

[药 理]

敦煌方大青龙汤对高原低氧大鼠肺损伤的影响

骆亚莉^{1,2}, 刘永琦^{1,3*}, 安方玉^{1,3}, 梁建国⁴, 范 宁⁴, 蔺文轩⁴

(1. 甘肃中医药大学敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 甘肃兰州 730000; 2. 甘肃中医药大学基础医学院病理教研室, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学重大疾病分子医学与中医药防治研究重点实验室, 甘肃兰州 730000; 4. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 甘肃兰州 730000)

摘要: 目的 观察敦煌古医方大青龙汤(麻黄、细辛、桂枝, 等)对高原低氧大鼠的肺功能、形态及血清白细胞介素-2(IL-2)、缺氧诱导因子- α (HIF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)表达的影响作用。方法 大鼠常规饲养3 d, 随机分为空白组, 模型组, 红景天组, 大青龙汤高、中、低剂量组, 每组12只。各组连续灌胃7 d, 从第8天开始除对照组外均进行减压低氧暴露连续14 d。末次低氧暴露后测定各组动物的肺功能。眼球取血检测血清中IL-2、HIF- α 、TGF- β 的含有量。取肺称重进行病理形态观察。结果 与空白组比较, 模型组吸气时间、呼气时间、持续时间均降低。潮气量、每分通气量、频率均升高; 与模型组比较, 各干预组每分通气量均降低, 大青龙汤组潮气量降低, 大青龙汤高剂量组、红景天组频率均降低。与空白组比较, 模型组血清IL-2含有量降低, HIF-1 α 、TGF- β 含有量均升高; 与模型组比较, 大青龙汤中、高剂量组, 红景天组IL-2、HIF-1 α 含有量均升高, TGF- β 含有量均降低。各组肺组织结构观察, 模型组肺泡间隔显著增厚, 肺毛细血管扩张, 炎症细胞浸润, 肺泡断裂、融合出现明显肺气肿, 局部有肺大泡及肺萎陷。大青龙汤中、高剂量组, 红景天组肺泡间隔增厚减轻, 炎症细胞浸润减少。结论 大青龙汤减轻肺损伤的防护作用可能与增强IL-2、HIF-1 α 表达而降低TGF- β 表达有关。

关键词: 大青龙汤; 敦煌方; 高原低氧; 肺功能; IL-2; HIF-1 α ; TGF- β

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)12-2529-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2016.12.001

Effects of Dunhuang prescription Daqinglong Decoction on lung injury in rats with altitude hypoxia

LUO Ya-li^{1,2}, LIU Yong-qi^{1,3*}, AN Fang-yu^{1,3}, LIANG Jian-guo⁴, FAN Ning⁴, LIN Wen-xuan⁴

(1. Key Laboratory Authorized by China's Ministry of Education of Dunhuang Medical and Transformation, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3. Key Laboratory of Major Disease Prevention and Control of Molecular Medicine and Traditional Chinese Medicine Research, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. School of Public Health, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: AIM To observe the effects of Daqinglong Decoction (*Ephedrae Herba*, *Asari Herba*, *Cinnamomi Ramulus*, *et al.*), Dunhuang ancient medical prescription, on the lung function, pathomorphology and the expression of IL-2, HIF-1 α and TGF- β in serum of altitude hypoxia rats. **METHODS** Conventional breeding rats for three days, the rats were randomly divided into control group, model group, *Rhodiola rosea* group, low-, medium- and high-dose Daqinglong Decoction groups. There were twelve rats in each group. Lavage lasted for seven days continuously. Starting from the 8th day, every rat except the control group was exposed to low pressure and low hypoxic chamber twenty-two hours after lavage thirty minutes for fourteen consecutive days. After the last hypoxic ex-

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室开放基金项目(DHYX1213-012)

作者简介: 骆亚莉(1979—), 女, 副教授, 博士生, 从事中西医结合基础方向的研究工作。Tel: (0931) 8760091, E-mail: mailofly@126.com

