

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.21.014

# 保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺动脉 JAK/STAT 信号传导通路的影响

何飞<sup>1</sup>, 沈亚青<sup>1</sup>, 徐俭朴<sup>\*</sup>, 王辉<sup>2</sup>, 贾仰民<sup>1</sup>, 喻婷<sup>1</sup>

(1. 浙江中医药大学附属中西医结合医院, 浙江省杭州市下城区环城东路 208 号, 310003; 2. 浙江中医药大学)

**摘要** 目的 探讨保肺定喘汤治疗慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的可能作用机制。方法 50 只大鼠随机分为正常组、模型组、中药组、西药组和中西医结合组, 每组 10 只。除正常组外其余各组采用气道滴注脂多糖联合香烟烟雾暴露的方法制备大鼠 COPD 模型。造模后第 29~70 天中药组给予保肺定喘汤 12.4 g/(kg·d) 灌胃, 西药组雾化吸入布地奈德混悬液 50  $\mu$ g/(kg·d), 中西医结合组同时予保肺定喘汤灌胃及雾化吸入布地奈德混悬液, 正常组、模型组用 4 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃。干预后对各组大鼠肺小动脉进行 Masson 染色并检测管壁内胶原纤维及  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 表达变化, 检测血清白细胞介素 6 (IL-6) 含量及大鼠肺动脉磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2) 和磷酸化信号转导及转录激活因子 1 (p-STAT1) 表达情况。结果与正常组比较, 模型组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达显著增加, 血清 IL-6 含量升高, 肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 表达显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。西药组、中药组与中西医结合组肺小动脉胶原纤维百分比、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达、血清 IL-6 含量及肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 表达均较模型组显著减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 中西医结合组较中药组 p-JAK2 表达显著下降 ( $P < 0.05$ )。结论 保肺定喘汤能有效减轻 COPD 大鼠肺血管重构, 其机制可能与抑制 JAK/STAT 信号传导通路、调节大鼠肺动脉胶原纤维和  $\alpha$ -SMA 表达有关。

**关键词** 慢性阻塞性肺疾病; 保肺定喘汤; 血管重构; JAK/STAT 信号传导通路;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是呼吸系统常见病、多发病, 其病情不断进展最终可引起慢性肺源性心脏病 (简称“肺心病”)。肺血管重构是 COPD 肺动脉高压持续进展及最终形成肺心病的重要原因<sup>[1]</sup>, 其过程受到多种细胞因子等引起肺血管细胞内信号转导通路发生变化组成复杂网络结构调控。JAK/STAT 是一条多种细胞因子和生长因子共同的信号转导途径, 与细胞生长、增殖和分化关系十分密切, 并在血管平滑肌细胞增殖和迁移中发挥着重要作用<sup>[2]</sup>。中医药在治疗 COPD 并发肺动脉高压、肺心病方面具有一定优势<sup>[3]</sup>。保肺定喘汤为国家级名老中医王会仍的经验方, 前期研究发现该方对大鼠肺血管重构具有一定的抑制作用<sup>[4]</sup>。本研究基于 JAK/STAT 信号传导通路探讨保肺定喘汤对 COPD 大鼠肺血管重构的干预作用, 为治疗 COPD

及其并发症提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 50 只, 5 周龄, 体重 (150  $\pm$  20) g, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 实验动物许可证号: SYXK (浙) 2013-0184。

### 1.2 药物

保肺定喘汤, 组成: 党参 15 g, 黄芪 15 g, 丹参 15 g, 当归 10 g, 熟地黄 15 g, 麦冬 9 g, 地龙 15 g, 淫羊藿 10 g, 桔梗 9 g, 甘草 6 g, 上述药物由浙江中医药大学附属中西医结合医院中药制剂室制成流浸膏, 生药含量 3.1 g/ml, 4℃ 储备; 布地奈德混悬液: 阿斯利康制药有限公司生产, 1 mg/支, 批号: 317538。

### 1.3 主要试剂和仪器

脂多糖 (LPS) 试剂盒 (美国 Sigma 公司, 货号: L2630); 香烟 (大前门牌, 上海卷烟厂, 每支含烟碱量为 13 mg, 尼古丁为 1.0 mg); 大鼠白

