·论著·

补肺益肾组分方Ⅲ调节慢性阻塞性肺疾病黏液高分泌的配伍特点

秦燕勤[1,2] 李敏艳[1,2] 田燕歌[1,2] 赵鹏[1,2] 李康沉[1] 李聪聪[1] 李建生[1,3]

[1]河南中医药大学 河南省中医药防治呼吸病重点实验室 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心，郑州 450046；[2]河南中医药大学中医药科学院，郑州 450046；[3]河南中医药大学第一附属医院呼吸科，郑州 450046

通信作者：李建生，Email：li_js8@163.com

【摘要】 目的 评价补肺益肾组分方Ⅲ（ECC-BYFⅢ）阻抑慢性阻塞性肺疾病（COPD）黏液高分泌的配伍特点。**方法** 将 ECC-BYFⅢ组分按原方药物功效分成补气（人参皂苷 Rh1+ 黄芪甲苷）、补肾（淫羊藿苷）、化痰（川陈皮素）、活血（丹皮酚）4 组，按数学排列组合的方法将其分为不同组分配伍组（14 组）。① 按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、ECC-BYFⅢ及不同组分配伍组，共 17 组。采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染的方法复制 COPD 稳定期大鼠模型。于制模第 9 周开始给予相应的药物灌胃，16 周结束后取材。用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测血清及支气管肺泡灌洗液（BALF）中基质金属蛋白酶 9（MMP-9）、基质金属蛋白酶抑制剂 1（TIMP-1）水平，以及肺组织和 BALF 中黏蛋白（MUC）5AC 水平。② 将人肺上皮细胞 BEAS-2B 分为空白组、模型组、ECC-BYFⅢ及不同组分配伍组。于相应药物预处理后 4 h 建立缺氧诱导的 BEAS-2B 细胞黏液高分泌模型。采用定量聚合酶链反应（PCR）检测 MUC5AC、MUC5B、MUC1 的 mRNA 表达。采用 Region（R）值综合评价法评价大鼠及 BEAS-2B 细胞黏液分泌指标。**结果** ① 与对照组比较，模型组大鼠血清及 BALF 中 MMP-9 显著升高，TIMP-1 水平显著降低；肺组织及 BALF 中 MUC5AC 显著升高。R 值综合评价结果显示，除补气组和补肾组外，ECC-BYFⅢ及其组分配伍均能显著纠正 COPD 大鼠黏液高分泌，以 ECC-BYFⅢ、补肾祛邪、扶正化痰、祛邪组分配伍效果较优（R 值分别为 2.15±0.42、2.11±0.23、2.16±0.23、2.16±0.55），与模型组（R 值：3.00±0.00）比较差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）。② 与空白组比较，模型组细胞 MUC5AC、MUC5B、MUC1 的 mRNA 表达均升高；但不同组分配伍对 BEAS-2B 细胞黏液分泌没有明显的作用特点。③ 综合体内外实验，R 值综合评价结果显示，ECC-BYFⅢ及其活血、祛邪、补肾活血、扶正化痰、补气祛邪组分配伍可显著纠正 COPD 黏液高分泌状态（R 值分别为 2.30±0.43、2.33±0.44、2.12±0.68、2.27±0.64、2.24±0.27、2.29±0.47），与模型组（R 值：3.00±0.00）比较差异均有统计学意义（均 $P<0.01$）；其作用强度为：祛邪＞扶正化痰＞补肾活血＞补气祛邪＞ECC-BYFⅢ＞活血。**结论** ECC-BYFⅢ组分配伍对 COPD 黏液分泌相关指标效应不同，含化痰（川陈皮素）或活血（丹皮酚）的组分配伍抑制黏液分泌效果较好。

【关键词】 补肺益肾组分方Ⅲ； 慢性阻塞性肺疾病； 组分配伍； 黏液高分泌

基金项目：国家自然科学基金（81973822）；国家发明专利（ZL 2017 1 1088757.0）

DOI：10.3760/cma.j.cn121430-20210611-00868

Compatibility characteristics of Bufei Yishen formula Ⅲ in regulating chronic obstructive pulmonary disease mucus hypersecretion

Qin Yanqin[1,2], Li Minyan[1,2], Tian Yange[1,2], Zhao Peng[1,2], Li Kangchen[1], Li Congcong[1], Li Jiansheng[1,3]

[1]Henan Key Laboratory of Chinese Medicine for Respiratory Disease, Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases co-constructed by Henan province & Education Ministry of P.R. China, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China; [2]Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China; [3]Department of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, Henan, China

