

南葶苈子中的指标成分槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-7-O-β-D-龙胆双糖苷对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部免疫功能调节机制研究

张桐茂, 刘 炜, 孔德颖

天津医科大学第二医院 中医科, 天津 300210

摘要: 目的 研究南葶苈子中的指标成分槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-7-O-β-D-龙胆双糖苷(QGG)对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺部免疫功能调节机制,阐释南葶苈子止咳平喘功效的物质基础与科学内涵。方法 SD大鼠随机分为对照组、模型组及QGG高(QGGH)、中(QGGM)、低(QGGL)剂量(0.20、0.15、0.10 g/kg)组和阳性对照氨茶碱(0.09 g/kg)组,连续8周采用香烟熏暴露联合细菌感染的方法制备COPD稳定期大鼠模型。各给药组大鼠于烟熏5周后开始ig给药,连续28 d。采用荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测大鼠肺组织中Th17和Treg细胞特异性转录因子RORγt和FOXP3 mRNA表达水平;流式细胞仪检测Th17/Treg细胞比例;TUNEL法观察QGG对大鼠肺组织细胞凋亡的影响;Western blotting法检测大鼠肺组织蛋白提取液中凋亡相关蛋白(cytoC、Caspase-9、Caspase-3、Bax、Bcl-2)及胞质转录因子-κBp65(NF-κBp65)和胞核NF-κBp65的表达。结果 对照组大鼠体质量增长率随周龄增长而明显增加,模型组大鼠体质量在第1~8周增长率变化缓慢。与模型组比较,QGGH和氨茶碱组大鼠体质量增长率从第5周开始呈增长趋势,而QGGM、QGGL组大鼠体质量增长缓慢。qRT-PCR检测结果显示,与对照组比较,模型组大鼠肺组织中Treg和Th17细胞相关转录因子FOXP3和RORγt的表达水平显著增高($P<0.05$),FOXP3与RORγt比值显著升高。与模型组比较,QGGH组和阳性对照组大鼠FOXP3和RORγt的表达均显著降低($P<0.05$),且QGGH组效果优于氨茶碱组。流式细胞仪检测结果表明,与模型组比较,QGGH组大鼠外周血中CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺和CD4⁺FOXP3⁺/CD4⁺的表达均显著下调($P<0.05$);CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺FOXP3⁺显著降低($P<0.05$)。氨茶碱组大鼠外周血中Th17和Treg细胞相关的表达与QGGH组相近,但是CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺FOXP3⁺无明显差异。与对照组比较,模型组大鼠肺组织细胞凋亡显著增加。与模型组比较,QGGH组和氨茶碱组大鼠肺组织细胞凋亡显著减少($P<0.05$),QGGM、QGGL组改变不明显。与对照组比较,模型组大鼠肺组织Bax、cytoC、Caspase-9、Caspase-3、胞核NF-κBp65表达水平显著升高($P<0.05$),而Bcl-2、胞质NF-κBp65表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,QGGH组和氨茶碱组大鼠肺组织Bax、cytoC、Caspase-9、Caspase-3、胞核NF-κBp65表达水平显著降低($P<0.05$),而Bcl-2、胞质NF-κBp65表达水平显著升高($P<0.05$)。结论 QGG可以显著改善COPD模型大鼠的生存状态、体质量,降低外周血CD4⁺IL-17⁺/FOXP3⁺CD4⁺,调控Treg和Th17特征性转录因子FOXP3和RORγt的基因表达,平衡外周血中Th17与Treg比例,抑制肺组织细胞凋亡,修复损伤的组织,维持器官功能的完整性。

关键词: 南葶苈子;慢性阻塞性肺疾病;槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖基-7-O-β-D-龙胆双糖苷;细胞凋亡;辅助性T细胞17;调节性T细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0910-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.018

Mechanism of QGG from *Descurainia sophia* on airway inflammation and remodeling in COPD rats

ZHANG Tong-mao, LIU Wei, KONG De-ying

Department of Traditional Chinese Medicines, Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300210, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of QGG from *Descurainia sophia* on the airway inflammation and remodeling in COPD rats. **Methods** SD Rats were randomly divided into six groups, including control, model, QGG high (QGGH, 0.20 g/kg), medium (QGGM 0.15 g/kg), low (QGGL 0.10 g/kg) groups and aminophylline group (0.09 g/kg). Rats with COPD in the stable phase were

收稿日期: 2018-11-06

基金项目: 天津市卫生和计划生育委员会中医中西医结合科研课题(2017160)

作者简介: 张桐茂(1978—),男,主治医师,博士,第六批全国老中医药专家学术经验继承工作继承人,研究方向为中药药理与临床。

Tel: 18602611503 E-mail: 13602116692@163.com

established by exposure to tobacco smoking combined with persistent bacterial infections for eight weeks. Rat in each group were ig administrated for twenty-eight days successive five weeks after smoking. Quantitative RT-PCR was applied to determine the mRNA expression of Th17 and Treg specific transcription factors ROR γ t and FOXP3. Ratio of Th17/Treg was tested by flow cytometry. Apoptosis cells of lung tissue were assayed by TUNEL. The expression of apoptotic related proteins cytoC, Caspase-9, Caspase-3, bax, bcl-2, nucleus NF- κ Bp65, and cytoplasm NF- κ Bp65 in protein extracts of lung tissue were determined by Western blotting.