基金项目: 国家自然科学基金 (81403336)

\* 通讯作者: xujianpu1@163.com

细胞介素 6 (IL-6) ELISA 检测试剂盒 (杭州联科生物有限公司, 货号: 70-EK3062/2); 磷酸化 Janus 激酶 2 (p-JAK2) 抗体 (美国 Abcam 公司, 货号: ab32101); 磷酸化信号转导及转录激活因子 1 (p-STAT1) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 8826S);  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA) 免疫组化抗体 (美国 Sigma 公司, 货号: SAB5500002); Masson 三色染色液 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号: 614121); HE 染色液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: G1120)。酶标仪 (美国 BioTek 公司, 型号: ELx800); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5424R); 光学显微镜 (Olympus 公司, 型号: BX43 型); 全自动生物组织染色机 (Tissue-Tek 公司, 型号: Prisma)。

#### 1.4 动物分组、造模及给药方法

50 只 SD 大鼠按随机数字表法分成正常组、模型组、中药组、西药组及中西医结合组, 每组 10 只。采用气道滴注 LPS 联合烟熏方法建立 COPD 模型<sup>[9]</sup>: 大鼠在自制吸烟染毒箱内被动吸烟 20 支, 每天 2 次, 每次 30 min, 间隔 8 h, 共 70 天; 造模第 1、28 天每只大鼠气道内滴入 LPS 0.2 ml (200  $\mu$ g), 该日内不予以吸烟。正常组每天在自制吸烟染毒箱内以相同时间呼吸正常空气并于造模第 1、28 天每只大鼠气道内滴入 0.2 ml 生理盐水。造模后第 29 ~ 70 天给药, 大鼠用药量都按照体重 60 kg 的成年人每日常规服用药量换算, 公式: (动物体重/人的体重)  $\times$  人用药量  $\times$  6.25<sup>[9]</sup>。中药组给予保肺定喘汤 12.4 g/(kg  $\cdot$  d) 灌胃, 西药组雾化吸入布地奈德混悬液 50  $\mu$ g/(kg  $\cdot$  d), 中西医结合组同时予保肺定喘汤灌胃及雾化吸入布地奈德混悬液, 剂量同上两组, 正常组、模型组用 4 ml/(kg  $\cdot$  d) 生理盐水灌胃。

#### 1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 肺小动脉胶原纤维及  $\alpha$ -SMA 测定 取右下肺置于 10% 中性甲醛溶液固定后, 常规石蜡制片。在光学显微镜下利用 HPLAS-1000 病理图文分析系统 (武汉同济千屏影像工程公司) 采集图像, 在

面积百分比。免疫组化切片测量  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达强度, 采用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析, 在 200 倍光镜下观察  $\alpha$ -SMA 免疫组化染色切片, 以固定颜色模式界定色调、饱和度、颜色强度等条件下测量大鼠肺小动脉壁内  $\alpha$ -SMA 平均光密度作为其相对含量, 每张切片均选取 3 ~ 5 个小动脉进行测量, 并取其平均值进行统计学分析。

1.5.2 血清 IL-6 测定 采用 ELISA 法检测血清 IL-6 水平, 操作方法严格按照试剂盒说明书进行。

1.5.3 肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 测定 采用免疫组化方法, 用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析, 在 200 倍光镜下观察 p-JAK2 和 p-STAT1 免疫组化染色切片, 以固定颜色模式界定色调、饱和度、颜色强度等条件下测量大鼠肺动脉壁内 p-JAK2 和 p-STAT1 平均光密度作为其相对含量, 每张切片均选取 3 ~ 5 个小动脉进行测量, 并取其平均值进行统计学分析。

#### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件包进行数据分析。计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 满足正态性且方差齐时采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK 法检验, 方差不齐性则采用 Tamhane's T2 法检验; 若不满足正态时采用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 各组大鼠肺小动脉胶原纤维 Masson 染色结果

图 1 示, 光镜下正常组血管基底膜及其周围胶原纤维少量表达; 模型组胶原纤维表达广泛增加, 血管壁内增加则更加明显; 各治疗组血管及其周围胶原纤维表达与模型组比较均有所减少, 各治疗组之间无明显差异。

