

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.01.012

升阳益胃汤对慢性阻塞性肺疾病肺脾气虚证模型大鼠组织病理学及血清炎症因子、外周血 Th17/Treg 平衡的影响

田津[✉], 叶佐玉, 付丹丹, 何新秒

贵州中医药大学第二附属医院, 贵州省贵阳市云岩区飞山街 32 号, 550002

[摘要] **目的** 探讨升阳益胃汤治疗慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 肺脾气虚证的可能作用机制。**方法** 将 84 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、瑞巴派特组、地塞米松组和升阳益胃汤高、中、低剂量组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用香烟烟熏+脂多糖气管内滴注+大黄混悬液灌胃的方法建立 COPD 肺脾气虚证大鼠模型, 共计造模 28 天。在造模第 15 天开始, 升阳益胃汤高、中、低剂量组大鼠分别给予升阳益胃汤 24.930、12.465、6.233 g/(kg·d) 灌胃, 地塞米松组给予醋酸地塞米松片溶液 0.0675 mg/(kg·d) 灌胃, 瑞巴派特组给予瑞巴派特片溶液 9 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组、模型组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃, 各组均每日灌胃 1 次, 连续 14 天。给药结束后采用 HE 染色观察大鼠肺、气管、胃、小肠组织的病理变化; 流式细胞术检测外周血辅助性 T 细胞 17 (Th17)、调节性 T 细胞 (Treg) 水平, 计算 Th17/Treg 值; 采用 ELISA 法检测大鼠肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 及血清中二胺氧化酶 (DAO)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 10 (IL-10)、白细胞介素 17 (IL-17)、转化生长因子 β (TGF- β) 水平; 实时荧光定量 PCR 测定肺组织叉状头/翅膀状螺旋转录因子 (FoxP3) mRNA、维甲酸相关核孤儿受体 γ (ROR γ t) mRNA 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠肺组织肺泡结构不完整并有大量炎症细胞浸润, 气管及胃肠黏膜均有损伤, Th17、Th17/Treg 值、MPO、DAO、IL-6、IL-17、TGF- β 水平及 ROR γ t mRNA 升高, Treg、IL-10 水平、FoxP3 mRNA 降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 升阳益胃汤高剂量组可明显改善肺、气管、胃、小肠组织病理损伤, 而地塞米松组仅能改善肺和气管组织病理损伤, 瑞巴派特组仅能改善胃肠组织病理损伤; 除地塞米松组 FoxP3 mRNA 表达无差异外, 升阳益胃汤高剂量组及地塞米松组、瑞巴派特组 Th17、Th17/Treg 值、MPO、DAO、IL-6、IL-17、TGF- β 水平及 ROR γ t mRNA 降低, Treg、IL-10 水平及 FoxP3 mRNA 升高 ($P<0.05$)。升阳益胃汤高剂量组较升阳益胃汤中、低剂量组更能降低 Th17、Th17/Treg 值及肺组织 MPO 和血清炎症因子水平, 改善 ROR γ t、FoxP3 mRNA 表达 ($P<0.05$)。**结论** 升阳益胃汤治疗 COPD 肺脾气虚证的作用机制可能与同时改善肺、气管、胃、小肠病理损伤, 调控 Th17/Treg 平衡, 降低相关炎症因子水平有关。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 肺脾气虚证; 免疫平衡; 升阳益胃汤; 炎症因子

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种常见的以持续性呼吸系统症状和气流受限为特征的疾病^[1]。目前研究证实, COPD 的发生发展与免疫失衡密切相关, 而辅

助性 T 细胞/调节性 T 细胞 (Th17/Treg) 的失衡在其中起着重要作用^[2]。COPD 属于中医学“肺胀”范畴, 是由于慢性肺系疾病日久导致肺脾肾虚损, 形成痰、饮、瘀等病理产物所致^[3]。虚实夹杂、正虚积损为 COPD 的主要病机, 其中肺脾气虚贯穿肺胀的全过程^[4], 且肺脾气虚证是肺胀的常见证型^[5]。升阳益胃汤首载于李杲《内外伤辨惑论》, 是肺脾同治的经典代表方剂。目前, 关于升阳益胃汤有效

基金项目: 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究专项 (QZY-2021-110)

✉ 通讯作者: 995022819@qq.com, 18608505063

治疗 COPD 的临床观察文献^[6-8]较多,但其作用机制研究尚欠缺。本研究从免疫失衡角度观察升阳益胃汤对 COPD 肺脾气虚证模型大鼠肺组织、胃肠组织病理改变的影响并探讨其可能的作用机制。本实验方案经贵州中医药大学动物实验中心批准(伦理批准号:20210059)。

1 材料及方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 84 只,体质量(200±20)g,4~5 周龄,购于湖南省长沙市天勤生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0014。饲料均为普通级饲料,饲养温度 25℃、湿度 80%,自由进食饮水。

1.2 药物

升阳益胃汤组成:黄芪 30 g,法半夏 15 g,人参 15 g,炙甘草 15 g,独活 9 g,防风 9 g,白芍 9 g,羌活 9 g,陈皮 6 g,茯苓 5 g,北柴胡 5 g,泽泻 5 g,白术 5 g,黄连 1.5 g。饮片煎煮前加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,按常规煎药法煎煮 2 次,每次 30 min,过滤药液并浓缩至 1 ml 药液含生药 2 g,经高压灭菌冷却,4℃冰箱保存备用。大黄 1000 g(同济堂中药智能免煎颗粒剂),按药物:水=1:1 方法配置成混悬液,浓度为 1 g/ml。醋酸地塞米松片(新乡市常乐制药有限公司,批号:1907066,0.75 mg/片),配置成浓度为 0.00675 g/ml 溶液。瑞巴派特片(浙江远力健药业有限责任公司,批号:21111402,0.1 g/片),配置成浓度为 0.009 g/ml 溶液。

1.3 主要试剂及仪器

遵义牌香烟(焦油量 10 mg,烟气烟碱量 0.8 mg,烟气一氧化碳量 12 mg,批号:208041899891607),贵州中烟工业有限责任公司;脂多糖(LPS,批号:0000097034),上海尤宁维生物科技股份有限公司;HE 染色液(批号:H8070),北京赛因坦科技有限公司;髓过氧化物酶(MPO,批号:R4G85ERJ3C)、二胺氧化酶(DAO,批号:20210320)试剂盒,钰博生物科技有限公司;白细胞介素 6(IL-6,批号:70-EK306/3-48)、白细胞介素 10(IL-10,货号:EK0418)、白细胞介素 17(IL-17,批号:A382110145)、转化生长因子 β (TGF- β ,货号:20r6523)ELISA 试剂盒,上海江莱生物科技有限公司;SYBRGreen PCR 试剂盒(货号:F-415XL)、逆转录试剂盒(货号:K1622),