Results The growth rate of control group increased obviously with weeks, however, that of model group increased slowly in COPD establishment stage and the following smoking stage. The growth rate in QGGH and aminophylline groups increased quickly from the fifth week but in QGGL and QGGM groups increased slowly. The expression of ROR γ t and FOXP3 was increased in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of ROR γ t and FOXP3 was decreased in the QGGH and positive groups ($P < 0.05$). The expression of CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺, FOXP3⁺CD4⁺/CD4 and the ratio of CD4⁺IL-17⁺/FOXP3⁺CD4⁺ in peripheral blood was significantly increased in the model group ($P < 0.05$). Compared with that of model, the expression of CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺, FOXP3⁺CD4⁺/CD4 and the ratio of CD4⁺IL-17⁺/FOXP3⁺CD4⁺ were decreased in the QGGH group ($P < 0.05$). The expression of CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺, FOXP3⁺CD4⁺/CD4 was decreased in the positive group, but the ratio of CD4⁺IL-17⁺/FOXP3⁺CD4⁺ was not changed. Compared with the control group, the apoptosis of lung tissues in the model group was significantly increased. Compared with the model group, apoptosis in the QGGH and positive groups was decreased ($P < 0.05$). The expression of bax, cytoC, Caspase-9, Caspase-3, and nucleus NF- κ Bp65 were significantly increased in the lung tissues of model rats, while that of bcl-2 and cytoplasm NF- κ Bp65 were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of bax, cytoC, Caspase-9, Caspase-3, and nucleus NF- κ Bp65 in QGGH and positive groups were obviously decreased ($P < 0.05$), but that of bcl-2 and cytoplasm NF- κ Bp65 increased ($P < 0.05$).

Conclusion QGG can significantly improve the survival conditions, growth ratio and pulmonary functions of rats. QGG can reduce the ratio of CD4⁺IL-17⁺/FOXP3⁺CD4⁺ in peripheral blood. It can modulate Treg and Th17 specific transcriptional factors FOXP3 and ROR γ t, balance the ratio of Th17/Treg. QGG can reduce the apoptosis of lung tissues, repair damaged tissue, and maintain the integrity of organ.

Key words: *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl.; chronic obstructive pulmonary disease; quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-7-*O*- β -*D*-gentiobioside; apoptosis; Th17; Treg

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种可以预防和治疗常见病, 其发病机制复杂, 目前尚未阐明。引发 COPD 的因素有环境污染、吸烟、气道感染等。COPD 一般会造成肺不可逆的病理损伤, 因此临床上需要寻找一种能够降低病理损伤同时修复组织损伤的治疗方法^[1]。课题组前期研究证实, 南葶苈子 *Descurainia sophia* (L.) Webb. ex Prantl. 可有效干预 COPD 大鼠的疾病进程, 缓解肺组织损伤, 减轻炎症反应。通过不同种属间比较发现, 南、北葶苈子虽然主成分含量存在不同, 但对实验性 COPD 大鼠的干预作用无显著差异, 均适用于肺气郁滞、失于宣发肃降 COPD 的治疗。《中国药典》2015 年版^[2]以槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖基-7-*O*- β -*D*-龙胆双糖苷 (quercetin-3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-7-*O*- β -*D*-gentiobioside, QGG) 的含量来控制 and 评价南葶苈子的质量。为阐释南葶苈子止咳平喘药效物质基础, 本实验选用 QGG 作为研究对象, 采用 COPD 模型大鼠, 以辅助性 T 细胞 17 (Th17) 和调节性 T 细胞 (Treg) 比例和肺组织凋亡为评价指标, 分析 Th17/Treg 及细胞相关转录因子与稳定期 COPD 的关联性 & QGG

可能存在的对不同亚群 T 细胞的调节关系; 通过对肺组织细胞凋亡及凋亡相关蛋白检测, 探讨 QGG 对稳定期 COPD 肺实质细胞异常凋亡的影响, 以阐释南葶苈子止咳平喘功效的物质基础与科学内涵。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 90 只, 2 月龄, 体质量 (200 \pm 10) g, 北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 合格证号京 XK2005-0001, 实验动物许可证号 SYXK (津) 2017-0167。

1.2 试剂

红梅香烟, 84 mm 烤烟型, 焦油量 10 mg, 烟气烟碱量 0.7 mg, 烟气一氧化碳量 12 mg (红塔烟草集团); QGG (质量分数 \geq 98%, 批号 19778, Sigma 公司); 氨茶碱 (质量分数 \geq 98%, 批号 RH230382, 山东新华药业公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、1.0 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、十二烷基硫酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (APS)、四甲基乙二胺 (TEMED)、细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司); cytoC 兔抗人单克隆抗体、Bax 兔抗人单克

