

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.05.013

调补肺肾系列方药对 PM 2.5 致肺损伤大鼠炎症和氧化应激的影响

王晶¹, 李亚^{1,2}, 李建生^{1,2*}, 田燕歌¹, 刘学芳¹, 冯素香¹, 冀会鸽¹, 陈龙飞¹

(1. 河南中医药大学呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 河南省郑州市郑东新区金水东路 156 号, 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院)

摘要 目的 评价调补肺肾系列方药(补肺方、补肺健脾方、补肺益肾方、益气滋肾方)对 PM 2.5 致肺损伤大鼠炎症和氧化应激的影响。方法 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组,除空白组外其余各组采用大气 PM 2.5 实时浓缩进行动物暴露。自暴露第 1 天起,空白组、模型组给予 0.9% 氯化钠溶液 2 ml/只灌胃,其余各组分别给予相应的补肺方 5.22 g/(kg·d)、补肺健脾方 4.84 g/(kg·d)、补肺益肾方 4.44 g/(kg·d) 和益气滋肾方 4.84 g/(kg·d) 灌胃,每日 1 次,连续给药 14 天后检测大鼠肺功能,观察肺组织病理改变,检测血清总抗氧化能力(T-AOC)和丙二醛(MDA)水平,肺泡灌洗液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、黏蛋白 5AC(MUC5AC)水平,肺组织中嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白(MBP)、中性粒细胞弹性蛋白酶(ELA2)、IL-6、IL-1 β 表达水平。并采用 R 值综合评价法对各指标进行综合评价。结果 与空白组比较,模型组大鼠肺功能下降,肺组织病理形态出现气道周围及肺泡腔炎性浸润增加,肺组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MBP、ELA2 水平升高,血清 T-AOC 降低、MDA 升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组对肺功能、肺组织病理均有一定改善,能降低肺组织 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MBP、ELA2 水平,使血清 T-AOC 升高、MDA 降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。R 值综合评价结果显示,对肺功能综合纠正强度排序为:补肺健脾组 > 补肺益肾组 > 益气滋肾组 > 补肺组,对炎症反应综合纠正强度排序为:补肺益肾组 > 补肺健脾组 > 补肺组 > 益气滋肾组,对氧化应激综合纠正强度排序为:补肺益肾组 > 补肺健脾组 > 补肺组 > 益气滋肾组,综合疗效优劣排序为:补肺益肾组 > 补肺健脾组 > 补肺组 > 益气滋肾组。结论 调补肺肾系列方药均可调节 PM 2.5 暴露致肺损伤的炎症反应和氧化应激,其中补肺益肾方具有明显优势。

关键词 肺损伤; PM 2.5; 调补肺肾; 氧化应激; 炎症反应; R 值综合评价

PM 2.5 是指空气动力学等效直径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$ 的大气细颗粒物,其易穿过鼻腔、气道纤毛屏障系统进入呼吸道深部,沉积于肺泡,甚至透过肺泡,进入血液循环影响全身系统。最新研究显示^[1],2015 年全球约有 420 万人因 PM 2.5 暴露而过早死亡,较 1990 年上升了 20%,其中心、肺疾病与其关联最强。PM 2.5 成分复杂且多变,致病机制涉及广泛,其表面富含的内毒素、重金属、脂多糖等毒性

成分可诱导氧化应激和炎症损伤^[2-3],PM 2.5 催化产生的过量活性氧(ROS)可进一步加重肺组织炎症反应^[4],引发多种急、慢性肺部炎症疾病,如慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肺炎、哮喘、肺纤维化、肺癌等。调补肺肾法是本课题组基于正虚积损病机理论制定的治疗 COPD 的主要法则^[5],包括补虚(补肺益气、补肺健脾、补肺益肾、益气滋肾)、佐以祛邪(化痰或/和活血)等治法方药,临床疗效确切^[6-9]。前期研究^[10-11]显示,其能够改善炎症反应、氧化应激状态。本研究以 PM 2.5 暴露的大鼠为研究对象,以 PM 2.5 致肺损伤炎症反应和氧化应激为指标,结合 R 值多指标综合评价法^[12],综

基金项目:国家自然科学基金(81673942,81673775);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015157);河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(182102310102);河南中医药大学省属科研业务费专项青年项目(2014KYYWF-YQ02)

* 通讯作者: li_js8@163.com, (0371) 65676568

合评价调补肺肾系列方药对 PM_{2.5} 致肺损伤的保护作用, 为临床用于防治雾霾致肺损伤、诱发 COPD 等相关疾病加重提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 200~220 g, 由河南省实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK 豫 2015-0005。SPF 级饲养环境, 温度 20~25℃, 湿度 50%~65%。大鼠 A 级饲料 (批号 120171102009) 喂养、自由饮水, 适应性饲养 1 周。本研究方案通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利伦理委员会审查 (批准编号: YFYDW2017013)。

