

· 基础研究 ·

补肺益肾组分方对 PM_{2.5} 诱发慢性阻塞性肺疾病加重模型大鼠上皮 - 间质转化的影响贺薇静¹ 赵 鹏^{1, 2} 李建生¹ 王 晶^{1, 2}

摘要 目的 观察 PM_{2.5} 及补肺益肾组分方对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠上皮 - 间质转化 (EMT) 的作用, 并探讨其作用机制。方法 将 50 只健康 SD 大鼠随机分为: 空白组、COPD 组、大气颗粒物 (PM_{2.5}) 组、补肺益肾组分方组 (组分方组) 和氨茶碱组, 每组 10 只。除空白组外采用香烟熏吸联合反复克雷伯杆菌感染制备 COPD 大鼠模型, 除空白组和 COPD 组外以大气实时浓缩 PM_{2.5} 对其进行全身暴露。自暴露第 1 天起, 组分方组和氨茶碱组分别给予补肺益肾组分方 [6.48 mg/(kg·d)] 或氨茶碱 [54 mg/(kg·d)] 灌胃, 其余各组给予生理盐水, 1 次/天, 持续 8 周。检测大鼠最大呼气中期流速 (MMEF) 和功能残气量 (FRC); 免疫组化法检测肺组织 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原蛋白 (COL I)、III 型胶原蛋白 (COL III) 表达; Western Blot 检测肺组织 E-钙黏附蛋白 (E-cad)、N-钙黏附蛋白 (N-cad)、 α -SMA、COL I、Smad 家族成员 (Smad) 4、p-Smad2/3 表达; ELISA 法检测血清和肺组织匀浆中 TGF- β 1 水平。结果 与空白组比较, COPD 组 MMEF 及 E-cad 蛋白表达降低, FRC、TGF- β 1 水平及 α -SMA、COL I、COL III、 α -SMA、p-Smad3、Smad4 蛋白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$); PM_{2.5} 组 MMEF 及 E-cad 蛋白表达降低, FRC、TGF- β 1 水平及 α -SMA、COL I、COL III、N-cad、p-Smad2、p-Smad3、Smad4 蛋白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 COPD 组比较, PM_{2.5} 组 FRC、TGF- β 1 水平及 α -SMA、COL I、COL III 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 PM_{2.5} 组比较, 组分方组 MMEF 及 E-cad 表达升高, FRC、TGF- β 1 水平及 α -SMA、COL I、COL III、N-cad、p-Smad2、Smad4 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 氨茶碱组 FRC、TGF- β 1 水平及 α -SMA、COL I、COL III、p-Smad2、Smad4 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 PM_{2.5} 暴露促进 COPD 大鼠肺组织 EMT, 进一步加重肺功能损伤; 补肺益肾组分方可有效防治 PM_{2.5} 诱导的 COPD 肺组织 EMT 加重, 其机制可能与调控 TGF- β 1/Smad 通路有关。

关键词 补肺益肾组分方; 慢性阻塞性肺疾病; 大气颗粒物; 上皮 - 间质转化; Smad

Effect of the Effective-Component Compatibility of Bufeiyishen Formula on Epithelial-Mesenchymal Transition in PM_{2.5}-Aggravated Chronic Obstructive Pulmonary Diseases Rats

HE Wei-jing¹, ZHAO Peng^{1, 2}, LI Jian-sheng¹, and WANG Jing^{1, 2} ¹ Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Prevention and Treatment of Respiratory Diseases by Henan Education Ministry of P. R. China, Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046); ² Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou (450046)

ABSTRACT Objective To observe the effect of PM_{2.5} and the effective-component compatibility of Bufeiyishen Formula (ECC-BYF) on the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) rats and its possible involved mechanism. **Methods** Fifty rats

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82104807, No.81973822, No.82074403)

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, 河南省中医药防治呼吸病重点实验室 (郑州 450046); 2. 河南中医药大学中医药科学院 (郑州 450046)

通讯作者: 王 晶, Tel: 0371-65945879, E-mail: wjing2431@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20220213.096

