

· 基础研究 ·

利金方对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型
JAK2-STAT3-RORyt 信号通路的影响陈斯宁¹ 李瑞祥¹ 黎展华¹ 黄文锋² 冯玉青³ 王浩舟¹

摘要 **目的** 探讨利金方对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠炎症细胞抑制作用的影响。**方法** 将 105 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为 7 组: 空白组、模型组、利金方低剂量组、利金方中剂量组、利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组, 每组 15 只。除空白组外, 其余各组通过烟熏等复合因素建立 COPD 大鼠模型。造模结束后, 空白组、模型组给予生理盐水灌胃, 利金方低剂量 (3 g/mL) 组、利金方中剂量 (10.5 g/mL) 组、利金方高剂量 (21 g/mL) 组分别给予不同浓度利金方灌胃, JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组分别予酪氨酸磷酸化抑制剂 (AG490) 试剂和 STAT3 信号传导通路抑制剂 (WP1193) 试剂腹腔注射。给药 7 天后, 分别检测大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达, 肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达以及大鼠血清与支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 IL-17 含量。**结果** 与空白组比较, 模型组肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达与肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达, 及血清与 BALF 中 IL-17 分泌均升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 用药组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达和肺组织 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达以及大鼠血清、BALF 中 IL-17 含量均下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与利金方低剂量组比较, 利金方高剂量组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达和肺组织 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达以及大鼠血清、BALF 中 IL-17 含量均下降 ($P<0.01$); 与利金方中剂量组比较, 利金方高剂量组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达和肺组织 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达以及大鼠血清、BALF 中 IL-17 含量均下降 ($P<0.01$)。**结论** 利金方能够通过调控细胞免疫中上游 JAK2-STAT3-RORyt 信号通路, 抑制炎症细胞分泌从而起到抗免疫炎症作用。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 利金方; JAK2; STAT3; RORyt; 信号通路; 中药

Effect of Lijin Recipe on JAK2-STAT3-RORYT Signaling Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat Model CHEN Si-ning¹, LI Rui-xiang¹, LI Zhan-hua¹, HUANG Wen-feng², FENG Yu-qing³, and WANG Hao-zhou¹ 1 Department of Respiratory Medicine, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001); 2 Department of Intensive Care, Qingyuan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong (511500); 3 Department of Clinical Laboratory, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning (530001)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Lijin Recipe (LJR) on the inhibition of inflammatory cells in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats. **Methods** A total of 105 SPF Wistar rats were randomly divided into 7 groups: blank group, model group, low, medium, high dose LJR groups, JAK2 inhibitor group, and STAT3 inhibitor group, 15 rats in each group. Except blank group, COPD rat model was established in the other groups by smoking and other compound factors. After modeling rats in blank group and model group were intragastrically given normal saline. Rats in each LJR groups were intragastrically given different concentrations

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81760853)

作者单位: 1. 广西中医药大学附属瑞康医院呼吸内科 (南宁 530001); 2. 广东省清远市中医医院重症医学科 (广东 511500); 3. 广西中医药大学附属瑞康医院检验科 (南宁 530001)

通讯作者: 李瑞祥, Tel: 0771-2188006, E-mail: 283723081@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20210717.183

of LJR (3, 10.5, 21 g/mL, respectively). JAK2 inhibitor group and STAT3 inhibitor group were intraperitoneally injected with tyrosine phosphorylation inhibitor (AG490) reagent and STAT3 signaling pathway inhibitor (WP1193) reagent respectively. After 7 days of administration, protein expressions of JAK2, STAT3, p-STAT3, and RORYT in lung tissue, mRNA expressions of JAK2, STAT3, and RORYT in lung tissue, and the IL-17 content in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats were detected. **Results** Compared with the blank group, protein expressions of JAK2, STAT3, p-STAT3, and RORYT in lung tissues, mRNA expressions of JAK2, STAT3, and RORYT in lung tissues, IL-17 secretion in serum and BALF increased (all $P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, protein expressions of JAK2, STAT3, p-STAT3, and RORYT in lung tissue, and mRNA expressions of JAK2, STAT3, and RORYT in lung tissue, the content of IL-17 in BALF and serum decreased in each treatment group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with low dose LJR group, protein expressions of JAK2, STAT3, p-STAT3, and RORYT, mRNA expressions of JAK2, STAT3, and RORYT in lung tissues, and the content of IL-17 in serum and BALF decreased in high dose LJR group (all $P < 0.01$). Compared with the medium dose LJR group, protein expressions of JAK2, STAT3, p-STAT3, and RORYT, mRNA expressions of JAK2, STAT3, and RORYT in lung tissue, and the content of IL-17 in serum and BALF decreased in high dose LJR group (all $P < 0.01$). **Conclusion** LJR inhibited the secretion of inflammatory cells to play an anti-inflammatory role in treating COPD by regulating the JAK2-STAT3-RORYT signaling pathway in the middle and upper reaches of cellular immunity.