1.2 药物

补肺方: 炙黄芪 15 g, 党参 15 g, 川贝母 3 g, 当归 12 g, 核桃仁 10 g 等; 补肺健脾方: 党参 15 g, 黄芪 15 g, 陈皮 9 g, 白术 12 g, 茯苓 12 g 等; 补肺益肾方: 人参 9 g, 黄芪 15 g, 浙贝母 9 g, 枸杞子 12 g, 山萸肉 12 g 等; 益气滋肾方: 人参 9 g, 黄精 15 g, 枸杞子 12 g, 熟地黄 15 g, 麦冬 15 g 等。由河南中医药大学药学院药物分析实验室提供并鉴定。灌胃时采用蒸馏水分别配制成浓度为 522、484、444、484 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂与仪器

0.9% 氯化钠溶液 (批号: 1705043202), 石家庄四药有限公司; 水合氯醛 (分析纯, 批号: 302-17-0), 郑州派尼化学试剂厂。HE 染色液 (批号: G1120), Solarbio 公司; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 批号: EK0526)、白细胞介素 6 (IL-6, 批号: EK0412)、白细胞介素 1 β (IL-1 β , 批号: EK0393) ELISA 检测试剂盒均由 Boster 公司提供。嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白 (MBP) 单克隆抗体 (批号: PAA539Ra01)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (ELA2) 单克隆抗体 (批号: PAA181Ra01)、黏蛋白 5AC (MUC5AC, 批号: SEA756Ra) 由 Cloud-Clone 公司提供; 兔抗大鼠 IL-6 抗体 (批号: 21865-1-AP)、IL-1 β 抗体 (批号: 16806-1-AP) 均由 Proteintech 公司提供。血清总抗氧化能力 (T-AOC) 检测试剂盒 (FRAP 法, 批号: A015-3), 南京建成生物工程研究所; 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (微量法, 批号: BC0025), Solarbio 公司。

DM6000B 型显微镜及显微照相系统 (LEICA 公司); FinePointe™ series PFT 测量系统 (BUXCO 公司); Spectra MaxM3 型酶标仪 (Molecular Devices 公

司); Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (Media Cybernetics 公司); PM_{2.5} 实时在线浓缩富集系统 (HRH-PM286)、动物全身动态暴露系统 (HRH-MNE1786) 均为北京慧荣和科技有限公司产品。

1.4 造模方法

参考文献 [3], 动物暴露地址位于河南中医药大学 (新区) 教学楼 B3 区八楼中医内科学开放实验室。采用 HRH-PM286 PM_{2.5} 在线浓缩富集系统对大气颗粒物进行分离、切割 (抽气流量 40 L/min, 稀释流量 0 L/min), 经浓缩 (6~10 倍) 输入动物实时暴露箱 (1.2 m³) 中, 大鼠每天暴露 4h (8:00~12:00), 持续 14 天, PM_{2.5} 实时暴露浓度 (626.9±458.8) $\mu\text{g}/\text{m}^3$; 每日无 PM_{2.5} 暴露间隙给予清洁过滤空气仍饲养于暴露箱中 (抽气流量 40 L/min, 稀释流量 40 L/min)。

1.5 动物分组与给药

将大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组, 每组 10 只, 适应性喂养 1 周后除空白组外其余各组大鼠进行造模。自造模第 1 天开始, 对照组和模型组给予 0.9% 的氯化钠溶液 2 ml/只灌胃, 其余各组分别给予补肺方 5.22 g/(kg·d)、补肺健脾方 4.84 g/(kg·d)、补肺益肾方 4.44 g/(kg·d) 和益气滋肾方 4.84 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 每周称取大鼠体重以调整灌胃剂量, 持续给药 14 天。药物剂量均采用人临床等效剂量系数换算 [4]。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 肺功能 各组大鼠于末次给药次日取材。水合氯醛 3 ml/kg 麻醉后, 取材前气管插管, 采用 PFT 测量系统检测大鼠用力肺活量 (FVC)、0.3 s 用力呼气容积 (FEV_{0.3}), 计算 FEV_{0.3}/FVC [5]。

