

# 益肺健脾方对肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病模型大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 的影响

张琳萍<sup>1</sup>, 夏平凡<sup>2</sup>, 徐晨<sup>2</sup>, 郑莉莉<sup>3</sup>, 王胜<sup>3,4,5</sup>

(1. 安徽中医药大学第一临床医学院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031;

3. 安徽中医药大学第一附属医院老年病中心, 安徽 合肥 230031; 4. 安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 安徽 合肥 230031; 5. 安徽省教育厅重点实验室中医药防治肺系重大疾病重点实验室, 安徽 合肥 230031)

**摘要:**目的 研究益肺健脾方对肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠支气管肺组织水通道蛋白3(AQP3)、水通道蛋白5(AQP5)及黏蛋白5AC(MUC5AC)的影响。方法 SD大鼠随机分为空白组、模型组、氨溴索组、地塞米松组及益肺健脾方高、中、低剂量组,烟熏法联合脂多糖滴注及番泻叶灌胃构建肺脾两虚型COPD大鼠模型。以苏木精-伊红染色(HE)、阿利新蓝-过碘酸-雪夫染色(AB-PAS)对大鼠支气管肺组织进行病理形态学观察,蛋白质免疫印记法(WB)、免疫组化法(IHC)检测大鼠AQP3、AQP5及MUC5AC蛋白表达,实时荧光定量PCR法(RT-qPCR)检测大鼠支气管肺组织AQP3、AQP5及MUC5AC mRNA表达。结果 模型组大鼠支气管肺组织均出现不同程度损伤,HE染色显示大鼠气道有明显炎性细胞浸润现象,AB-PAS染色显示大鼠支气管可见大量杯状细胞增生;模型组AQP3、AQP5 mRNA水平及蛋白表达明显降低,MUC5AC mRNA水平及蛋白表达显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠支气管肺组织炎症病理损害、杯状细胞增生情况均有不同程度的改善,AQP3、AQP5 mRNA水平及蛋白表达均增高,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组增高显著且水平相当( $P < 0.05$ );MUC5AC mRNA水平及蛋白表达均有不同程度的下降,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组下降显著且水平相当( $P < 0.01$ )。结论 益肺健脾方能够改善肺脾两虚型COPD模型大鼠气道黏液高分泌,减轻气道炎症,其作用机制与其上调AQP3、AQP5,下调MUC5AC转录及表达有关。

**关键词:**慢性阻塞性肺疾病;益肺健脾方;肺脾两虚;AQP3;AQP5;MUC5AC

**中图分类号:**R289.5

**文献标志码:**A

**文章编号:**1673-7717(2025)12-0042-11

## Effects of Yifei Jianpi Recipe(益肺健脾方) on AQP3, AQP5 and MUC5AC in Bronchopulmonary Tissues of COPD Model Rats with Lung and Spleen Deficiency Syndrome

ZHANG Linping<sup>1</sup>, XIA Pingfan<sup>2</sup>, XU Chen<sup>2</sup>, ZHENG Lili<sup>3</sup>, WANG Sheng<sup>3,4,5</sup>

(1. The First Clinical School of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China;

2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China;

3. The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China;

4. Institute of Traditional Chinese Medicine Respiratory Disease Prevention and Treatment,

Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China;

5. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Major Pulmonary Diseases,

Anhui Provincial Department of Education, Hefei 230031, Anhui, China)

**Abstract:** *Objective* To study the effects of Yifei Jianpi Recipe(益肺健脾方) on aquaporin 3(AQP3), aquaporin 5(AQP5) and mucin 5AC(MUC5AC) in bronchial and lung tissues of chronic obstructive pulmonary disease(COPD) model rats with lung and spleen deficiency syndrome. *Methods* Sprague-dawley rats were randomly segmented into blank group, model group, ambraxol group, dexamethasone group and Yifei Jianpi Recipe high, medium and low dose groups. The COPD rat model of lung and spleen deficiency was created by fumigation combined with lipopolysaccharide tracheal drip and Senna gavage and the pathologic morphology of bronchopulmonary tissues in rats was observed by hematoxylin-eosin(HE) staining and Alcian Blue-Periodic Acid Schiff(AB-PAS) staining, and the mRNA expressions of AQP3, AQP5 and MUC5AC in rat bronchopulmonary tissues were detected by RT-qPCR, and protein expressions of AQP3, AQP5 and MUC5AC were detected by Western Blot and immunohistochemistry(IHC) methods, the mRNA expressions of AQP3, AQP5 and MUC5AC in rat bronchopulmonary tissues were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction(RT-qPCR), and the protein expressions of AQP3, AQP5 and MUC5AC in

**基金项目:**国家自然科学基金项目(82274500);安徽省教育厅高校自然科学基金项目(KJ2020A0425);安徽省高等学校科学研究项目(2022AH050493);王胜安徽省名中医工作室项目(ahsmgzs20240039)

**作者简介:**张琳萍(1998-),女,安徽宿州人,硕士在读,研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。

**通讯作者:**王胜(1970-),男,安徽合肥人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail:ahzyws@163.com。

rat bronchopulmonary tissues were detected by Western Blot and IHC methods. *Results* Compared with those in the sham group, the bronchopulmonary tissues of rats in the model group showed different degrees of damage, and HE staining demonstrated that there were tangible inflammatory cell infiltration in the airways of rats, and AB - PAS staining reviewed that a good deal of cup - shaped cell hyperplasia could be seen in the bronchial tubes of rats. The mRNA and protein expressions of AQP3 and AQP5 were significantly decreased and MUC5AC mRNA and protein expressions were clearly increased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the model group, the inflammatory pathology damage of the bronchopulmonary tissues and the proliferation of cup cells in the rats of each dose group showed different degrees of improvement, and the mRNA and protein expressions of AQP3 and AQP5 were increased to different degrees. Among them, the Yifei Jianpi Recipe high dose group, the aminoglossum group and the dexamethasone group showed significant and comparable levels of increase ( $P < 0.05$ ); the MUC5AC mRNA and protein expressions were reduced to different degrees, among which the ambroxol group, the dexamethasone group and the Yifei Jianpi Recipe high dose group showed significant and comparable reductions ( $P < 0.01$ ). *Conclusion* Yifei Jianpi Recipe can inhibit airway mucus hypersecretion and reduce airway inflammation in COPD model rats with lung and spleen deficiency syndrome, and its mechanism is related to up - regulation of AQP3 and AQP5 and down - regulation of MUC5AC transcription and expression.

