

疏风宣肺汤对慢性支气管炎大鼠p38MAPK/ATF-2信号转导通路的影响

姜若愚¹, 闵锐², 范伏元²

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙, 410007)

[摘要] 目的:探讨疏风宣肺汤对慢性支气管炎大鼠 p38MAPK/ATF-2 信号转导通路的作用。方法:将 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、疏风宣肺汤组、宣肺止咳合剂组,采用混合烟雾吸入法建立慢性支气管炎大鼠模型,分别给予相应药物进行干预。检测各组大鼠 p38MAPK 蛋白表达含量、肺泡巨噬细胞计数、ATF-2 蛋白表达含量。结果:疏风宣肺汤组能够明显降低 p38MAPK 蛋白表达含量、肺泡巨噬细胞计数及 ATF-2 蛋白表达含量,其治疗效果优于宣肺止咳合剂组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论:疏风宣肺汤可能是通过抑制 p38MAPK/ATF-2 信号通路表达,发挥对慢性支气管炎的治疗作用。

[关键词] 慢性支气管炎;疏风宣肺汤;p38MAPK/ATF-2 信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.02.060

Effect of Shufeng Xuanfei decoction on the p38MAPK/ATF-2 signaling pathway in rats with chronic bronchitis

JIANG Ruoyu¹, MIN Rui², FAN Fuyuan²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Shufeng Xuanfei decoction on the p38MAPK/ATF-2 signaling pathway in rats with chronic bronchitis. Methods: Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank control group, model group, Shufeng Xuanfei decoction group, and Xuanfei Zhisou mixture group. A rat model of chronic bronchitis was established by smoke mixture inhalation, and the rats were given corresponding drugs for intervention. The protein expression of p38MAPK and ATF-2 and alveolar macrophage count were measured for all groups. Results: The Shufeng Xuanfei decoction group had significant reductions in the protein expression of p38MAPK and ATF-2 and alveolar macrophage count, as well as a significantly better treatment outcome, as compared with the Xuanfei Zhisou mixture group ($P < 0.05$). Conclusion: Shufeng Xuanfei decoction exerts a therapeutic effect on chronic bronchitis possibly by inhibiting the expression of the p38MAPK/ATF-2 signaling pathway.

[Key words] chronic bronchitis; Shufeng Xuanfei decoction; p38MAPK/ATF-2 signaling pathway

慢性支气管炎是由于感染或非感染因素引起气管、支气管黏膜及其周围组织的慢性非特异性炎症,其病理特点是支气管腺体增生,黏液分泌增多。临床表现为持续2年以上,每年持续3个月以上的咳嗽、咳痰或气喘等症状^[1-2]。在慢性支气管炎的进程中,p38MAPK通路通过对肺泡巨噬细胞(AM)等多种细胞的作用、对多种炎症因子产生的调控、对酶的诱导以及促进转录因子活化等机制来调节炎症过程的发生发展。疏风宣肺汤为范伏元教授治疗慢性支气管炎的经验方,临床疗效确切。本实验旨在研究疏风宣肺汤对慢性支气管炎大鼠 p38MAPK/ATF-2 信号通路的干预作用,以探讨其临床疗效作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠60只,体质量(200±20)g,雌雄各半,由湖南中医药大学动物实验中心代购,实验动物许可证号:SYXK2013(湘)-0005。实验方案通过湖南中医药大学医学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及试剂 疏风宣肺汤(前胡10g、桔梗10g、橘红5g、苦杏仁10g、薄荷5g、忍冬藤15g、紫菀10g、百部10g、浙贝母10g、蝉蜕5g、蓝布正15g、甘草3g)生药由湖南中医药大学第一附属医院提供。中药汤剂由本实验室制取,浓缩至含生药1g/ml,分装灭菌,4℃冷藏备用。根据60kg成人每天服用125g生药剂量进行换算,大鼠给药剂量公式为:大

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(编号:201717)

第一作者:姜若愚,男,2016级硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病

通讯作者:范伏元,男,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病, E-mail: ffy023@163.com

鼠剂量(g) = 成人每天剂量(g) × 大鼠体质量与体表面积比值/人体质量与体表面积比值, 各组给药体积均为 10ml/kg。宣肺止咳合剂(甘肃普安制药有限公司生产, 批准文号: 国药准字 Z20050288, 组成: 荆芥、前胡、桔梗、百部、紫菀、陈皮、鱼腥草、薄荷、罂粟壳、甘草)。脂多糖(LPS, 长沙丽欣生物技术有限公司生产, 规格: 10mg/瓶)。水合氯醛(上海浦山化工有限公司生产, 规格: 250g, 批号: 20151023)。戊巴比妥钠(上海浦山化工有限公司生产, 规格: 250g, 批号: 20151023)。0.9%氯化钠注射液(湖南科伦制药有限公司生产, 规格: 100ml: 0.9g, 产品批号: H16100902)。免疫组化试剂盒(bioss 公司生产); 苏木素-伊红染色试剂盒(碧云天公司生产)。