were randomly divided into control group, COPD group, PM2.5 group, ECC-BYF and aminophylline group, 10 rats in each group. Except for the control group, the COPD rat model was established by repeated cigarette smoke inhalations and bacterial infections, then rats in all groups except for the control and COPD groups were exposed to real-time atmospheric concentrated PM2.5. Meanwhile, rats in the ECC-BYF group and aminophylline group were given ECC-BYF ($6.48 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and aminophylline ($54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by gavage, respectively, while rats in other groups were given normal saline once daily, the course was 8 weeks. The maximum expiratory flow (MMEF) and functional residual capacity (FRC) were measured. The expression levels of alpha-smooth muscle actin (α -SMA), collagen (COL) I and COL III in lung tissues were examined by immunohistochemical. Evaluation of the expressions of E-cadherin (E-cad), N-cadherin (N-cad), α -SMA, COL I, Smad4, p-Smad2/3 in lung tissues were conducted via Western Blot, and TGF- β 1 in the serum and lung tissue homogenate were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, MMEF and E-cad protein expression decreased, FRC, TGF- β 1, α -SMA, COL I, COL III, p-Smad3, Smad4 protein expression increased in the COPD group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, MMEF and E-cad protein expression decreased, FRC, TGF- β 1 content, and α -SMA, COL I, COL III, N-cad, p-Smad2, p-Smad3 and Smad4 protein expression increased in the PM2.5 group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the COPD group, FRC and TGF- β 1 content, and α -SMA, COL I and COL III protein expression increased in the PM2.5 group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the PM2.5 group, MMEF and E-cad protein expression increased, FRC, TGF- β 1 content, α -SMA, COL I, COL III, N-cad, p-Smad2, p-Smad3, and Smad4 protein expression decreased in ECC-BYF group ($P<0.05$, $P<0.01$). FRC, TGF- β 1 content, α -SMA, COL I, COL III, p-Smad2 and Smad4 protein expression decreased in aminophylline group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusions** PM2.5 exposure promotes EMT in the lung tissue of COPD rats, which markedly aggravated lung injury. ECC-BYF could alleviate the EMT of COPD rats caused by PM2.5 exposure, and the mechanism may be related to the regulation of TGF β 1/Smad pathway.

KEYWORDS effective component compatibility of Bufe Yishen Formula; chronic obstructive pulmonary disease; particulate matter; epithelial-mesenchymal transition; Smad

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是一种以持续性呼吸道症状和气流受限为特征的重大慢性疾病, 具有患病率高、死亡率高特点, 尚缺乏有效防治手段^[1]。大气颗粒物 (particulate matter, PM2.5) 暴露是 COPD 发生发展的重要危险因素之一, 研究表明, PM2.5 浓度每增加 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, COPD 住院率和病死率分别增加 3.1% 和 2.5%^[2]。课题组前期研究亦证实, PM2.5 暴露能够显著降低 COPD 模型大鼠肺功能, 加重肺组织炎症浸润和气道重塑^[3]。上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是 COPD 气道重塑和肺功能下降的重要因素, 在 COPD 患者小气道中存在明显 EMT; 香烟烟雾诱导气道上皮损伤, 使胶原蛋白、波形蛋白等间质细胞标志物高表达, 且降低 E-钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) 等上皮细胞因子^[4]。在 PM2.5 染毒小鼠肺泡灌洗液中也发现基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、过基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-2, MMP-9)、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor1, TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth

muscle actin, α -SMA) 等显著升高^[5]。可见, EMT 可能是 PM2.5 加重 COPD 的关键环节, 抑制 EMT 可作为防治 PM2.5 加重 COPD 的有效途径。

补肺益肾方是李建生教授基于所提出 COPD “正虚积损” 病机理论、针对稳定期肺肾气虚证拟定的代表性方剂, 具有补肺益肾、止咳平喘、佐以化痰祛瘀的功效, 临床疗效确切^[6-8], 且具有抗炎、抗氧化、抑制黏液高分泌等功效^[9, 10]。但鉴于其疗效物质复杂, 作用机制难以深入探析, 故课题组基于系统药理学和体内外实验验证, 在补肺益肾组分方基础上优化获得了疗效相当、成分明确的补肺益肾组分方, 由人参皂苷 Rh1、黄芪甲苷、淫羊藿苷等 5 种中药单体组成^[11-13]。前期研究已证实补肺益肾组分方可有效防治 PM2.5 暴露环境下 COPD 大鼠肺功能和肺组织病理损伤的加重, 具有抑制炎症反应、氧化应激, 缓解气道重塑等作用^[14, 15], 但其对 EMT 作用机制尚不明确。本研究以 COPD 模型大鼠为研究对象, 采用大气实时浓缩 PM2.5 暴露法, 观察 PM2.5 对 COPD 大鼠肺组织 EMT 的影响及补肺益肾组分方调控 TGF- β 1/Smad 通路抑制 EMT 防治 PM2.5 暴露加重 COPD

机制,从而为阐释中药作用机制和靶点提供有效途径,为 PM_{2.5} 致肺损伤、加重呼吸系统疾病的临床应用提供科学依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 50 只,雌雄各半,6~9 周龄,体重 (250±20) g,购于济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证编号: SCXK (鲁) 20180007。动物饲养于河南中医药大学第一附属医院中心实验室 SPF 级动物房 [No.SYXK (豫) 2017-0001],维持温度 20~25 ℃,相对湿度 50%~65%,12 h 昼夜循环,自由进食饮水。本实验获得河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会批准 (No.DWLL202103158)。

2 细菌 肺炎克雷伯杆菌 (批号: 46117) 购自中国医学细菌保藏管理中心,使用前将细菌混悬液浓度调整为 6×10^8 菌落形成单位 (colony-forming unit, CFU) /mL。

