

李景梅,沈婷婷,范正媛,等. 益肺炎及其联合调补肺肾三方对 COPD 稳定期大鼠气道 MUC5AC 和 MUC5B 的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 20-27.

Li JM, Shen TT, Fan ZY, et al. Effects of Yifei moxibustion and its combination with Tiao bu-Fei shen formulas on MUC5AC and MUC5B in the airways of stable COPD rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 20-27.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.003

益肺炎及其联合调补肺肾三方对 COPD 稳定期大鼠 气道 MUC5AC 和 MUC5B 的影响

李景梅^{1,2,4}, 沈婷婷^{1,2,4}, 范正媛^{1,2,4}, 李 亚^{2,3,4}, 李建生^{1,2,3}, 李素云^{2,3,4*}

(1.河南中医药大学, 郑州 450046; 2.呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046;
3.河南省中医药防治呼吸病重点实验室, 郑州 450046; 4.河南中医药大学第一附属医院中药药理
(呼吸)实验室, 郑州 450000)

【摘要】 目的 探讨益肺炎及其联合调补肺肾三方对慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 稳定期大鼠气道黏蛋白 5AC (mucin 5AC, MUC5AC) 和黏蛋白 5B (mucin 5B, MUC5B) 水平的影响, 阐明益肺炎作用机制和灸药联合是否具备治疗优势。**方法** 采用香烟烟雾暴露联合肺炎克雷伯杆菌感染法建立 COPD 稳定期大鼠模型。第 9~20 周, 空白组和模型 (COPD) 组给予生理盐水 (每只 2 mL/d)、氨茶碱组给予氨茶碱 (27 mg/(kg·d))、补肺健脾组和益肺炎+补肺健脾组给予补肺健脾方 (12.42 g/(kg·d))、补肺益肾组和益肺炎+补肺益肾组给予补肺益肾方 (11.61 g/(kg·d))、益气滋肾组和益肺炎+益气滋肾组给予益气滋肾方 (12.42 g/(kg·d)) 灌胃, 益肺炎组及灸药联合组每周益肺炎灸 2 次, 每次 10~15 min。检测大鼠肺功能、肺组织病理、以及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和呼吸道中 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达。**结果** COPD 组大鼠较空白组 Penh 水平显著升高 ($P=0.007$), 支气管管壁增厚, 管腔狭窄, 小气道和 BALF 中 MUC5AC 蛋白表达均显著升高 ($P<0.001$, $P=0.005$), MUC5B 有升高趋势 ($P>0.05$)。各治疗干预均显著降低 COPD 大鼠 Penh 以及 BALF 和呼吸道 MUC5AC 水平 ($P<0.05$), 益肺炎、调补肺肾三方和益肺炎+益气滋肾方有降低 COPD 大鼠 MUC5B 的趋势 ($P>0.05$)。灸药联合在降低 Penh、MUC5AC 或 MUC5B 气道表达、分泌方面有不同程度上的优于灸、药单独应用的趋势。**结论** 益肺炎、调补肺肾三方及其联合均可改善 COPD 大鼠气道通气功能和黏蛋白高表达、分泌, 其中, 灸药联合可能是更有效策略。

【关键词】 慢性阻塞性肺疾病; 黏液高分泌; MUC5AC; MUC5B; 益肺炎; 调补肺肾三方

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0020-08

Effects of Yifei moxibustion and its combinations with Tiao bu-Fei shen formulas on MUC5AC and MUC5B in the airways of stable COPD rats

LI Jingmei^{1,2,4}, SHEN Tingting^{1,2,4}, FAN Zhengyuan^{1,2,4}, LI Ya^{2,3,4}, LI Jiansheng^{1,2,3}, LI Suyun^{2,3,4*}

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China. 2. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R., Zhengzhou 450046. 3. Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Zhengzhou 450046.
4. the Level Three Laboratory of Respiration Pharmacology of TCM in the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【基金项目】 国家重点研发计划项目 (2018YFC1704801); 国家自然科学基金资助项目 (82074413); 中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 项目 (国中医药人教函[2018]284 号); 河南省科技研发计划联合基金项目 (222301420081)。

【作者简介】 李景梅 (1996—), 女, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病。E-mail: 2839140939@qq.com

【通信作者】 李素云 (1965—), 女, 教授, 主任医师, 研究方向: 中医药防治呼吸系统疾病临床与基础研究。E-mail: lisuyun2000@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of Yifei moxibustion and its combinations with Tiao bu-Fei shen formulas on mucin (MUC) 5AC and MUC5B in stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats, reveal the mechanism of Yifei moxibustion, and determine whether the combinations are more effective for COPD treatment. **Methods** Stable COPD rat models were established by cigarette smoke exposure combined with *Klebsiella Pneumoniae* infection. Rats in control and COPD groups were administrated normal saline (2 mL/d), while those in treatment groups were treated by gavage with the corresponding drugs (APL, 27 mg/(kg·d); BJF, 12.42 g/(kg·d); BYF, 11.61 g/(kg·d); ZSF, 12.42 g/(kg·d) or Yifei Moxibustion (twice weekly, 10~15 min/time) during week 9~20. Lung functions, pathological changes and expression of MUC5AC and MUC5B in BALF and airways were determined. **Results** Compared with control rats, COPD rats had a higher level of Penh ($P=0.007$), thickened bronchial walls, narrowed airways, higher expression of MUC5AC ($P<0.001$, $P=0.005$), and higher expression of MUC5B ($P>0.05$) in small airways and BALF. Compared with the COPD group, Penh and MUC5AC were significantly reduced in all treatment groups ($P<0.05$). MUC5B in YFM, BJ, BY, ZS, and YFM+ZS groups tended to show decreases ($P>0.05$). Additionally, combination groups tended to be superior to YFM, BJ, BY, or ZS group alone in reducing the levels of Penh, MUC5AC, or MUC5B to varying degrees. **Conclusions** Yifei moxibustion, Tiao bu-Fei shen formulas and their combinations improve the airway ventilation function and expression and secretion of mucin in the airways of COPD rats. Additionally, the combinations might be more effective.