1.3 仪器 FA-2004N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司天平制造厂); 冰箱(海信容声冰箱有限公司); 智能恒温培养箱(上海冠森有限公司); 生物组织切片机(上海精科公司); 净化工作台(吴江德胜鑫净化设备有限公司); 注射器(湖南平安医械科技有限公司); 灌胃针头(北京哲成科技有限公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组、造模及给药 大鼠适应性饲养 1 周后, 将其按照完全随机方法分为空白对照组 15 只、造模组 45 只。采用混合烟雾吸入法建立慢性支气管炎模型^[3], 即在 15m³ 的烟室中, 以锯末 110g、烟叶 10g、辣椒 4g、硫磺 0.5g 为燃烧物, 30min 烧完, 浓度约为 200ng/m³, 每天 1 次, 每周 6 次, 共 7 周。分别在烟熏第 28、40 天时以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 麻醉成功后在气管前正中皮肤作小切口, 暴露气管前筋膜, 1ml 注射器预装 200μg(200μl) LPS 注入气管内。

将 45 只成模大鼠按随机数字表法分为模型组、疏风宣肺汤组、宣肺止咳合剂组。造模 24h 后开始灌胃给药, 疏风宣肺汤组、宣肺止咳合剂组以 60kg 的成人服药剂量为标准, 即 R1 = 346.68, 按此将药物折算成大鼠剂量, 用蒸馏水溶解稀释至 5ml 灌胃; 模型组给予等剂量 0.9% 氯化钠注射液灌胃。各组均每天 2 次, 每次 5ml, 连续 7d。

2.2 标本采集 末次给药前禁食 12h, 不禁水, 给药后 2h 将大鼠固定于鼠板, 应用 3% 戊巴比妥钠(1.5ml/kg) 腹腔麻醉, 常规消毒后打开胸腔, 暴露气管及肺组织。以棉线结扎右肺门, 剪下右肺, 分成 2 部分, 一部分放入装有 4% 多聚醛酸的管内固定, 以做病理切片及免疫组化, 余下右肺装入冻存管, -80℃ 保存待及 Western blot 检测。快速留取右肺组织标本后, 迅速于气管下段做一“T”形切口, 插入磨平的号针头用丝线结扎固定后, 用注射器吸取 2ml 0.9% 氯化钠注射液注入气管, 见左肺充分膨胀, 轻柔按揉肺组织保留 10s 后缓慢回抽, 反复多次灌洗, 冲洗 3 次将灌洗液合并, 共注入 0.9% 氯化钠注射液 6ml, 灌洗液收集于离心管中, 暂置 4℃ 冰箱。取出右中肺置于多聚甲醛缓冲液中固定后, 脱水透明、浸蜡、包埋、切片, 制成石蜡切片, 观察肺组织的病理变化。

2.3 Western-blot 法检测各组肺组织中 p38MAPK 蛋白

通过裂解细胞提取细胞总蛋白、蛋白含量的测定、配制 SDS-PAGE 胶、转膜、封闭及抗体孵育 ECL 显色, 用 ECL 显色试剂对膜进行显色, X 光片曝光, 洗片机洗片, 采用图形扫描分析软件对蛋白条带进行灰度扫描, 以积分吸光度(峰面积)代表蛋白条带的信号强弱, 以此对目的蛋白表达水平进行半定量比较, 观察 p-p38MAPK 蛋白水平情况。

2.4 免疫组化法检测肺组织的 ATF-2 表达含量 黄色或棕黄色染色为阳性染色。电脑图像采图软件 SPOT&Advanced 获取免疫组化图像后, 以 Image-Pro PLUS6.0 分析软件进行图像分析, 每张切片在 400 倍视野下, 随机采集 2 个包含同级肺组织的视野, 测定每个视野下肺组织阳性染色的平均灰度值(IOD), 以代表阳性部位的蛋白表达水平, 对各组免疫组化染色进行半定量分析。

