

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.23.012

补肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬功能及 PPAR γ 通路的影响

武颖烁, 尚艺婉, 孟丹华, 周哲旭, 陈星, 吴耀松, 任闪闪, 刘燕, 陈玉龙✉

河南中医药大学, 河南省郑州市金水路 126 号, 450000

[摘要] **目的** 探究补肺益肾方治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)的可能作用机制。**方法** 60只C57BL/6小鼠随机分为空白组、模型组、补肺益肾组、抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组,每组12只。除空白组外其余各组小鼠采用香烟烟雾熏吸8周的方法制备小鼠COPD模型。造模后补肺益肾组给予补肺益肾方溶液5.31 g/(kg·d)灌胃,腹腔注射生理盐水(雄鼠0.20 ml/次,雌鼠0.15 ml/次);抑制剂组给予过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)通路抑制剂GW9662 1 mg/(kg·d)腹腔注射,灌胃生理盐水(雄鼠0.25 ml/次,雌鼠0.20 ml/次);抑制剂合补肺益肾组给予补肺益肾方溶液灌胃和腹腔注射GW9662(剂量同上);空白组与模型组小鼠采用生理盐水灌胃及腹腔注射(剂量同上)。各组均每日1次,每周6次。4周后检测小鼠体质量、肺功能指标[包括最终潮气量(TV)、每分钟呼气量(MV)、呼气峰流速(PEF)、50%潮气量呼气流量(EF50)],肺组织匀浆中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素(IL-4)含量,肺泡巨噬细胞胞葬能力、肺组织细胞凋亡指数及巨噬细胞CD163、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、PPAR γ 表达。HE染色观察肺组织病理变化。**结果** 与空白组比较,模型组小鼠体质量、肺功能指标、肺泡巨噬细胞胞葬能力降低,肺组织匀浆中TNF- α 、IL-4含量及肺组织凋亡指数上升,肺泡巨噬细胞CD163、iNOS表达上升,PPAR γ 表达降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,补肺益肾组小鼠体质量、肺功能明显改善,肺组织匀浆中TNF- α 、IL-4含量,巨噬细胞CD163、iNOS表达及肺组织细胞凋亡指数显著下降,肺泡巨噬细胞胞葬能力及PPAR γ 表达上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组小鼠体质量、肺功能指标、肺泡巨噬细胞胞葬能力、肺组织凋亡指数与CD163、PPAR γ 表达差异均无统计学意义($P>0.05$),肺组织匀浆中TNF- α 、IL-4含量上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 补肺益肾方可能通过调控COPD模型小鼠肺泡巨噬细胞胞葬功能及PPAR γ 通路起到治疗COPD的作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;补肺益肾方;巨噬细胞;胞葬能力;过氧化物酶增殖物激活受体 γ 通路

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是人类常见的慢性呼吸系统疾病,病死率高,因其需要长期治疗且易复发,给家庭和社会带来了沉重的经济负担^[1-2]。中医药在治疗COPD方面具有一定优势^[3],本团队针对COPD稳定期主要证型中的肺肾气虚证拟定了具有补肺益肾、祛痰化痰功效的补肺益肾方^[4-5]。临床研究^[6-7]发现,补肺益肾方对于COPD稳定期患者

具有改善临床症状、增强运动耐受、优化生存质量等疗效;实验研究^[8]发现,补肺益肾方可抑制由香烟烟雾提取物诱发的促炎因子高分泌,并且对过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)信号通路具有激活效应。另有研究显示,肺泡巨噬细胞对于调节肺部的先天免疫至关重要,其对凋亡细胞的吞噬作用被称作胞葬作用,胞葬作用可以维持凋亡细胞稳态,阻止毒性细胞内容物释放所引起的组织损伤和炎症反应^[9-10]。而COPD患者存在肺泡巨噬细胞胞葬功能障碍,PPAR γ 通路是参与炎症反应的主要通路,也对胞葬功能起介导作用^[11]。因此,本

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

✉ 通讯作者:cyl72621@163.com

实验基于 PPAR γ 通路介导的巨噬细胞胞葬功能, 探讨补肺益肾方治疗 COPD 稳定期的可能分子机制。本实验经河南中医药大学动物实验伦理委员会批准, 伦理号: DWLL201830047。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 60 只, 6~8 周龄, 雌雄各半, 体质量 18~20 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 动物质量合格证号: 1107261911000082。适应性饲养 1 周后造模。

1.2 药物

补肺益肾方组成: 炙黄芪 15 g, 人参 9 g, 酒萸肉 12 g, 枸杞子 12 g, 炙淫羊藿 9 g, 浙贝母 9 g, 炒紫苏子 9 g, 赤芍 9 g, 地龙 9 g 等, 由河南中医药大学药物分析实验室制备, 制成浸膏, 干燥后每克浸膏含生药 3.14 g。