Thermo 公司;水合氯醛(批号:EB05980)、多聚甲醛(货号:ST1127),上海士锋生物科技有限公司;红细胞裂解液(货号:349202),Becton Dickinson 公司。

多功能酶标仪(型号:Thermo Multiskan™ FC)、Real-time 检测仪(型号:ABI-7500),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;台式离心机(型号:NX-1),北京鼎昊源科技有限公司;电热恒温干燥箱(型号:GZX-DH-50x55),上海跃进医疗器械厂;组织脱水机(型号:JJ-12J),武汉俊杰电子有限公司;电子分析天平(型号:FA2004),上海舜宇恒平科学仪器有限公司;组织切片机(型号:RM2235),北京昊诺斯科技有限公司;低温冷冻离心机(型号:5417R),德国艾本德股份公司;光学显微镜(型号:XDS-1A)、倒置显微镜(型号:IX71),OLYMPUS 公司;流式细胞仪(型号:beckman-coulter CytoFLEX),BD-FACSVerser 公司。

1.4 分组及造模

将 84 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周以后,采用随机数字表法分为空白组、模型组、瑞巴派特组、地塞米松组和升阳益胃汤高、中、低剂量组,每组 12 只。除空白组外,其余各组大鼠采用香烟烟熏+LPS 气管内滴注^[9]的方法建立 COPD 大鼠模型:大鼠在封闭的笼子(1 m×1 m×1 m)里进行每日 1 h 10 根香烟烟熏,连续 28 天;在造模的第 1 天及第 14 天予 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔麻醉,将麻醉后的大鼠呈仰卧位的姿势固定于鼠板,照射大鼠的喉部,充分暴露声门,将一次性的套针在光源的照射下迅速插入大鼠气管内,拔出套管内的钢芯,以棉丝放于套针外观察是否随大鼠呼吸有规律地波动,插管成功后予 1 ml 注射器先抽取 0.3 ml 的空气再抽取 0.2 ml(0.2 mg) LPS 推入气管内,完成后将大鼠直立反复旋转摇晃 1~2 min,使 LPS 充分均匀分布于双肺。空白组用一次性气管插管法予 0.2 ml 生理盐水支气管滴药。从熏烟后第 8 天开始,除空白组外其他各组大鼠以苦寒泻下法^[10]建立肺脾气虚证模型,即给予大黄混悬液 1 ml/100 g 灌胃,每日 1 次,连续给药 8 天,空白组大鼠给予生理盐水 1 ml/100 g 灌胃。

1.5 给药方法

造模第 15 天,参照大鼠体表面积与人体体表面积的换算公式^[11]换算给药剂量,升阳益胃汤中剂量组为人临床等效剂量。升阳益胃汤高、中、低剂量组大鼠分别给予升阳益胃汤 24.930、12.465、

6. 233 g/(kg·d) 灌胃, 地塞米松组给予醋酸地塞米松片溶液 0.0675 mg/(kg·d) 灌胃, 瑞巴派特组给予瑞巴派特片溶液 9 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组、模型组给予生理盐水 10 ml/(kg·d) 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 连续 14 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 大鼠的一般情况 实验期间采用 24 h 活动录像观察各组大鼠精神活动、皮毛光泽、饮食及大小便情况, 并记录各组大鼠体质量。

1.6.2 肺、气管、胃、小肠组织病理观察 实验第 31 天将大鼠禁食 24 h, 然后予 10% 水合氯醛腹腔麻醉 (0.3 ml/100 g) 进行腹主动脉取血, 摘取左肺上叶、气管、胃、小肠组织, 经 4% 的多聚甲醛固定 24 h 脱水, 将组织透明、浸蜡、包埋、切片, HE 染色, 中性树胶封固, 晾干后在光学显微镜下进行病理观察。

1.6.3 外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 值 收集大鼠外周血于抗凝管中, 加入 4 倍体积的红细胞裂解液充分裂解后, 于离心机 1000 r/min (离心半径 4.5 cm)、37 °C 离心 8 min; 去上清, 用 PBS 清洗细胞沉淀 3 次; 以 1:100 的稀释比例孵育抗体 30 min; 调整细胞密度, 过筛网, 采用流式细胞术测定 Th17、Treg 水平, 计算 Th17/Treg 值。具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.6.4 血清炎症因子及肺组织 MPO 水平 大鼠腹主动脉取血, 于离心机 4000 r/min (离心半径 4.5 cm)、37 °C 离心 10 min, 取上清备用。ELISA 法检测大鼠血清 DAO、IL-6、IL-10、IL-17、TGF- β 水平。取出右肺上叶组织放于冻存管内置于冰上待测, 检测肺组织 MPO 水平。具体检测方法按照试剂盒说明书进行。

1.6.5 肺组织叉状头/翅膀状螺旋转录因子(FoxP3)、维甲酸相关核孤儿受体 γ (ROR γ t) mRNA 表达 采用实时荧光定量 PCR 法测定。摘取大鼠右肺下叶组织充分研磨, 分别加入 Trizol 裂解液裂解细胞提取 RNA, 逆转录 cDNA, 逆转录条件: 42 °C 40 min; 85 °C 5 min。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增, 扩增体系如下: SYBRGreen Mix 10 μ l, 上游引物 0.4 μ l, 下游引物 0.4 μ l, ddH₂O 7.2 μ l, cDNA 模板 2 μ l, 总体积 20 μ l。扩增条件: 94 °C 10 min, (94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s) 40 个循环。数据采用 ABI Prism 7500 SDS 软件分析。引物由无锡善禾生物医药技术有限公司设计, GAPDH: 上游 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC, 下游 TTTGAGGGT-

