

爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠肺组织炎症因子及氧化应激的影响

尚立芝, 谢文英*, 张良芝, 潘晓丽, 胡文豪, 刘坦
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**探讨爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺部炎症及氧化损伤作用及机制。**方法:**采用脂多糖(LPS)加烟雾诱导 COPD 大鼠模型,大鼠随机分为正常组、模型组、爱罗咳喘宁低、中、高剂量组。正常组、模型组灌胃生理盐水(15.52 mL·kg⁻¹·d⁻¹),爱罗咳喘宁低、中、高剂量组分别灌胃(7.75,15.52,31.04) g·kg⁻¹·d⁻¹,连续 14 d。用比色法、酶联免疫法(ELISA)分别测定大鼠肺匀浆中磷酸化 p38MAPK(mitogen activatein kinase,p-p38MAPK)、髓过氧化物酶(MPO)活性,白介素-17(IL-17)和 C 反应蛋白(CRP)含量;并测定肺匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量。**结果:**与正常组比较,模型组 p-p38MAPK 和 MPO 活性、IL-17 和 CRP 含量均显著升高(均 $P < 0.01$);SOD 和 GSH-Px 活性均显著降低、MDA 含量显著升高(均 $P < 0.01$);与模型组相比,爱罗咳喘宁中剂量组 p-p38MAPK($P < 0.05$)、MPO($P < 0.01$)活性与 IL-17,CRP(均 $P < 0.01$)含量均显著降低,SOD 和 GSH-Px 活性均显著升高、MDA 含量显著降低(均 $P < 0.01$)。**结论:**爱罗咳喘宁对 COPD 有抗炎作用,其机制可能与抑制 p-p38MAPK,MPO 活性,减少 IL-17 的释放有关;爱罗咳喘宁对 COPD 有抗氧化损伤作用,其机制通过提高 SOD 和 GSH-Px 活性,减少 MDA 生成,保护肺组织的结构与功能。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;髓过氧化物酶;白细胞介素-17;C 反应蛋白;超氧化物歧化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0168-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014240168

Effect of Ailuo Kechuanning on Inflammatory Cytokines and Oxidative Stress of Lung Homogenates in Rats with COPD

SHANG Li-zhi, XIE Wen-ying*, ZHANG Liang-zhi, PAN Xiao-li, HU Wen-hao, LIU Tan
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Ailuo Kechuanning on mitogen activatein kinase (p38MAPK), myeloperoxidase (MPO), interleukin-17 (IL-17), C-reactive protein (CRP), and oxidative stress in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Method:** Lipopolysaccharide (LPS) smoke was used to COPD rat model, the experimental animals were randomly divided into normal group, model group, Ailuo Kechuanning groups (7.75, 15.52, 31.04 g·kg⁻¹·d⁻¹), The activity of p-p38MAPK and MPO was detected by colorimetric method, enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the change of IL-17 and C-reactive protein (CRP) levels. the concentration of MDA, the activity of SOD and glutethione peroxidase (GSH-Px) were measured in lung homogenates of all the groups. **Result:** The activity of p-p38MAPK and MPO, the levels of IL-17 and CRP were higher significantly, the activity of SOD and GSH-Px were decreased, the level of MDA was higher significantly in lung homogenates of the model group. Compared with the normal control group. While the activity of p-p38MAPK and MPO, and the levels of IL-17 and CRP was decreased significantly. the activity of SOD and GSH-Px were higher significantly, and the level of MDA was decreased significantly in lung homogenates of the rats treated with Ailuo Kechuanning (15.52 g·kg⁻¹·d⁻¹) compared with the model group.

