

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.24.012

PM_{2.5}对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠气道重塑的影响及补肺益肾组分方的保护作用王晶¹, 李亚¹, 李建生[✉], 赵鹏¹, 田燕歌¹, 刘学芳¹, 何慧慧¹, 贾瑞¹, 张彩丽²

1. 河南中医药大学呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南省郑州市郑东新区金水东路156号, 450046; 2. 河南中医药大学中医药科学院

[摘要] **目的** 观察PM_{2.5}对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠气道重塑的影响及补肺益肾组分方的保护作用与可能机制。**方法** 72只SD大鼠随机分为空白组、PM_{2.5}组、COPD组、PM_{2.5}+COPD组、补肺益肾组分方组和氨茶碱组, 每组12只。第1~8周, 除空白组和PM_{2.5}组外, 其余各组给予香烟熏吸联合反复细菌感染制备COPD大鼠模型。第9~16周, 除空白组和COPD组外, 其余各组给予大气实时浓缩PM_{2.5}全身暴露; 同时, 补肺益肾组分方组和氨茶碱组分别给予补肺益肾组分方6.48 mg/(kg·d)和氨茶碱混悬液54 mg/(kg·d)灌胃, 其余各组给予生理盐水灌胃(雌鼠1.5 ml/只、雄鼠2 ml/只)。PM_{2.5}末次暴露24 h内取材, 观察肺组织病理形态和超微结构; 采用免疫组化法检测肺组织碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、I型胶原蛋白(COL I)、III型胶原蛋白(COL III)表达; 采用ELISA法检测支气管-肺泡灌洗液中基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶12(MMP-12)和金属蛋白酶组织抑制因子1(TIMP-1)水平。**结果** 与空白组比较, PM_{2.5}组、COPD组和PM_{2.5}+COPD组大鼠肺组织出现肺泡壁和支气管壁增厚、支气管狭窄、血管增生、炎症细胞浸润和II型肺泡上皮结构破坏, 且以PM_{2.5}+COPD组尤为显著; 与PM_{2.5}+COPD组比较, 补肺益肾组分方组和氨茶碱组以上肺组织病理损伤显著改善。与空白组比较, PM_{2.5}组、COPD组和PM_{2.5}+COPD组大鼠肺组织中bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III阳性表达, 支气管-肺泡灌洗液中MMP-9和MMP-12均显著升高, TIMP-1显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与PM_{2.5}组或COPD组比较, PM_{2.5}+COPD组bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III和MMP-9、MMP-12显著升高, TIMP-1显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与PM_{2.5}+COPD组比较, 补肺益肾组分方组和氨茶碱组bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、MMP-9、MMP-12显著降低, TIMP-1显著升高, 补肺益肾组分方组COL III显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** PM_{2.5}暴露显著加重COPD模型大鼠气道重塑, 补肺益肾组分方可以延缓PM_{2.5}暴露环境下COPD气道重塑进程, 其机制可能与抑制胶原沉积、改善蛋白酶/抗蛋白酶失衡等相关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 补肺益肾方; PM_{2.5}; 气道重塑

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续存在的呼吸道症状和气流受限为特征的重大慢性疾病, 与长期暴露于有毒颗粒或气体引起的气道、肺泡异常密切相关^[1]。PM_{2.5}是空气动力学等效直径小于2.5 μ m的大气颗粒物, 极易穿过上呼吸道物理屏障到达远端气道, 沉积于肺泡, 诱导氧化应激和炎症反应,

而持续的气道/肺泡慢性炎症可引起黏液高分泌、蛋白酶-抗蛋白酶失衡和胶原沉积等, 共同导致不可逆的气道重塑和狭窄, 从而诱发或加重COPD^[2-3]。研究^[4]证实, PM_{2.5}浓度每增加10 μ g/m³, COPD住院率增加3.1%, 病死率增加2.5%。

补肺益肾方(专利号: ZL 201110117578.1)是课题组针对COPD稳定期的常见病机肺肾气虚兼痰浊血瘀制定的方剂, 法以补益肺肾佐以化痰活血, 临床疗效确切^[5-6], 其机制与改善炎症反应、氧化应激状态和气道重塑等有关^[7-8]。该方能够改

基金项目: 国家自然科学基金(81973822, 81673775, 82074403); 河南省特色骨干学科建设项目(STG-ZYXKY-2020014)

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

善 PM2.5 暴露大鼠肺功能和肺组织病理损伤, 抑制炎症反应、氧化应激和黏液高分泌等^[9-10]。而补肺益肾组分方是基于补肺益肾方关键组分优化配比配伍获得的中药组分方, 与补肺益肾方疗效相当^[11-12]。本研究以 COPD 模型大鼠为研究对象, 观察 PM2.5 暴露对 COPD 气道重塑的影响, 并探讨补肺益肾组分方的可能保护机制, 为防治雾霾诱发 COPD 加重的临床应用提供科学依据。本研究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批准 (批号 YFYDW2017013)。

