

益气固表丸对慢性阻塞性肺病模型大鼠 JAK/STAT 通路影响研究*

金 晶^{1,2}, 王 晶³, 姚梓平², 李风森^{3**}

(1. 新疆医科大学中医学院 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学第一附属医院 乌鲁木齐 830054;
3. 新疆维吾尔自治区呼吸病研究重点实验室 乌鲁木齐 830000)

摘 要:目的:观察中药复方制剂益气固表丸对COPD模型大鼠JAK/STAT通路及炎症反应表达影响,探讨益气固表丸治疗COPD的分子机制。方法:将60只鼠龄为8周的SPF级雄性Wistar大鼠随机分为3组,分别为:空白组、模型组和益气固表丸组,每组20只,其中模型组及益气固表丸组大鼠采用烟熏+脂多糖(LPS)气管内滴注方法建立COPD模型,空白组和模型组大鼠给予生理盐水灌胃,益气固表丸组大鼠给予益气固表丸相应剂量的水溶液灌胃,2次/天,连续12周。采用HE染色法检测大鼠肺组织形态学改变,ELISA法测定外周血中IL-17a、IL-23及INF- γ 及ROR γ t表达的变化,RT-PCR方法测定肺组织JAK1、JAK3、STAT1、STAT3 mRNA表达的变化。结果:与对照组比较,益气固表丸组大鼠HE染色的炎症细胞浸润情况减轻,支气管管腔直径变宽,差异有统计学意义($P < 0.01$);ELISA及RT-PCR结果均显示:与空白组相比较,模型组大鼠IL-17a、IL-23、ROR γ t水平升高,JAK1、JAK3、STAT1、STAT3 mRNA水平升高,与模型组比较,益气固表丸组以上指标mRNA水平下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。相关性分析提示JAK1、JAK3、STAT1、STAT3与IL-17a、IL-23及ROR γ t相关,具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:益气固表丸能够改善COPD模型大鼠肺内炎症反应,有效机制与抑制JAK/STAT通路活性有关。

关键词:益气固表丸 COPD模型大鼠 JAK/STAT通路

doi:10.11842/wst.2018.10.019 中图分类号:R289.5 文献标识码:A

慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)是一种反复发作的气道慢性炎症性疾病。酪氨酸蛋白激酶/信号传导因子和转录激活因子(Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription, JAK/STAT)信号通路已被证实广泛参与COPD病理过程中细胞炎症及免疫应答^[1]。近年来中药复方通过多环节、多靶点协同干预的优势,能够有效改善COPD患者的临床症状^[2]。益气固表丸(制剂

号:ZJ20130098,国家发明专利号:201410536529.5)由党参、炒白术、茯苓、陈皮、法半夏、生薏苡仁、浮小麦、紫苏子、蜜款冬花、黄芩、伊贝母、蜜枇杷叶、防风共13味中药组成^[3],是新疆维吾尔自治区某三甲医院治疗COPD等肺系病症的常用复方制剂,自2004年以丸剂形式投入临床以来能够有效改善患者咳嗽痰多,汗出易感等症状^[4,5]。本研究通过分析益气固表丸对COPD模型大鼠治疗前后JAK/STAT信号通路相关炎症因子表达的影响,探讨其治疗COPD有效性的可能机制,为中西医结合治疗COPD探寻新途径。

收稿日期:2018-08-06

修回日期:2018-08-11

* 新疆维吾尔自治区科技厅重点实验室开放课题(2016D03024):益气固表丸对慢性阻塞性肺疾病免疫调节相关转导通路的调节作用,负责人:李风森。

** 通讯作者:李风森,博士,主任医师,博士生导师,主要研究方向:呼吸病的中医临床诊治。

1 材料和方法

1.1 实验动物

新疆医科大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(新)2011-0004,实验单位使用许可证号SCXK(新)2011-0001]的SPF级鼠龄8周的雄性Wistar大鼠60只。饲养环境模拟自然昼夜条件,温度(21 ± 2)℃,湿度40%–50%,自由饮水,正常饮食,体质量约(200 ± 50)g。

