

本文引用格式:叶和江,王巧云,田学敏,等.有氧运动改善慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能的机制分析[J].安徽医学,2023,44(10):1168-1172.DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.005

· 基础医学 ·

有氧运动改善慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能的机制分析

叶和江 王巧云 田学敏 王保健

[摘要] **目的** 探讨有氧运动通过影响肺部炎症调控慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠肺功能的机制。**方法** 建立COPD大鼠模型并分为对照组和运动组。运动组进行9周跑台运动;对照组不干预。检测两组大鼠第1秒用力呼气量(FEV1)、用力呼气量(FVC)、最大呼气中段流速(MMEF)、呼气峰流速(PEF)。处死大鼠进行HE染色,采用Western blot法检测肺组织的趋化素(CHEM)、趋化因子受体-1(CMKLR1)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子(TNF)- α 蛋白表达水平。**结果** 运动组大鼠MMEF、PEF高于对照组($P<0.05$);两组大鼠FEV1、FVC水平接近($P>0.05$)。运动组大鼠肺组织CHEM、IL-1 β 、IL-8蛋白表达高于对照组,CMKLR1低于对照组($P<0.05$);两组肺组织IL-6、TNF- α 蛋白表达接近($P>0.05$)。**结论** 有氧运动可改善COPD大鼠肺功能及肺组织病理损害,且这一作用与有氧运动对炎症的抑制作用有关。

[关键词] 有氧运动;慢性阻塞性肺疾病;肺功能;炎症反应;信号通路

doi:10.3969/j.issn.1000-0399.2023.10.005

Mechanism analysis of aerobic exercise improving pulmonary function in rats with chronic obstructive pulmonary disease

YE Hejiang, WANG Qiaoyun, TIAN Xuemin, WANG Baojian

Department of Respiratory Medicine, 988 Hospital, Joint Logistic Support Force, Chinese People's Liberation Army, Zhengzhou 450007, China

Funding project: Medical Science and Technology Research Project of Henan Province (No.LHGJ20190867)

Corresponding author: WANG Baojian, Wangbj988@163.com

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of aerobic exercise regulating lung function in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats through its effect on pulmonary inflammation. **Methods** The COPD rat model was established and divided into control group and exercise group. The exercise group ran the table for nine weeks. The control group received no intervention. Forced expiratory volume in one second(FEV1), forced expiratory volume (FVC), maximum mid-expiratory flow rate (MMEF) and peak expiratory flow rate (PEF) of the two groups were detected. The rats were sacrificed for HE staining, and the expression levels of chemokine (CHEM), chemokine receptor-1 (CMKLR1), interleukin (IL) -1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF) - α in lung tissues were detected by Western blot. **Results** The MMEF and PEF in the exercise group were higher than those in the control group ($P<0.05$). The levels of FEV1 and FVC in the two groups were close ($P>0.05$). The expression of CHEM, IL-1 β and IL-8 protein in lung tissue of the exercise group was higher than that of the control group, and CMKLR1 was lower than that of the control group ($P<0.05$). The expressions of IL-6 and TNF- α in lung tissue were similar between the two groups ($P>0.05$). **Conclusion** The aerobic exercise can improve lung function and pathological damage of lung tissue in COPD rats, and this effect is related to the inhibitory effect of aerobic exercise on inflammation.

[Key words] Aerobic exercise; Chronic obstructive pulmonary disease; Lung function; Inflammatory response; Signaling pathway

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)为常见呼吸系统疾病,目前40岁以上人群的COPD患病率已达15%左右^[1]。气道炎症反应是COPD发生、发展的重要机制,可引发炎症性损害并伴随免疫系统的激活^[2]。研究发现,有氧运动可抑制烟雾暴露小鼠肺组织的炎症因子表达,抑制气道上皮增