KEYWORDS chronic obstructive pulmonary disease; Lijin Recipe; JAK2; STAT3; RORYt; signaling pathway; Chinese herbal drugs

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种严重危害人类健康的常见病, 严重影响患者的生活质量, 是导致死亡的重要病因, 并给患者及其家庭以及社会带来沉重的经济负担^[1]。在中国, COPD 成为居民死亡第三健康杀手^[2]。2018 年中国大型流行病学调查发现, 我国 40 岁以上人群 COPD 患病率达到 13.6%^[3], 较 2007 年 (8.2%)^[4] 明显增高。COPD 防治工作越来越受重视, 已成为健康中国 2030 重要目标。前期动物实验中发现利金方可通过下调血清及支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中白三烯 B4 (leukotriene B4, LTB4)、白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达以抑制气道炎症, 减轻 COPD 大鼠肺部炎症^[5,6]。在临床研究中证实利金方对 COPD 稳定期肺气虚证患者有较好疗效, 且能提高患者外周血 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 及 IgA、IgG、IgM 水平, 说明利金方能提高 COPD 稳定期肺气虚证患者细胞免疫和体液免疫功能^[7,8]。但有关利金方抑制 CD4⁺T 细胞分化为辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th17) 介导的 COPD 免疫炎症的细胞分子机制尚不清楚, 利金方是否能够通过 JAK2-STAT3-RORYt 信号通路抑制 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化从而起到抗炎作用, 需要实验的进一步证实。本实验观察利金方调控 COPD 大鼠模型

JAK2-STAT3-RORYt 信号通路影响, 探讨中医药治疗 COPD 的抗免疫炎症机制, 为防治 COPD 提供新的靶点。

材料与方法

1 动物 7 周龄健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 105 只, 体重 180~200 g。由长沙市天勤生物技术有限公司提供 [许可证书: SCXK (湘) 2014-0011]; 实验前 1 周将大鼠置于实验环境中饲养 (室温 24~28 °C, 空气流通好, 颗粒麦麸喂养。饲养笼具、饲料、饮水均按 SPF 级实验动物的要求进行制备和消毒)。本实验通过广西中医药大学动物实验伦理审查 (No. DW20180525-040)。

2 药物 利金方 (组成: 党参 10 g 黄芪 15 g 麦冬 10 g 五味子 6 g 紫菀 10 g 川贝母 6 g 蛤蚧 10 g 白术 10 g 防风 10 g 茯苓 10 g 陈皮 6 g 甘草 6 g, 广西中医药大学附属瑞康医院药剂科提供), 水煎浓缩为每毫升含生药 1.5 g 的浓缩液。

3 主要试剂及仪器 JAK2 抑制剂: 酪氨酸磷酸化抑制剂 (AG490) 试剂 (上海雅吉生物科技有限公司, 批号: S1509)。STAT3 抑制剂: STAT3 信号传导通路抑制剂 (WP1193, 上海熹垣生物提供, 批号: XY-420151-10MG)。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS): 美国 Sigma 公司, 批号: L8274; 真龙牌香烟: 广西中烟工业有限责任公司, 烟气烟碱量 1.2 mg,