Corresponding author: Li Jiansheng, Email: li_js8@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the compatibility laws of effective-component compatibility of Bufei Yishen formula Ⅲ (ECC-BYFⅢ) in regulating mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods** According to the efficacy of the original Chinese medicine, the components of ECC-BYFⅢ were divided into four categories: Buqi (Ginsenoside Rh1+Astragaloside), Bushen (Icariin), Huatan (Nobiletin), and Huoxue (Paeonol). The four categories were divided into 14 groups based on the method of mathematical permutation. ① The rats were divided into control group, model group, ECC-BYFⅢ, and different components compatibility groups according to the random number table, totaling 17 groups. COPD rat model in stable phase was established by cigarette smoke exposure combined with repeated bacterial infections. The corresponding drugs were given by gavage at the 9th week of modeling, and the samples were collected at the end of the 16th week. The levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and the

levels of mucin (MUC) 5AC in lung tissue and BALF were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). ② Human lung epithelial cells BEAS-2B were divided into blank group, model group, and different components compatibility groups. Hypoxia-induced mucus hypersecretion model of human lung epithelial cells BEAS-2B was established 4 hours after corresponding drug pretreatment. The mRNA expressions of MUC5AC, MUC5B, and MUC1 were detected by quantitative polymerase chain reaction (PCR). The mucus secretion indexes of rats and BEAS-2B cells were evaluated by Region (R) value comprehensive evaluation method. **Results** ① Compared with the control group, MMP-9 in serum and BALF from the model group were significantly increased, the level of TIMP-1 was significantly decreased, and MUC5AC in lung tissue and BALF were significantly increased. The results of R value comprehensive evaluation showed that except for the Buqi and Bushen groups, ECC-BYFⅢ and other components compatibility groups significantly corrected mucus hypersecretion in COPD rats, ECC-BYFⅢ, Bushen Quxie, Fuzheng Huatan, and Quxie groups were much better (R values were 2.15±0.42, 2.11±0.23, 2.16±0.23 and 2.16±0.55, respectively), compared with the model group (R value: 3.00±0.00), the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). ② Compared with the blank group, the mRNA expressions of MUC5AC, MUC5B, and MUC1 increased in the model group. But different components compatibility groups had no significant effects on the mucus secretion of BEAS-2B cells. ③ The comprehensive evaluation results of R value about each *in vivo* and *in vitro* index showed that ECC-BYFⅢ, Huoxue, Quxie, Bushen Huoxue, Fuzheng Huatan, Buqi Quxie groups significantly corrected the mucus hypersecretion (R values were 2.30±0.43, 2.33±0.44, 2.12±0.68, 2.27±0.64, 2.24±0.27 and 2.29±0.47, respectively), compared with the model group (R value: 3.00±0.00), the difference was statistically significant (all $P < 0.01$). The order was: Quxie > Fuzheng Huatan > Bushen Huoxue > Buqi Quxie > ECC-BYFⅢ > Huoxue. **Conclusions** Different components compatibility of ECC-BYFⅢ had different effects on COPD mucus secretion. The components containing Huatan (Nobiletin) or Huoxue (Paeonol) showed a better inhibitory effect on mucus secretion.

【Key words】 Effective-component compatibility of Bufei Yishen formula Ⅲ; Chronic obstructive pulmonary disease; Components compatibility; Mucus hypersecretion

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81973822); National Invention Patent of China (ZL 2017 1 1088757.0)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210611-00868

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以不完全可逆性气流受限为主要特征。气道黏液高分泌是COPD的重要病理特征之一,与COPD患者的咳嗽和咳痰症状、病情急性加重及死亡有关,影响COPD病程进展及预后[1-2]。黏蛋白(mucin, MUC)分泌增多是黏液高分泌的主要原因,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)可以促进MUC分泌[3-4]。补肺益肾方是临床治疗COPD的有效方剂,可减轻患者咳嗽、咳痰等临床症状,减少急性加重次数,提高患者生存质量[5-6]。中药复方具有多成分、多途径、多层次、多靶点等特点,在药物作用机制探讨方面存在一定的局限性。有效组分配伍研究是研发现代中药的新模式,便于进行药物质量控制,有助于揭示药物作用物质基础,明确药物的作用机制。补肺益肾组分方Ⅲ(effective-component compatibility of Bufei Yishen formula Ⅲ, ECC-BYFⅢ)是在补肺益肾方的基础上经ECC-BYFⅠ(专利号:ZL 2017 1 1088757.0)、ECC-BYFⅡ优化形成的,由人参皂苷Rh1、黄芪甲苷、淫羊藿苷、川陈皮素、丹皮酚组成。本课题组前期研究表明,ECC-BYFⅡ对COPD大鼠有较好的疗效,且可通过调控表皮生长因子受体/磷酸肌醇3-激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(epidermal growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin, EGFR/PI3K/mTOR)信号通路抑制COPD大鼠黏液分泌[7]。ECC-BYFⅢ在改善COPD大鼠肺功能、肺组织病理方面与ECC-BYFⅡ相当,但其抑制黏液分泌的物质基础仍需进一步研究。本研究在中医理论指导下,将ECC-BYFⅢ的补气(人参皂苷Rh1+黄芪甲苷)、补肾(淫羊藿苷)、化痰(川陈皮素)、活血(丹皮酚)4个模块按数学排列组合的方法进行配伍,在以香烟烟雾暴露联合反复细菌感染的COPD稳定期大鼠模型以及缺氧诱导的人肺上皮细胞BEAS-2B细胞黏液高分泌模型基础上,评价ECC-BYFⅢ及其组分配伍抑制黏液分泌的特点。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　动物:SPF级SD大鼠204只,雌雄各半,体质量(200±20)g,购于河南省实验动物中心,动物合格证号:41003100005505。