生,但运动改善COPD慢性炎症的具体机制仍不明确^[3-4]。趋化素(chemerin, CHEM)/趋化因子受体-1(CMKLR1)与COPD有密切关联,通过募集气道内白细胞而发挥促炎作用,与COPD预后密切相关^[5]。运动被认为可促进肺功能的改善^[6],且推测运动对COPD肺功能的影响可能与CHEM/CMKLR1有关。本研究以斯泼

基金项目:河南省医学科技攻关项目(编号:LHGJ20190867)

作者单位:450007 河南郑州 中国人民解放军联勤保障部队第九八八医院呼吸内科

通信作者:王保健, Wangbj988@163.com

累格·多雷(Sprague Dawley, SD)大鼠进行研究,探究有氧运动改善 COPD 肺功能的初步机制,旨在为临床 COPD 的运动疗法提供参考,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠(新疆医科大学动物实验中心),共 30 只,动物毛色光泽,无受损、断尾现象,食水摄入正常,自由饮水和进食。

1.1.2 实验仪器 自制静式被动吸烟箱(1 m×1 m×0.8 m);肺功能检测系统(BH-AX-MAPG,广州红象医疗科技有限公司);石蜡包埋机(HS-B7126-B,沈阳恒松科技有限公司)与切片机(RM2235,德国 Leica);光学显微镜(BX53F,日本 OLYMPUS);小型垂直电泳槽与小型 Trans-Blot 转印槽(美国伯乐公司);组织匀浆器(S-18KS,北京莱普特科学仪器有限公司);高速台式离心机(LC-LX-H165A,上海力辰仪器科技有限公司);电热恒温培养箱(GHP-9080,上海一恒科学仪器有限公司);全波长酶标仪(美国 Thermo scientific)。

1.1.3 实验试剂 二甲苯、无水乙醇、苏木素和伊红染色液(均为上海生工生物工程);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);中性树胶、RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、一抗及二抗稀释液、GAPDH/ β -actin 内参、HRP 标记二抗(均为北京深蓝云生物科技有限公司);CHEM、CMKLR1、CXCL8/IL-8、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 抗体(美国 abcam)。

1.2 实验方法

1.2.1 建立 COPD 大鼠模型 通过香烟暴露构建 COPD 模型:将 SD 大鼠置于被动吸烟箱,用抽吸电机对 20 只香烟(大前门牌)自动吸烟并将烟雾注入吸烟箱使大鼠被动吸烟,吸烟箱氧气浓度控制>18%,一氧化碳浓度保持在(345±35) ppm,烟熏刺激 16 周。模型判定:以大鼠肺组织 HE 染色呈 COPD 特征(炎症细胞浸润、气道狭窄及粘液增多)为 COPD 大鼠模型制备成功^[7]。

1.2.2 有氧运动 将 30 只 COPD 大鼠随机分为对照组和运动组,运动组予以跑台运动:采取中等强度的有氧运动(13.3 m/min),第 1 周进行适应性训练,每天 10 min,每周 3 d;第 2~9 周为正式训练,每天 40 min,3 天/周,共 9 周;对照组不干预。

1.2.3 动物取材 称量大鼠体重并记录结果。腹腔注射 10% 水合氯醛溶液,5 min 后检测肺功能。处死大鼠,取右肺组织,清洗后剪成 2 部分,分别用于苏木精-伊红染色和 Western-blot 检测。

1.2.4 肺功能检测 暴露大鼠颈部皮肤,消毒,于气

管软骨环下方剪一小口行气管插管,气管插管末端连接肺功能检测系统,操作电脑软件获取第 1 秒用力呼气量(forced expiratory volume in one second, FEV1)、用力呼气量(forced vital capacity, FVC)、最大呼气中段流速(maximal mid-expiratory flow, MMEF)、呼气峰流速(peak expiratory flow, PEF)等参数。