1.2 试验用药

益气固表丸购自新疆医科大学附属中医院中心药房(新疆制药厂,批号20121212),脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号:L-2880),雪莲过滤嘴香烟(新疆卷烟厂,烤烟型,焦油量13 mg,烟碱量1.1 mg,烟气一氧化碳量13 mg),大鼠IL-17a、IL-23、IFN- γ 及ROR γ t ELISA试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司,批号均为:GR201604-1),Platinum SYBR Green qPCR Super-Mix-UDG试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:C11733-038),Trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号:15596-026),M-MLV First-Strand Synthesis Kit反转录试剂盒(美国Invitrogen公司,批号:C28025-032),RT-PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 试验仪器

试验动物烟熏箱(自制,大小60 cm×50 cm×40 cm),Wistar大鼠全身暴露型无创肺功能检测仪(型号:PLY3211,美国Buxco Electronics公司),电子高清显微镜(型号:U-CMAD3,日本Olympus公司),全自动图像分析仪(型号:U-CMAD3,日本Olympus公司),Thermal cycler深孔PCR仪(型号:C1000,美国BIO-RAD公司),全波长酶标仪(型号:Multiskan Spectrum,德国Thermo公司)。

1.4 COPD动物模型造模

模型组及益气固表丸组大鼠($n = 40$)放置于动物烟熏箱内,给予被动熏烟,烟雾浓度450–500 bpm,30 min/次,间隔3 h/次,12 h更换烟盒1次,同时气管内滴注LPS $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,共计84天。并于大鼠造模第一天和最后一天,检测大鼠体质量,采用Wistar大鼠肺功能仪检测大鼠肺功能指标:吸气峰流速(PIF)、呼气峰流量(PEF)和每分钟通气量(MV),与空白组大鼠比较,下降幅度大于30%即为造模成功^[6]。

1.5 试验方案

大鼠按照随机数字原则分为3组,分别为:空白组

表1 JAK1、JAK3、STAT1及STAT3引物序列表

Designation		Sequence	Ann.Temp
Rat Actin beta	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	60.4
	Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	60.4
JAK1	Forward	GATGACAGTAACACGGCTTGTA	59
	Reverse	AAAGGTTGTCCGATTAGATGCTT	59
JAK3	Forward	AGTGAGGCGCATGTGAAGATTG	61
	Reverse	CCGAAGCTCCACACGTCAGA	61
STAT1	Forward	TCCAAGTTCCTGGAGCAGGTG	61
	Reverse	GTGGCGAACGAGACGTCGTA	61
STAT3	Forward	TTTGACAGAGGTGTACCACCAAG	54.5
	Reverse	ACCACAGGATTGATGCCCAAG	54.5

($n = 20$)、模型组($n = 20$)、益气固表丸组($n = 20$)。按照人与动物间体表面积折算等效剂量公式折算出试验用大鼠的每日灌药量($513 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),空白组及模型组大鼠每日予0.9%生理盐水6.6 mL灌胃,益气固表丸组给予益气固表丸水溶液6.6 mL灌胃,每日两次,所有的大鼠在给药期间喂食正常饮食,灌胃84天,处死各组大鼠,取外周血及肺组织进行分析。

1.6 病理标本的制作

垂直于支气管的肺矢状面最大周径处取材,取厚约5 mm的取各组大鼠左肺组织,剪成面积为 1.5 cm^2 左右的小块,浸入2 mL 4%多聚甲醛溶液中固定,使用PBS缓冲液洗涤,并浸泡于固定剂中至少24 h以上。甲醛固定后,石蜡包埋,将标本切为3–4 μm 并加工用于HE染色。

