

☆ XXXX ☆

基于整合应激反应探讨电针对COPD大鼠细胞凋亡和炎症反应的影响

黄柳杨^{1,2}, 段乐乐³, 陈丽^{1,2,4}, 薛廷政¹, 杨姝瑞^{1,4}, 何千里¹, 杨文卓¹, 陆大敏¹,
梁凤霞^{1,2,4}, 刘会同³

(¹湖北中医药大学针灸骨伤学院/针灸治未病湖北省协同创新中心, 武汉 430061; ²湖北时珍实验室, 武汉 430060; ³通山县中医医院, 湖北咸宁 437600; ⁴湖北中医药大学附属医院针灸科, 武汉 430060)

【摘要】 目的:观察电针对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠的影响,并探讨其潜在作用机制。方法:将30只SD大鼠随机分为空白组、模型组和电针组,每组各10只。采用气道滴注脂多糖(LPS)联合烟熏方法建立COPD模型。造模成功后,电针组取双侧“肺俞”“足三里”进行电针治疗(疏密波,4 Hz/20 Hz,1~3mA),每日1次,20 min/次,连续2周。比较各组大鼠干预前后一般情况;干预后,采用HE染色观察肺组织病理学变化,ELISA法检测血清白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量,TUNEL染色检测肺组织凋亡情况并计算凋亡指数,Western blot和qPCR法分别检测肺组织中蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)、真核起始因子2 α (eIF2 α)、激活转录因子4(ATF4)、C/EBP同源蛋白(CHOP)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、细胞凋亡调节因子(Bax)蛋白及mRNA表达。结果:治疗后,与空白组比较,模型组大鼠一般情况较差;肺组织病理损伤明显;血清IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量及肺组织细胞凋亡指数升高($P<0.01$),血清IL-10含量降低($P<0.01$);肺组织PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Bax蛋白和mRNA表达升高($P<0.01$, $P<0.05$),Bcl-2蛋白和mRNA表达降低($P<0.01$)。与模型组比较,电针组大鼠一般情况较好;肺组织病理损伤减轻;血清IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量及肺组织细胞凋亡指数降低($P<0.05$, $P<0.01$),血清IL-10含量升高($P<0.01$);肺组织PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Bax蛋白和mRNA表达降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白和mRNA表达升高($P<0.05$)。结论:电针能改善COPD大鼠肺损伤,其机制可能与抑制PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP级联介导的整合应激反应(ISR)通路激活,进而减轻细胞凋亡及炎症反应相关。**【关键词】** 电针;慢性阻塞性肺疾病;整合应激反应;细胞凋亡;炎症反应;蛋白激酶R样内质网激酶/真核起始因子2 α /激活转录因子4/C/EBP同源蛋白级联

The effects of electroacupuncture on apoptosis and inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease based on integrated stress responses

Huang Liu-yang^{1,2}, Duan Le-le³, Chen Li^{1,2,4}, Xue Ting-zheng¹, Yang Shu-rui^{1,4}, He Qian-li¹, Yang Wen-zhuo¹, Lu Da-min¹, Liang Feng-xia^{1,2,4}, Liu Hui-tong³ (¹College of Acupuncture and Orthopedics, Hubei University of Chinese Medicine/Hubei Provincial Collaborative Innovation Center of Preventive Treatment by Acupuncture and Moxibustion, Wuhan 430061, China; ²Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430060; ³Tongshan County Traditional Chinese Medicine Hospital, Xianning 437600, Hubei Province; ⁴Acupuncture and Moxibustion Department, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430060)

【ABSTRACT】 Objective To observe the effects of electroacupuncture on rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), so as to explore its potential mechanisms. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into a control group, a model group, and an electroacupuncture group, with 10 rats in each group. A COPD model was

【DOI】10.13702/j.1000-0607.20251087

引用格式:黄柳杨,段乐乐,陈丽,等.基于整合应激反应探讨电针对COPD大鼠细胞凋亡和炎症反应的影响[J].针刺研究,XXXX,XX(X):1-10.

项目来源:湖北省教育厅科学研究计划青年人才项目(No.Q20242014)

通信作者:梁凤霞,E-mail:fxliang5@hotmail.com;刘会同,E-mail:1796674120@qq.com

established by combining lipopolysaccharide instillation with smoke exposure. Following successful modeling, the electroacupuncture group received bilateral electroacupuncture at the “Feishu” (BL23) and “Zusanli” (ST36) points (dense-disperse wave, 4 Hz/20 Hz, 1—3 mA), once daily, 20 min/session, for 2 consecutive weeks. General conditions of rats in each group were compared before and after intervention. Post-intervention, histopathological changes in lung tissue were observed via HE staining. Serum levels of interleukin (IL)-6, IL-10, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and IL-1 β were measured by ELISA. TUNEL staining was used to detect apoptosis in lung tissue, and the apoptosis index was calculated. The protein and mRNA expressions of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK), eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP homologous protein (CHOP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) in lung tissue were detected by Western blot and qPCR respectively. **Results** Compared with the control group, rats in the model group exhibited poorer general condition after intervention, with significant pathological damage in lung tissue; serum IL-6, TNF- α and IL-1 β levels and the apoptosis index in lung tissue were significantly increased ($P<0.01$), and serum IL-10 level was decreased ($P<0.01$). The protein and mRNA expressions of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP and Bax in lung tissue were increased ($P<0.01$, $P<0.05$), while Bcl-2 protein and mRNA expression was decreased ($P<0.01$). Compared with the model group, rats in the electroacupuncture group showed improved general condition and reduced pathological damage in lung tissue; serum IL-6, TNF- α and IL-1 β levels and apoptosis index were decreased ($P<0.01$, $P<0.05$), and serum IL-10 level was increased ($P<0.01$). The protein and mRNA expressions of PERK, eIF2 α , ATF4, CHOP and Bax in lung tissue were decreased ($P<0.05$), and Bcl-2 protein and mRNA expression was increased ($P<0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture ameliorates lung injury in COPD rats, potentially by inhibiting the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP cascade of the integrated stress response pathway, thereby reducing apoptosis and inflammation.

