

芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠的保护作用[△]

张贺^{1*},葛平¹,王晓玉²,孟楣^{1,2#}(1.安徽中医药大学研究生院,合肥 230038;2.安徽中医药大学第一附属医院/国家中医药管理局中药制剂三级实验室,合肥 230031)

中图分类号 R285;R563 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)19-1741-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.19.04

摘要 目的:研究芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠的保护作用。方法:采用复合因素法复制大鼠COPD模型。90只SD大鼠随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、固本咳喘片(0.72 g/kg)组与芪白平肺高、中、低剂量(2.88、1.44、0.72 g/kg)组,复制模型第31天开始灌胃给药,每天1次,连续30 d。测定大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数和分类计数,测定BALF中白细胞介素(IL)-8、IL-6和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠BALF中白细胞总数增加,中性粒细胞总数、淋巴细胞比例、中性粒细胞比例增加,单核-巨噬细胞比例减少,IL-6、IL-8、TNF- α 含量增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,芪白平肺胶囊高、中、低剂量组大鼠BALF中白细胞总数、中性粒细胞比例、淋巴细胞比例减少,单核-巨噬细胞比例增加,IL-6、IL-8、TNF- α 含量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.01$)。结论:芪白平肺胶囊能下调COPD模型大鼠支气管BALF中IL-8、IL-6、TNF- α 的含量,减轻气道炎症反应而发挥治疗作用。

关键词 慢性阻塞性肺疾病;芪白平肺胶囊;白细胞介素6;白细胞介素8;肿瘤坏死因子 α

Protective Effects of Qibai Pingfei Capsules on Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model Rats

ZHANG He¹, GE Ping¹, WANG Xiao-yu², MENG Mei² (1. Graduate School, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China; 2. Three Level Lab of TCM Preparation, The First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM, State Administration of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of Qibai pingfei capsules on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats. METHODS: COPD model rat was induced by complex factors. 90 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Guben kechuan tablets group (0.72 g/kg), Qibai pingfei capsules high-dose, medium-dose and low-dose groups (2.88, 1.44, 0.72 g/kg). They were given relevant medicine intragastrically once a day since 31th day after modeling for consecutive 30 days. Total amount and differential counting of cells in BALF of rats both were determined. The contents of IL-8, IL-6 and TNF- α were determined in bronchus. RESULTS: Compared with normal control group, total amount of leucocyte in BALF of model group increased; and the proportion of neutrophile granulocyte and leukomonocyte increased while that of mononuclear macrophage decreased; the contents of IL-6 and IL-8 increased; there was statistical significance ($P<0.01$). Compared with model group, the total amount of leucocyte in BALF of rats decreased in Qibai pingfei capsule high-dose, medium-dose and low-dose groups; the proportion of neutrophile granulocyte and leukomonocyte decreased; the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α of BALF in Qibai pingfei group was decreased, there was statistical significance ($P<0.01$, $P<0.01$). CONCLUSIONS: Qibai pingfei capsule can down-regulate the levels of IL-6, IL-8 and TNF- α of BALF in COPD model rats; it play a therapeutic role on COPD by way of reducing the air way inflammatory reaction.

KEYWORDS Chronic obstructive pulmonary disease; Qibai pingfei capsule; IL-6; IL-8; TNF- α

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD),是一种以不完全可逆性气流受限为特征,与肺部有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关的疾病^[1-2],该病呈缓慢进行性发展,致残率及病死率都较高,相关研究预计至2020年COPD死亡率将达到世界第三^[3],成为一大世界疾病经济负担^[4]。近年来,随着对COPD气道炎症的不断研究,发现白细胞介素(IL)-8、IL-6是构成COPD气道炎症反应的复杂的炎性细胞、细胞因子网络的重要组成成分,能加速局部炎症反

应的相互促进及发生发展,最终导致气道结构的重塑和气流阻塞^[5]。有研究表明,肿瘤坏死因子(TNF)- α 是一种具有广泛生物学活性的炎性细胞因子,在气道炎症中扮演着重要的角色^[6]。