隆抗体、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 兔抗人单克隆抗体、Caspase-9 兔抗人单克隆抗体、Caspase-3 兔抗人单克隆抗体、胞核核转录因子- κ Bp65 (NF- κ Bp65) 兔抗人单克隆抗体、胞质 NF- κ Bp65 兔抗人单克隆抗体、白细胞介素-17A (IL-17A) 兔抗人单克隆抗体、叉头框蛋白 3 (FOXP3) 兔抗人单克隆抗体、CD4 兔抗人单克隆抗体 (英国 Abcom 公司); IgG2a K Isotype Control 抗体、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司); 30% 丙烯酰胺/甲叉丙烯酰胺复合液 (Acr/Bis, 重庆波尔生物科技有限公司); 蛋白相对分子质量 Marker (美国 Fermentas 公司); 脱脂奶粉 (广州威佳科技有限公司); 5×蛋白上样缓冲液 (美国 Pall 公司); Trizol (美国 Invitrogen 公司); dNTP (10 mmol/L)、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂 (日本 Takara 公司); 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物合成由金唯智生物科技 (北京) 有限公司完成; TUNEL 试剂盒 (瑞士 Roche 公司); 正常熔点的琼脂糖凝胶 (美国 Gibco 公司); 无水乙醇、甲醇 (天津市化学试剂一厂); ECL 发光试剂盒 (美国 Pierce 公司); 其余试剂均为国产分析纯; 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司); 聚山梨酯-80 (天津中和盛泰化工公司); GAPDH 抗体 (英国 Abcom 公司); 佛波酯、离子霉素、莫能霉素 (天津博奥生物科技有限公司)。

1.3 仪器

超净台 (苏州洁净设备有限公司); Forma Series II 型二氧化碳孵箱 (Thermo Electron Corporation); 转移电泳槽 (北京原平皓生物技术有限公司); CK40 生物倒置显微镜 (Olympus 公司); 高压蒸汽压力灭菌器 (上海华线医用核子仪器有限公司); 脱色摇床、垂直电泳装置 (北京六一仪器厂); L420 型台式离心机 (上海精密仪器有限公司); -80 °C 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); 显影、定影设备 (苏州虎丘影响设备公司); LabWorks™ 凝胶成像及分析系统 (美国 UVP 公司); 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 模型制备

对照组大鼠正常饲养, 其余各组统一进行香烟熏。烟熏法实施方案按照文献方法^[3]改良为 3 个 50 cm×40 cm×20 cm 烟熏箱上覆盖打孔玻璃板, 每箱放入 5 只大鼠, 制备 7 支/组香烟束, 烟熏 20 min, 每日 1 次, 连续 8 周。造模第 1、14 天大鼠

ip 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 仰面固定, 颈部备皮, 切开皮肤, 分离肌肉并暴露气管, 用 1 mL 注射器快速注入 LPS (1 g/L) 200 μ L, 并继续向气管内快速推注 0.5 mL 空气。立即将大鼠直立旋转。指触大鼠胸部听是否有水泡音。皮肤进行常规缝合。待大鼠醒后继续放入笼中自由饮食、饮水。

2.2 QGG 混悬剂制备

QGG 中加入聚山梨酯-80 和纯水, 使聚山梨酯-80 的终浓度为 1%, QGG 的终质量浓度为 20 mg/mL。

2.3 分组及给药

SD 大鼠随机分为对照组, 模型组, QGG 高 (QGGH)、中 (QGGM)、低 (QGGL) 剂量组和阳性对照氨茶碱组, 每组 15 只。各给药组大鼠于烟熏 5 周后开始 ig 给药, 连续 28 d。每只大鼠 ig 液体量为 2 mL/d, 对照组、模型组给予等量蒸馏水。南葶蒴子给药剂量以《中国药典》2015 年版中记载的人体最大剂量 0.15 g/(kg·d) 为基准进行动物剂量换算, QGGH、QGGM、QGGL 组给药剂量分别为 0.20、0.15、0.10 g/kg。氨茶碱组 ig 给予 0.09 g/kg 氨茶碱。

2.4 一般观察

每天观察各组大鼠皮毛色泽、精神状态, 每 2 周记录体质量变化, 计算体质量增长率。

2.5 qRT-PCR 法检测基因表达

利用 Trizol 试剂盒提取大鼠肺组织 RNA。qRT-PCR 法^[4]检测各组大鼠肺组织中 FOXP3、维 A 酸相关孤独受体 γ t (ROR γ t) 表达水平。扩增引物序列为 GAPDH-S: 5'-CCGAGGGCCCCACTAAAGG-3', GAPDH-AS: 5'-GCTGTTGAAGTCACAGGAGACAA-3', FOXP3-S: 5'-CGGGACAAGCAAACAGC-3', FOXP3-AS: 5'-GCCAGCGATGAGGAAGA-3', ROR γ t-S: 5'-CCAGGAGGTGTTTGGGTTG-3', ROR γ t-AS: 5'-TGAGCGGATGCCAGTGATA-3'。

2.6 流式细胞仪检测外周血中 Th17、Treg 相关转录因子的表达

2.6.1 外周血单个核细胞的分离 将腹主动脉抽取的血液样品放入 50 mL 离心管, 加入 10 mL 生理盐水溶液, 摇匀; 另取离心管加入 5 mL Ficoll 液。然后将稀释的血液轻轻加到 Ficoll 液中, 3 000 r/min 离心 30 min, 可见上层淡黄色血清, 白色细胞层为外周血单个核细胞。分别收集血清及外周血单个核细胞, -80 °C 备用。