焦油含量 11 mg; IL-17 ELISA 检测试剂: 上海远慕生物科技有限公司, 批号: YM-QP10190; Jak2 (D2E12) XP Rabbit mAb #3230 试剂: 美国 CST 公司, 批号: 3230S; PhosPho-Jak2 (Tyr1007/1008) (C80C3) Rabbit mAb #3776 试剂: 美国 CST 公司提供, 批号: 3776S; STAT3 Monoclonal Antibody (ST3-5G7) 试剂: 批号: 13-7000, PhosPho-STAT3 (Tyr705) Antibody (44-380G) 试剂: 批号: 44-380G, ROR gamma (t) Monoclonal Antibody (4G419) 试剂: 批号: MA5-16227, 均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。自制 0.6 m×0.8 m×1.2 m 透明亚克力材质烟熏箱, 箱顶部设置一直径 8 cm 小孔; 高速台式冷冻离心机(德国 Sigma 公司, Sigma 3-18KS); 微孔板恒温振荡器(杭州奥盛公司 AS-03030-00); 酶标仪[美国热电公司(THERMO) 51119000]; 蛋白垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司 1658000); 恒温水箱(上海万科仪器设备厂); QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司)。

4 动物分组及造模 Wistar 大鼠 105 只按随机数字表法分为 7 组: 空白组、模型组、利金方低剂量组、利金方中剂量组、利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组, 每组 15 只。参考文献[9]采用香烟烟雾吸入、LPS 气管内注入、冷空气刺激复合因素造模方法建立 COPD 大鼠模型, 具体方法如下: 除空白组外, 其余各组在第 1 天、14 天气管内注射脂多糖 200 μg/200 μL (1 g/L)。第 2~13 天、15~28 天, 每日上午在烟熏箱内被动吸烟, 1 次/天, 0.5 h。每天熏烟后立刻用 5℃冷空气刺激 1 h, 共 28 天。28 天后各组大鼠各随机处死两只, 进行肺组织病理学检测及大鼠肺功能测定确认建立 COPD 大鼠模型成功^[9]。

5 干预方法 造模结束后第 2 天(即第 29 天)起各组开始灌胃给药。空白组、模型组给予生理盐水 10 mL/kg 灌胃; 利金方低剂量组、利金方中剂量组、利金方高剂量组分别给予利金方药液 10.5 mL/(kg·d)、21 mL/(kg·d)、42 mL/(kg·d) 灌胃(分别相当于成人常规临床用量的 2、7、14 倍), 每组均 1 次/天, 连续灌胃 7 d; JAK2 抑制剂组: AG490 试剂, 8 mg/kg·d, 腹腔注射, 连续 7 天; STAT3 抑制剂组: WP1193 试剂, 8 mg/(kg·d), 腹腔注射, 连续 7 天。

6 取材方法 各组大鼠药物干预结束后, 用 10% 的水合氯醛(3 mL/kg)麻醉, 肺动脉采血 4 mL, -20℃保存; 切开胸部, 暴露气管及肺部, 取右下肺

肺组织置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h 备用。结扎右主支气管, 在隆突上用套管针刺至左主支气管, 以 2 mL 生理盐水灌洗左肺, 每次回收约 1.5 mL (回收率 75%), 反复灌洗 2 次, 总回收量约为 3 mL。将收集到的 BALF 离心(3 000 r/min, 5 min), 吸取上清液保存于 -20℃的冰箱中待检。随后剖取肺脏, 取左下肺保存于液氮罐中, 用于提取总 RNA 及蛋白。

7 检测指标及方法

7.1 大鼠肺组织病理及炎症反应检测 右下肺肺组织病理切片厚度为 3 μm, HE 染色, 400 倍光镜下观察小气道炎症、肺泡改变、血管炎症、血管平滑肌增殖、炎症细胞浸润等情况。COPD 特征性的病理学改变存在于气道、肺实质和肺血管系统^[1], 肺组织病理炎症评分参考文献[10], 主要观察肺组织炎症细胞的浸润程度、肺气肿、气道黏液分泌进行评分。炎症细胞浸润程度: 根据炎症和上皮脱落程度将炎症反应分 4 个等级进行评分。0 分: 未见明显炎性细胞浸润; 1 分: 主支气管周围有不等量的炎性细胞浸润(以淋巴细胞、中性粒细胞为主), 各级细支气管无明显炎性细胞浸润, 支气管结构完整; 3 分: 主支气管及各级细支气管可见大量淋巴细胞、中性粒细胞浸润, 以及不等量的单核细胞及嗜酸性粒细胞浸润, 部分细支气管腔内充满脓细胞, 并可出现管壁破坏及(或)上皮脱落; 2 分介于 1 分和 3 分之间。肺气肿程度: 根据肺泡壁变薄, 肺泡扩张, 部分融合成小囊状程度分 4 个等级进行评分。0 分: 无肺气肿病变; 1 分: 肺组织胸膜脏层下可见少量肺泡气肿; 3 分: 肺气肿病变占整个切面的 2/3 以上; 2 分介于 1 分和 3 分之间。黏液分泌程度: 根据黏液占支气管管腔的面积分为 4 个等级进行评分。0 分, 管腔内无黏液; 1 分, 黏液占管腔 1/3 面积; 2 分, 黏液占管腔 1/2 面积; 3 分, 部分全部充满管腔。