**Keywords:** COPD; Yifei Jianpi Recipe (益肺健脾方); deficiency of lung and spleen; AQP3; AQP5; MUC5AC

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种由于气道异常和/或肺泡异常引起的以持续性、进行性加重的气流受限为特征的异质性肺部疾病<sup>[1]</sup>。目前普遍认为 COPD 是由基因 (G) - 环境 (E) 在个体生命周期 (T) 中发生的相互作用 (GETomics) 引起的, 其发病与气道和肺组织吸入香烟烟雾、室内外空气污染有毒颗粒物和气体引起的异常慢性炎症反应有关, 多种机制相互影响, 共同参与其发病并加重 COPD 炎症反应<sup>[2]</sup>。其中, 持续慢性黏液分泌已成为 COPD 发病率和病死率增长的独立危险因素<sup>[3]</sup>。早期的药物治疗或可延缓 COPD 急性病程进展, 但目前临床疗效多欠佳, 控制水平尚不理想, 而中医学对咳嗽喘的论述由来已久, 其辨证施治的整体思想与 COPD 的治疗原则不谋而合, 以中医药控制炎症、调节免疫等辅助治疗 COPD, 在延缓疾病进程、减轻不良反应、提高生活质量等方面均具有独到优势<sup>[4-5]</sup>。水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 在渗透驱动的跨细胞和跨上皮水运动中起主要作用<sup>[6]</sup>, 其中, 肺 AQPs 已被证明与急性肺损伤密切相关, 特别是与氧气水平相关的损伤和感染<sup>[7-8]</sup>。水通道蛋白 3 (aquaporins 3, AQP3) 在鼻咽和大气道的基底上皮细胞中表达, 水通道蛋白 5 (aquaporins 5, AQP5) 主要在脉管系统内皮和肺泡上皮中表达, 以允许肺泡中的液体在空气空间和相关脉管系统之间移动<sup>[9]</sup>。益肺健脾方基于“肺通调水道、脾主运化水化”等理论, 为临床多年运用且有良效的经验方, 前期研究证实, 该方能降低 COPD 患者痰液中炎症因子表达水平<sup>[10-13]</sup>, 提示益肺健脾方能减轻 COPD 患者气道炎症反应及肺部病理损害, 抑制气道黏液高分泌, 改善痰液黏稠度。本实验基于前期工作基础, 以 COPD 痰饮生成异常为研讨切入点, 采用与痰饮密切关联的 AQP3、AQP5 及黏蛋白 5ac (MUC5AC) 为观察指标, 从水液代谢角度深入探析益肺健脾方改善慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌的作用机制。

## 1 材料与与方法

### 1.1 实验动物

112 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 年龄 6 ~ 8 周, 体质量为 (200 ± 20) g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司 [生产许可证号: SCXK (辽) 2020 - 0001], 均饲养于温度范围为 21 ~ 26 °C、相对湿度在 60% ~ 80% 的安徽中医药大学动物房, 并进行 20 次/h 的通风排气, 适应性饲养周期为 1 周。此项目已经得到了安徽中医药大学动物伦理委员会的正式批准 (动物伦理编号: AHUCM - rats - 2023153), 并且完全符合《实验动物保健

和使用指南》的规定。

### 1.2 药物

益肺健脾方: 黄芪 30 g, 半夏 15 g, 党参 15 g, 茯苓 15 g, 白术 15 g, 陈皮 10 g, 款冬花 10 g, 防风 10 g, 陈皮 10 g, 甘草 10 g, 地龙 8 g 每剂。药物来自安徽省中医院中药房。氨溴索 (批号 A19263) 购买于上海勃林网络格股格翰药业有限公司; 地塞米松 (批号 140602) 来源于浙江仙琚制药股份有限公司; 番泻叶 (批号 412495T) 来源于广东一方制药有限公司。

### 1.3 主要试剂及仪器

AQP3、AQP5 试剂盒购自美国 Biowor 公司, 批号 BS3671、BS3477; MUC5A 试剂盒购自英国 Abcam 公司, 批号 Ab24071; 反转录试剂盒购自美国 Thermo 公司, 批号: 00221108; 苏木素染色试剂购自安徽亿帆制药有限公司, 批号: 717105; 伊红染色试剂购自美国 Thermo 公司, 批号: 723132; 脂多糖购自美国 Sigma 公司, 批号 12180309。切片 (Leica RM2451 德国); 自动脱水机 (爱华 FTJ - 301 中国); 石蜡包埋机 (益迪 YD - 6D 浙江金华); 显微镜 (飞利浦 70T 荷兰); 电泳仪 (伯乐 1645056 美国 BIO - RAD); 转膜仪 (VE - 186 型 Tanon); 普通 PCR 仪 (伯乐 T100 美国 BIO - RAD); 荧光定量 PCR 仪 (伯乐 C1000 美国 BIO - RAD)。引物由上海生工生物有限公司合成。

### 1.4 分组、造模及给药

实验中, 大鼠随机分为空白组、模型组、氨溴索组、地塞米松组及益肺健脾方高、中、低剂量组, 每组 16 只。参照宋一平等<sup>[14]</sup>、张伟等<sup>[15]</sup>、张旭辉等<sup>[16]</sup> 学者的研究方法, 使用香烟烟熏法结合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 进行气管滴注和番泻叶灌胃, 造模共 49 d, 成功模拟出肺脾两虚型 COPD 大鼠模型。在大鼠接受 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉后的第 1 天和第 14 天进行固定, 确保气管完全暴露, 并予以 LPS 200 μL (1 mg/mL) 的气管滴注。在第 2 ~ 30 天 (除第 14 天外), 大鼠被放置在 1 m<sup>3</sup> 封闭的烟室里, 进行香烟烟雾处理 (中烟红三环渡江牌香烟: 烟碱量为 1.1 mg, CO 量为 14 mg, 香烟焦油量为 13 mg), 并持续吸入 30 min。每天进行 2 次烟熏, 每次吸入 15 支香烟。在第 20 天至 30 天, 每天给予大鼠 1 g/mL 和 4 °C 番泻叶浸液 (1 mL/100 g) 进行灌胃处理, 每天进行 1 次灌胃。参照《实用中医证候动物模型学》<sup>[17]</sup>, 确定了模型的成功准则: (1) 脾虚标准: ①精神不佳, 蜷卧扎堆; ②食量下降, 体质量减轻; ③大便稀溏或不成形; ④毛发凌乱且无光泽。(2) HE 染色、AB - PAS 染色符合 COPD 病理变化。造模成功后, 予以益

肺健脾方高、中、低[3.2、1.6、0.8 g/(mL·100 g)]、氨溴索混悬液[1.4 mg/(mL·100 g)]、地塞米松混悬液[(0.052 5 mg/(mL·100 g)]灌胃处理,正常组、模型组灌胃等体积0.9%氯化钠溶液,1次/d,连续6周。

### 1.5 检测指标及方法

在最后一次给药后的24 h移除死亡大鼠,并从每组中选择6只大鼠进行样本采集。在对大鼠进行腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉后,从其腹主动脉采集血液,经过离心后提取血清,并将其存放在-80℃的冰箱中进行冷冻保存。对大鼠进行断颈并处死后,打开其胸腔,首先将左支气管肺组织放入冷冻保存管中,以便进行实时荧光定量检测(RT-qPCR法)和蛋白质免疫印迹(Western blot)法的检测;然后取下右肺的三叶,用福尔马林和10%的甲醛溶液进行固定。接着,进行石蜡包埋和切片处理,以便进行苏木精-伊红(HE)染色、阿尔辛蓝-过碘酸雪夫染色(AB-PAS)和免疫组化法(IHC)的检测。

**1.5.1 免疫组化法检测大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 表达水平** 二甲苯脱蜡20 min 2次;梯度酒精复水(100% 2次,95%、90%、85%、蒸馏水,每次5 min);抗原修复(加热法);3%双氧水阻断非特异性;二抗同属种血清封闭;一抗4℃孵育过夜;孵育二抗;DAB显色;苏木素复染;脱水透明,中性树胶封片;并使用Image J软件进行阳性信号平均光密度值分析。

**1.5.2 RT-qPCR法检测大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 及 MUC5AC mRNA 表达水平** 取100 mg冻存支气管肺组织,加入Trizol试剂后提取组织总RNA;总RNA逆转录cDNA;依次加入dT、RNA、无Rnase水及逆转录试剂,设置仪器,严格按照说明书操作,得到的反应溶液即为所需cDNA,-80℃保存备用;cDNA扩增目的基因:加样、离心混匀、放入PCR仪中。引物序列见表1。

表1 检测基因引物序列(5'→3')

基因	上游	下游	长度/(bp)
β-actin	5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	5'-TTTAATGTCACGCAGCATTTTC-3'	150
AQP3	5'-CAATGGCAGACGCTGTAATCT-3'	5'-CACACACAATAAGGGCTGCT-3'	104
AQP5	5'-AAGCTCTGGACCTGTGAGT-3'	5'-CACGTAGAAGACGCTCGGA-3'	105
MUC5AC	5'-GCTCGATCGACTCTACTCC-3'	5'-GGTGGACCTAAGGTTGAGA-3'	128