*通信作者: 刘永琦(1973—), 男, 教授, 博士生导师。从事常见呼吸疾病的中西医结合防治研究工作。E-mail: liuyongqi73@163.com

posure, all the samples were taken for the following indicators simultaneously. Lung functions were studied with animal plethysmography; blood was sampled from rat eyes and the levels of IL-2, HIF-1 α , and TGF- β in serum were detected; lung was removed and weighted by electronic balance; pathological histology of lung was observed with HE staining. **RESULTS** Compared with the control group, indexes of inspiratory time (Ti), expiratory time (Te) and relaxation time (RT) were lowered in the model group. Compared with the model group, Ti were increased in the high-dose group. Compared with the control group, indexes of tidal volume (TV), minute ventilation (MV) and frequency were increased in the model group. Compared with the model group, MV were reduced in all interfered group; TV were reduced in Daqing long Decoction groups; frequency was slowed in the high-dose group and *Rhodiola rosea* group. The levels of IL-2 were lowered; however the levels of HIF-1 α and TGF- β were increased in the serum of the model group compared with the control group. Compared with the model group, the levels of IL-2 and HIF-1 α were all elevated and TGF- β were lowered in *Rhodiola rosea* group medium-and high-dose Daqinglong Decoction groups. The observation and comparison of lung tissue structure of all groups were carried out. The results showed that the structure of pulmonary was maintained basically complete and normal in the control group. Hypoxia lung injury in the model group was mainly featured with alveolar interval markedly thickened, pulmonary capillaries dilated, inflammatory cell infiltration and alveolar septum disrupted. As well as fusion of pulmonary alveoli, obvious pulmonary emphysema, pneumatocele and lung collapse partly presented. The pathological changes of medium-, high-dose Daqinglong Decoction and *Rhodiola rosea* groups lightened to different degrees as compared to the model group. **CONCLUSION** The protective effects of Daqinglong Decoction on pulmonary function may be related to the enhancement of the expression of IL-2 and HIF-1 α and the reduction in that of TGF- β .

KEY WORDS: Daqinglong Decoction; Dunhuang ancient medical prescription; altitude hypoxia; lung function; IL-2; HIF-1 α ; TGF- β

高原低氧环境所致的肺损伤危害严重，包括高原肺水肿、外呼吸功能下降等，严重者出现呼吸衰竭甚至导致死亡。目前对于高原肺损伤的发病机制尚不十分明了，治疗效果有限。本课题组前期研究结果显示较长时间的高原低氧暴露，可导致小鼠肺通气效率降低，肺缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达升高。敦煌古医方“大青龙汤”实则与《伤寒论》中“小青龙汤”相同，由麻黄、细辛、芍药、甘草、桂枝、五味子、半夏、干姜组成。现代研究表明其具有止咳、平喘作用，可治疗多种呼吸系统疾病，在临幊上已经得到普遍应用^[1-2]。而其温肺化饮、解表散寒的药效是否可对高原低氧的肺损伤发挥影响作用，目前未见相关报道。本实验建立高原低氧大鼠模型，通过观察肺组织的形态、功能改变及检测血清白介素-2 (IL-2)、HIF- α 、转化生长因子 β (TGF- β) 的表达水平，探讨敦煌古医方“大青龙汤”对高原低氧大鼠肺损伤的影响作用。

1 实验材料

1.1 实验动物 选择 SPF 级 SD 大鼠，体质量 180 ~ 220 g，由甘肃中医院院科研实验动物中心提供，动物合格证号 SCXK (甘) 2011-0006。

1.2 实验药物 敦煌古医方“大青龙汤”实际与

《伤寒论》中“小青龙汤”相同，由麻黄 (批号 131207)、细辛 (批号 131201)、芍药 (批号 131210)、甘草 (批号 130416)、桂枝 (批号 131215)、五味子 (批号 131208)、半夏 (批号 130401)、干姜 (批号 131209) 8 味药组成，饮片购自甘肃兰冠药业公司。按《辅行诀脏腑用药法要》配比及传统方法制备^[3]。于甘肃中医药大学科研实验中心药理实验室制备，浓缩成含原生药 2 g/mL 的水煎液。高压灭菌，4 ℃ 保存。红景天 (Roseroott) 胶囊 (洛阳红景天雪域生物制品有限公司生产，批号 140901)，按照临幊用量换算，以蒸馏水溶解配成质量浓度为 31.5 g/L 的混悬液。

计算各组临幊等效剂量。“大青龙汤”临幊剂量换算大鼠等效剂量为 12.1 g/(kg · d)。参照文献 [4]，低、中、高剂量分别为临幊等效剂量的 0.5、1.0、2.0 倍，则低、中、高剂量分别为 6.05、12.1、24.2 g/(kg · d)。红景天临幊用量换算大鼠等效剂量为 0.48 g/(kg · d)。