1.1.2　香烟:红旗渠过滤嘴香烟(硬金红,烤烟型,焦油含量11 mg、烟气烟碱含量0.9 mg、烟气一氧化碳含量11 mg),由河南中烟工业有限责任公司提供。

1.1.3　细菌:肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP;菌株号:46117),由中国药品生物制品检定院中国医学细菌保藏管理中心提供,使用前用生理盐水将菌液调整为6×10^8 CFU/mL。

1.1.4　细胞:BEAS-2B细胞购于中国科学院上海生

命科学院细胞资源中心。

1.1.5 主要药品与试剂：人参皂苷Rh1（CHB180608）、黄芪甲苷（MUST-17022804）、淫羊藿苷（MUST-16111710）、丹皮酚（MUST-16071405）购于成都曼斯特生物科技有限公司，川陈皮素（HL-20170312）购于西安汇林生物科技有限公司。大鼠MMP-9、基质金属蛋白酶抑制剂1（tissue inhibitors of metalloproteinase 1, TIMP-1）酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司；大鼠MUC5AC ELISA试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司。反转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）试剂盒购于美国Invitrogen公司。人MUC5AC、MUC5B、MUC1、内参核糖体蛋白L13 A1（ribosomal protein L13 A1, RPL13A1）引物序列由上海捷瑞生物技术有限公司设计合成。

1.2 动物实验

1.2.1 大鼠COPD模型制备：采用香烟烟雾暴露联合反复细菌感染方法复制COPD稳定期大鼠模型[8]。

1.2.2 动物分组与处理：按随机数字表法将大鼠分为17组，每组12只，雌雄各半，具体分组及用药干预见表1，于制模第9～16周每日上午灌胃1次。药物灌胃剂量采用等效剂量系数换算公式计算：$D_{大鼠}=D_{人}\times(HI_{大鼠}/HI_{人})\times(W_{大鼠}/W_{人})2/3$。其中，D为剂量，HI为体型系数，W为体质量。

1.2.3 指标检测：第16周结束后取材，经大鼠腹主动脉采血，静置2 h后无菌分离血清；结扎右支气管，用磷酸盐缓冲液灌注左肺，收集支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF），离心后取上清液；取右肺中叶进行组织匀浆。严格按照ELISA试剂盒说明书步骤检测血清及BALF中MMP-9、TIMP-1水平，BALF和肺组织匀浆中MUC5AC水平。

1.3 细胞实验：BEAS-2B细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，取2～4代细胞用于实验。以每孔1.6×10^5个细胞接种于6孔培养板，并分为空白组、模型组、ECC-BYFⅢ及其组分配伍（70.125 mg/L）组。药物预处理后4 h，将模型组及药物处理组细胞置于CO_2/N_2双气培养箱（5% CO_2，95% N_2）24 h。TRIzol法提取总RNA，紫外分光光度计测定RNA浓度及纯度，进行RNA反转录。荧光定量PCR检测细胞MUC5AC、MUC5B、MUC1的mRNA表达，以RPL13A1为内参照，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因表达水平，所有反应重复3次。

1.4 伦理学：本实验符合伦理学标准，并通过河南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准（审批号：YFYDW2019031）。

1.5 统计学分析：采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用单因素方差分析，方差齐者采用LSD检验，方差不齐则经数据转化后采用LSD检验。显著性水准取$\alpha=0.05$，$P<0.05$为差异有统计学意义。

1.6 Region（R）值综合评价：采用R值综合评价法对大鼠黏液分泌相关指标进行综合评价[9]。R值综合评价法是根据疾病对指标的影响和药物对指标的纠正作用，计算药物对指标的纠正强度，综合考察药物对多个指标的综合作用。R值越小，说明对该指标的纠正作用越强。

表1 ECC-BYFⅢ对COPD大鼠黏液高分泌调节研究的分组及药物干预

组别	灌胃药物	灌胃量
对照组	生理盐水	雄鼠2 mL，雌鼠1.5 mL
模型组	生理盐水	雄鼠2 mL，雌鼠1.5 mL
ECC-BYFⅢ组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋淫羊藿苷＋川陈皮素＋丹皮酚	5.50 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补气组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷	1.18 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补肾组	淫羊藿苷	3.92 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
化痰组	川陈皮素	0.16 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
活血组	丹皮酚	0.25 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
扶正组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋淫羊藿苷	5.10 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
祛邪组	川陈皮素＋丹皮酚	0.40 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补气化痰组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋川陈皮素	1.34 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补气活血组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋丹皮酚	1.43 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补肾化痰组	淫羊藿苷＋川陈皮素	4.08 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补肾活血组	淫羊藿苷＋丹皮酚	4.17 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
扶正化痰组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋淫羊藿苷＋川陈皮素	5.26 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
扶正活血组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋淫羊藿苷＋丹皮酚	5.35 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补气祛邪组	人参皂苷Rh1＋黄芪甲苷＋川陈皮素＋丹皮酚	1.58 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$
补肾祛邪组	淫羊藿苷＋川陈皮素＋丹皮酚	4.32 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$