1.6.2 肺组织病理与急性肺损伤评分 (ALI) 左肺经气管-支气管插管后, 采用 10% 中性甲醛灌注 1 h、固定 72 h, 以肺门为中心, 连续切取厚约 3 mm 的肺组织块, 脱水、透明、石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察肺组织病理改变。采用 Smith 评分方法 [6] 评价肺损伤程度: 分别对支气管、肺泡及间质中炎症细胞浸润、出血、肺水肿、肺泡融合等进行半定量评分, 0 分为无损伤, 1 分为病变范围 <25%, 2 分为病变范围 25%~50%, 3 分为病变范围 51%~75%, 4 分为病变 >75%。每个视野评分为以上评分总和, 每只大鼠观察 10 个高倍视野 (200 倍), 取平均值, 即 ALI 评分。

1.6.3 血清 T-AOC 和 MDA 水平 腹主动脉取血, 分离血清, -80℃ 冻存。T-AOC、MDA 按照试剂盒

提供的方法和步骤进行检测。

1.6.4 肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 MUC5AC 水平 左肺气管-支气管插管后, 4℃ PBS 灌注回抽, 3 ml/次, 重复 3 次, 2000 r/min 离心 10 min, 收集肺泡灌洗液, -80℃ 冻存。采用 ELISA 法检测肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MUC5AC 水平。

1.6.5 肺组织中 MBP、ELA2、IL-6、IL-1 β 表达 采用免疫组化法测定, 每只大鼠观察 6 个高倍视野 (400 倍), 并利用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析, 得出阳性区域 IOD 平均值。

1.7 数据处理

R 值综合评价法的建立参考文献 [2] 的方法建立 R 综合 (D) 值数据集, 取 D 值 = R - (-2.5), 使 R 值全部转化为正值。当 D 值 < 2.5 时, 药物对此类指标有一定的纠正作用, 且 D 值越接近于 1.5, 治疗效果越好, 越接近于 2.5, 治疗效果越差, 根据 D 值的大小可以得到药物对指标综合评价的优劣顺序。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理。计量资料符合正态性、方差齐性者, 以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用最小显著差异法 (LSD)。显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组大鼠肺功能指标比较

表 1 示, 模型组大鼠 FVC、FEV0.3 及 FEV0.3/FVC 均较空白组降低 ($P < 0.01$); 补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组及益气滋肾组大鼠 FVC、FEV0.3 及 FEV0.3/FVC 均较模型组升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 补肺健脾组大鼠 FVC 值较补肺组高, 补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组 FEV0.3 均较补肺组高 ($P < 0.01$); 补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠肺脏病理学及 ALI 评分比较

光镜下观察, 空白组大鼠肺组织基本正常; 模型组肺泡壁增厚, 气道周围及肺泡间隔充血、水肿及炎性细胞浸润明显, 可见部分肺泡结构破坏, 符合急性肺损伤模型特征; 各治疗组可不同程度地减轻以上病理改变, 以补肺益肾组最为明显。表 2 示, 模型组大鼠 ALI 评分较空白组升高 ($P < 0.01$); 补肺组、补肺益肾组及益气滋肾组 ALI 评分较模型组

降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与补肺组比较, 补肺健脾组 ALI 评分升高, 补肺益肾组 ALI 评分降低 ($P < 0.01$), 且补肺益肾组较补肺组和益气滋肾组 ALI 评分降低显著 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肺功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FVC (ml)	FEV0.3 (ml)	FEV0.3/FVC
空白组	8	18.68 $\pm$ 0.02	17.59 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.01
模型组	8	11.75 $\pm$ 1.42*	9.26 $\pm$ 1.03*	0.84 $\pm$ 0.02*
补肺组	8	12.64 $\pm$ 0.81	9.28 $\pm$ 1.06	0.89 $\pm$ 0.10
补肺健脾组	8	16.63 $\pm$ 0.63 $\Delta\Delta$	14.97 $\pm$ 0.31 $\Delta\Delta$	0.94 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$
补肺益肾组	8	15.36 $\pm$ 1.16 $\Delta\Delta$	13.43 $\pm$ 1.11 $\Delta\Delta$	0.92 $\pm$ 0.01 $\Delta\Delta$
益气滋肾组	8	15.31 $\pm$ 1.36 Δ	13.15 $\pm$ 1.13 $\Delta\Delta$	0.91 $\pm$ 0.01 Δ

注: FVC, 用力肺活量; FEV0.3, 0.3s 用力呼气容积; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与补肺组比较, $\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠肺组织 ALI 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALI 评分
空白组	8	5.44 $\pm$ 1.65
模型组	8	9.53 $\pm$ 2.02*
补肺组	8	8.69 $\pm$ 0.18 Δ
补肺健脾组	8	10.92 $\pm$ 0.47 $\Delta\Delta$
补肺益肾组	8	7.13 $\pm$ 0.43 $\Delta\Delta\Delta$
益气滋肾组	8	8.70 $\pm$ 2.43 $\Delta\Delta$