【Keywords】 chronic obstructive pulmonary disease; mucus hypersecretion; MUC5AC; MUC5B; Yifei moxibustion; Tiao bu-Fei shen formulas

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种以持续存在的呼吸道症状和气流受限为特征的呼吸系统疾病, 受有害颗粒或气体暴露和宿主因素等影响^[1], 是全球疾病死亡原因和伤残调整生命年的重要组成部分^[2]。气道黏液高分泌是 COPD 的重要病理, 表现为慢性咳嗽、咳痰, 与呼吸道感染、频繁急性加重、肺功能加速下降、生活质量降低和死亡风险升高等关系密切^[3]。目前主要通过 N-乙酰半胱氨酸、羧甲司坦、氨溴索等药物, 以及雾化、高频胸壁振荡、戒烟等干预来促进黏液排出和减少黏液生成, 但相关药物存在一定副作用^[3-4], 亟需寻找更安全、有效的治疗方案。

中医药及其外治疗法治疗 COPD 具有良好的疗效。团队前期随机、对照临床研究发现, 对于 COPD 稳定期患者, 调补肺肾三方辨证治疗以及益肺炎干预在减少急性加重、改善临床症状和肺功能、提高运动耐力和生活质量等方面疗效确切^[5-7]。动物实验表明, 补肺益肾方抑制 COPD 大鼠气道黏液高分泌^[8]。但益肺炎作用机制及其联合调补肺肾三方是否是治疗 COPD 的更有效策略尚待研究。本研究以 COPD 稳定期大鼠为研究对象, 以肺功能、支气管病理和黏蛋白表达为观察指标, 旨在探讨益肺炎及其联合调补肺肾三方对 COPD 稳定期大鼠气道黏液高分泌的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 120 只, 雌雄各半, 8 周龄, 体重 180~220 g, 由河南省实验动物中心提供 [SCXK (豫) 2017-0001]。本实验所涉及操作在河南中医药大学第一附属医院中心实验室进行 [SYXK (豫) 2017-0001], 本实验方案经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执行 (YFYDW2020022), 实验符合 3R 原则。

1.1.2 细菌

肺炎克雷伯杆菌 (菌株号: 46114), 购自中国医学细菌保藏管理中心, 使用前调整浓度为 6×10^8 CFU/mL。

1.2 主要试剂与仪器

红旗渠过滤嘴香烟 (硬金红, 河南中烟工业有限责任公司, 烤烟型, 焦油量 10 mg, 烟碱量 1.0 mg, 烟气一氧化碳含量 12 mg); 氨茶碱片 (国药准字 H37020630, 山东新华制药股份有限公司); 清艾条 (国药准字 Z32020253, 江苏康美制药有限公司); 补肺健脾方 (黄芪、党参、白术、茯苓等)、补肺益肾方 (人参、黄芪、山茱萸、枸杞子等) 和益气滋肾方 (人参、黄精、麦冬、五味子等), 由河南中医药大学药学院药物分析实验室提供。

HE 染色试剂盒 (G1120, 北京索莱宝科技有限

公司);黏蛋白 5AC (MUC5AC) ELISA 试剂盒 (AB-C1874, 上海艾比玛特医药科技有限公司);黏蛋白 5B (MUC5B) ELISA 试剂盒 (L220112313, 武汉云克隆科技股份有限公司); MUC5AC 一抗 (E-AB-40037, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); MUC5B 一抗 (YN0881, 苏州睿瀛生物技术有限公司)。

IVC-II 型动物饲养笼具 (冯氏实验动物设备有限公司, 苏州); WBP 无束缚全身体积描记系统 (BUXCO, 美国); 生物组织石蜡切片机 (LEICA, 德国); OLYMPUS-DP70 型显微镜及显微照相系统 (Olympus, 日本) 等。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备与治疗干预