[收稿日期] 20140913(002)

[基金项目] 河南省自然科学研究计划项目(2010A360024);河南省科技攻关项目(112102310314);郑州市科技领军人才项目(121PLJRC535)

[第一作者] 尚立芝,硕士,副教授,从事经方配伍基础研究,E-mail:1357865736@qq.com

[通讯作者] * 谢文英,教授,从事内科杂病防治研究,Tel:13663007589,E-mail:xiewenyi1963@163.com

Conclusion: Ailuo Kechuanning may improve the pulmonary function of COPD. The effects of Ailuo Kechuanning for treatment of COPD may inhibit the activity of p-p38MAPK and MPO, and decrease the levels of IL-17, CRP and MDA, lead to the anti-inflammatory and against oxidative damage.

[**Key words**] chronic obstructive pulmonary disease; myeloperoxidase; interleukin-17; C-reactive protein; superoxide dismutase

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以慢性非特异性气道炎症为主要病变特征的呼吸系统常见病和多发病^[1]。COPD 的发病由多种炎症细胞、炎症介质及氧化损伤参与并相互作用,中性粒细胞在气道腔内聚集、活化、释放蛋白酶等多种酶类及氧自由基等,导致肺组织损伤^[2-3]。本课题组拟定爱罗咳喘宁方,经多年临床和前期动物实验研究结果均显示,爱罗咳喘宁能显著提高 COPD 患者和动物模型的肺功能、改善肺组织结构,但其作用机制不明^[4-7]。本研究制备脂多糖 (LPS) 加烟雾诱导 COPD 大鼠模型,观察爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠肺组织匀浆中参与炎症反应的 p38 有丝分裂原激活的蛋白激酶 (p38MAPK)、髓过氧化物酶 (MPO) 活性,白介素-17 (IL-17) 和 C 反应蛋白 (CRP) 含量及对反映氧化损伤的丙二醛 (MDA),超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的影响,探讨爱罗咳喘宁对 COPD 炎症及氧化应激的作用及机制。

1 材料

1.1 药物 爱罗咳喘宁方药物组成:炙麻黄 (1206031) 6 g,党参 (1112024) 15 g,麦芽 (1112031) 20 g,白术 (1112011) 12 g,葶苈子 (1112011) 10 g,苍术 (1112021) 10 g 等均为中药配方颗粒,由江阴天江药业有限公司生产;姜半夏 (1111001S) 10 g,苦杏仁 (1110004S) 10 g,山药 (1103001S) 15 g 等均为中药配方颗粒,由三九医药生产。

1.2 试剂 IL-17 (CK-E30480R) 和 CRP (CK-E30459R) ELISA 试剂盒 (均为 R&D Systems 产品),测定 p-p38MAPK (FK211), MPO (A044), GSH-Px (A005), SOD (A003-3) 活性及 MDA (A003-1) 试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。脂多糖 (LPS, Solarbio 公司, L8880, 701c034), 红旗渠牌香烟 (烤烟型, 焦油、尼古丁含量分别 14, 1.1 mg/支, 河南安阳卷烟厂)。

1.3 仪器 自制有机玻璃熏烟箱 (50 cm × 50 cm × 40 cm), TGL-16GA 低温高速离心机 (上海安亭仪器厂), Powerwave XS 全波长扫描酶标仪 (美国 Biotek), 伯乐 1575 型全自动酶标洗板机 (美国伯乐公

司)。20486 型显微摄像仪 (日本 Olympus)。小动物肺功能测量系统 (TopScan, 吉安德尔科技有限公司), Inspira 小动物用呼吸机 (日本光电), ABL80 型血气分析仪 (丹麦 Radiometer 公司), DU640 型紫外分光光度仪 (美国 Beckman), 等。

1.4 动物 6 月龄雄性 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 雌雄各半, 体质量 (300 ± 20) g。郑州大学医学院实验动物中心提供动物, 合格证号 SCXK (豫) 2012-0001。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠随机分为正常组、模型组、爱罗咳喘宁低、中、高剂量组, 每组 10 只。