#### 2.2 各组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比及 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达比较

表 1 示, 与正常组比较, 其余各组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比和  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达均显著增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组胶原纤维百分比和  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达均

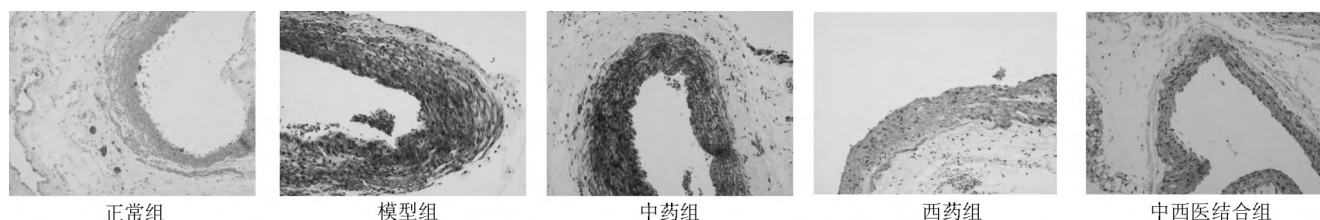


图 1 各组大鼠肺小动脉胶原纤维 Masson 染色病理图 ( $\times 200$ )

有不同程度降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而各治疗组之间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比及  $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | 胶原纤维百分比 (%)                          | $\alpha$ -SMA (平均光密度)                 |
|--------|----|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常组    | 10 | 4.73 $\pm$ 0.84                      | 28.64 $\pm$ 4.79                      |
| 模型组    | 10 | 9.42 $\pm$ 1.62 **                   | 49.72 $\pm$ 10.52 **                  |
| 中药组    | 10 | 7.34 $\pm$ 1.19 ** $\Delta$ $\Delta$ | 40.33 $\pm$ 10.04 ** $\Delta$         |
| 西药组    | 10 | 7.21 $\pm$ 1.17 ** $\Delta$ $\Delta$ | 38.61 $\pm$ 8.44 ** $\Delta$ $\Delta$ |
| 中西医结合组 | 10 | 6.90 $\pm$ 1.03 ** $\Delta$ $\Delta$ | 37.36 $\pm$ 8.38 ** $\Delta$ $\Delta$ |

注:  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白; 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

### 2.3 各组大鼠血清 IL-6 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 其余各组血清 IL-6 含量升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组血清 IL-6 含量均有不同程度显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而各治疗组之间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 2 各组大鼠血清 IL-6 含量比较 (pg/L,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | IL-6                          |
|--------|----|-------------------------------|
| 正常组    | 10 | 105.95 $\pm$ 9.77             |
| 模型组    | 10 | 159.00 $\pm$ 17.56 *          |
| 中药组    | 10 | 140.07 $\pm$ 17.67 * $\Delta$ |
| 西药组    | 10 | 136.43 $\pm$ 13.12 * $\Delta$ |
| 中西医结合组 | 10 | 132.48 $\pm$ 14.12 * $\Delta$ |

注: IL-6, 白细胞介素 6; 与正常组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$

### 2.4 各组大鼠肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 其余各组 p-JAK2 和 p-STAT1 表达显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组 p-JAK2 和 p-STAT1 表达均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 中西医结合组较中药组 p-JAK2 表达显著下降 ( $P < 0.05$ ); 各治疗组间 p-STAT1 表达比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组大鼠肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 表达比较 (平均光密度,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | 鼠数 | p-JAK2                                | p-STAT1                      |
|--------|----|---------------------------------------|------------------------------|
| 正常组    | 10 | 0.053 $\pm$ 0.009                     | 0.063 $\pm$ 0.011            |
| 模型组    | 10 | 0.156 $\pm$ 0.014 *                   | 0.202 $\pm$ 0.017 *          |
| 中药组    | 10 | 0.122 $\pm$ 0.013 * $\Delta$ $\Delta$ | 0.163 $\pm$ 0.013 * $\Delta$ |
| 西药组    | 10 | 0.115 $\pm$ 0.017 * $\Delta$          | 0.151 $\pm$ 0.018 * $\Delta$ |
| 中西医结合组 | 10 | 0.109 $\pm$ 0.016 * $\Delta$          | 0.152 $\pm$ 0.020 * $\Delta$ |