1.3 主要试剂 Mouse IL-2 precocated ELISA kit 检测试剂盒 (达科为生物技术有限公司，批号 CK-E30648R)；Mouse TGF- β precocated ELISA kit 检测试剂盒 (达科为生物技术有限公司，批号 CK-

E30636R); Mouse HIF-1 α precocated ELISA kit 检测试剂盒(达科为生物技术有限公司, 批号 CK-E30271R)。

1.4 主要仪器设备 肺功能测定仪(EMKA TECHNOLOGY公司); 低压氧舱(FLYDWC 50-IIA, 贵州风雷航空军械有限责任公司); 电子天平(赛多利斯科学仪器[北京]有限公司); Molcell 1810D 纯水机(上海轧良仪器设备有限公司); MLS-3750型高压蒸汽灭菌器(三洋电子株式会社); 奥林巴斯 BX53 生物显微镜及图像采集系统(日本奥林巴斯公司)。

2 实验方法

2.1 高原低氧大鼠模型的建立 大鼠适应性饲养1周, 常规饮食, 自由饮水。随机数字表法将动物分为6组。分别为空白组, 模型组, 大青龙汤低、中、高剂量组, 红景天组。各12只。大青龙汤高、中、低剂量分别含原生药为24.20、12.10、6.05 g/(kg·d), 红景天剂量为0.48 g/(kg·d)。各干预组按剂量换算给药体积, 模型组灌胃等量生理盐水, 空白组不灌胃。每日灌胃1次。连续灌胃21 d。从第8天开始每天灌胃半小时后除空白组外, 参照文献方法, 各组大鼠置低压舱内进行减压低氧暴露^[5]。以10 m/s速度上升至3 000 m停留5 min; 以同样速度上升至4 500 m停留3 min; 再以10 m/s速度上升至6 000 m, 低氧暴露22 h后, 以15 m/s的速度降至海平面高度。空白组动物在常氧环境中饲养。观察动物一般表现。连续暴露14 d。第22天末次低氧暴露后连同空白组动物测定肺功能。眼球取血处死动物, 取肺组织称重, 右肺下叶4%多聚甲醛固定。

2.2 肺功能检测 动物出舱后, 参照文献[6]进行肺功能检测。运行IOX数据采集系统软件, 调试设备。开启动物呼吸机、信号调理器, 建立新实验, 启动数据采集。将动物分批放入体积描记箱中, 无创清醒状态下进行肺功能测试。指标如下: 吸气时间(inspiratory time, Ti, ms)、呼气时间(expiratory time, Te, ms)、吸气气流高峰流速(peak inspiratory flow rate, PIF, mL/s)、呼气气流高峰流速(peak expiratory flow rate, PEF, mL/s)、潮气量(tidal volume, TV, mL)、最大呼气量(expiratory volume, EV, mL)、持续时间(relaxation time, RT, s)、每分通气量(minute ventilation, MV, mL)、频率(frequency, f, bpm)、吸气末端停顿(end inspiratory pause, EIP, ms)、呼气

末端停顿(end expiratory pause, EEP, ms)、呼吸停顿(enhanced expiratory pause, Penh, ms)、呼出50%气量时流速(expiratory flow rate of 50%, EF50, mL/s)等。

2.3 肺系数 处死动物, 打开动物胸腔, 小心取出完整肺组织, 擦拭表面血污, 称重, 计算肺系数。肺系数=肺湿重(mg)/体质量(g)×100%

2.4 血清IL-2、HIF-1 α 、TGF- β 含有量检测 眼球取血, 分离血清, 参照ELISA试剂盒说明书操作, 酶标仪450 nm测定各孔吸光度(A)值。结果处理: 标准品和标本的A值减去空白孔A值。以A值为纵坐标, 以标准品质量浓度为横坐标, 绘制散点图, 将各标准品所得散点进行线性拟合, 求出线性方程。IL-2: $Y = 0.166X - 0.099$, $r^2 = 0.990$ 。TGF- β : $Y = 0.233X - 0.245$, $r^2 = 0.995$ 。HIF-1 α : $Y = 0.255X - 0.281$, $r^2 = 0.990$ 。将各样品A值代入方程求出对应的质量浓度。