**1.5.3 WB法检测大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 蛋白表达水平** 取适量肺组织,裂解及蛋白定量;制备SDS-PAGE凝胶;蛋白电泳;组装SDS-PAGE、蛋白上样、接通电源,开始电泳;转膜;封闭蛋白抗原;抗原抗体反应:0.1%TBST润洗封闭后的NC膜3次,每次5 min,稀释、孵育、回收一抗,孵育二抗,0.1%TBST润洗NC膜3次,每次10 min;显色,使用imageJ软件分析。

### 1.6 统计学处理

采用SPSS 26.0统计软件进行数据处理分析,所有计量数据均用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,其中 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。如果数据满足正态分布和方差齐性,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较则使用两独立样本 $t$ 检验,若不满足条件,则使用非参数检验。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠支气管肺组织病理学改变

通过HE染色和AB-PAS染色的结果,观察到空白组的大鼠支气管肺组织结构保持完好、形态正常,并且可以看到少

数的杯状细胞;在模型组大鼠的支气管肺组织中,COPD的病理特征表现为管道狭窄,管壁增厚,大量的炎症细胞浸润,杯状细胞增多,肺泡壁破裂、融合后,形成肺大疱,进一步表现为肺气肿的变化;相较于模型组,用药组大鼠支气管病理损伤均有不同程度改善,中药高剂量组、氨溴索组和地塞米松组的改善尤为显著。见插页IV图1、插页V图2。

### 2.2 各组大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 和 MUC5AC 表达(免疫组化法)

**2.2.1 AQP3** 与空白组比较,模型组大鼠支气管及肺组织AQP3表达强度降低;与模型组比较,各给药组均显示AQP3表达升高,其中益肺健脾方高剂量组、氨溴索组及地塞米松组升高明显。见插页VI图3。

**2.2.2 AQP5** 与空白组比较,模型组大鼠支气管肺组织AQP5表达强度降低;与模型组比较,各给药组均显示AQP5表达升高,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组升高明显。见插页VII图4。

**2.2.3 MUC5AC** 与空白组比较,模型组大鼠支气管及肺组织MUC5AC表达强度升高;与模型组比较,各给药组均可见MUC5AC表达降低,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组降低明显。见插页VIII图5。

**2.2.4 平均光密度值** 与空白组比较,模型组大鼠支气管肺组织AQP3及AQP5表达量显著下降,光密度值降低,MUC5AC表达量显著增高,光密度值升高;与模型组比较,中药组与西药组大鼠支气管肺组织AQP3及AQP5表达量均有不同程度的升高,MUC5AC表达量均有不同程度的降低,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组AQP3、AQP5升高明显,MUC5AC降低明显。见表2。

表2 各组大鼠平均光密度值比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	AQP3	AQP5	MUC5AC
空白组	6	0.51 ± 0.003	0.52 ± 0.003	0.33 ± 0.003
模型组	6	0.25 ± 0.004 **	0.29 ± 0.003 **	0.50 ± 0.006 **
益肺健脾方高剂量组	6	0.44 ± 0.003 ##	0.37 ± 0.004 ##	0.43 ± 0.003 ##
益肺健脾方中剂量组	6	0.40 ± 0.007 ##☆	0.35 ± 0.007 ##☆	0.44 ± 0.003 ##☆
益肺健脾方低剂量组	6	0.36 ± 0.008 ##☆☆	0.32 ± 0.009 ##☆☆	0.47 ± 0.002 ##☆☆
氨溴索组	6	0.46 ± 0.006 ##	0.45 ± 0.010 ##	0.40 ± 0.002 ##
地塞米松组	6	0.42 ± 0.008 ##	0.48 ± 0.004 ##	0.37 ± 0.004 ##

注: \*\*与空白组比较, $P < 0.01$ ;##与模型组比较, $P < 0.01$ ;☆与中药高剂量组比较, $P < 0.05$ ;☆☆与中药高剂量组比较, $P < 0.01$ 。

### 2.3 各组大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 和 MUC5AC mRNA 表达(RT-qPCR法)

模型组大鼠支气管及肺组织中AQP3 mRNA、AQP5 mRNA表达量较空白组明显下降,MUC5AC mRNA表达量明显升高;与模型组比较,中药组与西药组大鼠支气管及肺组织AQP3 mRNA及AQP5 mRNA表达量均有不同程度的升高,MUC5AC mRNA表达量均有不同程度的降低,其中中药高剂量组、氨溴索组及地塞米松组AQP3 mRNA、AQP5 mRNA升高明显,MUC5AC mRNA降低明显。见表3、插页IX图6。

### 2.4 各组大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 和 MUC5AC 蛋白表达(WB法)

模型组大鼠支气管及肺组织中AQP3、AQP5表达较空白组明显下降,MUC5AC表达明显升高;与模型组比较,中药组与西药组大鼠支气管及肺组织中AQP3、AQP5表达均有不同程度的升高,MUC5AC表达均有不同程度下降,其中中药高剂量组、氨溴索组、地塞米松组变化明显。见表4、插页IX图7。

表 3 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AQP3mRNA、AQP5mRNA 和 MUC5ACmRNA 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) 单位: $2^{-\Delta\Delta CT}$ 

组别	n	AQP3	AQP5	MUC5AC
空白组	6	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.19
模型组	6	0.24 ± 0.03**	0.27 ± 0.04**	2.10 ± 0.30**
益肺健脾方高剂量组	6	0.74 ± 0.08##	0.75 ± 0.10##	1.21 ± 0.20##
益肺健脾方中剂量组	6	0.50 ± 0.08##☆	0.65 ± 0.06##☆	1.73 ± 0.27##☆
益肺健脾方低剂量组	6	0.40 ± 0.06##☆☆	0.43 ± 0.05##☆☆	2.14 ± 0.26##☆☆
氨溴索组	6	0.73 ± 0.05##	0.71 ± 0.05##	1.20 ± 0.08##
地塞米松组	6	0.82 ± 0.06##	0.92 ± 0.07##	1.16 ± 0.10##

注: \*\*与空白组相比,  $P < 0.01$ ; ##与模型组比较,  $P < 0.01$ ; ☆与中药高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ☆☆与中药高剂量组比较,  $P < 0.01$ 。

表 4 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5、MUC5AC 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) 单位: $\beta$ -actin

组别	n	AQP3	AQP5	MUC5AC
空白组	6	2.05 ± 0.05	2.15 ± 0.08	0.28 ± 0.02
模型组	6	0.69 ± 0.08**	0.72 ± 0.05**	0.54 ± 0.01**
益肺健脾方高剂量组	6	1.66 ± 0.05##	1.77 ± 0.07##	0.35 ± 0.04##
益肺健脾方中剂量组	6	1.32 ± 0.02##☆	1.38 ± 0.06##☆	0.41 ± 0.02##☆
益肺健脾方低剂量组	6	0.91 ± 0.08##☆☆	0.95 ± 0.09##☆☆	0.48 ± 0.03##☆☆
氨溴索组	6	1.63 ± 0.06##	1.78 ± 0.05##	0.35 ± 0.03##
地塞米松组	6	1.73 ± 0.08##	1.82 ± 0.05##	0.32 ± 0.04##

注: \*\*与空白组比较,  $P < 0.01$ ; ##与模型组比较,  $P < 0.01$ ; ☆与中药高剂量组比较,  $P < 0.05$ ; ☆☆与中药高剂量组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