3 香烟 红旗渠过滤嘴香烟,由河南中烟工业有限责任公司生产 (烤烟型,烟碱量 1.0 mg,烟气一氧化碳含量 11 mg,焦油量 10 mg)。

4 药物 补肺益肾组分: 由以下 5 种中药单体以 6.25: 1: 1.25: 25: 1.5625 的比例组成 (专利申请号: ZL201811115372.3): 人参皂苷 Rh1 (批号: CHB180608) 购自成都克洛玛生物有限公司,川陈皮素 (批号: HL-20170312) 购自西安汇林生物科技有限公司,黄芪甲苷 (批号: MUST-17022804)、淫羊藿苷 (批号: MUST-16111710)、丹皮酚 (批号: MUST-16071405) 购自成都曼思特生物科技有限公司,临用前溶于生理盐水。氨茶碱片 (批号: 1905027) 购于山东新华制药股份有限公司,用前研末溶于生理盐水,配制成浓度为 10.8 mg/mL 的混悬液。

5 试剂与仪器 即用型 SABC-POD (兔 IgG) 试剂盒 (批号: SA1022)、DAB 显色试剂盒 (批号: AR1022)、苏木素 (批号: AR0005)、大鼠 TGF- β 1 ELISA 检测试剂盒 (批号: 2281464903) 由武汉博士德生物工程有限公司提供;兔抗大鼠 α -SMA (批号: 14395-1-AP)、I 型胶原 (collagen type-1, COL I, 批号: 14695-1-AP)、III 型胶原 (collagen type-3, COL III, 批号: 22734-1-AP) 多克隆抗体由武汉三鹰生物技术有限公司提供;BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号: 015B1072)、PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号: 03583300) 由上海雅酶生物医药科

技有限公司提供;小鼠抗大鼠 E-cad (批号: 14472)、p-Smad2 (批号: 18338) 抗体由美国 CST 提供;兔抗大鼠 N-cad (批号: 22018-1-AP)、 α -SMA (批号: 14395-1-AP) 由武汉三鹰生物技术有限公司提供;兔抗大鼠 p-Smad3 (批号: GTX50333)、Smad4 (批号: GTX17380) 由美国 GeneTex 公司提供;兔抗大鼠 COL I (批号: AF7001) 由美国 Affinity 公司提供。

PM_{2.5} 在线浓缩富集系统 (北京慧荣和科技有限公司,HRH PM286)、动物全身动态暴露系统 (北京慧荣和科技有限公司,HRH MNE1786);动物肺功能检测系统 (Buxco 公司, Fine Pointe PFT);生物显微镜及图像分析系统 (LEICA 公司, DM6000B);自动切片机 (LEICA 公司, RM2145);离心机 (北京京立离心机有限公司, LDZ5-2);全波长酶标仪 (美国赛默飞公司, MultiskanMK3);生物组织摊烤片机 (亚光医用电子技术有限公司, YT-7FB);Tissue Lyser II 样品破碎系统 (QIANG 公司);Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司);Trans-Blot Turbo System 蛋白转印系统 (BioRad 公司)。

6 分组、造模及给药 将 50 只 SD 大鼠按随机数字表法分为 5 组:空白组、COPD 组、PM_{2.5} 组、补肺益肾组分方组 (组分方组) 和氨茶碱组,每组 10 只。除空白组外,采用香烟熏吸联合反复细菌感染法制备 COPD 稳定期大鼠模型^[16]:将大鼠置于熏烟箱 (100 cm×50 cm×180 cm) 中,进行香烟烟雾暴露,烟雾浓度控制在 (3 000±500) ppm (25 支香烟),每天 2 次,每次 40 min;反复细菌感染采用肺炎克雷伯杆菌经鼻滴入,每 5 天 1 次,每次 0.1 mL 细菌悬液,持续 8 周。以肺功能下降及肺组织病理表现出肺泡壁断裂、肺气肿、炎症细胞浸润等判断 COPD 大鼠模型制备成功^[16],各组均造模成功 10 只。第 9~16 周,除空白组和 COPD 组外,采用 PM_{2.5} 在线浓缩富集系统联合动物全身动态暴露系统 (1.2 m³) 对建模成功的 COPD 大鼠进行大气实时浓缩 PM_{2.5} 全身暴露^[3],每天暴露 4 h (上午 8:00~12:00),持续 8 周,实时记录 PM_{2.5} 暴露浓度;每天无 PM_{2.5} 暴露间隙将大鼠饲养于清洁过滤空气 (PM_{2.5} 浓度 < 10 μ g/m³)。于每日 PM_{2.5} 暴露前,空白组、COPD 组和 PM_{2.5} 组给予生理盐水灌胃 (雌鼠 1.5 mL/只、雄鼠 2 mL/只);组分方组和氨茶碱组分别给予补肺益肾组分方 [6.48 mg/(kg·d)] 和氨茶碱 [54 mg/(kg·d)] 灌胃,1 次/天,持续 8 周,PM_{2.5} 末次暴露 24 h 内取材。采用等效剂量系数换算公式^[17]计算灌胃剂量:

$D_{\text{大鼠}} = D_{\text{人}} \times (HI_{\text{大鼠}} / HI_{\text{人}}) \times (W_{\text{大鼠}} / W_{\text{人}})$
2/3, D 为剂量, HI 为体型系数, W 为体重。

7 观察指标及检测方法

7.1 检测肺功能 取材前, 麻醉后行气管插管术, 采用 PFT 系统检测大鼠最大呼气中期流速 (maximal mid-expiratory flow, MMEF) 和功能残气量 (functional residual capacity, FRC)。

7.2 IHC 法检测细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积 各组随机选择 6 只大鼠进行检测。采用 10% 中性甲醛固定肺组织, 72 h 后切取 3 mm 厚肺组织块儿, 制备石蜡切片, 厚度 $4\mu\text{m}$, 经脱蜡、抗原修复、5% BSA 封闭后, 加 α -SMA (1:200)、COL I (1:50)、COL III (1:1000) 一抗 4°C 孵育过夜, 二抗室温孵育 20 min, DAB 显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析。

7.3 Western Blot 检测 E-cad、N-cad、 α -SMA、COL I、p-Smad2/3、Smad4 蛋白表达 各组随机选择 6 只大鼠进行检测。取冻存肺组织 50 mg, 剪碎加入高效 RIPA 裂解液 $500\mu\text{L}$, 经组织破碎仪破碎后, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 100°C 加热进行蛋白变性, 上样, 60 V 电泳至分离胶、80 V 至胶底 1 cm 处, 甲醇活化 PVDF 膜, 200 mA 湿转 2 h, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加 E-cad (1:2000)、N-cad (1:2000)、 α -SMA (1:2000)、COL I (1:500)、p-Smad2 (1:1000)、p-Smad3 (1:1000)、Smad4 (1:1000) 一抗 4°C 孵育过夜, 二抗 (1:5000) 室温振荡孵育 1 h, 显影并采用凝胶图像分析系统扫描分析。

7.4 ELISA 法检测血清和肺组织匀浆中

TGF- β 1 水平 大鼠腹主动脉取血, 2 500 r/min 离心 20 min, 收集血清。取冻存肺组织 50 mg 剪碎, 加入 4°C 预冷的 PBS, 经组织破碎仪破碎, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集肺组织匀浆液。采用 ELISA 法检测大鼠血清和肺组织匀浆中 TGF- β 1 水平。

8 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, 组间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 两两比较方差齐者采用最小显著值法 LSD 法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

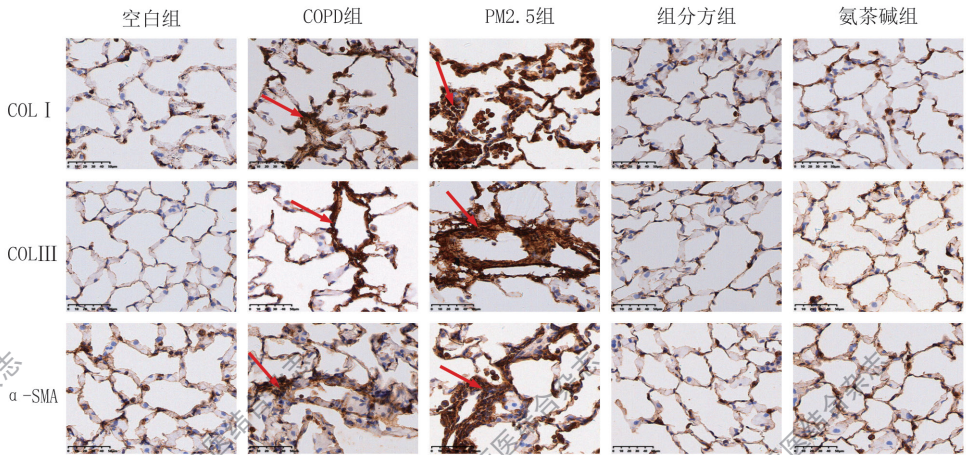
结 果

1 各组大鼠肺功能比较 (表 1) 与空白组比较, COPD 组和 PM2.5 组 MMEF 降低, FRC 升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 COPD 组比较, PM2.5 组 FRC 升高 ($P < 0.05$)。与 PM2.5 组比较, 组分方组 MMEF 升高, FRC 降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 氨茶碱组 FRC 降低 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肺功能比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	MMEF (mL/s)	FRC (mL)
空白	10	87.20 ± 3.62	3.09 ± 0.33
COPD	10	$72.71 \pm 12.67^*$	$3.72 \pm 0.35^*$
PM2.5	10	$68.72 \pm 6.77^{**}$	$4.33 \pm 0.45^{**\Delta}$
组分方	10	$86.69 \pm 9.35^\Delta$	$2.98 \pm 0.42^{\Delta\Delta}$
氨茶碱	10	80.31 ± 12.52	$2.70 \pm 0.39^{\Delta\Delta}$

