

二陈汤加味对 COPD 急性期患者 CC16,SP-D 及 HAT/HDAC 的影响

尚立芝¹, 季书¹, 谢文英^{1*}, 薛红莉², 刘志勇³, 刘坦¹, 张静¹,
杜红妍⁴, 李进京¹, 孙春阳¹, 刘晓蕙¹, 梁娟娟¹, 张森¹, 王祎¹

(1. 河南中医药大学 基础医学院, 郑州 450046; 2. 河南医学高等专科学校, 郑州 451191;
3. 河南中医药大学 第二附属医院, 郑州 450008; 4. 河南省人民医院, 郑州 450003)

[摘要] **目的:**观察二陈汤加味对 COPD 急性期加重期(acute exacerbation period of COPD,AECOPD)患者血浆、呼气冷凝液(exhale breath condensat,EBC)中克拉拉细胞蛋白(Clara cell protein,CC16),肺表面活性蛋白-D(pulmonary surfactant associated protein-D,SP-D)含量及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)中组蛋白乙酰基转移酶(histone acetyl transferase,HAT)及组蛋白去乙酰基酶(histone deacetylase,HDAC)活性的影响,评价二陈汤加味对 AECOPD 的作用及机制。**方法:**选取符合纳入标准 AECOPD 患者 200 例,随机分成对照组和治疗组,每组 100 例。两组均在西医常规治疗的基础上,对照组给予安慰剂,治疗组接受二陈汤加味治疗,疗程 14 d。检测肺功能,酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定血浆,EBC 中白细胞介素-17(interleukin-17,IL-17),C 反应蛋白(C-reactive protein,CRP),CC16,SP-D 及 PBMC 中 HDAC1,HDAC2 浓度。酶联免疫荧光法测定 PBMC 中 HAT 及 HDAC 活性。**结果:**与对照组治疗后比较,治疗组血浆及 EBC 中 CRP,IL-17,CC16 和 SP-D 水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),PBMC 中 HAT 活性明显降低($P<0.05$),HDAC 活性,HDAC2 含量均明显增高($P<0.05$)。**结论:**二陈汤加味可能调整 HAT/HDAC 的平衡,发挥抗炎作用,保护气道和肺的结构与功能。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;二陈汤;克拉拉细胞蛋白;肺表面活性蛋白 D;组蛋白乙酰基转移酶;组蛋白去乙酰基酶

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)10-0163-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017100163

Effect of Modified Erchentang on CC16, SP-D and HAT and HDAC in Patients at Acute Exacerbation Stage of COPD

SHANG Li-zhi¹, JI Shu¹, XIE Wen-ying^{1*}, XUE Hong-li², LIU Zhi-yong³, LIU Tan¹, ZHANG Jing¹,
DU Hong-yan⁴, LI Jin-jing¹, SUN Chun-yang¹, LIU Xiao-hui¹, LIANG Juan-Juan¹, ZHANG Miao¹, WANG Yi¹
(1. School of Basic Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 3. The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China; 4. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To study of the effect and mechanism of modified Erchentang on Clara cell protein (CC16), pulmonary surfactant associated protein-D (SP-D), histone acetyl transferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC) in patients at acute aggravating stage of COPD. **Method:** Totally 200 cases at acute

[收稿日期] 20160914(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573881);郑州市科技领军人才项目(121PLJRC535);河南省高等学校重点科研项目(15A360030);河南省重点科技攻关项目(152102310337);河南省中医药科学研究专项(2013ZY02070);河南中医药大学大学生创新学习项目(CXXM[2016]0019,CXXM[2016]0041)

[第一作者] 尚立芝,教授,从事中药作用机制研究,E-mail:lzshang2014@163.com

[通讯作者] * 谢文英,教授,从事中医药治疗肺系疾病的临床研究,E-mail:xiewenying1963@163.com

exacerbation period of COPD (AECOPD) were randomly divided into modified Erchentang group and placebo-controlled group, with 100 cases in each group. In addition to western drugs, modified Erchentang was also used in the modified Erchentang group, and placebo was also used in control group for 14 days. Their pulmonary function was detected, and euzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the levels of C-reactive protein (CRP), interleukin-17 (IL-17), CC16, SP-D, HDAC1 and HAD2 in plasma and exhaled breath condensate of all groups. The activities of HAT and HDAC were determinate by enzyme-linked immune fluorescence. **Result:** The activity of HDAC2 was higher significantly, but the levels of CRP, IL-17, CC16 and SP-D ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in plasma and exhaled breath condensate, and the activity of HAT were significantly decreased in treatment group with modified Erchentang, compared with those in control group. **Conclusion:** Modified Erchentang may have an effect on COPD by adjusting the HAT/HDAC, reducing levels of CRP, IL-17, CC16 and SP-D, preventing inflammation progress and improving the structure and function of respiratory system and lungs.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Erchentang; Clara cell protein (CC16); pulmonary surfactant associated protein-D (SP-D); histone acetyl transferase (HAT); histone deacetylase (HDAC)

