

基于 Rac1 信号通路研究淫羊藿苷对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能的影响

周哲旭, 王 省, 唐 洲, 陈 星, 吴耀松, 刘 洋, 菅佳宁, 胡啸博, 刘娅茹, 陈玉龙*

河南中医药大学, 河南省中医方证信号传导重点实验室, 河南省中医方证信号传导国际联合实验室, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 探讨淫羊藿苷基于 Rac1 信号通路改善慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能障碍的作用机制。 **方法** 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为空白组、模型组、Rac1 抑制剂 (2.5 mg/kg) 组和淫羊藿苷低、高剂量 (40、80 mg/kg) 组, 每组 8 只, 除空白组外其余各组小鼠采用香烟烟雾熏吸 8 周的方法制备 COPD 模型, 造模后 ip Rac1 抑制剂或 ig 淫羊藿苷, 1 次/d, 每周给药 6 次, 连续 4 周。检测小鼠体质量、肺功能指标; ELISA 法检测肺组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、IL-6、乳脂球表皮生长因子 8 (milk fat globule EGF factor 8, MFG-E8) 和生长停滞特异性蛋白 6 (growth arrest specific protein 6, GAS6) 含量; 流式细胞术检测肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬能力、小鼠全血巨噬细胞 M1/M2 分型; 苏木素-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE) 观察肺组织病理变化及肺泡平均截距 (mean linear intercept, MLI)、单位面积平均肺泡数 (mean alveolar numbers, MAN); qRT-PCR 和 Western blotting 分别检测肺组织 Rac1、P21 蛋白激酶 (P21 activated kinase, PAK) mRNA 和蛋白表达; 激光共聚焦显微镜观察巨噬细胞吞噬及骨架结构变化。 **结果** 与空白组比较, 模型组小鼠体质量、肺功能指标、吞噬及胞葬功能降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), MLI 上升 ($P < 0.01$), MAN 降低 ($P < 0.01$), 肺组织中炎症因子 IL-4、IL-6、TNF- α 水平上升 ($P < 0.05$ 、 0.01), 胞葬辅助因子 MFG-E8、GAS6 水平降低 ($P < 0.05$), M1 型巨噬细胞增多 ($P < 0.05$), 肺组织 Rac1、PAK mRNA 及蛋白表达上调 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, Rac1 抑制剂及淫羊藿苷干预后小鼠肺功能指标好转 ($P < 0.05$ 、 0.01), 吞噬及胞葬功能均有改善 ($P < 0.05$ 、 0.01), 炎症因子水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 胞葬辅助因子水平增加 ($P < 0.05$), M2 型巨噬细胞增多 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肺组织 Rac1、PAK mRNA 及蛋白表达降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 淫羊藿苷可以调控 Rac1 信号通路介导巨噬细胞骨架重排, 改善 COPD 小鼠肺泡巨噬细胞吞噬及胞葬功能障碍。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 淫羊藿苷; 巨噬细胞; 胞葬功能; 吞噬功能; Rac1 信号通路; 细胞骨架

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)01-0159-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.01.017

Effect of icariin on improving efferocytosis and phagocytosis dysfunction of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease model mice based on Rac1 signaling pathway

ZHOU Zhexu, WANG Xing, TANG Zhou, CHEN Xing, WU Yaosong, LIU Yang, JIAN Jianing, HU Xiaobo, LIU Yaru, CHEN Yulong

Henan International Joint Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Syndrome and Prescription in Signaling, Henan Key Laboratory of TCM Syndrome and Prescription in Signaling, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of icariin in improving efferocytosis and phagocytosis dysfunction of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model mice based on Rac1 signaling pathway. **Methods** A total of 40 C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, Rac1 inhibitor (2.5 mg/kg) group, icariin low- and high-dose (40, 80 mg/kg) groups, with eight mice in each group, except for the blank group, the rest groups of mice were prepared by cigarette smoke inhalation for eight weeks to prepare a mouse COPD model. After modeling, rats were ip Rac1 inhibitor or icariin, once a day,

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81873285); 国家自然科学基金面上项目 (82274438); 河南省特色骨干学科中医学学科建设项目 (重点项目) (STG-ZYXKY-2020022)

作者简介: 周哲旭, 硕士研究生, 从事分子生物学与中医方证信号传导研究。Tel: 19503873623 E-mail: zhouzhexu1@126.com

***通信作者:** 陈玉龙, 博士, 教授, 从事分子生物学与中医方证信号传导研究。Tel: 15937189768 E-mail: cyl72621@163.com

six times a week for four consecutive weeks. Body weight and lung function indices were detected; ELISA was used to detect levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-4 (IL-4), IL-6, milk fat globule EGF factor 8 (MFG-E8) and growth arrest specific protein 6 (GAS6) in lung tissue; Flow cytometry was used to detect the efferocytosis and phagocytosis function of alveolar macrophages, and the M1/M2 phenotype of whole blood macrophages in mice; HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue, as well as mean linear intercept (MLI) and mean alveolar numbers (MAN); qRT-PCR and Western blotting were used to detect *Rac1*, P21 activated kinase (*PAK*) mRNA and protein expressions in lung tissue; Macrophage phagocytosis and structural changes of skeleton were observed by laser confocal microscopy. **Results** Compared with blank group, body weight, lung function indexes, phagocytosis and efferocytosis function of mice in model group were decreased ($P < 0.05, 0.01$), MLI was increased ($P < 0.01$), MAN was decreased ($P < 0.01$), inflammatory factors IL-4, IL-6 and TNF- α levels in lung tissue were increased ($P < 0.05, 0.01$), levels of efferocytosis cofactors MFG-E8 and GAS6 were decreased ($P < 0.05$), M1-type macrophages was increased ($P < 0.05$), *Rac1*, *PAK* mRNA and protein expressions in lung tissue were up-regulated ($P < 0.05, 0.01$). Compared with model group, lung function indexes were improved after the intervention with *Rac1* inhibitor and icariin ($P < 0.05, 0.01$), phagocytosis and efferocytosis function were improved ($P < 0.05, 0.01$), levels of inflammatory factors were decreased ($P < 0.05, 0.01$), levels of efferocytosis cofactors were increased ($P < 0.05$), M2 type macrophages were increased ($P < 0.05, 0.01$), *Rac1*, *PAK* mRNA and protein expressions in lung tissue were decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Icariin can modulate the *Rac1* signaling pathway to mediate macrophage skeleton rearrangement and improve phagocytosis and efferocytosis dysfunction of alveolar macrophages in COPD mice.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease; icariin; macrophages; efferocytosis function; phagocytosis function; *Rac1* signaling pathway; cytoskeleton

慢性呼吸系统疾病包括慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、哮喘、肺纤维化等,截至 2017 年,全球慢性呼吸系统疾病发病率较 1990 年增加 39.8%,是仅次于心血管疾病和肿瘤的第 3 大死亡原因,其主要危险因素包括香烟烟雾、粉尘、生物燃料及空气污染^[1]等。其中吸烟是唯一最可预防的死亡和疾病原因,香烟烟雾除了与 COPD 密切相关,还与肺癌、间质性肺病的发展,以及肺部感染和急性肺损伤易感性的增加有关^[2]。香烟烟雾包含 4 500 多种物质 (尼古丁、焦油、一氧化碳等)^[3-4],具有致毒、致突变以及致癌作用。香烟烟雾会引起氧化应激,导致低级别慢性炎症反应,并通过激活上皮细胞、肺泡巨噬细胞、中性粒细胞和 T 淋巴细胞将炎症细胞募集到气道^[5]。肺泡巨噬细胞发挥吞噬和胞葬功能,清除肺内凋亡细胞、有害颗粒,从而维持内环境稳态,与 COPD 等慢性肺部疾病的发生发展密切相关。

