

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.09.013

泽漆化痰方对慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌模型大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白表达的影响

傅慧婷, 平键, 吴冬梅, 张平, 沈书扬, 余小萍, 窦丹波✉

上海中医药大学附属曙光医院, 上海市浦东新区张衡路 528 号, 201203

摘要 目的 探讨泽漆化痰方对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 气道黏液高分泌状态的影响及其机制。方法 28 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、泽漆化痰组、AG1478 组, 每组 7 只。除空白组外, 其余 3 组采用烟熏联合脂多糖 (LPS) 气道内滴入建立大鼠 COPD 气道黏液高分泌模型。造模 2 周后, 泽漆化痰组每日予泽漆化痰方浸膏粉以 1 g/100 g 体重灌胃, AG1478 组予以 AG1478 0.8 mg/100 g 体重灌胃, 空白组和模型组不灌胃, 连续 2 周。第 4 周末腹主动脉取血, 留取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织标本。HE、PAS 染色观察气道组织病理学变化, ELISA 法检测 BALF 中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 8 (IL-8) 含量, RT-PCR 法检测大鼠肺组织黏蛋白 5AC (MUC5AC) 基因表达, Western blot 法检测肺组织特异性蛋白 1 (SP1)、磷酸化特异性蛋白 1 (p-SP1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、磷酸化表皮生长因子受体 (p-EGFR)、MUC5AC 蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组大鼠气道上皮杯状细胞增生, 黏膜下腺体肥大, 局部炎症细胞浸润; BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量增加; 肺组织 MUC5AC 基因表达升高, p-EGFR/EGFR、p-SP1/SP1、MUC5AC 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, AG1478 组和泽漆化痰组大鼠气道上皮杯状细胞增生程度减轻, BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量降低, 肺组织 MUC5AC 基因表达下降, p-SP1/SP1、MUC5AC 蛋白表达均下降 ($P < 0.05$)。泽漆化痰组在降低 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量方面优于 AG1478 组 ($P < 0.05$)。结论 泽漆化痰方可抑制 COPD 气道黏液高分泌状态, 其机制可能与减轻炎症损伤, 降低肺组织 MUC5AC 基因表达, 下调 EGFR 信号通路相关蛋白表达有关。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 气道黏液高分泌; 泽漆化痰方; 气道黏蛋白; 表皮生长因子受体信号通路

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种危害人类健康的慢性呼吸系统疾病, 其特征是持续存在的气流受限^[1]。气道黏液高分泌是 COPD 的重要病理特征之一, 与 COPD 的发生、发展和临床结局密切相关, 是影响 COPD 患者肺功能、生命质量、住院率和病死率的重要因素, 干预并控制气道黏液高分泌在 COPD 防治研究中具有重要意义^[2]。泽漆化痰方是全国名老中医黄吉康教授治疗痰饮咳喘的经验方, 由《金匱要略》泽漆汤化裁而来, 全方宣肃并用, 升降并施, 梳理气机, 外透内散, 具有调节肺宣发、肃降的功能, 使肺之水道得以通调, 有助于痰液的

消散和排出, 从而缓解慢性咳嗽患者痰壅气逆、咳嗽胸闷等症状^[3]。前期研究^[4-5]证实, 泽漆化痰方具有抑制 COPD 气道黏液高分泌的作用。本研究旨在建立 COPD 气道黏液高分泌大鼠模型, 从调控气道黏蛋白表达的角度进一步探讨其防治 COPD 的可能作用机理, 为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 28 只, 8 周龄, 体质量 (200 ± 20) g, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 实验动物许可证号: SYXK (沪) 2017-008。饲养于上海中医药大学实验动物中心, 温度 (22 ± 2) °C, 相对湿度 (55 ± 2) %, 自由摄食饮水。

基金项目: 国家自然科学基金 (81704025); 上海中医药大学“杏林传承型人才培养计划”

✉ 通讯作者: doudabo@126.com, (021) 20256333

1.2 药物

泽漆化痰方组成: 泽漆 30 g, 紫菀 15 g, 款冬花 15 g, 枳壳 9 g, 桔梗 9 g, 前胡 12 g, 北柴胡 15 g, 白前 12 g, 竹沥半夏 15 g, 陈皮 9 g, 甘草 9 g。饮片购于上海中医药大学附属曙光医院中药房, 上药加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并滤液浓缩, 60 ℃ 减压干燥即得浸膏粉 1042 g (得膏率 34.7%), 低温干燥保存备用。AG1478 (货号 ICG1024), 购自美国 Calbiochem 公司。