阻塞性肺疾病(COPD)以气流受限为特征的呼吸系统常见病,其病理基础是炎症^[1-4]。白细胞介素-17(IL-17)和C反应蛋白(CRP)参与COPD的炎症过程,克拉拉细胞蛋白(CC16)和肺表面活性蛋白D(SP-D)可直接反映气道和肺的损伤程度^[5-10]。组蛋白的乙酰化与炎症介质基因表达和炎细胞增多有关^[11],组蛋白乙酰化酶(HAT)/去乙酰化酶(HDAC)失衡在COPD的炎症中起着重要的调节作用^[12]。宋代《太平惠民和剂局方》中的二陈汤,具有化痰燥湿,和中理气之功效。本课题组前期临床和实验研究证实,基于二陈汤加减的爱罗咳喘宁对COPD有抗炎作用^[13-15],但其抗炎的机制仍需探究。本研究采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定COPD急性期加重期(AECOPD)患者血浆、呼气冷凝液(EBC)中IL-17,CRP,CC16和SP-D,荧光免疫法检测外周血单个核细胞(PBMC)中的HAT和HDAC活性,探讨二陈汤加味对COPD患者肺组织的保护以及抗炎的机制,为二陈汤加味治疗COPD提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 河南中医药大学第一附属医院、第二附属医院、第三附属医院、河南省人民医院、河南医学高等专科学校附属医院及郑州市新华中医院呼吸科2012年1月至2016年8月门诊及住院AECOPD患者200例,随机分为治疗组与对照组,各100例。治疗组男57例,女43例,年龄(69.48±9.05)岁,平均病程(25.05±5.03)月。对照组100例,男55例,女45例,年龄(70.39±8.84)岁,平均病程(27.02±6.41)月。两组年龄、体重、病程等比

较,差异无统计学意义,具有可比性。

1.2 诊断标准 所有AECOPD患者诊断标准均参照中华医学会呼吸系统疾病学会《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)》^[1]和慢性阻塞性肺疾病全球议(GOLD)所增加的对AECOPD诊断标准^[2]。AECOPD患者主要表现为短期内咳嗽、咳痰、痰量增多,呈脓性或黏液脓性,胸膈满闷、甚则气喘痰鸣,气短和(或)喘息加重,舌淡苔白腻,脉滑。可伴发热等炎症明显加重的表现。中医辨证参照《呼吸病学》^[3]“喘证”及“肺胀”中痰湿阻肺证的诊断标准和《中药新药临床研究指导原则》^[4]中相关痰湿阻肺证标准。

1.3 纳入标准 经上述诊断标准确定为AECOPD的患者;年龄60~80岁;肺功能属Ⅰ~Ⅳ级;患者无明显过敏疾病史;所有患者经伦理委员会批准,患者知情并均签署知情同意书。

1.4 排除标准 ①合并其他肺部疾病者;②合并全身其他系统疾病者;③合并严重心功能不全者;④神志不清、痴呆、各种精神病患者患者依从性差所致未按规定服药者;⑤合并严重肝、肾功能损害者;⑥病例脱落者、临床资料不全及其他不符合纳入标准者。

1.5 治疗方法 两组患者在常规治疗(支气管扩张剂、抗生素控制感染、吸氧等,必要时行机械性通气)的基础上,对照组给予安慰剂,治疗组给予二陈汤加味方药:麻黄(炙)6g(批号1403125),党参10g(批号1407002w),茯苓10g(批号1405004w),陈皮10g(批号1302001H),白术10g(批号1403003s),苍术10g(批号1405001w),葶苈子10g(批号1308001s),姜半夏12g(批号1404001s),苦

杏仁 10 g (批号 1410004s), 山药 10 g (批号 1405002s), 干姜 6 g (批号 1402001w), 甘草 5 g (批号 1302001s) 等, 药物均为中药配方颗粒, 由华润三九医药股份有限公司提供。疗程为 14 d, 14 d 后评价疗效。

1.6 疗效评价 参照诊断及辨证标准^[14], 以临床症状、体征综合进行疗效评价。共分为 4 个等级: 临床控制、显效、有效、无效。将前 3 者合称为有效, 作为计算总有效率的依据。

1.7 肺功能测定 采用 MasterScreen PFT 型肺功能仪(德国 Jaeger 公司)测定患者治疗前后的肺功能, 测 1 s 用力呼气容积 (FEV₁), 用力肺活量 (FVC), FEV₁ 和 FEV₁/FVC。