目前,很少有治疗方法可以影响 COPD 的整体病程,现有的治疗方法大多以缓解症状为主以降低恶化率,如西医临床治疗慢性呼吸系统疾病以使用支气管扩张剂、吸入糖皮质激素以及服用抗生素和祛痰药物为主,这些药物可以在短期内有效改善肺通气从而缓解不适,但长期使用也会增加患者微生物感染的风险和频率^[6]。中医认为, COPD 属于中医“肺胀”“肺痿”等范畴,该病首先伤肺,久病肺虚累及脾肾,久虚又导致痰浊、气滞、血瘀,出现

正虚与邪瘀的相互影响。COPD 稳定期以补肺、健脾、益肾为主,而淫羊藿“禀天冬令之水气,入足少阴肾经,得地润泽之金味,入手太阴肺经”(《叶天士·本草经解》),入肺、肾、肝经,具有补肝肾、祛风湿、清肺润肺等功效。淫羊藿苷是淫羊藿的有效成分之一,属黄酮类物质^[7]。淫羊藿苷具有抗氧化作用,能抑制一氧化氮和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, iNOS) 释放^[8-9],具有抑制炎症的作用^[10],减少香烟烟雾诱导 COPD 小鼠肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞数量,改善香烟烟雾提取物引起的炎症反应、氧化应激和细胞损伤等^[11-12]。说明淫羊藿苷在一定程度上能够抑制 COPD 慢性持续性炎症反应的发展,为淫羊藿的补肺益肾功能提供实验依据。课题组前期研究发现,香烟烟雾提取物作用下大鼠肺泡巨噬细胞 *Rac1* 表达降低,淫羊藿苷能够上调 *Rac1* 表达。现有研究表明,在脂多糖/香烟烟雾诱导的 COPD 模型刺激下, *Rac1* 持续活化并释放炎症因子^[13-16], *Rac1* 受抑制会下调巨噬细胞吞噬颗粒物的活性^[17]。因此,本研究通过香烟烟雾熏吸法制备 COPD 小鼠模型,基于 *Rac1* 信号通路探讨淫羊藿苷介导细胞骨架重排改善 COPD 稳定期肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能障碍的分子机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 雌雄

各半, 体质量 18~20 g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 动物质量合格证号 113242200080854, 许可证号 SCXK(京) 2019-0010。动物适应性饲养 1 周后开始造模。实验动物伦理审查批号 DWLL202209008。

1.2 细胞

小鼠肺癌 LLC 细胞购自中国科学院昆明细胞库(编号 KCB20781YJ), 由本实验室传代培养。

1.3 药品与试剂

淫羊藿苷(质量分数 $\geq 98.0\%$, 批号 MUST-22012418)购自成都曼思特生物科技有限公司; Rac1 抑制剂(批号 S8031-03)购自美国 Selleck 公司; 无水乙醇(药用级, 批号 C13975831)购自上海麦克林生化科技有限公司; PKH26 细胞链接试剂盒(批号 6008X220861)购自懋康生物公司; TRIZOL(批号 284911)、pHrodo™ Deep Red *E. coli* BioParticles(批号 2510628)购自美国 Invitrogen 公司; FITC 鬼笔环肽(批号 CA1620)、红细胞裂解液(批号 20210915)购自北京索莱宝科技有限公司; ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒(批号 117000)购自日本 TOYOBO 公司; SYBR Green 荧光染料(批号 RK21203)购自武汉 ABclonal 公司; 兔单克隆抗体 Rac1(批号 2465S-4)购自美国 CST 公司; P21 蛋白激活激酶(P21 activated kinase, PAK)兔多克隆抗体(批号 0069245)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)鼠单克隆抗体(批号 41323)购自美国 Genetex 公司; 白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒(批号 A206H20233)、IL-4 ELISA 试剂盒(批号 A204H20757)购自杭州联科生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒(批号 AK064V062759)购自武汉 Elabscience 公司; 乳脂球表皮生长因子 8(milk fat globule EGF factor 8, MFG-E8) ELISA 试剂盒(批号 L220921733)购自武汉云克隆公司; 生长停滞特异性蛋白 6(growth arrest specific protein 6, GAS6) ELISA 试剂盒(批号 7421898927)购自武汉博士德生物公司; FITC 抗小鼠 F4/80 抗体(批号 B361742)、APC 抗小鼠 CD68 抗体(批号 B355351)购自 Biolegend 公司; PE-CD206 抗体(批号 D0721)购自 Santa Cruz 公司; “红旗渠”香烟(批号 1062453192944302)购自河南中烟工业公司。

1.4 仪器

YP10001 型电子天平(上海衡际科学仪器有限公司); Fine Pointe WBP 型非束缚小动物肺功能测量系统(美国 BUXCO 公司); FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Epoch 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); CL-1000 型紫外交联仪(美国 UVP 公司); Scientz-48L 型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司); Universal Hood II 型凝胶成像扫描仪(美国 Bio-Rad 公司); QuantStudio 6 型实时荧光定量 PCR 仪、ProFlex 型 PCR 热循环仪、NanoDrop One/One C 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备

雌、雄小鼠分笼饲养, 每笼 4 只, 适应性喂养 1 周后, 随机数字法选出雌雄共 8 只作为空白组, 其余 32 只小鼠采用香烟烟雾熏吸法制备 COPD 模型^[18-19]: 造模工具为熏烟架, 过滤嘴香烟, PE 塑料膜。造模时长为 8 周, 造模期间, 每周熏烟 6 d, 每日熏烟 2 次, 每次间隔 3 h 以上。每次熏烟时, 将鼠笼置于熏烟架上, 外用 PE 塑料膜密封, 共点燃 25 支香烟, 熏吸 40 min, 熏烟架上放置温度计, 实时监测熏烟时的温度, 温度控制于 26 °C, 熏烟结束后, 打开塑料膜, 稳定 30 min 后将小鼠运回动物房, 同时期空白组小鼠自由呼吸新鲜空气。熏烟结束后常规饲养, 8 周后判断是否造模成功^[20]。

2.2 动物分组及给药

将造模成功的 32 只小鼠运用随机数字法分为模型组、Rac1 抑制剂(2.5 mg/kg)组和淫羊藿苷低、高剂量(40、80 mg/kg)组, 每组 8 只。空白组和模型组 ig 生理盐水(雄鼠 0.25 mL/次, 雌鼠 0.20 mL/次)和 ip 生理盐水(雄鼠 0.20 mL/次, 雌鼠 0.15 mL/次); Rac1 抑制剂组 ig 生理盐水(雄鼠 0.25 mL/次, 雌鼠 0.20 mL/次)并 ip Rac1 抑制剂(雄鼠 0.20 mL/次, 雌鼠 0.15 mL/次); 淫羊藿苷 ig 不同浓度的药物(雄鼠 0.25 mL/次, 雌鼠 0.20 mL/次)并 ip 生理盐水(雄鼠 0.20 mL/次, 雌鼠 0.15 mL/次)。1 次/d, 每周给药 6 次, 干预 4 周。