注：ECC-BYFⅢ为补肺益肾组分方Ⅲ，COPD为慢性阻塞性肺疾病；各组制模第9～16周每日上午灌胃1次

2 结 果

2.1 ECC-BYFⅢ及其组分配伍对COPD大鼠MUC及金属蛋白酶的影响（表2）：与对照组比较，模型组大鼠血清及BALF中MMP-9水平显著升高，血清及BALF中TIMP-1水平显著降低，BALF及肺组织中MUC5AC水平显著升高（均$P<0.05$）。与模型组比较，ECC-BYFⅢ、活血、扶

正、祛邪、补肾化痰、扶正化痰、扶正活血、补气祛邪、补肾祛邪组大鼠血清 MMP-9 水平显著下降(均 $P<0.05$);活血、扶正、扶正化痰组大鼠 BALF 中 MMP-9 水平显著下降(均 $P<0.05$);ECC-BYFⅢ、补肾、化痰、祛邪、补肾活血、补气祛邪、补肾祛邪组大鼠血清 TIMP-1 水平显著升高(均 $P<0.05$);ECC-BYFⅢ、扶正、祛邪、补肾化痰、补肾活血、扶正化痰、补肾祛邪组大鼠 BALF 中 TIMP-1 水平显著升高(均 $P<0.05$);ECC-BYFⅢ、祛邪、补气化痰、补气活血、扶正化痰、补气祛邪组大鼠 BALF 中 MUC5AC 水平显著下降(均 $P<0.05$);ECC-BYFⅢ、补肾化痰、补肾活血、扶正化痰、补肾祛邪组大鼠肺组织中 MUC5AC 水平显著下降(均 $P<0.05$)。

2.2 ECC-BYFⅢ及其不同组分配伍对缺氧诱导的 BEAS-2B 细胞 MUC mRNA 表达的影响(表 3):与空白组比较,模型组细胞 MUC5AC、MUC5B、MUC1 的 mRNA 表达均显著上调(均 $P<0.05$)。与模型组比较,ECC-BYFⅢ、补气、补肾、祛邪、补肾活血组细胞 MUC5AC mRNA 表达显著下调(均 $P<0.05$);祛邪、补气化痰、补肾化痰、扶正化痰、补气祛邪组细胞 MUC1 mRNA 表达显著下调(均 $P<0.05$);除补肾祛邪组外,ECC-BYFⅢ及其他组分配伍均能显著下调 MUC5B mRNA 表达(均 $P<0.05$)。

2.3 ECC-BYFⅢ及其不同组分配伍对黏液分泌影响的 R 值综合评价(表 4):除补气组和补肾组外,ECC-BYFⅢ及其他组分配伍均能显著降低 COPD 大鼠黏液分泌相关指标(均 $P<0.05$);ECC-BYFⅢ及其组分配伍对缺氧细胞 MUC mRNA 表达无明显作用特点。对体内外所有指标 R 值综合评价结果显示,ECC-BYFⅢ及其活血、祛邪、补肾活血、扶正化痰、补气祛邪组分配伍可显著纠正 COPD 黏液高分泌,纠正强度为:祛邪>扶正化痰>补肾活血>补气祛邪>ECC-BYFⅢ>活血。

表 3　ECC-BYFⅢ及其组分配伍对缺氧诱导 BEAS-2B 细胞 MUC mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数(个)	mRNA($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
		MUC5AC	MUC5B	MUC1
空白组	3	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	3	1.65±0.20[a]	4.96±0.14[b]	2.50±0.10[b]
ECC-BYFⅢ组	3	0.54±0.08[c]	1.96±0.04[d]	2.22±0.22
补气组	3	0.39±0.00[c]	1.74±0.29[c]	2.41±0.11
补肾组	3	0.46±0.05[c]	2.37±0.19[d]	2.21±0.08
化痰组	3	0.97±0.35	2.43±0.54[c]	2.51±0.12
活血组	3	0.84±0.15	1.84±0.19[d]	2.52±0.15
扶正组	3	0.68±0.25	2.12±0.78[c]	2.68±0.03
祛邪组	3	0.21±0.00[c]	1.49±0.19[d]	1.79±0.03[d]
补气化痰组	3	0.94±0.05	1.10±0.37[c]	2.12±0.01[d]
补气活血组	3	1.19±0.54	1.86±0.17[d]	2.44±0.01
补肾化痰组	3	1.03±0.61	1.14±0.21[d]	2.08±0.02[d]
补肾活血组	3	0.36±0.00[c]	1.78±0.05[d]	2.33±0.04
扶正化痰组	3	0.90±0.58	0.96±0.02[d]	1.64±0.00[d]
扶正活血组	3	1.03±0.28	1.47±0.10[d]	2.27±0.20
补气祛邪组	3	1.13±0.14	1.66±0.02[d]	1.87±0.04[d]
补肾祛邪组	3	5.61±0.13	5.86±0.37	2.76±0.03

