

邓亚胜,林江,黄慧,等. 烟雾刺激法诱导呼吸系统疾病动物模型的研究及应用进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(5): 118-126.

Deng YS, Lin J, Huang H, et al. Research and application progress of animal models of respiratory diseases induced by the smoke stimulation method [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(5): 118-126.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.015

烟雾刺激法诱导呼吸系统疾病动物模型的研究 及应用进展

邓亚胜, 林江*, 黄慧, 梁天薇, 荣娜, 郑艺清, 范燕萍

(广西中医药大学, 南宁 530200)

【摘要】 环境空气污染对人类呼吸系统造成了严重的损害,增加了罹患呼吸系统疾病的风险。烟雾刺激法是临床动物实验中常用于制备呼吸系统疾病动物模型的造模方法,包括香烟烟雾刺激和浓烟烟雾刺激,主要是模仿空气环境污染的致病原理进行动物模型的制备。通过在动物模型上实施药物干预,是研发治疗呼吸系统疾病以及减轻疾病症状药物的关键。当前阶段,中药或中医外治对于治疗呼吸系统疾病的作用机制研究不断深入,中医药疗法在治疗呼吸系统疾病方面具有独特的优势。因此,构建出与临床呼吸系统疾病重现性好、吻合度高的动物模型,对于防治和研究呼吸系统疾病尤为重要。该文主要从环境空气污染对人类呼吸系统造成的危害入手,阐述烟雾刺激法的致病机制以及动物模型制备要素和方法,并分析烟雾刺激法构建的动物模型在中药和中医外治中的应用,为构建更加合理的呼吸系统疾病动物模型及中医新疗法和新药物的出现奠定基础。

【关键词】 烟雾刺激法;动物模型;呼吸系统疾病;中医药疗法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0118-09

Research and application progress of animal models of respiratory diseases induced by the smoke stimulation method

DENG Yasheng, LIN Jiang*, HUANG Hui, LIANG Tianwei, RONG Na, ZHENG Yiqing, FAN Yanping
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

【Abstract】 Environmental air pollution causes serious damage to the human respiratory system and increases the risk of respiratory diseases. Smoke stimulation is a modeling method commonly used in clinical animal experiments to prepare animal models of respiratory diseases, including cigarette smoke stimulation and thick smoke stimulation, by imitating the pathological principle of air environmental pollution. Through drug treatment of animal models, researchers can develop drugs to treat respiratory diseases and alleviate symptoms. Research on the mechanism of traditional Chinese medicine and external treatment with traditional Chinese medicine for respiratory diseases is constantly progressing. Traditional Chinese medicine therapy has unique advantages in the treatment of respiratory diseases. Therefore, establishing an animal model with good reproducibility and high consistency with clinical respiratory diseases is particularly important to prevent, treat, and research respiratory diseases. This article mainly discusses harm caused by environmental air pollution

【基金项目】 国家自然科学基金项目(82060825);全国高校黄大年式教师团队——中西医基础课程教师团队(教育部教师函[2022]2号);广西名中医林江传承工作室(桂中医药科教发[2021]6号,中医学广西一流学科(桂教科研[2022]1号))。

【作者简介】 邓亚胜(1991—),男,硕士研究生,研究方向:特色方剂的配伍及成药化研究。E-mail:1440362586@qq.com

【通信作者】 林江(1963—),女,博士,教授,博士生导师,研究方向:方剂组方原理、临床应用及实验研究。E-mail:1713552545@qq.com

to the human respiratory system, expounds the pathological mechanism of the smog stimulation method and the preparation elements and method of animal models, and analyzes the application of animal models established by the smog stimulation method in traditional Chinese medicine and external treatment with traditional Chinese medicine, laying the foundation to establish more reasonable animal models of respiratory diseases and the emergence of new therapies and drugs in traditional Chinese medicine.

【Keywords】 smoke stimulation; animal models; respiratory diseases; traditional Chinese medicinal therapy

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

环境空气污染是导致全球死亡率和预期寿命损失(loss of life expectancy, LLE)升高主要因素,长期暴露于空气污染环境下会增加人类患呼吸系统疾病的风险,全球的所有环境空气污染造成的超额死亡率估计为每年 88 万人,LLE 为每年 2.9 人,超过了吸烟的死亡率^[1]。自 1990~2017 年,全球有 5.449 亿人患有呼吸系统疾病,与 1990 年相比增加了 39.8%。慢性呼吸系统疾病是 2017 年第三大死因(占有死亡人数的 7.0%,仅次于肿瘤和心血管疾病)^[2]。2017 年因慢性呼吸系统疾病导致的死亡人数,自 1990 年以来增长了 18.0%,而总伤残调整寿命年(disability adjusted life year, DALY)增加了 13.3%^[3-5]。

暴露于室外细颗粒物 2.5(particulate matter 2.5, PM_{2.5})被认为是一个主要危害健康的全球问题,包括二手烟、使用固体燃料造成的家庭空气污染和主动吸烟,由此可见,吸烟在空气环境污染引发疾病过程当中占据首要因素^[3,6]。吸烟是全球疾病、残疾和死亡的主要可预防原因之一,会引起慢性肺病并使个体易患急性肺损伤和肺部感染,是引发呼吸系统疾病主要的原因。直接和二手香烟烟雾暴露都会增加发生呼吸道和其他侵入性感染的风险和严重程度^[7-8]。