1.7 外周血IL-17a、IL-23、IFN- γ 及ROR γ t水平的ELISA检测

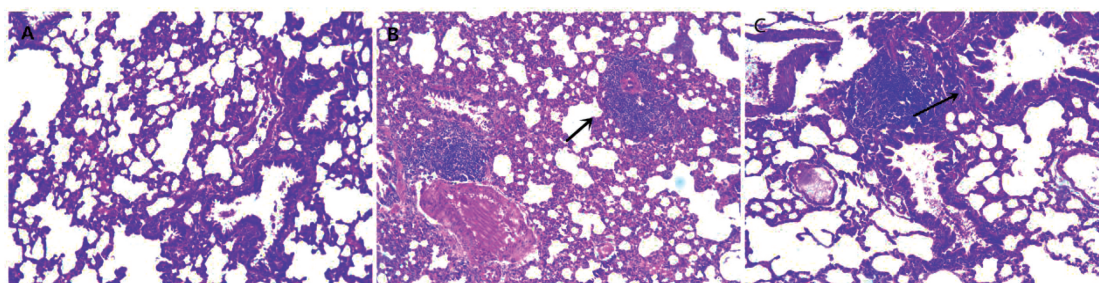
取各组大鼠外周血2 mL,离心3 000 rpm,10 mins,取血清保存于EP管置于 -80°C 冰箱保存,检测时根据试剂盒说明书操作,于设置450 nm波长的酶标仪上机检测并计算IL-17a、IL-23、IFN- γ 及ROR γ t水平。

1.8 肺组织JAK1、JAK3、STAT1及STAT3 mRNA的RT-PCR检测

依据Trizol试剂说明书提取各组大鼠右肺组织总RNA,PCR试剂盒反转录合成cDNA并扩增目的基因,引物由上海生工生物工程有限公司合成,反应总体积为25 μL 。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳确定其完整性,拍照并读取灰度值,分析JAK1、JAK3、STAT1及STAT3 mRNA转录水平变化情况(表1)。

1.9 统计学处理

所得实验数据使用SPSS 19.0软件进行分析,以均

图1 大鼠肺组织 HE 染色结果($\times 200$)

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,组间两两间比较采用 LSD- t 检验。Pearson 法相关性检验进行相关分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠肺组织形态学观察

对照组:支气管结构及肺泡结构清晰。支气管未见明显收缩,未见炎症细胞浸润,气道上皮排列整齐,管腔规则。模型组:支气管及肺泡组织结构紊乱,部分结构消失。支气管粘膜可见大量炎症细胞浸润,支气管出现收缩的现象,管腔变窄,气道上皮排列不整齐,甚至出现断裂的情况。益气固表丸组:较模型组的炎症细胞浸润减轻;支气管收缩好转;管腔变窄改善,管腔直径变宽(图1)。

正常组(A),模型组(B)和益气固表丸组(C)提示肺结构的组织学改变。模型组大鼠肺组织(箭头所示)主支气管结构紊乱和消失,存在广泛浸润的炎症细胞,支气管显示狭窄和痉挛状态,以及不规则和破裂的气道上皮(B);益气固表丸组大鼠肺组织(箭头所示)显示使用益气固表丸等量水溶液干预后炎症细胞浸润减轻;支气管痉挛状态好转(C)。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)测定结果

与空白组比较,模型组 IFN- γ 水平降低 ($P < 0.05$), IL-17a、IL-23 及 ROR γ t 水平升高,有统计学意义 ($P < 0.05$),益气固表丸组 IL-17a、IL-23、IFN- γ 及 ROR γ t 水平升高,有统计学意义 ($P < 0.05$),与模型组比较,益气固表丸组 IL-17a、IL-23、ROR γ t 水平下降 ($P < 0.05$), IFN- γ 水平升高,有统计学意义 ($P < 0.05$) (表2)。

2.3 实时-聚合酶链反应(RT-PCR)定量检测结果

与空白组比较,模型组及益气固表丸组 JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 mRNA 水平均升高,有统计学意义 ($P < 0.05$),与模型组比较,益气固表丸组 JAK1、

JAK3、STAT1 及 STAT3 mRNA 均降低,有统计学意义 ($P < 0.05$) (表3,图2)。

通过 RT-PCR 分析 JAK/STAT 通路中基因表达 (A)为 JAK1 扩增曲线, (B)为 JAK3 扩增曲线, (C)为 STAT1 扩增曲线, (D)为 JAK1 扩增曲线, (E)为 JAK1 溶解曲线, (F)为 JAK3 溶解曲线, (G)为 STAT1 溶解曲线, (H)为 STAT3 溶解曲线