芪白平肺胶囊原方由黄芪、生晒参、川芎、薤白、葶苈子、五味子、地龙7味药材组成,方中各味药的配伍与组方基于中医病机的“本虚标实”理论,黄芪甘温而入脾肺经,生晒参补气、益脾肺,合为君药,共奏益气温阳之功;川芎活血行气,薤白理气通阳,葶苈子泻肺平喘,三者共为臣药;五味子味酸收敛,甘温而润,为治疗久咳虚喘之要药;地龙清肺定喘、通行经络,合为佐药。诸药合用,具有益气温阳、化痰散瘀之功效。与COPD肺肾亏虚、血瘀内存的“虚瘀”机制相符合,长期以来该药在治疗COPD痰瘀阻肺证方面疗效显著。本课题组前期已研究此制剂在COPD模型大鼠中对肺组织^[7]和血清中相关

[△] 基金项目:安徽高校省级自然科学基金项目(No.KJ2011Z218)

* 硕士研究生。研究方向:中药新药研发。E-mail: 1003977361@qq.com

通信作者:主任药师,教授,硕士研究生导师。研究方向:中药新药研发。电话:0551-2838558。E-mail: ahzyymm@163.com

因子的影响,而本研究从与COPD密切相关的支气管肺泡灌洗液中的炎性细胞因子入手,采用参考文献方法复制大鼠肺气虚证COPD模型^[8-10],进一步探讨其在治疗COPD方面的作用机制,以期更好地反映和评价COPD肺内病变趋势。

1 材料

1.1 仪器

MAUO型电子天平(北京赛多利斯有限电子公司);680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);980型超声雾化仪(上海天缘医疗设备有限公司);AniRes2003型动物肺功能呼吸系统(北京贝兰博科技有限公司);KDC-16H型全自动冷冻高速离心机(科大创新股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

芪白平肺胶囊(安徽中医学院第一附属医院制剂中心,批号:20120902);固本咳喘片(南通精华制药股份有限公司,批号:2020851);木瓜蛋白酶(美国Sigma公司);IL-6、IL-8、TNF- α 试剂盒(美国RD公司)。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠90只,♂,体质量(200±20)g,由安徽长临河医药科技有限公司提供[实验动物使用许可证号:SCXK(皖)2007-001]。大鼠自由摄食和饮水,保持室内温度(20±2)℃,相对湿度保持50%左右。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药^[9]

大鼠置于密闭玻璃箱中,点燃约40g刨花、30g烟叶、5g硫磺,熏吸50min,根据大鼠反应情况调整烟量,每天2次,连续60d,同时于烟熏第30、32、34、36天雾化吸入木瓜蛋白酶以复制大鼠COPD模型。90只SD大鼠随机均分为6组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、固本咳喘片(0.72g/kg)组与芪白平肺胶囊高、中、低剂量(2.88、1.44、0.72g/kg)组,复制模型第31天开始ig给药,每天1次,连续30d。

2.2 一般状况观察

观察各组大鼠毛发、呼吸、活动、食量、体质量等情况。

2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)的采集

将大鼠用2%戊巴比妥(25mg/kg)ip麻醉后仰卧固定于操作台,切开胸腔,充分暴露出气管和双肺结扎右主支气管,于隆突上用套管针穿刺至左肺,以2ml生理盐水灌洗左肺,再缓慢回抽,每次回收液体约1.5ml(回收率约75%),如此反复灌洗3次,总回收量约4.5ml。

2.4 细胞计数分类的检测

混匀灌洗液,先取0.5ml用细胞计数板行BALF细胞计数,余下液体4℃下,以离心半径为20cm、1000r/min离心10min,取上清液-20℃贮藏。取沉渣涂片,瑞氏染色,按形态学标准进行细胞分类与计数。

2.5 大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 水平的测定

取离心后的BALF上清液适量,采用双抗体夹心ELISA法,严格按照试剂盒说明书测定大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 水平。

