优化,得到与补肺益肾方等效的补肺益肾组分方 III(专利号:ZL201811115372.3)。本研究采用香烟烟雾熏吸联合反复细菌感染法建立 COPD 大鼠模型,采用补肺益肾组分方联合针刺进行干预,观察其对 COPD 大鼠肺小动脉的动态变化,为下一步的机制研究提供依据。

本研究结果显示,COPD 大鼠肺小血管壁增厚,随着时间的变化有逐渐增厚的趋势,管腔狭窄持续存在。治疗期间:在治疗 2 周时,补肺益肾组分方、针刺及其联合即可降低血管壁面积、VEGF 和 ET-1;治疗 4 周时,补肺益肾组分方及其与针刺联合可降低血管壁厚度和面积、VEGF 和 ET-1,增大血管腔面积;治疗 8 周时,补肺益肾组分方、针刺及其联合可降低血管壁厚度和面积、VEGF 和 ET-1,增大血管腔面积。观察期间:停止治疗后 4 周,各干预方法仍可降低血管壁厚度和面积、VEGF 和 ET-1,增大血管腔面积。补肺益肾组分方及其与针刺联合可降低 VEGF,补肺益肾组分方和针刺可降低 ET-1;停止治疗 8 周,各治疗方法可降低血管壁厚度,补肺益肾组分方联合针刺还可降低血管壁面积、VEGF 和 ET-1。补肺益肾组分方、针刺及其联合均可不同程度改善 COPD 大鼠肺血管重构,其机制可能与调控 VEGF、ET-1 的表达有关。R 综合评价结果显示,针刺治疗起效早,在治疗早期即治疗 2 周时便可发挥一定的治疗作用,改善肺小动脉的管壁增厚,降低 VEGF 的表达水平,且治疗作用可持续存在;补肺益肾组分方在治疗 4 周时可降低 ET-1 的表达,治疗作用较针刺治疗好且持续时间长;二者联合兼具起效早、综合治疗作用强和远后效应佳的优点,效果更好。

综上,针刺、补肺益肾组分方及其联合均可不同程度的降低 COPD 大鼠肺小血管壁厚度,改善管腔狭窄,其中,针刺起效早,但远后效应一般,补肺益

肾组分方及其与针刺联合疗效及远后效应均较好,其中以补肺益肾组分方联合针刺治疗为优。本研究仅动态观察了补肺益肾组分方联合针刺改善 COPD 大鼠肺血管重塑的疗效特点,进一步的机制研究有待开展。