2.4 JAK1、JAK3、STAT1、STAT3 与 IL-17a、IL-23、IFN- γ 及 ROR γ t 的相关性分析

JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 与 IL-17a 显著相关 ($P < 0.01$), JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 与 IL-23 相关 ($P < 0.05$), JAK1 与 IFN- γ 呈负相关 ($P < 0.05$), JAK3、STAT1 与 STAT3 与 IFN- γ 无相关 ($P > 0.05$), JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 与 ROR γ t 无相关 ($P > 0.05$) (表4)。

3 讨论

气道炎症反应的持续状态是 COPD 过程中重要的病理状态^[7]。JAK/STAT 通路的激活与炎症因子的表达密切相关,多种细胞因子如干扰素受体家族 (IFN- γ) 以及白介素受体家族 (白细胞介素 IL-17a、IL-23) 等,通过激活 JAK/STAT 通路,在 COPD 的发生发展过程中发挥的重要作用^[8,9]。中医药通过调控 STAT 通路防治 COPD 的研究,逐渐显示出较大的潜力和广阔的应用前景,许光兰等^[10]证实清金化痰颗粒能够抑制 IL-6 的水平,下调 JAK/STAT 信号通路中 STAT1、STAT3 的过度表达和持续活化,从而减轻气道炎症,抑制 COPD 急性发作与加重。Wang C^[11]发现六味补气胶囊可有效抑制 JAK/STAT 通路活性,明显提高了肺气虚型 COPD 稳定期患者的生活质量和肺功能。

熊斌等^[12]认为“脾虚”对免疫功能的影响与 JAK/STAT 通路异常表达有关。因此,考虑能否通过中医的健脾的治法以改善免疫功能的异常,是现代中西医

结合证治研究的关注点,益气固表丸是建立在“培土生金”治则上针对临床肺脾气虚证 COPD 相关病症患者的复方制剂,方中党参具有补中益气,健脾益肺之功效,为方中之君药,能够健运脾气之大统,辅以白术、茯苓,淡渗利湿以醒脾,薏苡仁利湿健脾,半夏、陈皮以行“二陈汤”之理气和中兼燥湿之功效,脾气得充则有化湿之力,浮小麦滋阴敛汗而清肺之虚热,以防子(肺)火乘母(脾)脏,防风入肝脾经,以祛风胜湿固表,余药以清利肺气,诸药共参,多种药物综合起效达到共奏“抑炎抗氧化”之效。本次研究通过益气固表丸的干预,研究 JAK/STAT 通路的活性,是本次研究的目的,试验发现模型大鼠外周血及肺组织中,炎症因子如:白细胞介素(IL-17a、IL-23)、ROR γ t 水平升高,IFN- γ 水平下降,STAT1、STAT3 mRNA 表达显著高于正常组,IL-17a 及 IL-23 是 T 淋巴细胞亚群的下游产物,考虑 IL-17a 及 IL-23 的升高与 Th17/Treg 亚群失衡有关,提示 COPD 的病情进展与 JAK/STAT 通路的持续活化与其下游炎症蛋白过度表达密切相关,益气固表丸干预后可使上调的 IL-17a、IL-23 及 ROR γ t 水平下降,升高下调的 IFN- γ 水平,同时升高 JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 mRNA 的表达,起到抑制 JAK/STAT 通路活性的作用,下一步的研究将通过研究 T 淋巴细胞亚群失衡情况,以了解 JAK/STAT 通路 Th17/Treg 比例的关系,以及相关中药对通路及淋巴细胞亚群的影响。相关性分析发现 JAK1、JAK3、STAT1、STAT3 的 mRNA 表达与 IL-17a、IL-23 成正相关,JAK1、JAK3 与 IFN- γ 呈负相关,进一步证明 IL-17a 和 IL-23 具有强大的致炎性,是联系 T 细胞与中性粒细胞的重要介质,能够激活 JAK/

表2 各组大鼠外周血 IL-17a、IL-23、IFN- γ 及 ROR γ t 水平的比较/ ng·mL⁻¹ ($\bar{x} \pm s$)