2.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芪白平肺胶囊对模型大鼠一般活动的影响

正常对照组大鼠活泼好动,毛发光泽,生长壮硕,呼吸平稳;模型组大鼠行动迟缓,活动量减少,撮毛,食量减少,逐渐消瘦,咳嗽,后期呼吸加快加深,死亡增多;芪白平肺胶囊高、中、低剂量组大鼠活动、毛发光泽、咳嗽等各症状情况好转。

3.2 芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中细胞分类的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠BALF中白细胞总数增加,淋巴细胞、中性粒细胞比例增加,单核-巨噬细胞比例降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,芪白平肺胶囊高、中、低剂量组大鼠BALF中白细胞总数减少,淋巴细胞、中性粒细胞比例减少,单核-巨噬细胞比例增加,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中细胞分类的影响见表1。

表1 芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中细胞分类的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Effects of Qibai pingfei capsules on the cell classification of BALF in COPD model rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g/kg	白细胞总数, $\times 10^6 L^{-1}$	单核-巨噬细胞,%	淋巴细胞,%	中性粒细胞,%
正常对照组		85.75±73.94	72.88±3.91	21.75±6.41	2.38±1.51
模型组		301.50±218.21*	40.67±4.59*	38.67±7.31*	21.57±4.12*
芪白平肺胶囊低剂量组	0.72	143.00±81.74**	55.25±5.68**	28.60±9.04**	18.88±8.77**
芪白平肺胶囊中剂量组	1.44	169.75±184.98**	58.75±4.20**	28.50±4.07**	12.75±3.73**
芪白平肺胶囊高剂量组	2.88	130.88±128.06**	66.40±9.07**	24.75±4.83**	8.67±2.94**
固本咳喘片组	0.72	170.14±80.33**	60.00±3.51**	19.43±4.54**	17.80±0.71*

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 含量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,芪白平肺胶囊高、中、低剂量组大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 含量的影响见表2。

4 讨论

芪白平肺胶囊是安徽中医药大学第一附属医院院内之特色制剂,亦是目前为止国内在COPP方面取得显著治疗效果中鲜有的特色方剂之一。从已取得的临床疗效发现,该药可以增强COPD患者的免疫功能,在用于COPD的治疗上疗效较好。由前期完成的实验和本研究表明,芪白平肺胶囊在分子水平上能调节TNF- α 、IL-8、IL-6、干扰素 γ (IFN- γ)等炎症因子,从而抑制气道的慢性炎症,延缓不可逆气流受限的进程,

表2 芪白平肺胶囊对模型大鼠BALF中IL-6、IL-8、TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Effects of Qibai pingfei capsules on the contents of IL-6, IL-8 and TNF- α in BALF of COPD model rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,g/kg	IL-6,ng/L	IL-8,ng/L	TNF- α ,ng/L
正常对照组		7.82 \pm 0.88	56.11 \pm 11.96	18.59 \pm 0.71
模型组		9.98 \pm 2.05*	70.42 \pm 15.26*	29.28 \pm 3.30*
芪白平肺胶囊低剂量组	0.72	8.14 \pm 1.08**	59.53 \pm 11.41**	25.81 \pm 2.56*
芪白平肺胶囊中剂量组	1.44	8.09 \pm 0.92**	62.88 \pm 7.82*	25.08 \pm 1.32*
芪白平肺胶囊高剂量组	2.88	7.98 \pm 1.03**	58.60 \pm 13.72**	23.20 \pm 1.02**
固本咳喘片组	0.72	8.09 \pm 1.25**	63.80 \pm 13.42*	23.45 \pm 0.88**

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: ** $P < 0.05$,

** $P < 0.01$

达到改善肺功能的作用。

COPD大鼠模型的复制有多种方法,而近些年大多是采用复合因素诱发性动物模型。本研究采用烟、SO₂熏复合木瓜蛋白酶吸入法复制肺气虚证COPD模型,本方法简单,时间短,可操作性强,避免了前期实验中复制模型^[11]所需的自动测氧仪和CO₂传感器控制舱等仪器对大鼠创伤的影响,降低了动物的感染率。此模型与单一因素诱导模型相比,更容易诱导严重的肺气肿和明显异常的肺功能。模型复制的同时亦考察了模型组大鼠肺组织的病理形态,用益气化痰祛瘀方药芪白平肺胶囊和固本咳喘片对模型大鼠进行药物干预亦进行了反证,证明了本研究方法所复制的大鼠COPD模型是可靠的。