2.6.2 Th17、Treg 相关转录因子表达的检测^[5] 取每组大鼠外周血单个核细胞各 100 μ L 移入流式管

中, 分别标记为 CD4⁺IL17⁺ (A 管)、CD4⁺FOXP3⁺ (B 管)、IL-17 同型管 (AA 管) 和 FOXP3⁺同型管 (BB 管), 在 A 管和 AA 管中加入佛波酯 (PMA, 终质量浓度为 25 ng/mL)、离子霉素 (终质量浓度为 1 μg/mL)、莫能霉素 (终质量浓度为 10 μg/mL), 将其轻轻震荡, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中避光刺激 4 h。将 B 和 BB 管放入 37 °C、5% CO₂ 条件下避光刺激 4 h。将 A 和 AA 管移入常温磷酸盐缓冲液 (PBS), 1 500 r/min 离心 12 min 后去上清, 共洗涤 2 次, 加入 100 μL PBS 吹散细胞。将所有的 A、AA、B、BB 管中加入 0.25 μg/mL 的 FITC-Anti-CD4 抗体, 涡旋混匀, 4 °C 避光放置 40 min。PBS 洗涤 1 次, 1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清, 加入 100 μL PBS 重悬细胞轻轻涡旋震荡混匀。将 A 管和 AA 管加入 0.2 mL 固定破膜缓冲液; 将 B 管和 BB 管中加入 1 mL 固定破膜缓冲液; 轻轻涡旋震荡混匀, 4 °C 避光孵育 40 min。用超纯水 1:10 稀释 10× 通透液后, 在所有试管中加入 2 mL 的 1× 通透液, 1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清, 共洗 2 次, 加入 100 μL PBS 重悬。将所有 A 管中加入 0.5 μL 的 APC-Anti IL-17 抗体, 将所有 A 管中加入 0.5 μL 的 APC-Anti IgG2a K Isotype Control 抗体; 将所有 B 管加入 0.75 μL 的 PE-Anti FOXP3 抗体; 将所有 B 管加入 0.5 μL 的 PE-Anti IgG2a K Isotype Control 抗体; 4 °C 避光孵育 40 min。将所有的试管中加入 2 mL 的 1× 通透液, 1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清, 共洗 2 次, 加 200 μL PBS 吹散后准备上机测试。结果用 Flowjo 软件分析, 以 CD4⁺ 为指标, 计算各组之间细胞比例。

2.7 TUNEL 检测大鼠肺组织凋亡

严格按照 Tunel 细胞凋亡检测试剂盒说明书及相关操作流程^[6]进行操作, 检测大鼠肺组织细胞凋亡。

2.8 Western blotting 检测蛋白表达

采用 Western blotting 法^[7]测定肺组织中凋亡相关蛋白表达。每只大鼠称取肺组织 100 mg, 加入 500 μL 蛋白裂解液 (含 PMSF) 匀浆, 12 000 r/min 离心 9 min, 取适量上清置于新的 1.5 mL 离心管中。-80 °C 冻存。取上清, 考马斯亮蓝法测定蛋白质量浓度, 4% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 后转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 加入 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 按 1:500 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。24 h 后倒去一抗, 加入 5 mL TBST 漂洗 4 次, 每次 5 min。按 1:2 000 加入 HRP 标记的二抗, 37 °C 孵育 2 h。倒去二抗, 用 TBST 漂洗 4 次, 每次 5 min。取

ECL 液 A 与 B 各 1 mL 混匀加入杂交孔中, 将膜平铺在孔中, 上下翻动, 反应 5 min。取出膜置于曝光盒中, 滤纸吸去残余 ECL 液, 覆盖保鲜膜后曝光, 显影, 定影, 冲洗, 晾干。

2.9 统计学方法

所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。单因素方差分析存在显著性差异, 方差齐时, 使用 LSD 法进行多组间比较; 方差不齐时, 采用 Tamhane's T2 法。

3 结果

3.1 一般情况观察

造模 2 周内, 模型大鼠逐渐出现不同程度的呼吸短促、进食减少情况。第 3 周, 模型大鼠呈现皮毛枯黄, 少光泽; 倦怠喜卧, 喘促有痰鸣, 口鼻部有少量分泌物等情况。第 5~8 周为药物干预期, QGGH 组及氨茶碱组大鼠体质量明显增加, 皮毛恢复光泽, 活动度增多、增大, 呼吸喘促及痰鸣减轻。在整个实验过程中, 对照组未有大鼠死亡。模型组大鼠在造模 1~4 周内死亡 3 只, 5~6 周内死亡 1 只; QGGH 组大鼠在造模 1~4 周内死亡 1 只, 5~6 周内死亡 1 只; QGGM 组大鼠在造模 1~4 周内死亡 2 只, 5~6 周内死亡 1 只; QGGL 组大鼠在造模 1~4 周内死亡 1 只, 5~6 周内死亡 2 只; 氨茶碱组大鼠在造模 1~4 周内死亡 1 只。结果显示该模型制备成功, 但有一定的死亡率。

3.2 QGG 对 COPD 大鼠体质量的影响

各组大鼠体质量增长率见表 1。对照组大鼠体质量随周龄增长而明显增加。与对照组比较, 模型组大鼠体质量增长缓慢 ($P < 0.05$); 与模型组比较, QGGH 和氨茶碱组大鼠第 8 周体质量增长率显著增加 ($P < 0.05$)。

3.3 QGG 对 COPD 大鼠肺组织中 FOXP3、ROR γ t 表达水平的影响

qRT-PCR 结果表明, 与对照组比较, 模型组大鼠外周血中 Th17 和 Treg 相关转录因子 ROR γ t 和 FOXP3 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, QGGH 组和氨茶碱组大鼠外周血中 ROR γ t 和 FOXP3 的表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), QGGM、QGGL 组改变不明显, 见表 2。