1.8 AECOPD 实验室指标检测 治疗前后取 AECOPD 患者肘静脉血, 置于含有乙二胺四乙酸 (EDTA) 的离心管中, 待测血常规。置于肝素抗凝管中, 离心取上清液, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血浆中 CRP, IL-17, CC16, SP-D 浓度, 标本处理、测定步骤和含量计算均严格按照试剂盒说明书进行, CRP, IL-17, CC16, SP-D 试剂盒购自博士德生物工程有限公司, 批号分别为 EK1316, EK0430, EK1167, EK1171。

PBMC 分离, 取外周血沉淀物与等量生理盐水混匀, 加入淋巴细胞分离液, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 离心后分 3 层, 用毛细吸管吸取上、中层界面处白色云雾层单个核细胞, 放入离心管中, 加 5 倍以上生理盐水, 1 万 r·min⁻¹ 离心 1 min, 洗涤 2 次, ELISA 法检测 PBMC 中 HDAC1 和 HDAC2 含量, 按照试剂盒说明书进行, HDAC2, HDAC1 试剂盒购自 Abnova 公司, 批号分别为 KA2746, KA2744。

酶联免疫荧光法测定 PBMC 中 HAT 及 HDAC 活性, HDAC 活性按照 Amplite 荧光法试剂盒 (Bioquest 公司, 批号 AAT-13601) 说明书检测, HAT 活性按照试剂盒 (Abnova 公司, 批号 KA0782) 说明书检测。

呼气冷凝液 (EBC) 的制备与检测, 采用 Jaeger 公司生产的 EBC 收集器, 收集患者治疗前后的 EBC, 受试者用口平静呼吸 15 min, 呼出气体遇冷 (-18 ℃) 凝集成液体, 收集 EBC。-80 ℃ 冰箱保存待测。ELISA 法检测呼气冷凝液中 CRP, IL-17, CC16, SP-D 水平, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用

方差分析; 相关性检验用 Spearman 等级相关分析; 计数资料以 % 表示, 采用 Radit 进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者总有效率比较 与对照组比较, 治疗组总有效率明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组患者总有效率比较 ($n = 100$)
Table 1 Comparison of total effective rate between two groups ($n = 100$)

组别	临床控制/例	显效/例	有效/例	无效/例	总有效率/%
治疗	26	45	21	8	92 ¹⁾
对照	20	36	24	20	80

注: 与对照组治疗后比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 两组患者治疗前后肺功能比较 与本组治疗前比较, 治疗组治疗后 FEV₁, FEV₁% 均明显增大 ($P < 0.05$)。治疗组治疗后 FEV₁, FEV₁% 均显著大于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者治疗前后肺功能变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 100$)
Table 2 Comparison of lung function changes between two groups of AECOPD patients before and after treatment ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

组别	时间	FVC/L	FEV ₁ /L	FEV ₁ /FVC/%
治疗	治疗前	2.25 ± 0.02	1.19 ± 0.01	52.89 ± 0.50
	治疗后	3.05 ± 0.06 ¹⁾	2.15 ± 0.02 ²⁾	70.52 ± 0.33 ^{1,2)}
对照	治疗前	2.31 ± 0.04	1.20 ± 0.03	51.96 ± 0.75
	治疗后	2.75 ± 0.04	1.85 ± 0.02 ¹⁾	67.56 ± 0.50 ¹⁾

注: 与本组治疗前比较¹⁾ $P < 0.05$; 与对照组治疗后比较²⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 两组患者治疗前后 CRP, IL-17, CC16 和 SP-D 含量比较 与本组治疗前比较, 治疗组治疗后血浆中 CRP, IL-17, CC16, SP-D 含量均明显减少 ($P < 0.05$)。治疗后治疗组 CRP, IL-17, CC16 和 SP-D 均明显低于对照组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

与本组治疗前比较, 治疗组治疗后呼气冷凝液中 CRP, IL-17, CC16 和 SP-D 均明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。治疗后治疗组 CRP, IL-17, CC16, SP-D 均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 两组患者 PBMC 中 HAT 和 HDAC 活性比较 与本组治疗前比较, 治疗组外周血单个核细胞中 HAT 活性明显降低 ($P < 0.05$), HDAC 活性, HDAC2 含量均明显增高 ($P < 0.05$)。治疗后治疗组 HAT 明显低于对照组 ($P < 0.05$), HDAC 活性, HDAC2 含量均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 3 两组患者治疗前后血浆中 CRP,IL-17,CC16,SP-D 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