【KEYWORDS】 Electroacupuncture; Chronic obstructive pulmonary disease; Integrated stress response; Apoptosis; Inflammation; PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP cascade

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以气道、肺实质和肺血管损伤和重塑为特征的异质性呼吸系统疾病,这些肺损伤引起进行性气流受限,导致呼吸困难加重、残疾和过早死亡^[1]。COPD作为一项重大的全球健康负担,其患病率仍不断上升,特别是在人口老龄化严重、吸烟率高和空气污染严重的地区,给社会护理和卫生保健系统带来了沉重的经济负担^[2]。药物治疗虽然能在一定程度上改善COPD患者症状,但仍存在包括消化性溃疡、免疫力低下、多种感染、骨质疏松等不良反应,且复发率高、难以治愈等问题也是COPD治疗中的重要挑战^[3]。因此,亟待寻找一种安全有效的治疗方法。

针灸治疗COPD历史悠久且疗效肯定,2021年全球COPD疾病倡议中首次提出将针刺用于COPD临床治疗^[4]。国内外研究已经证实,针刺可通过抑制炎症因子释放、抑制气道上皮细胞黏液高分泌、调控神经免疫通路等多个环节改善COPD,减缓组织结构破坏^[5-6]。前期研究也显示电针能降低COPD患者血清炎症因子水平,改善患者肺功能、运动功能及呼吸困难症状^[7],提示针灸对炎症反应的调控可能是其改善COPD的重要途径,但其深入机制仍有待进一步研究。最新研究结果显示,整合应激反应(ISR)通过调控肺损伤和炎症反应,发

挥维持肺组织细胞稳态的重要作用^[8]。研究表明,持续存在的内质网应激相关蛋白激酶RNA样内质网激酶(PERK)/真核起始因子2 α (eIF2 α)/激活转录因子4(ATF4)/C/EBP同源蛋白(CHOP)通路在多种炎症疾病中起着驱动炎症反应和细胞死亡的关键作用^[9],且内质网应激是COPD发病和进展的关键环节^[10]。基于此,本实验拟观察电针“肺俞”“足三里”对COPD模型大鼠肺组织病理形态、炎症因子水平、肺组织细胞凋亡及ISR重要通路PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP相关因子基因和蛋白表达的影响,探讨电针干预COPD的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级8周龄的SD雄性大鼠30只,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(豫)2020-0005。体质量200~220 g。动物饲养温度20~24℃,湿度40%~60%,实验期间每日维持12 h光照,昼夜循环。适应性喂养1周后,运用随机数字表法选取10只大鼠作为空白组,剩余20只作为造模组,20只造模组大鼠造模后随机分为模型组和电针组,每组10只。本研究经湖北省疾病预防控制中心实验动物管理与使用委员会批准,批准号:

安评中心动(福)第202420325号。实验动物的处置严格遵守2006年中华人民共和国科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂与仪器

Mayer苏木精染液(BT-P107)、伊红染液(BT-P109)、PBS缓冲液(BT-P304)、包埋石蜡(69019361)均购自武汉旗赛生物,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)试剂盒(E-EL-R2856)、白细胞介素(IL)-1 β (E-EL-R0012)、IL-10试剂盒(E-EL-R0016)、IL-6试剂盒(E-EL-R0015)均购自武汉伊莱瑞特,DAPI(C1002,上海碧云天),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体(26593-1-AP)、细胞凋亡调节因子(Bax)抗体(50599-2-Ig)、CHOP抗体(15204-1-AP)、PERK抗体(68482-1-Ig)均购自武汉三鹰,eIF2 α 抗体(AF6087,美国Affinity),ATF4抗体(Bs-1531R,北京博奥森),qPCR试剂盒(R223)、TUNEL试剂盒(A113-03)均购自南京诺唯赞,脂多糖(LPS,L2630,美国sigma)。

JT-12J组织脱水机、JB-L6组织包埋机、JK-6组织摊烤片机(武汉俊杰),RM 2016组织切片机、FLEXACAM C1显微镜(德国Leica),FlexStation 3多功能酶标仪(美国Molecular Devices),HI-16KR高速冷冻离心机、HI-16K高速离心机(湖南可成),Tissuelyser-24L组织研磨仪(上海净信),OYY-6C电泳仪、WD-9413B凝胶成像分析仪(北京六一),ViiA-7实时荧光定量PCR仪、proFlex PCR扩增仪(美国ABI),BX53荧光显微镜(日本奥林巴斯),HANS-100A电针仪(南京济生)。

1.3 造模方法

采用气道滴注LPS联合烟熏方法建立COPD模型^[11]。造模组大鼠分别于第1、14天固定时间经气道注射LPS(200 μ L, 1 mg·kg⁻¹), 完毕后将大鼠直立旋转10~20 s, 使LPS均匀分布于肺部。将大鼠于第2至13天、第15至30天在自制密闭箱中进行被动吸烟暴露(每天2次, 每次30 min, 间隔时间>4 h, 每次10支香烟)。整个模型制作周期30 d。模型评价: 造模结束后第2天, 从正常对照组及造模组各随机选取2只大鼠行肺功能检测; 当COPD大鼠第0.3秒用力呼气容积(FEV_{0.3})/用力肺活量(FVC)%<70%时, 判定COPD模型造模成功^[12]。

1.4 干预方法

模型评价结束后, 于每日固定时段进行干预。电针组大鼠选取双侧“足三里”和“肺俞”, 穴位定位参考《实验动物常用穴位名称与定位》第2部分: 大

鼠^[13]。将大鼠固定于大鼠固定器, 去除穴位周围毛发, 使用华佗牌0.30 mm×25 mm无菌针灸针, 常规消毒后将针直刺入“足三里”, 斜刺入“肺俞”(均为双侧)。选用HANS-100A电针仪(南京济生医疗科技有限公司), 连接电针仪, 电针波形、频率及强度分别为疏密波、4 Hz/20 Hz、1~3 mA, 以引起双下肢轻微颤动为宜, 针柄连接电针仪输出端, 置参考电极, 正负极端分别连接同侧“足三里”“肺俞”。每日一次, 20 min/次, 连续干预2周^[14]。空白组和模型组每天同一时间进行抓取和捆绑, 但不进行电针干预。