注:ECC-BYFⅢ为补肺益肾组分方Ⅲ,BEAS-2B为人肺上皮细胞,MUC为黏蛋白;与空白组比较,[a]$P<0.05$,[b]$P<0.01$;与模型组比较,[c]$P<0.05$,[d]$P<0.01$

表 2　ECC-BYFⅢ及其组分配伍对 COPD 大鼠 MUC 及金属蛋白酶的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	血清 MMP-9(ng/L)	血清 TIMP-1(ng/L)	BALF MMP-9(ng/L)	BALF TIMP-1(ng/L)	BALF MUC5AC(ng/L)	肺 MUC5AC(ng/L)
对照组	6	1 191.41± 457.02	1 566.06±189.78	189.24± 54.40	577.80± 41.09	236.17± 43.42	3 198.02± 289.36
模型组	6	2 385.72± 679.54[a]	884.90±108.92[a]	326.44±170.64[b]	411.91± 50.86[a]	371.70± 94.52[a]	5 139.06± 981.82[a]
ECC-BYFⅢ组	6	1 713.95± 610.35[c]	1 383.07±145.02[c]	214.45±136.04	909.6±180.27[c]	249.98± 72.04[c]	3 633.89± 435.67[d]
补气组	6	2 313.80± 903.96	1 260.35±156.19	287.51± 76.95	457.18± 92.58	273.90± 87.21	4 397.54± 903.48
补肾组	6	2 191.91± 619.77	1 397.31±289.80[d]	247.13± 78.94	510.89± 81.26	279.93± 50.24	4 939.90± 772.40
化痰组	6	2 496.93±1 574.15	1 436.73±170.55[c]	229.98±123.26	540.00±266.98	286.66± 62.91	4 470.56± 572.56
活血组	6	1 082.29± 549.93[c]	1 278.80±227.31	127.91± 65.03[c]	524.74± 54.41	267.39± 87.42	4 654.45±1 194.57
扶正组	6	1 581.42± 473.20[c]	1 397.94±179.45	194.92±126.89[d]	771.65±145.24[c]	265.28± 66.59	4 469.42± 812.44
祛邪组	6	1 715.78± 605.74[d]	1 443.44±110.35[c]	271.45±113.21	664.89±149.85[c]	262.15± 33.02[c]	4 007.19±1 015.35
补气化痰组	6	1 689.82± 957.60	1 253.36±299.37	214.57±142.50	517.94±126.92	247.77± 69.07[d]	4 217.26± 784.34
补气活血组	6	1 876.91± 903.43	1 139.40±284.20	251.94±124.00	456.18±106.36	222.87± 34.74[c]	4 213.10± 912.46
补肾化痰组	6	1 458.20± 221.03[c]	1 283.45±147.96	298.15±112.26	606.64±130.59[c]	272.94± 63.76	3 445.12± 658.93[c]
补肾活血组	6	2 282.93±1 379.82	1 410.61±176.74[c]	242.41±119.64	594.69± 73.11[d]	280.81± 57.33	3 701.29± 531.27[d]
扶正化痰组	6	1 624.53± 549.06[d]	1 316.78±232.15	179.58± 47.52[c]	555.92± 65.97[d]	267.46± 49.24[d]	3 868.96± 617.76[d]
扶正活血组	6	1 470.98± 927.55[d]	1 351.35±151.26	218.17± 37.46	517.53±173.19	325.78±112.29	3 892.65± 597.61
补气祛邪组	6	1 096.10± 590.59[c]	1 440.84±216.72[d]	293.80±219.82	540.04±123.58	217.13± 53.39[c]	4 311.36± 463.25
补肾祛邪组	6	1 405.47± 881.76[d]	1 419.72±217.70[d]	214.34± 70.33	614.16± 44.47[c]	272.88± 70.15	3 601.36± 862.34[c]

注:ECC-BYFⅢ为补肺益肾组分方Ⅲ,COPD 为慢性阻塞性肺疾病,MUC 为黏蛋白,MMP-9 为基质金属蛋白酶 9,TIMP-1 为基质金属蛋白酶抑制剂 1,BALF 为支气管肺泡灌洗液;与对照组比较,[a]$P<0.01$,[b]$P<0.05$;与模型组比较,[c]$P<0.01$,[d]$P<0.05$