3.4 QGG 对 COPD 大鼠外周血中 Th17、Treg 细胞比例的影响

与对照组比较, 模型组大鼠外周血中 CD4⁺IL-17⁺/

CD4⁺和 CD4⁺FOXP3⁺/CD4⁺表达水平显著升高, CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺FOXP3⁺值显著增高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, QGGH 组 CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺和 CD4⁺FOXP3⁺/CD4⁺的表达均显著下调 ($P < 0.05$); CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺FOXP3⁺显著降低 ($P < 0.05$)。阳

性对照药组外周血中 Th17 和 Treg 细胞相关转录因子的表达水平与 QGGH 组相近, CD4⁺IL-17⁺/CD4⁺FOXP3⁺与模型组比较无显著差异。与模型组比较, QGGM、QGGL 组各转录因子水平变化不明显, 见图 1~3。FOXP3 和 ROR γ T 分别为 Th17 和

表 1 QGG 对 COPD 大鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of QGG on weight gain rate of COPD rats in stable stage ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量增长率/%			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	15	—	1.17±0.28	1.28±0.29	1.42±0.17	1.58±0.25
模型	11	—	1.07±0.17	1.15±0.18	1.21±0.20*	1.25±0.19*
氨茶碱	14	0.09	1.12±0.16	1.18±0.21	1.31±0.19*	1.46±0.21*#
QGGH	13	0.20	1.14±0.16	1.17±0.21	1.35±0.20*	1.48±0.16*#
QGGM	12	0.15	1.10±0.28	1.16±0.21	1.26±0.22*	1.32±0.23*
QGGL	12	0.10	1.08±0.18	1.13±0.21	1.25±0.20*	1.32±0.25*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group, same as below

表 2 QGG 对 COPD 大鼠肺组织中 Foxp3、ROR γ T 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of QGG on expression level of Foxp3 and ROR γ T in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	相对表达量		
			ROR γ T	FOXP3	ROR γ T/FOXOP3
对照	—	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	6	6.08±0.84*	2.89±0.34*	2.05±0.29*
氨茶碱	0.09	9	3.68±0.47*#	2.01±0.26*#	1.83±0.20*
QGGH	0.20	8	3.87±0.45*#	2.05±0.18*#	1.31±0.28*#
QGGM	0.15	7	5.75±0.52*	2.68±0.28*	1.91±0.18*
QGGL	0.10	7	5.88±0.82*	2.92±0.31*	1.89±0.17*