7.2 Western Blot 法检测肺组织 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达 在组织样品或细胞中加入 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂), 研磨或冰上裂解后, 超声破碎, 离心, 取上清, BCA 法检测样本蛋白浓度。按照说明书配置相应浓度的蛋白胶, 上样, 电泳, 转膜, 封闭。兔抗 Jak2 抗体、单克隆 STAT3 抗体、多克隆 p-STAT3 抗体、单克隆 RORyt 抗体均按 1:1 000 的比例稀释, 鼠抗 GAPDH 内参抗体按 1:1 000 的比例稀释, 4℃过夜, 1:1 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温 1 h 孵育后进行化学发光法显影。图像处理软件对显影条带进行灰度分析, 将目的蛋白与 GAPDH 灰度值的比值作为目的蛋白的相

对表达水平。

7.3 荧光定量 PCR 检测肺组织 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达 取适量组织液氮研磨，按照相关试剂说明书提取组织细胞总 RNA，逆转录 cDNA。荧光定量 PCR 扩增反应程序：95 ℃ 预变性 2 min；95 ℃ 变性 5 s，60 ℃ 退火 30 s，共 40 个循环，采用 2^{-ΔΔCt} 法分析各组相对表达量。见表 1。

表 1 PCR 引物序列

基因	引物序列 5'-3'	引物长度 (bp)
GAPDH	上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	20
	下游 TTTGAGGGTGCAGCGAAGCTT	20
JAK2	上游 GAAAAGGACATCAGTGGCAAGA	22
	下游 GTAGAGGTAGACAGTGGGGATAC	24
STAT3	上游 GTAGCCCTAAGGACTTCAACA	21
	下游 ATCTTTCGGCTTTGGAGGAC	20
RORyt	上游 AGACCCACACCTCACAAATCG	21
	下游 TTCGGTCAATGGGGCAGTTC	20

7.4 ELISA 检测大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量 集各组大鼠的血清及 BALF，根据 ELISA 试剂盒说明书进行相关实验操作，检测各组大鼠的血清及 BALF 中 IL-17 含量。

8 统计学方法 采用统计软件包 SPSS 22.0 进行统计学处理，各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用 One-Way ANOVA 法分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 动物一般状况 实验结束时，空白组大鼠精神状态好，发育正常，无气促、咳嗽等。其余各组大鼠均有不同程度出现精神状态欠佳，活动性差，被毛脱落，饮食减少，体重增长缓慢，呼吸急促，咳嗽等症状，经药物干预后利金方低剂量组、利金方中剂量组、利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组大鼠症状逐渐减轻，精神状态、活动性、饮食

情况等较模型组改善。实验过程中，各组大鼠除确认造模各处死 2 只外，空白组死亡 1 只，模型组、利金方中剂量组、利金方高剂量组大鼠各死亡 2 只。

2 各组大鼠肺组织 HE 染色及病变半定量分析 (图 1，表 2) 空白组大鼠肺结构完整，肺泡大小正常，无明显炎症细胞浸润。模型组大鼠肺泡扩大并融合成肺大泡，可见较多炎症细胞浸润。利金方低剂量组、利金方中剂量组大鼠肺泡扩大、肺大泡形成，炎症细胞浸润，气道内可见炎性分泌物，其镜下改变较模型组减轻。利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组见大鼠肺大泡形成，炎症细胞浸润，镜下病理改变较利金方低剂量组和利金方中剂量组减轻。病理炎性反应、肺气肿、黏液分泌、总分各项评分，模型组高于空白组 ($P < 0.01$)，用药组大鼠各项评分 (除利金方低、中剂量组肺气肿评分外) 与模型组比较均下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与利金方低、中剂量组比较，利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组大鼠评分降低 ($P < 0.01$)；利金方低剂量组与利金方中剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、