1.5 取材

干预结束后, 大鼠禁食禁水12 h后取材。腹腔注射0.3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)对大鼠进行麻醉后, 迅速打开腹腔, 从腹主动脉抽取动脉血3~5 mL, 4℃离心15 min后收集上清液, 置于-80℃冰箱备用, 用于ELISA检测。取完动脉血后, 打开胸腔, 整体切下肺, 速至冰上工作台。结扎右肺, 用5 mL的注射器经气管向左肺缓慢注射3 mL的PBS缓冲液并缓慢回抽灌洗液, 用4层无菌纱布过滤后注入离心管, 反复灌洗3次。把离心管中收集到的支气管肺泡灌洗液置于离心机中离心5 min(4℃), 离心后将上清液取出保存在EP管内, 进行标记编号后, 放置于-80℃冰箱保存, 用于ELISA检测。取完肺泡灌洗液后, 将右肺于结扎远端处剪断, 部分装入4%的多聚甲醛溶液中, 用于HE染色和TUNEL检测; 部分液氮速冻后, 移至-80℃冰箱保存, 用于Western blot和实时荧光定量PCR检测。

1.6 观察指标及检测方法

一般情况观察: 每天观察大鼠一般情况, 包括呼吸、饮食、毛发、活动及精神状态等情况。

HE染色观察大鼠肺组织病理变化: 将固定好的肺组织脱水处理后浸蜡、包埋制作蜡块, 并用切片机切成4 μ m厚的切片; 将切片置于60℃烤箱烤片3 h, 待切片紧密黏附后, 进行常规苏HE染色; 最后在光学显微镜下观察各组大鼠肺组织的病理改变。细胞核呈蓝色, 细胞质、肌纤维、胶原纤维和红细胞呈不同程度的红色。

ELISA法检测大鼠血清IL-6、IL-10、TNF- α 和IL-1 β 含量: 取冻存血清, 按照ELISA检测试剂盒说明书操作, 分别设定标准孔、空白孔和样本孔。标准孔加入100 μ L倍比稀释的标准品, 空白孔加入100 μ L标准品稀释液, 其余孔加入100 μ L待测样本。覆膜, 37℃孵育90 min。每孔加入生物素化抗

体工作液 100 μL , 覆膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。每孔加洗涤液 350 μL , 浸泡 1 min。重复此洗板步骤 3 次。每孔加 HRP 酶结合物工作液 100 μL , 覆膜, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min。每孔加终止液 50 μL , 终止反应。立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的吸光度值(OD 值), 根据标准曲线计算样本中相应指标的含量。

Western blot 法检测大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP 蛋白表达: 提取肺组织中总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 制备 5% 浓缩胶和 12% 分离胶, 进行电泳分离、转膜、封闭后, 用封闭液稀释相应的 β -actin(1:5 000)、Bcl-2(1:2 000)、PERK(1:5 000)、Bax(1:3 000)、eIF2 α (1:1 000)、ATF4(1:1 000)、CHOP(1:2 000) 一抗, 使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 充分洗膜 5 次, 5 min/次。二抗 1:1 000 (羊抗兔)、1:10 000 (羊抗小鼠) 稀释, 常温孵育 2 h, 放入显影液显影, 冲洗胶片。晾干并扫描胶片, 用 Image Pro Plus 软件分析条带灰度值, 以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

实时荧光定量 PCR 法检测大鼠肺组织 Bcl-2、Bax、PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP mRNA 表达: 取 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的肺组织 100 mg, 用 Trizol 法提取总 RNA, 根据 OD260/OD280 比值估测 RNA 质量, 比值在 1.8~2.0 之间则满足实验要求。将总 RNA 反转录成 cDNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火、延伸 60 s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$, 熔解曲线采集 15 s。以 β -actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

TUNEL 染色检测肺组织细胞凋亡情况: 将肺组织用石蜡固定, 切成 4 μm 厚的组织切片, 脱蜡至水, 按照 TUNEL 染色试剂盒说明书染色, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min 染核, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下观察采集图像, 蓝色为细胞核, 红色为凋亡细胞。计算凋亡指数, 凋亡指数(%) = 凋亡细胞数 \div 细胞核数 \times 100%。

1.7 统计学分析

结果使用 SPSS26.0、GraphPad Prism 9.5 进行统计分析和作图, 所有数据均使用平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较若符合正态分布且方差齐, 用单因素方差分析 (ANOVA) 检验进行统计分析, 若不符合正态分布或方差不齐时, 选用 Kruskal-Wallis 秩和检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
β -actin	上游 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	下游 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
Bcl-2	上游 GCCTTCTTTGAGTTTCGGTGG	221
	下游 CTGAGCAGCGTCTTCAGAGA	
Bax	上游 AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT	153
	下游 CCAGTTGAAGTTGCCGTCTG	
PERK	上游 CCAGAGAAGTGGAAGAGGA	188
	下游 CCCACTGAGAAAGACCGACT	
eIF2 α	上游 TGGATTTGGAAACCTTCGAG	242
	下游 AAGAAACCTGCCACAATTCCG	
ATF4	上游 GCCAAGCACTTCAAACCTCAT	141
	下游 CATTCTTCCAACATCCAATC	
CHOP	上游 CCCAGGAAACGAAGAGGAA	210
	下游 CGCACTGACCACTCTGTTTC	

注: Bcl-2 为 B 细胞淋巴瘤-2, Bax 为细胞凋亡调节因子, PERK 为蛋白激酶 R 样内质网激酶, eIF2 α 为真核起始因子 2 α , ATF4 为激活转录因子 4, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白。