1.3 主要试剂和仪器

肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体 (批号 20190719-31063A)、白细胞介素 8 (IL-8) 抗体 (批号 20190721-30221A), 上海酶联生物科技有限公司; 脂多糖 (LPS, 货号 L2880)、戊巴比妥钠 (货号 P3761), 美国 Sigma 公司; 造模实验用烟 (University of Kentucky 公司, 批号 CODE 3R4F); 4% 甲醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20190325); RIPA 裂解液 (碧云天生物技术有限公司, 货号 P0013C); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (货号 G1005)、PAS 染色试剂盒 (货号 G1008), 武汉谷歌生物科技; 羊抗兔 IgG (Servicebio 公司, 货号 GB23303); DAB 显色剂 (迈新公司, 货号 DAB0031); 反转录试剂 (货号 D6110A)、定量 PCR 试剂 (货号 RR420A), Takara 公司; Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司, 批号 1401902); 兔抗特异性蛋白 1 (SP1) 抗体 (货号 ab227383)、兔抗磷酸化特异性蛋白 1 (p-SP1) 抗体 (货号 ab59257)、兔抗表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体 (货号 ab52894)、兔抗磷酸化表皮生长因子受体 (p-EGFR) 抗体 (货号 76193), Abcam 公司; 兔抗黏蛋白 5AC (MUC5AC) 抗体 (NOVUS 公司, 货号 4586); 兔抗 GAPDH 抗体 (Abcam 公司, 货号 A20120A0701); ECL 化学发光试剂 (GE 公司, 批号 5978613)。

自制有机玻璃烟熏箱 (100 cm × 100 cm × 50 cm); 小动物体重台称 (上海花潮电器有限公司, 型号 ES461); 包埋机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, 型号 KD-BM); 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司, 型号 RM2016); 正置光学显微镜 (日本尼康公司, 型号 Nikon Eclipse CI); 成像系统 (日本尼康公司, 型号 Nikon DS-U3); 定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号 7900); 多功能酶标仪 (Bio-Tek 公司, 型号 Power Wave X); 小型高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 型号

5415R); 电泳仪 (上海天能科技有限公司, 型号 EPS-300); 紫外分光光度计 (上海美析仪器有限公司, 型号 UV-1800PC)。

1.4 COPD 气道黏液高分泌大鼠模型的建立

采用烟熏联合 LPS 气道内滴入建立 COPD 气道黏液高分泌大鼠模型^[8]。大鼠于实验第 1、14 天乙醚麻醉后气管内注入浓度为 1 g/L 的 LPS 200 μ l (当日不进行烟熏), 第 2~28 天 (第 14 天除外), 每日将 50 支造模实验用烟分 2 次加入盛有 21 只大鼠的烟熏笼中熏 40 min (每次 25 支, 上午 9: 00, 下午 3: 00), 每日 2 次。病理染色符合气道上皮杯状细胞增生提示模型建立成功。

1.5 分组及给药

将 28 只大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、泽漆化痰组、AG1478 组, 每组 7 只。除空白组外, 其余 3 组均进行 COPD 气道黏液高分泌模型制备。泽漆化痰组造模 2 周后给予泽漆化痰浸膏粉 1 g/100 g 灌胃, AG1478 组造模 2 周后给予 AG1478 0.8 mg/100 g 灌胃, 均于每日烟熏前给药, 连续 2 周。空白组和模型组不灌胃。

1.6 观察指标及方法

各组于末次给药后禁食 12 h, 应用 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 然后将大鼠仰卧固定在操作台上, 腹主动脉放血处死, 切开胸部, 暴露气管及肺部, 取标本。统一结扎右肺, 然后气管插管进入左肺, 注入 5 ml PBS, 反复抽吸 4 次后吸出肺泡灌洗液, 打入 10 ml 离心管中, 即为支气管肺泡灌洗液 (BALF); 再取没有灌洗的右肺切取相同部位, 4% 甲醛固定, 其余组织放入冻存管中, 液氮保存。