1 材料与方法

1.1 动物和细菌

SPF 级 SD 大鼠 72 只, 雌雄各半, 6~9 周龄, 体质量 (250±20) g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (鲁) 20180007。SPF 级饲养环境, 维持温度 20~25 ℃, 相对湿度 50%~65%, 12 h 昼夜循环, 自由进食饮水。肺炎克雷伯杆菌 (菌株编号: 46117), 由中国医学细菌保藏管理中心提供, 使用前将细菌混悬液浓度调整为 6×10^8 CFU/ml。

1.2 香烟

红旗渠过滤嘴香烟 (硬金红, 河南中烟工业有限责任公司, 烤烟型, 烟碱量 1.0 mg, 烟气一氧化碳含量 11 mg, 焦油量 10 mg)。

1.3 药物

补肺益肾组分方, 由人参皂苷 Rh1 (批号: CHB180608)、黄芪甲苷 (批号: MUST-17022804)、淫羊藿苷 (批号: MUST-16111710) 和丹皮酚 (批号: MUST-16071405) 等 5 种中药单体组成 (专利申请号: 201811115372.3), 临用前根据各单体配比 (5 : 1 : 20 : 0.8) 溶于生理盐水, 配制为浓度为 1.3 mg/ml 混悬液。氨茶碱片 (批号: 1905027), 购于山东新华制药股份有限公司, 临用前研末溶于生理盐水, 配制成浓度为 10.8 mg/ml 的混悬液。

1.4 主要试剂与仪器

兔抗大鼠碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF, 批号: AG09113492)、血管内皮生长因子 (VEGF, 批号: AH03121212)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA, 批号: A102264747) 多克隆抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; I 型胶原蛋白 (COL I, 批号: 14695-1-AP)、III 型胶原蛋白 (COL III, 批号: 22734-1-AP) 多克隆抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; 基质金属蛋白酶 9 (MMP-9, 批号: E-EL-R0624c)、基质金属蛋白酶 12 (MMP-12, 批号:

E-EL-R0044c) 和金属蛋白酶组织抑制因子 1 (TIMP-1, 批号: E-EL-R0540c) ELISA 检测试剂盒, 武汉伊莱瑞特生物技术有限公司; 戊巴比妥钠 (货号: 57-33-0), 德国 Ruibio 公司; 中性甲醛 (货号: P804536), 上海麦克林生化科技有限公司; 苏木素染液 (批号: H9627), 美国 Sigma 公司; 伊红染液 (批号: 71014544)、二甲苯 (批号: 10023428)、石蜡 (批号: 69019563)、戊二醛 (批号: 30092438), 国药集团化学试剂有限公司; 即用型 SABC-POD (兔 IgG) 试剂盒 (货号: SA1022), 武汉博士德生物工程有限公司; 醋酸双氧铀 (批号: 1110814), 美国 SPI 公司; 柠檬酸铅 (批号: 10136767), 英国阿法埃莎公司; 四氧化钼 (货号: 18456), 美国 Tedpella 公司。

PM2.5 在线浓缩富集系统 (型号: HRH-PM286)、动物全身动态暴露系统 (型号: HRH-MNE1786), 北京慧荣和科技有限公司; 生物显微镜及图像分析系统 (型号: DM6000), 德国徕卡公司; 高速台式冷冻离心机 (型号: Multifuge X1R)、全波长酶标仪 (型号: Multiskan MK3), 美国赛默飞公司; 透射电子显微镜 (型号: JEM-1400), 日本 OLYMPUS 公司。

1.5 模型制备

采用香烟熏吸联合反复细菌感染法制备 COPD 大鼠模型^[13]: 于自制烟熏箱 (120 cm × 50 cm × 180 cm) 中对大鼠进行香烟烟雾暴露, 每天 2 次, 每次 40 min (上午 8: 00~8: 40, 下午 17: 00~17: 40), 烟雾浓度控制在 (3000 ± 500) ml/m³ (25 支香烟); 反复细菌感染采用肺炎克雷伯杆菌经鼻滴入, 每 5 天 1 次, 每次 0.1 ml 细菌悬液, 持续 8 周。以肺功能下降及肺组织病理表现出肺泡壁断裂、肺气肿、炎症细胞浸润等判断 COPD 大鼠模型制备成功。

1.6 PM2.5 暴露

第 9~16 周, 参考文献 [9, 14] 中方法采用 PM2.5 在线浓缩富集系统联合动物全身动态暴露系统 (1.2 m³) 对建模成功的 COPD 大鼠进行大气实时浓缩 PM2.5 全身暴露, 每天暴露 4 h (上午 8: 00~12: 00), 持续 8 周, 实时记录 PM2.5 暴露浓度; 每天无 PM2.5 暴露间隙将大鼠饲养于清洁过滤空气 (PM2.5 浓度 < 10 μ g/m³)。