义的标准。

2 结果

2.1 各组大鼠干预后一般情况比较

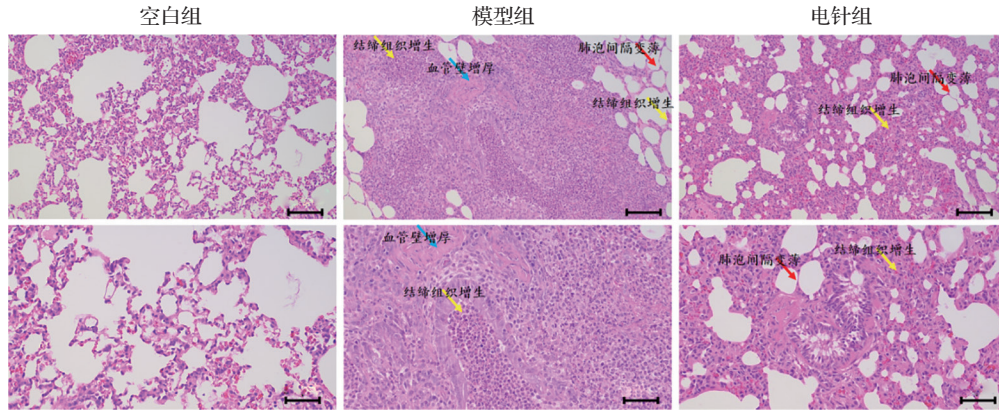
造模前, 各组大鼠精神状况良好, 毛发浓密有光泽, 反应灵敏, 饮食正常, 大便干湿适宜。造模后, 空白组精神状况良好, 体质量较造模前持续增加; 模型组大鼠出现精神萎靡、活动减少、反应迟钝、食欲减退、毛色枯黄无光泽、呼吸急促、口鼻分泌物增多、饮水饮食减少等症状。干预后, 空白组大鼠较前无明显变化; 与空白组相比, 模型组大鼠呼吸急促、反应迟钝、口鼻分泌物增多、饮水饮食减少等症状进一步加重; 与模型组相比, 电针组大鼠精神状态较好, 反应迟钝、气促、口鼻分泌物增多、体质量下降等症状有所减轻。

2.2 各组大鼠肺组织病理形态比较

空白组大鼠肺泡大小均一, 肺泡内无渗出液渗出, 气管上皮排列正常, 未见明显细胞碎片游离及炎性浸润; 模型组肺组织损伤严重, 病灶居多, 视野内可见实质区肺泡大量消失, 局部视野可见肺泡扩张肺间隔变薄(红色箭头), 气管上皮损伤且腔内见

大量炎性细胞浸润,累及周边,病灶内少量结缔组织增生(黄色箭头),血管管壁不均匀增厚(蓝色箭头),整体病变严重;电针组肺组织内出现较明显肺间隔增厚(黄色箭头),较多肺泡结构消失,气管上

皮轻微紊乱,局部视野肺泡间隔轻微变薄,肺泡体积扩充(红色箭头),整体病变优于模型组。见图1。



注:上排图标尺=100 μm,下排图标尺=50 μm。模型组红色箭头示肺间隔,黄色箭头示结缔组织,蓝色箭头示血管壁,电针组黄色箭头示肺间隔,红色箭头示肺泡。

图1 各组大鼠肺组织病理形态比较(HE染色)

Fig. 1 Comparison of pathological morphology of lung tissue of rats in the 3 groups (HE staining)

2.3 各组大鼠血清IL-6、IL-10、TNF-α和IL-1β含量比较

与空白组比较,模型组大鼠血清IL-6、TNF-α、IL-1β含量升高($P<0.01$),IL-10降低($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠血清IL-6、TNF-α、IL-1β含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),IL-10含量升高($P<0.01$)。见图2。

2.4 各组大鼠肺组织整合应激反应相关因子PERK、eIF2α、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达比较

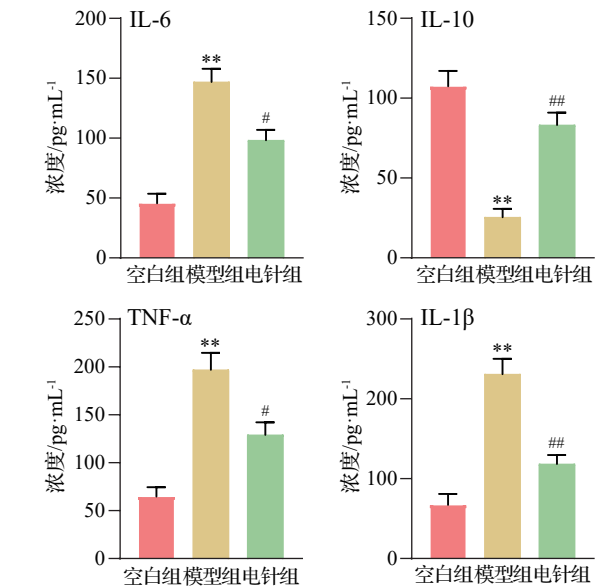
与空白组比较,模型组大鼠肺组织PERK、eIF2α、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达升高($P<0.01$, $P<0.05$);与模型组比较,电针组大鼠肺组织PERK、eIF2α、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达降低($P<0.05$)。见图3。

2.5 各组大鼠肺组织细胞凋亡因子Bcl-2、Bax蛋白和mRNA表达比较

与空白组比较,模型组大鼠肺组织Bcl-2蛋白和mRNA表达降低($P<0.01$),Bax蛋白和mRNA表达升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠肺组织Bcl-2蛋白和mRNA表达升高($P<0.05$),Bax蛋白和mRNA表达降低($P<0.05$)。见图4。

2.6 各组大鼠肺组织细胞凋亡情况比较

与空白组比较,模型组大鼠肺组织细胞凋亡指数升高($P<0.01$);与模型组比较,电针组大鼠肺组



注:IL-6为白细胞介素-6,IL-10为白细胞介素-10,TNF-α为肿瘤坏死因子-α,IL-1β为白细胞介素-1β。与空白组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