分组	IL-17a	IL-23	IFN- γ	ROR γ t
空白组	14.36±0.94	30.90±3.96	65.06±1.81	8.49±0.45
模型组	89.91±0.94*	74.21±4.91*	49.63±3.12*	36.41±2.34*
益气固表丸组	53.08±2.95 [△]	54.93±5.09 [△]	55.32±1.58 [△]	20.09±1.84 [△]
F	1627.6	172.165	94.405	520.013
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组相比, $P < 0.05$ 。

表3 各组大鼠肺组织 JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 的比较/ ng·mL⁻¹ ($\bar{x} \pm s$)

	JAK1	JAK3	STAT1	STAT3
空白组	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0
模型组	5.05±2.50*	4.08±0.97*	5.93±2.30*	4.21±1.82*
益气固表丸组	0.89±0.43 [△]	3.13±0.71 [△]	1.72±0.89 [△]	2.08±0.97 [△]
F	15.76	30.386	20.932	11.267
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.001

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组相比, $P < 0.01$ 。

表4 JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 与 IL-17a、IL-23、IFN- γ 及 ROR γ t 的相关性分析/ ng·mL⁻¹

	JAK1	JAK3	STAT1	STAT3
IL-17a	0.965**	0.937**	0.986**	0.410*
IL-23	0.934*	0.948*	0.084*	0.437*
IFN- γ	-0.157*	-0.294	-0.320	0.893
ROR γ t	0.033	0.410	0.409	0.394