COPD 总属于中医学“咳嗽”“喘证”“肺胀”等范畴, 历代古书医籍中多有表述, 其病位先在肺, 继则至于脾肾, 病机总属标本本虚<sup>[18]</sup>, 病理因素为痰浊、水饮、血瘀, 其病程发展初期以气虚多见, 渐至气阴两虚, 后期气虚及阳, 肺脾气虚是病程发展的关键阶段, 咳嗽是其常见临证因素<sup>[19]</sup>。考慢性阻塞性肺疾病患者, 多因宿恙久羁, 肺虚体弱, 新感之机尤多, 故临床多见虚实同着一体者, 病势迁延; 且“脾为生痰之源, 肺为贮痰之器, 肾为生痰之本”, 痰饮停贮, 更致久咳不愈; 古语云: “久病必痰”, 久咳痰喘者, 肺宣发肃降失职, 津液代谢失常、血液运行不畅, 如此气滞血瘀, 更致咳喘不止, 是故益肺健脾之法, 刻不容缓。本实验采用玉屏风散合六君子汤化裁即益肺健脾方治疗 COPD, 方中黄芪、防风、白术、党参、茯苓、陈皮、半夏、款冬花、地龙、甘草, 各药相配, 共奏益气化痰之效。本实验旨在观察益肺健脾方高、中、低剂量对肺脾两虚型 COPD 模型大鼠支气管和肺组织中水通道蛋白 AQP3、AQP5 及黏蛋白 MUC5AC 表达情况的影响, 并选用对化痰、减轻炎症具有明确作用的氨溴索、地塞米松作为对照药物, 探讨益肺健脾方治疗慢性阻塞性肺疾病气道炎症及黏液高分泌的作用机制。

实验中观察到每组大鼠均出现不同数量的死亡(死亡大鼠及时剔除并予以补充), 在使用香烟烟熏法联合脂多糖气管滴注及番泻叶灌胃复制肺脾两虚型 COPD 模型大鼠过程中, 发现气管滴注 LPS 后, 大鼠病死率升高, 这可能与 LPS 诱导大鼠急性肺损伤有关<sup>[20]</sup>。空白组大鼠生长发育状况良好, 精神佳, 行动敏捷, 被毛光滑、梳理良好。模型组大鼠精神萎靡, 行动迟缓, 蜷卧少动, 被毛凌乱、毛发污染, 弓背, 异常呼吸, 食欲减退, 体质量偏低。随用药天数增加, 益肺健脾方高、中、低剂量组、氨溴索组及地塞米松组大鼠, 大鼠精神状态均较前改善, 可见进食量、体质量增加, 且被毛比模型组更有光泽, 尤其是在益肺健脾方高剂量组、氨溴索组和地塞米松组中, 改善效果尤为显著。

对 AQP3、AQP5、MUC5AC 3 个指标的研究发现, 益肺健脾方可提高肺脾两虚型 COPD 模型大鼠支气管和肺组织中 AQP3、AQP5 的 mRNA 和蛋白表达, 降低 MUC5AC 的 mRNA 和蛋白的表达。水通道蛋白是高度保守的跨膜通道, 构建为四聚体, 每个单体由约 320 个氨基酸组成, 分子量为 28 kD<sup>[21]</sup>, 其介导跨细胞液体运动, 是维持体内水液平衡必不可少的基础蛋白, 目前研究表明, 哺乳动物中已发现 13 种 AQP (AQP0 - AQP12), 呼吸系统中存在 4 种 (AQP1、3、4、5), 参与调节肺内水液的吸收与转运, 其细胞分布广泛, 包括气道上皮、肺泡上皮、相关微血管内皮和黏膜下腺等, 其中 AQP3 在基底上皮细胞(鼻咽和大气道)中表达, AQP5 在肺泡 I 型上皮细胞和黏膜下腺的腺泡上皮细胞中表达<sup>[7, 22-23]</sup>。黏蛋白是一类高分子量、重糖基化蛋白, 呼吸道黏蛋白主要为 MUC5AC 及 MUC5B, 与气道黏液高分泌密切相关<sup>[24-25]</sup>。已知 COPD 发病机制多与炎症相关<sup>[26-27]</sup>, 且气道黏液高分泌被认为是主要病理变化<sup>[28]</sup>, TOWNE 等首次发现 AQP1、AQP5 在肺部感染中表达降低<sup>[29]</sup>, ANURADHA 等证实, AQP1、AQP3、AQP5 可作为炎症标志物发挥关键作用<sup>[30]</sup>, 付海晶等<sup>[31]</sup>、吴振起等<sup>[32]</sup>均发现, AQP5、MUC5AC 与 COPD 密切相关, 故本实验选取 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 作为实验指标。

水通道蛋白的转录调控机制尚不明确, 但 AQP3 在启动子区域具有多种反应元件和转录因子结合位点, 如雌激素反应元件(ERE)、ROR/REV - ERB - 反应元件(RORE)、SP1 位点、FOXA1 位点, 使其选择性充当水甘油通道蛋白<sup>[33]</sup>。参与 COPD 炎症反应的细胞, 在经历渗透微环境的改变时, 导致细胞水力通透性和大小增加, 从而改变细胞骨架结构<sup>[34]</sup>。RABOLLI 等强调了 AQP3 可能参与炎症过程的发展<sup>[35]</sup>, ZHU 等提出 AQP3 参与吞噬体形成<sup>[36]</sup>。AQP5 是人类染色体 12q13 上的单拷贝基因, 内含子 3 (rs3736309) 中的单核苷酸多态性(SNP)与中国人人群中 COPD 的存在有关<sup>[37]</sup>, VERKMAN 等指出<sup>[38]</sup>, 人 AQP5 表达降低与 COPD 和肺功能降低的患者气道中黏液过量产生有关。此外, 吸烟已被证明可以减弱 COPD 患者黏膜下腺体中 AQP5 的表达<sup>[39-40]</sup>。近年来, AQPs 的表达与非小细胞肺癌关系密切<sup>[41]</sup>, 且 AQP3 与肠道菌群失调相关<sup>[42]</sup>, 据称 AQP5 还可以通过影响黏蛋白 MUC5AC 的分泌来促进肿瘤细胞的迁移<sup>[43]</sup>, 为本课题组进一步开展深入研究提供理论依据。

总之, 本实验通过结合烟熏法、LPS 气管滴注及番泻叶灌胃, 成功构建了肺脾两虚型 COPD 大鼠模型, 并使用益肺健脾方干预 COPD 大鼠模型, 通过上调 AQP3、AQP5, 降低 MUC5AC 表达, 抑制 COPD 气道炎症和黏液高分泌, 证实了水通道蛋白 AQP3、AQP5 是益肺健脾方发挥抑制气道炎症和黏液高分泌的潜在靶点之一, 为临床用药提供依据。

### 参考文献

- [1] KLAUS F RABE, SUZANNE HURD, ANTONIO ANZUETO, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2007(6): 532 - 555.
- [2] KAUR MANPREET, CHANDEL JITENDER, MALIK JAI, et al. Particulate matter in COPD pathogenesis: an overview [J]. Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society, 2022(7/8): 797 - 815.
- [3] 彭鑫, 刘健, 栾哲宇, 等. 慢性阻塞性肺疾病气道黏液高分泌的发病机制及中医药干预的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(4): 228 - 239.