1.6.1 HE、PAS 染色观察大鼠气道组织的病理形态学变化 4% 甲醛固定肺组织, 石蜡包埋, HE 染色: 石蜡切片, 常规脱蜡覆水, 苏木精染色 5 min, 5% 乙酸分化 1 min, 流水冲洗, 返蓝, 伊红染色 1 min, 脱水, 滴上中性树胶, 封片。PAS 染色: 脱蜡, 蒸馏水洗, 阿尔新蓝染色液染色 10 min, 水洗, 过碘酸处理 10 min, 水洗, 滴加 Schiff 液 2 ml 染色 10 min, 流水冲洗 5 min, 苏木素复染细胞核, 分化, 水洗; 返蓝、水洗, 脱水透明, 树胶封片, 显微镜下分析拍照。

1.6.2 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 检测大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-8 浓度 参考试剂盒操作流程, 采用酶标仪检测, 以标准物的浓度为横坐标, OD 值为纵坐标, 采用标准物的浓度与 OD 值计算出标

准曲线的直线回归方程式, 计算出样品浓度, 再乘以稀释倍数, 即为样品的实际浓度。

1.6.3 实时荧光定量 PCR 法检测大鼠肺组织 MUC5AC 基因表达 Trizol 提取总 RNA, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度及纯度, 按反转录试剂盒操作说明将总 RNA 反转录成 cDNA, -20°C 或 -80°C 存储。引物由上海生工生物技术有限公司设计合成, 序列如下: GAPDH: 上游引物 5'-TGACT-TCAACAGCGACACCCA-3', 下游引物 5'-CACCCT-GTTGCTGTAGCCAAA-3', 产物长度 197bp; MUC5AC: 上游引物 5'-CCAGCCTATGTGAAAGAT-3', 下游引物 5'-GAGGGAAGTGGAGTTATTG-3', 产物长度 121 bp; 按扩增试剂盒操作说明进行 cDNA 扩增, 采用 $F = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算各组基因相对表达量。

1.6.4 Western blot 法检测肺组织 SP1、EGFR、MUC5AC 蛋白表达 RIPA 裂解肺组织提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳, 湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭 1 h, 之后加入不同一抗孵育, 兔抗 GAPDH 抗体 (1:1000), 兔抗 SP1 抗体 (1:2000), 兔抗 p-SP1 抗体 (1:500), 兔抗 EGFR 抗体 (1:1000), 兔抗 p-EGFR 抗体 (1:500), 兔抗 MUC5AC 抗体 (1:1000); 孵育结束 TBST 洗涤 3 次后加入二抗羊抗兔 IgG, 室温孵育 2 h, 充分洗涤后 ECL 化学发光法显影, 化学发光成像系统分析电泳条带, Image J (1.52a 版本) 软件将图片上每个特异条带灰度值数字化。

1.7 统计学方法

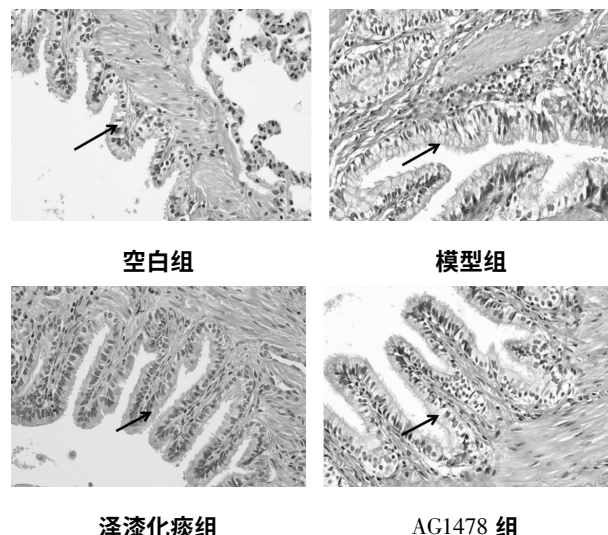
采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量数据采用均数 $\pm$ 标准差描述, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较若方差齐采用 LSD 法, 若方差不齐采用 Dunnett's T^3 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠气道组织 HE 染色结果比较