注: 与空白组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 COPD 组比较, $^\Delta P < 0.05$; 与 PM2.5 组比较, $^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

2 各组大鼠肺组织 ECM 比较 (图 1, 表 2) 与空白组比较, COPD 组和 PM2.5 组大鼠肺组织 α -SMA、COL I、COL III 蛋白表达增加 ($P < 0.05$,



注: 红色箭头指示阳性表达区域

图 1 各组大鼠肺组织 ECM 比较 (免疫组化, $\times 400$)

$P<0.01$)。与 COPD 组比较, PM2.5 组 α -SMA、COL I、COL III 表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与 PM2.5 组比较, 组分方组和氨茶碱组大鼠肺组织 α -SMA、COL I、COL III 表达降低 ($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠肺组织 COL I、COL III、 α -SMA 比较 (IOD, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	COL I	COL III	α -SMA
空白	6	44.59 $\pm$ 5.61	59.76 $\pm$ 5.98	43.00 $\pm$ 0.82
COPD	6	81.89 $\pm$ 13.20**	117.45 $\pm$ 46.00*	86.27 $\pm$ 5.17**
PM2.5	6	113.43 $\pm$ 9.82** Δ	182.73 $\pm$ 3.41** Δ	144.37 $\pm$ 11.12** $\Delta\Delta$
组分方	6	46.14 $\pm$ 1.59 Δ	77.99 $\pm$ 10.05 Δ	64.00 $\pm$ 17.26 Δ
氨茶碱	6	40.54 $\pm$ 11.25 Δ	52.52 $\pm$ 0.61 Δ	29.97 $\pm$ 3.61 Δ

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 COPD 组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$; 与 PM2.5 组比较, Δ $P<0.01$

3 各组大鼠肺组织 EMT 相关指标比较 (图 2, 表 3) 与空白组比较, COPD 组和 PM2.5 组大鼠肺组织 E-cad 蛋白表达降低 ($P<0.01$), PM2.5 组 N-cad、 α -SMA 表达增加, COPD 组 α -SMA 表达增加 ($P<0.05$)。与 PM2.5 组比较, 组分方组大鼠肺组织 E-cad 表达增加, N-cad、 α -SMA、COL I 表达降低, 氨茶碱组 COL I 表达降低 ($P<0.05$)。

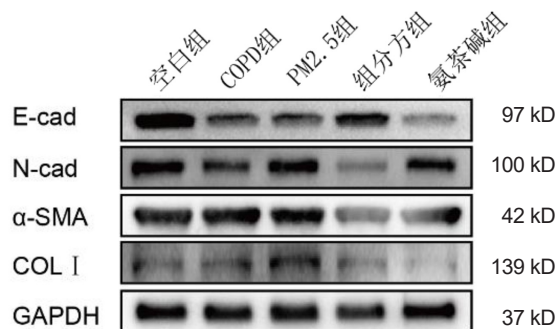


图 2 各组大鼠肺组织 E-cad、N-cad、 α -SMA、COL I 蛋白表达条带图

4 各组大鼠肺组织 TGF- β 1/smad 通路相关指标比较 (图 3, 表 4、5) 与空白组比较, COPD 组和 PM2.5 组大鼠血清和肺组织匀浆中 TGF- β 1 水平、肺组织中 p-Smad3、Smad4 蛋白表达增加 ($P<0.05$,

$P<0.01$), PM2.5 组 p-Smad2 表达增加 ($P<0.01$)。与 COPD 组比较, PM2.5 组大鼠血清和肺组织匀浆中 TGF- β 1 水平升高 ($P<0.01$)。与 PM2.5 组比较, 组分方组和氨茶碱组血清和肺组织匀浆中 TGF- β 1 水平、肺组织 p-Smad2、Smad4 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 组分方组 p-Smad3 表达降低 ($P<0.05$)。

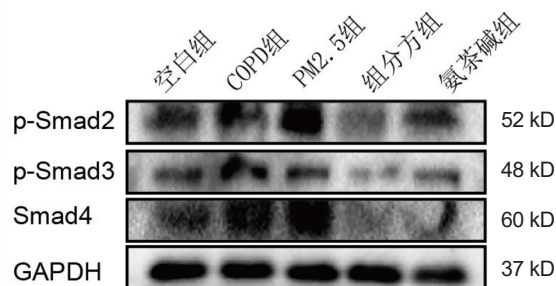


图 3 各组大鼠肺组织 TGF- β 1/smad 通路相关指标比较

表 4 各组大鼠血清和肺组织匀浆 TGF- β 1 水平 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	血清 TGF- β 1	肺组织匀浆 TGF- β 1
空白	10	2 662.83 $\pm$ 299.76	450.47 $\pm$ 39.05
COPD	10	4 409.46 $\pm$ 251.66*	660.64 $\pm$ 46.29*
PM2.5	10	5 365.31 $\pm$ 263.51* Δ	734.00 $\pm$ 11.71* Δ
组分方	10	3 975.81 $\pm$ 287.37 Δ	517.54 $\pm$ 40.45 Δ
氨茶碱	10	4 048.09 $\pm$ 272.50 Δ	507.09 $\pm$ 28.30 Δ