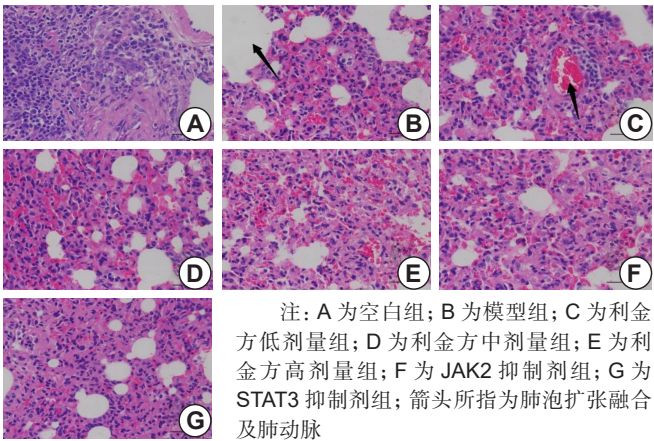


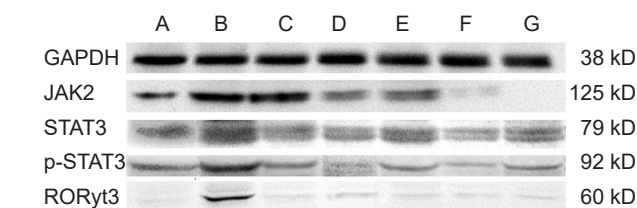
图 1 各组大鼠肺组织病理改变 (HE, ×400)
STAT3 抑制剂组大鼠评分组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织病理炎性反应评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	炎性反应	肺气肿	黏液分泌	总分
空白	12	0.95 ± 0.24	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.14	1.20 ± 0.18
模型	11	2.85 ± 0.14*	2.64 ± 0.33*	3.02 ± 0.21*	8.57 ± 0.37*
利金方低剂量	13	2.24 ± 0.18 [△]	2.51 ± 0.37	2.56 ± 0.35 [△]	7.31 ± 0.76 [△]
利金方中剂量	11	2.19 ± 0.20 [△]	2.52 ± 0.41	2.55 ± 0.44 [△]	7.40 ± 0.54 [△]
利金方高剂量	11	1.61 ± 0.21 ^{△△▲○}	1.75 ± 0.21 ^{△△▲○}	1.11 ± 0.15 ^{△△▲○}	4.24 ± 0.36 ^{△△▲○}
JAK2 抑制剂	13	1.58 ± 0.26 ^{△△▲○}	1.72 ± 0.19 ^{△△▲○}	0.98 ± 0.21 ^{△△▲○}	4.17 ± 0.58 ^{△△▲○}
STAT3 抑制剂	13	1.57 ± 0.41 ^{△△▲○}	1.80 ± 0.13 ^{△△▲○}	1.05 ± 0.17 ^{△△▲○}	4.25 ± 0.53 ^{△△▲○}

注：与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与利金方低剂量组比较，[▲] $P < 0.01$ ；与利金方中剂量组比较，[○] $P < 0.01$

3 各组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白水平比较 (图 2, 表 3) 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 用药组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与利金方低、中剂量组比较, 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白表达下降 ($P<0.01$); 利金方低、中剂量组两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为空白组; B 为模型组; C 为利金方低剂量组; D 为利金方中剂量组; E 为利金方高剂量组; F 为 JAK2 抑制剂组; G 为 STAT3 抑制剂组

图 2 各组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、P-STAT3、RORyt 蛋白表达电泳图

4 各组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 水平比较 (表 4) 与空白组比较, 模型组大

鼠肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 用药组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 水平下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与利金方低、中剂量组比较, 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 水平下降 ($P<0.01$); 利金方低、中剂量组两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组 3 组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