1.7 分组及给药

采用 Microsoft Excel 2010 产生 72 个随机数, 以“随机数”序列为关键字排序, 将大鼠随机分为 6

组:空白组、PM2.5组、COPD组、PM2.5+COPD组、补肺益肾组分方组和氨茶碱组,每组12只。实验第1~8周,除空白组和PM2.5组外,其余各组给予香烟熏吸联合反复细菌感染法制备COPD大鼠模型。实验第9~16周,除空白组和COPD组外,其余各组给予PM2.5暴露;此外,补肺益肾组分方组和氨茶碱组于每日PM2.5暴露前分别给予补肺益肾组分方6.48 mg/(kg·d)和氨茶碱混悬液54 mg/(kg·d)灌胃。补肺益肾组分方组给药剂量为人与大鼠等效剂量^[15]。空白组始终饲养于清洁过滤空气,并同PM2.5组、COPD组和PM2.5+COPD组均给予生理盐水灌胃(雌鼠1.5 ml/只、雄鼠2 ml/只)。各组大鼠处理均每天1次,持续8周。

1.8 观察指标及方法

1.8.1 肺组织病理 于PM2.5末次暴露24 h内取材。采用3%戊巴比妥钠(2.5 ml/kg)麻醉大鼠,待大鼠四肢肌肉松弛呼吸减弱,行左肺气管-支气管插管,结扎右支气管,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 μ m切片,HE染色,在光学显微镜下观察肺组织病理改变。

1.8.2 肺组织超微结构 新鲜肺组织按照1 mm×1 mm×1 mm切块,2.5%戊二醛固定、1%四氧化锇后固定、乙醇梯度脱水、渗透、包埋、超薄切片,对切片进行醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色。采用透射电子显微镜观察大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞和呼吸膜超微结构。

1.8.3 肺组织bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I和COL III表达水平 采用免疫组化法检测。各组采用随机数字表法选取6只大鼠,取其固定后的左肺组织,切取3 mm厚的肺组织块,脱水、透明、石蜡包埋,4 μ m切片,65 $^{\circ}$ C烤片3 h;抗原修复,自然冷却,加3% H₂O₂,室温孵育10 min;正常山羊血清封闭30 min,甩去封闭液,加50 μ l稀释的一抗覆盖组织(bFGF、VEGF稀释浓度为1:300, α -SMA、COL I、COL III稀释浓度分别为1:500、1:50、1:1000),4 $^{\circ}$ C过夜;PBS洗3次,加二抗37 $^{\circ}$ C孵育20 min;PBS洗3次,加链霉亲和素-生物素复合物(SABC)37 $^{\circ}$ C孵育30 min;PBS洗3次,加DAB显色液,2 min终止,苏木素复染30 s,自来水冲洗;加1%盐酸乙醇,自来水冲洗,脱水,中性树胶封片。光镜下观察,每张切片随机选取10个高倍视野(400 $\times$),采用Image-Pro Plus 6.0软件进行分析,结果以阳性区域积分光密度值

(IOD)平均值表示。

1.8.4 支气管-肺泡灌洗液中蛋白酶水平 左肺气管-支气管插管后,4 $^{\circ}$ C PBS灌注回抽,每次3 ml,重复3次,1500 r/min、离心半径16.5 cm、4 $^{\circ}$ C离心15 min,收集支气管-肺泡灌洗液,-80 $^{\circ}$ C冻存。各组采用随机数字表法选取8只大鼠,采用ELISA法检测大鼠支气管-肺泡灌洗液中MMP-9、MMP-12和TIMP-1水平。

1.9 统计学方法

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用LSD法,方差不齐者采用Dunnett's *T*³法。显著性水准取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

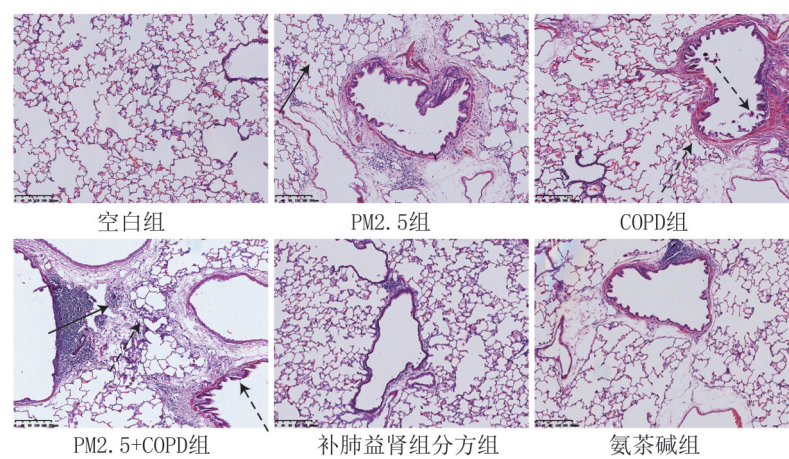
实验过程中,氨茶碱组因打斗、肺脓肿、肺部肿瘤等原因共有3只大鼠死亡,其余各组无死亡。