图 1 示, 空白组大鼠气道黏膜上皮完整, 纤毛无脱落, 杯状细胞少见, 黏膜下腺体无增生肥大, 气道壁无增厚, 气道无狭窄, 腔内无分泌物堵塞。模型组气道上皮纤毛倒伏、脱落明显, 杯状细胞增生, 黏膜下腺体肥大, 局部炎性细胞浸润, 说明造模成功。泽漆化痰组气道上皮可见纤毛少量粘连及脱落, 杯状细胞较模型组减少, 炎症程度较模型组

减轻。AG1478 组气道上皮脱落坏死较模型组减轻, 杯状细胞增生程度较轻, 气道周围炎性细胞浸润较模型组减轻。

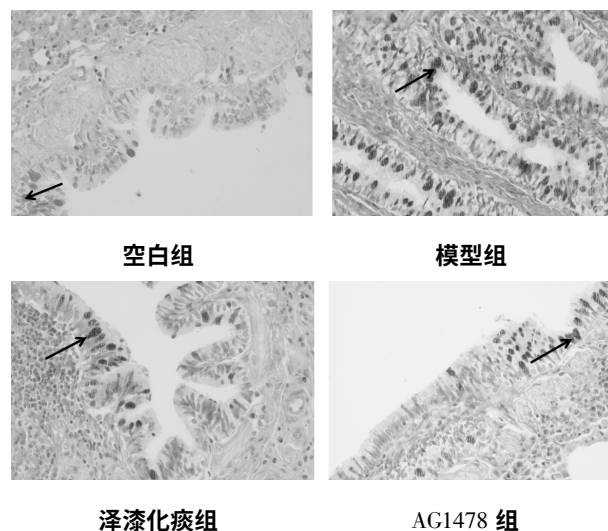


注: 箭头所指为杯状细胞。

图 1 各组大鼠气道组织 HE 染色结果 ($\times 200$)

2.2 各组大鼠气道组织 PAS 染色结果比较

图 2 示, 各组气道组织轮廓清晰, 杯状细胞主要分布在气道上皮。与空白组比较, 模型组杯状细胞数目显著增多; 与模型组比较, 泽漆化痰组和 AG1478 组杯状细胞数目均减少, 以泽漆化痰组最为明显。



注: 箭头所指为杯状细胞。

图 2 各组大鼠气道组织 PAS 染色结果 ($\times 200$)

2.3 各组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量比较

表 1 示, 与空白组比较, 其余各组 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 泽漆化痰组与 AG1478 组 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量均降低 ($P < 0.05$); 与 AG1478 组比较,

泽漆化痰组 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量均降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-8 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α	IL-8
空白组	7	219.14 $\pm$ 2.26	186.43 $\pm$ 0.82
模型组	7	250.54 $\pm$ 5.51 ^{a)}	230.63 $\pm$ 4.52 ^{a)}
泽漆化痰组	7	227.14 $\pm$ 1.88 ^{a) b) c)}	211.57 $\pm$ 1.35 ^{a) b) c)}
AG1478 组	7	238.13 $\pm$ 1.56 ^{a) b)}	215.55 $\pm$ 1.72 ^{a) b)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; IL-8, 白细胞介素 8。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与 AG1478 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠肺组织 MUC5AC 基因表达比较

表 2 示, 与空白组比较, 模型组 MUC5AC 基因表达水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 泽漆化痰组和 AG1478 组肺组织中 MUC5AC 基因表达均降低 ($P < 0.05$); 泽漆化痰组和 AG1478 组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织 MUC5AC 基因表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MUC5AC 基因
空白组	7	1.05 $\pm$ 0.12
模型组	7	1.29 $\pm$ 0.18 ^{a)}
泽漆化痰组	7	0.99 $\pm$ 0.12 ^{b)}
AG1478 组	7	0.97 $\pm$ 0.09 ^{b)}

注: MUC5AC, 黏蛋白 5AC。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 各组大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白表达比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织 p-EGFR/EGFR、p-SP1/SP1、MUC5AC 增高, 泽漆化痰组和 AG1478 组 p-SP1/SP1 亦升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 泽漆化痰组及 AG1478 组肺组织中 p-SP1/SP1、MUC5AC 均不同程度降低, AG1478 组 p-EGFR/EGFR 降低 ($P < 0.05$), 而泽漆化痰组 p-EGFR/EGFR 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 泽漆化痰组肺组织 p-EGFR/EGFR 高于 AG1478 组 ($P < 0.05$)。各组大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白电泳图见图 3。