5 各组大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量比较 (表 5) 与空白组比较, 模型组大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 用药组大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量下降 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与利金方低、中剂量组比较, 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量下降 ($P<0.01$); 利金方低、中剂量组两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

讨 论

JAK2-STAT3-RORyt 信号通路是近年来发现的一条由细胞因子刺激的信号转导通路, 参与细胞的增殖、分化、凋亡以及免疫调节等许多重要的生物学过

表 3 各组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、P-STAT3、RORyt 蛋白表达的相对表达量比较 (目的蛋白/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	JAK2/GAPDH	STAT3/GAPDH	P-STAT3/GAPDH	RORyt/GAPDH
空白	12	0.32 ± 0.08	0.28 ± 0.09	0.21 ± 0.06	0.20 ± 0.08
模型	11	0.95 ± 0.06*	0.91 ± 0.10*	0.82 ± 0.07*	0.78 ± 0.06*
利金方低剂量	13	0.76 ± 0.09 [△]	0.62 ± 0.08 [△]	0.61 ± 0.08 [△]	0.54 ± 0.06 [△]
利金方中剂量	11	0.51 ± 0.06 [△]	0.59 ± 0.11 [△]	0.58 ± 0.04 [△]	0.56 ± 0.08 [△]
利金方高剂量	11	0.40 ± 0.05 ^{△△▲○}	0.42 ± 0.08 ^{△△▲○}	0.36 ± 0.05 ^{△△▲○}	0.42 ± 0.04 ^{△△▲○}
JAK2 抑制剂	13	0.24 ± 0.07 ^{△△▲○}	0.40 ± 0.06 ^{△△▲○}	0.40 ± 0.05 ^{△△▲○}	0.45 ± 0.05 ^{△△▲○}
STAT3 抑制剂	13	0.19 ± 0.04 ^{△△▲○}	0.41 ± 0.07 ^{△△▲○}	0.37 ± 0.06 ^{△△▲○}	0.43 ± 0.07 ^{△△▲○}

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与利金方低剂量组比较, [▲] $P<0.01$; 与利金方中剂量组比较, [○] $P<0.01$

表 4 各组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 水平比较 (相对表达量, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	JAK2	STAT3	RORyt
空白	12	1.22 ± 0.09	1.20 ± 0.08	1.23 ± 0.05
模型	11	1.84 ± 0.07*	1.93 ± 0.12*	1.88 ± 0.11*
利金方低剂量	13	1.61 ± 0.05 [△]	1.59 ± 0.06 [△]	1.61 ± 0.09 [△]
利金方中剂量	11	1.62 ± 0.08 [△]	1.60 ± 0.08 [△]	1.59 ± 0.08 [△]
利金方高剂量	11	1.34 ± 0.06 ^{△△▲○}	1.41 ± 0.09 ^{△△▲○}	1.37 ± 0.05 ^{△△▲○}
JAK2 抑制剂	13	1.33 ± 0.09 ^{△△▲○}	1.39 ± 0.15 ^{△△▲○}	1.36 ± 0.12 ^{△△▲○}
STAT3 抑制剂	13	1.35 ± 0.07 ^{△△▲○}	1.42 ± 0.07 ^{△△▲○}	1.38 ± 0.04 ^{△△▲○}

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与利金方低剂量组比较, [▲] $P<0.01$; 与利金方中剂量组比较, [○] $P<0.01$

表 5 各组大鼠血清及 BALF 中 IL-17 含量比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 IL-17	BALF IL-17
空白	12	3.34 ± 0.20	9.67 ± 1.11
模型	11	9.21 ± 0.19*	18.98 ± 1.17*
利金方低剂量	13	6.15 ± 0.24 [△]	12.11 ± 1.25 [△]
利金方中剂量	11	6.07 ± 0.17 [△]	11.75 ± 1.30 [△]
利金方高剂量	11	4.62 ± 0.21 ^{△△△○}	7.94 ± 1.21 ^{△△△○}
JAK2 抑制剂	13	4.11 ± 0.18 ^{△△△○}	8.05 ± 1.20 ^{△△△○}
STAT3 抑制剂	13	4.28 ± 0.22 ^{△△△○}	8.19 ± 1.18 ^{△△△○}