现阶段,通过在动物模型上实施药物干预,是研发治疗呼吸系统疾病以及减轻疾病症状药物的关键,合适的动物模型是防治和研究呼吸系统疾病的重要基础。本文主要阐述烟雾刺激法对呼吸系统疾病动物模型的构建,同时对模型制备要素以及模型建立过程中的致病病理变化和造模方法进行评价,并且阐述了中医药疗法在烟雾刺激法构建动物模型的研究应用。

1 烟雾刺激与呼吸系统疾病致病关联性 & 病理作用机制分析

1.1 反复呼吸道感染疾病

反复呼吸道感染(recurrent respiratory tract infections, RRTIs)是指 1 年之内上、下呼吸道感染

的次数频繁,超过正常次数范围,是儿科的一种常见疾病^[9]。本病在学龄前儿童群体中发病率很高,据资料显示,有 10%~15% 的儿童经历过反复呼吸道感染,在发达国家,将近有 25% 的 1 岁以下儿童及 18% 的 1~4 岁儿童患 RRTIs^[10]。RRTIs 疾病 5 岁以下儿童每年死亡人数高达 1000 万例,其中发展中国家占 90%,本病的发生对患儿、家庭、社会和卫生系统造成重大影响,本病已成为全球性公共卫生问题^[10-13]。发病原因除感染因素外还可能与免疫系统功能低下、微量元素缺乏以及呼吸系统基础疾病等多种原因相关^[14-15]。儿童早期的呼吸道感染与空气污染密切相关^[16-17],现有研究表明,空气环境污染对于呼吸系统的破坏不仅仅是诱导呼吸系统组织器官的氧化应激和炎症反应,对 T 细胞介导的细胞免疫反应也会产生抑制作用,引起免疫力低下,增加呼吸道疾病感染的风险^[18-19]。

实验研究中采用烟雾刺激法常用于构建反复呼吸道感染肺气虚证动物模型。烟雾刺激的主要作用机制为增加呼吸道器官组织中脂质氧化(MDA)导致氧化应激反应增加,激活上皮细胞、中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞、单核细胞并募集到气道,引起炎性细胞浸润气管、支气管及肺组织,产生炎症反应,造成呼吸道感染疾病^[20]。

1.2 慢性支气管炎疾病

慢性支气管炎(chronic bronchitis, CB)是指发作为气管、支气管黏膜及周围组织的慢性非特异性炎症性疾病,是慢性阻塞性肺疾病的临床表型^[21-22]。在我国具有很高的发病率,尤其是中老年群体中发病率最高,具有病程长,反复发作特点,且易发展为肺心病或肺气肿,对患者的生活质量造成了巨大的影响^[23]。研究发现慢性支气管炎的发病与吸烟、环境污染、感染以及过敏因子等多种因素密切相关,吸烟是 CB 发病的主要诱导因素,吸烟者 30 年累积 CB 发病率高达 42%^[24]。国内外学者通过烟熏法成功构建慢性支气管炎动物模型,使其与人类临床发病和病理变化更加吻合,目前该方法应

用最为广泛^[25]。

研究表明,烟熏烟雾中存在焦油、尼古丁、氢氰酸等多种化学物质,对呼吸道屏障造成严重的破坏,杯状细胞过多的产生和分泌粘液,引起呼吸道黏液分泌增多,支气管黏膜上皮细胞肿胀,纤毛细胞变性、脱落,纤毛运动受阻致使痰液阻塞气道;烟雾中的焦油和尼古丁会增加副交感神经兴奋性,使支气管痉挛收缩,气道阻力增加,气管黏膜损伤、气道重塑,气道顺应性下降导致气流阻塞恶化,最终产生慢性支气管炎疾病^[26-28]。

1.3 慢性阻塞性肺疾病

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是临床上一种常见的可预防、可治疗的呼吸系统疾病,其致病特征是持续存在的不可逆气流受限和相应的呼吸系统症状^[29]。其发病通常与香烟烟雾或者暴露于其它显著有害颗粒或气体相关,流行病率达 10.1%^[30-31]。COPD 是 2019 年全球第三大死因,疾病负担排在全球第五。我国 40 岁及以上人群 COPD 患病率高达 13.7%,以 COPD 为主的呼吸系统慢性疾病已被列为我国四大慢病之一^[32-33]。目前吸烟及被动吸烟被认为是慢性阻塞性肺疾病的主要发病诱因,吸烟诱导 COPD 疾病的作用机制尚不十分清楚,但此法在构建 COPD 动物模型中较为普遍^[21,34]。

研究表明,吸入烟雾的刺激和直接毒害作用,会致使气管黏膜上皮细胞肿胀,杯状细胞以及腺体增生,纤毛细胞变短、不规则且部分脱落,肺泡巨噬细胞吞噬功能降低,黏膜纤毛系统结构和功能发生异常,支气管痉挛,气道阻力加大。烟雾中大量的氧化剂和自由基直接损伤细胞功能,引起肺血管内皮细胞以及肺泡巨噬细胞聚集、活化。一方面释放氧自由基与蛋白酶类(如弹性蛋白酶),加重气道上皮氧化负担,损坏氧化/抗氧化平衡关系。另一方面抑制抗蛋白酶类(如弹性蛋白酶抑制剂)的活性,促使血中弹性蛋白酶活性升高,使蛋白酶-抗蛋白酶失衡被打破,导致肺泡壁破坏,引起肺气肿的形成与发展,最终产生慢性阻塞性肺疾病^[35-39]。