2.5 肺形态观察 多聚甲醛固定的肺组织石蜡包埋, 切片, 常规HE染色。由病理学教研室高年资教师观察肺组织病理形态变化。

2.6 统计方法 数据分析均采用SPSS 17.0软件进行统计分析, 计量资料均表示为 $\bar{x} \pm s$, 采用单因素方差分析组间显著性差异, 用LSD分析组间两两比较, 若方差不齐时用Dunnett's法分析。 $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

3 结果

3.1 肺功能检测 如表1所示, 与空白组比较, 模型组吸气时间Ti、呼气时间Te、持续时间RT均降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 大青龙汤高剂量组吸气时间Ti升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 各干预组Te、RT均无明显变化($P > 0.05$)。

如表2所示, 与空白组比较, 模型组潮气量TV、每分钟通气量MV、频率均升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 各干预组MV均降低($P < 0.01$), 大青龙汤组TV降低($P < 0.05$), 大青龙汤高剂量组、红景天组频率f均降低($P < 0.05$)。

其它指标: 呼出50%气量时流速EF50、呼气末端停顿EEP、吸气末端停顿EIP、呼吸停顿Penh、吸气气流高峰流速PIF、呼气气流高峰流速PEF、最大呼气量EV均无明显变化($P > 0.05$)。

3.2 肺系数检测 各组间比较, 肺系数均未出现明显变化($P > 0.05$)。见表3。

3.3 对血清IL-2、HIF-1 α 、TGF- β 表达的影响 与对照组比较, 模型组IL-2含有量明显降低,

表1 肺功能通气时间指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$, n=12)Tab. 1 Testing results of respiratory time indexes ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	吸气时间/ms	呼气时间/ms	吸气末端停顿/ms	呼气末端停顿/ms	持续时间/s	呼吸停顿/ms
空白组	279.0 \pm 27.9	434.0 \pm 36.8	3.2 \pm 0.3	45.9 \pm 5.1	246.4 \pm 27.9	1.1 \pm 0.3
模型组	241.6 \pm 23.1 [*]	388.3 \pm 45.9 [*]	3.2 \pm 0.2	42.3 \pm 5.8	214.9 \pm 26.7 [*]	1.1 \pm 0.3
大青龙汤低剂量组	255.4 \pm 17.8 [*]	386.3 \pm 43.6 [*]	3.2 \pm 0.4	43.4 \pm 3.2	216.4 \pm 31.1 [*]	1.2 \pm 0.2
大青龙汤中剂量组	264.4 \pm 28.8	406.7 \pm 39.9	3.2 \pm 0.2	43.6 \pm 7.0	215.0 \pm 35.5 [*]	1.2 \pm 0.3
大青龙汤高剂量组	267.6 \pm 27.7 [▲]	418.7 \pm 44.2	3.2 \pm 0.2	43.6 \pm 5.7	217.0 \pm 27.1 [*]	1.2 \pm 0.2
红景天组	255.5 \pm 15.5 [*]	411.1 \pm 47.5	3.2 \pm 0.2	44.5 \pm 5.9	223.0 \pm 24.4	1.2 \pm 0.3

注: 与空白组比较, ^{*}P < 0.05; 与模型组比较, [▲]P < 0.05表2 肺功能通气量、通气流速检测结果 ($\bar{x} \pm s$, n=12)Tab. 2 Testing results of respiratory capacity and airflow velocity indexes ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	最大呼气量/ mL	每分钟通气量/ mL	潮气量/ mL	吸气气流高峰流速/ (mL·s ⁻¹)	呼气气流高峰流速/ (mL·s ⁻¹)	呼出50%气量时 流速/(mL·s ⁻¹)	频率/bpm
空白组	1.2 \pm 0.1	105.1 \pm 5.6	1.2 \pm 0.1	6.8 \pm 0.5	7.8 \pm 0.6	3.5 \pm 0.6	88.5 \pm 6.6
模型组	1.2 \pm 0.2	147.8 \pm 10.9 [*]	1.4 \pm 0.1 [*]	6.9 \pm 0.4	7.9 \pm 1.4	3.4 \pm 0.4	106.8 \pm 11.9 [*]
大青龙汤低剂量组	1.2 \pm 0.1	114.5 \pm 8.3 ^{▲▲}	1.1 \pm 0.1 [▲]	6.8 \pm 0.9	7.8 \pm 1.2	3.5 \pm 0.7	103.0 \pm 8.9 [*]
大青龙汤中剂量组	1.2 \pm 0.1	111.3 \pm 11.1 ^{▲▲}	1.1 \pm 0.1 [▲]	6.6 \pm 0.7	7.9 \pm 1.0	3.4 \pm 0.5	101.7 \pm 10.0 [*]
大青龙汤高剂量组	1.2 \pm 0.2	108.8 \pm 8.9 ^{▲▲}	1.1 \pm 0.2 [▲]	6.8 \pm 0.9	7.8 \pm 1.1	3.4 \pm 0.6	97.2 \pm 6.0 [*] [▲]
红景天组	1.2 \pm 0.2	112.1 \pm 7.7 ^{▲▲}	1.2 \pm 0.1	6.9 \pm 0.2	7.7 \pm 0.5	3.4 \pm 0.2	94.1 \pm 2.1 [▲]