2.2 模型制备 参照文献 [8-9] 制备 LPS 加烟雾诱导 COPD 大鼠模型。采用气管注 LPS 加熏香烟法: 在第 1, 14 天, 用 1% 的戊巴比妥钠 (40 mg · kg⁻¹) ip 麻醉, 仰卧位固定, 暴露声门, 将 18 号静脉套管针快速插入气管, 拔出针芯, 用 1 mL 注射器注入溶于生理盐水的 LPS 200 μL (1 g · L⁻¹), 将大鼠固定板直立旋转, 使 LPS 能够均匀分布于两肺。第 2 ~ 28 天 (第 14 天除外) 将大鼠置入熏箱内, 内熏香烟烟雾, 40 min/次, 2 次/d (每次 8 支烟), 每周休息 1 d; 正常组, 第 1, 14 天经气管注入 200 μL 生理盐水, 其余无特殊处理。

2.3 给药方案 正常组、模型组生理盐水 ig (15.52 mL · kg⁻¹ · d⁻¹), 爱罗咳喘宁低、中、高剂量组分别 ig (7.75, 15.52, 31.04 g · kg⁻¹ · d⁻¹), 连续 14 d。

2.4 肺组织匀浆制备 取右肺组织 1.0 g, 在预冷的生理盐水中漂洗, 用滤纸拭干, 制备成 10% 的肺匀浆 4 °C 离心 2 000 r · min⁻¹, 离心 10 min, 收集上清液, -20 °C 冻存待测。

2.5 指标检测 IL-17 和 CRP 浓度, p-p38MAPK, MPO^[10], GSH-Px, SOD 活性及 MDA 含量, 均按试剂盒说明书操作进行。

2.6 统计学处理 数据处理在 SPSS 11.5 中进行, 计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间均数比较采用方差分析, 相关性检验用 Spearman 等级相关分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺匀浆中 p-p38MAPK, MPO 活性和 IL-17, CRP 含量的影响 与正常组比较,模型组肺匀浆中 p-p38MAPK, MPO 活性及 IL-17, CRP 含量均显著升

高(均 $P < 0.01$);与模型组相比,爱罗咳喘宁 3 个剂量组 p-p38MAPK, MPO 活性均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), IL-17 和 CRP 含量均显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 爱罗咳喘宁对 COPD 大鼠肺匀浆中 p-p38MAPK 和 MPO 活性, IL-17 和 CRP 含量的影响

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	p-p38MAPK/U·L ⁻¹	MPO/U·L ⁻¹	IL-17/μg·L ⁻¹	CRP/μg·L ⁻¹
正常	10	-	0.67 ± 0.28	80.21 ± 16.13	14.35 ± 1.21	18.45 ± 1.22
模型	8	-	6.21 ± 0.12 ²⁾	168.27 ± 12.46 ²⁾	91.04 ± 1.57 ²⁾	142.32 ± 3.42 ²⁾
爱罗咳喘宁	8	7.75	3.14 ± 1.25 ³⁾	113.13 ± 15.22 ⁴⁾	47.55 ± 1.65 ⁴⁾	80.71 ± 3.21 ⁴⁾
	9	15.52	2.71 ± 1.37 ³⁾	98.27 ± 13.21 ⁴⁾	43.56 ± 1.42 ⁴⁾	48.63 ± 1.34 ⁴⁾
	9	31.04	5.86 ± 3.17 ³⁾	117.47 ± 8.49 ³⁾	45.27 ± 0.98 ⁴⁾	50.67 ± 1.38 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对肺匀浆中 SOD, GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺匀浆中 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低(均 $P < 0.01$),MDA 含量显

著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,爱罗咳喘宁 3 个剂量组 SOD 和 GSH-Px 活性均显著增高(均 $P < 0.01$),MDA 含量显著降低($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 爱罗咳喘宁对 COPD 肺匀浆中 SOD, GSH-Px, MDA 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹
正常	10	-	182.41 ± 2.21	32.51 ± 1.09	2.56 ± 0.17
模型	8	-	79.30 ± 1.16 ²⁾	12.33 ± 3.13 ²⁾	11.34 ± 0.05 ²⁾
爱罗咳喘宁	8	7.75	120.22 ± 3.53 ³⁾	27.13 ± 3.42 ³⁾	6.23 ± 3.13 ³⁾
	9	15.52	153.50 ± 1.82 ⁴⁾	25.04 ± 1.05 ⁴⁾	3.02 ± 0.52 ⁴⁾
	9	31.04	126.67 ± 3.43 ³⁾	20.24 ± 2.47 ³⁾	8.53 ± 2.31