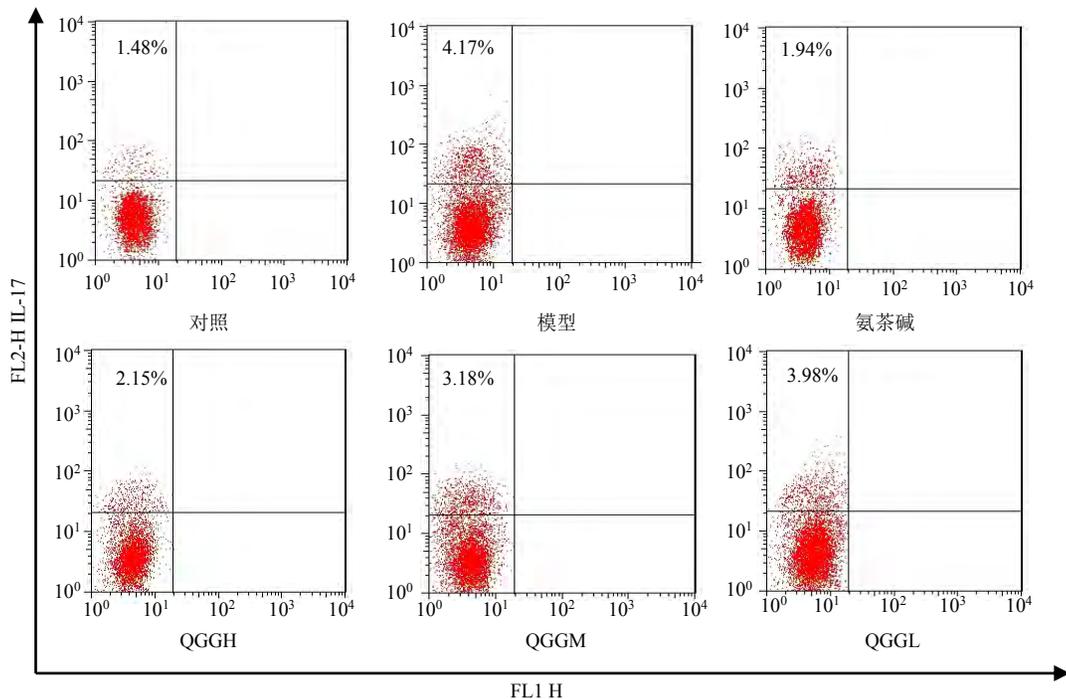


图 1 各组大鼠外周血 Th17 细胞表面分子的表达

Fig. 1 Expression of surface molecules of Th17 cells in each test group

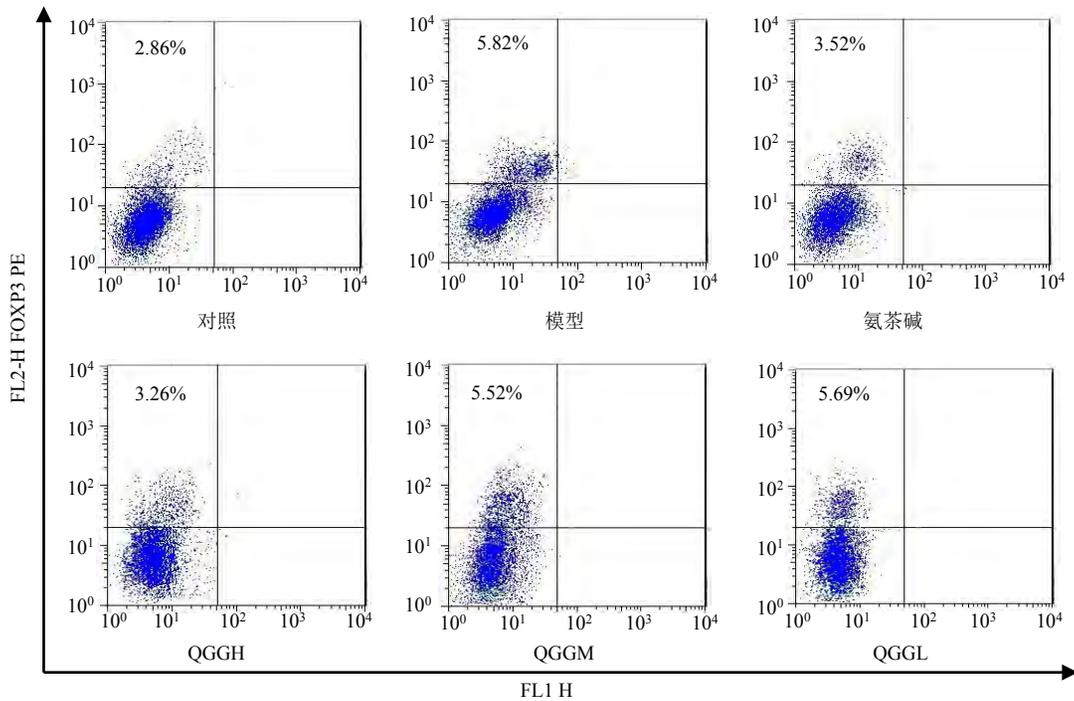


图2 各组大鼠外周血 Treg 细胞表面分子的表达

Fig. 2 Expression of surface molecules of Treg cells in each test group

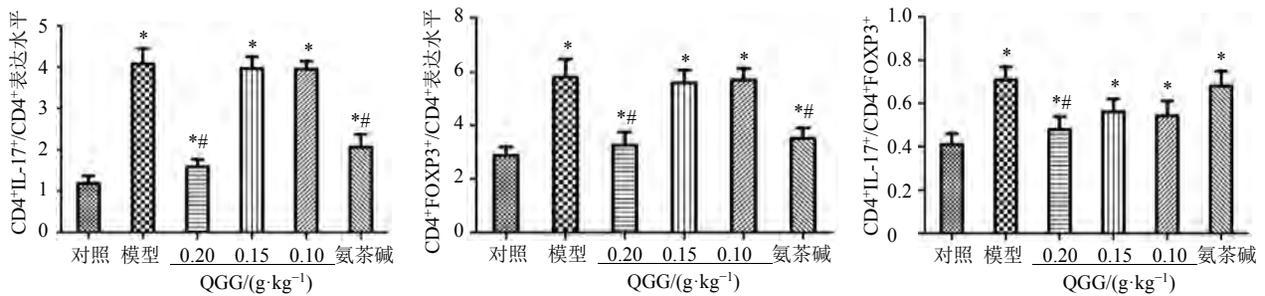


图3 QGG 对 COPD 大鼠外周血中 Th17、Treg 细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of QGG on ratio of Th17 and Treg cells in peripheral blood of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

Treg 细胞特征性转录因子。本实验中模型组中转录因子 ROR γ T 和 FOXP3 表达水平及 Th17 和 Treg 细胞比例检测结果提示, QGG 能够通过调控 Th17 和 Treg 细胞的平衡影响 COPD 的进程进而影响气道的重塑。

3.5 QGG 对 COPD 大鼠肺组织细胞凋亡的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肺组织细胞凋亡显著增加。与模型组比较, QGGH 组和阳性对照组大鼠肺组织细胞凋亡显著减少 ($P < 0.05$), QGGM、QGGL 组改变不明显。见图 4、5。

3.6 QGG 对 COPD 大鼠肺组织凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肺组织 cytoC、Caspase-9、Caspase-3、胞核 NF- κ Bp65 的表达显著

增加, Bcl-2/Bax 显著降低, 胞质 NF- κ Bp65 表达显著减少 ($P < 0.05$)。与模型组比较, QGGH 组和氨茶碱组大鼠肺组织 Bax、cytoC、Caspase-9、Caspase-3、胞核 NF- κ Bp65 的表达显著降低, Bcl-2 和胞质 NF- κ Bp65 表达显著增加 ($P < 0.05$), 而 QGGM 组中 Bax、cytoC、Caspase-9、Caspase-3 表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 6、7。