GCAGCGAACTT, 252 bp; FoxP3: 上游 TCTCAAGCACTGCCAAGC, 下游 TCTCCGCACAGCAAACAA, 289 bp; ROR γ t: 上游 AAGGCAAATACGGTGGTGT, 下游 GTAGAGGGCAATCTCATCC, 125 bp。采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析目的基因的相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件与 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析与制图。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, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神良好, 皮毛光泽, 活动自如, 饮食正常、每日约进食 50 g, 大便质软成形、每日 1 或 2 次, 小便每日 3 或 4 次。模型组大鼠精神倦怠, 腹背部部分皮毛色泽黯淡发黄, 活动减少或喜静卧, 进食量每日约 15 g, 大便多不成形或成稀糊状、每日 3~5 次, 小便量多、每日 7 或 8 次, 易尿失禁。升阳益胃汤低剂量组大鼠精神欠佳, 皮毛色泽黯淡, 活动减少, 进食量每日约 20 g, 稀便较多、每日 3~5 次, 小便每日 6 或 7 次。升阳益胃汤中剂量组大鼠精神欠佳, 皮毛稍有色泽, 活动减少, 进食量每日 30~35 g, 大便质软稍成形或伴有稀便、每日 2~4 次, 小便每日 5 或 6 次。升阳益胃汤高剂量组大鼠精神稍倦怠, 皮毛稍有色泽, 活动可, 进食量每日 35~40 g, 大便质软成形、每日 1 或 2 次, 小便每日 3 或 4 次。地塞米松组大鼠精神倦怠, 皮毛色泽黯淡, 活动减少, 进食量每日约 20 g, 大便时质软、时稀便、每日 2 或 3 次, 小便每日 6 或 7 次。瑞巴派特组大鼠精神稍倦怠, 皮毛稍有色泽, 活动尚可, 进食量每日 40~45 g, 大便质软成形、每日 1 或 2 次, 小便每日 3 或 4 次。表 1 示, 各组大鼠体质量差异无统计学意义 (P>0.05)。

表 1 各组大鼠体质量比较 (g, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	体质量
空白组	12	344.3 $\pm$ 10.97
模型组	12	358.7 $\pm$ 8.02
地塞米松组	12	338.7 $\pm$ 15.28
瑞巴派特组	12	374.7 $\pm$ 9.29
升阳益胃汤低剂量组	12	334.0 $\pm$ 9.85
升阳益胃汤中剂量组	12	333.7 $\pm$ 17.62
升阳益胃汤高剂量组	12	339.0 $\pm$ 16.09

2.2 各组大鼠肺组织病理学形态比较

图 1 示, 空白组大鼠肺组织肺泡结构完整, 肺泡壁正常, 血管结构正常, 肺泡腔和肺间质无明显炎症细胞渗出, 无明显红细胞渗出; 模型组肺泡结构不完整, 肺泡壁增厚严重, 血管内有淤血, 部分血管伴有粉染蛋白样物质, 肺泡腔和肺间质有大量炎症细胞渗出, 有大量红细胞渗出; 地塞米松组肺泡结构完整, 肺泡壁增厚, 血管内有淤血, 部分血管伴有粉染蛋白样物质, 肺泡腔和肺间质有大量实质结构, 无明显红细胞渗出; 瑞巴派特组肺泡结构不完整, 肺泡壁增宽, 极少数血管中含有淤血, 肺泡腔和肺间质有大量红细胞渗出; 升阳益胃汤低剂量组肺泡结构不完整, 部分肺泡壁增厚严重, 血管内有淤血, 部分血管伴有粉染蛋白样物质, 肺泡腔和肺间质有大量炎症细胞渗出, 无明显红细胞渗出; 升阳益胃汤中剂量组肺泡结构不完整, 肺泡壁增厚严重, 血管内有淤血, 少量血管伴有粉染蛋白样物质, 肺泡腔和肺间质有部分炎症细胞渗出, 有少量红细胞渗出; 升阳益胃汤高剂量组肺泡结构不完整, 肺泡壁增厚严重, 少量血管内有淤血, 少量血管伴有粉染蛋白样物质, 肺泡腔和肺间质有部分炎症细胞渗出, 有大量红细胞渗出。

2.3 各组大鼠气管组织病理学形态比较

图 2 示, 空白组大鼠气管组织软骨结构正常, 黏膜绒毛排列整齐, 无明显上皮细胞脱落; 模型组软骨结构正常, 黏膜绒毛排列疏松, 有少量上皮细胞脱落; 地塞米松组软骨结构正常, 黏膜绒毛基层细胞增生严重, 无明显上皮细胞脱落; 瑞巴派特组

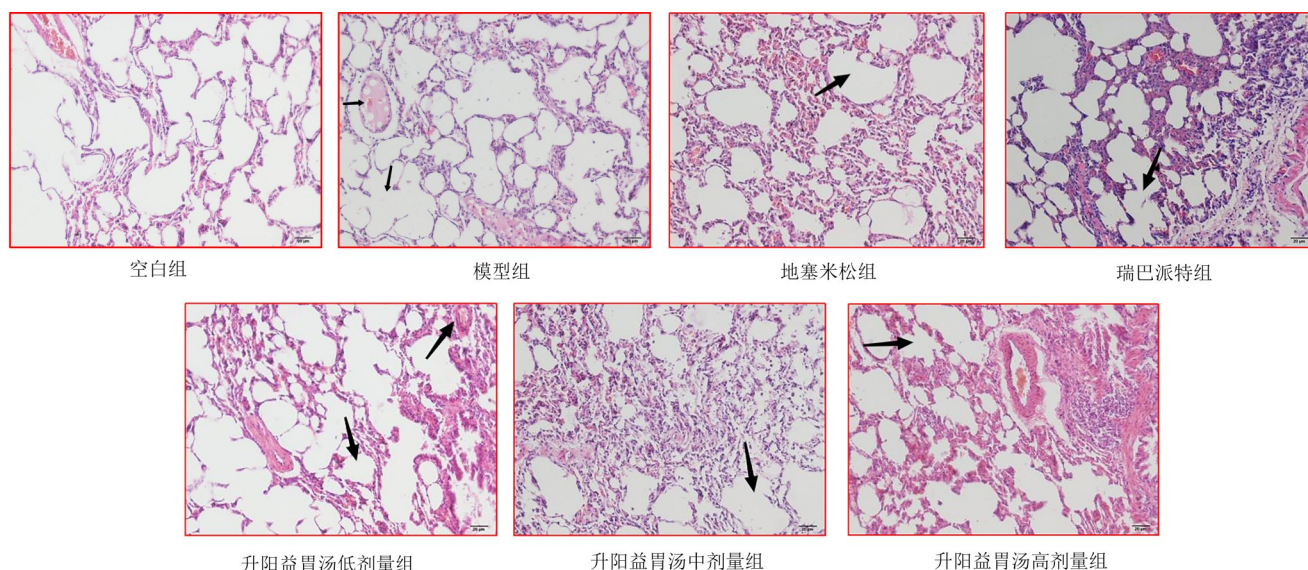
气管的固有层中可见淋巴细胞, 有明显的红细胞, 杯状细胞明显增多; 升阳益胃汤低剂量组软骨结构正常, 黏膜绒毛排列较疏松, 有少量上皮细胞脱落; 升阳益胃汤中剂量组软骨结构正常, 黏膜绒毛排列较疏松, 绒毛基层细胞增生略严重, 有少量上皮细胞脱落; 升阳益胃汤高剂量组软骨结构正常, 黏膜绒毛排列较疏松, 黏膜绒毛基层细胞增生严重, 无明显上皮细胞脱落。