2.3 一般情况观察

每日观察小鼠精神、运动、呼吸状态、皮肤毛色、饮水饮食等, 每周日称定小鼠体质量, 比较各组小鼠第 0、4、8、12 周的体质量。

2.4 肺功能检测

第 0、4、8、12 周采用无束缚小动物全身体积

描记仪测定无创肺功能。通过软件记录分析得出最终潮气量 (TV)、每分钟呼气量 (MV)、呼气峰流速 (PEF) 和 50% 潮气量呼气流量 (EF50)。

2.5 小鼠肺组织病理分析

给药结束后, 使用 4% 多聚甲醛灌注小鼠左肺, 固定 72 h, 将固定好的肺组织乙醇梯度浸泡、石蜡包埋制作蜡块, 用切片机切成 4 μm 切片。捞片后, 将切片置于烤片机内烤片, 按照脱蜡、水化、染色、中性树胶封片流程进行常规苏木素-伊红 (HE) 染色。置于光学显微镜下观察各组气道、支气管及肺泡的病理变化。

各组均取 6 张病理切片, 采用 K-viewer 数字病理分析软件随机选取 6 个视野, 在 200 倍视野下, 避开大、中支气管与大、中血管, 截取图片, 测得视野总面积 (S), “十”字线总长度 (L), 计算视野中肺泡总数 (N_a) 和穿过“十”字线的肺泡间隔数 (N_s), 计算肺泡平均截距 (mean linear intercept, MLI) 和单位面积平均肺泡数 (mean alveolar numbers, MAN)。

$$\text{MLI} = L/N_s$$

$$\text{MAN} = N_a/S$$

2.6 小鼠 BALF 提取肺泡巨噬细胞

末次给药 3 h 后取材, 取材前 12 h 禁食不禁水。取材时小鼠称定质量, 颈椎脱臼处死, 全身喷洒乙醇, 迅速转移至超净台内, 固定好四肢, 手术剪分离小鼠气管, 横剪“一”字小口后, 用 5 mL 注射器将 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 缓慢注入肺内进行肺泡灌洗, 收集 BALF 至 15 mL 尖底离心管内, 1 500 r/min 离心 10 min, 用 1 mL 完全培养基重悬, 转移至 6 孔板内, 收集贴壁细胞即为小鼠肺泡巨噬细胞。

2.7 巨噬细胞胞葬功能测定

将各组小鼠肺泡巨噬细胞种于 35 mm 的培养皿中, 调整细胞数量为 5×10^5 个, 每皿 2 mL 完全培养基, 等待贴壁。同时诱导 LLC 细胞凋亡, 以每皿 20 mL 培养基开盖置于紫外交联仪中, 以 30 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ 的紫外强度照射 15 min 后, 置于 CO_2 培养箱中平衡 10 min。平衡结束后使用 PKH26 膜标记探针进行染色, 使 LLC 细胞携带红色荧光。待巨噬细胞贴壁后, 按照小鼠肺泡巨噬细胞-LLC 细胞 (1:5) 的比例, 加入染色后的 LLC 凋亡细胞, 置于培养箱中孵育 1 h, 使用 4% 多聚甲醛避光固定 15 min, 0.04% 台盼蓝淬灭细胞外荧光, 1 500 r/min 离心 5 min, PBS 重悬后, 流式细胞术检测巨噬细胞荧光强

度, 肺泡巨噬细胞所携带的平均荧光强度代表其吞噬凋亡细胞的能力。

2.8 巨噬细胞吞噬功能检测

将各组小鼠肺泡巨噬细胞以 5×10^5 接种于 35 mm 的培养皿中, 每皿 2 mL 完全培养基, 配制荧光标记大肠杆菌溶液 (1 mg/mL), 将大肠杆菌加入对应各组, 终质量浓度为 0.1 mg/mL, 在 CO_2 培养箱中避光吞噬 3 h 后, 流式细胞仪检测巨噬细胞吞噬大肠杆菌的平均荧光强度。

2.9 全血巨噬细胞 M1/M2 分型检测

抽取 100 μL 全血, 加入 F4/80、CD68、CD206 抗体避光孵育 30 min, 加入 5 倍体积的红细胞裂解液, 冰上裂解, 每 5 分钟避光涡旋 1 次, 裂解 15 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、450 $\times g$ 离心 10 min, 重复裂解 2 次, 配制含 5% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞, 转移至含 2 mL PBS 流式管中, 离心后加入 500 μL PBS 重悬细胞, 上机检测。

2.10 ELISA 法检测肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-4、IL-6 及胞葬辅助因子 MFG-E8、GAS6 含量

取小鼠肺组织 30 mg, 置于 1.5 mL EP 管内, 用眼科剪将组织剪碎, 加入 4~5 个小钢珠和 270 μL 预冷的 PBS, 用组织破碎机破碎 10 min, 离心取上清用于检测, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测细胞上清中 TNF- α 、IL-4、IL-6、MFG-E8、GAS6 的含量。

2.11 qRT-PCR 检测肺组织 *Rac1* 和 *PAK* mRNA 表达

称取小鼠肺组织, TRIZOL 法提取 RNA, ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒合成 cDNA, 使用 SYBR Green Fast qPCR Mix 进行实时荧光 PCR 检测, 以 GAPDH 为参考基因, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量, 对照组的基因表达被标准化为 1。引物序列由 GENEWIZ 公司设计与合成, 见表 1。

2.12 Western blotting 检测肺组织 *Rac1* 和 *PAK* 蛋白表达

称取肺组织, 加入适量裂解液, 组织破碎机低温破碎 10 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>Rac1</i>	F: GAGACGGAGCCGTTGGTAAA R: TGGGGATGTACTCTCCAGGG
<i>PAK</i>	F: ACCTGAAGTTGTGACACGCA R: CTCTGGCGTCCCATTGGTAG
<i>GAPDH</i>	F: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC R: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT

采用 BCA 法检测各组蛋白浓度后变性蛋白，统一蛋白上样量，蛋白条带以凝胶成像分析系统进行检测，使用 Image Lab 软件分析条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值分析各实验组蛋白表达情况，进行统计分析。

2.13 巨噬细胞吞噬及骨架结构变化观察

各组小鼠肺泡巨噬细胞种板同“2.8”项，贴壁后吸掉培养液，加入大肠杆菌混悬液，使其终质量浓度为 0.1 mg/mL，吞噬 3 h 后处理细胞：37 °C 预热的 PBS 清洗细胞 2 次；4%多聚甲醛固定 10 min；室温下 PBS 清洗细胞 2 次，每次 10 min；加入 2 mL 0.5% Triton X-100 溶液透化处理 5 min；PBS 清洗 2 次，每次 10 min；每皿加入 1 mL 配制好的 FITC 鬼笔环肽工作液（100 nmol/L），室温避光孵育 30 min 后，PBS 清洗 3 次，每次 5 min；使用 500 μ L DAPI 溶液（100 nmol/L）对细胞核进行复染 30 s；在皿底中央滴入抗荧光衰减封片剂，盖上盖玻片后放入暗盒内，在激光共聚焦下观察。