注: 与空白组比较, * $P<0.01$; 与 COPD 组比较, Δ $P<0.01$; 与 PM2.5 组比较, Δ $P<0.01$

讨 论

PM2.5 属中医学“外邪”范畴, 常兼燥、湿、毒邪之性。天气通于肺, 肺主皮毛、司呼吸, PM2.5 由口鼻、皮毛而入, 首先犯肺; 燥胜则干, 常见咽干、口干等; 湿性黏浊, 阻滞气机, 肺失宣降, 水液聚而为痰成饮, 常见咳、痰、喘等; 浊毒伤络, 痰浊内生, 血行瘀滞; 痰瘀毒火戕害正气, 耗气伤阴损精败血, 肺损及脾伤肾; 终致邪盛正虚, 病程迁延, 缠绵难愈。中医治疗 PM2.5 致病以“趋避霾毒, 扶正为本, 祛邪为先”为治则, 具有一定的优势和特色^[18, 19]。

补肺益肾方是课题组针对 COPD 稳定期“肺肾气虚兼痰浊血瘀”常见病机, 法以“补益肺肾佐以化

表 3 各组大鼠肺组织 EMT 相关指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	E-cad/GAPDH	N-cad/GAPDH	α -SMA/GAPDH	COL I /GAPDH
空白	6	1.30 $\pm$ 0.23	0.52 $\pm$ 0.14	0.60 $\pm$ 0.13	0.58 $\pm$ 0.11
COPD	6	0.68 $\pm$ 0.24**	0.69 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.15*	0.67 $\pm$ 0.18
PM2.5	6	0.58 $\pm$ 0.11**	0.93 $\pm$ 0.16*	1.13 $\pm$ 0.22*	0.90 $\pm$ 0.15
组分方	6	1.03 $\pm$ 0.13 Δ	0.53 $\pm$ 0.20 Δ	0.70 $\pm$ 0.17 Δ	0.51 $\pm$ 0.08 Δ
氨茶碱	6	0.64 $\pm$ 0.05	0.68 $\pm$ 0.14	0.86 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.11 Δ

注: 与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 PM2.5 组比较, Δ $P<0.05$

表 5 各组大鼠肺组织 p-Smad2、p-Smad3、Smad4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-Smad2/GAPDH	p-Smad3/GAPDH	Smad4/GAPDH
空白	6	0.40 ± 0.11	0.39 ± 0.06	0.41 ± 0.10
COPD	6	0.56 ± 0.05	0.63 ± 0.09*	0.69 ± 0.09*
PM2.5	6	0.81 ± 0.12**	0.63 ± 0.11*	0.77 ± 0.14**
组分方	6	0.45 ± 0.13 ^{△△}	0.38 ± 0.05 [△]	0.31 ± 0.06 ^{△△}
氨茶碱	6	0.53 ± 0.06 [△]	0.43 ± 0.11	0.39 ± 0.10 ^{△△}

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 PM2.5 组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

痰活血”而制定的代表性方剂，可显著降低 COPD 患者急性加重次数和程度、改善临床症状和肺功能、提高运动能力和生活质量，且具有良好的远后效应^[20-23]；在改善 PM2.5 致肺损伤大鼠肺功能和肺组织病理损伤中亦有较好的效果^[24, 25]。补肺益肾组分方是在补肺益肾方基础上优化获得的疗效明显、成分明确的中药组分方，由人参皂苷 Rh1、川陈皮素、黄芪甲苷和淫羊藿苷等 5 种中药单体组成。现代药理学证据显示，人参皂苷 Rh1 具有抗炎^[26, 27]、抗氧化^[28]、调节免疫^[29]、抑制蛋白酶活性^[30]的药理作用。黄芪甲苷在体内外实验中均可降低香烟烟雾诱导的炎症反应和氧化损伤^[31]，对于提高 PM2.5 诱导急性肺损伤大鼠生活质量、减轻肺水肿和肺组织结构损伤亦有积极作用^[32]。淫羊藿苷属于天然黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化的生物活性，可减轻香烟烟雾诱导的炎症损伤^[33]。川陈皮素、丹皮酚同样具有显著的抗炎、抗氧化活性^[34, 35]。课题组前期研究已证明，补肺益肾组分方可显著改善 PM2.5 诱导的 COPD 炎症反应、氧化应激和气道重塑等的加重^[14, 15]。