大鼠购回后适应性饲养 1 周。采用随机数字法将大鼠随机分为空白 (Control) 组、模型 (COPD) 组、氨茶碱 (Aminophylline, APL) 组、益肺灸 (Yifei moxibustion, YFM) 组、补肺健脾 (Buwei Jianpi, BJ) 组、补肺益肾 (Buwei Yishen, BY) 组、益气滋肾 (Yiqi Zishen, ZS) 组、益肺灸+补肺健脾 (Yifei moxibustion + Buwei Jianpi, YFM+BJ) 组、益肺灸+补肺益肾 (Yifei moxibustion + Buwei Yishen, YFM+BY) 组和益肺灸+益气滋肾 (Yifei moxibustion + Yiqi Zishen, YFM+ZS) 组, 共 10 组, 每组 12 只, 雌雄各半。根据参考文献^[9]并结合实验情况建立 COPD 稳定期大鼠模型。自制 95 cm×62 cm×37 cm 动物熏烟箱, 每次放入 30 只大鼠, 于造模第 1~12 周进行香烟烟雾暴露使大鼠被动吸烟, 每天 2 次, 每次 15 支香烟 (熏烟箱内烟雾浓度达到 (3000±500) ppm), 每次 30 min, 2 次香

烟烟雾暴露间隔≥3 h, 每周熏烟 6 d; 于造模第 1~8 周进行肺炎克雷伯杆菌感染, 在大鼠吸气时经鼻腔滴入肺炎克雷伯杆菌菌液 (调整菌液浓度为 6×10^8 CFU/mL, 每只 0.1 mL), 每 5 d 1 次 (固定下午), 且细菌感染当天下午不予香烟烟雾暴露。12 周结束成模。自第 9 周开始, Control 组和 COPD 组大鼠给予生理盐水 (每只 2 mL/d)、APL 组给予氨茶碱 (27 mg/(kg·d))、BJ 组和 YFM+BJ 组给予补肺健脾方 (12.42 g/(kg·d))、BY 组和 YFM+BY 组给予补肺益肾方 (11.61 g/(kg·d))、ZS 组和 YFM+ZS 组给予益气滋肾方 (12.42 g/(kg·d)) 灌胃, YFM 组及灸药联合组每周灸 2 次, 每次 10~15 min。第 20 周结束后取材。分组与治疗干预详见表 1。

等效剂量换算^[10]公式 $D_{\text{大鼠}} = D_{\text{人}} \times (HI_{\text{大鼠}}/HI_{\text{人}}) \times (W_{\text{人}}/W_{\text{大鼠}})^{2/3}$ 。D: 剂量, HI: 体型系数, W: 体重。

大鼠益肺灸操作: 以《实验针灸学》^[11]为参考进行大鼠取穴定位, 在背部找到督脉, 进行悬灸操作, 以施灸部位有温热感为宜。

1.3.2 指标测定与观察

(1) 肺功能检测

于第 20 周, 采用 WBP 无束缚全身体积描记系统检测大鼠气道狭窄指数 (Penh)。

(2) 支气管肺泡灌洗液中 MUC5AC 和 MUC5B 水平检测

结扎右主支气管, 用 3 mL 预冷 PBS 灌洗左肺, 充分回抽, 如此重复 3 次, 确保回抽左肺支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 体积大于 7 mL, 经离心 (3000 r/min, 4℃, 10 min) 取得 BALF 上清, -80℃ 保存。ELISA 法检测 MUC5AC 和

表 1 分组与治疗干预
Table 1 Grouping and therapeutic interventions

组别 Groups	第 9~20 周干预 Therapeutic interventions in week 9~20
空白组 Control group	生理盐水 2 mL/d Normal saline 2 mL/d
模型组 COPD group	生理盐水 2 mL/d Normal saline 2 mL/d
氨茶碱组 APL group	氨茶碱 27 mg/(kg·d) APL 27 mg/(kg·d)
益肺灸组 YFM group	益肺灸 2 次/周 YFM twice weekly
补肺健脾组 BJ group	补肺健脾方 12.42 g/(kg·d) BJF 12.42 g/(kg·d)
补肺益肾组 BY group	补肺益肾方 11.61 g/(kg·d) BYF 11.61 g/(kg·d)
益气滋肾组 ZS group	益气滋肾方 12.42 g/(kg·d) ZSF 12.42 g/(kg·d)
益肺灸+补肺健脾组 YFM+BJ group	益肺灸+补肺健脾方 YFM+BJF
益肺灸+补肺益肾组 YFM+BY group	益肺灸+补肺益肾方 YFM+BYF
益肺灸+益气滋肾组 YFM+ZS group	益肺灸+益气滋肾方 YFM+ZSF

MUC5B 水平。

(3) 肺组织病理

左肺制备 BALF 后,4%多聚甲醛灌注、固定、脱水,石蜡包埋和切片,进行 HE 染色,镜下观察各组肺支气管病理情况。

(4) 免疫组化

对肺组织病理切片进行 MUC5AC、MUC5B 免疫组化染色,镜下观察气道黏蛋白表达情况,采用 IPP 6.0 软件分析,结果以平均光密度 (Mean IOD) 表示。

1.4 统计学方法

所有数据采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,符合正态分布,结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),方差齐采用最小显著差异法 (Least-Significant Difference, LSD),方差不齐采用 Dunnett's T3 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠状态良好。COPD 组大鼠精神萎靡,毛色枯黄,鼻腔分泌物增多,喘息明显等。各治疗组上述症状均有不同程度改善。