1.2.5 肺组织苏木精-伊红染色 ①石蜡包埋:用镊子固定组织,持手术刀垂直切断组织,后放入流水过夜。按 75%(45 min)、85%(45 min)、95%(10 min)、100%(5 min)酒精的顺序进行梯度脱水。依次加入无水乙醇+二甲苯(20 min)、二甲苯 I (10 min)、二甲苯 II (10 min)进行透明。浸蜡后于包埋器内注入高熔点石蜡,用镊子将组织移到包埋器内中间位置。待石蜡凝固后去除包埋器,置于 4℃下保存。②染色:切除边缘余蜡后切片,乙醇梯度脱水,苏木精染液染 4 min,流动水清洗;85% 酒精、95% 酒精脱水各 5 min,伊红染液中染色 5 min,最后乙醇梯度脱水后中性树胶封片。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白表达 ①制备组织蛋白上清液:剪碎组织,加入酶抑制剂三联装,按每 20 mg 组织加 100 μ L 裂解液的比例加入裂解液。离心机 12 000 r/min 离心 5 min 留取上清液。②上清液蛋白浓度:BCA 蛋白定量试剂盒制成工作液待用;稀释 BSA 标准品成 8 个浓度梯度。每管加上清液 100 μ L 后加 2 mL 工作液,孵育 0.5 h 后检测 562 nm 处光密度值。制作标准曲线,计算样品总蛋白浓度。③肺组织的各蛋白表达:灌胶、电泳后转印蛋白,BSA 中封闭 PVDF 膜 2 h,洗膜;加稀释的 CHEM、CMKLR1、白细胞介素 8(interleukin 8, IL-8)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 、IL-1 β 、白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和 GAPDH,孵育过夜。与 HRP 标记的二抗反应,孵育,显影、定影。

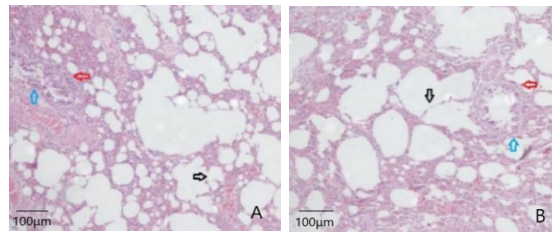
1.3 统计学方法 采用 GraphPad 8.0 进行统计,正态分布计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 苏木精-伊红染色结果 对照组的肺组织可见炎症细胞浸润,气道黏液增加,为慢性支气管炎特征;肺泡结构被破坏,间隔破裂融合为肺大疱,为肺气肿特征,见图 1(A)。运动组的肺组织可见支气管周围炎症浸润与黏液分泌、黏膜增生减少,管壁变薄,肺泡结构破坏减轻,见图 1(B)。

2.2 肺功能指标比较 运动组大鼠 MMEF、PEF 高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);两组 FEV1、FVC

差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。



注:A为对照组;B为运动组;红色箭头提示炎症细胞浸润;蓝色箭头提示气道黏液与管壁;黑色箭头提示肺泡结构。

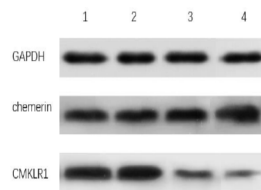
图1 大鼠肺组织苏木精—伊红染色($\times 200$)

表1 两组大鼠肺功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	FEV1(mL)	FVC(mL)	MMEF(mL/s)	PEF(mL/s)
对照组	15	18.67 $\pm$ 3.38	19.45 $\pm$ 3.28	139.32 $\pm$ 36.45	191.33 $\pm$ 39.86
运动组	15	20.14 $\pm$ 3.52	21.52 $\pm$ 3.96	180.32 $\pm$ 42.11	232.77 $\pm$ 49.55
<i>t</i> 值		1.729	1.559	2.851	2.524
<i>P</i> 值		0.095	0.130	0.008	0.018

注:FEV1为第1s用力呼气量;FVC为用力呼气量;MMEF为最大呼气中段流速;PEF为呼气峰流速。

2.3 大鼠肺组织 CHEM、CMKLR1 蛋白表达水平比较 运动组大鼠肺组织 CHEM 蛋白表达高于对照组, CMKLR1 表达低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2、表 2。