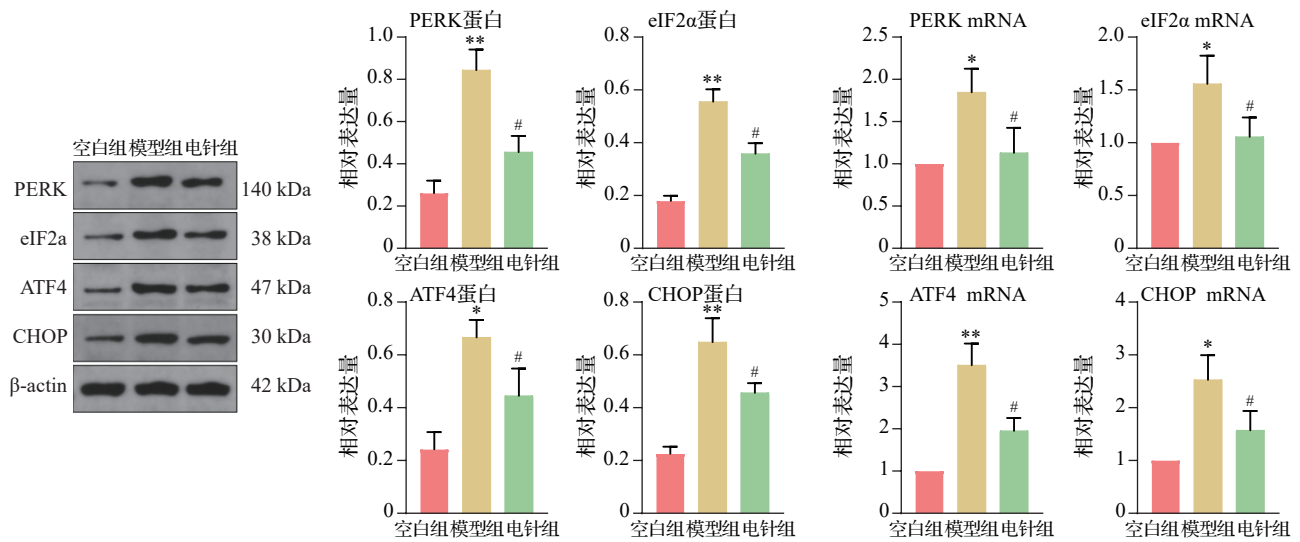
图2 各组大鼠血清IL-6、IL-10、TNF-α和IL-1β含量比较 ($\bar{x}\pm s$, 6只鼠/组)

Fig. 2 Comparison of serum IL-6, IL-10, TNF-α and IL-1β contents of rats in the 3 groups ($\bar{x}\pm s$, 6 rats/group)

织细胞凋亡指数降低($P<0.01$)。见图5。

3 讨论

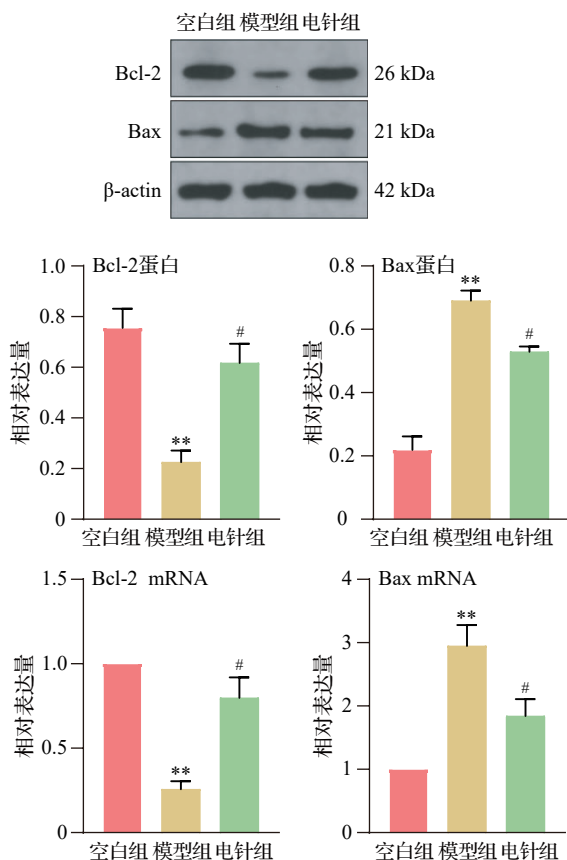
COPD主要由反复发作的咳嗽、哮喘、喘病等



注:PERK为蛋白激酶R样内质网激酶,eIF2α为真核起始因子2α,ATF4为激活转录因子4,CHOP为C/EBP同源蛋白。
与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠肺组织PERK、eIF2α、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 3 Comparison of PERK, eIF2α, ATF4 and CHOP proteins and mRNA expression levels of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)



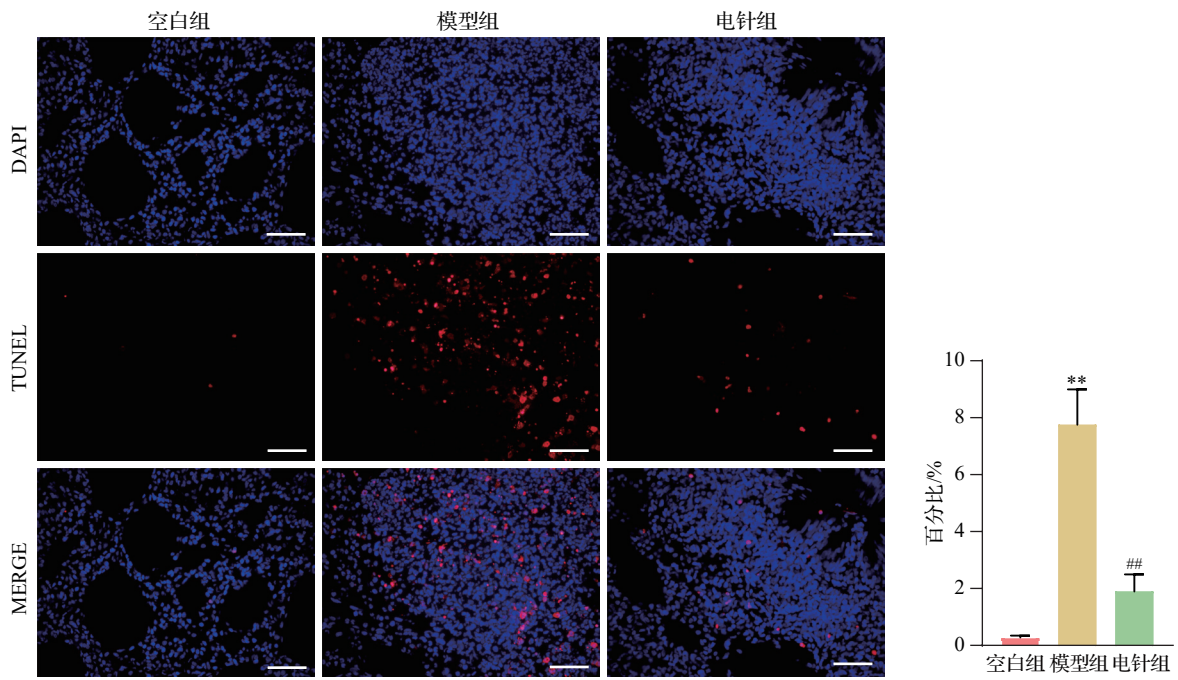
注:Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2,Bax为细胞凋亡调节因子。
与空白组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠肺组织Bcl-2、Bax蛋白和mRNA表达比较($\bar{x} \pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 4 Comparison of Bcl-2 and Bax proteins and mRNA expression levels of rats in the 3 groups ($\bar{x} \pm s$, 3 rats/group)