Table 3 Comparison of changes in CRP, IL-17, CC16, SP-D between two groups of patients before and after treatment($\bar{x} \pm s, n = 100$)					
$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$					
组别	时间	CRP	IL-17	CC16	SP-D
治疗	治疗前	1. 58 $\pm$ 0. 33	1. 46 $\pm$ 0. 36	0. 65 $\pm$ 0. 02	283. 71 $\pm$ 23. 51
	治疗后	0. 63 $\pm$ 0. 34 ^{1,2)}	0. 56 $\pm$ 0. 40 ^{1,2)}	0. 31 $\pm$ 0. 07 ^{1,2)}	153. 42 $\pm$ 20. 16 ^{1,3)}
对照	治疗前	1. 55 $\pm$ 0. 12	1. 42 $\pm$ 0. 28	0. 56 $\pm$ 0. 23	281. 58 $\pm$ 25. 15
	治疗后	0. 56 $\pm$ 0. 25 ¹⁾	1. 15 $\pm$ 0. 25 ¹⁾	0. 41 $\pm$ 0. 22 ¹⁾	231. 73 $\pm$ 24. 32 ¹⁾

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P < 0. 05$;与对照组治疗后比较²⁾ $P < 0. 05$,³⁾ $P < 0. 01$ (表 5 同)。

表 4 两组 AECOPD 患者治疗前后呼气冷凝液中 CRP,IL-17,CC16 和 SP-D 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

Table 4 Comparison of CRP, IL-17, CC16 and SP-D in exhaled breath condensate between two groups of AECOPD patients before and after treatment($\bar{x} \pm s, n = 100$)					
$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$					
组别	时间	CRP	IL-17	CC16	SP-D
治疗	治疗前	1. 87 $\pm$ 0. 24	1. 25 $\pm$ 0. 12	1. 96 $\pm$ 0. 08	265. 41 $\pm$ 11. 34
	治疗后	0. 45 $\pm$ 0. 15 ^{1,3)}	0. 48 $\pm$ 0. 23 ^{1,3)}	0. 52 $\pm$ 0. 03 ^{2,3)}	103. 52 $\pm$ 12. 41 ^{2,3)}
对照	治疗前	1. 85 $\pm$ 0. 31	1. 22 $\pm$ 0. 23	1. 89 $\pm$ 0. 05	258. 00 $\pm$ 13. 36
	治疗后	0. 89 $\pm$ 0. 04 ¹⁾	0. 82 $\pm$ 0. 22 ¹⁾	0. 97 $\pm$ 0. 04 ¹⁾	125. 00 $\pm$ 16. 12 ¹⁾

注:与本组治疗前比较¹⁾ $P < 0. 05$,²⁾ $P < 0. 01$;与对照组治疗后比较³⁾ $P < 0. 05$ 。

表 5 两组患者治疗前后外周血单个核细胞中 HAT,HDAC 活性及 HDAC1,HDAC2 相对含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 100$)

Table 5 Comparison of activities of HAT and HDAC and content of HDAC1 and HDAC2 between two groups of AECOPD patients before and after treatment($\bar{x} \pm s, n = 100$)					
组别	时间	HAT 活性/ $\text{fu} \cdot (\text{h} \cdot \mu\text{g})^{-1}$	HDAC 活性/ $\text{fu} \cdot (\text{h} \cdot \mu\text{g})^{-1}$	HDAC1 相对含量	HDAC2 相对含量
治疗	治疗前	0. 69 $\pm$ 0. 37	0. 09 $\pm$ 0. 12	0. 62 $\pm$ 0. 02	0. 74 $\pm$ 0. 04
	治疗后	0. 33 $\pm$ 0. 31 ^{1,2)}	0. 69 $\pm$ 0. 25 ^{1,2)}	0. 67 $\pm$ 0. 01	1. 97 $\pm$ 0. 03 ^{1,2)}
对照	治疗前	0. 74 $\pm$ 0. 11	0. 08 $\pm$ 0. 02	0. 59 $\pm$ 0. 05	0. 73 $\pm$ 0. 01
	治疗后	0. 52 $\pm$ 0. 21 ¹⁾	0. 38 $\pm$ 0. 22 ¹⁾	0. 61 $\pm$ 0. 02	1. 75 $\pm$ 0. 01 ¹⁾

3 讨论

COPD 的病理特征是非特异性炎症,其发病过程中有多种炎细胞的募集、激活及细胞因子的参与,COPD 患者急性加重期增多的细胞因子,可加重气道壁和肺组织的损伤^[16]。

本课题组依据 COPD 病机及方证相关理论,拟定二陈汤加味方,该方药由麻黄(炙)、陈皮、苦杏仁、苍术、姜半夏、葶苈子、白术、茯苓、山药、党参、干姜、甘草等组成。本研究发现,二陈汤加味治疗组 FEV₁,FEV₁/FVC 较治疗前显著提升,说明二陈汤加味可改善肺的通气功能。治疗组总有效率较对照组明显提高,提示在对 AECOPD 常规治疗的基础上,同时施以二陈汤加味治疗能明显提高疗效。方中麻黄(炙)辛散而微兼苦降之性,主治肺气壅遏,苦杏仁祛痰止咳平喘。姜半夏燥湿化痰,葶苈子泻肺祛痰;干姜温肺化饮;茯苓健脾化痰;葶苈子泻水逐饮,祛痰止咳。党参健脾益肺,甘草和中理气,白术健脾