2.1 各组大鼠肺组织病理形态比较

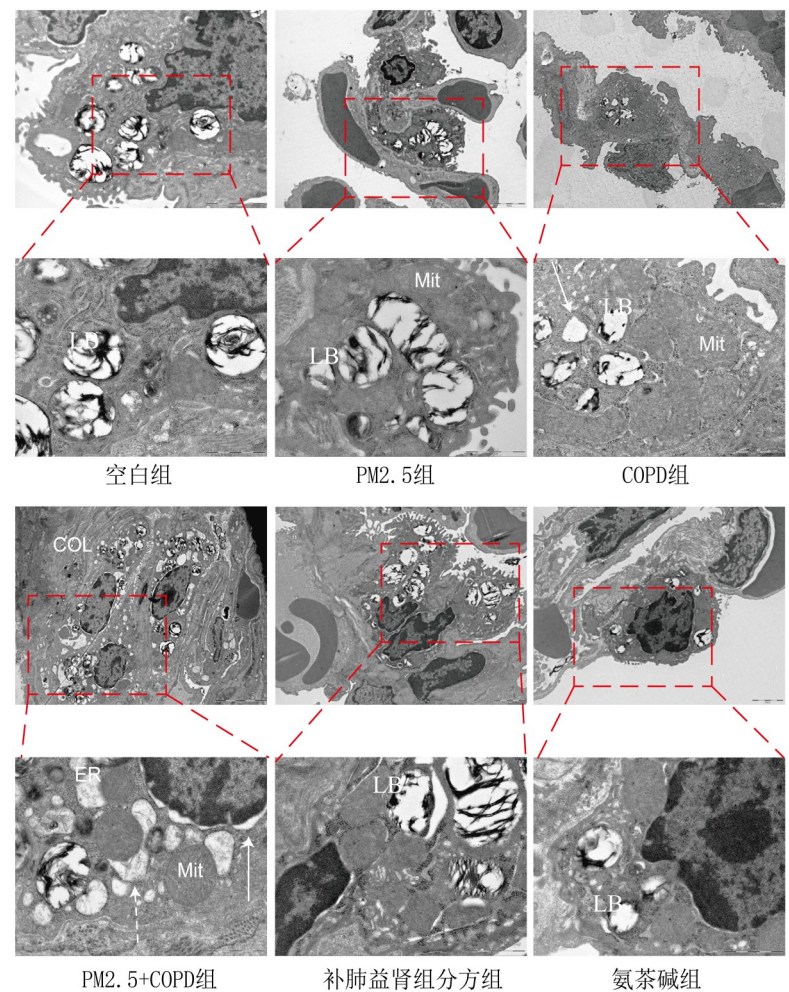
图1(扫描本文二维码获取彩图)示,光镜下观察,空白组大鼠肺组织结构清晰,肺泡壁未见明显增厚,无充血、水肿和炎症细胞浸润等表现;PM2.5组大鼠肺泡腔中出现少量炎症细胞浸润,肺泡壁、支气管壁增厚;COPD组大鼠肺组织出现支气管壁、肺泡壁增厚,气道变窄,肺泡腔及支气管周围炎症细胞浸润明显,气道上皮脱落,肺泡壁断裂融合;PM2.5+COPD组大鼠肺泡结构紊乱,肺泡壁、支气管壁增厚明显,气道狭窄,肺泡和支气管周围炎症细胞浸润较COPD组显著增加;补肺益肾组分方组和氨茶碱组以上病理损伤显著改善,炎症细胞浸润减少,肺泡壁、支气管壁无明显增厚。

2.2 各组大鼠肺组织超微结构比较

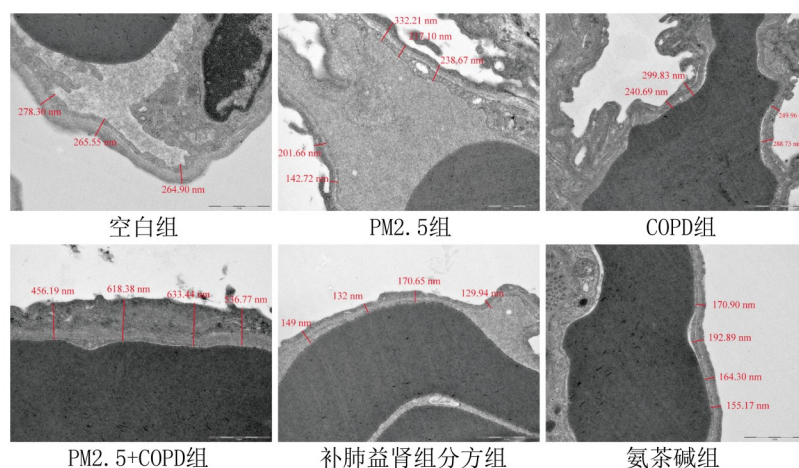
图2、图3(扫描本文二维码获取彩图)示,透射电镜下观察,空白组Ⅱ型肺泡上皮细胞嗜碱性板层小体数量较多,无排空现象,核膜边界清楚,绒毛膜排列整齐;肺泡毛细血管内皮细胞无肿胀,呼吸膜结构清晰致密。PM2.5组Ⅱ型肺泡上皮细胞表面微绒毛短小,排列散乱,板层小体体积增大且不规则,可见部分排空;呼吸膜边缘模糊,较空白组增厚。COPD组Ⅱ型肺泡上皮细胞板层小体呈空泡化,微绒毛减少且排列紊乱,线粒体明显肿胀呈“条状面包样”;呼吸膜各层结构模糊不清,部分呈溶解状态。PM2.5+COPD组肺泡结构紊乱,肺泡间隔胶原纤维增生,胶原沉积显著,肺泡内可见坏死脱落的上皮和渗出物;板层小体呈空泡化,内质网