注: 与空白组比较, ^{*}P < 0.05; 与模型组比较, [▲]P < 0.05, ^{▲▲}P < 0.01表3 各组肺系数检测结果 ($\bar{x} \pm s$, n=12)Tab. 3 Testing results of lung coefficient ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	空白组	模型组	大青龙汤低剂量组	大青龙汤中剂量组	大青龙汤高剂量组	红景天组
肺系数/%	5.3 \pm 0.6	5.1 \pm 0.6	4.9 \pm 0.1	5.3 \pm 0.5	5.3 \pm 0.3	5.4 \pm 0.6

HIF-1 α 、TGF- β 含有量均升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 大青龙汤中、高剂量组, 红景天组 IL-2、HIF-1 α 含有量均升高, 而 TGF- β 含有量均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 大青龙汤低剂量组无明显变化。见表4。

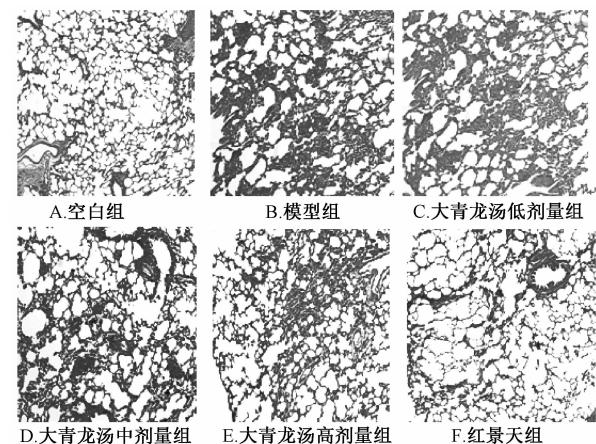
表4 各组血清 IL-2、HIF-1 α 、TGF- β 含有量 ($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	IL-2/ ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	HIF-1 α / ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TGF- β / ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白组	88.1 \pm 7.0	6.7 \pm 0.3	6.6 \pm 0.5
模型组	56.2 \pm 4.5 ^{**}	9.2 \pm 0.3 ^{**}	10.0 \pm 0.6 ^{**}
大青龙汤低剂量组	62.0 \pm 4.7 ^{**}	9.9 \pm 0.5 ^{**}	9.2 \pm 0.5 ^{**}
大青龙汤中剂量组	66.9 \pm 5.5 ^{**▲}	10.1 \pm 0.4 ^{**▲}	8.6 \pm 0.7 ^{**▲}
大青龙汤高剂量组	69.5 \pm 8.6 ^{**▲▲}	10.4 \pm 0.4 ^{**▲▲}	8.5 \pm 0.8 ^{**▲▲}
红景天组	73.9 \pm 6.4 ^{**▲▲}	11.8 \pm 0.4 ^{**▲▲}	8.0 \pm 0.6 ^{**▲▲}

注: 与空白组比较, ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01; 与模型组比较, [▲]P < 0.05, ^{▲▲}P < 0.01

3.4 肺病理学形态变化观察 空白组肺泡结构基本完整, 见明显结构破坏, 可见极少炎症细胞浸润, 无明显间质及肺泡腔内渗出, 未见明显肺毛细血管扩张, 肺泡壁厚度基本均匀一致。其它各组存在不同程度的肺毛细血管扩张、肺间质增宽、炎症