肺部疾病,导致肺气胀满,不能敛降造成。中医学认为该病与肺脾关系最为密切,肺虚及脾,脾虚累肺,相互影响,致使病情迁延,反复发作,治疗时应重视培土生金,不限于肺,不忘于脾,多方兼顾^[15]。肺俞是肺脏经气输注、转输之处,具有止咳平喘、补益肺气、调节肺脏经气等作用,是治疗肺部疾病的重要穴位。临床研究结果显示针刺肺俞可以缩短肺炎患者咳嗽时间,降低咳嗽症状评分、炎性反应指标水平和不良反应率^[16]。足三里为保健要穴,能燥化脾湿,生发胃气,可治虚劳诸证。研究结果显示,针刺“足三里”能缓解COPD大鼠炎性状态,改善其肺功能^[17]。脾五行属土,肺五行属金,土生金,足三里为胃的下合穴,刺激足三里能扶土培元,补益脾肺之气;肺俞为肺的背俞穴,与足三里合用更加体现了针灸多穴协同增效的特点。研究显示,疏密波、频率4 Hz/20 Hz、电流1~3 mA电针双侧“肺俞”“足三里”(每次20 min,每天1次,连续14 d)能显著改善COPD大鼠肺功能和组织损伤^[14]。故本研究选用相同刺激方式,以探讨电针治疗COPD的作用机制。

COPD的核心病理特征是持续的肺部炎症反应和结构破坏,包括气道重塑、肺泡壁破坏、肺弹性回缩力减弱等,是导致气流受限和呼吸功能障碍的直接原因^[18]。长期吸烟、空气污染、感染等因素会引发肺部炎症反应,释放蛋白酶和氧化应激物质,破坏肺组织,逐渐发展为COPD,而COPD患者由于



注:标尺=50 μm。蓝色为DAPI染色的细胞核,红色为TUNEL染色阳性凋亡细胞。与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

图5 各组大鼠肺组织细胞凋亡比较(TUNEL染色, $\bar{x}\pm s$, 3只鼠/组)

Fig. 5 Comparison of apoptosis in lung tissue of rats in the 3 groups (TUNEL staining, $\bar{x}\pm s$, 3 rats/group)

气道阻塞和肺功能下降,容易反复发生呼吸道感染,进一步加重肺组织损伤,形成恶性循环^[19]。基于肺组织损伤及炎性反应是COPD重要的病理特点及广泛认可的病因,本研究主要探讨电针如何改善COPD大鼠肺组织损伤及炎性反应,以期为临床针灸治疗COPD提供实验依据。COPD慢性气道炎性反应表现为炎性介质和促炎细胞因子过度释放,并从肺部扩散至血液,引发全身性炎性反应,而过度的细胞凋亡会破坏上皮屏障,使病毒和细菌得以侵入肺组织。香烟烟雾能诱导细胞凋亡和炎性反应^[20]。COPD中免疫反应失调,可引起多种免疫细胞(如中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞和嗜酸性粒细胞)被激活^[21],这些细胞分泌大量的炎性介质和细胞因子将更多的免疫细胞招募到肺部,从而持续炎性反应过程,并导致气道重塑和肺组织破坏^[22]。Bcl-2作为一种被广泛认可的抗凋亡调节因子,能够维持线粒体膜稳定。香烟烟雾暴露后抗凋亡因子Bcl-2表达水平降低,促凋亡因子Bax表达水平升高^[23]。有研究结果显示,COPD患者体内Bcl-2表达水平显著低于健康对照者,且抗氧化治疗能降低吸烟模型中的活性氧水平,改善肺细胞凋亡及升高Bcl-2蛋白表达水平^[24]。本研究结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清中促炎因子IL-6、TNF-α和

IL-1β升高,抗炎因子IL-10降低,肺组织中促凋亡因子Bax蛋白和mRNA升高,抗凋亡因子Bcl-2蛋白和mRNA降低,肺组织损伤严重且细胞凋亡指数升高,提示炎性反应与肺组织损伤是COPD的重要病理特征;与模型组相比,电针组大鼠血清中促炎因子IL-6、TNF-α和IL-1β降低,抗炎因子IL-10升高,肺组织中促凋亡因子Bax蛋白和mRNA降低,抗凋亡因子Bcl-2蛋白和mRNA升高,肺组织损伤较轻且细胞凋亡指数降低,提示电针可能通过改善COPD大鼠肺部炎性反应及细胞凋亡水平改善肺组织损伤。

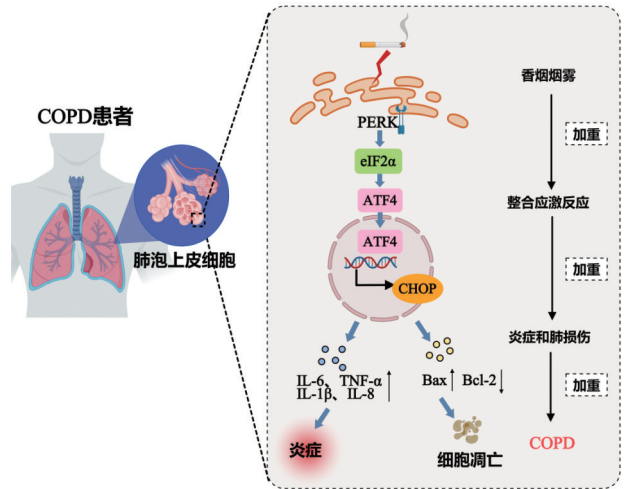
ISR是维持真核细胞稳态的高度保守的信号通路,包括一般性控制阻遏蛋白激酶2、双链RNA依赖蛋白激酶、PERK和血红素调节抑制蛋白激酶的4种激酶可磷酸化eIF2α,抑制全局蛋白合成,启动特异性基因编码ATF4翻译,调控氨基酸代谢、抗氧化反应、凋亡或自噬^[25]。已证实ISR在包括认知障碍、神经退行性疾病、肿瘤和糖尿病等疾病的发展中扮演着重要角色^[26]。香烟暴露(CSE)及其引发的氧化应激是COPD的核心发病机制之一,氧化应激往往能引发内质网应激,二者相互影响,共同推动COPD的病理进程^[10]。CSE所致的氧化应激通过抑制内质网相关降解途径中蛋白酶的活性,促