注: p-JAK2, 磷酸化 Janus 激酶 2; p-STAT1, 磷酸化信号转导及转录激活因子 1; 与正常组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与中西医结合组比较,  $\Delta\Delta P < 0.05$

## 3 讨论

在大多数白细胞介素、粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等信号的传递中 JAK/STAT 都发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。JAK2 及 STAT1 在呼吸道广泛分布, 与受体偶联的 JAK 激酶相互接近并通过交互的酪氨酸磷酸化作用而活化<sup>[2]</sup>, 故选择 p-JAK2 及 p-STAT1 进行检测。IL-6 与血管性疾病进展密切相关, 能促进血管平滑肌的增殖以及单核细胞趋化因子 1 的释放, 有研究证明这种促进作用是通过 JAK/STAT 信号通路来实现的<sup>[3]</sup>。COPD 病理改变之一是肺血管重构<sup>[4]</sup>。胶原纤维是细胞外基质重要组成部分, 在 COPD 肺血管重构过程中起到重要作用<sup>[5]</sup>。肺动脉平滑肌细胞是肺动脉血管重构的主要靶细胞,  $\alpha$ -SMA 在肺内主要表达于所有平滑肌细胞及肌成纤维细胞, 可间接反映平滑肌细胞增殖情况, 促进肺血管重构<sup>[6]</sup>。

中医学认为, 肺血管重构属肺络病范畴<sup>[7]</sup>, 其病机为肺脏久病入络, 络气亏虚, 气虚无力推动血液、津液正常运行而致血停成瘀, 津聚为痰, 痰浊、瘀血有形之邪阻塞肺络, 致肺络改变, 发病中心环节均具有“气虚”和“痰瘀”, 所以益气活血通络法在各分型治疗中都应适当运用。保肺定喘汤既有益气活血通络的作用, 又能兼顾脾胃、清肺化痰, 使痰瘀同化, 肺络得畅。临床研究发现, 该方治疗 COPD 具有良好的临床疗效<sup>[8]</sup>。本研究结果显示, 模型组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达显著增加, 血清 IL-6 含量显著升高, 同时肺动脉 p-JAK2 和 p-STAT1 表达显著增加。而保肺定喘汤干预后肺动脉胶原纤维百分比、 $\alpha$ -SMA 阳性细胞表达、血清 IL-6 含量、p-JAK2 和 p-STAT1 表达均显著减少, 说明保肺定喘汤可以显著减轻肺血管重构, 其机制可能通过抑制 JAK/STAT 信号传导通路、调节大鼠肺动脉胶原纤维和  $\alpha$ -SMA 表达有关。各治疗组之间比较时, 仅中西医结合组 p-JAK2 较中药组表达显著下降, 其余均无明显差异, 说明中西医结合组在降低 p-JAK2 上有一定优势, 但在其余指标比较中未体现出优势。

## 参考文献

- [1] SAKAO S, VOELKEL NF, TATSUMI K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations [J]. Eur Respir Rev, 2014, 23 (133): 350-355.
- [2] LEVY O, TY G. Arginine-vasopressin activates the JAK-STAT pathway in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol

Chem, 2006, 281( 23): 15597-15604.

- [9] 张琼, 樊长征, 苗青, 等. 慢性阻塞性肺疾病继发性肺动脉高压的中医发病机制及治疗思路 [J]. 中医杂志, 2013, 54( 4): 290-292.
- [10] 何飞, 徐俭朴, 周忠辉, 等. 保肺定喘汤对小牛肺动脉平滑肌细胞增殖的干预作用 [J]. 中国中医药科技, 2009, 16( 5): 355-356.
- [11] 方苏榕, 谷伟, 谭焰, 等. 烟熏联合内毒素构建 COPD 大鼠模型 [J]. 南京医科大学学报( 自然科学版), 2013, 33( 9): 1226-1230.
- [12] 章元沛. 药理实验方法学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版, 1996: 238.
- [13] O'SULLIVAN LA, LIONGUE C, LEWIS RS, et al. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease [J]. Mol Immunol, 2007, 44( 10): 2497-2506.
- [14] GHORESCHI K, LAURENCE A, O'SHEA JJ. Janus kinases in immune cell signaling [J]. Immunol Rev, 2009, 228( 1): 273-287.
- [15] WATANABE S, MU W, KAHN A, et al. Role of JAK/

STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells [J]. Am J Nephrol, 2004, 24( 4): 387-392.