1.3 主要试剂及仪器

红旗渠牌过滤嘴香烟(烤烟型; 焦油量: 10 mg; 烟气烟碱量: 0.8 mg; 烟气一氧化碳量: 12 mg; 批号: 1062453192944302), 河南中烟工业有限责任公司; PPAR γ 通路抑制剂 GW9662 (批号: HY-1657), 美国 MCE 公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒 (批号: A80010633), 杭州联科生物科技股份有限公司; PKH26 细胞连接试剂 (批号: 3006X1820), 懋康生物科技有限公司; 水合氯醛 (批号: C804539), 上海麦克林生化科技有限公司; 白细胞介素 4 (IL-4) ELISA 试剂盒 (批号: 12715961010)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号: 2411599101)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号: 14I07G11H2125)、兔 IgG-免疫组化试剂盒 (批号: 13I10C26H1622), 博士德生物有限公司; 抗 CD163 抗体 (批号: AH12066875)、抗诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体 (批号: AH04138902)、PPAR γ 抗体 (批号: AD03031245), 北京博奥森生物技术有限公司; PBS 缓冲液 (批号: 20201104), 0.4% 台盼蓝染色液 (批号: 20180803), 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号: 20191024), 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号: 20210425), DAB 显色试剂盒 (批号: 20210512), Solarbio 公司; 中性甲醛 (批号: 20180501), 烟台双双化工有限公司。

电子天平 (上海衡际科学仪器有限公司, 型号: YP10001); 非束缚小动物肺功能测量系统 (美国 BUXCO 公司, 型号: Fine Pointe WBP); 流

式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: FACSCalibur); 显微镜及显微照相系统 (日本奥林巴斯株式会社, 型号: OLYMPUS-DP70); 酶标仪 (Bio-Tek 公司, 型号: Epoch); 紫外交联仪 (美国 UVP 公司, 型号: CL-1000); 高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号: Scientz-48L)。

1.4 动物模型制备

小鼠雌雄分笼饲养, 每笼 5 只。适应性喂养 1 周后, 运用随机数字表法选出 12 只小鼠作为空白组, 其余小鼠制备 COPD 模型。采用香烟烟雾熏吸的方法制备小鼠 COPD 模型^[12-13]: 每次熏烟 25 支, 每次 40 min, 每日 2 次, 熏烟 8 周。8 周后小鼠肺功能较正常小鼠显著降低, 肺组织病理显示炎症浸润说明造模成功^[12]。

1.5 动物分组及给药

将造模成功的 48 只小鼠运用随机数字表法分为模型组、补肺益肾组、抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组, 每组 12 只。空白组与模型组小鼠采用生理盐水灌胃 (雄鼠 0.25 ml/次, 雌鼠 0.20 ml/次) 及腹腔注射 (雄鼠 0.20 ml/次, 雌鼠 0.15 ml/次)。补肺益肾组给予补肺益肾方溶液临床等效剂量 (5.31 g/kg) 灌胃, 腹腔注射生理盐水 (雄鼠 0.20 ml/次, 雌鼠 0.15 ml/次)。抑制剂组给予 GW9662 (1 mg/kg) 腹腔注射, 灌胃生理盐水 (雄鼠 0.25 ml/次, 雌鼠 0.20 ml/次)。抑制剂合补肺益肾组给予补肺益肾方溶液灌胃 (5.31 g/kg), 腹腔注射 GW9662 (1 mg/kg)。各组均每日 1 次, 每周 6 次, 干预 4 周。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 一般情况观察 每日观察小鼠精神状态、皮肤毛色、摄食饮水、呼吸状况等, 每周称量小鼠体质量, 比较各组小鼠给药 4 周后体质量。

1.6.2 肺功能 4 周后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)。

1.6.3 巨噬细胞胞葬功能测定 4 周后取材, 取材前 12 h 禁食, 不禁水。1) 取材时, 小鼠称重, 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉, 将麻醉后的小鼠置于超净台上, 用手术剪分离出小鼠气管, 在气管上横剪出“一”字小口, 用 5 ml 注射器针头插入小口并固定, 用注射器将 PBS 缓冲液注入肺内进行肺泡灌洗, 离心, 重悬, 置于完全培养基中培养, 收集贴壁细胞, 即为小鼠肺泡巨噬细胞。2) 在显微镜下观察细胞密度达到 80% 时进行紫外诱导小鼠