4 讨论

COPD 的具体发病机制至今仍不明确, 目前发现的主要发病机制是气道、肺实质及肺血管的慢性炎症, 但氧化和抗氧化、蛋白酶和抗蛋白酶的平衡变化等均是 COPD 的推动因素^[8]。

近年来研究表明, 南、北葶苈子间完全相同的化学成分较少, 差别主要是南葶苈子中的黄酮苷多

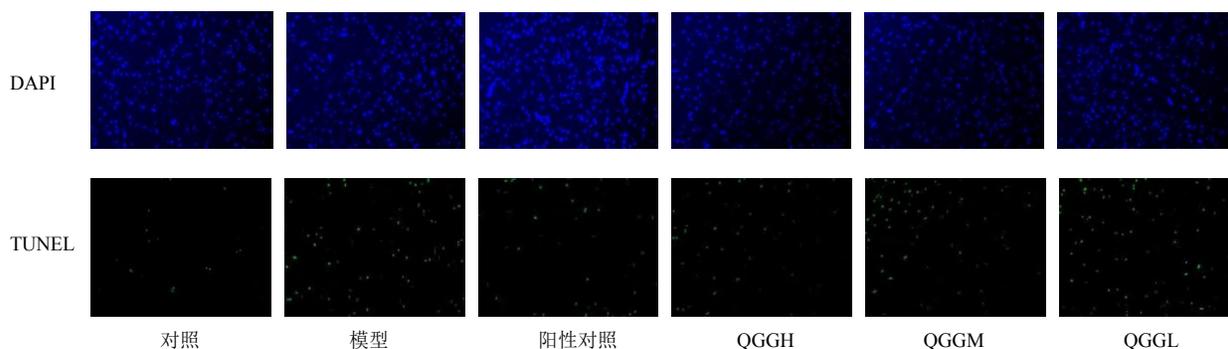


图 4 QGG 对 COPD 大鼠肺组织细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of QGG on apoptosis in lung tissue of COPD rats

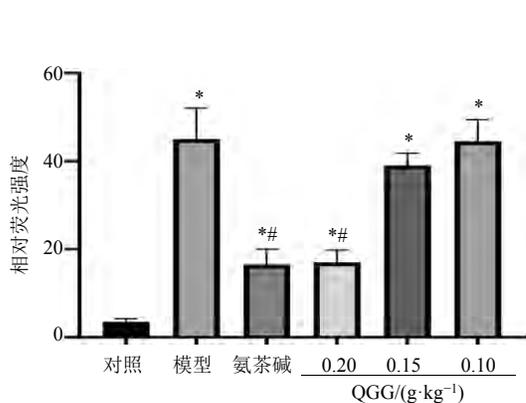


图 5 QGG 对 COPD 大鼠肺组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 5 Effect of QGG on apoptosis in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

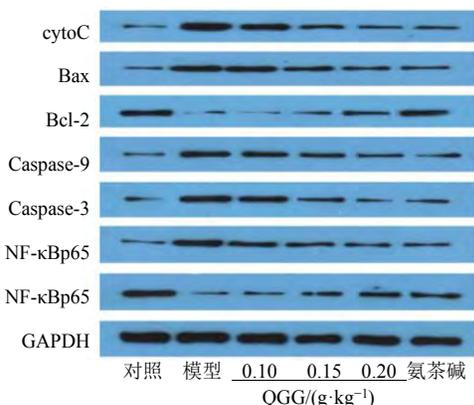


图 6 QGG 对 COPD 大鼠肺组织凋亡相关蛋白表达的影响
Fig. 6 Effects of QGG on apoptosis related proteins in lung tissue of COPD rats

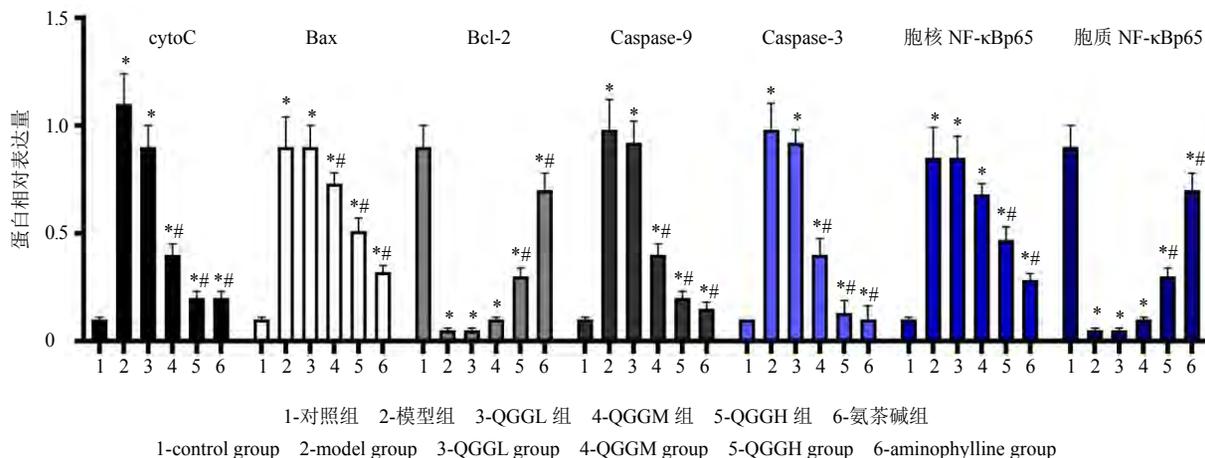


图 7 QGG 对 COPD 大鼠肺组织凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 7 Effects of QGG on apoptosis related proteins in lung tissue of COPD rats ($\bar{x} \pm s$)