2.2 肺功能

与空白组比较,COPD 组大鼠 Penh 水平显著升高 ($P<0.05$)。与 COPD 组比较,各治疗组 Penh 水平均有不同程度降低 ($P<0.05$)。治疗组间比较,YFM 组、BY 组、YFM+BJ 组、YFM+BY 组和 YFM+ZS 组 Penh 水平有低于 APL 组的趋势 ($P>0.05$);BY 组、YFM+BY 组和 YFM+ZS 组 Penh 水平有低于 YFM 组的趋势 ($P>0.05$);调补肺肾三方组中,BY 组 Penh 水平降低较为显著,但与 BJ 组和 ZS 组无统计学意义 ($P>0.05$);灸药联合组中,YFM+ZS 组 Penh 水平降低较为显著,但与 YFM+BJ 组和 YFM+BY 组无统计学意义 ($P>0.05$);YFM+BJ 方和 YFM+ZS 方在降低 Penh 方面分别有优于 BJ 方和 ZS 方的作用趋势,但无统计学意义 ($P>0.05$),见图 1。

2.3 BALF 中 MUC5AC、MUC5B 浓度

与空白组比较,COPD 组大鼠 BALF 中 MUC5AC 浓度显著升高 ($P<0.05$),MUC5B 浓度呈升高趋势 ($P>0.05$)。与 COPD 组比较,各治疗组 MUC5AC 浓度显著降低 ($P<0.05$);YFM、调补肺肾

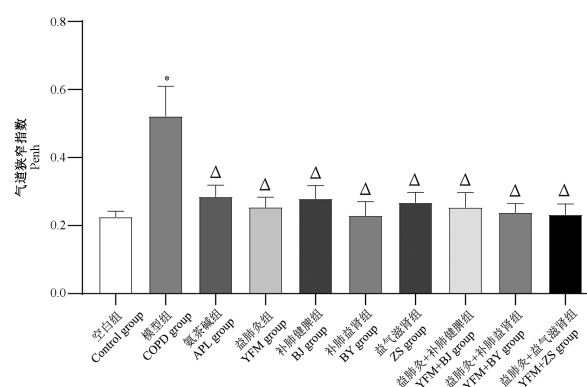
三方、YFM+BY 方和 YFM+ZS 方治疗干预均可一定程度上降低 MUC5B 浓度 ($P>0.05$)。治疗组间比较,BJ 组、ZS 组、YFM+BY 组和 YFM+ZS 组 MUC5AC 浓度显著低于 APL 组和 YFM 组 ($P<0.05$),YFM+BY 组 MUC5AC 浓度低于 BY 组 ($P<0.05$);调补肺肾三方组和 YFM+ZS 组 MUC5B 浓度有低于 APL 组和 YFM 组的趋势 ($P>0.05$),见图 2。

2.4 肺组织病理

空白组大鼠肺支气管形态基本正常。COPD 组大鼠支气管管壁增厚,管腔狭窄,炎症细胞浸润明显。各治疗组支气管病理均有不同程度的改善,见图 3。

2.5 小气道 MUC5AC、MUC5B 蛋白表达

空白组大鼠小气道管腔、上皮和黏膜下腺存在少量 MUC5AC 和 MUC5B 表达。与空白组相比,COPD 组大鼠小气道 MUC5AC 表达显著增加 ($P<0.05$),MUC5B 有增加趋势 ($P>0.05$)。与 COPD 组相比,各治疗组 MUC5AC 表达均降低 ($P<0.05$),以 YFM+BY 组和 YFM+ZS 组最为显著 ($P<0.05$);各治疗组 MUC5B 表达均有不同程度的降低趋势 ($P>0.05$)。治疗组间比较,YFM+BY 组和 YFM+ZS 组 MUC5AC 表达水平有低于 APL 组、YFM 组、BY 组和 ZS 组的趋势 ($P>0.05$);YFM+BJ 组和 YFM+ZS 组 MUC5B 表达水平有低于 YFM 组、BJ 组和 ZS 组的趋势 ($P>0.05$),见图 4。

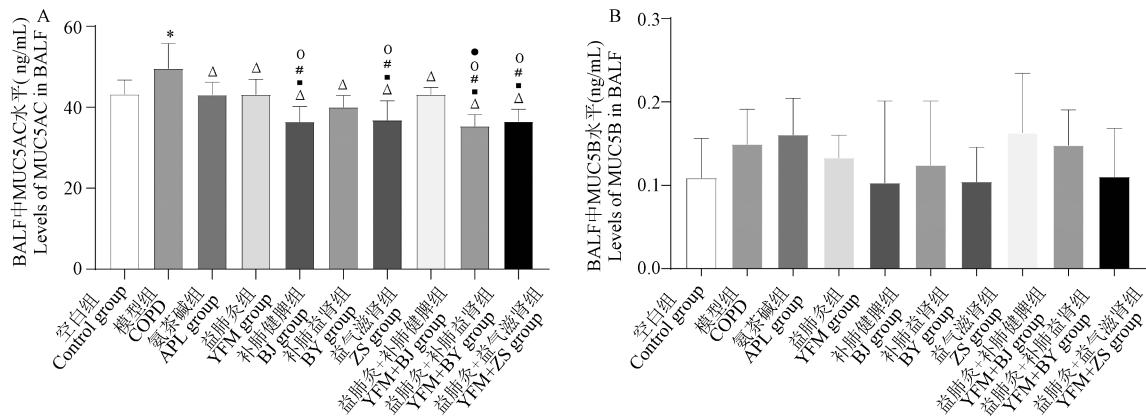


注:有效 Penh 测量值对应的排斥指数 $R_{inx}\leq 0.5$ 。与空白组比较, * $P<0.05$;与 COPD 组比较, $\Delta P<0.05$ 。

图 1 各组 Penh 水平 ($n=6$)

Note. Corresponding Penh is effective when $R_{inx}\leq 0.5$. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with COPD group, $\Delta P<0.05$.