2 烟雾刺激法诱导的呼吸系统疾病动物模型的制备

2.1 烟雾刺激法致病作用机制

烟雾刺激法目前主要通过香烟烟雾刺激和浓烟烟雾刺激两种方式进行。香烟烟雾刺激采用香烟烟雾暴露的方式,浓烟烟雾刺激则采用烟叶或者

以烟叶、刨花、锯末、辣椒、硫磺等全部或部分燃料混合的方式进行烟熏,两者都是模仿空气污染对呼吸系统的破坏进行模型制备。颗粒物 (particulate matter, PM) 是空气污染的主要组分,也是引发呼吸系统疾病的最主要诱发因素^[18]。采用香烟或浓烟烟雾刺激使动物模型与人类呼吸系统疾病在相同致病因素下诱发疾病,构建重现性好、吻合度高动物模型。

香烟烟雾 (Cigarette smoke, CS) 是一种气溶胶,由固体或液体小质点 (焦油) 分散并悬浮在气体介质中形成的胶体分散体系组成,由 4500 多种不同的物质组成^[40-41]。一类由焦油、尼古丁、一氧化碳、二氧化碳、甲醛、丙酮、丙烯醛、铅 (Pb)、镉 (Cd)、多环芳烃 (PAH)、N-亚硝胺、氧自由基、多环芳香烃、羟基醌和氮氧化物等物质构成,此类物质对机体具有致癌、影响骨流失、细胞死亡、功能障碍、毒性作用等多种影响^[42-45]。二类根据吸入香烟烟雾的颗粒物大小沉积在肺部不同位置,较大的颗粒物停留在上呼吸道,微小颗粒物停留在下呼吸道的肺泡中。CS 可通过增加脂质氧化 (MDA) 导致氧化应激反应增加,从而激活上皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞并募集到气道,引起炎性细胞浸润气管、支气管及肺组织,产生慢性炎症反应^[20,46-47]。三类 CS 会削弱宿主对部分病原菌的防御能力并且增加病原菌的致病力,增加肺部疾病感染和恶化的风险^[48-49]。

浓烟烟雾刺激主要是根据空气环境污染致病对人体致病机制的机理进行模型制备,PM 是由有机碳、矿物粉尘、硝酸盐、硫酸盐、铵、微量元素和水组成的复合物。PM 对呼吸系统的发病原理主要是诱导氧化应激和炎症反应,炎症因子和氧化应激可以调控关键的信号转导通路^[18,50-51]。研究证实,PM 可以增加炎性细胞因子受体的表达,这些受体能够激活肺组织细胞中的 IL-1 受体 (IL-1R) 和 IL-6R 介导的信号通路,增加 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、GM-CSF 和 IL-13 等炎性介质的释放,导致炎性细胞浸润^[52]。PM 主要是通过通过各种组织器官中产生活性氧 (ROS) 和一些氧化代谢物的方式诱发氧化应激反应,使气道产生炎症反应^[52]。

2.2 动物模型制备要素

烟雾刺激法主要是将一定数量的动物投放到烟室内接受烟熏,烟熏时间和次数根据不同的需求有所变化,临床上主要用于构建呼吸系统相关疾

病。烟雾刺激法构建动物模型常用模型动物有 SD 大鼠、Wistar 大鼠、KM 小鼠、NIH 小鼠、豚鼠,此外有学者采用兔、猴、羊等哺乳动物作为研究使用。当前实验常采用的模型动物是鼠类。其中大鼠、小鼠是当前运用最广泛的动物模型,具有易饲养繁殖和成模周期短的优势,并且与人类基因序列高度相似,存在很多与基因互补的抗体和探针的酶,对于基因表达的实验操作提供了很大的便利^[53-54]。现有研究表明,大鼠体积和气道表面积相对于小鼠较大,易于实验操作,在烟熏或 LPS 注射方法造模时易出现炎性浸润和纤维化沉积、支气管壁增厚等病理改变。小鼠对刺激性气体较为敏感,易诱导气道损伤模型,成本低,故刺激性气体诱导动物模型多使用小鼠。与此同时,考虑到小鼠体型偏小,气道压力和气道体积小,进行气道顺应性检测时,会对实验的开展造成了一定的影响,并且不利于气道病理评分的检验^[55]。

模型动物的性别选择对实验的结果也会造成影响。研究表明,雌性小鼠分泌的雌二醇会影响烟雾中化学物质的代谢,使雌性动物的气道更易受氧化应激损伤^[56]。据 2009 年国家卫生统计中心报告,67.8% 的慢性支气管炎患者为女性^[57]。女性 CB 发病率更高的原因,排除雌激素的影响因素外,可能还与人类免疫反应的性别二态性导致的疾病出现性别差异的影响因素相关^[58-59]。进行烟雾刺激法动物实验研究过程中,雌雄性别差异会对呼吸系统相关疾病实验结果造成一定的影响,雌雄各半的模型在一定程度上虽然可以证实研究数据不受性别差异的影响,但部分实验也会因性别差异对实验造成结果上的偏差,故呼吸系统动物模型的制备多采用雄性小鼠^[2,60]。

烟雾刺激法制备模型需考虑烟熏材料、烟熏时间、烟室体积、烟熏动物种类、烟熏动物数量、烟熏动物体重等多种影响因素。根据既往烟雾刺激法模型的构建文献进行筛查综合评价,模型制备过程中,多选用 1 m³ 熏箱,刨花、锯末、烟叶各 50 g 或直接使用香烟烟熏,部分实验中会添加少许辣椒、硫磺等材料。烟室内烟雾浓度常要求在 2 min 内要达到 4%,烟熏材料燃尽时烟室内烟雾浓度约为 200~260 ng/m³,熏箱中氧浓度保持在 20%~21% 之间,保持熏箱内气压与大气压等同,造模周期在 28~90 d 不等,以 28 d 多见^[61-62]。