益气,山药固肾益精,苍术燥湿健脾,赤芍活血祛瘀。共奏化痰宣肺、止咳平喘、健脾固肾等功效。

IL-17 主要由外周血 T 细胞、单核细胞等产生,能强烈诱导和激活中性粒细胞在呼吸道的聚集,损伤肺组织^[17-18]。IL-17 诱导内皮细胞、表皮细胞和成纤维细胞分泌白细胞介素-8(IL-8),IL-8 诱导肝合成分泌 CRP^[19],IL-17 可作为反映 AECOPD 患者病情严重程度的指标^[20-21]。CRP 由肝细胞及呼吸道上皮细胞分泌。但在炎症因子作用下,肺泡巨噬细胞亦可产生 CRP^[22-24],灵敏反映各种原因引起的炎症和组织损伤,CRP 是临床上最常用的主要炎症指标^[5]。机体感染状态时,CRP 可黏附结合在病原体表面,启动免疫吞噬,诱导补体参与免疫、杀伤病原体^[25],血浆 CRP 水平与气道炎症、气道阻塞严重程度密切相关^[26]。动态监测 CRP 对 COPD 急性加重期的诊断、疗效评价、预后判断、病情与风险评估具有一定的临床意义^[27]。本研究结果显示,治疗组

和对照组治疗前患者血浆、呼气冷凝液中 CRP、IL-17 均明显高于治疗后,与文献报道一致^[1,20-21,26-27],说明 COPD 患者急性加重期存在明显的炎症反应。治疗后治疗组和对照组血浆、呼气冷凝液中 CRP、IL-17 均减少,提示二陈汤加味治疗有效。与对照组治疗后比较,治疗组血浆和呼气冷凝液的中 CRP、IL-17 均降低,提示二陈汤加味有协同增加抗炎的作用。

CC16 为组织特异性蛋白,CC16 主要在人肺组织表达,支气管肺泡灌洗液(BALF),肺泡液中均可检出^[28]。CC16 在前列腺、妊娠子宫以及肾脏组织中的含量极微,因而血中的 CC16 可能几乎全部来自肺组织^[29]。Clara 细胞是细支气管黏膜层中无纤毛的柱状上皮细胞,具有分化潜能,细胞质中含有许多分泌颗粒^[30]。Clara 细胞还能分泌肺表面活性物质相关蛋白(SP-A,SP-B,SP-D),肺表面活性物质主要由磷脂构成,磷脂是磷脂酶 A₂(PLA₂)的底物,CC16 在体内能抑制 PLA₂,从而可抑制肺表面活性物质的降解,使肺泡表面张力降低。CC16 有抗炎、抗肿瘤、抗纤维化、免疫抑制作用,并清除沉积在呼吸道中的有害物质^[28,31-32]。动物实验显示,烟尘暴露使 BALF 及血清中 CC16 水平明显增加^[33-35],CC16 是 Clara 细胞损害和肺毛细血管通透性增加的标志物^[36]。COPD 急性加重期因感染、氧化应激、炎症等因素,导致 CC16 表达增强,加之肺毛细血管通透性增加,释放并扩散至气道及血液中,继而引起呼气冷凝液、血浆中 CC16 含量显著增加。BALF 及血浆中 CC16 的浓度水平作为肺损伤的标志^[37]。

SP-D 可反映肺损伤的程度。SP-D 在 COPD 患者血清中水平明显高于健康人群,在 AECOPD 患者表达水平明显增强^[38-39]。肺泡表面活性物质(PS)由肺泡Ⅱ型上皮细胞合成并分泌,其成分 90% 为磷脂,8%~9% 为表面活性蛋白(SP),SP 主要包括 SP-A,B,C,D,其中 SP-A 和 SP-D 为亲水性大分子蛋白,而 SP-B 和 SP-C 为疏水性小分子蛋白^[28]。PS 存在于肺泡表面的液体层中,对降低吸气阻力,维持肺泡容积相对稳定,预防肺水肿等有重要生理作用^[40]。SP-D 主要表达于肺泡Ⅱ型细胞,其次呼吸性细支气管黏膜上的 Clara 细胞,几乎所有的黏膜表面都表达 SP-D^[41-42]。AECOPD 炎症使肺泡Ⅱ型细胞损伤及部肺血管壁的通透性增加,使合成增加的 SP-D 释放增加,SP-D 与肺表面磷脂连接不紧密,透过肺气-血屏障进入血液,使血液中 SP-D 水平升高^[43-45]。另外,其他器官上皮细胞也可能是 SP-D