2.14 统计学分析

数据采用 SPSS 25.0 软件进行分析，数据符合正态分布，结果以 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。两组间对比选用独立样本 *t* 检验；多组间对比选用单因素方差分析，方差齐以 LSD 为统计依据，若方差不齐则采用 Dunnett *T*³ 检验。

3 结果

3.1 小鼠一般情况观察

实验期间，空白组小鼠毛色鲜亮，摄食活动正常，二便正常，精神状态良好，体质量正常增长；模型组小鼠出现烦躁不安，毛色晦暗等现象，撕咬打架较为频繁，摄食进水减少，垫料较为潮湿，造模第 4 周时空白组小鼠体质量增长较快，造模组雌、雄小鼠体质量均增长缓慢，第 8 周造模结束时，与空白组比较，其余熏烟雌雄小鼠体质量均有显著降低（*P* < 0.05、0.01，表 2、3），给药 4 周后，模型组雌雄小鼠体质量虽有较前有所增长，但仍较空白组偏低（*P* < 0.05、0.01）；与模型组比较，Rac1 抑制剂组及淫羊藿苷高、低剂量组雄鼠体质量有一定升高但无统计学差异，Rac1 抑制剂组及淫羊藿苷高剂量组雌鼠体质量有显著升高（*P* < 0.05、0.01）。

3.2 小鼠肺功能指标比较

如表 4~7 所示，造模 4 周时，与空白组比较，熏烟小鼠 TV、MV、EF50、PEF 有降低趋势（*P* < 0.05、0.01）；第 8 周造模结束后，模型组小鼠肺功能指标 TV、MV、EF50、PEF 显著降低（*P* < 0.05、0.01）；第 12 周给药结束后，与空白组比较，模型组 TV、MV、PEF 水平仍受损（*P* < 0.05、0.01）；与模型组比较，淫羊藿苷低、高剂量组小鼠肺功能 TV、MV、PEF 水平有明显改善（*P* < 0.05、0.01）。

表 2 各组雄鼠体质量变化（ $\bar{x} \pm s, n = 4$ ）

Table 2 Changes of body weight of male mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	21.41 ± 0.52	24.13 ± 0.56	26.69 ± 0.27	28.14 ± 0.88
模型	—	21.15 ± 0.19	21.87 ± 0.37*	22.77 ± 0.62**	25.57 ± 1.81*
Rac1 抑制剂	2.5	21.12 ± 0.67	21.32 ± 2.20*	23.14 ± 0.85**	26.37 ± 1.53
淫羊藿苷	40	21.02 ± 0.50	21.97 ± 1.64*	23.51 ± 0.69**	25.80 ± 1.07
	80	21.07 ± 0.16	21.49 ± 1.34*	23.54 ± 0.62**	25.96 ± 0.89

与空白组比较：**P* < 0.05 ***P* < 0.01；与模型组比较：#*P* < 0.05 ###*P* < 0.01，下表同。

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs control group; #*P* < 0.05 ###*P* < 0.01 vs model group, same as below tables.

表 3 各组雌鼠体质量变化（ $\bar{x} \pm s, n = 4$ ）

Table 3 Changes of body weight of female mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	体质量/g			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	17.46 ± 0.22	19.88 ± 0.36	21.02 ± 0.09	21.74 ± 0.47
模型	—	17.35 ± 0.58	18.08 ± 0.65**	18.54 ± 0.99**	19.93 ± 0.94**
Rac1 抑制剂	2.5	17.43 ± 0.53	18.50 ± 0.32*	18.81 ± 0.71**	21.33 ± 0.40##
淫羊藿苷	40	17.09 ± 0.47	18.13 ± 0.87**	19.16 ± 0.45*	20.48 ± 0.43
	80	17.37 ± 0.51	18.31 ± 0.98**	18.54 ± 1.77**	20.88 ± 0.50#

表 4 各组小鼠 TV 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Changes of TV in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TV/mL			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	0.25±0.03	0.32±0.03	0.41±0.11	0.39±0.05
模型	—	0.23±0.02	0.27±0.03*	0.24±0.08**	0.23±0.07**
Rac1 抑制剂	2.5	0.24±0.02	0.27±0.02*	0.31±0.07*	0.27±0.08
淫羊藿苷	40	0.24±0.03	0.27±0.06*	0.23±0.06**	0.33±0.07 [#]
	80	0.24±0.02	0.30±0.04	0.31±0.08*	0.35±0.07 ^{##}

表 5 各组小鼠 MV 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Changes of MV in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MV/mL			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	103.57±15.99	118.16±13.51	182.58±52.40	169.84±13.58
模型	—	110.61±4.75	72.96±20.92**	108.07±41.35**	97.92±26.80**
Rac1 抑制剂	2.5	121.24±11.02	84.44±20.22**	131.52±29.82*	113.32±32.29
淫羊藿苷	40	110.25±7.02	88.90±15.15*	99.87±24.01**	140.79±28.34 [#]
	80	116.82±10.43	80.90±23.74**	100.68±39.51**	149.58±33.13 ^{##}

表 6 各组小鼠 EF50 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Changes of EF50 in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	EF50/mL			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	0.27±0.05	0.45±0.06	0.46±0.13	0.39±0.09
模型	—	0.28±0.03	0.35±0.13*	0.29±0.08**	0.28±0.11
Rac1 抑制剂	2.5	0.32±0.07	0.27±0.05**	0.30±0.09**	0.27±0.08
淫羊藿苷	40	0.27±0.05	0.28±0.06**	0.25±0.08**	0.30±0.11
	80	0.30±0.04	0.35±0.09*	0.29±0.07**	0.35±0.11

表 7 各组小鼠 PEF 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Changes of PEF in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	PEF/mL			
		第 0 周	第 4 周	第 8 周	第 12 周
空白	—	4.79±0.89	7.31±0.95	10.67±3.79	10.49±1.66
模型	—	5.01±0.57	6.22±1.53	5.61±2.36**	5.81±1.69*
Rac1 抑制剂	2.5	5.26±0.78	5.68±0.83*	7.02±1.75*	6.95±2.40
淫羊藿苷	40	4.81±0.61	5.77±1.33*	5.05±1.24**	8.32±1.96 [#]
	80	5.08±0.60	6.57±1.26	5.67±1.65**	9.35±2.66 ^{##}

3.3 小鼠肺组织病理观察

如图 1 所示, 空白组小鼠肺泡大小基本均匀, 肺泡壁结构比较完整, 肺泡无明显塌陷, 偶见肺泡壁断裂融合, 肺泡腔和肺泡壁炎症细胞浸润较少, 支气管管壁未见明显增厚。模型组小鼠肺泡大小不

一, 大量肺泡壁断裂融合, 可见明显肺泡塌陷, 肺泡腔扩大, 炎症细胞浸润明显, 支气管壁可见明显增厚, 管腔狭窄, 杯状细胞与黏液细胞肥大增生, 支气管周围纤维组织增生。Rac1 抑制剂组和淫羊藿苷低、高剂量组小鼠上述情况明显改善。