本研究是在王传博等^[12]研究基础上的进一步的探讨,复制模型方法异于传统方法,而是采用烟、SO₂熏复合木瓜蛋白酶吸入法复合因素复制模型,同时阳性药选用固本平喘片而非川芎嗪与泼尼松,细胞因子的种类亦有差异之处,本研究结果与前期文献报道相符,更加证实了芪白平肺胶囊能下调模型大鼠BALF中IL-8、IL-6及TNF- α 的水平,减轻COPD患者气道炎症反应而发挥治疗作用。

本研究中COPD模型大鼠BALF中IL-8、IL-6及TNF- α 水平均明显升高,说明COPD模型大鼠体内确实存在一定的炎症过程,提示IL-8、IL-6及TNF- α 水平对COPD的发生与发展有着十分重要的作用。

综上,COPD是多种细胞因子参与调控的复杂的慢性进行性气流阻塞性肺部炎症反应,任何针对单一因素的治疗可能不会有力地改变COPD病变进程。鉴于中药复方具有多靶位、多因素及生物调节剂样作用的特点,因此开展中药复方在COPD防治中的研究,具有十分重要的意义^[13]。本研究结合前期实验可知,芪白平肺胶囊在治疗COPD方面取得了较好的疗效,但其对COPD的治疗作用研究还具有局限性,如在药动学方面对于该制剂的最小有效量等实验研究的欠缺,而且对COPD病因病机研究深度不够,涉及COPD病变分子机制和芪白平肺胶囊对其作用的分子机制研究的整体方面都相对欠缺,因此后期还需进一步地展开分子机制的研究,从而系统地

认识COPD的发病机制,进而全面评价芪白平肺胶囊对COPD的作用效果和机制。

参考文献

- [1] Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 176(6):532.
- [2] 袁丽萍,翟所迪.慢性阻塞性肺疾病住院患者药物相互作用调查[J].中国药房,2009,20(8):632.
- [3] Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254(2):72.
- [4] 李泽庚,王传博,彭波,等.芪白平肺胶囊对慢阻肺痰瘀阻肺证模型大鼠肺功能的影响[J].上海中医药大学学报,2009,23(6):51.
- [5] Pinto-Plata VM, Cote C, Cabral H, *et al.* The 6-min walk distance: change over time and value as a predictor of survival in severe COPD[J]. *Eur Respir*, 2004, 23(1):28.
- [6] 孙钢,吕志坚,茅彩萍,等.参蛤益肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病大鼠炎症因子的影响[J].中国中医药信息杂志,2007,14(2):37.
- [7] 孟楣,李泽庚,王晓玉,等.芪白平肺胶囊对大鼠慢性阻塞性肺疾病模型肺功能的影响[J].中药新药与临床药理,2012,23(6):623.
- [8] 张葵,张樱,陈翌江,等.肺气虚证慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重构中支气管肺组织NF- κ B和MMP-9的表达变化[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(5):360.
- [9] 张葵,滕久祥,彭芝配.肺气虚证稳定期慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(3):179.
- [10] 吴建军,姜良铎,鲁香凤,等.安肺益肾方对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能的影响[J].中医杂志,2012,53(17):1492.
- [11] 李泽庚,王传博,彭波,等.芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病痰瘀阻肺证模型大鼠血气分析的影响[J].时珍国医国药,2010,21(3):569.
- [12] 王传博,李泽庚,彭波,等.芪白平肺胶囊对慢阻肺痰瘀阻肺证模型大鼠支气管肺泡灌洗液细胞因子的影响[J].中华中医药杂志,2012,27(11):2807.
- [13] Li SY, Li JS, Wang MH, *et al.* Effects of comprehensive therapy based on traditional Chinese medicine patterns in stable chronic obstructive pulmonary disease: a four-center, open-label, randomized, controlled study[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2012(12):197.

(收稿日期:2014-01-02 修回日期:2014-02-19)