细胞浸润、肺泡扩张、融合或断裂现象。模型组表现为肺泡间隔显著增厚, 肺毛细血管扩张, 肺泡断裂融合出现明显肺气肿, 局部有肺大泡及肺萎陷。大青龙汤中、高剂量组, 红景天组肺泡间隔增厚减轻, 炎症细胞浸润减少, 肺泡断裂、融合现象仍存在, 大青龙汤高剂量组、红景天组肺损伤变化减轻较明显。见图1。

图1 肺病理形态学改变 (HE, $\times 100$)Fig. 1 HE staining of lung tissue of rats in each group (HE, $\times 100$)

4 讨论

“大青龙汤”方取自《辅行诀脏腑用药法要》《敦煌古医方》，实际为《伤寒论》中“小青龙汤”，从方药、方证、组成、煎服法完全相同。可温肺化饮，解表散寒。君药麻黄、桂枝，发汗解表，且麻黄能开宣肺气以解喘咳之证，桂枝化气行水以利内饮之化。臣药干姜、细辛，温肺化饮。佐以半夏，燥湿化痰；五味子、芍药令散中有收，以利肺气开合，又可防诸辛散温燥之药耗气伤精之虞。使药甘草，益气和中^[3]。小青龙汤具有止咳、平喘、抗炎、增强免疫等作用^[7-8]。

文献报道^[9-10]，高海拔环境的缺氧、寒冷均对肺组织结构及功能产生较大影响，出现呼吸困难，呼吸频率加快现象。由平原进入高原者，低氧刺激外周化学感受器反射性引起呼吸加深加快，这一变化可以持续到高原低氧暴露后 10~14 d。从而增加通气量^[11]。本实验结果显示，模型组呼吸频率显著升高，潮气量 TV 增加，每分钟通气量增加，符合文献报道及课题组前期研究结果。但也有研究认为，久居高原后肺通气量增加可不显著，甚至在低氧环境使通气反应迟钝，呼吸驱动不足导致肺活量下降^[12]。而吸气时间 Ti、呼气时间 Te、持续时间 RT、呼气末端停顿 EEP 等指标均降低，我们认为可能与呼吸频率加快有关。敦煌古医方大青龙汤对于高原低氧环境的大鼠肺功能具有改善作用，表现在可以降低潮气量、每分钟通气量及呼吸频率。其对于呼吸系统疾病如慢阻肺、哮喘等的防治研究已开展较多，显示其对肺功能有改善的作用，可提高慢性阻塞性肺疾病患者血氧饱和度，改善患者缺氧状态^[13]，对治疗外寒内饮型急性发作期慢性阻塞性肺疾病疗效显著，可显著改善临床症状并减少缺氧及二氧化碳潴留^[14]。本课题组将在后期对其改善肺功能的具体作用机制进一步开展研究探讨。

本实验通过病理形态观察，模型组肺损伤明显，但未见明显水肿，以肺组织弹性变差、肺气肿、纤维化倾向加重，我们认为病变已度过炎症反应急性期而向后期过渡，可能原因是缺氧时间较长，急性肺水肿逐渐被吸收，表现为反应性增生、纤维化和代偿性肺气肿。模型组局部损伤较重，肺泡上皮受损明显，表面活性物质减少而出现局部肺不张。经药物干预后，损伤减轻，显示敦煌古医方大青龙汤对于高原低氧环境的大鼠肺组织损伤具有保护作用。

呼吸道作为机体黏膜免疫系统的一部分，通过

淋巴系统归巢发生联系^[15]，当机体受到外界条件的刺激或影响时，表现为细胞因子等物质表达量发生调节。细胞因子是一类具有广泛生物学活性的低分子量可溶性蛋白质，细胞因子及细胞因子形成的复杂网络系统在疾病的发生、发展过程中发挥重要作用。研究表明细胞因子具有调节炎症反应、免疫反应、细胞生长以及损伤组织修复等多种功能。近年来，包括缺氧诱导因子 HIF 等在内的某些细胞因子在缺氧与炎症的关联中发挥作用受到学者的关注^[16]，同时，中药通过调节细胞因子表达发挥对疾病的防护作用越来越受到重视^[17-18]。