注:**表示:在 0.01 水平(双侧)上显著相关;*在 0.05 水平(双侧)上显著相关

STAT 通路,进一步肯定了炎症细胞因子在 COPD 病变过程中的作用。

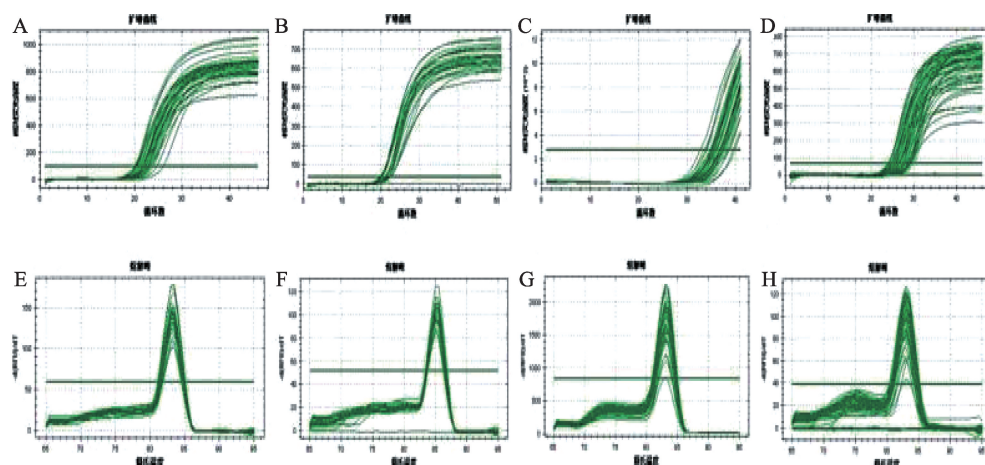


图2 JAK1、JAK3、STAT1 及 STAT3 RT-PCR 图形

4 结论

COPD 模型大鼠肺组织中 JAK/STAT 通路处于激活状态,益气固表丸通过下调外周血中 IL-23 及 IL-

17a 水平,升高 IFN- γ 水平,抑制肺组织中 JAK/STAT 通路中相关因子 mRNA 水平的表达,改善 COPD 模型大鼠气道炎症水平及病理学变化。

参考文献

- 1 Yew-Booth L, Birrell M A, Lau M S, *et al.* JAK-STAT pathway activation in COPD. *ERJ Express*, 2015, 46(3): 843-845.
- 2 陈浩, 李七一, 陆曙. 中医药调控 JAK/STAT 信号通路的研究进展. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(19): 2258-2262.
- 3 卜淑卫, 聂继红, 王萍. 参浮益气固表浓缩丸水提工艺研究. 新疆医科大学学报, 2012, 35(2): 189-192, 196.
- 4 李凤森, 徐丹, 高振, 等. 益气固表丸联合平喘敷贴膏治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期临床研究. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(6): 22-26.
- 5 Li F, Zhang Y, Li Z, *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled superiority trial of the Yiqigubiao pill for the treatment of patients with chronic obstructive pulmonary disease at a stable stage. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 12(4): 2477-2488.
- 6 Lee S Y, Cho J H, Cho S S, *et al.* Establishment of a chronic obstructive pulmonary disease mouse model based on the elapsed time after LPS intranasal instillation. *Lab Anim Res*, 2018, 34(1): 1-10.
- 7 Aggarwal T, Wadhwa R, Rohil V, *et al.* Biomarkers of oxidative stress and protein-protein interaction in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Physiol Biochem*, 2017, 10(11): 1-6.
- 8 Simanski M, Rademacher F, Schroder L, *et al.* IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59531-e59536.
- 9 Ruwanpura S M, McLeod L, Miller A, *et al.* Deregulated Stat3 signaling dissociates pulmonary inflammation from emphysema in gp130 mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(7): L627-L639.
- 10 许光兰, 赵媚, 钟云青, 等. 清金化痰颗粒对 COPD 急性期(痰热郁肺型)大鼠肺组织 STAT1, STAT3 的调控作用. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 91-97.
- 11 Wang C, Ding H, Tang X, *et al.* Effect of Liuweibuqi Capsules in Pulmonary Alveolar Epithelial Cells and COPD Through JAK/STAT Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(2): 743-756.
- 12 熊斌, 钱会南. 益气健脾方药对脾虚大鼠脑内 JAK1、STAT1、SOCS1 水平变化的影响. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1543-1547.

Effect of Yiqigubiao Pill Regulate Inflammatory Cytokines Through JAK/STAT Pathway in COPD Rats Model

Jin Jing^{1,2}, Wang Jing³, Yao Ziping², Li Fengsen³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Internal Medicine Department of TCM, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Xinjiang Uygur Autonomous Region Key Laboratory of Respiratory Disease Research, Urumqi 830000, China)

Abstract: The research observed the effect of Yiqigubiao Pill regulating inflammatory reaction mRNA expression in JAK/STAT pathway in COPD rats model and explored protective effect of Yiqigubiao pills in the treatment or auxiliary possible mechanism in COPD. 60 SFP Wistar rats were divided randomly into control group (CN), COPD model group (M) and Yiqigubiao Pill group (Yqgb). The rats in group M and group YQGB were establish by using the method of LPS and smoking as COPD, rats in group M and group CN were given normal saline intragastric administration, and rats in the YQGB group were given water solution intragastric administration at the corresponding dose, twice a day. After using drugs for 12 weeks, we used ELISA method to detect changes in IL-17a, IL-23, IFN- γ and ROR γ t expression in peripheral blood, RT-PCR method to detect changes in the expression of JAK1, JAK3, STAT1 and STAT3 mRNA in lung tissues. Compared with the group CN, the infiltration of inflammatory cells stained by HE in the experimental group was reduced, and the diameter of the bronchial lumen was broadened ($P < 0.01$). Both of ELISA and RT-PCR results showed

that, compared with group CN, the levels of IL-17a, IL-23 and ROR γ t, the levels of JAK1, JAK3, STAT1, and STAT3 mRNA were increased in group M. Compared with group M, the mRNA levels of above indicators in group Yqgb were decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Correlation analysis revealed that JAK1, JAK3, STAT1 and STAT3 were associated with IL-17a, IL-23, and ROR γ t had statistical significance ($P < 0.05$). Therefore, Yiqigubiao Pill can inhibit the inflammatory response in COPD rats model, and its mechanism may be associated with inhibition of JAK/STAT pathway.

Keywords: Yiqigubiao pill, COPD rats model, JAK/STAT pathway

(责任编辑:周哲琦,责任译审:王 昭)