2.3 动物模型制备方法

烟雾刺激法在临床上常用于构建反复呼吸道感染、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病 3 种呼吸系统疾病,构建的呼吸系统疾病动物模型的中医证型为肺气虚证。具体的造模情况见表 1。

3 烟雾刺激法构建动物模型在中医药治疗呼吸系统疾病中的应用

现阶段,呼吸系统疾病的治疗药物及手段众多,西医治疗主要采用抗生素、免疫制剂、肾上腺皮质激素、抗胆碱药物等手段,具有多种副作用以及耐药性的产生,对患者身体及心理上造成了极大的负担^[66]。中医采用辩证论治疗法,中药以及中医外治在治疗呼吸系统疾病方面有显著疗效,具有显著缓解疾病症状、降低复发率、减少并发症、多靶点、副作用少等优势,在治疗呼吸系统疾病研究中受到越来越多的重视。

3.1 中药(含天然药物)

研究结果表明,多种中药及中药单体对烟雾刺激法诱导呼吸系统疾病动物模型具有显著疗效^[51,63,67-72],研究结果见表 2。

表 1 烟雾刺激法对呼吸系统动物模型的制备
Table 1 Preparation of animal models of respiratory system by smoke stimulation

疾病 Diseases	模型动物 Model animals	中医证型 Chinese medicine evidence type	造模方法 Moulding methods
反复呼吸道感染 Recurrent respiratory tract infections	SD 大鼠 ^[63] SD rats	肺气虚型 Lung Qi deficiency type	采用刨花加烟叶各 15 g 烟熏大鼠,每天 30 min,连续 22 d The rats were smoked with 15 g each of shavings and tobacco leaves for 30 min per day for 22 d
慢性支气管炎 Chronic bronchitis	SD 大鼠 ^[64] SD rats	肺气虚型 Lung Qi deficiency type	SD 大鼠,置于 60 cm×100 cm×100 cm 的烟室中;每次烟熏用香烟 20 支,烟熏时间 30 min,每日 2 次,连续 35 d SD rats, placed in a 60 cm × 100 cm × 100 cm smoke chamber; 20 cigarettes were smoked for 30 min each time, twice daily for 35 d
慢性阻塞性肺疾病 Chronic obstructive pulmonary disease	BALB/c 小鼠 ^[65] BALB/c mice	肺气虚型 Lung Qi deficiency type	将小鼠放入熏烟箱,点燃香烟使烟雾浓度达到(30±5)% 时进行烟雾熏吸,每次 40 min,每天 2 次,持续 28 d Mice were placed in a fumigation box and the smoke was smoked for 40 min each time, twice a day for 28 d, when the cigarette was lit to a concentration of (30±5)%