2.4 各组大鼠胃组织病理学形态比较

图 3 示, 空白组大鼠胃黏膜层胃腺排列整齐, 无明显红细胞渗出, 肌层排列整齐紧密; 模型组胃黏膜层胃腺排列紊乱, 基质细胞增生严重, 有少量红细胞渗出, 肌层排列略疏松; 地塞米松组胃黏膜层胃腺排列略紊乱, 基质细胞少量增生, 有极少量红细胞渗出, 肌层排列紧密; 瑞巴派特组胃黏膜层可见明显的红细胞, 胃腺间隙增大、排列疏松; 升阳益胃汤低剂量组胃黏膜层胃腺排列紊乱, 基质细胞增生严重, 有少量红细胞渗出, 肌层排列略疏松; 升阳益胃汤中剂量组胃黏膜层胃腺排列略紊乱, 基质细胞部分增生, 有少量红细胞渗出, 肌层排列略疏松; 升阳益胃汤高剂量组胃黏膜层胃腺排列整齐, 基质细胞无明显增生, 无明显红细胞渗出, 肌层排列紧密。

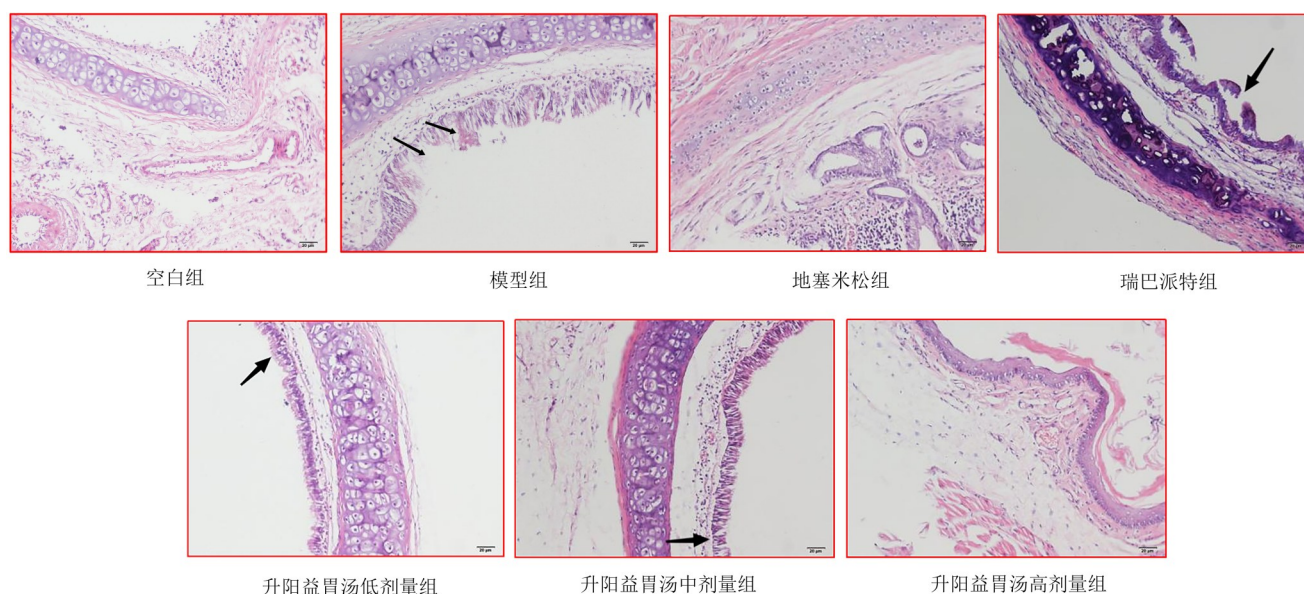
2.5 各组大鼠小肠组织病理学形态比较

图 4 示, 空白组大鼠肠腺数目正常, 黏膜层结构完整, 黏膜下层排列紧密, 未有明显淋巴细胞浸润; 模型组肠腺数目减少, 黏膜上皮细胞脱落严重, 黏膜下层排列疏松, 固有层有明显淋巴细胞浸



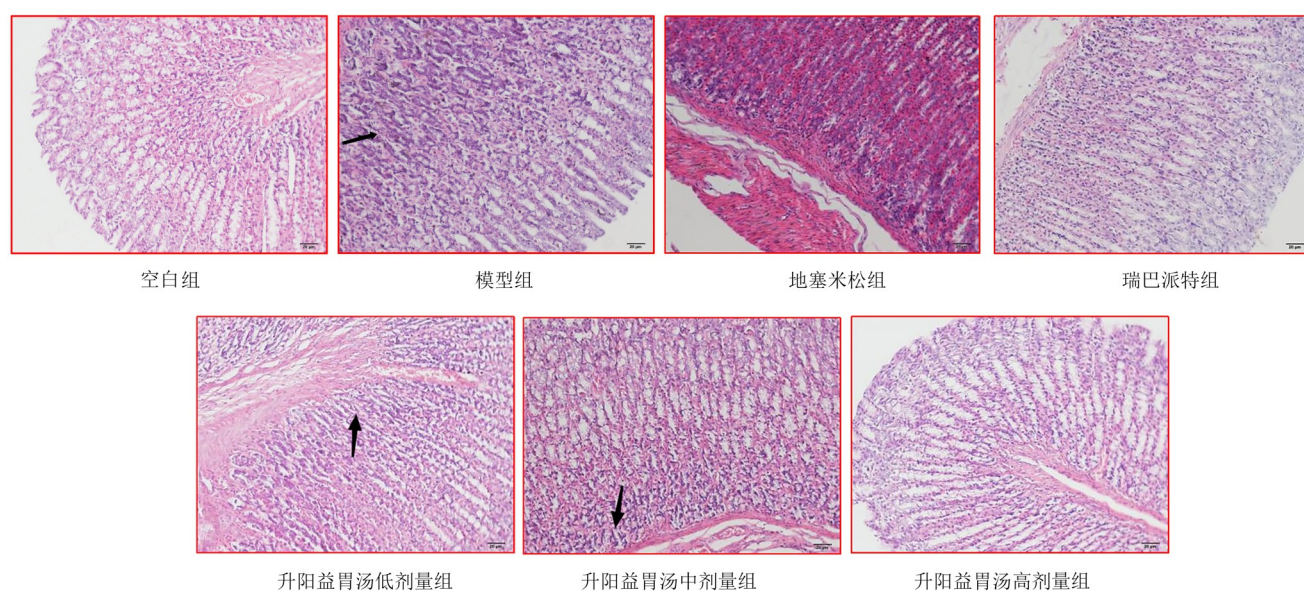
注: 图中黑色箭头指示肺泡结构不完整。

图 1 各组大鼠肺组织病理图 (HE 染色, ×200)