Figure 1 Levels of Penh in each group

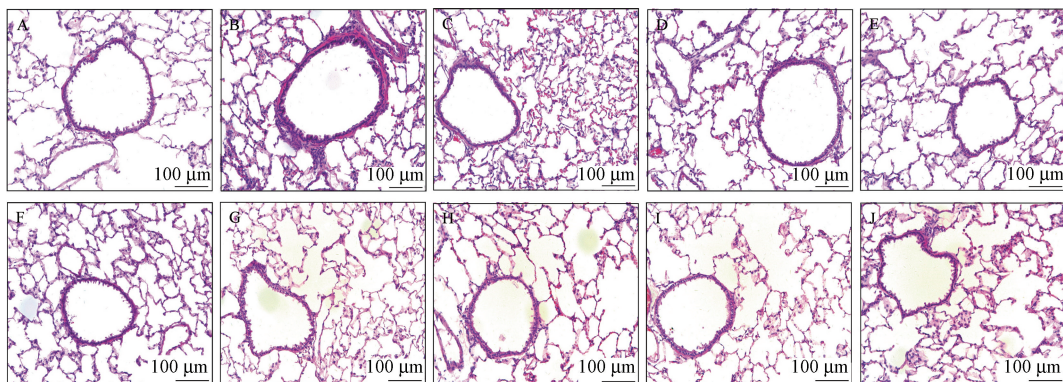


注:A;BALF 中 MUC5AC 浓度水平;B;BALF 中 MUC5B 浓度水平。与空白组比较, * $P<0.05$;与 COPD 组比较, $\Delta P<0.05$;与 APL 组比较, $\blacksquare P<0.05$;与 YFM 组比较, $\#P<0.05$;与 BY 组比较, $\bullet P<0.05$;与 YFM+BJ 组比较, $\circ P<0.05$ 。

图 2 各组 BALF 中 MUC5AC、MUC5B 水平($n=6$)

Note. A, Levels of MUC5AC in BALF. B, Levels of MUC5B in BALF. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with COPD group, $\Delta P<0.05$. Compared with APL group, $\blacksquare P<0.05$. Compared with YFM group, $\#P<0.05$. Compared with BY group, $\bullet P<0.05$. Compared with YFM+BJ group, $\circ P<0.05$.

Figure 2 Levels of MUC5AC and MUC5B in BALF in each group



注:A;空白组;B;COPD 组;C;APL 组;D;YFM 组;E;BJ 组;F;BY 组;G;ZS 组;H;YFM+BJ 组;I;YFM+BY 组;J;YFM+ZS 组。

图 3 各组气道病理变化(HE 染色)

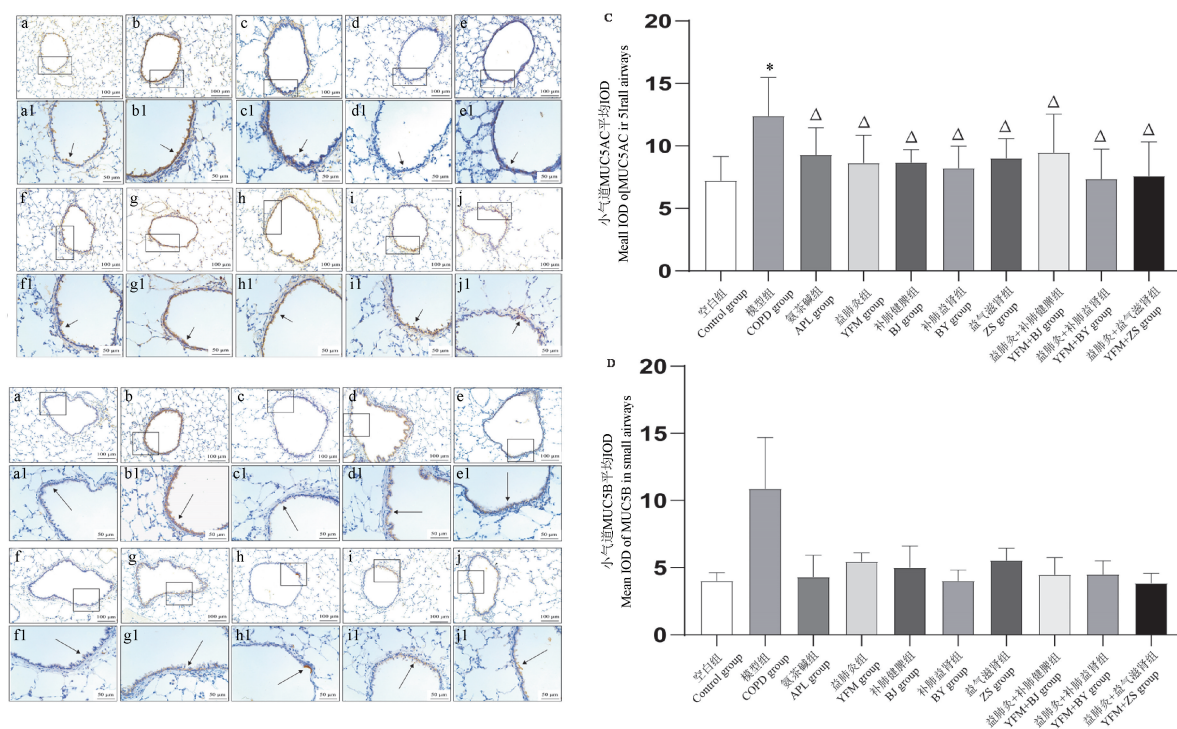
Note. A, Control group. B, COPD group. C, APL group. D, YFM group. E, BJ group. F, BY group. G, ZS group. H, YFM+BJ group. I, YFM+BY group. J, YFM+ZS group.