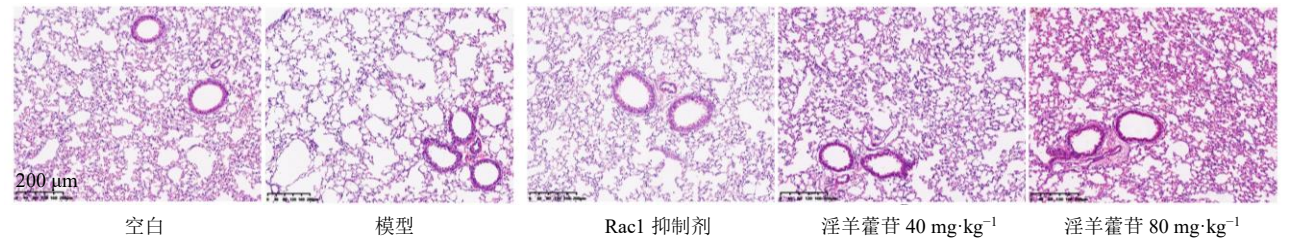


图 1 各组小鼠肺组织病理变化 (HE, ×100)

Fig. 1 Histopathologic changes in lung of mice in each group (HE, × 100)

3.4 肺组织病理定量分析

如图 2 和表 8 所示, 200 倍镜下测得视野总面积 0.2257 mm^2 , “十”字线总长度为 $955.41\text{ }\mu\text{m}$, 计算视野中肺泡总数和穿过“十”字线的肺泡间隔数,

结果显示, 与空白组比较, 模型组 MAN 显著降低 ($P<0.01$), MLI 显著升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, Rac1 抑制剂组和淫羊藿苷低、高剂量组 MAN 显著升高 ($P<0.01$), MLI 显著降低 ($P<0.01$)。

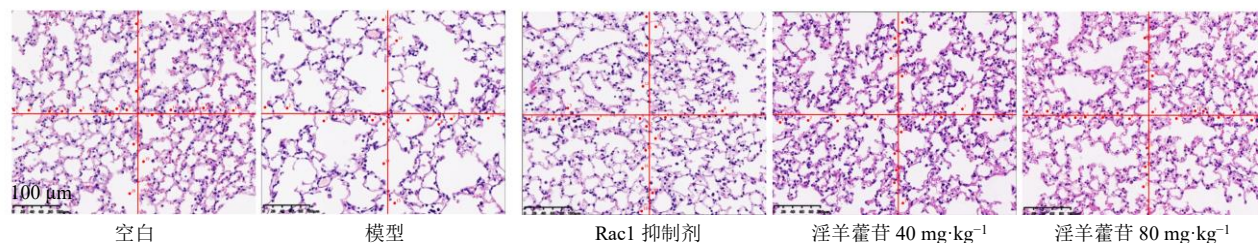


图 2 各组小鼠穿过“十”字线肺泡间隔数 (HE, $\times 200$)

Fig. 2 Number of alveolar intervals across cross line in each group of mice (HE, $\times 200$)

表 8 各组小鼠 MAN、MLI 定量分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 8 Analysis of MAN and MLI in each group of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	MAN/ mm^2	MLI/ μm
空白	—	453.48 ± 35.98	43.15 ± 1.54
模型	—	$298.13 \pm 52.94^{**}$	$70.17 \pm 6.10^{**}$
Rac1 抑制剂	2.5	$427.87 \pm 85.96^{##}$	$45.17 \pm 4.91^{##}$
淫羊藿苷	40	$400.67 \pm 49.60^{##}$	$45.20 \pm 5.00^{##}$
	80	$442.65 \pm 43.09^{##}$	$47.84 \pm 5.34^{##}$

3.5 小鼠肺泡巨噬细胞胞葬、吞噬功能及 M1/M2 分型检测

如表 9 和图 3 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬及吞噬功能显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 促炎 M1 型巨噬细胞表达增加 ($P<0.05$), 抑炎 M2 型巨噬细胞表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给予 Rac1 抑制剂后 M2 型巨噬细胞比例增加 ($P<0.01$), 低、高剂量淫羊藿苷干预后

表 9 各组肺泡巨噬细胞胞葬、吞噬功能及 M1/M2 分型变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Efferocytosis, phagocytosis and M1/M2 phenotype of alveolar macrophage in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	胞葬平均荧光强度	吞噬平均荧光强度	M1/%	M2/%
空白	—	752.33 ± 125.92	451.33 ± 37.74	12.50 ± 7.44	32.23 ± 3.88
模型	—	$147.00 \pm 19.00^*$	$208.00 \pm 67.27^{**}$	$24.13 \pm 4.59^*$	$13.07 \pm 2.15^{**}$
Rac1 抑制剂	2.5	197.33 ± 15.18	205.67 ± 51.40	19.50 ± 2.31	$23.07 \pm 1.70^{##}$
淫羊藿苷	40	$549.67 \pm 41.02^{##}$	276.33 ± 241.71	$3.45 \pm 1.88^{##}$	$20.77 \pm 4.73^{\#}$
	80	$454.00 \pm 43.35^{\#}$	241.00 ± 22.27	$11.90 \pm 6.89^{\#}$	$27.60 \pm 4.45^{##}$

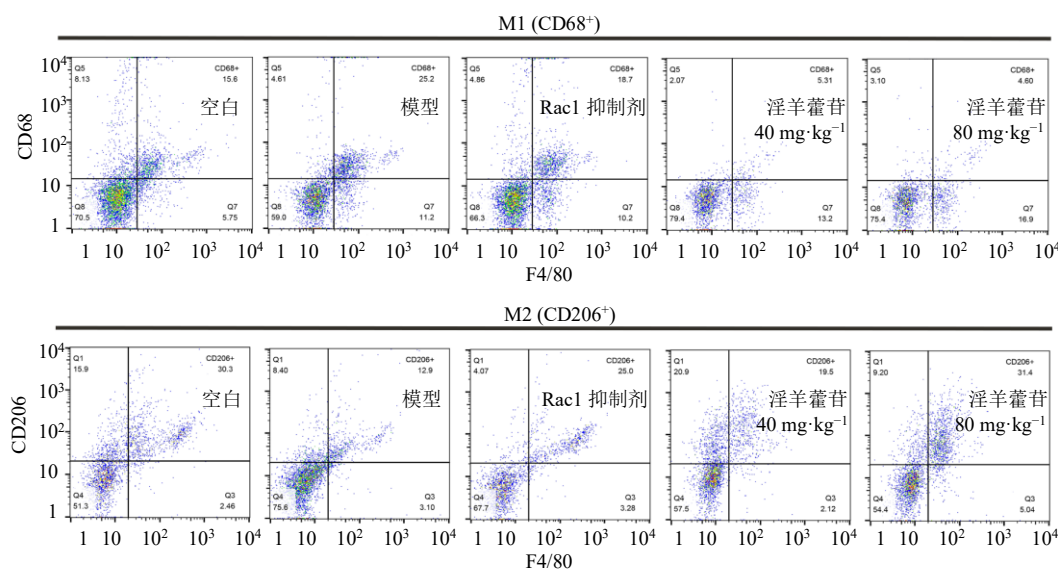


图 3 小鼠肺泡巨噬细胞 M1/M2 分型

Fig. 3 Mouse alveolar macrophage M1/M2 phenotyping

胞葬功能增加 ($P<0.05$ 、 0.01)，吞噬功能改善，M1 型巨噬细胞比例降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，M2 型巨噬细胞显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 小鼠肺组织炎症因子及胞葬辅助因子含量比较