注:1、2为对照组,3、4为运动组。

图2 两组大鼠肺组织CHEM、CMKLR1的蛋白免疫印迹

表2 大鼠肺组织CHEM、CMKLR1蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

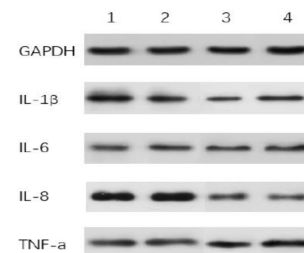
组别	例数	CHEM	CMKLR1
对照组	15	1.03 $\pm$ 0.25	1.19 $\pm$ 0.29
运动组	15	1.38 $\pm$ 0.31	0.37 $\pm$ 0.12
<i>t</i> 值		3.404	10.119
<i>P</i> 值		0.002	<0.001

注:CHEM为趋化素;CMKLR1为趋化因子受体-1。

2.4 大鼠肺组织炎症因子蛋白表达水平水平比较 运动组大鼠肺组织 IL-1 β 、IL-8 蛋白表达低于对照组 ($P<0.05$);运动组大鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 蛋白表达与对照组比差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3、表 3。

3 讨论

3.1 有氧运动对 COPD 大鼠肺组织炎症因子的影响 本研究结果显示,运动组大鼠肺组织 IL-1 β 、IL-8 蛋白



注:1、2为对照组,3、4为运动组。

图3 两组大鼠肺组织IL-8、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6的蛋白免疫印迹

表3 大鼠肺组织IL-8、TNF- α 、IL-1 β 及IL-6蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IL-8	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	15	1.24 $\pm$ 0.28	0.82 $\pm$ 0.20	1.13 $\pm$ 0.25	0.92 $\pm$ 0.25
运动组	15	0.69 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.18	0.53 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.28
<i>t</i> 值		6.804	0.576	7.686	0.413
<i>P</i> 值		<0.001	0.569	<0.001	0.683

注:IL-8为白细胞介素-8;TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ;IL-1 β 为白细胞介素-1 β ;IL-6为白细胞介素-6。

表达低于对照组($P<0.05$),提示有氧运动可抑制 COPD 大鼠肺组织的 IL-1 β 、IL-8 蛋白表达。香烟烟雾是有效的促炎剂,其中的有毒颗粒可穿过肺泡-毛细血管界面并进入全身血液循环,激活促炎细胞因子产生 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等炎症因子^[8-9]。COPD 涉及许多不同类型的炎性细胞,包括 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 等,肺组织 IL-1 β 、IL-8 等分泌的增加会释放更多的炎性介质,形成复杂网络作用,共同诱发并加重 COPD 慢性炎症^[10-11]。研究表明,C57BL/6J 小鼠香烟暴

露后进行耐力运动干预可降低血浆中炎症细胞因子,发挥明显抗炎作用^[12],与本研究结论一致。有氧运动可减轻由烟暴露引起的促炎反应和全身循环中细胞浸润^[13],提示有氧运动可减轻 COPD 小鼠的肺部炎症和重塑反应。分析原因,有氧运动可大幅提高气道气流,缓解细小支气管的浸润,促进气道舒张与阻力减小,提高肺组织弹性,缓解肺气肿与肺组织的炎性介质沉积,对肺组织的炎症反应发挥抑制作用,进而减少了肺组织 IL-1 β 、IL-8 分泌与表达^[14]。此外,有氧运动可减少机体循环中炎症细胞因子,减轻全身及局部炎症。

3.2 有氧运动对 COPD 大鼠肺功能的影响 本研究结果显示,运动组大鼠 MMEF、PEF 高于对照组 ($P < 0.05$),提示有氧运动可在一定程度上改善 COPD 大鼠肺功能。国外研究认为,运动疗法可作为 COPD 的非药物干预手段,通过抑制炎症反应来改善肺功能^[15],与本研究结论一致。分析原因,有氧运动可缓解胸膜与肺泡压力,减小呼吸道阻力,延缓支气管周纤维化及气道壁增厚,使肺功能得以改善^[16-17]。此外,有氧运动对肺组织炎症反应的抑制作用也是改善肺功能的途径之一,随着有氧运动对炎症的抑制,肺组织中炎性介质的沉积减少,气道壁增厚与管腔变窄也能得到改善,进而增强肺部呼吸功能。有氧运动还能减轻机体应激,缓解因应激引起的肺功能障碍^[18-19]。