- [4] 丁乙洪,陈圆,李秀华,等. 中医药治疗慢性阻塞性肺疾病研究进展[J]. 中医研究,2023,36(10):88-92.
- [5] 徐梦娇,晏军,张迪,等. 中医药多靶点治疗慢性阻塞性肺疾病机制的研究概论[J]. 世界中医药,2023,18(16):2396-2401.
- [6] BHATTACHARYA SUKANTA S., YADAV BRIJESH, YADAV EKTA, et al. Differential modulation of lung aquaporins among other pathophysiological markers in acute (Cl<sub>2</sub> gas) and chronic (carbon nanoparticles, cigarette smoke) respiratory toxicity mouse models [J]. *Frontiers in Physiology*,2022(8):80815.
- [7] MARINA A. CREED, ENRIQUE BALLESTEROS, L. JOHN GREENFIELD JR, et al. Mild COVID-19 infection despite chronic B cell depletion in a patient with aquaporin-4-positive neuromyelitis optica spectrum disorder. [J]. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 2020 (prepublish):102199
- [8] ALLNOCH LISA, BEYTHIEN GEORG, LEITZEN EVA, et al. Vascular inflammation is associated with loss of aquaporin 1 expression on endothelial cells and increased fluid leakage in SARS-CoV-2 infected golden syrian hamsters[J]. *Viruses*,2021(4):639.
- [9] YADAV E, YADAV N, HUS A, et al. Aquaporins in lung health and disease: Emerging roles, regulation, and clinical implications [J]. *Respir Med*,2020,174:106193.
- [10] 王胜,张念志,季红燕,等. 益肺健脾中药对 COPD 气道炎症作用的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2002,22(6):462.
- [11] 王胜,季红燕,张念志,等. 益肺健脾方对 COPD 患者痰液炎症细胞计数和 IL-8、TNF- $\alpha$  水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(2):111-113.
- [12] 王胜,季红燕,张念志,等. 益肺健脾方改善 COPD 患者肺功能及营养状况[J]. 中国临床康复,2005,9(31):141-143.
- [13] 徐晨,李春颖,王胜. 益肺健脾方降低香烟烟雾诱导的人支气管上皮细胞的炎性损伤和黏液高分泌:基于抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路[J]. 南方医科大学学报,2023,43(4):507-515.
- [14] 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(8):51-52,73-74.
- [15] 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.
- [16] 张旭辉,孙杰,桑凯,等. 肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病大鼠血清 Ghrelin、Obestatin 的动态表达[J]. 西部中医药,2020,33(3):21-25.
- [17] 陈小野. 实用中医证候动物模型学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1992:286.
- [18] 李建生. 慢性阻塞性肺疾病中医康复指南[J]. 世界中医,2020,15(23):3710-3718.
- [19] 钟相根,祝小惠,郑子安,等. 论“痰”在慢性阻塞性肺疾病发病及治疗中的重要性[J]. 中华中医药杂志,2012,27(12):3159-3161.
- [20] EHRENTAUT H, WEISHEIT C K, FREDE S, et al. Inducing acute lung injury in mice by direct intratracheal lipopolysaccharide instillation[J]. *J Vis Exp*,2019,6(149):2013.
- [21] 李想,孔令俊,邓叶龙,等. 基于“宗气”理论探讨慢性阻塞性肺疾病发展为慢性肺源性心脏病的病因病机[J]. 实用中医内科杂志,2024,38(9):128-130
- [22] 轩银霜,卞晴晴,李亚,等. 中药对肺部炎症性疾病水通道蛋白影响的实验研究进展[J]. 中药药理与临床,2021,37(2):221-227.
- [23] 程静,王平. 从津液角度探讨肺与大肠相表里的生物学基础[J]. 中国中医药现代远程教育,2019,17(10):102-105.
- [24] LI J, YE Z. The Potential role and regulatory mechanisms of MUC5AC in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Molecules*, 2020,25(19):4437.
- [25] 侯红豆,张利英,李洋洋,等. 慢性阻塞性肺疾病中黏蛋白 5AC 生成增多的机制及中医药干预研究进展[J]. 中医药学报,2024,52(2):108-115.
- [26] 张玥,丁宁,王胜. 益肺健脾方对慢性阻塞性肺疾病大鼠血清和 BALF 中炎症因子水平的影响[J/OL]. 安徽中医药大学学报:1-11[2024-03-09].
- [27] ZHU X Y, MENG X B, LEI N, et al. Chinese herbal injections plus Western Medicine on inflammatory factors for patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and network meta-analysis. [J]. *Journal of thoracic disease*, 2023(4):1901-1918.
- [28] YANG R, WU X, GOUNNI A S, et al. Mucus hypersecretion in chronic obstructive pulmonary disease: From molecular mechanisms to treatment [J]. *J Transl Int Med*,2023,11(4):312-315.
- [29] TOWNE J E, KRANE C M, BACHURSKI C J, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells [J]. *J Biol Chem*,2001,276(22):18657-18664.
- [30] ANURADHA KALITA, MANAS DAS. Aquaporins (AQP5) as a marker in the physiology of inflammation and its interaction studies with garcinol. [J]. *Inflammopharmacology*,2024(2):1575-1592.
- [31] 付海晶. 苏子降气汤对 COPD 模型大鼠 MUC5AC、AQP5 的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [32] 吴振起,刘光华,张天宇. 养阴清肺汤加味对肺炎支原体感染小鼠肺内水液代谢的影响[J]. 时珍国医国药,2023,34(4):769-773.
- [33] YDE JONATHAN, KEELY STEPHEN J, MOELLER HANNE B. Expression, regulation and function of Aquaporin-3 in colonic epithelial cells [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,2021(7):183619.
- [34] ROBERT MAIDHOF, TIMOTHY JACOBSEN, ANGELOS PAPA-THODOROU, et al. Inflammation induces irreversible biophysical changes in isolated nucleus pulposus cells. [J]. *PLoS ONE*,2017(6):e99621.
- [35] RABOLLI VIRGINIE, WALLEMME LAURENT, LO RE SANDRA, et al. Critical role of aquaporins in interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced inflammation. [J]. *The Journal of biological chemistry*,2014(20):13937-13947.
- [36] ZHU N A, FENG X C, HE C Y, et al. Defective macrophage function in aquaporin-3 deficiency [J]. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*,2011(12):4233-4239.
- [37] LEE M D, BHAKTA K Y, RAINA S, et al. The human Aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization [J]. *J Biol Chem*,1996,271(15):8599-8604.
- [38] VERKMAN A S, MATTHAY M A, SONG Y. Aquaporin water channels and lung physiology [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000,278(5):L867-879.
- [39] WANG K, FENG Y L, WEN F Q, et al. Decreased expression of human aquaporin-5 correlated with mucus overproduction in airways of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007,28(8):1166-1174.
- [40] D'AGOSTINO C, PARISIS D, CHIVASSO C, et al. Aquaporin-5 Dynamic Regulation [J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(3):1889.
- [41] LIN G, CHEN L, LIN L, et al. Comprehensive analysis of aquaporin superfamily in lung adenocarcinoma [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8:736367.
- [42] 余远盼,林桂梅,李医名,等. 生、制枳实换用的枳实芍药散对便秘型肠易激综合征大鼠“脑-肠-菌”轴功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(9):1-9.
- [43] JASKIEWICZ L, ROMASZKO-WOJTOWICZ A, DOBOSZYNSKA A, et al. The role of aquaporin 5 (AQP5) in lung adenocarcinoma: a review article [J]. *Cells*,2023,12(3):468.