注: ALI, 急性肺损伤评分; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与补肺组比较, $\Delta P < 0.01$; 与补肺益肾组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠血清 T-AOC 和 MDA 水平比较

表 3 示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 MDA 水平升高, T-AOC 水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 其余 4 组 MDA 水平均降低, T-AOC 水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 补肺益肾组大鼠血清 T-AOC 水平高于补肺组、补肺健脾组和益气滋肾组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠血清 MDA、T-AOC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA (nmol/mL)	T-AOC (nmol/L)
空白组	8	1.23 $\pm$ 0.03	1.03 $\pm$ 0.26
模型组	8	3.94 $\pm$ 0.27*	0.59 $\pm$ 0.13*
补肺组	8	1.90 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$	0.85 $\pm$ 0.05 $\Delta\Delta\Delta$
补肺健脾组	8	2.02 $\pm$ 0.19 $\Delta\Delta$	0.80 $\pm$ 0.10 $\Delta\Delta\Delta$
补肺益肾组	8	2.11 $\pm$ 0.16 $\Delta\Delta$	1.08 $\pm$ 0.07 $\Delta\Delta$
益气滋肾组	8	2.11 $\pm$ 0.14 $\Delta\Delta$	0.85 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta\Delta$

注: T-AOC, 总抗氧化能力; MDA, 丙二醛; 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与补肺益肾组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.4 各组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MUC5AC 水平比较

表 4 示, 与空白组比较, 模型组大鼠肺泡灌洗

液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 MUC5AC 水平均升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组上述 4 个指标及益气滋肾组 TNF- α 水平降低 ($P < 0.01$)。益气滋肾组 TNF- α 水平较补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组高 ($P < 0.05$)；补肺健脾组 IL-1 β 水平较补肺组、补肺益肾组、益气滋肾组低，补肺益肾组 IL-1 β 水平较补肺组、益气滋肾组低 ($P < 0.01$)；补肺益肾组 IL-6 水平明显低于补肺组、补肺健脾组和益气滋肾组 ($P < 0.01$)；补肺组 MUC5AC 水平高于补肺健脾组、补肺益肾组，低于益气滋肾组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，补肺益肾组 MUC5AC 水平低于补肺健脾组、益气滋肾组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠肺组织中 MBP、ELA2、IL-1 β 、IL-6 表达比较

表 5 示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织中 MBP、ELA2、IL-1 β 及 IL-6 水平均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较，补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组 MBP 水平降低，补肺健脾组、补肺益肾组 IL-6、ELA2 水平降低，各治疗组 IL-1 β 水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。补肺益肾组大鼠肺组织中 MBP、ELA2、IL-1 β 及 IL-6 水平均较补肺组、补肺健脾组、益气滋肾组降低 ($P < 0.01$)；补肺健脾组 MBP、IL-1 β 水平较益气滋肾组降低显著 ($P < 0.01$)；补肺组 MBP 水平较益气滋肾组降

低 ($P < 0.05$)。

2.6 肺功能、炎症反应、氧化应激三类指标及总疗效的 R 值综合评价结果

补肺组、补肺健脾组、补肺益肾组和益气滋肾组肺功能共 3 个指标 (FVC、FEV0.3、FEV0.3/FVC)，15 个 D 值，均 < 2.50 ，说明各治疗组对肺功能均有积极的纠正意义，其中补肺健脾组的纠正强度较补肺组显著 ($P < 0.05$)，纠正强度依次为：补肺健脾组、补肺益肾组、益气滋肾组、补肺组；各治疗组肺脏局部炎症共 8 个指标 (MBP、ELA2、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、ALI 评分)，40 个 D 值，均 < 2.50 ，说明各治疗组对炎症各指标均有积极的纠正意义，其中补肺益肾组的纠正强度较其余 3 组显著 ($P < 0.01$)，纠正强度依次为：补肺益肾组、补肺健脾组、补肺组、益气滋肾组；各治疗组氧化应激加黏蛋白共 3 个指标 (MDA、T-AOC、MUC5AC)，15 个 D 值，均 < 2.50 ，说明各治疗组对氧化应激均有积极纠正意义，其中补肺益肾组的纠正强度较补肺组、补肺健脾组、益气滋肾组显著 ($P < 0.01$)，纠正强度依次为：补肺益肾组、补肺健脾组、补肺组、益气滋肾组。以上总疗效包括肺功能、炎症反应和氧化应激共 14 个指标，70 个 D 值，均 < 2.50 ，说明各治疗组对总疗效均有积极的综合纠正意义，其中补肺益肾组的纠正强度较补肺组、补肺