2.5 肺泡巨噬细胞分类计数 将收集的 EP 管灌洗液进行离心 10min(4℃ 离心机, 4000r/min), 弃上清液至 1ml, 再将沉淀物打匀, 用 100μl 移液枪取溶液 100μl, 均匀涂于载玻片上, 自然风干, 再将载玻片置于无水甲醇中固定 10min, 取出后自然晾干后进行瑞氏-姬姆萨染色进行细胞分类: 用蜡块在切片上画出染色区; 将染液滴满染色区, 染色 2~3min; 滴加 PBS 缓冲液, 勿溢出染色区, 10min; 蒸馏水冲洗掉染液, 晾干玻片; 显微镜下随机取 3 个视野, 计算巨噬细胞所占的百分数和总数。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件对所得数据进行统计学分析, 计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用 LSD-t 检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 一般情况 空白对照组大鼠精神状态良好, 饮食正常, 反应敏捷, 毛色光泽, 肌肉丰满, 粪便呈麦粒状, 尿量正常。模型组大鼠在造模 1 周后出现了倦怠、活动迟缓、食欲减退等状况; 造模 20d 后, 模型组大鼠皮毛枯槁, 气道可以听到喘鸣音, 并且出现咳嗽、呼吸困难等现象。造模 30d 后, 模型组大鼠可见球结膜充血水肿, 气道喘鸣音、咳嗽、呼吸困难症状更加明显。药物干预 7d 后, 疏风宣肺汤组与宣肺止咳合剂组大鼠上述症状均有所缓解, 其中疏风宣肺汤组咳嗽、呼吸困难基本好转, 无明显球结膜水肿及喘鸣音。

3.2 各组肺组织病理变化 空白组(图 1-A): 支气管壁平整光滑, 黏膜结构完好, 管腔内未见炎性渗出物, 纤毛排列整齐密集, 支气管平滑肌无增生、未见断裂, 肺组织内无炎症细胞浸润; 模型组(图 1-B): 支气管黏膜上皮细胞增生, 局部上皮细胞脱落缺损, 纤毛稀疏甚至局部完全脱落, 管腔内有较多炎性分泌物, 黏膜下层有炎症细胞浸润, 肺泡扩张、炎症细胞浸润; 宣肺止咳合剂组(图 1-C): 气管黏膜结构界限模糊, 管壁有轻度充血水肿, 纤毛较稀疏, 分布不甚均匀, 但较模型组长度和密度稍高, 肺组织内少量炎症细胞浸润; 疏风宣肺汤组(图 1-D): 气管黏膜结构基本完整、未见上皮细胞脱落, 纤毛分布正常、但长度和密度均较空白组差, 肺组织可见肺泡增生, 但无明显炎症细胞浸润。

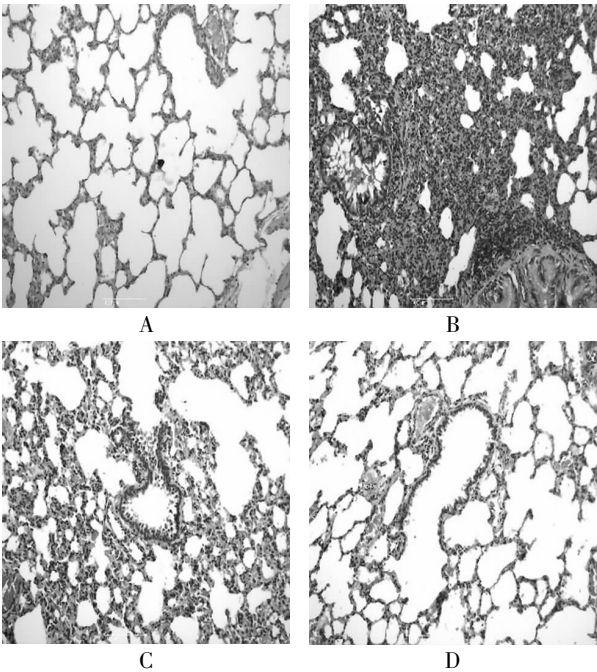


图1 免疫组化法检测肺组织的ATF2表达含量的结果

3.3 各组肺组织中p38MAPK蛋白、ATF-2蛋白表达含量的比较 与空白对照组比较,模型组大鼠肺组织中p38MAPK蛋白表达含量增加,ATF-2蛋白表达含量降低,差异均有统计学意义;与模型组比较,药物干预2组肺组织中p38 MAPK蛋白表达含量减少,ATF-2蛋白表达含量均增加,疏风宣肺汤组改善更明显,差异均有统计学意义。提示宣肺止嗽合剂组与疏风宣肺汤组均能降低模型大鼠肺组织中p38MAPK蛋白表达,增高ATF-2蛋白表达,而疏风宣肺汤效果更明显。(见表1、图2、图3)

表1 各组大鼠肺组织中p38MAPK蛋白表达比较(̄x±s)