潜在的来源之一。

检测 BALF 或血液中 CC16、SP-D 水平,可了解肺损伤的严重程度,对 COPD 急性期诊断或药物治疗评价具有实用价值。本研究结果显示,AECOPD 治疗前在治疗组和对照组血浆、呼气冷凝液中 CC16 含量均显著高于治疗后,与文献报道一致^[37,46-47],CC16 合成分泌增多,提示 Clara 细胞和肺泡Ⅱ型细胞,以及肺泡壁毛细血管基底膜损伤较重。经二陈汤加味治疗后血浆、呼气冷凝液中 CC16 均降低,提示二陈汤加味对 Clara 细胞和肺泡Ⅱ型细胞有保护作用。结果显示,AECOPD 治疗前在治疗组和对照组血浆中 SP-D 含量均显著高于治疗后,与文献报道一致^[38-39,44-45],提示 AECOPD 炎症及肺损伤较重。二陈汤加味治疗后血浆、呼气冷凝液中 SP-D 较治疗前均显著降低,较对照组治疗后显著降低,也提示二陈汤加味对肺泡Ⅱ型细胞,Clara 细胞有协同保护作用。

炎症是 COPD 的重要特征,HAT/HDAC 失衡在 COPD 的炎症中起着重要的作用^[13]。HAT 可以使炎症介质的组蛋白乙酰化,使炎症介质基因由关闭状态变为开放状态,促进炎症介质基因的转录表达;HDAC 是使组蛋白去乙酰化的蛋白酶,组蛋白的去乙酰化稳定核小体的结构,染色质更加致密卷曲,阻碍 DNA 与转录因子结合,抑制基因的转录^[48]。降低 HAT 活性、提高 HDAC 活性有望成为对 COPD 抗炎药物新的靶点^[49]。COPD 患者和吸烟者的肺组织肺泡巨噬细胞 HDAC 活性有显著下降,并且 HDAC 活性下降幅度与疾病严重程度相关^[50-51]。本研究结果显示,治疗组和对照组 AECOPD 患者治疗前在 PBMC 中,HAT 活性明显高于治疗后,而 HDAC 活性低于治疗后,与文献一致^[50],提示治疗前 HAT 活性高,促进炎症介质基因的转录;HDAC 活性降低,组蛋白去乙酰化减弱,对炎症介质基因的转录抑制作用减弱。治疗后,与治疗前比较,治疗组 HAT 活性降低,HDAC 活性增高,二陈汤加味通过抑制 HAT 活性,提高 HDAC 活性,抑制炎症介质基因的表达。与对照组治疗后比较,治疗组 HAT 低于对照组,HDAC 活性均高于对照组。提示二陈汤加味具有增强抗炎的作用。HDAC2 是组蛋白去乙酰化酶(HDACs)家族成员,存在于细胞核内,参与调控细胞的存活、增殖^[52-54]。HDAC2 主要参与炎症反应,HDAC2 是糖皮质激素介导的抗炎活性所必需的酶,糖皮质激素可提高细胞 HDAC2 的活性^[55]。吸烟使肺组织 HDAC2 活性降低越明显,戒烟可使之恢

复^[56]。香烟烟雾通过激活肺部的氧化应激,活化中性粒细胞,巨噬细胞,T 淋巴细胞释放蛋白酶和活性氧等引起细胞损伤和触发慢性炎症^[57-58]。COPD 患者的肺内氧化应激,过氧化物使 HADC 活性降低甚至失去活性,从而导致 COPD 患者体内 HDAC 的降低^[59-60]。本研究结果显示,治疗组和对照组 AECOPD 患者在治疗前 PBMC 中 HDAC2 含量均低于治疗后;而与本组治疗后比较,治疗组 HDAC2 含量增高,表明二陈汤加味通过增加 HDAC2 含量,抑制炎症介质基因的表达。

综上,二陈汤加味对 AECOPD 患者有治疗作用,其机制可能抑制 HAT 活性、提高 HDAC 活性,遏制 IL-17、CRP 的基因表达而发挥抗炎作用,总有效率,肺功能,CC16,SP-D 含量共同佐证二陈汤加味的抗炎和对气道、肺组织的保护作用,为临床应用二陈汤加味治疗 COPD 提供依据。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8-17.

[2] Vestbo J, Hurd S S, Agusti A G, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187(4): 347-365.

[3] 王辰. 呼吸病学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2014:38-58.

[4] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:61.

[5] 李清云. C 反应蛋白在 AECOPD 的意义[J]. 临床肺科杂志,2008,13(7):869-870.

[6] 张旭东. 呼出气冷凝液检测炎性指标监测在慢性阻塞性肺病患者中的临床应用[J]. 中国老年学杂志,2014,34(11):2988-2990.