Figure 3 Pathological changes of airways in each group(HE staining)

3 讨论

COPD 属于中医学“肺胀”“咳嗽”“喘病”等范畴,病位在肺、脾、肾,核心病机为正虚积损,主要病理变化为本虚标实。中医药内、外治对改善 COPD 患者症状、提高生活质量、促进肺康复等疗效确切^[12-13]。课题组分析 COPD 患者临床中医证候相关资料发现,肺脾气虚证(25.4%)、肺肾气虚证(30.0%)和肺肾气阴两虚证(14.3%)是稳定期 COPD 的主要证型^[14]。基于此,Li 等^[5]拟定调补肺肾三方辨证治疗 COPD 稳定期患者,可明显改善咳

嗽、咳痰、呼吸困难等。动物实验也表明补肺益肾方有针对 COPD 大鼠气道黏液高分泌的抑制作用^[8]。此外,补肺益肾颗粒联合舒肺贴在减轻 COPD 大鼠肺、气道炎症方面存在一定的协同作用^[15]。益肺灸是课题组是基于“内病外治”理论,在传统督灸的基础上改良和创新,融合经络、灸粉、姜泥、艾绒、火、发泡等共同作用治疗 COPD 稳定期患者的一种灸疗法,可有效减轻 COPD 患者咳嗽、咯痰、喘息等^[7]。然而,益肺灸具体作用机制及其联合调补肺肾三方对 COPD 的治疗作用仍有待探索。本文基于气道黏蛋白表达、分泌对益肺灸及其



注:A:各组大鼠小气道 MUC5AC 表达(免疫组化);B:各组大鼠小气道 MUC5B 表达(免疫组化);C:小气道 MUC5AC 表达水平;D:小气道 MUC5B 表达水平。a/a1:空白组;b/b1:COPD 组;c/c1:APL 组;d/d1:YFM 组;e/e1:BJ 组;f/f1:BY 组;g/g1:ZS 组;h/h1:YFM+BJ 组;i/i1:YFM+BY 组;j/j1:YFM+ZS 组。与空白组比较, *P<0.05;与 COPD 组比较, Δ P<0.05。

图 4 各组小气道 MUC5AC 和 MUC5B 表达(n=6)

Note. A, Expressions of MUC5AC in small airways of rats in each group (IHC). B, Expressions of MUC5B in small airways of rats in each group (IHC). C, Levels of MUC5AC in small airways of rats in each group. D, Levels of MUC5B in small airways of rats in each group. a/a1, Control group. b/b1, COPD group. c/c1, APL group. d/d1, YFM group. e/e1, BJ group. f/f1, BY group. g/g1, ZS group. h/h1, YFM+BJ group. i/i1, YFM+BY group. j/j1, YFM+ZS group. Compared with control group, *P<0.05. Compared with COPD group, Δ P<0.05.

Figure 4 Expressions of MUC5AC and MUC5B in small airways in each group

联合调补肺肾三方对 COPD 稳定期大鼠的影响开展研究。

气道黏液高分泌缘于气道杯状细胞大量增生、黏膜下腺肥大以及黏蛋白大量合成和分泌,黏液体积和黏弹性增加,在损伤气道上皮的同时限制纤毛黏液清除能力,造成黏液滞留^[16-17],增加呼吸道感染风险和刺激黏液分泌,加速病情进展和导致预后不良^[3,18-19],针对黏液治疗有益于更大的临床获益^[20-21]。黏蛋白高表达是气道黏液高分泌的重要发展环节。MUC5B、MUC5AC 分别是健康机体和疾病发生、发展中的气道主要黏蛋白,在香烟烟雾、细胞因子、蛋白酶等刺激下表达和分泌增加^[17,22-24]。与健康不吸烟者比较, COPD 患者诱导痰中 MUC5AC 浓度大幅升高(MUC5B 仍占主导地位);高 MUC5AC 浓度与 FEV₁ 和 FEV₁/FVC 下降、外周气道阻塞、COPD 恶化次数增加相关^[25]。COPD 恶