表 2 改善呼吸系统疾病的部分中药
Table 2 Selected herbs for improving respiratory diseases

疾病 Diseases	中药 (含药物单体) Chinese medicine (with drug monomers)	模型动物 Model animals	作用机制 Mechanism of action
反复呼吸道感染 Recurrent respiratory tract infections	参苓白术散 Shenling Atractylodes San	SD 大鼠 ^[63] SD rats	升高血清 IgA、IgG、IgM 水平,降低气管 NF-κB 表达水平,抑制炎症因子的生成 Increase serum IgA, IgG and IgM levels, decrease airway NF-κB expression levels and inhibit the production of inflammatory factors
慢性支气管炎 Chronic bronchitis	柚皮素 Naringenin	豚鼠 ^[67] Guinea pigs	①降低白细胞介素-8 (IL-8)、白三烯 B4 (LTB4) 和肿瘤坏死因子的浓度;②降低肺泡灌洗液中 (TNF-α) 肺组织中的髓过氧化物酶 (MPO) 活性 ① Reduced concentrations of interleukin-8 (IL-8), leukotriene B4 (LTB4) and tumour necrosis factor; ② Reduced (TNF-α) myeloperoxidase (MPO) activity in alveolar lavage fluid in lung tissue
	安石榴苷 Amphiregulin	SD 大鼠 ^[69] SD rats	①抑制肺组织、血清中炎症因子的表达 (IL-6、IL-8、IL-1β 和 TNF-α 含量下降);②促进肺组织、血清抗氧化酶表达 (SOD、CAT、GSH-Px 活性升高,MDA 含量下降);③激活 PPARγ/PGC-1α 和 Nrf2/γ-GCS 信号通路,提高慢性支气管炎抗氧化能力 ① Inhibit the expression of inflammatory factors in lung tissue and serum (decrease in IL-6, IL-8, IL-1β and TNF-α); ② Promote the expression of antioxidant enzymes in lung tissue and serum (increase in SOD, CAT, GSH-Px activity and decrease in MDA); ③ Activate PPARγ/PGC-1α and Nrf2/γ-GCS signaling pathways to improve antioxidant capacity in chronic bronchitis
	人参蜜百部醇提取物 Ginseng Honey Bupleurum Alcoholic Extract	SD 大鼠 ^[70] SD rats	提升血清超氧化物歧化酶 (SOD) 含量,降低血清丙二醛 (MDA)、白介素-6 (IL-6)、白介素 (IL-1β) 水平 Increase serum superoxide dismutase (SOD) levels and decrease serum malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6) and interleukin (IL-1β) levels
慢性阻塞性肺疾病 Chronic obstructive pulmonary disease	补肺益肾颗粒 Bufei Yishen granule	SD 大鼠 ^[68] SD rats	降低血清、肺组织、支气管肺泡灌洗液中肺表面活性蛋白 (SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D) 的水平 Reduces the levels of lung surface active proteins (SP-A, SP-B, SP-C and SP-D) in serum, lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid
	藏红花素 Saffronin	SD 大鼠 ^[51] SD rats	通过 Nrf2 途径减轻 CS 介导的氧化应激和 GSH 消耗的能力,增加 GSH 的生物合成以及清除 CS 诱导的 ROS 来减弱 CSE 介导的 GSH 水平消耗 Ability to reduce CS-mediated oxidative stress and GSH depletion through the Nrf2 pathway, increase GSH biosynthesis and scavenge CSE-induced ROS to attenuate CSE-mediated GSH level depletion
	青蒿琥酯 Artesunate	BALB/c 小鼠 ^[71] BALB/c mice	通过抑制促炎性 PI3K/Akt 和 p44/42 MAPK 信号通路,增强核因子 erythroid-2 相关因子 2 (Nrf2) 和过氧化氢酶活性以及降低 NADPH 氧化酶 2 (NOX2) 水平 Enhanced nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) and catalase activity and reduced NADPH oxidase 2 (NOX2) levels through inhibition of pro-inflammatory PI3K/Akt and p44/42 MAPK signalling pathways
	穿心莲内酯 Andrographolide	BALB/c 小鼠 ^[72] BALB/c mice	①降低肺泡灌洗液中 IL-1β、IP-10、MCP-1 和 KC 的水平;②抑制肺组织 GM-CSF、TNF-α 和 MIP-2α (称为 GRO-β 或 CXCL2) 基因表达的升高;使 iNOS 基因表达降低至基础水平;③抑制了 3-NT、8-OHdG 和 8-异前列腺素的水平,从而改善了吸烟引起的蛋白质、DNA 和脂质的氧化损伤;④促进香烟烟雾暴露小鼠肺中谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 活性的诱导,增强 Nrf2 活性,增加核 Nrf2 积累和激活,促进 GSH 的产生 ① Reduced the levels of IL-1β, IP-10, MCP-1 and KC in alveolar lavage fluid; ② Suppressed elevated gene expression of GM-CSF, TNF-α and MIP-2α (known as GRO-β or CXCL2) in lung tissue; reduced iNOS gene expression to basal levels; ③ Suppressed the levels of 3-NT, 8-OHdG and 8-isoprostane, thereby ameliorating oxidative damage to proteins, DNA and lipids induced by cigarette smoking; ④ Promoted the induction of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activity, enhanced Nrf2 activity, increased nuclear Nrf2 accumulation and activation, and promoted GSH production in the lungs of cigarette smoke-exposed mice

3.2 其它传统中医疗法

其它传统疗法主要指中医特有的外治手法,包括灸法、电针、穴位贴敷等,研究表明,此类中医疗法对改善烟熏法诱导呼吸系统疾病动物模型具有一定的疗效^[68,73-74],详见表 3。

4 总结

呼吸系统疾病给人们的生产生活带来了严重的影响,对全球的经济造成了极大的负担^[75]。环境污染是导致呼吸系统疾病的首要因素,其对呼吸系统的破坏主要通过诱导组织气管的氧化应激和炎症反应方式,从而引起呼吸系统的损伤。烟雾刺激法包括香烟烟雾刺激和浓烟烟雾刺激两种手段,采用该方法制备动物模型,高度地还原空气环境污染对人体的致病原理,构建出了重现性好、吻合度高的动物模型,为治疗呼吸系统疾病药物的研究开发和临床试验提供理论基础。

现阶段,为了更规范的使用烟雾刺激法构建的动物模型,目前仍存在一些问题亟待解决。第一,动物模型的制备缺乏规范化标准。当下烟雾刺激法构建动物模型制备方法各异,烟雾刺激的方法诱导动物模型缺少统一化、规范化的造模标准,如烟熏材料的多少、材料的种类、烟室的体积、烟熏周期、烟室内烟雾浓度等在研究中没有进行确切的阐述。第二,模型构建疾病的诊断一致性问题。当前阶段多出现临床实验研究造模方法相同,但构建的动物模型疾病可能迥然各异。烟雾刺激法针对的是整个呼吸系统,模型建立后如何精准的判断模型制备的是慢性支气管炎还是慢性阻塞性肺疾病,采取的验证手段往往仅仅监测目标疾病的相关检测指标,并未排除其他可能造模合并产生的疾病。第三,模型建立后的给药缺乏用药的靶向性判断。如药物对慢性支气管炎治疗后,单纯检测慢性支气管炎的相关指标是否改善,但该药物对其他可能因此

表 3 其它传统中医疗法对烟雾刺激法诱导呼吸系统疾病动物模型的部分研究结果
Table 3 Selected results of other traditional Chinese medicine studies on animal models of respiratory disease induced by smoke stimulation