注：实线箭头表示炎症细胞浸润；虚线箭头表示肺泡壁、支气管壁增厚，气道上皮脱落。
图1 各组大鼠肺组织病理形态（HE 染色， $\times 100$ ）



注：第一、三排图放大倍数：8000 倍；第二、四排图放大倍数：30 000 倍。实线箭头表示细胞核固缩；虚线箭头表示内质网扩张。LB，板层小体；Mit，线粒体；ER，内质网；COL，胶原纤维。
图2 各组大鼠肺组织Ⅱ型肺泡上皮细胞超微结构



注：图中标注数字为呼吸膜厚度。

图3 各组大鼠肺组织呼吸膜超微结构（电镜， $\times 30\,000$ ）

增生且扩张肿胀成池，细胞核固缩，核边界增宽；内皮细胞肿胀，呼吸膜较前3组明显增宽。与PM2.5+COPD组比较，补肺益肾组分方组和氨茶碱组，肺组织超微结构损伤明显改善。

2.3 各组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I 和 COL III 表达比较

表1示，与空白组比较，PM2.5组、COPD组及PM2.5+COPD组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III 表达均显著升高 ($P < 0.01$)；与PM2.5组比较，PM2.5+COPD组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III 表达均显著升高 ($P < 0.05$)；与COPD组比较，PM2.5+COPD组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III 表达均显著升高 ($P < 0.01$)；与PM2.5+COPD组比较，补肺益肾组分方组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I、COL III 表达均显著降低，氨茶碱组 bFGF、VEGF、 α -SMA 和 COL I 表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，且两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠支气管-肺泡灌洗液中蛋白酶水平比较

表2示，与空白组比较，PM2.5组、COPD组和PM2.5+COPD组支气管-肺泡灌洗液中MMP-9和MMP-12显著升高，TIMP-1显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)；与PM2.5组及COPD组比较，PM2.5+COPD组MMP-9和MMP-12均显著升高，TIMP-1均显著降低 ($P < 0.01$)；与PM2.5+COPD组比较，补肺益肾组分方组和氨茶碱组MMP-9和MMP-12均显著降低，TIMP-1均显著升高 ($P < 0.01$)；与补肺益肾组分方组比较，氨茶碱组MMP-12显著升高 ($P < 0.01$)。

3 讨论

COPD属中医学“肺胀”“喘证”等范畴，总体病机为本虚标实，本虚责于气（阳）虚、阴虚，标实常见痰浊、血瘀兼证。PM2.5属中医外邪范畴，天气通于肺，肺乃华盖，亦为娇脏，故霾邪外感，首先犯肺。肺失宣降，痰浊内蕴，久则肺、脾、肾虚损，痰瘀互阻，发为肺胀、喘证等。

表1 各组大鼠肺组织 bFGF、VEGF、 α -SMA、COL I 和 COL III 表达比较（积分光密度值， $\bar{x} \pm s$ ）

组别	鼠数	bFGF	VEGF	α -SMA	COL I	COL III
空白组	6	11.89 $\pm$ 2.05	10.21 $\pm$ 3.46	14.65 $\pm$ 3.61	13.16 $\pm$ 1.24	13.07 $\pm$ 3.18
PM2.5组	6	21.44 $\pm$ 2.84 ^{a)}	23.29 $\pm$ 2.73 ^{a)}	22.76 $\pm$ 0.39 ^{a)}	26.07 $\pm$ 4.28 ^{a)}	27.06 $\pm$ 1.44 ^{a)}
COPD组	6	23.92 $\pm$ 4.32 ^{a)}	27.27 $\pm$ 6.00 ^{a)}	25.18 $\pm$ 2.54 ^{a)}	33.78 $\pm$ 2.73 ^{a)}	37.68 $\pm$ 3.56 ^{a)}
PM2.5+COPD组	6	35.58 $\pm$ 4.36 ^{a) b) c)}	39.59 $\pm$ 6.04 ^{a) b) c)}	36.92 $\pm$ 4.88 ^{a) b) c)}	40.97 $\pm$ 2.80 ^{a) b) c)}	46.83 $\pm$ 7.87 ^{a) b) c)}
补肺益肾组分方组	6	21.23 $\pm$ 2.05 ^{d)}	24.78 $\pm$ 6.10 ^{d)}	20.98 $\pm$ 6.41 ^{d)}	33.71 $\pm$ 2.05 ^{e)}	30.04 $\pm$ 0.83 ^{d)}
氨茶碱组	6	22.00 $\pm$ 3.10 ^{d)}	28.85 $\pm$ 5.07 ^{d)}	21.18 $\pm$ 4.42 ^{d)}	26.44 $\pm$ 2.51 ^{d)}	36.25 $\pm$ 0.80