化患者痰样本 MUC5AC 和 MUC5B 含量分别增加至非 COPD 对照组的 5 倍和 2 倍,病情缓解时分别回落至对照组的 3 倍和 1 倍^[26]。Penh 可替代肺阻力,其值升高反映支气管收缩、气道阻塞增加、通气困难等^[27-28],可与气道病理和 MUC5AC、MUC5B 水平共同反映实验动物气道阻塞情况、黏蛋白表达和分泌状态,以及相关治疗是否有效。

本研究结果显示, COPD 组大鼠 Penh 升高,提示气道空腔狭窄、阻塞增加,与支气管管壁增厚、管腔狭窄等病理染色结果一致,肺组织和 BALF 中 MUC5AC、MUC5B 表达上调,与王生成等^[29]实验结果一致,且支持 MUC5AC 比 MUC5B 更为敏感的反映 COPD 气道黏液高分泌状态。本研究证实了氨茶碱、益肺炎、调补肺肾三方以及益肺炎联合调补肺肾三方均可不同程度的改善上述病理表现,中医药内、外治及内外联合在改善 COPD 稳定期大鼠气道

狭窄、阻塞和 MUC5AC 气道高表达、高分泌方面有效。其中,补肺益肾方和益肺炎+益气滋肾方在降低 MUC5AC、MUC5B 气道表达和分泌方面有优于氨茶碱和益肺炎的趋势;调补肺肾三方均可降低气道 MUC5AC 表达、分泌,且在一定程度上有减少 MUC5B 表达、分泌的作用趋势,组间效果无统计学差异;灸药联合中,益肺炎+益气滋肾方在改善肺功能、下调 MUC5AC、MUC5B 的表达和分泌方面整体效果较为突出,但与益肺炎+补肺健脾方、益肺炎+补肺益肾方无统计学差异。此外,益肺炎+补肺健脾方改善气道狭窄、阻塞和 MUC5B 气道表达的疗效有优于补肺健脾方的趋势,益肺炎+补肺益肾方降低 MUC5AC 气道高表达、分泌有优于益肺炎、补肺益肾方单独应用的作用趋势,益肺炎+益气滋肾方降低 MUC5AC、MUC5B 气道高表达和 MUC5AC 气道高分泌疗效有优于益肺炎和益气滋肾方的趋势。提示益肺炎和调补肺肾三方在改善气道黏蛋白高表达、高分泌和气道通气功能方面存在一定程度的协同增效效应。

综上所述,益肺炎、调补肺肾三方以及益肺炎联合调补肺肾三方均有改善 COPD 稳定期大鼠气道通气和降低黏蛋白表达、分泌的治疗作用,且中医药内、外同治可能比内、外治单独应用更具治疗潜力。

本研究仅检测并分析气道黏液高分泌关键病理指标,但相关确切调控机制仍有待挖掘,进一步丰富益肺炎和灸药联合治疗 COPD 的现代研究意义和临床应用理论。

参考文献:

- [1] GOLD. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease(2022 report) [EB/OL]. [2022-01-18]. <https://goldcopd.org/2022-gold-reports/>.
- [2] WHO. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [EB/OL]. [2022-01-01]. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
- [3] Shen Y, Huang S, Kang J, et al. Management of airway mucus hypersecretion in chronic airway inflammatory disease: Chinese expert consensus (English edition) [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 399-407.
- [4] Li X, Jin F, Lee HJ, et al. Recent advances in the development of novel drug candidates for regulating the secretion of pulmonary mucus [J]. Biomol Ther (Seoul), 2020, 28(4): 293-301.
- [5] 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.
- [6] 李纳. 益肺炎治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期患者临床疗效评价 [D]. 郑州: 河南中医学院, 2015.
- [7] 王明航, 谢洋, 史阳琳, 等. 益肺炎对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者生存质量和疗效满意度的影响多中心随机对照研究 [J]. 中医杂志, 2019, 60(14): 1202-1208.
- [8] 梅晓峰, 吴婉柳, 肖振亚, 等. 补肺益肾方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌及肺组织 Notch3, HES1 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 68-75.
- [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 Pharm Bull, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 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.
- [11] 余曙光, 徐斌. 实验针灸学 2 版. [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2016.
- [12] 李建生. 国际中医临床实践指南 慢性阻塞性肺疾病 [J]. 世界中医药, 2020, 15(7): 1084-1092.
- [13] 李建生. 慢性阻塞性肺疾病中医康复指南 [J]. 世界中医药, 2020, 15(23): 3710-3718.
- [14] 李建生, 张海龙, 王海峰, 等. 慢性阻塞性肺疾病证候演变特点临床调查 [J]. 中医杂志, 2017, 58(9): 772-776.
- [15] Tian Y, Li Y, Li J, 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, 2017: 1768243.
- [16] Fahy JV, Dickey BF. Airway mucus function and dysfunction [J]. N Engl J Med, 2010, 363(23): 2233-2247.
- [17] McKelvey MC, Brown R, Ryan S, et al. Proteases, mucus, and mucosal immunity in chronic lung disease [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9): 5018.
- [18] Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, et al. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3): 537-550.
- [19] Li Y, Tang XX. Abnormal airway mucus secretion induced by virus infection [J]. Front Immunol, 2021, 12: 701443.
- [20] Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention [J]. Lancet, 2007, 370(9589): 786-796.
- [21] Poole P, Black PN, Cates CJ. Mucolytic agents for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012(8): CD001287.
- [22] Saco TV, Breitziig MT, Lockett RF, et al. Epigenetics of mucus hypersecretion in chronic respiratory diseases [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 58(3): 299-309.