表 4 各组大鼠肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MUC5AC 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MUC5AC (ng/ml)
空白组	8	167.41 $\pm$ 22.40	108.19 $\pm$ 23.90	372.84 $\pm$ 29.91	66.98 $\pm$ 10.09
模型组	8	269.37 $\pm$ 31.15*	269.10 $\pm$ 15.77*	688.70 $\pm$ 17.85*	92.32 $\pm$ 4.85*
补肺组	8	191.63 $\pm$ 15.73 Δ	211.70 $\pm$ 18.55 Δ	480.01 $\pm$ 26.13 Δ	80.88 $\pm$ 4.77 Δ
补肺健脾组	8	175.09 $\pm$ 18.41 Δ	104.85 $\pm$ 21.33 $\Delta\Delta$	512.93 $\pm$ 19.8 Δ	73.18 $\pm$ 2.86 Δ
补肺益肾组	8	182.23 $\pm$ 11.18 Δ	162.27 $\pm$ 28.43 $\Delta\Delta\Delta$	384.00 $\pm$ 29.35 $\Delta\Delta\Delta$	65.60 $\pm$ 7.75 $\Delta\Delta\Delta$
益气滋肾组	8	211.30 $\pm$ 25.61 $\Delta\Delta\Delta$	244.22 $\pm$ 23.82 $\Delta\Delta\Delta$	509.91 $\pm$ 22.51 $\Delta\Delta\Delta$	89.41 $\pm$ 9.38 $\Delta\Delta\Delta$

注：TNF- α ，肿瘤坏死因子 α ；IL-1 β ，白细胞介素 1 β ；IL-6，白细胞介素 6；MUC5AC，黏蛋白 5AC；与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， Δ $P < 0.01$ ；与补肺组比较， $\Delta\Delta$ $P < 0.05$ ， $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$ ；与补肺健脾组比较， $\#P < 0.05$ ， $\#\#\Delta$ $P < 0.01$ ；与补肺益肾组比较， $\square P < 0.05$ ， $\square\square P < 0.01$ 。

表 5 各组大鼠肺组织 MBP、ELA2、IL-1 β 及 IL-6 比较 (IOD 值， $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MBP	ELA2	IL-1 β	IL-6
空白组	8	10.08 $\pm$ 0.96	11.81 $\pm$ 1.58	10.60 $\pm$ 1.36	9.89 $\pm$ 1.03
模型组	8	31.02 $\pm$ 1.20*	31.99 $\pm$ 1.87*	32.29 $\pm$ 3.75*	33.39 $\pm$ 2.05*
补肺组	8	26.74 $\pm$ 2.32 $\Delta\Delta$	29.43 $\pm$ 5.02	29.90 $\pm$ 3.39 $\Delta\Delta$	27.50 $\pm$ 1.68
补肺健脾组	8	25.44 $\pm$ 0.93 $\Delta\Delta$	26.24 $\pm$ 4.63 Δ	25.23 $\pm$ 1.63 $\Delta\Delta$	25.70 $\pm$ 0.91 $\Delta\Delta$
补肺益肾组	8	14.64 $\pm$ 1.32 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	18.27 $\pm$ 1.49 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	20.12 $\pm$ 1.25 $\Delta\Delta\Delta\Delta$	18.46 $\pm$ 1.26 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
益气滋肾组	8	29.65 $\pm$ 2.47 $\Delta\Delta\Delta$	29.48 $\pm$ 3.33 Δ	28.65 $\pm$ 3.40 $\Delta\Delta\Delta$	29.35 $\pm$ 0.97 Δ

注：MBP，嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白；ELA2，中性粒细胞弹性蛋白酶；与空白组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与补肺组比较， $\Delta\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ ；与补肺健脾组比较， $\#P < 0.01$ ；与补肺益肾组比较， $\square P < 0.01$ 。

表 6 各组大鼠肺组织肺功能、氧化应激、炎症反应及总疗效综合评价 D 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	肺功能	氧化应激	炎症反应	总疗效
模型组	2.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00
补肺组	2.44 ± 0.05	1.65 ± 0.14 **	2.30 ± 0.14	2.13 ± 0.03 **
补肺健脾组	1.88 ± 0.18 ***△	1.59 ± 0.09 ***△△	2.14 ± 0.21 **	1.97 ± 0.15 ***△
补肺益肾组	2.10 ± 0.23 *	1.20 ± 0.16 ***△△▲▲	1.79 ± 0.16 ***△△▲▲	1.86 ± 0.06 ***△△
益气滋肾组	2.14 ± 0.19	2.00 ± 0.08 ***△▲▲#	2.32 ± 0.16 #	2.15 ± 0.06 ***▲#