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 report[OL]. <http://www.goldcopd.org>.
- [2] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms[J]. *Circ Res*, 2006, 99(7): 675-691.
- [3] 李建生. 正虚积损为慢性阻塞性肺疾病的主要病机[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(8): 1710-1713
- [4] 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 Alternat Med*, 2012, 12: 197.
- [5] 李素云, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法治疗慢性阻塞性肺疾病大鼠疗效及远后效应[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(12): 3116-3121.
- [6] 王英, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠右心室重构的影响和远后效应[J]. *中医杂志*, 2013, 54(5): 415-419, 429.
- [7] 曹爱玲, 何海浪, 周贤梅. 针刺治疗慢性阻塞性肺疾病疗效的 Meta 分析[J]. *环球中医药*, 2017, 10(7): 899-904.
- [8] 宿中笑, 肖达, 雒久红, 等. 电针对自发性高血压大鼠血压和主动脉血管重构的影响[J]. *上海针灸杂志*, 2003, 22(5): 20-22.
- [9] 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 Pharmac Bull*, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [10] 余曙光, 郭义主编. 实验针灸学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 150.
- [11] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理实验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] 田燕歌, 谢洋, 李建生. 基于疗效评价“三要素”的中医药疗效评价设想[J]. *中医杂志*, 2012, 53(8): 649-650.
- [13] 李建生, 崔红新, 田燕歌, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病稳定期模型大鼠肺胶原和蛋白酶调节作用的 R 值综合评价[J]. *中医杂志*, 2014, 55(11): 949-954.
- [14] Peinado VI, Pizarro S, Barbera JA. Pulmonary vascular involvement in COPD[J]. *Chest*, 2008, 134: 808-814.
- [15] Sifakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Int J Chron Obstr Pulmonary Dis*, 2007, 2(4): 453-462.
- [16] Renna NF, de Las HN, Miatello RM. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension[J]. *Int J Hypertens*, 2013: 808353.
- [17] Man SF, Van Eeden S, Sin DD. Vascular risk in chronic obstructive pulmonary disease: role of inflammation and other mediators[J]. *Can J Cardiol*, 2012, 28(6): 653-661.
- [18] Di Venere D, Pettini F, Nardi Corsalini M, et al. Correlation between parodontal indices and orthodontic retainers: prospective study in a group of 16 patients[J]. *Oral Implantol*, 2017, 10: 78-86.
- [19] Grassi FR, Grassi R, Rapone B, et al. Dimensional changes of buccal bone plate in immediate implants inserted through open flap, open flap and bone grafting, and flapless technique. A CBCT randomized controlled clinical trial[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2019, 30: 1155-1164.
- [20] Di Venere D, Nardi GM, Lacarbonara V, et al. Early mandibular canine-lateral incisor transposition: case Report[J]. *Oral Implantol*, 2017, 10: 181-189.
- [21] Di Venere D, Corsalini M, Nardi GM, et al. Obstructive site localization in patients with obstructive sleep apnea syndrome: a comparison between otolaryngologic data and cephalometric values[J]. *Oral Implantol*, 2017, 10: 295-310.
- [22] Grassi FR, Rapone B, Scarano Catanzaro F, et al. Effectiveness of computer-assisted anesthetic delivery system (STA™) in dental implant surgery: a prospective study[J]. *Oral Implantol*, 2017, 10: 381-389.
- [23] 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.
- [24] Lee SH, Kim CH, Yang KS, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1 α in lung tissue of patients with chronic bronchitis[J]. Clin Biochem, 2014, 47: 552-559.
- [25] Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(4): 253-265.
- [26] Zhang Y, Xu CB. The roles of endothelin and its receptors in cigarette smoke-associated pulmonary hypertension with chronic lung disease[J]. Pathol Res Pract, 2020, 216(9): 153083.
- [27] 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.
- [28] Li JS, Xie Y, Li SY, et al. Comparison of conventional medicine, TCM treatment, and combination of both conventional medicine and TCM treatment for patients with chronic obstructive pulmonary disease: study protocol of a randomized comparative effectiveness research trial[J]. Trials, 2014, 15: 153.
- [29] Li JS, Li SY, Xie Y, et al. The effective evaluation on symptoms and quality of life of chronic obstructive pulmonary disease patients treated by comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns[J]. Complement Ther Med, 2013, 21(6): 595-602.
- [30] 吕明圣, 张沂, 张迪, 等. 中医药多靶点干预慢性阻塞性肺疾病机制研究概述[J]. 中医杂志, 2019, 60(19): 1697-1700.
- [31] Tian Y, Li Y, Li JS, et al. Bufei Yishen Granule combined with acupoint sticking improves pulmonary function and morphometry in chronic obstructive pulmonary disease rats[J]. BMC Complement Alternat Med, 2015, 15: 266.
- [32] Tian Y, Li JS, Li Y, et al. Effects of Bufei Yishen Granules combined with acupoint sticking therapy on pulmonary surfactant proteins in chronic obstructive pulmonary disease rats[J]. Biomed Res Int, 2016: 8786235.
- [33] Tian Y, Li Y, Li JS, et al. Bufei Yishen 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.
- [34] Li Y, Li JS, Li WW, et al. Long-term effects of three Tiao-Bu Fei-Shen therapies on NF- κ B/TGF- β 1/smad2 signaling in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. BMC Complement Alternat Med, 2014, 14: 140.
- [35] 李亚, 王元元, 李建生, 等. 调补肺肾法对 COPD 大鼠肺组织胶原和基质金属蛋白酶的影响及远后效应[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 615-619.
- [36] Li Y, Tian YG, Li JS, et al. Bufei Yishen Granules combined with acupoint sticking therapy suppress oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease rats: Via regulating peroxisome proliferator-activated receptor-gamma signaling[J]. Ethnopharmacology, 2016, 193: 354-361.
- [37] 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⁺CD25⁺ 的影响及远后效应[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(11): 1569-1575.
- [38] Li JS, Zhao P, Yang L, et al. System biology analysis of long-term effect and mechanism of Bufei Yishen on COPD revealed by system pharmacology and 3-omics profiling[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25492.
- [39] Zhao P, Li JS, Li Y, et al. Systems pharmacology-based approach for dissecting the active ingredients and potential targets of the Chinese herbal Bufei Jianpi Formula for the treatment of COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015, 10: 2633-2656.
- [40] 张伯礼, 王永炎, 商洪才. 组分配伍研制现代中药的理论和方[J]. 继续医学教育, 2006, 20(19): 89-91.
- [41] Li J, Ma J, Tian Y, et al. Effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula II inhibits mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease rats by regulating EGFR/PI3K/mTOR signaling[J]. Ethnopharmacology, 2020, 257: 112796.
- [42] Li JS, Liu XF, Dong HR, et al. Effective-constituent compatibility-based analysis of Bufei Yishen Formula, a traditional herbal compound as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Integr Med J, 2020, 18(4): 351-362.

(收稿: 2020-12-01 在线: 2021-08-02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