肺癌细胞 (LLC) 凋亡。将培养皿放入紫外线照射箱中, 开盖照射, 功率为 $30\ 000\ \mu\text{J}/\text{cm}^2$, 时间为 20 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 用 PKH26 染液对制备的凋亡细胞进行染色。3) 将小鼠肺泡巨噬细胞种皿。待贴壁后将 PKH26 染色后的 LLC 凋亡细胞加入培养皿中, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳培养箱中孵育 1 h。每皿加入 0.4% 台盼蓝混匀 (终浓度 0.02%), 孵育 1 min 后用胰蛋白酶消化细胞, 收集离心, 加入 4% 细胞固定液, 孵育后进行荧光强度检测, 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, 即为肺泡巨噬细胞胞葬能力。

1.6.4 肺组织病理观察 采用 10% 中性甲醛灌注小鼠左肺, 固定 72 h, 将固定好的肺组织采用酒精梯浸蜡-包埋流程制作蜡块, 用切片机切成 $4\ \mu\text{m}$ 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 HE 染色。置于光学显微镜下观察各组小鼠气道、支气管及肺泡的病理变化。

1.6.5 肺组织匀浆 TNF- α 、IL-4 含量测定 采用随机数表法每组选取 6 只小鼠, 切取肺心叶 40 mg, 置于 1.5 ml EP 管内, 用眼科剪将组织剪碎, 加入 2 个小钢珠和 360 μl 预冷的 PBS, 用组织破碎机破碎 10 min, 破碎后样品离心, 取上清用于炎症因子测定。严格按照 ELISA 法试剂盒说明书操作, 用酶标仪测定 OD 值并计算出 TNF- α 、IL-4 的浓度。

1.6.6 TUNEL 法检测小鼠肺组织细胞凋亡 采用随机数表法每组选取 6 只小鼠。在病理切片的基础上, 按照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作。除去样本片内源氧化物, 封闭后加稀释的生物素化抗地高辛抗体, 孵育并洗涤, 滴加 SABC, 孵育洗涤后加 DAB 显色液, 待棕黄色显现时终止反应, 苏木素复染, 脱水, 透明, 封片。光学显微镜下观察, 棕色为凋亡细胞, 用 Image proplus 6.0 软件处理分析, 并统计细胞凋亡指数 (AI)。

1.6.7 免疫组化法检测小鼠肺组织巨噬细胞中 CD163、iNOS、PPAR γ 含量 采用随机数表法每组选取 6 只小鼠。对组织切片进行脱蜡复水处理, 脱蜡后, 除去样本片内源氧化物, 消化洗涤封闭, 加一抗 (CD163、iNOS 按 1:200 稀释, PPAR γ 按 1:300 稀释), 置于湿盒过夜。加二抗孵育洗涤后显色。苏木素复染, 洗涤, 脱水, 透明, 封片。光学显微镜下观察, 棕色即为免疫组化阳性, 用 Image proplus 6.0 软件分析, 并计算统计切片图像

积分光密度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。本研究数据均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 两两比较若方差齐则运用 LSD 法进行分析, 若方差不齐则用 Dunnett T^0 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验期间共有 4 只小鼠死亡: 第 9 周由于灌胃操作不当, 导致液体进入补肺益肾组 1 只小鼠的气管致其呛咳而死; 第 10 周补肺益肾组中 1 只小鼠因撕咬而死; 第 11 周模型组 2 只小鼠死亡, 解剖见两肺局部有明显脓点, 可能存在肺脓肿。

2.1 各组小鼠一般状况观察结果

空白组小鼠精神状态良好, 毛发光泽, 活动敏捷, 饮食、大小便正常, 体质量增长正常; 模型组小鼠于实验第 2~3 周出现烦躁, 打架撕咬频繁, 多笼小鼠出现头顶部、下腹部撕咬伤, 实验第 6 周后烦躁程度减轻, 精神萎靡, 逐渐出现毛发干枯、无光泽, 反应迟钝, 进水进食均减少, 形体消瘦, 体质量增长缓慢。补肺益肾组小鼠烦躁撕咬现象较少, 精神状态较好, 反应较灵敏, 形体消瘦不明显; 抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组小鼠与模型组小鼠相比, 症状未见明显改善, 出现精神萎靡, 毛发干枯, 反应不灵敏, 进食减少, 形体消瘦等表现。表 1 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠体质量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 模型组、补肺益肾组、抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组小鼠体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组小鼠体质量比较 (g , $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量
空白组	6	25.60 $\pm$ 1.56
模型组	6	21.72 $\pm$ 1.47 ^{a)}
补肺益肾组	6	23.27 $\pm$ 2.66 ^{b)}
抑制剂组	6	21.92 $\pm$ 1.27 ^{a)}
抑制剂合补肺益肾组	6	22.15 $\pm$ 1.56 ^{a)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠肺功能指标比较