4 讨论

COPD 以气道、肺实质和肺血管的慢性炎症为特征。浸润的炎细胞释放细胞因子,如白三烯 B4 (LTB4), IL-17, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和 CRP 等^[2-3]。参与 COPD 反应的炎症细胞主要有中性粒细胞、巨噬细胞等^[11]。中性粒细胞是 COPD 发病中的主要炎症细胞^[12]。IL-17 与其受体结合后通过 MAPK,核因子(NF)- κ B,Janus 激酶/信号转导途径,介导中性粒细胞的募集和激活^[13]。阻断 IL-17 的释放与作用,可能成为 COPD 治疗的新靶点, p38MAPK 特异性抑制剂,有助于慢性阻塞性肺疾病的防治^[14]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组肺组织匀浆中 p-p38MAPK 和 MPO 活性,IL-17 和 CRP 含量都显著增高(均 $P < 0.01$),可能通过 p38MAPK 信号途径促进 IL-17 和 CRP 等细胞因子的释放,诱导中性粒细胞的募集和激活,活化的中性粒细胞释放 MPO,协同参与 COPD 的炎症过程。与模型组相比,爱罗咳喘宁 3 个剂量组 p-p38MAPK, MPO 活性均显著降低,IL-17, CRP 含量显著降低。爱罗咳喘宁可能对 MPO 活性、IL-17 和 CRP 的合

成、释放及 p-p38MAPK 信号途径有抑制作用。

p38MAPK 是炎性细胞因子表达调控的重要信号分子,其活化与氧化应激相关^[15]。氧化应激通过激活 p38MAPK 通路,促进其下游的炎症介质的转录、翻译与释放,从而加重组织损伤^[16]。氧化应激可激活炎症细胞,并使炎症细胞释放炎症介质,构成炎症细胞和炎症介质网络。香烟中存在大量的氧化剂,活化的炎症细胞产生内源性氧化剂。自由基能使生物膜的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,产生的 MDA 使 DNA、蛋白质分子发生交连造成细胞损伤,MDA 反映 COPD 时组织脂质过氧化程度^[17]。SOD, GSH-Px 是体内重要的氧自由基清除剂,二者对肺组织有保护作用。本研究结果显示,与正常组比较,模型组 SOD 和 GSH-Px 活性均显著低于正常组(均 $P < 0.01$),MDA 含量显著高于正常组($P < 0.05$)。与模型组比较,爱罗咳喘宁 3 个剂量组 SOD 和 GSH-Px 活性均显著增高,MDA 含量显著降低(均 $P < 0.01$)。提示爱罗咳喘宁可通过提高 SOD, GSH-Px 活性,增强体内清除氧自由的能力,减少脂质过氧化生成的 MDA,发挥对肺组织保护作用。

MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶,通过脂质过氧化作用引起肺组织损伤。MPO 可作为中性粒细胞的活化标志物,MPO 活力变化代表着中性粒细胞功能和活性状态。反映中性粒细胞的浸润情况,又可定量反映炎症损伤的程度^[18]。本实验结果发现,模型组 MPO 较正常组显著增高,这与文献^[19-20]报道结果相一致。说明在 COPD 大鼠肺内存在中性粒细胞的聚集,活化。提示模型组肺内中性粒细胞脱颗粒释放过量的 MPO 等酶类和细胞因子,诱导了气道炎症和组织损伤。与模型组比较,爱罗咳喘宁 3 个剂量组肺匀浆中 MPO 水平显著低于模型组(均 $P < 0.05$),提示爱罗咳喘宁可减低肺匀浆中 MPO 水平,抑制 MPO 活性。从而发挥其抗炎、抗氧化损伤的作用。这可能是爱罗咳喘宁通过多途径、多靶点治疗 COPD 的作用机制之一。其详细机制,有待深入研究。