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与补肺组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与补肺健脾组比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与补肺益肾组比较, # $P < 0.01$

健脾组、益气滋肾组显著 ($P < 0.01$), 综合疗效排序为: 补肺益肾组、补肺健脾组、补肺组、益气滋肾组。详见表 6。

3 讨论

COPD 是一种以持续呼吸症状和气流受限为特征的慢性炎症性疾病, 尤以中性粒细胞、活化的巨噬细胞及淋巴细胞介导的炎症反应为主^[1], 其致病因素与有毒颗粒或气体暴露密切相关^[2]。流行病学结果显示, PM 2.5 高浓度暴露与 COPD 发病率增高显著相关, PM 2.5 日排放量每增加 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, COPD 住院率增加 3.1%, 死亡率增加 2.5%^[3]。研究显示, PM 2.5 短期暴露促进 COPD 稳定期急性加重^[4], 增加 COPD 急诊就诊率^[5]。PM 2.5 浓度每增加 $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, 第 1 秒用力呼气量 (FEV1) 下降 26 ml、FVC 下降 28 ml、FEV1/FVC 下降 0.09%^[6]。实验研究显示, PM 2.5 暴露大鼠表现出肺功能下降, 肺大泡病理改变, 肺组织炎症浸润, 金属蛋白酶失衡等改变^[7]。

目前认为, 氧化应激和炎症反应是 PM 2.5 致病的主要机制^[8], PM 2.5 短期暴露增加肺泡腔中巨噬细胞、多核中性粒细胞等免疫细胞的聚集, 促进 ROS/RNS 和炎症因子释放, 激活氧化、炎症信号通路, 引起氧化应激、炎症损伤、DNA 损伤、细胞凋亡等级联反应^[9]。研究显示, PM 2.5 可作用于肺上皮细胞, 促进 ROS 的释放, 增强细胞中 MDA 表达, 直接导致上皮细胞氧化损伤^[10]; PM 2.5 还可促进巨噬细胞、肺泡上皮细胞分泌 TNF- α 、IL-1 β ^[11]、巨噬细胞炎性细胞蛋白 1 (MIP-1)、IL-6^[12-14] 等炎症因子, 促使多形核白细胞、单核细胞的活化和聚集。本研究结果显示, 模型组大鼠 FVC、FEV0.3 及 FEV0.3/FVC 降低, 肺组织及气道周围炎性细胞浸润明显, 肺脏局部炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MBP 及 ELA2 分泌增加, 炎症反应显著, 同时 T-AOC 降低, MDA 升高, 出现氧化-抗氧化失衡现象; 且随着肺组织病理损伤的加重, 肺脏局部炎症因子的释放及全身氧化失衡

状态均呈现加重趋势, 与上述文献中的报道结果一致。

中医学认为, 雾霾致肺病以素体本虚, 痰、瘀、毒侵袭为主要病机, 故以扶正祛邪为治则, 补益正气的同时, 兼以化痰解毒、祛瘀解毒辨证施治。调补肺肾系列方药是针对 COPD 稳定期肺气虚、肺脾气虚、肺肾气虚及肺肾气阴两虚四种证候类型^[15-17] 而设, 拟定以补肺、健脾、益肾, 佐以祛痰、活血等为主的中药复方, 其临床疗效已通过多中心临床研究的证实^[18], 机制可能与改善炎症损伤^[19]、氧化应激^[20]、蛋白酶-抗蛋白酶失衡^[21]等相关。本研究结果显示, 补肺方、补肺健脾方、补肺益肾方及益气滋肾方四方均可有效改善 PM 2.5 大鼠肺功能及肺组织病理损伤; 升高血清 T-AOC, 降低 MDA 水平, 纠正氧化-抗氧化失衡; 降低肺局部炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MBP、ELA2 的表达, 减轻炎症损伤。且经多指标 R 值综合评价发现, 肺功能综合纠正强度依次为补肺健脾方、补肺益肾方、益气滋肾方、补肺方; 氧化应激综合纠正强度依次为补肺益肾方、补肺健脾方、补肺方、益气滋肾方; 炎症反应综合纠正强度依次为补肺益肾方、补肺健脾方、补肺方、益气滋肾方; 综合疗效排序依次为补肺益肾方、补肺健脾方、补肺方、益气滋肾方。综上所述, 调补肺肾系列方药可明显降低炎症反应和氧化应激, 从而改善肺功能和肺组织损伤, 其中补肺益肾方综合调节意义尤为突出, 但具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] LANDRIGAN PJ, FULLER R, ACOSTA NJR, et al. The Lancet Commission on pollution and health [J]. Lancet, 2018, 391 (10119): 462-512.
- [2] JEON YM, SON BS, LEE MY. Proteomic identification of the differentially expressed proteins in human lung epithelial cells by airborne particulate matter [J]. J Appl Toxicol, 2011, 31(1): 45-52.
- [3] AALAPATI S, GANAPATHY S, MANAPURAM S, et al. Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nan-