[7] 陈忠仁, 秦篙. SP-D、CCL18、CC16 在慢性阻塞性肺疾病急性加重期血清和呼气冷凝液中的变化及临床价值[J]. 重庆医学,2015,44(19):2638-2640.

[8] Guzel A, Karadag A, Okuyucu A, et al. The evaluation of serum surfactant protein D (SP-D) levels as levels as a biomarker of lung injure in tuberculosis and different lung disease[J]. Clin Lab, 2014, 60(7):1091-1098.

[9] 庞琪, 刘晓菊, 施凯, 等. 香烟烟雾对慢性阻塞性肺病患者单核细胞源性巨噬细胞吞噬功能的影响[J]. 中华医学杂志,2014,94(12):895-898.

[10] Johansson S L, TAN Q, Holst R, et al. Surfactant protein D is a ccandidate biomarker for subclinical to bacco smok enduced lung damage[J]. Am J Physiol Lung Cell

Mol Physiol, 2014, 306(9):1887-1895.

[11] 李羚, 潘珍珍, 贺建, 等. 组蛋白乙酰基转移酶与组蛋白去乙酰基酶在哮喘发病中的作用研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(6):629-633.

[12] 陈延伟, 艾文, 李一禄, 等. 1-磷酸鞘氨醇在慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部炎症作用的研究[J]. 武汉大学学报:医学版, 2015, 36(1):11-14.

[13] 尚立芝, 谢文英, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对 COPD 肺组织炎症因子及氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24):118-122.

[14] 谢文英, 尚立芝, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-8 和白细胞介素-18 及炎细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(4):448-451.

[15] 尚立芝, 谢文英, 张良芝, 等. 爱罗咳喘宁对稳定期和急性加重期 COPD 抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1):134-139.

[16] 王丽, 谭焰, 谷伟. 慢性阻塞性肺病缓解期患者血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 表达的研究[J]. 临床肺科杂志, 2011, 16(6):835-836.

[17] Park S J, Lee Y C. Interleukin-17 regulation; an attractive therapeutic approach for asthma [J]. Respir Res, 2010, 11(1):78-89.

[18] CHANG Y, Nadigel J, Boulais N, et al. CD8 positive T cells express IL-17 in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Resp Res, 2011, 12(1):43-53.

[19] 沈锋, 赵鸣武, 贺贺, 等. 白细胞介素 17 在大鼠慢性阻塞性肺疾病和支气管哮喘模型中的变化及意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(10):654-658.

[20] ZHANG J Q, LAO Q F, CHU S Y, et al. Interleukin-17 expression and significance in normal lung function smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. Natl Med J China, 2010, 90(20):1431-1435.

[21] 何小双, 许西琳, 刘冬, 等. 慢性阻塞性肺病患者呼出气冷凝液中白介素 8、白介素 17 水平及其与第 1 秒用力呼气末容积占预计值百分比的关系研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(1):63-67.

[22] 金丛, 黄相增. CRP 及 D-Dimer 在慢性阻塞性肺疾病急性加重期继发肺动脉高压中的相关性[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(24):3949-3951.

[23] 叶胜兰, 李承红. COPD 急性发作期患者血清 IL-2、IL-8、CRP 水平变化与肺功能的相关性分析[J]. 内科急危重症杂志, 2010, 16(1):34-35.

[24] 易辉, 王树立, 崔江禹. COPD 患者 C 反应蛋白、TNF- α 、IL-8、IL-6 临床研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(3):534-537.

[25] Karadag F, Kirdar S, Karul A B, et al. The value of C-

reactive protein as a marker of systemic inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur J Int Med, 2008, 19(2):104-108.

[26] PENG C, TIAN C, ZHANG Y, et al. C-reactive protein levels predict bacterial exacerbation in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Med, 2013, 345(3):190-194.

[27] 孙思, 陈玉玲, 张志亮, 等. 慢性阻塞性肺疾病血 IL-16、IFN- γ 、CXCR3 和 CRP 的表达及临床意义[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(18):2902-2904.

[28] Broeckaert F, Bernard A. Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker[J]. Clin Exp Aller, 2000, 30(4):469-475.

[29] Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential application as markers[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 159(2):646-678.

[30] Emura M. Stem cells of the respiratory tract[J]. Paediatr Respir Rev, 2002, 3(1):36-40.

[31] 聂小蒙, 李强. Clara 细胞蛋白-CC16[J]. 国外医学:呼吸系统分册, 2004, 24(2):97-99.

[32] 章晓红, 王曾礼. Clara 细胞蛋白与肺部疾病[J]. 国外医学:呼吸系统分册, 2002, 22(1):49-51.

[33] Van M E, Dumont X, Bernard A. CC16 as a marker of lung epithelial hypermeability in an acute model of rats exposed to mainstream cigarette smoke[J]. Toxicol Lett, 2005, 159(2):115-123.