症状 Symptoms	方法 Methods	模型动物 Model animals	作用机制 Mechanism of action
慢性支气管炎 Chronic bronchitis	隔药饼灸 (I 组:肺俞、肾俞; II 组:关元、足三里) 玉屏风散药饼 Moxibustion (Group I: Lung Yu, Kidney Yu; Group II: Guan Yuan, Foot San Li) Yuping Feng San	SD 大鼠 ^[73] SD rats	①升高 T 细胞亚群中 CD3 ⁺ 、CD8 ⁺ 细胞和细胞因子,增强免疫功能;②诱导肺气虚证大鼠淋巴细胞增殖,增强脾淋巴细胞活性,提高巨噬细胞活性,激发 NK 细胞活性;③改善慢支患者的免疫状态,提高外周血中 C3、C4、IgA、IgG 及 IgM 含量 ①Increase CD3 ⁺ and CD8 ⁺ cells and cytokines in T-cell subsets to enhance immune function;②Induce lymphocyte proliferation, enhance spleen lymphocyte activity, increase macrophage activity and stimulate NK cell activity in rats with lung qi deficiency; ③Improve the immune status of patients with chronic branch disease, increase C3, C4, IgA, IgG and IgM levels in peripheral blood
	电针 (大椎、肺腧 (两侧)、肾俞 (两侧)) Electroacupuncture (Dazhi, Lung acupoint (both sides), Kidney Yu (both sides))	SD 大鼠 ^[74] SD rats	降低血管壁面积以及血管内皮生长因子 (VEGF) 和内皮素-1 (ET-1) 含量,改善肺血管重构 Reduces vessel wall area as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 (ET-1) content and improves pulmonary vascular remodelling
慢性阻塞性肺疾病 Chronic obstructive pulmonary disease	穴位贴敷舒肺贴软膏 (大椎、肺俞 (两侧)、肾俞 (两侧)) Acupuncture point application of Shu Lung Patch Ointment (Da Zhi, Lung Yu (both sides), Kidney Yu (both sides))	SD 大鼠 ^[68] SD rats	降低血清、肺组织、支气管肺泡灌洗液中肺表面活性蛋白 (SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D) 的水平 Reduction of lung surface active protein (SP-A, SP-B, SP-C and SP-D) levels in serum, lung tissue and bronchoalveolar lavage fluid

造模方法导致的呼吸系统疾病疗效并没有进一步的探究。第四,模型建立的中医证型单一。烟雾刺激法构建的动物模型为肺气虚模型,临床上应扩大加深烟雾刺激模型的应用,可采用烟雾刺激法与中医病因造模方法相结合造模方式,构建出更多人类临床疾病的中医证型。中医药如口服中药及电针、穴位贴敷等外治疗法对于治疗 RRTIs、CB、COPD 等呼吸系统疾病有其独特的优势,疗效确切,但其作用机制研究尚不深入。此后的研究过程中,我们应当不断规范化、合理化烟雾刺激法对呼吸系统疾病动物模型的制备,不断地扩大和加深中医药疗法对于呼吸系统疾病的临床作用机制研究。

参考文献:

- [1] Hystad P, Yusuf S, Brauer M. Air pollution health impacts: the knowns and unknowns for reliable global burden calculations [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(11): 1794–1796.
- [2] Mo R, Li J, Chen Y, et al. lncRNA GAS5 promotes pyroptosis in COPD by functioning as a ceRNA to regulate the miR-223-3p/NLRP3 axis [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 26(1): 219.
- [3] GBD Chronic Respiratory Disease Collaborators. Prevalence and attributable health burden of chronic respiratory diseases, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet Respir Med*, 2020, 8(6): 585–596.
- [4] Burnett R, Chen H, Szyszkowicz M, et al. Global estimates of mortality associated with long-term exposure to outdoor fine particulate matter [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(38): 9592–9597.
- [5] Lelieveld J, Pozzer A, Pöschl U, et al. Loss of life expectancy from air pollution compared to other risk factors: a worldwide perspective [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(11): 1910–1917.
- [6] Fernández E, López MJ, Gallus S, et al. Tackling second-hand exposure to tobacco smoke and aerosols of electronic cigarettes: the TackSHS project protocol [J]. *Gac Sanit*, 2020, 34(1): 77–82.
- [7] Feng RM, Zong YN, Cao SM, et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22.
- [8] Burnett R, Chen H, Szyszkowicz M, et al. Global estimates of mortality associated with long-term exposure to outdoor fine particulate matter [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(38): 9592–9597.
- [9] Cuppari C, Colavita L, Miraglia Del Giudice M, et al. Recurrent respiratory infections between immunity and atopy [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, 31: 19–21.
- [10] Pasternak G, Lewandowicz-Uszyńska A, Królak-Olejnik B. Recurrent respiratory tract infections in children [J]. *Pol Merkuriusz Lekarski*, 2020, 49(286): 260–266.
- [11] 中国医师协会儿科医师分会儿童耳鼻咽喉专业委员会, 许政敏, 付勇, 等. 儿童反复上呼吸道感染临床诊治管理专家共识 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2017, 32(10): 721–725.
- [12] Esposito S, Jones MH, Feleszko W, et al. Prevention of new respiratory episodes in children with recurrent respiratory infections: an expert consensus statement [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11): 1810.
- [13] Iwasaki A, Teramoto M, Muraki I, et al. The association between living area in childhood and respiratory disease mortality in adulthood [J]. *Int J Public Health*, 2022, 67: 1604778.
- [14] 李政, 蒋晶晶, 巫波, 等. 反复呼吸道感染患儿血清维生素 A、E 和体液免疫水平变化及临床意义的研究 [J]. *成都医学院学报*, 2019, 14(4): 463–466.
- [15] 李亚, 聂鑫, 崔明明. 儿童反复呼吸道感染与血清维生素 A、D、E 水平的相关性研究 [J]. *中国儿童保健杂志*, 2017, 25(6): 634–636.
- [16] Rivas-Santiago CE, Sarkar S, Cantarella P, et al. Air pollution particulate matter alters antimicrobial respiratory epithelium innate immunity [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(6): 2507–2517.
- [17] MacIntyre EA, Gehring U, Mölter A, et al. Air pollution and respiratory infections during early childhood: an analysis of 10 European birth cohorts within the ESCAPE Project [J]. *Environ Health Perspect*, 2014, 122(1): 107–113.
- [18] Nagappan A, Park SB, Lee SJ, et al. Mechanistic implications of biomass-derived particulate matter for immunity and immune disorders [J]. *Toxics*, 2021, 9(2): 18.
- [19] Jiang A, Bloom O, Ono S, et al. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation [J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 610–624.
- [20] Lugg ST, Scott A, Parekh D, et al. Cigarette smoke exposure and alveolar macrophages: mechanisms for lung disease [J]. *Thorax*, 2022, 77(1): 94–101.
- [21] Boukhenouna S, Wilson MA, Bahmed K, et al. Reactive oxygen species in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 5730395.
- [22] Kim V, Criner GJ. The chronic bronchitis phenotype in chronic obstructive pulmonary disease: features and implications [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2015, 21(2): 133–141.
- [23] Chamitava L, Cazzoletti L, Ferrari M, et al. Biomarkers of oxidative stress and inflammation in chronic airway diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4339.
- [24] Kelly F. Air pollution and chronic bronchitis: the evidence firms up [J]. *Thorax*, 2021, 76(8): 744–745.
- [25] 曹利华, 赵院院, 苗晋鑫, 等. 基于 TGF- β 信号通路探讨鲜芦根抗慢性支气管炎气道炎症作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(22): 5887–5894.
- [26] Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(3): 228–237.
- [27] Ma J, Rubin BK, Voynow JA. Mucins, mucus, and goblet cells