注：图中黑色箭头指示黏膜绒毛排列疏松。

图2 各组大鼠气管组织病理图 (HE 染色, ×200)



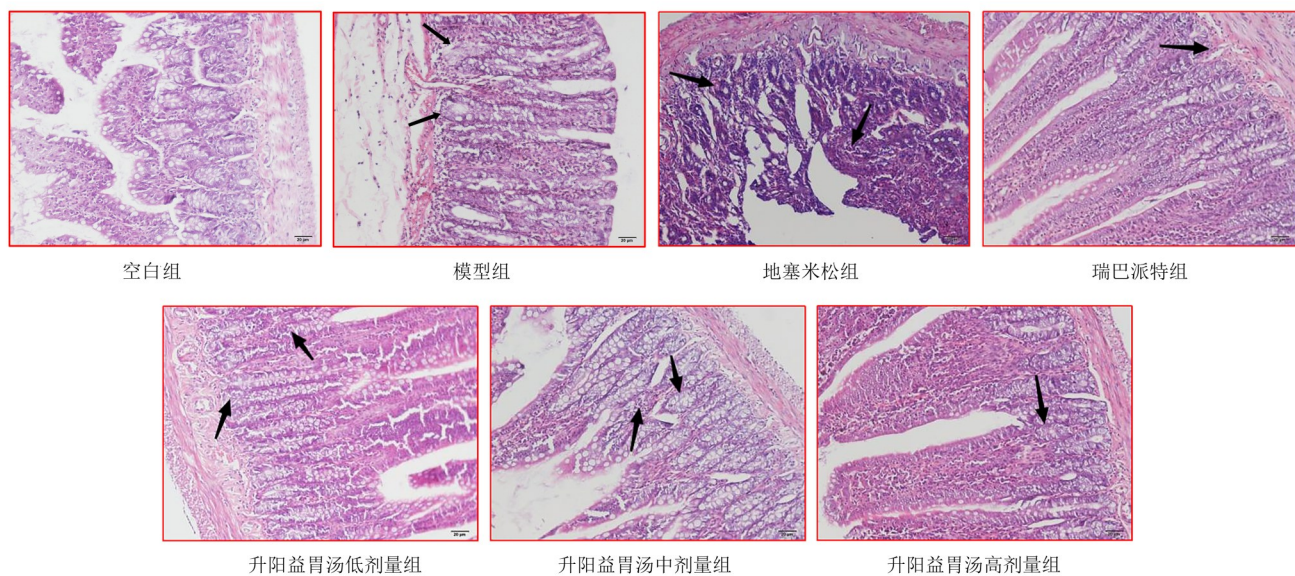
注：图中黑色箭头指示胃腺排列紊乱。

图3 各组大鼠胃组织病理图 (HE 染色, ×200)

润；地塞米松组肠腺数目略减少，黏膜层结构完整，黏膜下层排列略疏松，有少量淋巴细胞浸润；瑞巴派特组肠腺数目减少，黏膜层排列疏松，结构不完整；升阳益胃汤低剂量组肠腺数目减少，黏膜上皮细胞少量脱落，黏膜下层排列疏松，固有层有明显淋巴细胞浸润；升阳益胃汤中剂量组肠腺数目略减少，黏膜上皮细胞少量脱落，黏膜下层排列较疏松，固有层有明显淋巴细胞浸润；升阳益胃汤高剂量组肠腺数目略减少，黏膜上皮细胞少量脱落，黏膜下层排列较疏松，固有层有少量淋巴细胞浸润。

2.6 各组大鼠外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 值比较

表 2 示，与空白组比较，模型组大鼠外周血 Th17 水平及 Th17/Treg 值升高，Treg 水平降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各药物干预组 Th17 水平及 Th17/Treg 值降低，Treg 水平升高 ($P < 0.05$)；与地塞米松组比较，除升阳益胃汤中剂量组 Treg 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外，升阳益胃汤各剂量组 Th17 水平及 Th17/Treg 值升高，Treg 水平降低 ($P < 0.05$)；与瑞巴派特组比较，升阳益胃汤高剂量组 Th17 水平及 Th17/Treg 值降低 ($P <$



注：图中黑色箭头指示肠腺数目减少。

图4 各组大鼠小肠组织病理图（HE 染色，×200）

表2 各组大鼠外周血Th17、Treg水平及Th17/Treg值比较 (% , $\bar{x}\pm s$)				
组别	鼠数	Th17	Treg	Th17/Treg
空白组	12	0.47±0.13	19.20±0.35	0.02±0.0068
模型组	12	5.81±0.19 ^{a)}	12.85±0.64 ^{a)}	0.45±0.0274 ^{a)}
地塞米松组	12	2.50±0.15 ^{b)}	16.02±0.27 ^{b)}	0.16±0.0099 ^{b)}
瑞巴派特组	12	4.97±0.13 ^{b)}	15.54±0.40 ^{b)}	0.32±0.0105 ^{b)}
升阳益胃汤低剂量组	12	5.28±0.24 ^{b) c)}	15.30±0.31 ^{b) c)}	0.35±0.0189 ^{b) c)}
升阳益胃汤中剂量组	12	4.85±0.25 ^{b) c) e)}	15.80±0.26 ^{b)}	0.31±0.0179 ^{b) c)}
升阳益胃汤高剂量组	12	4.33±0.10 ^{b) c) d) e) f)}	15.44±0.24 ^{b) c)}	0.28±0.0084 ^{b) c) d) e) f)}

注：Th17，辅助性T细胞17；Treg，调节性T细胞。

a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与地塞米松组比较， $P<0.05$ ；d) 与瑞巴派特组比较， $P<0.05$ ；e) 与升阳益胃汤低剂量组比较， $P<0.05$ ；f) 与升阳益胃汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