[34] LIAO J P, CHI C H, LI H C, et al. Effect of *N*-acetylcysteine on Clara cells in rats with cigarette smoke exposure [J]. Chin Med J: Engl, 2010, 123 (4):412-417.

[35] Kropski J A, Fremont R D, Calfee S C, et al. Clara cell protein (CC16), a marker of lung epithelial injury, is decreased in plasma and pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury [J]. Chest, 2009, 135(6):1440-1447.

[36] Broeckaert F, Clippe A, Knoops B, et al. Clara cell secretory protein (CC16): features as a peripheral lung biomarker[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 923(1):68-77.

[37] 刘萍, 王世鑫, 陈蕾, 等. 染矽尘大鼠 SP-D 和 CC16 蛋白表达的动态变化[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2008, 26(7):410-414.

[38] LIU W, JU C R, CHEN R C, et al. Role of serum and induced sputum surfactant protein D in predicting the response to treatment in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Exp ther Med, 2014, 8(4):1313-1317.

[39] Guzel A, Karadag A, Okuyucu A, et al. The evaluation of serum surfactant protein D (SP-D) levels as levels as a biomarker of lung injure in tuberculosis and different lung disease[J]. Clin Lab, 2014, 60(7):1091-1098.

[40] Kishore U, Bernal A L, Kamran M F, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2005, 53(5):399-417.

[41] Madsen J, Kliem A, Tornoe I, et al. Localisation of lung surfactant protein D on mucosal surfaces in human tissues[J]. Immunol, 2000, 164(11):5866-5870.

[42] NI M, Evans D J, Hawgood S, et al. Surfactant protein D is present in human tear fluid and the cornea and inhibits epithelial cell invasion by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Infect Immun, 2005, 73(4):2147-2156.

[43] Honda Y, Kuroki Y, Matsuura E, et al. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(6):1860-1866.

[44] Jobe A, Ikegami M, Jacobs H, et al. Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability[J]. Appl Physiol, 1983, 55(1):169-176.

[45] Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H, et al. Surfactant proteins A and D: disease markers[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1408(2/3):334-345.

[46] WANG S X, LIU P, CHEN L, et al. The roles of serum CC16 and SP-D on early diagnosis and progression of silicosis [J]. J Occupa Envir Med, 2007, 49(8):834-839.

[47] Hasegawa M, Fujimoto M, Hamaguchi Y, et al. Use of serum Clara cell 16-kDa (CC16) levels as a potential indicator of active pulmonary fibrosis in systemic sclerosis[J]. J Rheumatol, 2011, 38(5):877-884.

[48] Adcock I M. Glucocorticoid-regulated transcription factors [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2001, 14(3):211-219.

[49] Pitson S M. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling[J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(2):97-107.

[50] Melendez A J. Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784(1):66-75.

[51] Ito K, Ito M, Elliott W M, et al. Decreased histone deacetylase activity in chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352(19):1967-1976.

[52] LI D Z, RUAN S W, CHEN Z B, et al. Effect of Quanzhenyiqitang on apoptosis of alveolar macrophages and expression of histone deacetylase 2 in rats with

chronic obstructive pulmonary disease [J]. Exp Ther Med, 2014, 7 (5) : 1327-1331.

[53] Bjerling P, Silverstein R A, Thon G, et al. Functional divergence between histone deacetylases in fission yeast by distinct cellular localization and in vivo specificity [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (7) : 2170-2181.

[54] Marks P A, Richon V, Miller M, et al. Histone deacetylase inhibitors [J]. Adv Cancer Res, 2004, 91 (1) : 137-168.

[55] De Ruijter A J, van Gennip A H, Caron H N, et al. Histone deacetylases (HDACs) : characterization of the classical HDAC family [J]. Biochem J, 2003, 370 (3) : 737-749.

[56] Pace E, Ferraro M, Vincenzo D S, et al. Comparative cytoprotective effects of carbocysteine and fluticasone propionate in cigarette smoke extract-stimulated bronchial epithelial cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2013, 18 (6) : 733-743.

[57] 王玉梅, 黄琼, 罗鹏, 等. 香烟对大鼠肺白介素-8、谷胱甘肽及组蛋白去乙酰化酶 2 的影响 [J]. 中国医学创新, 2014, 11 (22) : 18-23.

[58] YAO H, Sundar I K, Ahmad T, et al. SIRT1 protects against cigarette smoke-induced lung oxidative stress via a FOXO3-dependent mechanism [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306 (9) : 816-828.

[59] YANG S R, Chida A S, Bauter M R, et al. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappa B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291 (1) : 46-57.

[60] Adcock I M, Ito K, Barnes P J. Histone deacetylation: an important mechanism in inflammatory lung diseases [J]. COPD, 2005, 2 (4) : 445-455.

[责任编辑 张丰丰]