表 2 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠 TV、MV、PEF、EF50 均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 补肺益肾组小鼠 TV、MV、EF50 升高 ($P<0.05$), 抑制剂组小鼠 TV、MV、PEF、EF50 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 抑制

表2 各组小鼠肺功能指标比较 (x̄±s)

组别	鼠数	TV/ml	MV/ml·min ⁻¹	PEF/ml·s ⁻¹	EF50/ml·s ⁻¹
空白组	6	0.39±0.02	178.82±10.92	9.50±0.82	0.44±0.05
模型组	6	0.29±0.02 ^{a)}	129.16±9.00 ^{a)}	6.17±0.32 ^{a)}	0.31±0.05 ^{a)}
补肺益肾组	6	0.33±0.04 ^{a) c)}	142.81±7.95 ^{a) c)}	7.07±0.96 ^{a)}	0.38±0.06 ^{b) c)}
抑制剂组	6	0.29±0.02 ^{a) d)}	120.05±4.28 ^{a) d)}	6.38±0.73 ^{a)}	0.33±0.05 ^{a)}
抑制剂合补肺益肾组	6	0.30±0.01 ^{a)}	118.22±9.37 ^{a) c) d)}	6.33±0.81 ^{a)}	0.30±0.05 ^{a) c)}

注：TV，最终潮气量；MV，每分钟呼气量；PEF，呼气峰流速；EF50，50%潮气量呼气流量。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与空白组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与补肺益肾组比较， $P<0.01$ ；e) 与补肺益肾组比较， $P<0.05$ 。

剂合补肺益肾组小鼠MV明显降低 ($P<0.05$)；与补肺益肾组比较，抑制剂组小鼠TV、MV降低 ($P<0.01$)，抑制剂合补肺益肾组小鼠的MV、EF50降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组肺功能指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组小鼠肺组织病理结果

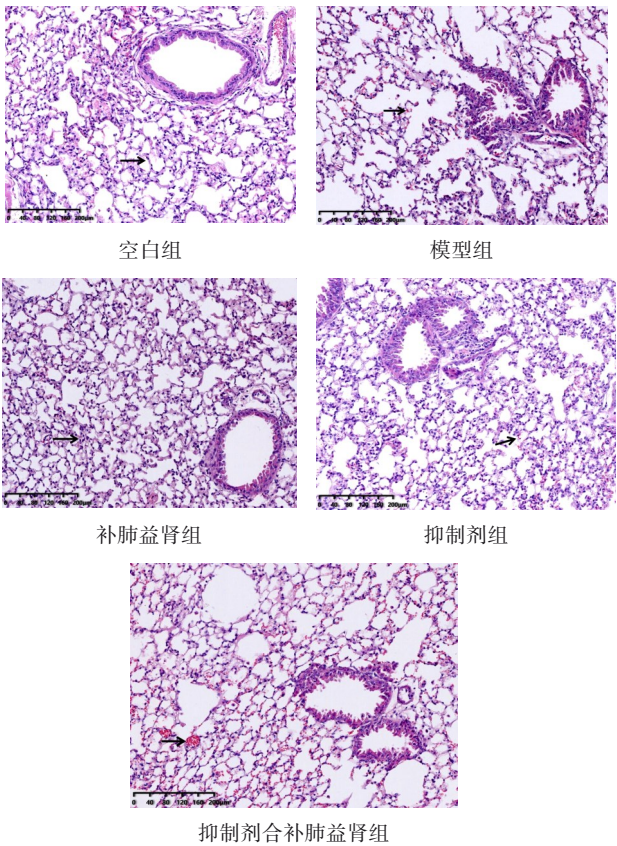
图1示，空白组小鼠肺组织病理显示肺泡大小基本均一、肺泡壁结构基本完整，偶见肺泡壁断裂融合；支气管管壁未见明显增厚，少量炎症细胞浸润。模型组小鼠肺泡大小不一、大量肺泡断裂融合、肺泡腔扩大；支气管管壁明显增厚，管腔变窄，杯状细胞和黏液腺肥大和增生，黏液下和支气管周围纤维组织增生，周围有较多炎性细胞浸润。补肺益肾组肺组织肺泡大小较为均一、肺泡壁结构较完整，偶见肺泡壁断裂融合，支气管管壁增厚减轻，炎症细胞浸润减少。抑制剂组及抑制剂合补肺益肾组病理改变未见明显改善。

2.4 各组小鼠肺组织匀浆TNF-α、IL-4含量比较

表3示，与空白组比较，模型组小鼠肺组织匀浆中TNF-α、IL-4显著升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，补肺益肾组、抑制剂组与抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织匀浆中TNF-α、IL-4均显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；抑制剂组与抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织匀浆中TNF-α、IL-4差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与补肺益肾组比较，抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织匀浆中TNF-α、IL-4差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力及肺组织凋亡指数比较