如表 10 所示，与空白组比较，模型组小鼠肺组织匀浆中炎症因子 IL-4、IL-6、TNF- α 水平显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01)，胞葬辅助因子 MFG-E8、GAS6 水平显著降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，Rac1 抑制剂组炎症因子 IL-4、TNF- α 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)，淫羊藿苷低、高剂量组均能显著降低

相关炎症因子水平，促进胞葬相关辅助因子的分泌 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.7 小鼠肺组织 Rac1、PAK mRNA 表达变化

如表 11 所示，与空白组比较，模型组小鼠肺组织 Rac1、PAK mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，各给药组 Rac1、PAK mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

3.8 小鼠肺组织 Rac1、PAK 蛋白表达

如图 4 和表 12 所示，与空白组比较，模型组小鼠肺组织 Rac1、PAK 蛋白表达水平显著升高 ($P<$

表 10 各组小鼠肺组织炎症因子及胞葬辅助因子表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 10 Expressions of inflammatory factors and efferocytosis cofactors in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	MFG-E8/(pg·mL ⁻¹)	GAS6/(pg·mL ⁻¹)
空白	—	43.94±3.15	31.83±2.26	47.24±19.69	73.90±13.04	798.80±190.96
模型	—	51.45±6.72*	55.67±13.15*	177.17±10.97**	48.24±5.03*	443.68±77.00*
Rac1 抑制剂	2.5	44.09±4.37#	59.17±24.43	52.29±20.30##	47.93±13.61	554.29±135.74
淫羊藿苷	40	37.40±4.46##	25.02±2.01#	44.46±1.33##	115.20±27.44#	589.80±15.93#
	80	46.92±4.81	27.84±4.69#	67.37±13.77##	124.21±18.40#	579.36±8.49#

表 11 各组小鼠肺组织 Rac1、PAK mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Rac1 and PAK mRNA expressions in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mRNA 相对表达量	
		Rac1	PAK
空白	—	1.00±0.00	1.00±0.00
模型	—	1.25±0.13*	1.69±0.08**
Rac1 抑制剂	2.5	0.91±0.10##	0.57±0.03##
淫羊藿苷	40	0.83±0.12##	0.84±0.10##
	80	0.66±0.20##	0.74±0.07##

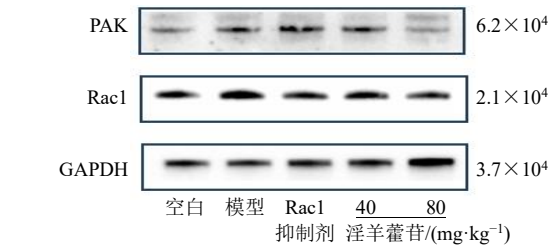


图 4 各组小鼠肺组织 PAK、Rac1 蛋白表达

Fig. 4 PAK and Rac1 protein expressions in lung tissue of mice in each group

表 12 各组小鼠肺组织 PAK、Rac1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 12 PAK and Rac1 protein expressions in lung tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		Rac1	PAK
空白	—	1.38±0.13	0.57±0.18
模型	—	2.40±0.54**	1.03±0.26*
Rac1 抑制剂	2.5	1.33±0.08##	1.20±0.29
淫羊藿苷	40	1.09±0.37##	0.53±0.08#
	80	0.98±0.31##	0.61±0.06#

0.05、 0.01)；与模型组比较，各给药组 Rac1、PAK 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.9 小鼠肺泡巨噬细胞细胞骨架变化

如图 5 所示，与空白组比较，模型组小鼠肺泡巨噬细胞形态僵硬，肌动蛋白丝排列紊乱，吞噬 *E. coli* 较少，伪足伸出数量较少；与模型组比较，Rac1 抑制剂组和淫羊藿苷低、高剂量组小鼠肺泡巨噬细胞形态明显改善，吞噬 *E. coli* 变多，丝状伪足伸出。

4 讨论

COPD 在中医学属“肺胀”“喘证”范畴，病位主要在肺、脾、肾三脏，以肺虚为始而肾虚为基，且随着患者病情发展，肺、脾、肾功能受损而导致水谷精微等营养物质化生不足，病人营养不良的风险随之增加。本研究造模期间发现，在香烟烟雾熏吸下，小鼠的精神状态及毛发色泽变差，体质量增长缓慢。药物干预后体质量及一般情况有所改善。肺功能是检测及评估 COPD 的金标准，通过无束缚小动物全身体积描记仪测定无创肺功能，检测 TV、MV、EF50、PEF 评估小鼠肺功能，发现模型组小鼠 TV、MV、EF50、PEF 均有一定程度受损，通过肺组织病理切片也可以看出，模型组小鼠肺泡大小不一，断裂融合较多，有明显的萎缩塌陷情况，肺泡腔可见大量炎症细胞浸润，支气管壁明显增厚，纤毛排列不整齐，管腔内外大量炎症细胞浸润，MAN 显著降低，MLI 显著上升；而与模型组比较，Rac1

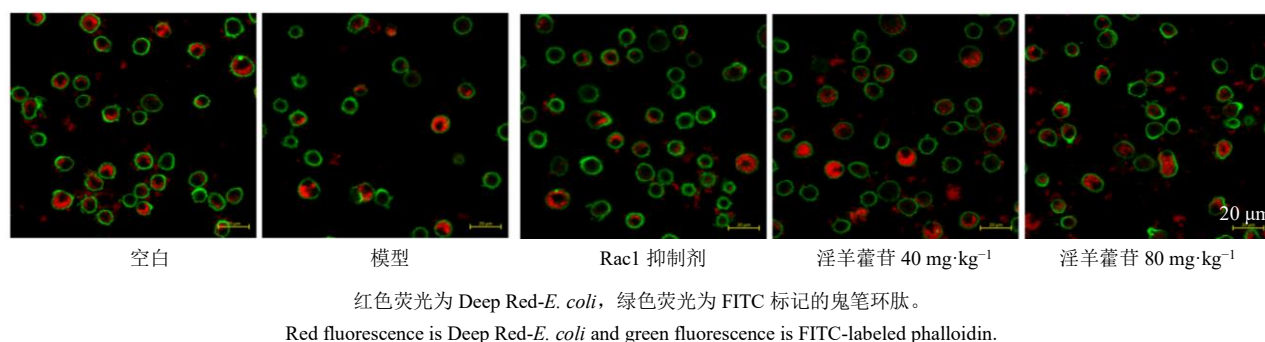


图 5 小鼠肺泡巨噬细胞骨架形态变化 (×400)

Fig. 5 Morphologic changes in cytoskeleton of mouse alveolar macrophages (×400)