- [J]. Chest, 2018, 154(1): 169–176.
- [28] Kim V, Dolliver WR, Nath HP, et al. Mucus plugging on computed tomography and chronic bronchitis in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Respir Res, 2021, 22(1): 110.
- [29] Wen L, Krauss-Etschmann S, Petersen F, et al. Autoantibodies in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Front Immunol, 2018, 9: 66.
- [30] Onur ST, Boyracı N, Akyl FT, et al. Developing lung cancer in COPD: possible role of carrying Alpha-1 antitrypsin deficiency variants [J]. Respir Med Case Rep, 2022, 38: 101667.
- [31] Fujita M, Nakanishi Y. The pathogenesis of COPD: lessons learned from *in vivo* animal models [J]. Med Sci Monit, 2007, 13(2): RA19-RA24.
- [32] Tanner L, Single AB. Animal models reflecting chronic obstructive pulmonary disease and related respiratory disorders: translating pre-clinical data into clinical relevance [J]. J Innate Immun, 2020, 12(3): 203–225.
- [33] Iheanacho I, Zhang S, King D, et al. Economic burden of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic literature review [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2020, 15: 439–460.
- [34] Cervilha DAB, Ito JT, Lourenço JD, et al. The Th17/treg cytokine imbalance in chronic obstructive pulmonary disease exacerbation in an animal model of cigarette smoke exposure and lipopolysaccharide challenge association [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1921.
- [35] Shapiro SD. Animal models for COPD [J]. Chest, 2000, 117(5): 223S–227S.
- [36] 焦丽君, 章菁仪, 王欣燕. 中性粒细胞弹性蛋白酶对支气管扩张症作用机制的研究进展 [J]. 现代医学, 2021, 49(6): 710–713.
- [37] Gharib SA, Manicone AM, Parks WC. Matrix metalloproteinases in emphysema [J]. Matrix Biol, 2018, 73: 34–51.
- [38] Shibata S, Miyake K, Tateishi T, et al. Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(51): 13057–13062.
- [39] Theodoro-Júnior OA, Righetti RF, Almeida-Reis R, et al. A plant proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* attenuates pulmonary mechanics, inflammation and remodeling induced by elastase in mice [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 403.
- [40] Correction; Ergosterol attenuates cigarette smoke extract-induced COPD by modulating inflammation, oxidative stress and apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(21): 2237.
- [41] Goel R, Bitzer Z, Reilly SM, et al. Variation in free radical yields from U. S. marketed cigarettes [J]. Chem Res Toxicol, 2017, 30(4): 1038–1045.
- [42] Benson NU, Anake WU, Adedapo AE, et al. Toxic metals in cigarettes and human health risk assessment associated with inhalation exposure [J]. Environ Monit Assess, 2017, 189(12): 619.
- [43] Qin Y, Liu Y, Jiang Y, et al. Cigarette smoke exposure inhibits osteoclast apoptosis via the mtROS pathway [J]. J Dent Res, 2021, 100(12): 1378–1386.
- [44] Anderson C, Majeste A, Hanus J, et al. E-cigarette aerosol exposure induces reactive oxygen species, DNA damage, and cell death in vascular endothelial cells [J]. Toxicol Sci, 2016, 154(2): 332–340.
- [45] Scherübl H. Smoking tobacco and cancer risk [J]. Dtsch Med Wochenschr, 2021, 146(6): 412–417.
- [46] John G, Kohse K, Orasche J, et al. The composition of cigarette smoke determines inflammatory cell recruitment to the lung in COPD mouse models [J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(3): 207–221.
- [47] Jasper AE, Sapely E, Thickett DR, et al. Understanding potential mechanisms of harm: the drivers of electronic cigarette-induced changes in alveolar macrophages, neutrophils, and lung epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 321(2): L336–L348.
- [48] Chien J, Hwang JH, Nilaad S, et al. Cigarette smoke exposure promotes virulence of *Pseudomonas aeruginosa* and induces resistance to neutrophil killing [J]. Infect Immun, 2020, 88(11): e00527–e00520.
- [49] Gilpin DF, McGown KA, Gallagher K, et al. Electronic cigarette vapour increases virulence and inflammatory potential of respiratory pathogens [J]. Respir Res, 2019, 20(1): 267.
- [50] Kim HJ, Choi MG, Park MK, et al. Predictive and prognostic biomarkers of respiratory diseases due to particulate matter exposure [J]. J Cancer Prev, 2017, 22(1): 6–15.
- [51] Dianat M, Radan M, Badavi M, et al. Crocin attenuates cigarette smoke-induced lung injury and cardiac dysfunction by anti-oxidative effects: the role of Nrf2 antioxidant system in preventing oxidative stress [J]. Respir Res, 2018, 19(1): 58.
- [52] Li R, Zhou R, Zhang J. Function of PM_{2.5} in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 7506–7514.
- [53] Chenouard V, Remy S, Tesson L, et al. Advances in genome editing and application to the generation of genetically modified rat models [J]. Front Genet, 2021, 12: 615491.
- [54] Meek S, Mashimo T, Burdon T. From engineering to editing the rat genome [J]. Mamm Genome, 2017, 28(7/8): 302–314.
- [55] Robichaud A, Fereydoonad L, Collins SL, et al. Airway compliance measurements in mouse models of respiratory diseases [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2021, 321(1): L204–L212.
- [56] Raghavan D, Varkey A, Bartter T. Chronic obstructive pulmonary disease; the impact of gender [J]. Curr Opin Pulm Med, 2017, 23(2): 117–123.
- [57] Zhang H, Dong L, Kang YK, et al. Epidemiology of chronic airway disease: results from a cross-sectional survey in Beijing, China [J]. J Thorac Dis, 2018, 10(11): 6168–6175.