表4示，与空白组比较，除补肺益肾组外其余各组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，补肺益肾组、抑制剂组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力显著上升



注：箭头指炎症细胞浸润的肺泡腔。
图1 各组小鼠肺组织病理结果 (HE染色，×400)

表3 各组小鼠肺组织匀浆TNF-α、IL-4含量比较 (pg/ml, x̄±s)

组别	鼠数	TNF-α	IL-4
空白组	6	334.40±91.00	325.71±51.12
模型组	6	555.69±162.11 ^{a)}	449.85±24.29 ^{a)}
补肺益肾组	6	362.21±59.99 ^{c)}	307.74±55.69 ^{c)}
抑制剂组	6	425.26±66.11 ^{b)}	327.99±29.55 ^{c)}
抑制剂合补肺益肾组	6	412.59±105.42 ^{b)}	334.35±71.33 ^{c)}

注：TNF-α，肿瘤坏死因子α；IL-4，白细胞介素4。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ 。

($P<0.01$)；与补肺益肾组比较，抑制剂合补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力降低 ($P<0.01$)。

与空白组比较, 其余各组小鼠肺组织凋亡指数显著上升 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肺益肾组、抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织凋亡指数显著下降 ($P<0.01$), 抑制剂组小鼠肺组织凋亡指数差异无统计学意义 ($P>0.05$); 与补肺益肾组比较, 抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织凋亡指数显著升高 ($P<0.01$); 抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织凋亡指数差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 4 各组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力及肺组织凋亡指数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胞葬能力/平均 荧光强度	肺组织凋亡 指数/%
空白组	6	122.29±6.29	45.55±1.10
模型组	6	91.10±7.67 ^{a)}	56.82±1.53 ^{a)}
补肺益肾组	6	118.02±14.61 ^{c)}	48.34±0.36 ^{a) c)}
抑制剂组	6	101.75±1.35 ^{b) c)}	55.87±0.75 ^{a) d)}
抑制剂合补肺益肾组	6	92.07±6.75 ^{a) d)}	54.21±1.31 ^{a) c) d)}

注: a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与空白组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$; d) 与补肺益肾组比较, $P<0.01$ 。

2.6 各组小鼠肺部巨噬细胞 CD163、iNOS、PPAR γ 表达比较

表 5 示, 与空白组比较, 其余各组小鼠肺部巨噬细胞 CD163、iNOS 表达上升, PPAR γ 表达下降 ($P<0.01$); 与模型组比较, 补肺益肾组小鼠肺部巨噬细胞 CD163、iNOS 表达下降, PPAR γ 表达上升 ($P<0.01$), 抑制剂组 iNOS 表达上升 ($P<0.05$); 与补肺益肾组比较, 抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组小鼠肺部巨噬细胞 CD163、iNOS 表达升高, PPAR γ 表达降低 ($P<0.01$)。抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组小鼠各指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

COPD 属于中医学“肺胀”“喘证”范畴, 临床多见本虚标实, 以肺肾气虚为主要证型, 据此拟

定的补肺益肾方具有补益肺肾、化痰活血化癥之功效。方中人参为君, 大补元气, 补益肺肾; 黄芪补气升阳, 有益肺脾; 山茱萸补益肝肾, 固护肾精; 五味子敛肺滋肾; 淫羊藿补肾助阳; 浙贝母化痰散结; 陈皮健脾化痰, 再佐以活血化瘀等药。前期研究^[14-15]发现, 补肺益肾方能改善 COPD 模型大鼠肺泡上皮细胞结构, 调节肺泡表面活性蛋白的合成, 改善肺部炎症等。

COPD 晚期患者随着病情加重, 肌肉质量损失更加突出。研究^[16-17]发现, COPD 患者有营养不良的风险率为 57%, 营养摄入与肺功能指标以及 COPD 的发生发展有关。本实验造模期间小鼠出现精神萎靡, 毛发干枯, 反应迟钝, 进水进食减少, 形体消瘦, 体质量增长缓慢。用药后, 补肺益肾组小鼠上述症状有所缓解, 抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组与模型组相比均无明显差异, 表明补肺益肾方可有效改善 COPD 小鼠精神状态、营养状况, 提高小鼠活动能力。但补肺益肾组与模型组之间体质量差异无统计学意义, 其原因可能与样本量及用药时间较短有关。