注:与空白组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与利金方低剂量组比较, $\Delta P < 0.01$;与利金方中剂量组比较, $\circ P < 0.01$

程,它主要由 3 个成分组成,即酪氨酸激酶相关受体、酪氨酸激酶 (Janus kinase, JAK) 和转录因子 (Signal transducers and activators of transcription, STAT) [11]。研究发现,IL-6 和细胞膜酪氨酸激酶相关受体结合后激活酪氨酸激酶 2 (JAK2),接着使转录因子 3 (STAT3) 磷酸化,变成 p-STAT3 复合物。p-STAT3 复合物进入细胞核内激活孤独核受体 (RORyt),这一信号通路激活使 CD4⁺T 细胞转化为 Th17 细胞并分泌大量的 IL-17 [12]。Park JS 等 [13] 研究发现,在小鼠自身免疫性关节炎模型中,IL-6 可刺激 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化从而产生以 IL-17 为主的炎症介质发生炎症反应,而 JAK2 抑制剂 AG490 可以通过抑制 JAK2-STAT3 途径从而抑制 IL-6 介导的 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化的过程。Betts BC 等 [14] 证实在小鼠骨髓移植急性移植物抗宿主病中,CD4⁺T 细胞中的 p-STAT3 Y705 明显增加,RORyt Th17 细胞数量明显增多;此研究表明 CD4⁺T 细胞通过 JAK2-STAT3-RORyt 途径分化为 Th17 细胞并在组织中积累与急性移植物抗宿主病的发病、严重程度及治疗效果密切相关。由此可知,JAK2-STAT3-RORyt 信号通路在多种免疫性疾病中介导 CD4⁺T 细胞分化为 Th17 细胞并进一步促进炎症形成均有重要的调控作用。

COPD 归属于中医学“喘证”“肺胀”等病范畴,其病机特点是本虚标实,本虚以肺脾肾虚损为主,标实以痰瘀为主。肺气虚证是 COPD 及其合并症中最常见的证型,它直接影响 COPD 的发生发展,并贯穿于 COPD 的整个病程中 [15]。因此,对 COPD 患者在肺气虚时期早期积极治疗,对于阻止或减缓其病情发展具有重要的意义。目前中医药对 COPD 治疗取得不错疗效,且中医药对 COPD 的干预是多靶点的,并能减少长期使用西药的依赖性及不良反应,改善患者生活质量。包永生等 [16] 通过研究二陈汤加味对 COPD 大鼠肺组织 GATA3、T-bet mRNA 表达的

影响,发现二陈汤加味能抑制 T-bet,兴奋 GATA3 的蛋白和 mRNA 表达,来减轻 COPD 大鼠肺组织炎症,阻止 COPD 的免疫紊乱。周林水等 [17] 发现肺脾颗粒能通过调节 Th17/Treg 平衡而改善 COPD 患者免疫相关炎症状况。利金方 (由党参、黄芪、麦冬、五味子、紫菀、川贝、蛤蚧、白术、防风、茯苓、陈皮、甘草组成) 为广西名中医陈斯宁教授以《医学正传》古籍文献中“六君子汤”为基础,结合长期临床经验而总结出来的治疗 COPD 肺气虚证患者的有效经验方,具有补肺固卫、健脾化痰的功效。前期临床研究中证实利金方对 COPD 稳定期肺气虚证患者有较好疗效,可明显减轻症状,改善肺功能,提高运动耐力及生活质量 [8,18]。

此研究结果表明,烟熏等复合因素法能复制 COPD 大鼠蛋白模型。模型组大鼠肺组织中不管是 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 蛋白及 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达,还是大鼠血清和 BALF 中 IL-17 含量均较空白组明显升高,说明烟熏复合因素法能刺激炎症因子的产生。经药物干预后,用药组大鼠肺组织中 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 的蛋白及肺组织中 JAK2、STAT3、RORyt mRNA 表达均能下降,血清及 BALF 中 IL-17 含量也较模型组下降,其中以利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组下降明显,且优于利金方低剂量组、利金方中剂量组;利金方高剂量组、JAK2 抑制剂组、STAT3 抑制剂组各指标水平差异无统计学意义,利金方低剂量组、利金方中剂量组指标水平基本一致,说明利金方能抑制 JAK2、STAT3、p-STAT3、RORyt 的蛋白表达及 JAK2、STAT3、RORyt 的 mRNA 表达,降低大鼠血清及 BALF 中 IL-17 的含量,且随着利金方浓度的增加,效果越明显,当其达到成人常规临床用量的 14 倍 (即高剂量) 的时候具有同使用 AG490 试剂、WP1193 试剂干预同样的效果。总体而言,利金方具有抑制 JAK2-STAT3-RORyt 信号通路蛋白、mRNA 表达,降低炎症因子 IL-17 分泌,且与剂量相关,当其达到成人常规临床用量的 14 倍效果最佳。