注：bFGF，碱性成纤维细胞生长因子；VEGF，血管内皮生长因子； α -SMA， α 平滑肌肌动蛋白；COL I，I型胶原蛋白；COL III，III型胶原蛋白。

a) 与空白组比较， $P < 0.01$ ；b) 与PM2.5组比较， $P < 0.05$ ；c) 与COPD组比较， $P < 0.01$ ；d) 与PM2.5+COPD组比较， $P < 0.01$ ；e) 与PM2.5+COPD组比较， $P < 0.05$ 。

表2 各组大鼠支气管-肺泡灌洗液中 MMP-9、MMP-12 和 TIMP-1 水平比较 (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MMP-9	MMP-12	TIMP-1
空白组	8	10.32±2.71	409.23±118.67	1.76±0.14
PM2.5 组	8	15.31±3.11 ^{a)}	651.19±157.03 ^{a)}	1.09±0.14 ^{b)}
COPD 组	8	17.29±3.77 ^{b)}	832.63±119.71 ^{b)}	0.99±0.12 ^{b)}
PM2.5+COPD 组	8	32.24±3.10 ^{b) c) d)}	1170.87±146.85 ^{b) c) d)}	0.67±0.13 ^{b) c) d)}
补肺益肾组分方组	8	22.32±3.98 ^{e)}	694.17±88.77 ^{e)}	1.44±0.27 ^{e)}
氨茶碱组	8	23.15±3.22 ^{e)}	989.70±143.30 ^{e) f)}	1.60±0.26 ^{e)}

注：MMP-9，基质金属蛋白酶9；MMP-12，基质金属蛋白酶12；TIMP-1，金属蛋白酶组织抑制因子1。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白组比较， $P<0.01$ ；c) 与 PM2.5 组比较， $P<0.01$ ；d) 与 COPD 组比较， $P<0.01$ ；e) 与 PM2.5+COPD 组比较， $P<0.01$ ；f) 与补肺益肾组分方组比较， $P<0.01$ 。

COPD 已成为全球第三大死因^[16]，其持续增长的患病率和死亡率与危险因素的暴露密切相关，其中环境污染占 COPD 风险因素归因高达 41.07%^[17]，尤其在发展中国家，PM2.5 等空气污染物的暴露是非吸烟人群肺功能下降和不可逆气流受限的主要原因^[18-19]。本研究结果显示，PM2.5 暴露可促进健康大鼠肺组织形态损伤，诱发胶原沉积、蛋白酶/抗蛋白酶失衡等，与前期研究^[9]结果一致；同时，PM2.5+COPD 组大鼠肺损伤较 PM2.5 组显著，提示相较于健康状态，COPD 疾病状态对污染环境更加敏感，这可能与 COPD 存在的肺功能损伤、纤毛清除能力减弱和慢性气道炎症等^[20]相关。

气道重塑是 COPD 气流受限的基础，主要表现为上皮细胞增生、黏液腺增生、气道壁细胞外基质组分和数量改变及血管增生等，与炎症反应、氧化应激和蛋白酶/抗蛋白酶失衡等密切相关^[21-22]。PM2.5 表面富含的有毒成分及其自由基活性触发免疫应答释放炎症介质，吸引炎症细胞募集于肺；活化的炎症细胞释放基质金属蛋白酶、弹性蛋白酶、半胱氨酸酶及活性氧等，诱导氧化应激、黏液高分泌和蛋白酶/抗蛋白酶失衡，进而导致不可逆性气道重塑和狭窄，诱发或加重 COPD^[2-3]。本研究中，COPD 大鼠经 PM2.5 暴露后进一步加重肺泡壁和支气管壁增厚、血管增生和炎症细胞浸润等肺组织病理损伤，Ⅱ型肺泡上皮细胞结构破坏和呼吸膜增厚等超微结构异常的显著加重，提示 PM2.5 暴露可显著加重 COPD 大鼠气道重塑。

VEGF 是一种广泛分布于肺组织的上皮生长因子，在吸烟、低氧、炎症等情况下呈现高表达，可调控平滑肌增生和迁移，诱导成纤维细胞增殖，参与血管和气道重塑^[23]。bFGF 通过自分泌的形式诱导 VEGF 产生，与 VEGF 协同作用促进平滑肌细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞增殖分化，其表达水平与 COPD 急性加重期气道重塑程度密切相关，是气道重塑的敏感指标之一^[24]。细胞外基质的过度沉