IL-2 由 Th1 细胞分泌，可促进 T 细胞生长增殖和分化各种功能 T 细胞亚群，增强 NK 细胞的活性，促进淋巴细胞分泌干扰素等，重建免疫缺陷的人和动物免疫功能。在抗感染中具有重要作用，并发挥免疫调节作用^[19]。IL-2 等因子的血清水平能够反映缺血缺氧相关疾病的发病程度及治疗结局，可作为其临床诊断和预后的重要筛查指标^[20-21]。研究认为，细胞因子在一定程度可反应气道炎症的严重程度，其与肺功能之间均存在相关性^[22]。文献报道 IL-2 参与缺氧的免疫调节过程^[23]。本实验显示高原低氧环境降低大鼠血清中 IL-2 水平，而敦煌古医方大青龙汤可能通过升高 IL-2 水平来发挥调节免疫损伤，减轻炎性反应的保护作用。

TGF-β 作为一种多效性的细胞因子，TGF-β 的生物学功能研究主要在炎症、组织修复和胚胎发育以及细胞的生长、分化和免疫功能的调节作用等方面，它也是公认的肺纤维化形成与发展的“开关性”细胞因子^[24-25]。损伤和修复，在细胞和组织水平上都紧密相连，TGF-β 是细胞和组织对损伤反应过程中的重要物质。大量研究表明 TGF-β 或通过减轻损伤程度，或通过增强其自身修复，起到稳定内环境的作用。张蕾等^[26] 报道在炎症反应中，TGF-β 作为多种炎症细胞的强趋化因子和激活因子发挥作用。TGF-β1 可促进炎症细胞水平的增加，诱导辅助性 Th 细胞扩大炎症反应^[27]。活化的巨噬细胞和气道上皮细胞释放 IL-18，可促进炎症反应的发生；同时 TGF-β1 可抑制多种炎性细胞的功能，通过负性调节作用降低气道炎症^[28]；并且抑制 IL-4、IL-5 等细胞因子的释放^[27]。研究报道，缺氧预处理后可提高 TGF-β 的表达水平^[29]。本实验结果显示，高原低氧环境升高大鼠血清中 TGF-β 水平，而敦煌古医方大青龙汤发挥减轻损伤促进受损组织修复重建的作用可能与降低 TGF-β 水平

有关。

低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 是近年来发现的介导哺乳动物细胞适应低氧环境的核转录因子。生理情况下, 作为氧感受家族中的管家转录因子, 它会参与调节机体产生适应性变化, 耐受环境的变化, 保护组织器官不受损伤^[30]。在病理性低氧条件下 HIF-1 α 也能在转录水平对多种细胞增殖相关基因的表达进行调控。其调控基因涉及细胞能量代谢、离子状态等诸多方面, 在调控的同时还可刺激 HIF-1 α 本身的表达^[31-32]。HIF-1 α 可调控适应低葡萄糖水平的葡萄糖转运蛋白 Glut-1; 调节 pH 值、碳酸酐酶 IX、血管内皮生长因子和促红细胞生成素等^[33], 这些蛋白分子通过增加细胞的氧输送和增强糖酵解的过程, 促进能量代谢以保持氧平衡状态和维持内环境稳定, 可使机体对低氧产生耐受与适应。所以, HIF-1 α 是引发缺氧耐受的重要蛋白质分子, 是哺乳动物不同组织、细胞形成缺氧耐受的共同分子生物学机制^[34]。HIF-1 也可以促进水通道蛋白 (AQP-1) 基因的表达, 从而增加血管透水性, 减轻水肿的形成^[35]。在本实验中, 高原低氧环境升高大鼠血清中 HIF-1 α 水平, 而敦煌古医方大青龙汤可能通过进一步升高其表达水平来发挥调节损伤, 增强缺氧适应及耐受性的保护作用。本课题组将下一步对高原缺氧环境与相关炎症之间的联系及其作用具体机制进行深入分析和探讨。

参考文献:

- [1] 刘璐佳, 曲婉莹, 王有鹏. 浅谈小青龙汤证[J]. 中医药临床杂志, 2016, 28(2): 182-184.
- [2] 唐万云, 曾玉英, 汪秀玲. 血府逐瘀汤合小青龙汤治疗慢性肺源性心脏病急性加重期临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(4): 164-169.
- [3] 刘喜平. 敦煌古医方研究[M]. 北京: 科学普及出版社, 2006, 161-163.
- [4] 卿俊. 复方钩藤降压片对 SHR 血管重塑状态下 p22phox 介导的氧化应激的干预研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015: 3.
- [5] 骆亚莉, 刘永琦, 安方玉, 等. 高原低氧环境气虚小鼠心、肺反应性变化的分子机制研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(12): 50-54.
- [6] 蔺兴遥, 张毅, 李娟, 等. 黄芪黄酮与红芪黄酮对肺间质纤维化模型大鼠肺功能影响的对比研究[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1770-1773.
- [7] 王同乐, 马民凯, 王素伟, 等. 加味小青龙汤治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作期的临床研究[J]. 四川中医, 2016, 34(3): 117-119.
- [8] 张保国, 刘庆芳. 小青龙汤现代研究与新用[J]. 中成药, 2012, 34(2): 340-344.
- [9] Swenson E R, Bärtsch P. High-altitude pulmonary edema[J]. *Compr Physiol*, 2012, 2(4): 2753-2773.
- [10] Seys S F, Daenen M, Dilissen E, et al. Effects of high altitude and cold air exposure on airway inflammation in patients with asthma[J]. *Thorax*, 2013, 68(10): 906-913.
- [11] 赵顺云, 朱海宏, 郭亚民, 等. 南极不同海拔下考察队员心肺功能相关指标变化的研究[J]. 高原医学杂志, 2012, 22(3): 11-13.
- [12] 何秀英, 王俊, 钟宜桉, 等. 不同海拔人群肺功能检测分析与研究[J]. 青海医药杂志, 2013, 43(6): 79.
- [13] 谢加富, 陈仕章, 秦平祥, 等. 小青龙汤配合基础治疗对慢性阻塞性肺疾病患者血氧饱和度的影响[J]. 临床和实验医学杂志, 2008, 7(9): 5-6.
- [14] 李秀兰, 王勇奇, 李香凤, 等. 小青龙汤加味治疗外寒内饮型急性发作期慢性阻塞性肺疾病临床研究[J]. 河南中医, 2015, 35(10): 2317-2319.
- [15] 张欣悦, 高永翔, 谢怡敏. 黏膜免疫系统研究进展[J]. 中药与临床, 2015, 6(5): 64-68.
- [16] Koeppen M, Eckle T, Eltzschig H K. The hypoxia-inflammation link and potential drug targets[J]. *Curr Opin Anesthesiol*, 2011, 24(4): 363-369.
- [17] Yang S J, Yu H Y, Kang D Y, et al. Antidepressant-like effects of salidroside on olfactory bulbectomy-induced pro-inflammatory cytokine production and hyperactivity of HPA axis in rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 124(9): 451-457.
- [18] Zhang J, Zhen Y F, Pu-Bu-Ci-Ren, et al. Salidroside attenuates beta amyloid-induced cognitive deficits via modulating oxidative stress and inflammatory mediators in rat hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2013, 244(5): 70-81.
- [19] Dente F L, Bacci E, Bartoli M L, et al. Effects of oral prednisone on sputum eosinophils and cytokines in patients with severe refractory asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010, 104(6): 464-470.
- [20] Julian C G, Subudhi A W, Wilson M J, et al. Acute mountain sickness, inflammation, and permeability: new insights from a blood biomarker study[J]. *J Appl Physiol*, 2011, 111(2): 392-399.
- [21] Orrock J E, Panchapakesan K, Vezina G, et al. Association of brain injury and neonatal cytokine response during therapeutic hypothermia in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Pediatr Res*, 2016, 79(5): 742-747.
- [22] 卢惠伦, 何海春, 游世伦. 支气管哮喘患者血清炎症因子与肺功能相关性研究[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(1): 51-53.
- [23] Shweta, Mishra K P, Chanda S, et al. A comparative immunological analysis of CoCl₂ treated cells with *in vitro* hypoxic exposure[J]. *Biometals*, 2015, 28(1): 175-185.
- [24] 贺佳林, 戴爱国. 红景天抗氧化及对细胞因子作用的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(2): 272-277.
- [25] 方向明, 王智星, 邬锡琴. 平喘宁对哮喘大鼠肺组织 TGF- β 1、CyclinD1 及 p-ERK1/2 mRNA 表达的影响[J]. 中华中