0.05)；与升阳益胃汤低剂量组比较，升阳益胃汤中、高剂量组Th17水平降低，升阳益胃汤高剂量组Th17/Treg值降低 ($P<0.05$)；与升阳益胃汤中剂量组比较，升阳益胃汤高剂量组Th17水平及Th17/Treg值降低 ($P<0.05$)。

2.7 各组大鼠肺组织MPO及血清炎症因子水平比较

表3示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织MPO及血清DAO、IL-6、IL-17、TGF-β水平升高，血清IL-10水平降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，升阳益胃汤高剂量组、瑞巴派特组及地塞米松组MPO、DAO、IL-6、IL-17、TGF-β水平降低，IL-10水平升高 ($P<0.05$)；升阳益胃汤中剂量组TGF-β、IL-6水平降低，IL-10水平升高 ($P<0.05$)；升阳益胃汤低剂量组仅TGF-β水平降低 ($P<0.05$)。与地塞米松组比较，瑞巴派特组MPO、TGF-β、DAO水平降低 ($P<0.05$)；升阳益胃汤低剂量组

TGF-β、IL-6水平升高，IL-10水平降低 ($P<0.05$)。与升阳益胃汤低剂量组比较，升阳益胃汤中、高剂量组MPO、TGF-β、IL-6水平降低，IL-10水平升高，升阳益胃汤高剂量组DAO水平亦降低 ($P<0.05$)。与升阳益胃汤中剂量组比较，升阳益胃汤高剂量组MPO、IL-6水平降低，IL-10水平升高 ($P<0.05$)。

2.8 各组大鼠肺组织RORγt、FoxP3 mRNA表达比较

表4示，与空白组比较，模型组大鼠肺组织RORγt mRNA表达升高，FoxP3 mRNA表达降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，瑞巴派特组、升阳益胃汤高剂量组FoxP3 mRNA表达升高，各给药组RORγt mRNA表达降低 ($P<0.05$)；与地塞米松组比较，瑞巴派特组和升阳益胃汤高剂量组FoxP3 mRNA表达升高，瑞巴派特组和升阳益胃汤高、中

表 3 各组大鼠肺组织 MPO 及血清炎症因子水平比较

(pg·mg⁻¹, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MPO	TGF- β	IL-17	IL-6	IL-10	DAO
空白组	12	68.94 $\pm$ 5.61	189.60 $\pm$ 22.36	7.84 $\pm$ 1.67	82.94 $\pm$ 11.45	79.16 $\pm$ 10.60	39.80 $\pm$ 7.31
模型组	12	98.45 $\pm$ 7.65 ^{a)}	237.62 $\pm$ 22.36 ^{a)}	15.15 $\pm$ 1.82 ^{a)}	101.63 $\pm$ 9.06 ^{a)}	56.16 $\pm$ 8.05 ^{a)}	57.69 $\pm$ 5.57 ^{a)}
地塞米松组	12	79.27 $\pm$ 8.53 ^{b)}	199.44 $\pm$ 15.77 ^{b)}	13.39 $\pm$ 0.10 ^{b)}	92.87 $\pm$ 8.13 ^{b)}	62.27 $\pm$ 5.43 ^{b)}	46.16 $\pm$ 5.75 ^{b)}
瑞巴派特组	12	74.70 $\pm$ 7.72 ^{b) c)}	195.30 $\pm$ 14.46 ^{b) c)}	14.23 $\pm$ 2.15 ^{b)}	91.80 $\pm$ 10.93 ^{b)}	70.41 $\pm$ 10.75 ^{b)}	44.86 $\pm$ 2.91 ^{b) c)}
升阳益胃汤低剂量组	12	92.54 $\pm$ 6.74	223.56 $\pm$ 21.83 ^{b) c)}	15.15 $\pm$ 1.35	100.71 $\pm$ 7.77 ^{c)}	57.37 $\pm$ 6.88 ^{c)}	49.61 $\pm$ 5.57
升阳益胃汤中剂量组	12	90.77 $\pm$ 9.10 ^{d)}	213.84 $\pm$ 29.35 ^{b) d)}	14.77 $\pm$ 1.58	96.41 $\pm$ 10.41 ^{b) d)}	62.64 $\pm$ 5.71 ^{b) d)}	48.56 $\pm$ 6.43
升阳益胃汤高剂量组	12	79.16 $\pm$ 11.39 ^{b) d) e)}	212.30 $\pm$ 21.08 ^{b) d)}	14.20 $\pm$ 1.34 ^{b)}	93.08 $\pm$ 7.56 ^{b) d) e)}	66.20 $\pm$ 8.50 ^{b) d) e)}	47.93 $\pm$ 2.47 ^{b) d)}

注: MPO, 髓过氧化物酶; TGF- β , 转化生长因子 β ; IL-17, 白细胞介素 17; IL-6, 白细胞介素 6; IL-10, 白细胞介素 10; DAO, 二胺氧化酶。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与地塞米松组比较, $P < 0.05$; d) 与升阳益胃汤低剂量组比较, $P < 0.05$; e) 与升阳益胃汤中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

剂量组 ROR γ t mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与瑞巴派特组比较, 升阳益胃汤低剂量组 FoxP3 mRNA 表达降低、ROR γ t mRNA 表达升高, 升阳益胃汤高剂量组 ROR γ t mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与升阳益胃汤低剂量组比较, 升阳益胃汤中、高剂量组 FoxP3 mRNA 表达升高, ROR γ t mRNA 表达降低 ($P < 0.05$); 与升阳益胃汤中剂量组比较, 升阳益胃汤高剂量组 FoxP3 mRNA 表达升高, ROR γ t mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠肺组织 ROR γ t、FoxP3 mRNA 表达比较(2^{- $\Delta\Delta CT$} , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	FoxP3/ $\times 10^{-3}$	ROR γ t/ $\times 10^{-3}$
空白组	12	1.05 $\pm$ 0.39	1.00 $\pm$ 0.09
模型组	12	0.22 $\pm$ 0.07 ^{a)}	3.21 $\pm$ 0.96 ^{a)}
地塞米松组	12	0.55 $\pm$ 0.12	1.80 $\pm$ 0.29 ^{b)}
瑞巴派特组	12	0.72 $\pm$ 0.25 ^{b) c)}	1.43 $\pm$ 0.17 ^{b) c)}
升阳益胃汤低剂量组	12	0.39 $\pm$ 0.09 ^{d)}	1.74 $\pm$ 0.25 ^{b) d)}
升阳益胃汤中剂量组	12	0.44 $\pm$ 0.19 ^{e)}	1.49 $\pm$ 0.22 ^{b) c) e)}
升阳益胃汤高剂量组	12	0.63 $\pm$ 0.26 ^{b) c) e) f)}	1.25 $\pm$ 0.16 ^{b) c) d) e) f)}