肺功能检测是 COPD 诊断与评估的金标准, MV 是一个重要的载荷指标, 反映胸部是否完整、呼吸道是否无障碍、呼吸肌是否正常以及肺组织的弹性是否受到损害^[18]。本研究采用无束缚小动物全身体积描记仪测定无创肺功能, 主要检测 TV、MV、PEF 和 EF50 以评估小鼠肺功能。模型组小鼠 TV、MV、PEF、EF50 均较空白组降低, 与模型组相比, 补肺益肾组小鼠 TV、MV、EF50 明显升高, 抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组均无明显差异, 结果显示补肺益肾方可改善 COPD 小鼠肺功能, 其机制可能与 PPAR γ 通路有关。

巨噬细胞是重要的免疫细胞, 具有维持稳态, 免疫监视, 清除微生物与细胞碎片, 促进炎症消退、修复损伤等作用^[19]。巨噬细胞依靠吞噬功能发挥生理作用, 其对凋亡细胞清除的过程称作胞

表 5 各组小鼠肺部巨噬细胞 CD163、iNOS、PPAR γ 表达比较 (IOD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CD163	iNOS	PPAR γ
空白组	6	8.72±0.15	10.19±0.29	17.09±0.44
模型组	6	12.18±0.62 ^{a)}	15.13±0.62 ^{a)}	11.94±0.33 ^{a)}
补肺益肾组	6	10.05±0.2 ^{a) b)}	12.32±0.59 ^{a) b)}	15.86±0.43 ^{a) b)}
抑制剂组	6	14.09±0.27 ^{a) d)}	15.95±0.6 ^{a) c) d)}	12.36±0.53 ^{a) d)}
抑制剂合补肺益肾组	6	14.19±0.45 ^{a) d)}	15.59±0.35 ^{a) d)}	12.28±0.28 ^{a) d)}

注: iNOS, 诱导型一氧化氮合酶; PPAR γ , 过氧化物酶增殖物激活受体 γ 。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$; c) 与模型组比较, $P<0.05$; d) 与补肺益肾组比较, $P<0.01$ 。

葬。胞葬作用在组织稳态、胚胎发育、免疫和炎症消退中发挥重要作用^[20-21]。气道和肺组织内凋亡细胞的识别及清除主要由巨噬细胞介导完成。而 COPD 患者的肺泡巨噬细胞不仅对细菌的清除减少,而且这些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^[22]。研究^[23-24]发现, COPD 患者肺泡巨噬细胞对嗜酸性粒细胞的胞葬作用受损,且与 COPD 急性加重的炎症程度有关。本研究中,与空白组比较,模型组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力显著下降,其肺组织凋亡指数显著上升;与模型组相比,补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力显著上升,其肺组织凋亡指数显著下降;而抑制剂组、抑制剂合补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力差异没有统计学意义。结果说明,补肺益肾方可有效改善 COPD 小鼠肺泡巨噬细胞胞葬能力,从而减少凋亡细胞积累,其机制与调控 PPAR γ 通路有关。

COPD 患者存在小气道和肺实质炎症,外周血表现为轻度炎症,局部炎症的特征在于炎症细胞高分泌,如中性粒细胞,淋巴细胞和巨噬细胞的数目增加,以及高浓度的 TNF- α 、IL-4 等炎症因子^[25]。其中, TNF- α 与 COPD 患者的严重程度密切相关, IL-4 可促进巨噬细胞向 M2 型转化,并发挥促炎作用^[26]。本研究中,模型组小鼠肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-4 显著升高,而补肺益肾组、抑制剂组及抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-4 均较模型组显著降低,抑制剂组和抑制剂合补肺益肾组小鼠肺组织匀浆中 TNF- α 、IL-4 无明显差异,说明补肺益肾方可有效改善 COPD 小鼠的肺部炎症反应。

研究^[27]发现, iNOS 以 L-精氨酸为底物,生成一氧化氮 (NO) 参与巨噬细胞对吞入的微生物的杀菌作用,常作为 M1 巨噬细胞标志物; CD163 是 I 型跨膜蛋白介导细胞吞噬结合珠蛋白与血红蛋白复合体, CD163 与配体结合后参与介导抗炎细胞因子的分泌,常作为 M2 巨噬细胞标志物, COPD 患者 M1/M2 巨噬细胞极化发生失衡, M2 巨噬细胞在吸烟诱导的 COPD 的发病机制中起着至关重要的作用。本研究结果显示,模型组小鼠肺泡巨噬细胞 CD163、iNOS 表达显著上升,而补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞 CD163、iNOS 的表达下降,抑制剂组

及抑制剂合补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞 CD163 的表达均无明显差异,抑制剂组小鼠肺泡巨噬细胞 iNOS 的表达有所上升,可能与 PPAR γ 通路被抑制, M1 巨噬细胞增多有关。以上结果提示,补肺益肾方可有效改善 COPD 小鼠肺泡巨噬细胞的极化从而减轻炎症程度,其机制可能与 PPAR γ 通路相关。