表 4 ECC-BYF Ⅲ及其组分配伍对 COPD 黏液分泌影响的 R 值综合评价（$\bar{x}\pm s$）

组别	综合评价 R 值		
	大鼠黏液分泌	细胞黏蛋白表达	整体疗效
模型组	3.00±0.00	3.00±0.00	3.00±0.00
ECC-BYFⅢ组	2.15±0.42 [a]	2.62±0.28	2.30±0.43 [b]
补气组	2.56±0.38	2.25±1.04	2.46±0.62
补肾组	2.49±0.37	2.37±0.75	2.45±0.48
化痰组	2.45±0.49 [b]	2.83±0.19	2.58±0.44
活血组	2.17±0.41 [a]	2.65±0.35	2.33±0.44 [b]
扶正组	2.17±0.32 [a]	2.77±0.39	2.37±0.44
祛邪组	2.16±0.55 [a]	2.03±1.04	2.12±0.68 [b]
补气化痰组	2.40±0.31 [b]	2.54±0.36	2.45±0.31
补气活血组	2.41±0.61 [b]	2.81±0.16	2.54±0.52
补肾化痰组	2.22±0.34 [b]	2.72±0.09	2.39±0.37
补肾活血组	2.34±0.51 [a]	2.12±0.97	2.27±0.64 [b]
扶正化痰组	2.16±0.23 [b]	2.42±0.30	2.24±0.27 [b]
扶正活血组	2.35±0.35 [b]	2.67±0.24	2.46±0.34
补气祛邪组	2.19±0.55 [a]	2.49±0.22	2.29±0.47 [b]
补肾祛邪组	2.11±0.23 [a]	4.28±2.06	2.84±1.51

注：ECC-BYFⅢ为补肺益肾组分方Ⅲ，COPD 为慢性阻塞性肺疾病；与模型组比较，[a]$P<0.01$，[b]$P<0.05$

3 讨 论

COPD 属中医“肺胀”“喘病”“咳嗽”等范畴，其病因病机及临床症状与肺胀最为接近。肺肾气虚证兼见痰瘀是 COPD 稳定期的主要证候，补肺益肾佐以化痰祛瘀是其主要治则，补肺益肾方补肺肾之气以扶正，化痰活血以祛邪，是临床常用治疗方剂。本课题组前期研究表明，补肺益肾方可明显改善 COPD 模型大鼠肺功能，减轻肺气道病理损伤和炎症反应[10-11]，并对 $PM_{2.5}$ 诱导的大鼠鼻腔黏液分泌有保护作用[12]。为了探讨补肺益肾方的物质基础及作用机制，我们在此基础上结合系统药理学方法及体内外实验筛选疗效相当的 ECC-BYF[13-14]，优化为 ECC-BYFⅢ，并对 ECC-BYFⅢ进行组分配伍，结合体内外实验，探讨其抑制黏液高分泌的配伍规律。

气道黏液高分泌是 COPD 的重要病理特征，是影响 COPD 病理进程和预后的独立危险因素。气道黏液是由水、离子、蛋白质和大分子组成的凝胶。生理状态下，气道黏液是防止呼吸道水分流失、微生物入侵的重要防御屏障；而过多的黏液分泌可增加纤毛负担、阻塞气道、加重呼吸道症状，聚集的黏液可为微生物提供生存环境，导致进一步感染，诱发 COPD 急性加重[15-16]。MUC 是气道黏液的主要大分子物质，其中 MUC5AC 和 MUC5B 是分泌并聚合形成凝胶的主要 MUC，主要维持气道黏液的黏弹性；MUC1 是具有跨膜结构域且与细胞表面相关的 MUC[17]。MUC5AC 由气道上皮杯状细胞及黏膜下腺体产生，具有黏弹性和黏附特性，是气道纤毛清除黏液的基础，富含 MUC5AC 的黏液凝胶可导致纤毛功能受损，进一步影响黏液清除，是黏液高分泌的关键因素[18]。香烟烟雾、细菌感染、活化的炎性细胞等都可引起气道上皮杯状细胞过度分泌 MUC5AC，导致气道的黏液集聚[19]。此外，有研究者发现 MUC5AC 的分泌具有 MMP-9 依赖性[20]。MMP-9 生物学功能广泛，可通过特异性降解基底膜中的Ⅳ型胶原，破坏基底膜的完整性[21]；而增强 MMP-9 活性可促进 MUC5AC 的产生[22]。MUC5B 是气道保护性黏液屏障的必需 MUC，在 COPD 患者痰液中显著增加，且其水平与肺功能呈负相关[23]。MUC1 在 COPD 急性加重期分泌显著增加[24]，且可促进烟雾诱导的小鼠杯状细胞化生和 MUC5AC 表达[25]。本研究显示，COPD 大鼠 BALF 及肺组织中 MUC5AC 水平显著升高，血清及 BALF 中 MMP-9 水平显著升高，血清及 BALF 中 TIMP-1 水平显著降低；缺氧诱导的气道上皮细胞 MUC5AC、MUC5B、MUC1 的 mRNA 表达升高，与上述文献报道结果一致。

气道黏液归属中医“痰”的范畴，是津液运行输布失常或水液不归正化聚为痰饮而成的病理产物，其产生与肺脾肾三脏关系密切。痰浊阻肺，气机升降失司，肺气不利发为咳嗽、咳痰；痰浊阻肺，影响肺气血运行、致瘀血产生，痰瘀相互搏结，阻遏气道，致肺气胀满不能敛降，发为胸闷气喘；痰瘀稽留，日久损伤正气，致使肺脾肾三脏虚损，正虚卫外不固，外邪易反复侵袭而诱使 COPD 发作[26]。历年来，中医在治“痰”方面积累了丰富的经验，从肺脾肾三脏入手，或温化寒痰、或清热化痰、或燥湿化痰，并制定了治“痰”的诸多方药。补肺益肾方是李建生教授基于 COPD“正虚积损”病机拟定的复方，旨在补肺益肾，佐以化痰活血，止咳平喘，ECC-BYFⅢ是以补肺益肾方为基础筛选而来的组分方。