EMT 是气道重塑的重要病理环节，在 COPD 患者和吸烟人群小气道上皮存在明显 EMT 现象并与 COPD 气道重塑密切相关^[36]。PM2.5 诱导气道上皮损伤，使细胞间紧密连接和细胞极性丧失，在修复过程中 EMT 被激活，参与气道壁纤维化和增厚，加重气道重塑和肺功能进行性下降。已有研究证实，PM2.5 暴露可增强气道上皮细胞迁移和侵袭能力，激活 EMT^[37]。在 EMT 过程中，上皮细胞表型被破坏，表现为 E-cad、角蛋白等上皮细胞标志物下调而间质细胞标志物 N-cad、波形蛋白等表达上调，且损伤的上皮细胞可转移至间质中分泌细胞外基质 Fn、 α -SMA、胶原蛋白等^[38]。本研究结果显示，PM2.5 暴露可显著升高 COPD 大鼠肺组织中 N-cad、 α -SMA、COL I、COL III 表达，且降低 E-cad 表达，而补肺益肾组分方可显著改善以上指标，提高肺功能，提示补肺益肾组分方可有效抑制 PM2.5 诱导的 COPD 大鼠 EMT 的加重。

EMT 涉及多条信号通路，其中 TGF- β 1/Smad 信号传导途径是最经典的纤维化通路。TGF- β 1 被认为是诱导纤维化的“总开关”，可与气道上皮 TGF- β 受体结合并磷酸化 Smad2/3，磷酸化的 Smad2/3 与 Smad4 形成转录复合物三聚体，进入细胞核与 Smad 结合元件结合，调控细胞外基质的表达，诱导 EMT 和纤维化的发生^[38]。有研究证实，PM2.5 染毒小鼠肺组织中 TGF- β 1 水平显著升高，敲除 TGF- β 1 可显著改善肺功能，减少肺组织细胞外基质沉积，且降低 Smad2/3 磷酸化表达^[39]。COPD 全球倡议推荐使用的治疗药物氨茶碱具有抗炎、改善气道重塑的作用，可降低 COPD 患者血清 TGF- β 1 水平^[40]。课题组前期研究证实，补肺益肾方亦可显著降低 COPD 大鼠肺组织 TGF- β 1、Smad2 表达^[41]。本研究表明，补肺益肾组分方可降低 PM2.5 诱导升高的 COPD 大鼠肺组织中 TGF- β 1、p-Smad2/3、Smad4 蛋白表达，提示补肺益肾组分方可能通过 TGF- β 1/Smad 抑制 EMT 防治 PM2.5 加重 COPD。

综上，本研究基于 COPD 模型大鼠，采用大气实时浓缩 PM2.5 全身暴露法，观察 PM2.5 对 COPD 大鼠肺组织 EMT 的影响及中药补肺益肾组分方的保护作用，证实 PM2.5 暴露可激活 EMT 发生，进一步增加 COPD 大鼠肺组织细胞外基质沉积，降低肺功能，而补肺益肾组分方能够显著改善以上损伤，其机制与调控 TGF- β 1/Smad 通路抑制 EMT 有关。本研究为揭示 PM2.5 对 COPD 疾病的影响机制及寻求新的治疗策略提供了科学依据。

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 (2022 gold report) [EB/OL]. <https://goldcopd.org/2022-gold-reports/>