进蛋白质的合成与转移,并抑制其自噬,诱导蛋白质的错误折叠和聚集,且该病理过程与eIF2 α 磷酸化水平变化密切相关,是COPD肺气肿发展的关键机制之一^[27-29],且持续的未折叠蛋白反应(UPR)激活会导致细胞死亡和炎症反应发生^[30-31]。CHOP是内质网应激过程中引发细胞凋亡的关键下游效应分子^[32],同时,PERK作为内质网膜上引起UPR的主要跨膜感受器之一,也被认为是调控CHOP依赖性凋亡通路的主要上游因子。已知持续存在的内质网应激相关PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP通路在多种炎症性疾病中起着驱动炎症反应和细胞死亡的关键作用^[9]。基于以上,我们推测PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP级联介导的ISR通路中内质网应激通路激活,引起的细胞凋亡和炎症反应可能是导致COPD发生发展的重要原因(见图6)。

近期的研究结果显示,COPD小鼠肺组织中CHOP含量升高,提示了内质网应激介导的细胞凋亡可能在COPD发病机制中起重要作用^[33]。与未暴露于香烟烟雾的小鼠相比,暴露于香烟烟雾的小鼠肺裂解物中磷酸化的eIF2 α 表达增加了4倍^[34],PERK和eIF2 α 表达水平升高,加剧了香烟诱导的急性肺损伤模型的炎症反应和细胞凋亡^[35]。基于支气管道上皮细胞的基因表达谱研究也表明,在患有和不患有COPD的吸烟者中,ATF4基因表达增加是导致COPD相关病理改变的重要因素^[36]。研究也证实,ISR在维持肺上皮细胞发育和稳态中至关重要,肺上皮细胞线粒体功能障碍会激活ISR,导致ISR的靶基因ATF4表达增加及肺泡结构的组织学异常,且小分子ISR抑制剂给药逆转了肺泡结构的组织学异常^[8]。与这些结果一致,本研究显示,与空白组比较,模型组大鼠肺组织中ISR相关因子PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达升高,提示ISR参与了COPD的发病过程;与模型组比较,电针组大鼠肺组织中ISR相关因子PERK、eIF2 α 、ATF4、CHOP蛋白和mRNA表达降低,提示电针可能通过抑制ISR中PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP通路减轻COPD肺细胞凋亡和炎症反应,发挥治疗作用。

综上,电针“肺俞”“足三里”可以改善COPD大鼠肺损伤,其疗效机制可能与抑制PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP级联介导的ISR通路激活,进而减轻肺组织细胞凋亡及炎症反应相关。本实验阐释了电针干预COPD的潜在机制,但是关于电针如何调节肺组织ISR仍有待进一步研究;同时本研究实验

结果分析时各组样本量较小,可能影响统计效力与结论外推,未来需扩大样本量以验证当前研究结果的稳健性。



注:COPD为慢性阻塞性肺疾病,PERK为蛋白激酶R样内质网激酶,eIF2 α 为真核起始因子2 α ,ATF4为激活转录因子4,CHOP为C/EBP同源蛋白,IL-6为白细胞介素-6,IL-10为白细胞介素-10,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-1 β 为白细胞介素-1 β ,Bax为细胞凋亡调节因子,Bcl-2为B细胞淋巴瘤-2。

图6 香烟烟雾引起整合应激反应机制图

Fig. 6 Schematic diagram of the integrated stress response mechanism induced by cigarette smoke

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突。作者梁凤霞为本刊编委,但未参与本文的审理。

参考文献

[1] Christenson S A, Smith B M, Bafadhel M, et al. Chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2022, 399 (10342): 2227-2242.

[2] Naghavi M, Ong K L, Aali A, et al. Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990 - 2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. Lancet, 2024, 403(10440): 2100-2132.

[3] Leitao Filho F S, Takiguchi H, Akata K, et al. Effects of inhaled corticosteroid/long-acting β 2-agonist combination on the airway microbiome of patients with chronic obstructive pulmonary disease: a randomized controlled clinical trial (DISARM) [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2021, 204 (10): 1143-1152.

[4] 李正欢, 张晓云, 陈杨, 等. 基于2021年GOLD《COPD诊断、治疗与预防全球策略》解析慢性阻塞性肺疾病稳定期非药物管理策略[J]. 中国全科医学, 2022, 25(2): 131-138.

Li Z H, Zhang X Y, Chen Y, et al. Analysis of non-pharmacological management strategies for stable chronic obstructive pulmonary disease based on 2021 GOLD's global

- strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease (in Chinese) [J]. Chinese General Practice, 2022, 25(2): 131-138.
- [5] Shi F Y, Cao J J, Zhou D, et al. Revealing the clinical effect and biological mechanism of acupuncture in COPD: a review [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 170: 115926.
- [6] Jiang L H, Li P J, Wang Y Q, et al. Anti-inflammatory effects of acupuncture in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Integr Med, 2023, 21(6): 518-527.
- [7] Xu G X, Luo Q, Sun M S, et al. Effectiveness and safety of acupuncture as an adjunctive therapy for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial [J]. BMC Complementary Med Ther, 2024, 24(1): 326.
- [8] Han S, Lee M, Shin Y, et al. Mitochondrial integrated stress response controls lung epithelial cell fate [J]. Nature, 2023, 620(7975): 890-897.
- [9] Shi M, Liu K, Li X, et al. Melatonin ameliorates PM_{2.5}-induced airway inflammation and apoptosis by PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP in chronic obstructive pulmonary disease mice [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2025, 499: 117314.
- [10] Ghemrawi R, Battaglia-Hsu S F, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders [J]. Cells, 2018, 7(6): 63.
- [11] Shi M Y, Xue Q, Xie J H, et al. Protective effect of Shenqi Wenfei Formula against lipopolysaccharide/cigarette smoke-induced COPD in Rat based on gut microbiota and network pharmacology analysis [J]. Front Microbiol, 2024, 15: 1441015.
- [12] 包贝贝, 张彭, 徐百川, 等. 基于中西医临床病证特点的慢性阻塞性肺疾病动物模型分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(18): 212-220.
- Bao B B, Zhang P, Xu B C, et al. Evaluation of animal models of chronic obstructive pulmonary disease based on clinical characteristics in traditional Chinese and western medicine (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2025, 31(18): 212-220.
- [13] 中国针灸学会. 实验动物常用穴位名称与定位 第2部分: 大鼠 [J]. 针刺研究, 2021, 46(4): 351-352.
- China Association of Acupuncture and Moxibustion. Nomenclature and location of commonly used acupoints in experimental animals. Part 2: rats (in Chinese) [J]. Acupuncture Research, 2021, 46(4): 351-352.
- [14] 陈道鸿, 陈颖, 齐文川, 等. 基于“肠-肺”轴理论探讨电针对COPD模型大鼠肠道菌群的影响 [J]. 中国针灸, 2025, 45(7): 967-981.
- Chen D H, Chen Y, Qi W C, et al. Effect of electroacupuncture on intestinal flora in COPD rats based on gut-lung axis theory (in Chinese) [J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion, 2025, 45(7): 967-981.
- [15] 陈文畅, 陈乙菲, 李凤森. 培土生金法治疗慢性阻塞性肺疾病的研究进展 [J]. 世界中医药, 2024, 19(1): 133-138.
- Chen W C, Chen Y F, Li F S. Research progress on treating chronic obstructive pulmonary disease with banking up earth (spleen) to generate metal (lung) (in Chinese) [J]. World Chinese Medicine, 2024, 19(1): 133-138.
- [16] Maekura T, Miki K, Miki M, et al. Clinical effects of acupuncture on the pathophysiological mechanism of chronic obstructive pulmonary disease during exercise [J]. Int J Chronic Obstr Pulm Dis, 2019, 14: 2787-2798.
- [17] 李玮, 刘自兵, 潘娅玲, 等. 电针对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能及TGF- β 、TNF- α 、IL-8的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 541-545.
- Li W, Liu Z B, Pan Y L, et al. Effect of electroacupuncture on lung function and TGF- β , TNF- α , IL-8 in rats with chronic obstructive pulmonary disease (in Chinese) [J]. Journal of Hunan University of Chinese Medicine, 2021, 41(4): 541-545.
- [18] Eapen M S, Sohal S S. Update on the pathogenesis of COPD [J]. N Engl J Med, 2019, 381(25): 2483-2484.
- [19] Xu J, Zeng Q Y, Li S Q, et al. Inflammation mechanism and research progress of COPD [J]. Front Immunol, 2024, 15: 1404615.
- [20] Agustí A, Celli B R, Criner G J, et al. Global initiative for chronic obstructive lung disease 2023 report: gold executive summary [J]. Arch De Bronconeumología, 2023, 59(4): 232-248.
- [21] Rabe K F, Rennard S, Martinez F J, et al. Targeting type 2 inflammation and epithelial alarmins in chronic obstructive pulmonary disease: a biologics outlook [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2023, 208(4): 395-405.
- [22] Wu H X, Yang S F, Wu X J, et al. Interleukin-33/ST2 signaling promotes production of interleukin-6 and interleukin-8 in systemic inflammation in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450(1): 110-116.
- [23] Chen J M, Cheng Y F, Cui H J, et al. N-acetyl-L-cysteine protects rat lungs and RLE-6TN cells from cigarette smoke-induced oxidative stress [J]. Mol Med Rep, 2025, 31(4): 1-10.
- [24] Zeng H H, Li T, He X, et al. Oxidative stress mediates the apoptosis and epigenetic modification of the Bcl-2 promoter via DNMT1 in a cigarette smoke-induced emphysema model [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 229.
- [25] Lu H J, Koju N, Sheng R. Mammalian integrated stress responses in stressed organelles and their functions [J]. Acta Pharmacol Sin, 2024, 45(6): 1095-1114.
- [26] Costa-Mattioli M, Walter P. The integrated stress response: From mechanism to disease [J]. Science, 2020, 368(6489): eaat5314.
- [27] Min T, Bodas M, Mazur S, et al. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema [J]. J Mol Med, 2011, 89(6): 577-593.
- [28] Tran I, Ji C, Ni I, et al. Role of cigarette smoke - induced aggresome formation in chronic obstructive pulmonary disease - emphysema pathogenesis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2015, 53(2): 159-173.

- [29] Somborac-Bacura A, van der Toorn M, Franciosi L, et al. Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress response and proteasomal dysfunction in human alveolar epithelial cells[J]. *Exp Physiol*, 2013, 98(1): 316-325.
- [30] Ajoolabady A, Lebeaupin C, Wu N N, et al. ER stress and inflammation crosstalk in obesity[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(1): 5-30.
- [31] Zhang J, Guo J F, Yang N N, et al. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(12): 1051.
- [32] Kopp M C, Larburu N, Durairaj V, et al. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(11): 1053-1062.
- [33] Tang F, Ling C H. Curcumin ameliorates chronic obstructive pulmonary disease by modulating autophagy and endoplasmic reticulum stress through regulation of SIRT1 in a rat model [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(10): 4764-4774.
- [34] Kenche H, Baty C J, Vedagiri K, et al. Cigarette smoking affects oxidative protein folding in endoplasmic reticulum by modifying protein disulfide isomerase[J]. *FASEB J*, 2013, 27(3): 965-977.
- [35] Feng H S, Li M L, Altawil A, et al. Cigarette smoke extracts induce apoptosis in Raw264.7 cells *via* endoplasmic reticulum stress and the intracellular Ca^{2+} /P38/STAT1 pathway[J]. *Toxicol Vitro*, 2021, 77: 105249.
- [36] Garcia-Ryde M, van der Burg N M D, Berlin F, et al. Expression of stress-induced genes in bronchoalveolar lavage cells and lung fibroblasts from healthy and COPD subjects[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6600.

收稿日期:2025-10-11 修回日期:2025-12-31