- oparticles in CD1 mice [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(7): 786-798.
- [4] BECHER R, BUCHT A, OVREVIK J, et al. Involvement of NADPH oxidase and iNOS in rodent pulmonary cytokine responses to urban air and mineral particles [J]. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(8): 645-655.
- [5] 李建生. 正虚积损为慢性阻塞性肺疾病的主要病机 [J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(8): 710-713.
- [6] 张海龙. 辨证治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期的疗效及对全身炎症反应的影响 [J]. 郑州: 河南中医学院, 2010.
- [7] 李建生, 余学庆, 王明航, 等. 中医治疗慢性阻塞性肺疾病研究的策略与实践 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(6): 1607-1614.
- [8] LI SY, LI JS, WANG MH, et al. Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012, 12: 197. doi: 10.1186/1472-6882-12-197.
- [9] LI JS, LI SY, XIE Y, et al. The effective evaluation on symptoms and quality of life of chronic obstructive pulmonary disease patients treated by comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns [J]. *Complement Ther Med*, 2013, 21(6): 595-602.
- [10] LI JS, LI Y, LI SY, et al. Long-term effects of Tiaobu Feishen therapies on systemic and local inflammation responses in rats with stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Chin Integrat Med*, 2012, 10(9): 1039-1048.
- [11] 田燕歌, 李亚, 李建生, 等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织氧化应激的影响和远后效应 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(2): 621-624.
- [12] 田燕歌, 崔红新, 李建生, 等. 调补肺肾三法调控慢性阻塞性肺疾病稳定期大鼠炎症反应的 R 值综合评价 [J]. *中医杂志*, 2015, 56(15): 1330-1334.
- [13] XU Z, XU X, ZHONG M, et al. Ambient particulate air pollution induces oxidative stress and alterations of mitochondria and gene expression in brown and white adipose tissues [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 20. doi: 10.1186/1743-8977-8-20.
- [14] 黄继汉, 黄晓辉, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] SMITH KM, MROZEK JD, SIMONTON SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model model of respiratory distress syndrome [J]. *Crit Care Med*, 1997, 25(11): 1888-1897.
- [16] BARNES PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(1): 16-27.
- [17] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, revised 2018 [EB/OL]. (2018-01-20) [2018-06-20]. <http://www.goldcopd.org>.
- [18] LI MH, FAN LC, MAO B, et al. Short-term exposure to ambient fine particulate matter increases hospitalizations and mortality in COPD: a systematic review and meta-analysis [J]. *Chest*, 2016, 149(2): 447-458.
- [19] NI L, CHUANG CC, ZUO L. Fine particulate matter in acute exacerbation of COPD [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 294. doi: 10.3389/fphys.2015.00294.
- [20] TIAN Y, XIANG X, JUAN J, et al. Short-term effects of ambient fine particulate matter pollution on hospital visits for chronic obstructive pulmonary disease in Beijing, China [J]. *Environ Health*, 2018, 17(1): 21. doi: 10.1186/S12940-018-0369-y.
- [21] LIU S, ZHOU Y, LIU S, et al. Association between exposure to ambient particulate matter and chronic obstructive pulmonary disease: results from a cross-sectional study in China [J]. *Thorax*, 2017, 72(9): 788-795.
- [22] DENG X, ZHANG F, RUI W, et al. PM 2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(6): 1762-1770.
- [23] VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS K, et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2013, 10(9): 3886-3907.
- [24] XIA T, KOVOCHICH M, NEL AE. Impairment of mitochondrial function by particulate matter (PM) and their toxic components: implications for PM-induced cardiovascular and lung diseases [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 1238-1246. PMID: 17127377.
- [25] GARCON G, DAGHER Z, ZERIMECH F, et al. Dunkerque city air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20(4): 519-528.
- [26] VAN EEDEN SF, YEUNG A, QUINLAM K, et al. Systemic response to ambient particulate matter: relevance to chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(1): 61-67.
- [27] VAN EEDEN SF, TAN WC, SUWA T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10))