3 讨论

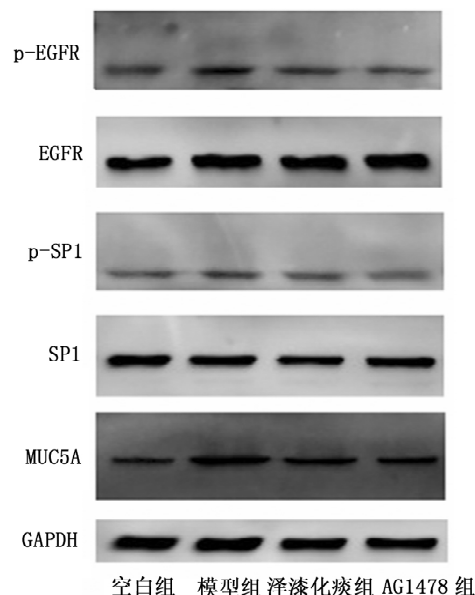
临床上, COPD 气道黏液高分泌的主要临床表现为反复的咳嗽咳痰^[7], 可归属于中医学“肺胀”“咳嗽”“痰饮”等范畴。痰作为病理产物, 同时也是致病因素, 痰液滞留的部位在肺, 痰的形成与肺通调水道功能障碍有关^[8]。黄吉康教授认为,

表 3 各组大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	p-EGFR/EGFR	p-SP1/SP1	MUC5AC
空白组	7	0.85 $\pm$ 0.14	0.38 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.13
模型组	7	1.17 $\pm$ 0.12 ^{a)}	1.08 $\pm$ 0.06 ^{a)}	1.17 $\pm$ 0.11 ^{a)}
泽漆化痰组	7	0.95 $\pm$ 0.14 ^{c)}	0.82 $\pm$ 0.17 ^{a) b)}	0.82 $\pm$ 0.13 ^{b)}
AG1478 组	7	0.71 $\pm$ 0.09 ^{b)}	0.80 $\pm$ 0.13 ^{a) b)}	0.71 $\pm$ 0.09 ^{b)}

注: EGFR, 表皮生长因子受体; p-EGFR, 磷酸化表皮生长因子受体; SP1, 特异性蛋白 1; p-SP1, 磷酸化特异性蛋白 1; MUC5AC, 黏蛋白 5AC。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与 AG1478 组比较, $P < 0.05$ 。



空白组 模型组 泽漆化痰组 AG1478 组

注: EGFR, 表皮生长因子受体; p-EGFR, 磷酸化表皮生长因子受体; SP1, 特异性蛋白 1; p-SP1, 磷酸化特异性蛋白 1; MUC5AC, 黏蛋白 5AC。

图 3 各组大鼠肺组织 EGFR 信号通路相关蛋白电泳图
慢性肺系疾病时发时止, 缠绵难愈, 痰为其主要病理因素; 痰浊久居于肺, 每因体虚感寒引动宿痰伏饮, 阻于气道, 肺失宣降而出现咳嗽喘症; 痰的变化与慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、支气管哮喘等肺系疾病的发作程度密切相关。因此, 提出“治喘先治痰”“治咳者, 化痰为先”, 若不蠲除痰饮之患, 肺系疾病将永无宁日^[9]。泽漆化痰方以泽漆为君药, 《长沙药解》曰“泽漆, 苦寒之性, 长于泄水, 故能治痰饮阻格之咳”, 是黄老治疗痰饮咳喘的必用药物, 按每日排痰量的多少, 其剂量可为 15 ~ 120 g; 臣以柴胡、半夏, 柴胡主升, 半夏主降, 柴胡外透, 半夏内散, 柴胡性寒, 半夏性温, 两者相辅相成; 紫菀长于祛痰, 款冬花善于止咳, 两味相伍为用为《千金要方》中“治三十年

嗽方”；白前、前胡成对，《本草纲目》称前胡为“痰气要药”，《本草正义》中称白前为“止咳降气要药”；枳壳下气，桔梗宣肺载药上行，一上一下，一升一降，开肺行气，宣郁宽胸，使气机畅达，顽痰则消。