本研究显示，ECC-BYFⅢ可显著降低 MUC5AC 及 MMP-9 水平，各组分配伍对 MUC5AC、MMP-9 及 TIMP-1 有不同程度的调节作用。为了评价其整体作用效果，我们采用 R 值综合评价法评价各组分配伍对黏液分泌相关指标的综合作用。结果显示，除补气、补肾组分配伍外，ECC-BYFⅢ及其他组分配伍均能显著降低 COPD 大鼠黏液分泌相关指标。此外，我们还检测了各组分配伍对缺氧诱导 BEAS-2B 细胞 MUC 分泌的影响，结果显示，ECC-BYFⅢ可以显著降低 BEAS-2B 细胞 MUC5AC 和 MUC5B 的

mRNA 表达；除补肾祛邪组分配伍外，ECC-BYFⅢ各组分配伍均能显著降低 MUC5B mRNA 表达；补气、补肾、祛邪及补肾活血组分配伍对 MUC5AC mRNA 表达效果显著；祛邪、补气化痰、补肾化痰、扶正化痰及补气祛邪组分配伍（均含化痰组分淫羊藿苷）可显著降低 MUC1 mRNA 表达。R 值综合评价结果显示，ECC-BYFⅢ及其组分配伍对 MUC mRNA 表达的影响无明显规律，这可能与其作用靶细胞不同有关。通过 R 值综合评价体内外黏液分泌相关指标发现，活血、祛邪、补肾活血、扶正化痰、补气祛邪组分配伍对 COPD 黏液分泌相关指标有显著纠正作用，作用强度为：祛邪＞扶正化痰＞补肾活血＞补气祛邪＞ECC-BYFⅢ＞活血。

综上，ECC-BYFⅢ不同组分配伍对 COPD 黏液分泌相关指标有不同的效应，含化痰（川陈皮素）或活血（丹皮酚）的组分配伍抑制黏液分泌效果较好。本研究在组分配伍药效基础上，探讨 ECC-BYFⅢ抑制黏液高分泌的配伍规律，为揭示 ECC-BYFⅢ物质基础及作用机制提供了思路。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ramos FL, Krahnke JS, Kim V. Clinical issues of mucus accumulation in COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2014, 9: 139–150. DOI: 10.2147/COPD.S38938.

[2] Martin C, Frija-Masson J, Burgel PR. Targeting mucus hypersecretion: new therapeutic opportunities for COPD? [J]. Drugs, 2014, 74 (10): 1073–1089. DOI: 10.1007/s40265–014–0235–3.

[3] Kesimer M, Ford AA, Ceppe A, et al. Airway mucin concentration as a marker of chronic bronchitis [J]. N Engl J Med, 2017, 377 (10): 911–922. DOI: 10.1056/NEJMoa1701632.

[4] Wang YH, Shen Y, Li K, et al. Role of matrix metalloproteinase–9 in lipopolysaccharide–induced mucin production in human airway epithelial cells [J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 486 (2): 111–118. DOI: 10.1016/j.abb.2009.04.006.

[5] Li JS, Xie Y, Li SY, et al. Comparison of conventional medicine, TCM treatment, and combination of both conventional medicine and TCM treatment for patients with chronic obstructive pulmonary disease: study protocol of a randomized comparative effectiveness research trial [J]. Trials, 2014, 15: 153. DOI: 10.1186/1745–6215–15–153.

[6] Li JS, Wang HF, Li SY, et al. Effect of sequential treatment with TCM syndrome differentiation on acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and AECOPD risk window [J]. Complement Ther Med, 2016, 29: 109–115. DOI: 10.1016/j.ctim.2016.09.009.

[7] Li JS, Ma JD, Tian YG, et al. Effective–component compatibility of BufeiYishen formula Ⅱ inhibits mucus hypersecretion of chronic obstructive pulmonary disease rats by regulating EGFR/PI3K/mTOR signaling [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 257: 112796. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112796.

[8] Li Y, Li SY, Li JS, et al. A rat model for stable chronic obstructive pulmonary disease induced by cigarette smoke inhalation and repetitive bacterial infection [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35 (10): 1752–1760. DOI: 10.1248/bpb.b12–00407.

[9] 李建生，崔红新，田燕歌，等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病稳定期模型大鼠肺胶原和蛋白酶调节作用的 R 值综合评价 [J]. 中医杂志，2014, 55 (11): 949–954. DOI: 10.13288/j.11–2166/r.2014.11.014.
Li JS, Cui HX, Tian YG, et al. R–value comprehensive evaluation of effect of three methods for lung–kidney regulating and supplementing on lung collagen and protease in stable COPD model rats [J]. J Tradit Chin Med, 2014, 55 (11): 949–954. DOI: 10.13288/j.11–2166/r.2014.11.014.