# 益肺健脾方对肺脾两虚型慢性阻塞性肺疾病模型大鼠支气管肺组织 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 的影响

(正文见 42 - 46 页)

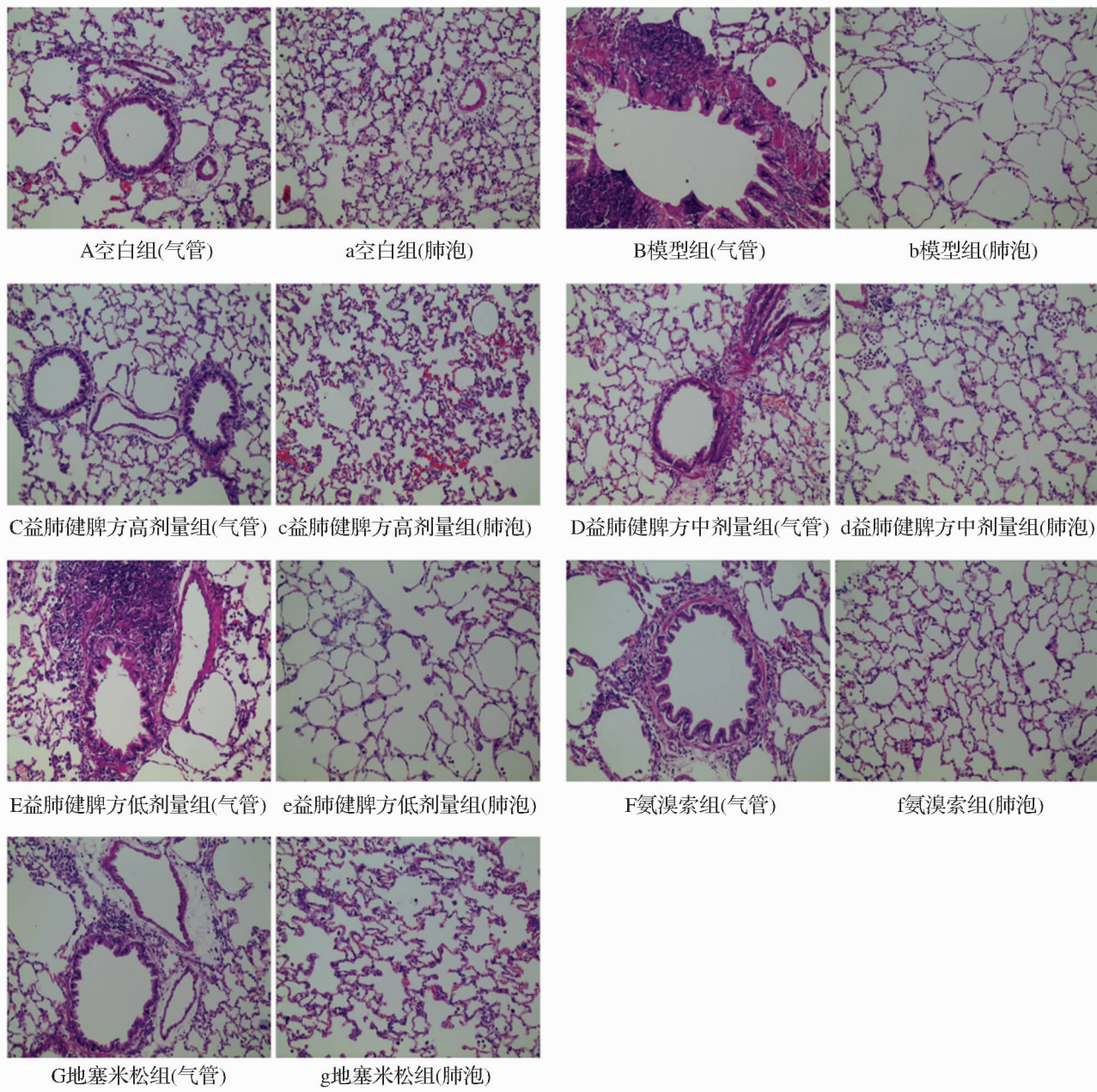


图1 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 HE 染色 (×200)

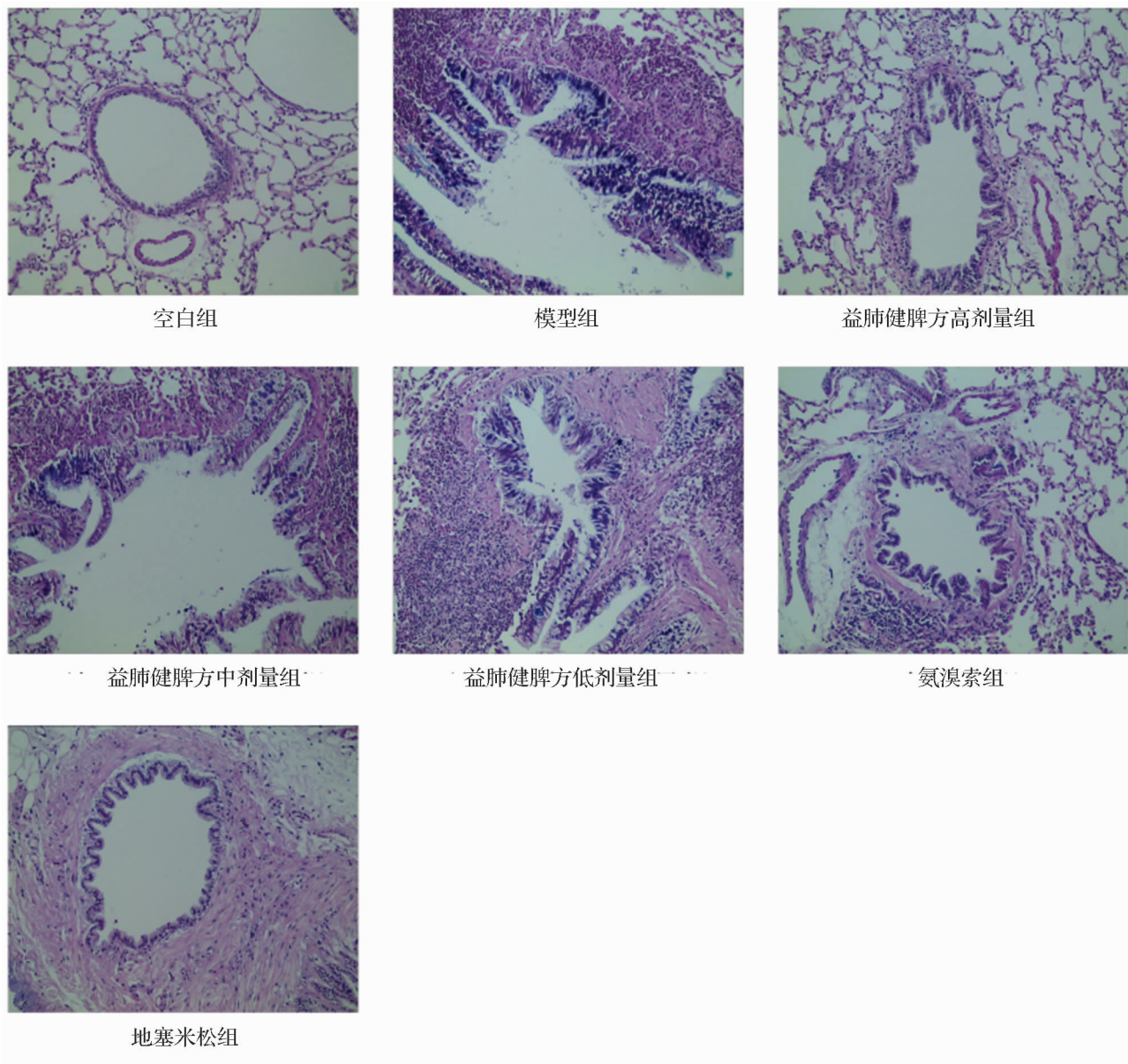


图2 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AB - PAS 染色 ( ×200 )