积在 COPD 气道重塑中亦占有重要地位， α -SMA 可诱导肌成纤维细胞聚集，诱导细胞外基质异常沉积，导致气道平滑肌增厚，在 COPD 患者支气管上皮高表达^[25]；而胶原蛋白(COL I、COL III)是细胞外基质的主要成分。因此，VEGF、bFGF、 α -SMA 及 COL I、COL III 均是反映气道重塑的重要指标。氨茶碱是指南推荐的 COPD 稳定期临床用药，短期服用可有效抑制气道重塑，改善肺功能^[26]，故本研究选择其作为阳性对照药。

本研究结果显示，PM2.5 暴露可显著增加 COPD 大鼠肺间质、血管上皮和肺泡上皮 VEGF、bFGF、 α -SMA、COL I 和 COL III 阳性表达，而补肺益肾组分方可有效防治 PM2.5 暴露加重 COPD 大鼠肺组织病理损伤，降低上述指标水平，且与氨茶碱效果相当，提示补肺益肾组分方可显著抑制 PM2.5 暴露诱导的 COPD 大鼠气道重塑的加重。另外，基质金属蛋白酶(MMPs)通过降解细胞外基质破坏气道和重构气道，金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)是其抑制剂，维持 MMPs/TIMPs 稳态可以延缓改善 COPD 气道重塑^[27]。本研究发现，PM2.5 暴露进一步加重 COPD 大鼠 MMPs/TIMPs 失衡，而补肺益肾组分方通过降低 MMP-9、MMP-12 同时升高 TIMP-1 纠正蛋白酶/抗蛋白酶失衡。以上结果提示，PM2.5 暴露可进一步加重 COPD 大鼠气道重塑，而补肺益肾组分方能够显著缓解此效应。

综上所述，本研究基于 COPD 模型大鼠，采用大气实时浓缩 PM2.5 全身暴露法，观察 PM2.5 暴露对 COPD 肺损伤的影响及中药补肺益肾组分方的保护作用，证实 PM2.5 暴露可显著加重 COPD 大鼠气道重塑，表现在肺泡结构破坏、炎症细胞浸润、细胞外基质异常沉积和蛋白酶/抗蛋白酶失衡等，而补肺益肾组分方可以显著改善以上肺损伤，为 PM2.5 致肺损伤、诱发 COPD 等呼吸系统疾病加重的临床应用提供了科学依据。

参考文献

- [1] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2021 gold report) [EB/OL]. (2020-11-17) [2021-08-24]. <https://goldcopd.org/2021-gold-reports/>.
- [2] FALCON-RODRIGUEZ CI, OSORNIO-VARGAS AR, SADA-OVALLE I, et al. Aeroparticles, composition, and lung diseases [J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 3. doi: 10.3389/fimmu.2016.00003.
- [3] SALVI S. Tobacco smoking and environmental risk factors for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Clin Chest Med*, 2014, 35(1): 17-27.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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 Integr Med*, 2012, 10(9): 1039-1048.
- [8] ZHAO P, LI JS, YANG LP, et al. Integration of transcriptomics, proteomics, metabolomics and systems pharmacology data to reveal the therapeutic mechanism underlying Chinese herbal Bufe Yishen formula for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5247-5257.
- [9] 王晶, 李亚, 李建生, 等. 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 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(5): 415-421.
- [10] LI JS, LIU XF, DONG HR, et al. Effective-constituent compatibility-based analysis of Bufe Yishen formula, a traditional herbal compound as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Integr Med*, 2020, 18(4): 351-362.
- [11] LI JS, MA JD, TIAN YG, et al. Effective-component compatibility of Bufe Yishen formula II inhibits mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease rats by regulating EGFR/PI3K/ mTOR signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112796. doi: 10.1016/j.jep.2020.112796.
- [12] LI JS, XIE Y, ZHAO P, et al. A chinese herbal formula ameliorates COPD by inhibiting the inflammatory response via downregulation of p65, JNK, and p38 [J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153475. doi: 10.1016/j.phymed.2021.153475.
- [13] LI Y, LI SY, LI JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(10): 1752-1760.
- [14] WANG J, LI Y, ZHAO P, et al. Exposure to air pollution exacerbates inflammation in rats with preexisting COPD [J]. *Mediators Inflamm*, 2020: 4260204. doi: 10.1155/2020/4260204.
- [15] 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.
- [16] GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10159): 1736-1788.
- [17] Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). GBD Compare [EB/OL]. (2020-10) [2021-08-24]. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>.
- [18] ABBEY DE, BURCHETTE RJ, KNUTSEN SF, et al. Long-term particulate and other air pollutants and lung function in nonsmokers [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(1): 289-298.
- [19] AMARAL AFS, PATEL J, KATO BS, et al. Airflow obstruction and use of solid fuels for cooking or heating: BOLD results [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(5): 595-610.
- [20] SINT T, DONOHUE JF, GHIO AJ. Ambient air pollution particles and the acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Inhal Toxicol*, 2008, 20(1): 25-29.
- [21] HIROTA N, MARTIN JG. Mechanisms of airway remodeling [J]. *Chest*, 2013, 144(3): 1026-1032.
- [22] JONES RL, NOBLE PB, ELLIOT JG, et al. Airway remodelling in COPD: It's not asthma ! [J]. *Respirology*, 2016, 21(8): 1347-1356.
- [23] BAKAKOS P, PATENTALAKIS G, PAPI A. Vascular biomarkers in asthma and COPD [J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(14): 1599-1609.
- [24] PAVLISA G, PAVLISA G, KUSEC V, et al. Serum lev-