- [16] HARKNESS LM, KANABAR V, SHARMA HS, et al. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2014, 29( 2): 144-155.
- [17] BARBERÀ JA. Mechanisms of development of chronic obstructive pulmonary disease-associated pulmonary hypertension [J]. Pulm Circ, 2013, 3( 1): 160-164.
- [18] ARCINIEGAS E, FRID MG, DOUGLAS IS, et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293( 1): L1-L8.
- [19] 何飞. 运用肺络理论治疗肺系疾病刍议 [J]. 浙江中医杂志, 2011, 46( 8): 549-550.
- [20] 何飞, 汝触会, 陈爱凤, 等. 益气活血通络法治疗慢性阻塞性肺疾病 D 组稳定期的临床观察 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35( 6): 1466-1468.

## Impact of *Baofei Dingchuan Decoction* ( 保肺定喘汤 ) on Pulmonary Artery JAK/STAT Signaling Pathways of Chronic Obstructive Pulmonary Diseases Rats

HE Fei<sup>1</sup>, SHEN Yaqing<sup>1</sup>, XU Jianpu<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, JIA Yangmin<sup>1</sup>, YU Ting<sup>1</sup>

( 1. Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, 310003; 2. Zhejiang University of Chinese Medicine )

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Baofei Dingchuan Decoction* ( 保肺定喘汤 ) in treating chronic obstructive pulmonary diseases ( COPD ). **Methods** Fifty rats were randomized into normal group, model group, herb group, western medicine group and integration group, with 10 in each group. Except the normal group, rats in other groups were made COPD models by lipopolysaccharide airway instillation combined with cigarette smoking exposure. Since the 29th day to the 70th day of modeling, the herb group was given *Baofei Dingchuan Decoction* 12.4 g/( kg · d ) by gavage, the western medicine group was given budesonide suspension 50 μg/( kg · d ) by atomizing inhalation. The integration group was given *Baofei Dingchuan Decoction* by gavage and budesonide suspension by atomizing inhalation. The normal group and the model group were given normal saline 4 ml( kg · d ) by gavage. After intervention, rats' pulmonary arterioles were made Masson staining in each group. The changes of collagen fiber within the vascular wall and the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin (  $\alpha$ -SMA ) were detected. Serum interleukin 6 ( IL-6 ) level, as well as the expressions of rats' pulmonary artery phosphorylated Janus Kinase 2 ( p-JAK2 ) and phosphorylated signal transducers and activators of transcription 1 ( p-STAT1 ) were detected. **Results** Compared with the normal group, rats' pulmonary arterioles collagen fiber percentage and  $\alpha$ -SMA positive cell expression in the model group decreased, with serum IL-6 level increasing and the expressions of pulmonary artery p-JAK2 and p-STAT1 increasing (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). Compared with the model group, pulmonary arterioles collagen fiber percentage,  $\alpha$ -SMA positive cell expression, serum IL-6 level and the expressions of pulmonary artery p-JAK2 and p-STAT1 in the Western medicine group, the herb group and the integration group decreased (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ). The expression of p-JAK2 in the integration group was lower than that in the herb group (  $P < 0.05$  ). **Conclusion** *Baofei Dingchuan Decoction* might reduce the vascular remodeling of COPD rats; the mechanism might relate to inhibiting JAK/STAT signaling pathways and regulating rats' pulmonary arterioles collagen fiber and  $\alpha$ -SMA expression.

**Keywords** chronic obstructive pulmonary diseases; *Baofei Dingchuan Decoction*; vascular remodeling; JAK/STAT signaling pathways;  $\alpha$ -smooth muscle actin

( 收稿日期: 2017-04-17; 修回日期: 2017-06-19 )

编辑: 邓 媛