- [] . Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(5): 826-830.
- [8] FUJII T, HAYASHI S, HOGG JC, et al. Interaction of alveolar macrophages and airway epithelial cells following exposure to particulate matter produces mediators that stimulate the bone marrow [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27(1): 34-41.
- [9] HE M, ICHINOSE T, YOSHIDA S, et al. PM 2.5-induced lung inflammation in mice: Differences of inflammatory response in macrophages and type II alveolar cells [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37(10): 1203-1218.
- [10] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会. 慢性阻塞性肺疾病中医证候诊断标准(2011 版) [J]. 中医杂志, 2012, 53(2): 177-178.
- [11] 中华中医药学会内科分会肺系病专业委员会. 慢性阻塞性肺疾病中医诊疗指南(2011 版) [J]. 中医杂志, 2012, 53(1): 80-84.
- [12] 李亚, 王元元, 李建生, 等. 调补肺肾三法对 COPD 大鼠肺组织基质金属蛋白酶的影响及远后效应 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(9): 615-619.

Effects of Formulae Series for Regulating and Invigorating Lung and Kidney on Inflammation and Oxidative Stress of Rats with Lung Injury by PM 2.5

WANG Jing¹, LI Ya^{1,2}, LI Jiansheng^{1,2}, TIAN Yange¹, LIU Xuefang¹, FENG Suxiang¹, JI Huige¹, CHEN Longfei¹

(1. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To evaluate the effects of formulae series for regulating and invigorating lung and kidney including *Buwei Recipe* (补肺方), *Buwei Jianpi Recipe* (补肺健脾方), *Buwei Yishen Recipe* (补肺益肾方), *Yiqi Zishen Recipe* (益气滋肾方) on inflammation and oxidative stress in rats with lung injury induced by particulate matter (PM) 2.5. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into blank group, model group, Buwei group, Buwei Jianpi group, Buwei Yishen group, Yiqi Zishen group. Real-time atmospheric concentrated PM 2.5 were used to establish rats model for groups except the blank group. Since the first day exposed with PM 2.5, rats in blank group and model group were gavaged with 0.9% sodium chloride solution, 2 ml for each rat; while rats in treatment groups were gavaged respectively with 5.22 g/(kg·d) *Buwei Recipe*, or 4.84 g/(kg·d) *Buwei Jianpi Recipe*, 4.44 g/(kg·d) *Buwei Yishen Recipe*, 4.84 g/(kg·d) *Yiqi Zishen Recipe*, one time per day. After continuous treatment for 14 days, the pulmonary function was detected, the histomorphological changes of lung tissue observed, serum levels of total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA), levels of tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β), mucin 5AC (MUC5AC) in alveolar lavage fluid, eosinophil major basic protein (MBP), neutrophil elastase (ELA2), IL-6, and IL-1β expression in lung tissue were detected. R-value comprehensive evaluation method was used to evaluate the comprehensive effect of each index. **Results** Compared with the blank group, pulmonary function in the model group was decreased. Airway and alveolar inflammatory infiltration increased in histomorphology. The levels of inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6, IL-1β, MBP, ELA2) in lung tissue all increased. T-AOC in serum decreased, whereas MDA increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). All of four methods for regulating and invigorating lung and kidney can improve the pulmonary function and pulmonary pathology condition, which could decrease the level of TNF-α, IL-6, IL-1β, MBP, ELA2 in the lung tissue, increase serum T-AOC, and reduce MDA ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The R-value comprehensive evaluation results showed that the order of corrective effect intensity of all treatments on pulmonary function was Buwei Jianpi group→Buwei Yishen group→Yiqi Zishen→Buwei group→Buwei group; The order of corrective effect intensity on inflammation was Buwei Yishen group→Buwei Jianpi group→Buwei group→Yiqi Zishen group; The order of corrective effect intensity on oxidative stress was Buwei Yishen group→Buwei Jianpi group→Buwei group→Yiqi Zishen group; The order of comprehensive efficacy was Buwei Yishen group→Buwei Jianpi group→Buwei group→Yiqi Zishen group. **Conclusion** All of these four formulae for regulating and invigorating lung and kidney can comprehensively adjust alleviate inflammation and oxidative stress in lung injury induced by PM 2.5, among which *Buwei Yishen Recipe* has significant advantages.

Keywords lung injury; particulate matter 2.5; regulating and invigorating lung and kidney; oxidative stress; inflammation reaction; R-value comprehensive evaluation

(收稿日期: 2018-06-29; 修回日期: 2018-09-06)

编辑: 邓 媛