注: FoxP3, 叉状头/翅膀状螺旋转录因子; ROR γ t, 维甲酸相关核孤儿受体 γ 。

a) 与空白组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与地塞米松组比较, $P < 0.05$; d) 与瑞巴派特组比较, $P < 0.05$; e) 与升阳益胃汤低剂量组比较, $P < 0.05$; f) 与升阳益胃汤中剂量组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺胀是较为复杂的肺系疾病, 其虚实夹杂, 病情反复, 预后不佳, 治则常以扶正与祛邪兼顾^[3]。《素问·阴阳应象大论篇》曰: “脾生肉, 肉生肺。”脾和肺的关系, 主要表现为气和水的关系, 二者在生理病理上均密不可分^[12]。孙思邈《备急千金要方》曰: “凡脾劳病者, 补肺气以益之。”李杲认为卫气为元气的组成部分, 元气盛则卫气充, 故健脾

即可补肺, 其创立的升阳益胃汤即为治疗肺脾虚证的代表方剂^[13-14]。升阳益胃汤扶正与祛邪兼顾, 方中陈皮、茯苓、法半夏、炙甘草健脾化痰, 黄芪、白术、防风、人参益气固卫、健脾扶正, 羌活、独活、柴胡祛风宣肺解表, 黄连使里热得清, 泽泻使湿邪得导, 柴胡加白芍还有升举清阳、疏肝和胃之意。全方寓补于升, 气机升降有序, 肺气得宣, 脾运得健, 清阳得升, 痰湿得祛, 配伍精当巧妙。

研究^[15]显示, COPD 的发生发展与 Th17、Treg 介导的免疫失衡密切相关, Th17 细胞的分化发育与 Treg 细胞分化发育呈相互抑制关系。IL-17 是 Th17 细胞的主要效应因子, ROR- γ t 是其重要的转录因子。IL-17 是由活化的 T 细胞产生的致炎细胞因子, 可以促进 T 细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子如 IL-6、IL-8、TGF- β 等, 从而导致炎症的发生^[16]。Treg 细胞是维持机体免疫耐受的重要因素之一, Treg 细胞主要分泌 IL-10 等发挥免疫负调控作用, 并通过主动调节的方式抑制存在于正常机体内潜在的自身反应性 T 细胞的活化与增殖, 从而调节机体的免疫力, 而 FoxP3 数量减少或功能异常均有可能导致自身免疫病的发生^[16]。MPO 是一种含血红素的过氧化物酶, 主要存在于中性粒细胞中, 是中性粒细胞活化的标志, MPO 参与了 COPD 患者肺动脉高压、肺气肿和小气道重塑等病理改变^[17]。血清 DAO 活性水平可作为反映肠黏膜上皮细胞损伤和肠黏膜屏障破坏的指标^[18]。

本研究选择对控制炎症有明确效果的地塞米松作为抗炎对照药物, 选择对胃肠黏膜有明确修复作用的瑞巴派特作为修复胃肠黏膜对照药物。研究结果显示, 瑞巴派特及升阳益胃汤各剂量均能不同程度改善模型大鼠的一般情况, 且以升阳益胃汤高剂

量效果最好,而地塞米松的改善作用不明显,说明升阳益胃汤和瑞巴派特均可有效改善 COPD 肺脾气虚大鼠的状态。病理结果显示,模型组大鼠肺、气管及胃、肠组织均有较重损伤,而升阳益胃汤可对上述组织有不同程度的改善效果,且升阳益胃汤高剂量组较中、低剂量组更具有保护和修复胃肠黏膜的作用;地塞米松组对肺组织病理炎性损伤有改善,但对胃肠黏膜无修复作用;瑞巴派特组对胃肠黏膜均有修复作用,但对肺组织病理无明显改善。

本研究结果显示,模型组大鼠外周血 Th17 水平升高,其分泌的 IL-6、IL-17、TGF- β 水平及 ROR γ t mRNA 表达均升高,而 Treg 及其分泌的 IL-10 水平、FoxP3 mRNA 表达降低, Th17/Treg 值升高,说明大鼠炎症反应较严重,免疫功能失调。而各给药组大鼠外周血 Th17、Treg 水平及 Th17/Treg 值均较模型组改善,说明各药物均有调节 Th17/Treg 平衡的作用,但调节程度不尽相同。升阳益胃汤各剂量组随着药物剂量的增加,下调 Th17/Treg 值越显著,升阳益胃汤高剂量组在下调 Th17/Treg 值方面优于瑞巴派特组但不如地塞米松组。升阳益胃汤在降低 IL-6 及 ROR γ t mRNA 表达、升高 IL-10 及 FoxP3 mRNA 表达方面亦呈剂量依赖性,说明升阳益胃汤高剂量在改善炎症反应和免疫平衡方面效果最佳。此外,与空白组比较,模型组大鼠 MPO、DAO 水平升高,说明模型大鼠有肺组织病理损伤和肠黏膜屏障损害。升阳益胃汤高剂量组、地塞米松组及瑞巴派特组 DAO 及 MPO 水平均较模型组降低,其中瑞巴派特组降低效果优于地塞米松组,而瑞巴派特组与升阳益胃汤高剂量组两项指标比较差异均无统计学意义,表明各药物均可有效改善肺组织病理及肠黏膜屏障损伤,升阳益胃汤高剂量与瑞巴派特疗效相当。升阳益胃汤低、中剂量组对 MPO 及 DAO 的调控不明显,可能与用药剂量太小有关。

综上,升阳益胃汤可综合改善 COPD 肺脾气虚证大鼠肺、胃、肠炎性损伤,其作用机制可能是通过调节 Th17/Treg 平衡,从而达到改善气道黏膜、肺部炎症的目的。本研究揭示了升阳益胃汤通过修复胃肠黏膜干预 COPD 的可能作用机制,为临床使用升阳益胃汤治疗 COPD 肺脾气虚证提供了实验依据。但本研究采用的干预措施与临床常以中药联合西药吸入疗法控制 COPD 炎症具有一定差异,因此后期拟进行中西医结合相关临床观察,以提高升阳