- [23] Li J, Ye Z. The potential role and regulatory mechanisms of MUC5AC in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Molecules*, 2020, 25(19): 4437.
- [24] Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, mucus, and goblet cells [J]. *Chest*, 2018, 154(1): 169–176.
- [25] Radicioni G, Ceppe A, Ford AA, et al. Airway mucin MUC5AC and MUC5B concentrations and the initiation and progression of chronic obstructive pulmonary disease: an analysis of the SPIROMICS cohort [J]. *Lancet Respir Med*, 2021, 9(11): 1241–1254.
- [26] Chillappagari S, Preuss J, Licht S, et al. Altered protease and antiprotease balance during a COPD exacerbation contributes to mucus obstruction [J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 85.
- [27] Ramírez-Ramírez E, Torres-Ramírez A, Alquicira-Mireles J, et al. Characteristic plethysmographic findings in a Guinea pig model of COPD [J]. *Exp Lung Res*, 2017, 43(2): 57–65.
- [28] Kirschvink N, Vincke G, Fiévez L, et al. Repeated cadmium nebulizations induce pulmonary MMP-2 and MMP-9 production and emphysema in rats [J]. *Toxicology*, 2005, 211(1–2): 36–48.
- [29] 王生成, 李琪, 蔡潇阳, 等. 西维来司钠对 COPD 大鼠 GRP78/PERK/CHOP 信号通路及气道高分泌的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 16–23.

〔收稿日期〕2022–10–11

(上接第 10 页)

- [5] Schmit K, Michiels C. TMEM proteins in cancer: a review [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1345.
- [6] Zhang N, Pan H, Liang X, et al. The roles of transmembrane family proteins in the regulation of store-operated Ca^{2+} entry [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 118.
- [7] Wang X, Jiang W, Luo S, et al. The *C. elegans* homolog of human panic-disorder risk gene *TMEM132D* orchestrates neuronal morphogenesis through the WAVE-regulatory complex [J]. *Mol Brain*, 2021, 14(1): 54.
- [8] Xu J, Su Z, Ding Q, et al. Inhibition of proliferation by knockdown of transmembrane (TMEM) 168 in glioblastoma cells via suppression of Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncol Res*, 2019, 27(7): 819–826.
- [9] Dodeller F, Gottar M, Huesken D, et al. The lysosomal transmembrane protein 9B regulates the activity of inflammatory signaling pathways [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(31): 21487–21494.
- [10] Li X, Feng R, Huang C, et al. microRNA-351 regulates TMEM 59 (DCF₁) expression and mediates neural stem cell morphogenesis [J]. *RNA Biol*, 2012, 9(3): 292–301.
- [11] Shen K, Yu W, Yu Y, et al. Knockdown of TMEM45B inhibits cell proliferation and invasion in gastric cancer [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 104: 576–581.
- [12] Li Y, Guo W, Liu S, et al. Silencing transmembrane protein 45B (TMEM45B) inhibits proliferation, invasion, and tumorigenesis in osteosarcoma cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(6): 1021–1026.
- [13] Zhang X, Zhang Y, Miao Y, et al. TMEM17 depresses invasion and metastasis in lung cancer cells via ERK signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(41): 70685–70694.
- [14] Wrzesiński T, Szeląg M, Cieślowski WA, et al. Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 518.
- [15] Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, et al. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 186(1): 60–67.
- [16] Gao W, Chen R, Xie N, et al. Duloxetine-induced neural cell death and promoted neurite outgrowth in N2a cells [J]. *Neurotox Res*, 2020, 38(4): 859–870.
- [17] Xie CJ, Gu AP, Cai J, et al. Curcumin protects neural cells against ischemic injury in N2a cells and mouse brain with ischemic stroke [J]. *Brain Behav*, 2018, 8(2): e00921.
- [18] Yamine A, Zarrouk A, Nury T, et al. Prevention by dietary polyphenols (resveratrol, quercetin, apigenin) against 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in neuronal N2a cells: potential interest for the treatment of neurodegenerative and age-related diseases [J]. *Cells*, 2020, 9(11): 2346.
- [19] Kim SU, Lee HJ, Kim YB. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases [J]. *Neuropathology*, 2013, 33(5): 491–504.
- [20] Tu S, Wu J, Chen L, et al. LncRNA CALB2 sponges miR-30b-3p to promote odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells via up-regulating RUNX2 [J]. *Cell Signal*, 2020, 73: 109695.
- [21] Yuan J, Lei ZN, Wang X, et al. Interaction between OC-1 and Lmx1a promotes ventral midbrain dopamine neural stem cells differentiation into dopamine neurons [J]. *Brain Res*, 2015, 1608: 40–50.
- [22] Huang S, Choi MH, Huang H, et al. Demyelination regulates the circadian transcription factor BMAL1 to signal adult neural stem cells to initiate oligodendrogenesis [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(7): 108394.

〔收稿日期〕2022–11–16