3.3 有氧运动对 CHEM/CMKLR1 的调控作用 本研究结果显示,运动组大鼠肺组织中 CHEM 蛋白表达高于对照组,CMKLR1 表达低于对照组 ($P < 0.05$),提示有氧运动可促进大鼠肺组织 CHEM 蛋白表达并抑制 CMKLR1 表达。CHEM/CMKLR1 被认为是有氧运动调控炎症反应的通路之一,其中 CHEM 主要通过内吞噬作用减少中性粒细胞炎症并抑制炎性细胞因子释放,发挥抗炎作用;而其受体 CMKLR1 则可使树突细胞和巨噬细胞迁移,募集炎症因子、促进炎症发展,发挥促炎作用^[20-21]。因此 CHEM/CMKLR1 的平衡是调控炎症反应的关键,当 CHEM 表达上调而 CMKLR1 表达下调时,抗炎作用占主导;CHEM 表达下调而 CMKLR1 表达上调时,促炎作用占主导^[22-23]。有氧运动对 COPD 大鼠肺组织 CHEM 表达的促进作用及对 CMKLR1 表达的下调作用,考虑与有氧运动减少了气道 CHEM 蛋白消耗,从而减弱了 CMKLR1 趋化作用有关,在较大程度上避免了促炎细胞因子及炎性细胞在肺部大量积聚,是有氧运动调节 COPD 炎症反应的信号通路之一^[24-25]。

本研究不足之处:①CHEM/CMKLR1 通路只是有氧运动调控肺部炎症的其中一个信号通路,尚有其他涉及的信号通路及作用机制仍有待发现与探讨;②本

次仅初步确认了 CHEM/CMKLR1 参与有氧运动调控大鼠肺组织炎症反应的过程,但具体的调控过程仍有待在分子生物学水平上进行探讨;③有氧运动的类型较多,运动方式及运动时间、运动量对 COPD 的影响也有待进一步分析,从而为 COPD 患者的有氧运动辅助治疗方案提供参考。

综上所述,有氧运动可通过对 CHEM/CMKLR1 表达的影响抑制炎症反应,改善 COPD 大鼠的肺功能。

参考文献

- [1] 陈宇清,王铭杰,张海,等.稳定期慢性阻塞性肺疾病患者的气道阻力与运动相关呼吸困难肺功能参数的关系[J].国际呼吸杂志,2020,40(2):6-9.
- [2] 杨露露,曲木诗玮,司徒炫明,等.慢性阻塞性肺疾病稳定期患者六分钟步行试验诱导的运动性低氧的预测方法研究[J].中国全科医学,2022,25(2):5-9.
- [3] 陈玮,郝建,杨艳,等.有氧运动对慢性阻塞性肺疾病稳定期患者外周血调节性T细胞亚群与心肺运动功能的干预研究[J].中国康复医学杂志,2020,35(2):5-8.
- [4] 黄鑫,钱钧,陈法余,等.有氧运动对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者血清炎性因子及心肺运动功能的影响[J].中国全科医学,2021,24(28):6-9.
- [5] 杨凤娇,钱钧,唐肖雄,等.有氧训练对稳定期慢性阻塞性肺疾病患者外周血 IL-6、IL-10 及心肺运动功能的影响[J].中国康复,2019,34(8):3-7.
- [6] 唐诗帅,张伟兵,田晓彦,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织中 IGF-1、IGFBP3 表达及其与气道重塑的关系[J].山东医药,2019,59(5):4-8.
- [7] 刘东辉,张欣怡.负荷深呼吸训练联合有氧运动对老年烟民慢性阻塞性肺疾病患者肺功能康复的影响[J].中国老年学杂志,2020,40(1):4-6.
- [8] LANGER D, CIAVAGLIA C, FAISAL A, et al. Inspiratory muscle training reduces diaphragm activation and dyspnea during exercise in COPD[J]. J Appl Physiol (1985), 2018, 125(2):381-392.
- [9] 杨肇宇,李培君,李健,等.运动对慢性阻塞性肺疾病系统性炎症和骨骼肌功能障碍干预效果的系统综述[J].中国康复理论与实践,2021,27(12):7-10.
- [10] 张迪,夏艺,范丽,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立与评价[J].中国实验动物学报,2020,28(2):6-7.
- [11] JAMES B D, JONES A V, TRETHEWEY R E, et al. Obesity and metabolic syndrome in COPD: is exercise the answer?[J]. Chron Respir Dis, 2018, 15(2):173-181.
- [12] VINIOL C, VOGELMEIER C F. Exacerbations of COPD[J]. Eur Respir Rev, 2018, 27(147):170103-170105.
- [13] NEUNHAUSERER D, REICH B, MAYR B, et al. Impact of exercise training and supplemental oxygen on submaximal exercise performance in patients with COPD[J]. Scand J Med