正常情况下，气道黏膜覆盖少量黏液，作为呼吸道黏膜的保护性屏障，在清除外来有害物质、保持呼吸道微环境的稳定中起到重要作用^[8]。而在 COPD 的发生发展过程中，由于感染、变应原、烟雾等有害刺激因素，使气道炎症细胞及其释放的多种炎症因子刺激黏膜下腺体肥大增生，常伴有杯状细胞增生/化生，黏蛋白基因表达上调，导致气道黏液分泌亢进，影响黏液的生物物理学特性，表现为黏液的量和黏稠度明显增加^[9]。其病理后果包括气道阻塞、气流受限、继发感染、急性加重、气体交换功能障碍、通气/血流比例失调^[10]。因此，干预气道黏液调控的重要环节以及有效控制气道黏液高分泌，已经成为 COPD 防治研究面临的重要课题。

MUC5AC 是 COPD 气道黏液高分泌的分子基础，气道上皮 MUC5AC 的含量和转录水平与气道黏液分泌呈正相关^[11]。EGFR 信号通路在气道黏液高分泌的信号转导通路中居于中心地位，也是许多炎症介质引起气道黏液高分泌的共同通路^[12]。TNF- α 可刺激气道上皮 EGFR 及其配体增多，EGFR 酪氨酸残基磷酸化，激活下游通路蛋白 SP1，使细胞外信号传至细胞核而触发 MUC5AC 基因转录^[14-15]。有研究^[16]发现，应用 EGFR 受体酪氨酸激酶抑制剂 AG1478 可通过抑制 EGFR 自身酪氨酸激酶活性，有效阻断 TNF- α 诱导的气道黏液高分泌，故本研究设立 AG1478 组。

本实验结果显示，与空白组比较，模型组大鼠气道上皮杯状细胞增生明显，BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量显著升高，肺组织 MUC5AC 基因表达上调，肺组织 p-EGFR/EGFR、p-SP1/SP1、MUC5AC 蛋白表达增多。经泽漆化痰方干预后，大鼠气道上皮杯状细胞增生减轻，BALF 中炎症因子 TNF- α 、IL-8 含量显著降低，肺组织 MUC5AC 基因表达下调，p-SP1/SP1 及 MUC5AC 蛋白表达水平降低。以上结果说明泽漆化痰方可能通过抑制炎症因子的释放，进而下调 EGFR 信号通路相关蛋白，从而干预气道上皮杯状细胞的增生，减轻气道黏液高分泌的病理状态。同时，泽漆化痰组降低模型大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-8 含量更为明显，AG1478 组干预 EGFR

信号通路相关蛋白表达水平较为显著，说明泽漆化痰方抑制气道黏液高分泌的过程还可能存在 EGFR 信号通路之外的未知通路，值得我们进一步的研究和探索。

参考文献

- [1] VOGELMEIER CF, CRINER GJ, MARTINEZ FJ, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease 2017 report: GOLD executive summary [J]. Eur Respir, 2017, 195(5): 557-582.
- [2] KIM V, CRINER GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(3): 228-237.
- [3] 黄吉康, 余小萍. 黄吉康肺病临证经验集 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 64-65.
- [4] 傅慧婷, 窦丹波, 杨军, 等. 泽漆化痰方治疗慢阻肺痰浊阻肺证及对气道黏液高分泌的影响 [J]. 中国中医急症, 2015, 24(3): 415-417.
- [5] 傅慧婷, 窦丹波, 杨军, 等. 基于“肺主通调水道”理论研究泽漆化痰方对 COPD 大鼠气道黏液高分泌的影响 [J]. 中国中医急症, 2014, 3(23): 391-393.
- [6] 王骏, 李春盈, 刘治坤, 等. 慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌大鼠模型的建立 [J]. 心肺血管杂志, 2014, 33(4): 592-595.
- [7] NADEL JA. Mucous hypersecretion and relationship to cough [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(5): 510-513.
- [8] 傅慧婷, 余小萍. 肺主通调水道功能与气道黏液高分泌 [J]. 新中医, 2013, 45(3): 5-7.
- [9] ROGERS DF. Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion [J]. Respir Care, 2007, 52(9): 1134-1146.
- [10] TAMAOKI J. Targeting airway mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Investig, 2015, 53(6): 247-248.
- [11] MARTIN C, FRIJA-MASSON J, BURGEL PR. Targeting mucus hypersecretion: new therapeutic opportunities for COPD? [J]. Drugs, 2014, 74(10): 1073-1089.
- [12] 强丽霞, 石昭泉. MUC5AC 与气道黏液高分泌 [J]. 国际呼吸杂志, 2011, 31(5): 385-387.
- [13] RUBIN BK, PRIFTIS KN, SCHMIDT HJ, et al. Secretory hyperresponsiveness and pulmonary mucus hypersecretion [J]. Chest, 2014, 146(2): 496-507.
- [14] COSIO MG, SAETTA M, AGUSTI A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease [J]. N Engl J Med, 2009, 360(23): 2445-2454.
- [15] LAI H, ROGERS DF. New pharmacotherapy for airway mucus hypersecretion in asthma and COPD: targeting