PPAR γ 是一类配体激活的核转录因子超家族成员, PPAR γ 与相应配体结合后才能活化,活化后的 PPAR γ 与维甲酸类 X 受体结合形成异二聚体,可调节相关靶基因,也可以直接激活特定的基因^[28]。巨噬细胞 PPAR γ 活化后可以上调吞噬细胞胞葬相关表面受体和桥梁分子的表达,增强巨噬细胞吞噬能力,促进巨噬细胞向 M2 型极化和抑制炎症^[29]。本研究中,模型组小鼠肺泡巨噬细胞 PPAR γ 的表达较空白组显著下降,补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞 PPAR γ 表达较模型组显著上升,而抑制剂组及抑制剂合补肺益肾组小鼠肺泡巨噬细胞 PPAR γ 表达没有明显差异,提示补肺益肾方可有效改善 COPD 小鼠的肺泡巨噬细胞 PPAR γ 的表达,这进一步证实补肺益肾方可能通过调控 PPAR γ 的表达介导肺泡巨噬细胞胞葬能力。

综上所述,补肺益肾方可改善因 COPD 所导致的肺功能、肺组织损伤,抑制肺部炎症反应,调控 PPAR γ 通路介导的巨噬细胞胞葬功能可能是其机制之一。

参考文献

- [1] RABE KF, WATZ H. Chronic obstructive pulmonary disease[J]. Lancet, 2017, 389(10082): 1931-1940.
- [2] SCHAMBERGER AC, MISE N, MEINERS S, et al. Epigenetic mechanisms in COPD: implications for pathogenesis and drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2014, 9(6): 609-628.
- [3] 黄红艳, 朱秋秋, 杨惠琴. 慢性阻塞性肺疾病中医治疗临床研究进展[J]. 新疆中医药, 2020, 38(5): 78-81.
- [4] 赵静, 方统念, 谭泳梅, 等. 慢性阻塞性肺疾病稳定期与中医辨证分型[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(6): 1107-1109.
- [5] 刘栋强, 徐顺贵, 林劲榕. 慢性阻塞性肺疾病中医证候病机研究进展[J]. 光明中医, 2018, 33(22): 3443-3445.
- [6] 王国力, 邓虎, 徐艳玲. 补肺益肾方提高慢性阻塞性肺疾病患者活动耐力的临床研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(1): 66-69.
- [7] 赵晶晶, 李志更, 翟志光, 等. 补肺益肾方对稳定期慢阻

- 肺肺肾两虚证疗效评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(7): 965-966, 1014.
- [8] 陈玉龙, 吴耀松, 李建生, 等. 调补肺肾三法对香烟烟雾提取物和脂多糖刺激单核巨噬细胞 THP-1 分泌细胞因子的影响[J]. 中医杂志, 2012, 53(22): 1948-1953.
- [9] YAMASAKI K, EEDEN SFV. Lung Macrophage phenotypes and functional responses: role in the pathogenesis of COPD[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 582.
- [10] BAGDONAS E, RAUDONIUTE J, BRUZAUSKAITE I, et al. Novel aspects of pathogenesis and regeneration mechanisms in COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2015, 10: 995-1013. doi: 10. 2147/COPD. S82518.
- [11] LIU Y, LIU H, LI C, et al. Proteome profiling of lung tissues in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): platelet and macrophage dysfunction contribute to the pathogenesis of COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2020, 15: 973-980. doi: 10. 2147/COPD. S246845.
- [12] 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.
- [13] LIANG GB, HE ZH. Animal models of emphysema[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(20): 2465-2475.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] MCCUBBREY AL, CURTIS JL. Efferocytosis and lung disease[J]. *Chest*, 2013, 143(6): 1750-1757.
- [17] MINEMATSU N, BLUMENTAL-PERRY A, SHAPIRO SD. Cigarette smoke inhibits engulfment of apoptotic cells by macrophages through inhibition of actin rearrangement[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(4): 474-482.
- [18] WANG J, WANG W, LIN H, et al. Role of pulmonary function and FeNO detection in early screening of patients with ACO [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(2): 830-837.
- [19] BYRNE AJ, MATHIE SA, GREGORY LG, et al. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways[J]. *Thorax*, 2015, 70(12): 1189-1196.
- [20] KOURTZELIS I, HAJISHENGALLIS G, CHAVAKIS T. Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 553. doi: 10. 3389/fimmu. 2020. 00553.
- [21] MARTIN CJ, PETERS KN, BEHAR SM. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 17: 17-23. doi: 10. 1016/j. mib. 2013. 10. 007.
- [22] 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(1): 112.
- [23] 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.
- [24] RICHENS TR, LINDERMAN DJ, SAHORSTMANN Net al. Cigarette smoke impairs clearance of apoptotic cells through oxidant-dependent activation of RhoA [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(11): 1011-1021.
- [25] HUANG AX, LU LW, LIU WJ, et al. Plasma inflammatory cytokine IL-4, IL-8, IL-10, and TNF- α levels correlate with pulmonary function in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease (COPD) overlap syndrome [J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2800-2808. doi: 10. 12659/msm. 896458.
- [26] ACCORTT NA, CHUNG JB, BONAFEDE M, et al. Retrospective analysis to describe associations between tumor necrosis factor alpha inhibitors and COPD-related hospitalizations [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12: 2085-2094. doi: 10. 2147/COPD. S127815.
- [27] EAPEN MS, HANSBRO PM, MCALINDEN K, et al. Abnormal M1/M2 macrophage phenotype profiles in the small airway wall and lumen in smokers and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13392.
- [28] HE S, XIE L, LU J, et al. Characteristics and potential role of M2 macrophages in COPD [J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2017, 12: 3029-3039. doi: 10. 2147/COPD. S147144.
- [29] YOON YS, KIM SY, KIM MJ, et al. PPAR γ activation following apoptotic cell instillation promotes resolution of lung inflammation and fibrosis via regulation of efferocytosis and proresolving cytokines [J]. *Mucosal Immunol*, 2015, 8(5): 1031-1046.