[参考文献]

- [1] 钟南山. 慢性阻塞性肺疾病在中国[J]. 中国实用内科杂志,2011,31(5):321.
- [2] Herfs M, Hubert P, Poirrier A L, et al. Proinflammatory cytokines induce bronchial hyperplasia and squamous metaplasia in smokers: implications for chronic obstructive pulmonary disease therapy[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*,2012,47(1):67.
- [3] 姚坚,陈金亮,陶一江. COPD 患者血清中 LTB₄ 和 TNF- α 的检测及其临床意义[J]. 临床肺科杂志,2012,17(3):459.
- [4] 尚立芝,谢文英,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠白三烯 B₄,白细胞介素-6 和肺组织病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(12):170.
- [5] 谢文英,尚立芝,张良芝,等. 爱罗咳喘宁对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子- α ,白细胞介素-8 和白细胞介素-18 及炎细胞的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(4):448.
- [6] 谢文英,常学辉,张良芝. 爱罗咳喘宁口服液对支气管哮喘患者白细胞介素 2 及白细胞介素 13 的影响[J]. 中医杂志,2007,48(7):614.
- [7] 谢文英,张良芝,刘霖,等. 爱罗咳喘宁口服液对慢性支气管炎大鼠白细胞介素-13 和肿瘤坏死因子- α 含量的影响[J]. 中国新药杂志,2012,21(5):551.
- [8] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary

- disease: experimental animal models of pulmonary emphysema[J]. *Thorax*, 2002,57: 908.
- [9] 宋小莲,王昌惠,白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺病大鼠模型比较[J]. 第二军医大学学报,2010,31(3):246.
 - [10] 胡坚,陈发秀,邱元芝,等. 髓过氧化物酶在老年慢性心力衰竭患者中的临床意义[J]. 中国老年学杂志,2014,34(1):13.
 - [11] Ross Vlahos, Steven Bozinovski. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD[J]. *Clin Sci*,2014,126(4):253.
 - [12] Hogg J C, Chu F, Utokaparch S, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(26):2645.
 - [13] Vanaudenaerde B M, Wuyts W A, Geudens N, et al. Macrolides inhibit IL-17-induced IL-8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells[J]. *Am J Transplant*,2007,7(1):76.
 - [14] Huang C P, Zhang Z X, Xu Y J. Effect of p38 protein kinase on the activation of rat alveolar macrophages by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2003, 19(5): 661.
 - [15] 孟爱宏,凌亦凌,张霄鹏. p38MAPK 和 STAT3 参与 CCK-S 抑制 LPS 诱导的大鼠促炎细胞因子生成[J]. 中国病理生理杂志,2013.29(6):1095.
 - [16] 胡晓霞,王艳,王妮. p38 MAPK, NF-KB 与氧化应激在肝纤维化中作用[J]. 中国公共卫生,2013,29(6):834.
 - [17] 刘涌,赵蜀军,蔡圣荣. 慢性支气管炎肺气虚证大鼠丙二醛、肿瘤坏死因子- α 改变及意义[J]. 中医临床杂志,2007,19(1):26.
 - [18] Forte E, Salinas R E, Chang C, et al. The Epstein-Bar virus(EBV)-induced tumor suppressor microRNA MiR-34ais groth promoting in EBV-infected B cells [J]. *Virology*,2012,86(12): 6889.
 - [19] 彭红星,杨荣时,曾玉兰,等. 吸烟诱导的慢性支气管炎大鼠模型巨噬细胞炎性蛋白-2 及髓过氧化物酶研究[J]. 中国现代医学杂志,2012,22(12):10.
 - [20] 方苏榕,谷伟,谭焰,等. 烟熏联合内毒素构建 COPD 大鼠模型[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(9):1226.

[责任编辑 聂淑琴]