组别	只数	p38MAPK	ATF-2
空白对照组	15	0.304±0.024	97.70±1.56
模型组	15	0.743±0.033 ^a	73.23±1.55 ^a
宣肺止嗽合剂组	15	0.716±0.032 ^b	78.10±1.88 ^b
疏风宣肺汤组	15	0.513±0.021 ^{cd}	94.09±1.26 ^{cd}

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.01;与模型组比较,^b*P*<0.05,^c*P*<0.01;与宣肺止嗽合剂组比较,^d*P*<0.05。

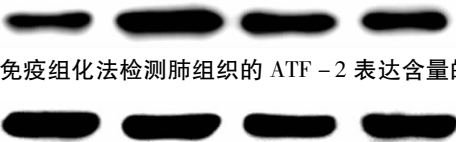


图2 免疫组化法检测肺组织的ATF-2表达含量的结果

图3 Western-blot法定测定肺组织中p-p38MAPK蛋白表达的结果

3.4 各组肺泡巨噬细胞计数比较 与空白对照组比较,模型组大鼠肺组织中肺泡巨噬细胞计数增加;与模型组比较,药物干预组肺组织中肺泡巨噬细胞计数均减少,疏风宣肺汤组改善更明显,差异均有统计学意义。提示宣肺止嗽合剂组与疏风宣肺汤组均能降低模型大鼠肺组织中肺泡巨噬

细胞计数,而疏风宣肺汤效果更明显。(见表2)

表2 各组大鼠肺泡巨噬细胞计数比较(̄x±s)

组别	只数	巨噬细胞计数
空白对照组	15	137.87±2.799
模型组	15	184.13±2.863 ^a
宣肺止嗽合剂组	15	169.00±3.272 ^b
疏风宣肺汤组	15	147.27±3.402 ^{bc}

注:与空白对照组比较,^a*P*<0.01;与模型组比较,^b*P*<0.05;与疏风宣肺汤组比较,^c*P*<0.05。

4 讨论

慢性支气管炎属于中医学“咳嗽”的范畴,因其病程迁延,亦可归于“久咳”“顽咳”范畴。内伤外感均可伤肺而致咳嗽,但风邪为百病之长,易袭阳位,肺脏首当其冲,如《医学入门》中言“风乘肺咳,则鼻塞声重,口干喉痒。语未竟而咳”。起病初期风邪犯肺,肺气上逆而为咳,但由于正气虚弱或医治不当,风邪祛而未尽,即可留伏于肺,致风邪伏肺,咳嗽迁延难愈^[4]。现代药理学研究表明疏风宣肺汤中大多数药物均具有祛痰、镇咳、平喘、抗炎的作用^[5]。笔者的前期研究及临床观察也表明疏风宣肺汤能明显改善慢性咳嗽患者的咳嗽、咽痒、咳痰等症状^[6-7]。

研究显示,慢性支气管炎的气道炎症是以中性粒细胞、肺泡巨噬细胞浸润为主,多种细胞因子和黏附分子等都参与了炎症反应^[8]。肺泡巨噬细胞是气道内细胞因子的重要来源,是气道局部炎症反应的主要始动细胞^[9],其激活并释放内源性炎症因子产生瀑布级联是导致炎症发生、发展的根本原因。在慢性支气管炎的进程中,p38通路通过对肺泡巨噬细胞(AM)等多种细胞的作用、对多种炎症因子产生的调控、对酶的诱导以及促进转录因子活化等机制来调节炎症过程的发生发展。p38MAPK的下游底物为ATF-2,p38MAPK可通过激活ATF-2,调节包括TNF-α、IL-1、IL-6等多种炎症因子在内的基因表达^[10]。ATF-2包含Thr-69、Thr-71和Ser-90 3个磷酸化位点,其中Ser-90不直接参与转录。p38 MAPK信号通路通过先磷酸化Thr-69,再磷酸化Thr-71从而使ATF-2磷酸化^[11]。ATF-2的转录活性主要由磷酸化翻译后调节,氨基末端磷酸化增加其转录活性,活化的ATF-2有助于调节肺泡巨噬细胞等多种炎性细胞因子的基因表达。黄翠萍等^[12]研究发现,应用特异性p38蛋白激酶抑制剂能剂量依赖性地抑制诱导的AM细胞TNF-a、白介素-8合成,提示p38蛋白激酶参与了对LPS诱导肺泡巨噬细胞炎症因子释放的调控,可能在AM细胞的活化机制中发挥作用。