[10] 秦燕勤，董浩然，李建生，等. 补肺益肾方对单核细胞条件培养基刺激下肺泡上皮细胞炎症反应的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志，2017, 24 (1): 63–67. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2017.01.018.
Qin YQ, Dong HR, Li JS, et al. The effects of nourishing lung and kidney formulas on inflammatory response of alveolar epithelial cells stimulated by monocytes conditioned medium [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2017, 24 (1): 63–67. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2017.01.018.

[11] Li JS, Zhao P, Yang LP, et al. System biology analysis of long–term effect and mechanism of Bufei Yishen on COPD revealed by system pharmacology and 3–omics profiling [J]. Sci Rep, 2016, 6: 25492. DOI: 10.1038/srep25492.

[12] 王晶，李亚，李建生，等. 调补肺肾方药对 $PM_{2.5}$ 暴露大鼠鼻腔黏液高分泌的保护作用 [J]. 中华中医药杂志，2019, 34 (5): 1893–1897.
Wang J, Li Y, Li JS, et al. Protective effect of invigorating lung and kidney formulae on nasal mucus hypersecretion in rats exposed to $PM_{2.5}$ [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2019, 34 (5): 1893–1897.

[13] 马锦地. 基于 COPD 疗效的补肺益肾组分方优化及抑制气道黏液高分泌机制探讨 [D]. 北京：北京中医药大学，2019.
Ma JD. Optimization of effective–component compatibility of Bufei Yishen formula and the mechanism of inhibiting airway mucus hypersecretion based on efficacy for COPD [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.

[14] Li JS, Liu XF, Dong HR, et al. Effective–constituent compatibility–based analysis of Bufei Yishen formula, a traditional herbal compound as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Integr Med, 2020, 18 (4): 351–362. DOI: 10.1016/j.joim.2020.04.004.

[15] Shen YC, Huang SG, Kang J, et al. Management of airway mucus hypersecretion in chronic airway inflammatory disease: Chinese expert consensus (English edition) [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2018, 13: 399–407. DOI: 10.2147/COPD.S144312.

[16] 张丽娜，吴铁军，张喜红. 低温刺激影响气道黏蛋白分泌与 AECOPD [J]. 中华危重病急救医学，2020, 32 (10): 1273–1276. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430–20200612–00465.
Zhang LN, Wu TJ, Zhang XH. Low temperature affects airway mucin secretion and promotes acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (10): 1273–1276. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430–20200612–00465.

[17] Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, mucus, and goblet cells [J]. Chest, 2018, 154 (1): 169–176. DOI: 10.1016/j.chest.2017.11.008.

[18] Bonser LR, Zlock L, Finkbeiner W, et al. Epithelial tethering of MUC5AC–rich mucus impairs mucociliary transport in asthma [J]. J Clin Invest, 2016, 126 (6): 2367–2371. DOI: 10.1172/JCI84910.

[19] Evans CM, Raclawska DS, Ttofali F, et al. The polymeric mucin Muc5ac is required for allergic airway hyperreactivity [J]. Nat Commun, 2015, 6: 6281. DOI: 10.1038/ncomms7281.

[20] Binker MG, Binker–Cosen AA, Richards D, et al. LPS–stimulated MUC5AC production involves Rac1–dependent MMP–9 secretion and activation in NCI–H292 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386 (1): 124–129. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.05.136.

[21] 丁瑞敏. 联合检测外周血 CEA、CA125、VEGF、MT 及 MMP–9 在晚期非小细胞肺癌诊断中的意义 [J]. 实用检验医师杂志，2015, 7 (1): 42–43, 24. DOI: 10.3969/j.issn.1674–7151.2015.01.19.
Ding RM. The significance of MT, VEGF, CA125, CEA and MMP–9 combine detection in NSCLC diagnosis [J]. Chin J Lab Pathol, 2015, 7 (1): 42–43, 24. DOI: 10.3969/j.issn.1674–7151.2015.01.19.

[22] Deshmukh HS, Shaver C, Case LM, et al. Acrolein–activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 38 (4): 446–454. DOI: 10.1165/rcmb.2006–0339OC.

[23] Kirkham S, Kolsum U, Rousseau K, et al. MUC5B is the major mucin in the gel phase of sputum in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 178 (10): 1033–1039. DOI: 10.1164/rccm.200803–391OC.

[24] Zheng ZG, Qi YF, Xu XM, et al. Sputum mucin 1 is increased during the acute phase of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation [J]. J Thorac Dis, 2017, 9 (7): 1873–1882. DOI: 10.21037/jtd.2017.06.63.

[25] Kato K, Chang EH, Chen Y, et al. MUC1 contributes to goblet cell metaplasia and MUC5AC expression in response to cigarette smoke *in vivo* [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, 319 (1): L82–L90. DOI: 10.1152/ajplung.00049.2019.

[26] 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): 1710–1713.
Li JS. Accumulation of pathogen and damage due to deficiency of vital qi is the main pathogenesis of chronic obstructive pulmonary diseases [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2011, 26 (8): 1710–1713.

（收稿日期：2021–06–11）