为二糖苷及三糖苷，而北葶苈子中多为单糖苷。QGG 存在于不同来源的南葶苈子中，是南葶苈子中较稳定的特征性成分，因此进一步研究 QGG 缓解 COPD 肺组织损伤、减轻炎症反应、止咳平喘、化

痰的作用机制对指导中医用药具有重要意义。COPD 模型的制备方法主要有 LPS 诱导法，烟熏法、ip 香烟烟雾提取物法等^[9]。单纯的烟熏法具有花费大、耗时长，且模型病理停留在疾病初期等缺点。

而 LPS 诱导法得到的模型与人类 COPD 的病理很相似, 但炎症浸润却与烟熏法不同^[10]。宋一平等^[11]采用的 LPS 联合烟熏法是最常用的 COPD 大鼠模型制备方法, 该方法的优势是时间相对较短, 且其致伤机制与人 COPD 高度符合, 因此本实验采用此方法制备 COPD 大鼠模型。

FOXP3 和 ROR γ T 分别为 Th17 和 Treg 细胞特征性转录因子, 也是二者增殖、释放因子、行使各项功能必需的调控因子。FOXP3 和 ROR γ T 在数量、活性上相互平衡。本实验中模型组大鼠肺组织中 ROR γ T 和 FOXP3 比例显著升高, QGGH 组 ROR γ T 和 FOXP3 比例降低, 提示 QGG 通过调控 Th17 和 Treg 细胞的平衡影响 COPD 进程, 进而影响到气道的重塑。炎症细胞浸润及气道、血管结构重建具有细胞增殖与凋亡平衡失调的病理特征, 细胞凋亡参与了 COPD 的发病过程^[12-14]。与对照组比较, 模型组大鼠肺组织凋亡蛋白 Bax、cytoC、Caspase-9 和 Caspase-3 表达显著升高, QGGH 和氨茶碱能够显著抑制这种增长; 模型组大鼠肺组织抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著降低, 而 QGGH 和氨茶碱能够显著逆转这种抑制作用。另外, NF- κ Bp65 能够调控多种基因的表达, 本实验中 NF- κ Bp65 在细胞核和细胞质中的表达显著变化, 提示 QGG 能够影响 NF- κ Bp65 的活化从而激活下游蛋白的表达, 达到调控细胞凋亡和其他的作用。

本课题首次对南葶苈子的活性成分 QGG 进行药效学研究, 以 Th17 和 Treg 细胞的比例和肺组织凋亡为评价指标, 分析 Th17/Treg 及细胞相关转录因子与稳定期 COPD 的关联性及 QGG 对不同亚群 T 细胞之间可能存在的调节关系; 通过对肺组织细胞凋亡及凋亡相关蛋白检测, 探讨 QGG 对稳定期 COPD 肺实质细胞异常凋亡的影响, 阐释南葶苈子止咳、平喘、化痰功效的物质基础与科学内涵, 为阐明南葶苈子药理作用机制提供参考。

参考文献

[1] 魏伟超, 吴伟, 王创畅. 邓铁涛五脏相关理论在慢性阻塞性肺疾病治疗中的应用 [J]. 中医杂志, 2017, 58(23): 2068-2070.

[2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

[3] Nie Y C, Wu H, Li P B, *et al.* Characteristic comparison of three rat models induced by cigarette smoke or combined with LPS: To establish a suitable model for study of airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2012, 25(5): 349-356.

[4] 朱 闽, 徐 楠, 何清湖, 等. 湿热消腰部热敷疗法对 EAP 小鼠模型前列腺 Th17/Treg 相关特异性因子表达的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(3): 243-250.

[5] 杨 霞, 邱诗林, 李煜梅, 等. 烟草烟雾暴露小鼠中 CD4⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞亚型与 Th1/Th17 变化的实验研究 [J]. 广西医科大学学报, 2017, 34(4): 514-517.

[6] 许和平, 姚津剑, 吴多益, 等. 细胞色素 C 氧化酶-2/前列腺素 E2 信号通路对老年慢性阻塞性肺病患者肺血管内皮细胞凋亡的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(14): 3432-3433.

[7] 童祥丽, 朱 洁, 杨 程, 等. 益气化痰散瘀方含药血清对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(3): 200-207.

[8] Pauwels R A, Buist A S, Calverley P M, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) workshop summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(5): 1256-1276.

[9] 杨 群, 万丽玲, 丁兆辉, 等. 调补肺肾膏调治慢性阻塞性肺疾病稳定期肺肾两虚证的临床研究 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(27): 108-110.

[10] 李连怀, 张淑华, 常广敬, 等. 南葶苈子和北葶苈子的电镜扫描与理化鉴别 [J]. 河北医学院学报, 1989, 1(3): 1-3.

[11] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(5): 283-287.

[12] Vila J, Isaacs J D, Anderson A E. Regulatory T cells and autoimmunity [J]. *Curr Opin Hematol*, 2009, 16(4): 274-279.

[13] Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma [J]. *Microb Infect*, 2001, 3(11): 899-904.

[14] Chatila T A. Role of regulatory T cells in human diseases [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(5): 949-959.