- [58] Han MK, Postma D, Mannino DM, et al. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(12): 1179-1184.
- [59] Lavolette L, Lacasse Y, Doucet M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in women [J]. Can Respir J, 2007, 14(2): 93-98.
- [60] Yang WK, Kim SH, Jung IC, et al. Effects of *Scutellaria baicalensis* extract on cigarette smoke-induced airway inflammation in a murine model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Med Food, 2019, 22(1): 87-96.
- [61] 彭红星, 杨荣时, 曾玉兰. 吸烟诱导的慢性支气管炎大鼠模型巨噬细胞炎症蛋白-2 及髓过氧化物酶研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(12): 10-12.
- [62] 李庆云, 黄绍光, 吴华成, 等. 烟雾致大鼠慢性支气管炎系列模型的建立及病理变化半定量评价 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2002, 1(3): 163-166, 1003.
- [63] 王永杰, 魏丹丹, 王慧娟, 等. 参苓白术散对肺脾气虚反复呼吸道感染模型大鼠免疫功能的影响 [J]. 中医药信息, 2020, 37(5): 33-37.
- [64] 曹利华, 赵院院, 苗晋鑫, 等. 基于 TGF- β 信号通路探讨鲜芦根抗慢性支气管炎气道炎症作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5887-5894.
- [65] 江宇航, 梅晓峰, 贾利丹, 等. 香烟烟雾诱导慢性阻塞性肺疾病模型小鼠气道上皮屏障损伤的机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1297-1303.
- [66] Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, et al. Link between antibiotic persistence and antibiotic resistance in bacterial pathogens [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 900848.
- [67] Luo YL, Zhang CC, Li PB, et al. Naringin attenuates enhanced cough, airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a Guinea pig model of chronic bronchitis induced by cigarette smoke [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13(3): 301-307.
- [68] Tian Y, Li J, Li Y, et al. Effects of Bufeiyishen granules combined with acupoint sticking therapy on pulmonary surfactant proteins in chronic obstructive pulmonary disease rats [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016: 8786235.
- [69] 尚立群, 张永庆, 杨淑梅, 等. 安石榴苷对慢性支气管炎大鼠抗氧化能力的影响 [J]. 四川中医, 2017, 35(5): 73-76.
- [70] 律广富, 朴永革, 黄晓巍, 等. 人参蜜百部醇提物对烟熏法诱导慢性支气管炎模型大鼠的作用研究 [J]. 人参研究, 2020, 32(6): 2-5.
- [71] Ng DS, Liao W, Tan WS, et al. Anti-malarial drug artesunate protects against cigarette smoke-induced lung injury in mice [J]. Phytomedicine, 2014, 21(12): 1638-1644.
- [72] Guan SP, Tee W, Ng DS, et al. Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity [J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(7): 1707-1718.
- [73] 罗明, 阳仁达, 谭静, 等. 隔药饼灸对慢性支气管炎模型大鼠外周血中 T 细胞亚群的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(1): 37-40.
- [74] 苗玉芳, 张蓝熙, 金凡力, 等. 补肺益肾组分方联合针刺对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺小血管的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2021, 41(8): 973-980.
- [75] Mejza F, Gnatiuc L, Buist AS, et al. Prevalence and burden of chronic bronchitis symptoms: results from the BOLD study [J]. Eur Respir J, 2017, 50(5): 1700621.

[收稿日期]2022-11-10