本实验结果表明,疏风宣肺汤组能够显著改善慢性支气管炎大鼠的症状,明显降低p38MAPK蛋白表达含量、肺泡巨噬细胞计数及ATF-2蛋白表达含量,提示疏风宣肺汤可能是通过抑制p38MAPK/ATF-2信号通路表达,减少细胞因子、炎症介质等促炎因素的产生,抑制慢性支气管炎进展,从而发挥对慢性支气管炎的治疗作用。

天降血栓通丸对 2 型糖尿病大鼠血糖、大血管病变的影响

徐彩凤, 马国海

(天津市北辰区中医医院, 天津, 300400)

[摘要] 目的:研究天降血栓通丸对 2 型糖尿病大鼠血糖、大血管病变的影响。方法:将 90 只 wistar 大鼠随机分为正常组 15 只与造模组 75 只,通过高糖高脂饲料+链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠模型,造模成功后将其随机分为模型组,天降血栓通丸早期干预组、中期干预组、晚期干预组(简称为早期组、中期组、晚期组),盐酸吡格列酮组(西药组),每组各 15 只,分别采用相应药物干预。观察大鼠一般情况,检测空腹血糖、胰岛素、胰岛素敏感指数、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平。结果:造模组与空白组比较,胰岛素、胰岛素敏感指标、体质量、第 13 周空腹血糖差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。药物干预后空腹血糖水平 ICAM-1 模型组、各治疗组与空白组比较,各治疗组与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:天降血栓通丸无降糖作用,其早期干预能有效降低 ICAM-1,这可能是其对 2 型糖尿病大鼠大血管病变影响的机制之一。

[关键词] 2 型糖尿病大鼠;血糖;大血管病变;天降血栓通丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.02.061

Clinical effect of Tianjiang Xueshuantong pills on blood glucose and macrovascular complications in rats with type 2 diabetes

XU Caifeng, MA Guohai

(Beichen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300400, China)

[Abstract] Objective: To investigate the clinical effect of Tianjiang Xueshuantong pills on blood glucose and macrovascular complications in rats with type 2 diabetes. Methods: A total of 90 Wistar rats were randomly divided into normal group with 15 rats and model group with 75 rats. High-sugar and high-fat feed and streptozotocin were used to establish a rat model of diabetes, and after the model was successfully established, the rats were divided into model group, early-, middle-, and late-stage Tianjiang Xueshuantong pill intervention groups (early-, middle-, and late-stage intervention groups, respectively), and pioglitazone hydrochloride group (Western medicine

基金项目: 天津市北辰区科技发展计划项目(编号:2015-SHGY-13)

第一作者: 徐彩凤,女,医学硕士,主治医师,研究方向:中西医结合诊治糖尿病及其并发症

通讯作者: 马国海,男,主任医师,研究方向:中西医结合糖尿病及并发症的研究, E-mail: bczzykjk@126.com

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘组. 咳嗽的诊断与治疗指南(2009 版)[S]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(6): 407-413.
- [2] 中华医学会. 临床诊疗指南:呼吸病学分册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2009.
- [3] 李庆云, 黄绍光, 吴华成, 等. 烟雾致大鼠慢性支气管炎系列模型的建立及病理变化半定量评价[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2002, 1(3): 163-166.
- [4] 闵锐. 疏风宣肺汤治疗单纯型慢性支气管炎迁延期风邪伏肺证的临床观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2017.
- [5] 梅全喜. 现代中药药理[M]. 北京:中国中医药出版社, 2016: 43-72.
- [6] 范伏元, 罗姣利. 自拟疏风宣肺汤治疗慢性咳嗽 300 例临床观察[J]. 中医药导报, 2006, 12(2): 33-34, 43.
- [7] 罗姣利. 疏风宣肺汤治疗慢性咳嗽的临床观察及对小鼠镇咳作用的实验研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2007.
- [8] Michael JR, Markewitz BA. Endothelins and the lung[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996(154): 556-581.
- [9] Koh Ono, Jiahuai Han. The p38 signal transduction pathway Activation and function[J]. Cellular Signalling, 2000, 12(1): 1-13.
- [10] 王毅鑫, 苏文利, 朱文献, 等. 创伤患者 p38 MAPK 信号通路的变化及其临床意义[J]. 中国急救医学, 2008, 28(3): 201-204.
- [11] Ouwens DM, Ruiter ND, vander Zon G, et al. Growth factors can activate ATF2 via a two-step mechanism: phosphorylation of Thr71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr69 through Ral-GDS-Src-p38[J]. EMBO J, 2002(21): 3782-3793.
- [12] 黄翠萍, 张珍祥, 徐永健. p38 蛋白激酶对大鼠肺巨噬细胞活化机制的调控[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 661-663.

(收稿日期: 2018-07-28)