- Sci Sports, 2021, 31(3):710-719.
- [14] MOHAMMED J, DEROM E, VAN OOSTERWIJCK J, et al. Evidence for aerobic exercise training on the autonomic function in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review[J]. Physiotherapy, 2018, 104(1): 36-45.
- [15] ADOLFO J R, DHEIN W, SBRUZZI G. Intensity of physical exercise and its effect on functional capacity in COPD: systematic review and meta-analysis[J]. J Bras Pneumol, 2019, 45(6):11-14.
- [16] MAYER A F, KARLOH M, DOS SANTOS K, et al. Effects of acute use of pursed-lips breathing during exercise in patients with COPD: a systematic review and meta-analysis[J]. Physiotherapy, 2018, 104(1):9-17.
- [17] O'DONNELL D E, MILNE K M, JAMES M D, et al. Dyspnea in COPD: new mechanistic insights and management implications[J]. Adv Ther, 2020, 37(1):41-60.
- [18] NOLAN C M, ROCHESTER C L. Exercise training modalities for people with chronic obstructive pulmonary disease[J]. COPD, 2019, 16(5-6):378-389.
- [19] REYCHLER G, BOUCARD E, PERAN L, et al. One minute sit-to-stand test is an alternative to 6MWT to measure functional exercise performance in COPD patients[J]. Clin Respir J, 2018, 12(3):1247-1256.
- [20] CRUZ J, BURTIN C. Eccentric exercise in COPD: take it or leave it?[J]. Chest, 2021, 159(2):467-468.
- [21] HANSEN H, BIELER T, BEYER N, et al. Supervised pulmonary tele-rehabilitation versus pulmonary rehabilitation in severe COPD: a randomised multicentre trial[J]. Thorax, 2020, 75(5):413-421.
- [22] ROCHA A, ARBEX F F, SPERANDIO P A, et al. Exercise intolerance in comorbid COPD and heart failure: the role of impaired aerobic function[J]. Eur Respir J, 2019, 53(4): 1802386.
- [23] PATEL S, MADDOCKS M, MAM W D. Exercise training in COPD: FITT for purpose?[J]. Chest, 2020, 158(1):9-10.
- [24] DE ROOS P, LUCAS C, STRIJBOOS J H, et al. Effectiveness of a combined exercise training and home-based walking programme on physical activity compared with standard medical care in moderate COPD: a randomised controlled trial[J]. Physiotherapy, 2018, 104(1):116-121.
- [25] SILVA C, GOMES NETO M, SAQUETTO M B, et al. Effects of upper limb resistance exercise on aerobic capacity, muscle strength, and quality of life in COPD patients: a randomized controlled trial[J]. Clin Rehabil, 2018, 32(12):1636-1644.

(2022-11-15收稿)

(本文编校:朱岚,张迪)