- els of VEGF and bFGF in hypoxic patients with exacerbated COPD [J]. Eur Cytokine Netw, 2010, 21 (2): 92-98.
- [25] LÖFDAHL M, KAARTEENAHÖ R, LAPPI-BLANCO E, et al. Tenascin-C and alpha-smooth muscle actin positive cells are increased in the large airways in patients with COPD [J]. Respir Res, 2011, 12(1): 48.
- [26] CAZZOLA M, CALZETTA L, BARNES PJ, et al. Efficacy and safety profile of xanthines in COPD: a network meta-analysis [J]. Eur Respir Rev, 2018, 27 (148): 180010.
- [27] GRZELA K, LITWINIUK M, ZAGORSKA W, et al. Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma: the Role of Matrix Metalloproteinase-9 [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2016, 64(1): 47-55.

Effect of PM2. 5 on the Airway Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats and the Protective Effect of the *Effective-component Compatibility of Bufei Yishen Formula* (补肺益肾组分方)

WANG Jing¹, LI Ya¹, LI Jiansheng¹, ZHAO Peng¹, TIAN Yange¹, LIU Xuefang¹, HE Huihui¹, JIA Rui¹, ZHANG Caili²

1. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine Prevention and Treatment of Respiratory Diseases by Henan and Education Ministry of P. R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046; 2. Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effect of PM2. 5 exposure on the airway remodeling of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model rats and the protective effect as well as the possible mechanism of the *effective-component compatibility of Bufei Yishen Formula* (补肺益肾组分方, ECC-BYF). **Methods** A total of 72 SD rats were randomized into control group, PM2. 5 group, COPD group, PM2. 5+COPD group, ECC-BYF group, and aminophylline group, with 12 rats in each group. The COPD rat model was prepared in all groups except for the control group and PM2. 5 group by using repeated cigarette smoke inhalation and bacterial infection during week 1 to 8; then rats in all groups except for the control group and COPD group were exposed to real-time atmospheric concentrated PM2. 5 during week 9 to 16. Meanwhile, rats in the ECC-BYF group and aminophylline group were given ECC-BYF (6. 48 mg/kg·d) and aminophylline (54 mg/kg·d) by gavage, respectively, while rats in other groups were given normal saline (1. 5 ml for female rat, 2 ml for male rat) once daily from week 9 to 16. Animals were sacrificed within 24 hours of the last PM2. 5 exposure. The histomorphological changes and ultrastructure of lung tissue were observed. The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I (COL I) and collagen III (COL III) in lung tissues were detected by immunohistochemistry, and the levels of matrix metalloproteinases (MMP)-9, MMP-12, and metalloproteinase-inhibitor (TIMP)-1 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the control group, lung tissues derived from rats in PM2. 5 group, COPD group, and PM2. 5+COPD group showed marked alveolar and bronchial wall thickness, airway narrowing, vascular hyperplasia, inflammatory cells infiltration, and disordered structure of type II alveolar epithelium, and more severe changes were seen in PM2. 5+COPD group; compared with the PM2. 5+COPD group, more improvement on the above mentioned lung tissue outcomes were shown in the ECC-BYF group and aminophylline group. Compared with the control group, there were increased positive expressions of bFGF, VEGF, α -SMA and COL I and COL III, elevated MMP-9 and MMP-12 in BALF, as well as decreased TIMP-1 in the PM2. 5 group, COPD group, and PM2. 5+COPD group ($P<0. 05$ or $P<0. 01$); compared with the PM2. 5 group or the COPD group, there were increased bFGF, VEGF, α -SMA, COL I, COL III and MMP-9, MMP-12, and decreased TIMP-1 ($P<0. 05$ or $P<0. 01$) PM2. 5+COPD group; compared with the PM2. 5+COPD group, the ECC-BYF group and aminophylline group have significantly decreased bFGF, VEGF, α -SMA, COL I, MMP-9, MMP-12, increased TIMP-1, and lowered COL III ($P<0. 05$ or $P<0. 01$). **Conclusion** PM2. 5 exposure markedly aggravates the airway remodeling in rats with preexisting COPD, while ECC-BYF could alleviate the airway remodeling progression of COPD rats caused by PM2. 5 exposure; the mechanism may be related to the inhibition of collagen deposition, and the improvement of protease/anti-protease imbalance.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; *Bufei Yishen Formula* (补肺益肾方); PM2. 5; airway remodeling
(收稿日期: 2021-06-24; 修回日期: 2021-08-28)

[编辑: 王利芬]