综上所述,利金方能通过调控细胞免疫中上游信号转导通路 JAK2-STAT3-RORyt 干预 CD4⁺T 细胞向 Th17 细胞分化,减少炎症因子分泌,从而抑制免疫炎症反应。为中医药突破 COPD 抗炎及免疫调节的治疗提供有力的证据及新的方向。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组, 中国医师协会呼吸医师分会慢性阻塞性肺疾病工作委员会. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2021 年修订版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021, 44 (3): 170-205.
- [2] 中国老年医学学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 中国老年慢性阻塞性肺疾病临床诊治实践指南 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43 (2): 100-119.
- [3] Fang L, Gao P, Bao H, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in China: a nationwide prevalence study[J]. Lancet Respir Med, 2018, 6 (6): 421-430.
- [4] Zhong N, Wang C, Yao W, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in China: a large population-based survey[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176 (8): 753-760.
- [5] 陈斯宁, 黄美杏, 潘玲, 等. 利金方对 COPD 稳定期肺气虚证患者免疫功能影响的研究 [J]. 甘肃中医, 2007, 20 (12): 25-26.
- [6] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠 IL-8 及 TNF- α 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2009, 18 (6): 939-941.
- [7] 陈斯宁, 黄美杏, 龙学明, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病大鼠 LTB₄ 表达及气道炎症的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27 (7): 1410-1420.
- [8] 陈斯宁, 谭玉萍, 李瑞祥, 等. 利金方联合噻托溴铵治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的远期疗效观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (6): 577-580.
- [9] 王玮, 王琦, 张永生, 等. 香烟联合脂多糖建立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (9): 3866-3871.
- [10] 刘君波, 黄梦珊, 余晨曦, 等. 气管内反复滴入脂多糖建立大鼠慢性阻塞性肺疾病模型 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19 (2): 129-133.
- [11] 谷蕾, 张丽军, 刘立芳, 等. JAK/STAT 信号通路抑制剂与肺癌 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26 (2): 314-317.
- [12] Hirano T. Zinc suppresses Th17 development via inhibition of STAT3 activation[J]. Int Immunol, 2010, 22 (5): 375-386.
- [13] Park JS, Lee J, Lim MA, et al. JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells[J]. J Immunol, 2014, 192 (9): 4417-4424.
- [14] Betts BC, Sagatys EM, Veerapathran A, et al. CD4⁺T cell STAT3 phosphorylation precedes acute GVHD, and subsequent Th17 tissue invasion correlates with GVHD severity and therapeutic response[J]. J Leukocyte Bio, 2015, 97 (4): 807-819.
- [15] 吴孝政, 王振兴, 刘丽耘, 等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期中医证候分布规律与 GOLD2017 综合评估的相关性探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46 (3): 562-566.
- [16] 包永生, 谢文英, 王俊月, 等. 二陈汤加味对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织 GATA3, T-bet mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (23): 19-25.
- [17] 周林水, 王真, 朱渊红, 等. 利肺健脾颗粒对慢性阻塞性肺疾病稳定期肺脾气虚患者 Th17/Treg 平衡的影响 [J]. 新中医, 2019, 51 (9): 106-109.
- [18] 陈斯宁, 谭玉萍, 李瑞祥, 等. 利金方联合噻托溴铵治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的远期疗效观察 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (6): 577-580.
- [19] 陈斯宁, 谭玉萍, 王朝晖, 等. 利金方对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者的综合评价研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27 (10): 2448-2449.

(收稿: 2021-02-24 在线: 2021-11-02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