intracellular signaling pathways [1]. J Aerosol Med Pulm

Drug Deliv, 2010, 23(4): 219–231.

[6] TAKEZAWA K, OGAWA T, SHIMIZU S, et al. Epider-

mal growth factor receptor inhibitor AG1478 inhibits mu-

cus hypersecretion in airway epithelium [J]. Am J Rhinol

Allergy, 2016, 30(1): 1–6.

Effect of *Zeqi Huatan Formula* (泽漆化痰方) on the Expression of EGFR Signaling Pathway-related Proteins in Lung Tissues of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats with Airway Mucus Hypersecretion

FU Huiting, PING Jian, WU Dongmei, ZHANG Ping, SHEN Shuyang, YU Xiaoping, DOU Danbo

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Zeqi Huatan Formula* (ZHF, 泽漆化痰方) on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model rats with airway mucus hypersecretion as well as the underlying mechanism.

Methods Twenty-eight Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, ZHF group and AG1478 group, with seven rats in each group. Except for the blank group, smoking combined with airway instillation of lipopolysaccharide (LPS) were used to establish COPD airway mucus hypersecretion rat model. Two weeks after the modeling, ZHF group was given ZHF extract powder by gavage daily at a dose of 1 g/100 g body weight, while AG1478 group was administered with AG1478 by gavage at a dose of 0–8 mg/100 g body weight, both for two consecutive weeks; the rats in the blank group and the model group were not gavaged. At the end of the fourth week, blood was collected from the abdominal aorta, and the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue samples were obtained. HE and PAS staining were used to explore the airway histopathological changes. ELISA method was used to detect the content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin 8 (IL-8) in BALF, and RT-PCR method was used to detect the gene expression of mucin 5AC (MUC5AC) in the lung tissues of rats. Western blotting was used to detect the expression of specific protein 1 (SP1), phosphorylated specific protein 1 (p-SP1), epidermal growth factor receptor (EGFR), phosphorylated epidermal growth factor receptor (p-EGFR), and MUC5AC protein in the lung tissues. **Results** Compared to the blank group, in the model group there were airway epithelial goblet cells hyperplasia, submucosal gland hypertrophy, and local inflammatory cell infiltration; the contents of TNF- α and IL-8 in BALF increased; the gene expression of MUC5AC in the lung tissues increased; the expression of p-EGFR/EGFR, p-SP1/SP1, MUC5AC protein increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the degree of airway epithelial goblet cell proliferation was reduced in AG1478 group and ZHF group; the TNF- α and IL-8 levels in BALF decreased; the MUC5AC gene expression in the lung tissue decreased; the expression of p-SP1/SP1 and MUC5AC protein decreased ($P < 0.05$). ZHF group was better than AG1478 group in reducing the TNF- α and IL-8 levels in BALF ($P < 0.05$). **Conclusion** ZHF may inhibit the hypersecretion of airway mucus in COPD rats possibly by reducing inflammation, decreasing the MUC5AC gene expression in lung tissue, and down-regulating the expression of EGFR signaling pathway-related proteins.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; airway mucus hypersecretion; *Zeqi Huatan Formula* (泽漆化痰方); airway mucin; epidermal growth factor receptor signaling pathway

(收稿日期: 2020–06–04; 修回日期: 2020–11–04)

编辑: 邓 媛