Effect of *Bufei Yishen Formula* (补肺益肾方) on the Efferocytosis of Alveolar Macrophages and PPAR γ Pathway in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Mice

WU Yingshuo, SHANG Yiwan, MENG Danhua, ZHOU Zhexu, CHEN Xing, WU Yaosong, REN Shan-shan, LIU Yan, CHEN Yulong

Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450000

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Bufei Yishen Formula* (补肺益肾方, BYF) in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, BYF group, inhibitor group, and combination (inhibitor combined with BYF) group, with 12 mice in each group. Except for the blank group, mice were immersed in cigarette smoke for 8 weeks to develop the COPD models. After modeling, the BYF group was given 5.31 g/(kg·d) BYF solution by gavage and normal saline (male 0.2 ml, female 0.15 ml each time) by intraperitoneal injection; inhibitor group was given 1 mg/(kg·d) GW9662, the inhibitor of peroxidase proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) pathway, by intraperitoneal injection and normal saline (male 0.25 ml, female 0.2 ml each time) by gavage; the combination group was given BYF solution (5.31 g/kg·d) by gavage and GW9662 (1 mg/kg·d) by intraperitoneal injection; the blank group and model group were given normal saline by gavage and by intraperitoneal injection with the same dosage as other groups; all administrations were given once daily, six times a week. After four weeks, the body weight of mice, the lung function indicators including final tidal volume (TV), exhaled minute ventilation (MV), peak expiratory flow (PEF), and mid-tidal expiratory flow (EF50), the content of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-4 (IL-4) in lung tissue homogenate, the efferocytosis of alveolar macrophages, the lung tissue cells apoptotic index, and the expression of macrophage CD163, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and PPAR γ were assessed. HE staining was used to observe pathological changes of lung tissue. **Results** Compared to those in the blank group, the body weight of mice, the lung function indicators, and the efferocytosis of alveolar macrophages in the model group significantly decreased; the content of TNF- α and IL-4, the lung tissue cells apoptotic index, as well as the expression of CD163 and iNOS in alveolar macrophages increased significantly; and the expression of PPAR γ significantly decreased ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the body weight and the lung function indicators in the BYF group were significantly improved; the content of TNF- α and IL-4, the expression of CD163 and iNOS in pulmonary macrophages, and the lung tissue cells apoptotic index significantly decreased; and the efferocytosis of alveolar macrophages and the expression of PPAR γ significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significant differences in the body weight of mice, the lung function indicators, the efferocytosis of alveolar macrophages, the lung tissue cells apoptotic index, and the expression of CD163 and PPAR γ between the model group and the inhibitor group and the combination group ($P > 0.05$); but increased content of TNF- α and IL-4 were found in the inhibitor and the combination group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** BYF may act the role of treating COPD by regulating the efferocytosis of alveolar macrophages and the PPAR γ pathway.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; *Bufei Yishen Formula* (补肺益肾方); macrophages; efferocytosis; peroxidase proliferator activated receptor gamma pathway

(收稿日期: 2021-06-11; 修回日期: 2021-08-29)

[编辑: 邓媛]