抑制剂组与淫羊藿苷低、高剂量组小鼠肺功能指标有一定程度升高, 肺组织损伤减轻, 表明淫羊藿苷可以改善 COPD 小鼠一般状态及肺功能损伤。

COPD 的特征性表现——慢性气道炎症、持续性的呼吸道症状以及进行性的气流阻塞等, 与肺泡巨噬细胞吞噬及胞葬功能受损有关。巨噬细胞在肺内分布广泛, 占肺内免疫细胞的 90% 以上^[2], 巨噬细胞作为前哨细胞, 在抗原呈递、释放炎症介质的、募集炎症细胞中起重要作用, 在清除死亡或凋亡细胞及组织碎片、结束炎症反应和组织修复中也起重要作用^[21-23]。凋亡细胞能够快速被吞噬细胞吞噬, 这一过程可以预防死亡细胞释放胞内抗原引起的炎症反应和自身免疫应答是维持内环境稳态的重要基础^[24-27]。本研究结果显示, 烟雾刺激下小鼠肺泡巨噬细胞吞噬及胞葬功能降低, 巨噬细胞以促炎 M1 型为主, 使用 Rac1 抑制剂及低、高剂量淫羊藿苷干预后, 巨噬细胞吞噬及胞葬功能有所恢复, 巨噬细胞由促炎 M1 型向抑炎 M2 型转化。COPD 患者的肺泡巨噬细胞不仅对流感嗜血杆菌和肺炎链球菌的吞噬能力较差, 导致细菌定植及感染的反复发生, 而且巨噬细胞对细胞碎片、死亡或凋亡细胞清除的胞葬功能也受到抑制, 使坏死物质在肺中积累, 从而导致炎症持续存在, 加重患者病情^[28]。此外, 在香烟烟雾刺激下, 慢性持续性炎症反应导致 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症介质的释放, 高表达的 TNF- α 负向调节胞葬相关受体分子的表达, 使凋亡细胞不能有效清除从而加重炎症反应, 而正常的巨噬细胞胞葬亦可以有效减少 TNF- α 等炎症因子的分泌, 且 TNF- α 、IL-6 等炎症标志物与 COPD 严重程度密切相关, 在 COPD 稳定期患者血清和痰液中较正常人升高, 并在急性加重期进一步升高^[29-30]。巨噬细胞对凋亡细胞的清除是结束炎症反应的关键,

MFG-E8、GAS6 作为吞噬细胞表面胞葬辅助因子, 是吞噬细胞与凋亡细胞之间的纽带^[31-33]。研究表明, 香烟烟雾暴露下的小鼠肺组织凋亡细胞增加, MFG-E8 水平降低, 从而引起巨噬细胞胞葬功能的障碍^[34], 炎症刺激下 GAS6 被抑制导致巨噬细胞胞葬功能降低^[35]。本研究通过检测肺组织匀浆中炎症因子与胞葬辅助因子含量, 发现模型组小鼠炎症因子 IL-4、IL-6、TNF- α 水平增加, 胞葬辅助因子 MFG-E8、GAS6 水平受到抑制, 而给予 Rac1 抑制剂及淫羊藿苷干预后, 炎症有所缓解, 胞葬辅助因子水平增加, 巨噬细胞吞噬及胞葬功能障碍均得到一定程度的改善。说明淫羊藿苷可以改善香烟烟雾引起的小鼠肺泡巨噬细胞胞葬与吞噬功能障碍, 该机制可能与 Rac1 通路相关。

现有研究表明, 活化的 Rac1 介导炎症反应及氧化应激, Rac1 还通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶介导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生^[36]。香烟烟雾刺激下会引起肺部炎症反应并导致 ROS 大量堆积, 进而产生氧化应激导致肺组织损伤^[37]。体内外研究发现, 暴露在香烟烟雾下的小鼠肺组织 Rac1 表达升高并介导肺泡-上皮间充质转化^[38]。此外, Rac1 在调控细胞骨架重排中发挥重要作用, 巨噬细胞发挥吞噬作用需要细胞骨架形态的变化, 通过细胞膜结构的改变形成吞噬杯进而包裹被吞噬物^[39-40], 其主要过程包括 ①初始吞噬杯形成: 巨噬细胞通过膜表面受体识别病原微生物后, 细胞膜内侧产生大量肌动蛋白, 聚合的肌动蛋白形成初始吞噬杯; ②延展: 吞噬杯包裹颗粒物使肌动蛋白大量聚集, 根据颗粒物形态动态调整其形态和延展方向; ③吞噬杯延伸至最大: 随着细胞机械张力的增加, 吞噬杯延伸至最大程度,

细胞前缘肌动蛋白不断聚合并伴随着后方解聚,保持细胞极性及动态平衡^[41-43];④吞噬杯关闭:吞噬杯内包裹颗粒物并完全封闭^[39]。肌动蛋白的聚合与解聚、丝的断裂、末端加帽、丝的集束等动态变化被称为“肌动蛋白细胞骨架重构”^[44]。Rac1 作为 Rho 家族的小三磷酸鸟苷酶主要研究对象之一,活跃在细胞前沿,形成膜褶皱及板状伪足,膜褶皱与胞吞作用相关,板状伪足的形成在细胞迁移中发挥重要作用。本研究收集了小鼠肺泡巨噬细胞,使其吞噬灭活的荧光标记大肠杆菌,共聚焦显微镜下观察发现,模型组小鼠巨噬细胞吞噬大肠杆菌较少,形态变圆且僵硬,大量肌动蛋白丝聚合,排列紊乱,而给予 Rac1 抑制剂或淫羊藿苷干预后,巨噬细胞吞噬大肠杆菌变多,细胞形态有所改善。Rac1 与下游效应分子结合,协同完成肌动蛋白聚合与解聚,从而使巨噬细胞发挥正常的吞噬和胞葬功能,Rac1 通过胰岛素受体酪氨酸激酶底物 p53 蛋白(insulin receptor substrate p53, IRSp53)与 WASP 家族蛋白 WAVE 结合,刺激 Arp2/3 成核肌动蛋白聚合;或通过磷酸化其下游效应器 PAK 激活 LIM 激酶(LIM kinase, LIMK),活化的 LIMK 使得肌动蛋白解聚蛋白 cofilin 失活,从而稳定肌动蛋白,此时 cofilin 可以与突起前缘的 Arp2/3 复合物协同作用来促进肌动蛋白聚合,且进一步稳定所形成的板状伪足或膜褶皱^[45]。从 mRNA 及蛋白表达结果来看,香烟烟雾制备 COPD 模型小鼠肺组织中 Rac1、PAK 蛋白及 mRNA 的表达上调,使用 Rac1 抑制剂及低、高剂量淫羊藿苷干预后可下调其相关表达。说明在香烟烟雾刺激下,Rac1 等相关促进肌动蛋白聚合的分子表达均上调,Rac1 作为细胞前缘膜突起形成的关键因子,通过与 WAVE 蛋白结合激活 Arp2/3 复合物使肌动蛋白聚合排列,使肌动蛋白在细胞前缘不断堆积,作用于巨噬细胞吞噬杯的早期形成,吞噬杯的形成与包裹闭合是 1 个动态过程,香烟烟雾导致 Rac1 的持续活化使吞噬杯不能完全闭合,细胞骨架重排障碍进而导致吞噬功能障碍。淫羊藿苷可以通过调节 Rac1 及其下游分子的表达,介导巨噬细胞骨架结构重排改善其吞噬及胞葬功能障碍。

此外,Rac1 在吞噬过程中被上调,然后在吞噬体成熟之前被下调^[46],Rac1 在不断的激活和失活中调控细胞骨架重排,使巨噬细胞发挥吞噬功能,Rac1 活化可以激活巨噬细胞的吞噬功能,但 Rac1 持续活化则会导致炎症反应加剧,吞噬杯延伸停滞