益胃汤治疗 COPD 疗效评估的客观性。

参考文献

- [1]王蕾,杨汀,王辰,等. 2017 年版慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略解读[J]. 中国临床医生杂志, 2017,45(1):104-108.
- [2]YANG JF, SUNDRUD MS, SKEPNER J, et al. Targeying Th17 cells in autoimmune diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2014,35(10):493-500.
- [3]田德禄,蔡淦. 中医内科学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2013:103-104.
- [4]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.
- [5]田津. 吴光炯教授肺脾同治学术思想的理论依据与实践[J]. 中国临床医生杂志, 2015,43(8):77-79.
- [6]张立山,李德莹. 升阳益胃汤治疗呼吸疾病举隅[J]. 中华中医药杂志, 2017,32(8):3540-3542.
- [7]袁沙沙,苗青. 升阳益胃汤治疗呼吸系统疾病验案[J]. 山东中医杂志, 2017,36(6):520-521.
- [8]汤冬亮,孙朋,王维,等. 升阳益胃汤在肺系病中的应用[J]. 中医药通报, 2017,16(5):64-66.
- [9]宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8):556-557.
- [10]张伟,宫静,张靖轩,等. 一种肺脾两虚型慢阻肺动物模型的建立[J]. 辽宁中医杂志, 2009,36(1):142-143.
- [11]赵伟,孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息, 2010(5):52-53.
- [12]张召杨,孙增涛,刘南飞,等. 肺脾相关理论及临床应用研究[J]. 陕西中医, 2020,41(11):1623-1626, 1631.
- [13]徐海荣,段永强,梁玉杰,等. 李东垣从脾胃论治五脏病遣方用药规律及其临床意义[J]. 中医杂志, 2015, 56(12):1011-1014.
- [14]田津. 基于肺脾同治探讨升阳益胃汤在肺系疾病中的应用[J]. 医药界, 2020(5):172.
- [15]王华英,翁跃颂,应华娟,等. 慢性阻塞性肺疾病患者 Th17/Treg 细胞失衡与肺功能相关性研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2014,34(7):527-533.
- [16]YU Y, ZHAO L, XIE Y, et al. Th1/Th17 cytokine profiles are associated with disease severity and exacerbation frequency in COPD patients[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020,15:1287-1299. doi: 10. 2147/COPD. S252097.
- [17]李晶,张固琴,王丽慧. 慢性阻塞性肺疾病患者呼出气冷凝液中髓过氧化物酶的检测及其意义[J]. 国际呼吸杂志, 2014,34(13):977-979.
- [18]汤菲,徐海涛,贾克然. 二胺氧化酶的临床应用[J]. 临床误诊误治, 2014,27(8):112-115.

Effect of *Shengyang Yiwei Decoction* (升阳益胃汤) on Histopathology, Serum Inflammatory Factors and Peripheral Blood Th17/Treg Balance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats with Lung-spleen *Qi* Deficiency Syndrome

TIAN Jin, YE Zuoyu, FU Dandan, HE Xinmiao

Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550000

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of *Shengyang Yiwei Decoction* (升阳益胃汤, SYD) in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) with lung-spleen *qi* deficiency syndrome. **Methods** Eighty-four SD rats were randomly divided into 7 groups, namely blank group, model group, rebamipide group, dexamethasone group, high-, medium- and low-dose SYD group, with 12 rats in each group. Except for the blank control group, rats were given cigarette smoke plus intratracheal instillation of lipopolysaccharide plus intragastric administration of Dahuang (*Radix et Rhizoma Rhei*) suspension to establish the model of COPD with lung-spleen *qi* deficiency syndrome for a total of 28 days. Since the 15th day of modeling, the rats in the high-, medium- and low-dose SYD groups were given 24.930, 12.465, and 6.233 g/(kg·d) of SYD by gavage, respectively. The rats in the dexamethasone group were given 0.0675 mg/(kg·d) of dexamethasone acetate tablet solution, while those in the rebamipide group were given 9 mg/(kg·d) of rebamipide tablet solution by gavage. The blank group and model group were given 10 ml/(kg·d) of normal saline by gavage. All groups were administered once a day for 14 consecutive days. After treatment, the pathological changes of lung, trachea, and gastrointestinal tissues were observed by HE staining. The levels of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in the peripheral blood were detected by flow cytometry, and the Th17/Treg ratio was calculated. The changes of diamine oxidase (DAO), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 17 (IL-17) and transforming growth factor beta (TGF- β) in serum and myeloperoxidase (MPO) in lung tissue of rats were detected by ELISA. The expression of forkhead/winged helix transcription factor (FoxP3) mRNA and retinoic acid-related nuclear orphan receptor γ (ROR γ t) mRNA in lung tissue were determined by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared to those in the blank group, the alveolar structure of the rats in the model group was incomplete with a large number of inflammatory cells infiltration, and damaged airway and gastrointestinal mucosa; the values of Th17, Th17/Treg ratio, MPO, DAO, IL-6, IL-17, TGF- β levels and ROR γ t mRNA in the model group significantly increased, while the levels of Treg, IL-10 and FoxP3 mRNA were reduced ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the histopathological damage of the lung, trachea, and gastrointestinal tissues were improved in the high-dose SYD group, while only the damage of lung and trachea in the dexamethasone group, and the damage of gastrointestinal tissues in the rebamipide group improved; the values of Th17, Th17/Treg ratio, MPO, DAO, IL-6, IL-17, TGF- β , and ROR γ t mRNA were significantly reduced in high-dose SYD group, dexamethasone group and rebamipide group, while Treg, IL-10 levels and FoxP3 mRNA increased ($P < 0.05$), but there was no difference in expression of FoxP3 mRNA in dexamethasone group. The high-dose SYD group was better than the medium- and low-dose groups in decreasing Th17, Th17/Treg ratios, MPO in lung tissue and serum inflammatory factor levels, and improving ROR γ t and FoxP3 mRNA expressions ($P < 0.05$). **Conclusion** SYD is effective in the treatment of COPD with lung-spleen *qi* deficiency, which may be related to its function of improving the pathological damage of the lung, trachea, gastrointestinal tissues simultaneously, regulating Th17/Treg balance, and reducing the levels of related inflammatory factors.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; lung-spleen *qi* deficiency syndrome; immune balance; *Shengyang Yiwei Decoction* (升阳益胃汤); inflammatory factors

(收稿日期: 2022-05-25; 修回日期: 2022-08-21)

[编辑: 邓媛]