- [2021-11-13].
- [2] Li MH, Fan LC, Mao B, et al. Short-term exposure to ambient fine particulate matter increases hospitalizations and mortality in COPD: a systematic review and meta-analysis[J]. *Chest*, 2016, 149 (2): 447–458.
 - [3] Wang J, Li Y, Zhao P, et al. Exposure to air pollution exacerbates inflammation in rats with preexisting COPD[J]. *Mediators Inflamm*, 2020: 4260204.
 - [4] Milara J, Peiró T, Serrano A, et al. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke[J]. *Thorax*, 2013, 68 (5): 410–420.
 - [5] Wang Y, Zhang Y, Hou T, et al. PM_{2.5} induces EMT and promotes CSC properties by activating Notch pathway *in vivo* and *vitro*[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 178: 159–167.
 - [6] 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.
 - [7] 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.
 - [8] 李建生, 余学庆, 王明航, 等. 中医治疗慢性阻塞性肺疾病研究的策略与实践 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (6): 1607–1614.
 - [9] Li JS, Li Y, Li SY, 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 Integrat Med*, 2012, 10 (9): 1039–1048.
 - [10] Zhao P, Li JS, Yang LP, et al. Integration of transcriptomics, proteomics, metabolomics and systems pharmacology data to reveal the therapeutic mechanism underlying Chinese herbal Bufeiyishen formula for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (4): 5247–5257.
 - [11] Li JS, Liu XF, Dong HR, et al. Effective-constituent compatibility-based analysis of Bufeiyishen formula, a traditional herbal compound as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Integr Med*, 2020, 18 (4): 351–362.
 - [12] Li JS, Xie Y, Zhao P, et al. A chinese herbal formula ameliorates COPD by inhibiting the inflammatory response via downregulation of p65, JNK, and p38[J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153475.
 - [13] Li JS, Zhao P, Xie Y, et al. The anti-inflammatory effect of a combination of five compounds from five Chinese herbal medicines used in the treatment of COPD[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 709702.
 - [14] 王晶, 李亚, 李建生, 等. PM_{2.5}对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道重塑的影响及补肺益肾组分方的保护作用 [J]. *中医杂志*, 2021, 62 (24): 2176–2183.
 - [15] Li J, Wang J, Li Y, et al. Effective-component compatibility of Bufeiyishen formula protects COPD rats against PM_{2.5}-induced oxidative stress via miR-155/FOXO3a pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 228: 112918.
 - [16] 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: 1752–1760.
 - [17] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9 (9): 1069–1072.
 - [18] 杨欢, 李永美, 王东军, 等. 基于雾霾理论的中医诊疗探讨 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (2): 505–507.
 - [19] 周游, 张伟. 国医大师邓铁涛治疗雾霾性肺损伤经验总结 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34 (2): 609–612.
 - [20] 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.
 - [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Tian Y, Li Y, Li J, et al. Bufei Yishen granule combined with acupoint sticking improves pulmonary function and morphometry in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15: 266.
- [24] 王晶, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾系列方药对 PM 2.5 致肺损伤大鼠炎症和氧化应激的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60 (5): 415–421.
- [25] 王晶, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾方药对 PM2.5 暴露大鼠鼻腔黏液高分泌的保护作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34 (5): 1893–1897.
- [26] Lee W, Cho SH, Kim JE, et al. Suppressive effects of ginsenoside Rh1 on HMGB1-mediated septic responses [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47 (1): 119–133.
- [27] Jung JS, Shin JA, Park EM, et al. Anti-inflammatory mechanism of ginsenoside Rh1 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of the protein kinase A pathway and hemeoxygenase-1 expression [J]. *J Neurochem*, 2010, 115 (6): 1668–1680.
- [28] Park YC, Lee CH, Kang HS, et al. Ginsenoside-Rh1 and Rh2 inhibit the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 40 (4): 751–757.
- [29] Tam DNH, Truong DH, Nguyen TTH, et al. Ginsenoside Rh1: a systematic review of its pharmacological properties [J]. *Planta Med*, 2018, 84 (3): 139–152.
- [30] Jung JS, Ahn JH, Le TK, et al. Protopanaxatriol ginsenoside Rh1 inhibits the expression of matrix metalloproteinases and the *in vitro* invasion/migration of human astrogloma cells [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63 (2): 80–86.
- [31] Meiqian Z, Leying Z, Chang C. Astragaloside IV inhibits cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice [J]. *Inflammation*, 2018, 41 (5): 1671–1680.
- [32] 王振兴, 王智超, 吴雨潇, 等. 黄芪甲苷预防性给药对 PM2.5 诱导大鼠急性肺损伤病理结构的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2019, 25 (12): 1664–1667, 1733.
- [33] Li L, Sun J, Xu C, et al. Icariin ameliorates cigarette smoke induced inflammatory responses via suppression of NF-kappaB and modulation of GR *in vivo* and *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e102345.
- [34] He Z, Li X, Chen H, et al. Nobiletin attenuates lipopolysaccharide/Dgalactosamine-induced liver injury in mice by activating the Nrf2 antioxidant pathway and subsequently inhibiting NFkappaB mediated cytokine production [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14 (6): 5595–5600.
- [35] Liu MH, Lin AH, Lee HF, et al. Paeonol attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 651890.
- [36] Nowrin K, Sohal SS, Peterson G, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a fundamental underlying pathogenic process in COPD airways: fibrosis, remodeling and cancer [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2014, 8 (5): 547–559.
- [37] Xu Z, Li Z, Liao Z, et al. PM2.5 induced pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro* [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 171: 112–121.
- [38] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15 (3): 178–196.
- [39] Gu LZ, Sun H, Chen JH. Histone deacetylases 3 deletion restrains PM2.5-induced mice lung injury by regulating NF- κ B and TGF- β /Smad2/3 signaling pathways [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 756–762.
- [40] 陆小华, 张学会, 沈静妍, 等. 氨茶碱与多索茶碱对老年慢性阻塞性肺病患者气道重塑及血清激活素 A、转化生长因子 β 1 水平影响的对比研究 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26 (7): 70–73.
- [41] 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/sm2 signaling in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 140.

(收稿: 2022-04-29 在线: 2023-03-30)

责任编辑: 邱禹