而无法关闭,导致巨噬细胞吞噬功能障碍,同样,Rac1 低表达会下调巨噬细胞摄取颗粒物的活性,抑制吞噬体的闭合。通过体内外实验发现,淫羊藿苷可以调控 Rac1 及其下游效应分子的表达,使其恢复正常的激活-失活状态,从而介导巨噬细胞骨架重排,改善 COPD 所致肺功能、肺组织损伤,抑制炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990—2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(6): 585-596.
- [2] Lugg S T, Scott A, Parekh D, *et al.* Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: Mechanisms for lung disease [J]. *Thorax*, 2022, 77(1): 94-101.
- [3] Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre G E, *et al.* Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 813: 152667.
- [4] Rennard S I. Cigarette smoke in research [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 31(5): 479-480.
- [5] Barnes P J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(3): 183-192.
- [6] Sohal S S. Inhaled corticosteroids and increased microbial load in COPD: Potential role of epithelial adhesion molecules [J]. *Eur Respir J*, 2018, 51(2): 1702257.
- [7] 罗云梅,李铭铭,熊乙林,等.基于 CX3CL1 介导的炎症反应研究淫羊藿苷对缺氧诱导的肺动脉高压小鼠的作用 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 1068-1075.
- [8] Solleti S K, Simon D M, Srisuma S, *et al.* Airway epithelial cell PPAR γ modulates cigarette smoke-induced chemokine expression and emphysema susceptibility in mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(3): L293-L304.
- [9] Liu Z Q. Icaritin: A special antioxidant to protect linoleic acid against free-radical-induced peroxidation in micelles [J]. *J Phys Chem A*, 2006, 110(19): 6372-6378.
- [10] 孙玉姣,李祎群,李莉.淫羊藿苷对慢性阻塞性肺疾病模型的抗炎和抗氧化作用 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2015, 17(4): 4-7.
- [11] Xu C Q, Liu B J, Wu J F, *et al.* Icaritin attenuates LPS-induced acute inflammatory responses: Involvement of

- PI3K/Akt and NF-kappaB signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 642(1/2/3): 146-153.
- [12] Li L L, Sun J, Xu C Q, *et al.* Icaritin ameliorates cigarette smoke induced inflammatory responses via suppression of NF- κ B and modulation of GR *in vivo* and *in vitro* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102345.
- [13] Lea S, Plumb J, Metcalfe H, *et al.* The effect of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands on *in vitro* and *in vivo* models of COPD [J]. *Eur Respir J*, 2014, 43(2): 409-420.
- [14] Jiang J X, Zhang S J, Shen H J, *et al.* Rac1 signaling regulates cigarette smoke-induced inflammation in the lung via the Erk1/2 MAPK and STAT3 pathways [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(7): 1778-1788.
- [15] Ito H, Yamashita Y, Tanaka T, *et al.* Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and suppresses efferocytosis through the activation of RhoA [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12620.
- [16] Kim J G, Islam R, Cho J Y, *et al.* Regulation of RhoA GTPase and various transcription factors in the RhoA pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6381-6392.
- [17] Hoppe A D, Swanson J A. Cdc42, Rac1, and Rac2 display distinct patterns of activation during phagocytosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(8): 3509-3519.
- [18] 张科东, 马冉, 李征途, 等. 一种熏烟小鼠慢性阻塞性肺疾病模型的建立及鉴定 [J]. *国际呼吸杂志*, 2012, 32(21): 1607-1611.
- [19] Liang G B, He Z H. Animal models of emphysema [J]. *Chin Med J*, 2019, 132(20): 2465-2475.
- [20] 田燕歌, 董浩然, 刘学芳, 等. 补肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺泡表面活性蛋白 A、D 及肺泡结构的影响 [J]. *中医学报*, 2018, 33(1): 99-105.
- [21] Dewhurst J A, Lea S, Hardaker E, *et al.* Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7143.
- [22] Byrne A J, Mathie S A, Gregory L G, *et al.* Pulmonary macrophages: Key players in the innate defence of the airways [J]. *Thorax*, 2015, 70(12): 1189-1196.
- [23] Bazzan E, Turato G, Tinè M, *et al.* Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity [J]. *Respir Res*, 2017, 18(1): 40.
- [24] Jacobson M D, Weil M, Raff M C. Programmed cell death in animal development [J]. *Cell*, 1997, 88(3): 347-354.
- [25] Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 784-788.
- [26] Savill J, Dransfield I, Gregory C, *et al.* A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses [J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(12): 965-975.
- [27] Hengartner M O. Apoptosis: Corraling the corpses [J]. *Cell*, 2001, 104(3): 325-328.
- [28] Eltboli O, Bafadhel M, Hollins F, *et al.* COPD exacerbation severity and frequency is associated with impaired macrophage efferocytosis of eosinophils [J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14: 112.
- [29] 赵志刚, 倪海滨, 王双乐. 慢性阻塞性肺疾病发生发展与炎症介质关系的研究进展 [J]. *交通医学*, 2020, 34(2): 150-154.
- [30] Chen Y W R, Leung J M, Sin D D. A systematic review of diagnostic biomarkers of COPD exacerbation [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158843.
- [31] Poon I K, Lucas C D, Rossi A G, *et al.* Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 166-180.
- [32] Nepal S, Tirupathi C, Tsukasaki Y, *et al.* STAT6 induces expression of Gas6 in macrophages to clear apoptotic neutrophils and resolve inflammation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(33): 16513-16518.
- [33] Miksa M, Amin D, Wu R Q, *et al.* Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages [J]. *Mol Med*, 2007, 13(11/12): 553-560.
- [34] Wang Y Q, Luo G W, Chen J, *et al.* Cigarette smoke attenuates phagocytic ability of macrophages through down-regulating Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) expressions [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42642.
- [35] Feng X Y, Deng T T, Zhang Y, *et al.* Lipopolysaccharide inhibits macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils by regulating the production of tumour necrosis factor α and growth arrest-specific gene 6 [J]. *Immunology*, 2011, 132(2): 287-295.
- [36] Acevedo A, González-Billault C. Crosstalk between Rac1-mediated actin regulation and ROS production [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116: 101-113.
- [37] Wang C X, Zhou J D, Wang J Q, *et al.* Progress in the mechanism and targeted drug therapy for COPD [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 248.
- [38] Shen H J, Sun Y H, Zhang S J, *et al.* Cigarette smoke-induced alveolar epithelial-mesenchymal transition is mediated by Rac1 activation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(6): 1838-1849.

- [39] Rougerie P, Miskolci V, Cox D. Generation of membrane structures during phagocytosis and chemotaxis of macrophages: Role and regulation of the actin cytoskeleton [J]. *Immunol Rev*, 2013, 256(1): 222-239.
- [40] Dustin M L, Davis S J. Phagocytes get close to their enemies [J]. *Dev Cell*, 2016, 36(2): 131-132.
- [41] Botelho R J, Teruel M, Dierckman R, *et al.* Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(7): 1353-1368.
- [42] Marion S, Mazzolini J, Herit F, *et al.* The NF- κ B signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles [J]. *Dev Cell*, 2012, 23(5): 954-967.
- [43] Scott C C, Dobson W, Botelho R J, *et al.* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(1): 139-149.
- [44] Ono S. A plague of actin disassembly [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(19): 8101-8102.
- [45] Abdrabou A, Wang Z X. Post-translational modification and subcellular distribution of Rac1: An update [J]. *Cells*, 2018, 7(12): 263.
- [46] Kim S Y, Kim S, Bae D J, *et al.* Coordinated balance of Rac1 and RhoA plays key roles in determining phagocytic appetite [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e174603.

[责任编辑 李亚楠]