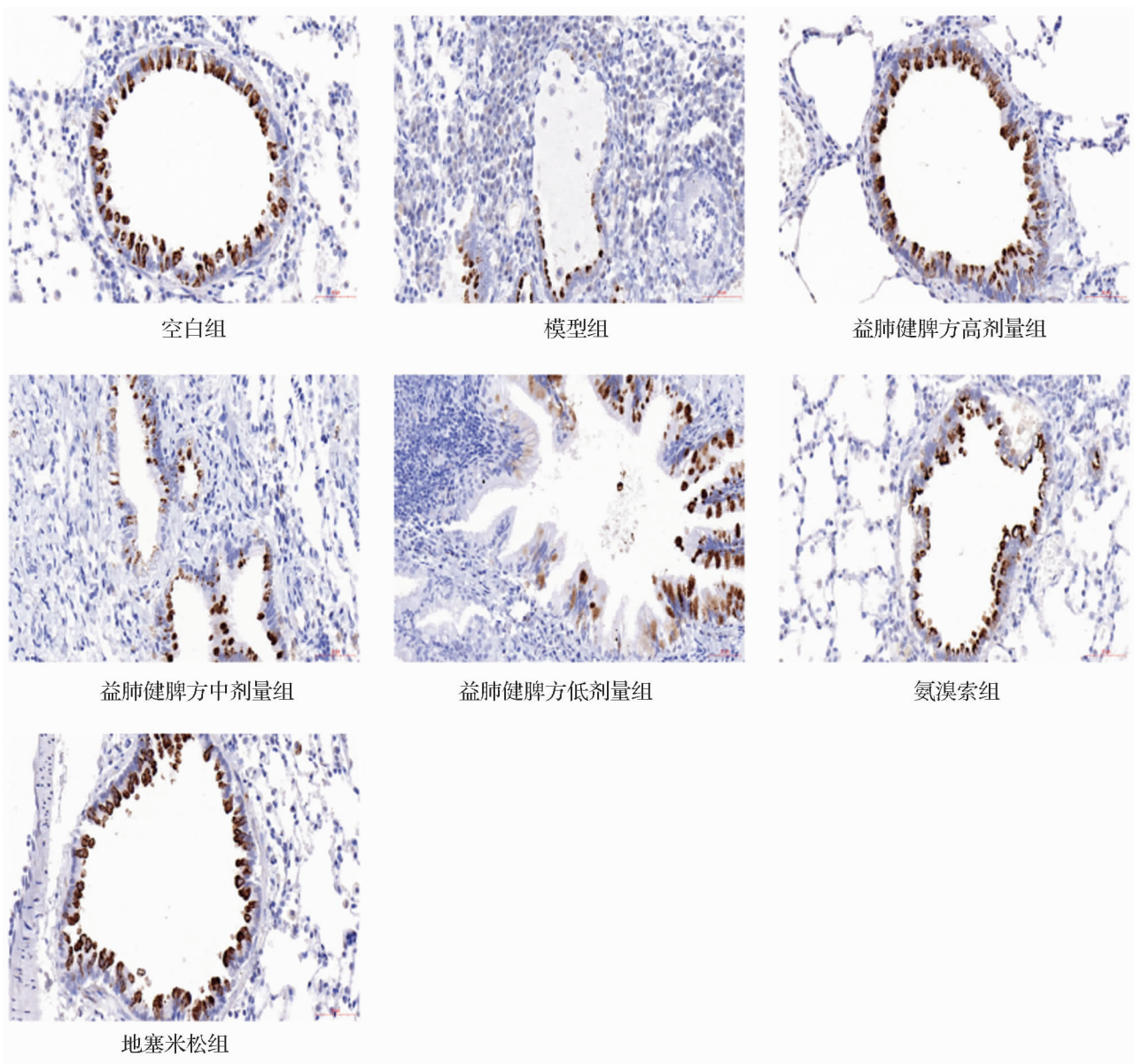


图3 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AQP3 表达强度

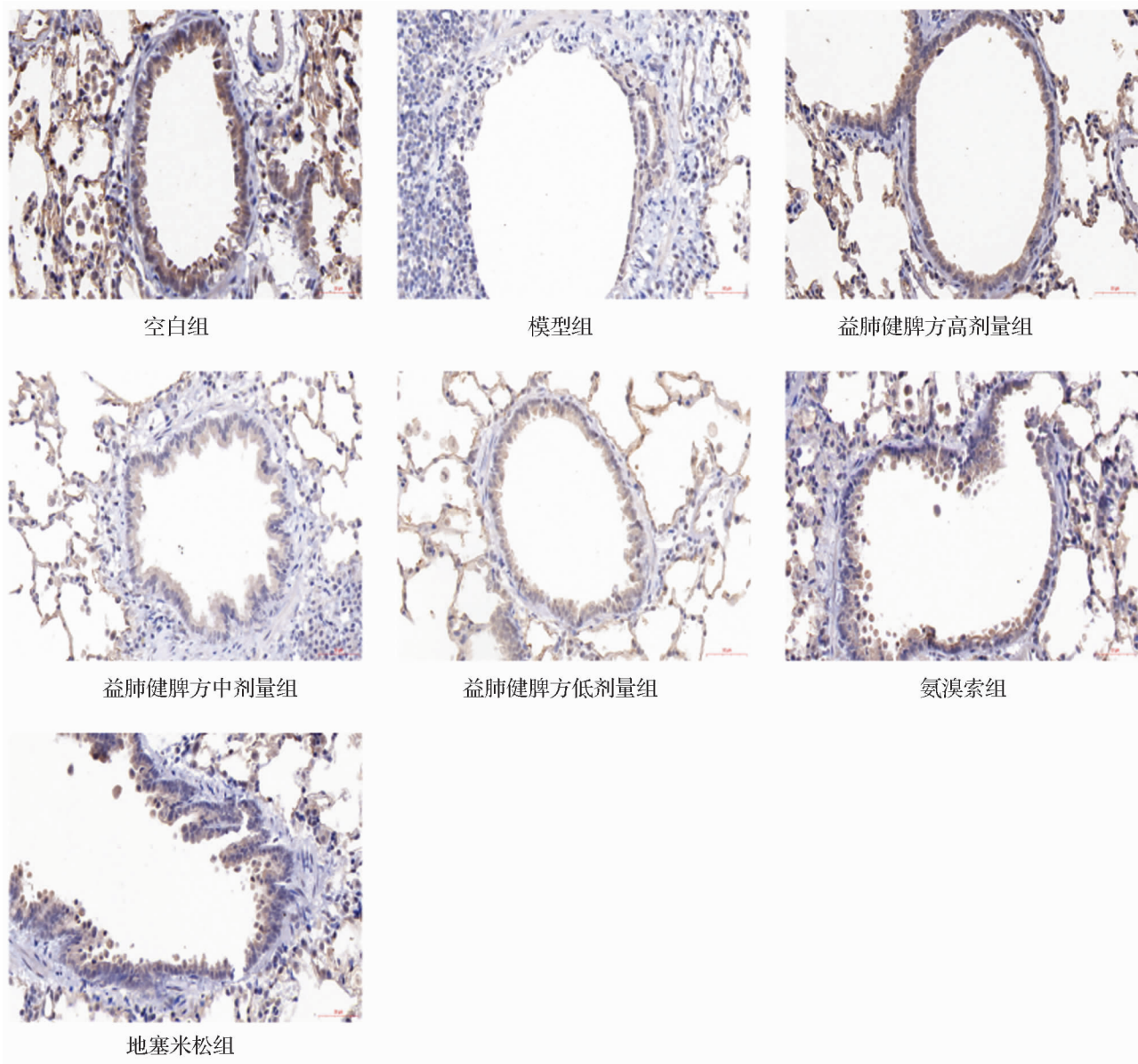


图4 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AQP5 表达强度

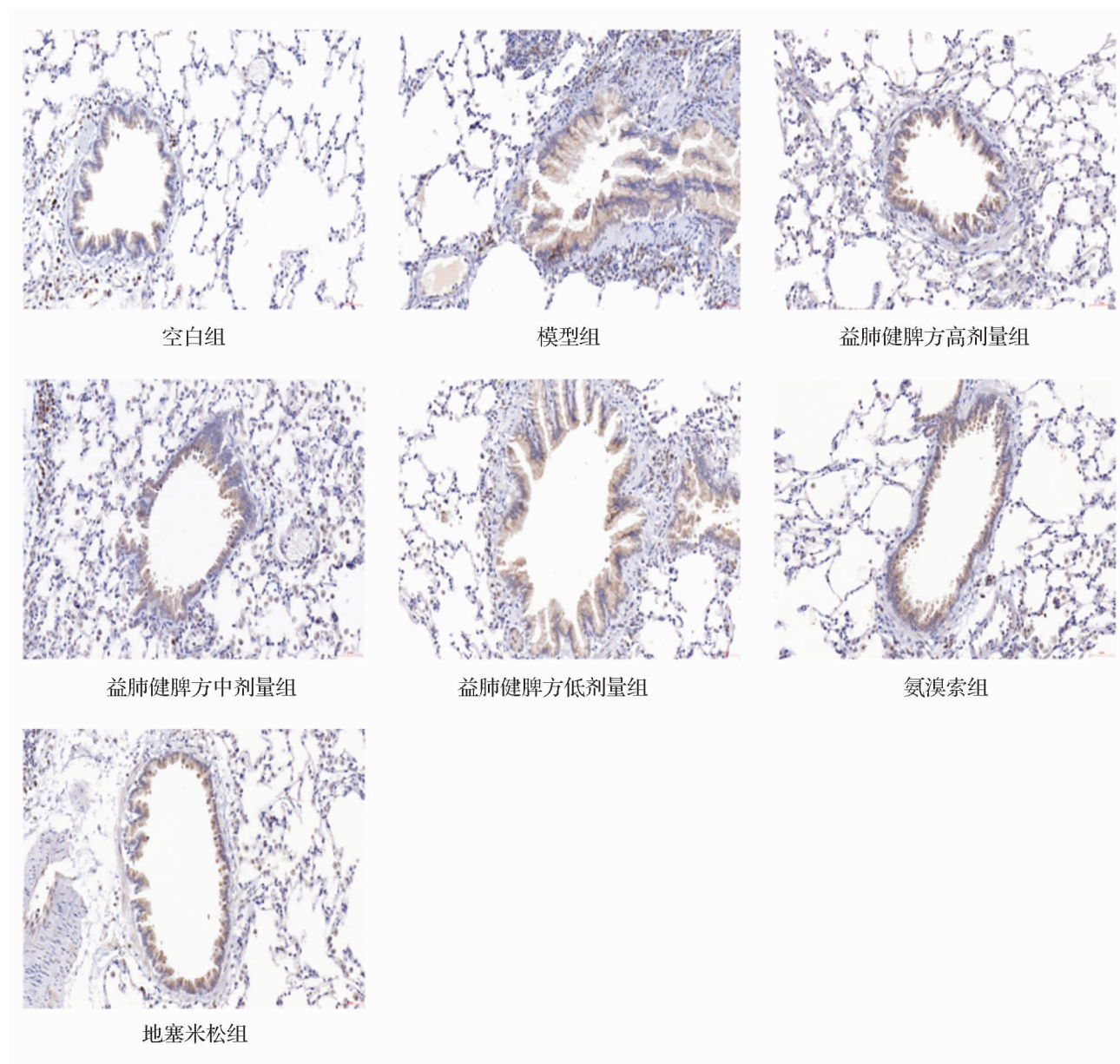
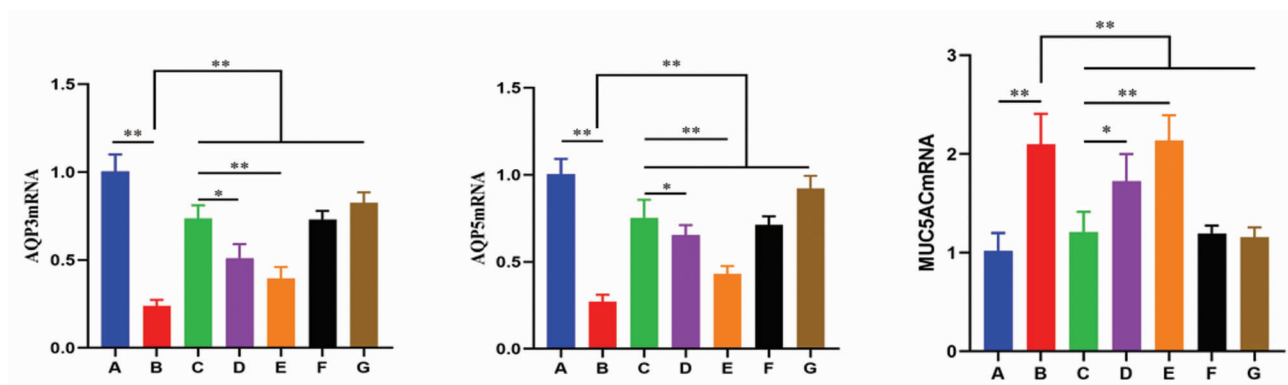
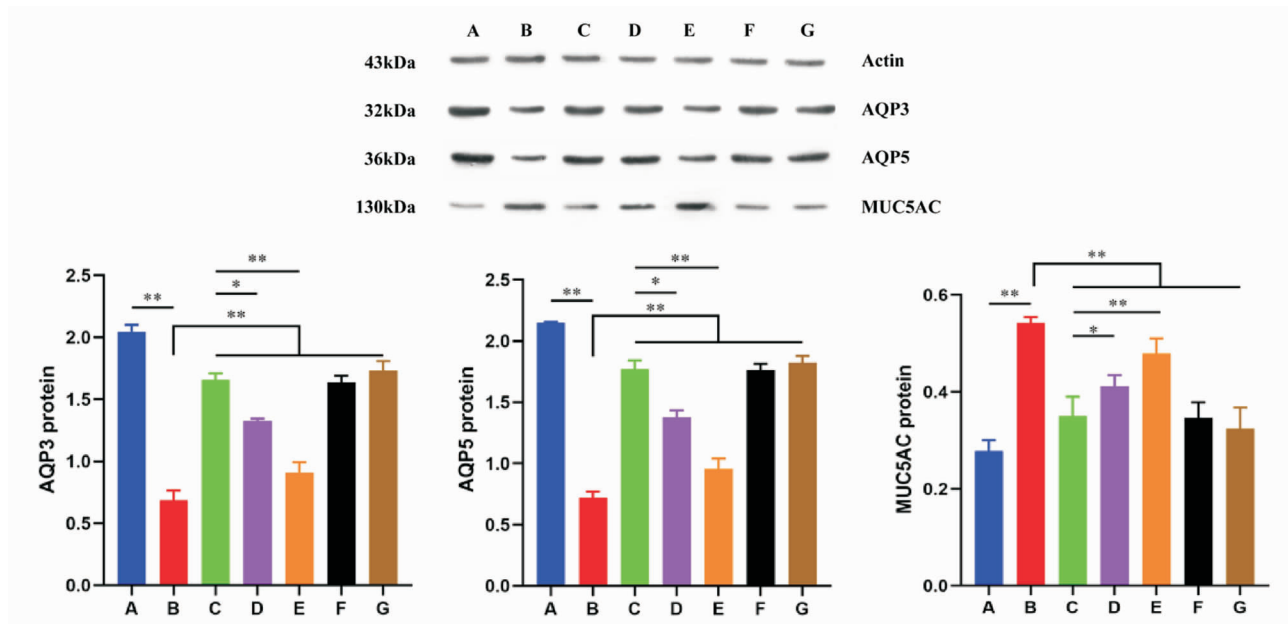


图5 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 MUC5AC 表达强度



注:A.空白组;B.模型组;C.中药高剂量组;D.中药中剂量组;E.中药低剂量组;F.氨溴索组;G.地塞米松组; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ 。

图6 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AQP3mRNA、AQP5mRNA 及 MUC5ACmRNA 平均相对表达量



注:A.空白组;B.模型组;C.中药高剂量组;D.中药中剂量组;E.中药低剂量组;F.氨溴索组;G.地塞米松组; \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ 。

图7 各组肺脾两虚型 COPD 大鼠 AQP3、AQP5 及 MUC5AC 蛋白表达