

补肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病动物模型的疗效观察

韩云霞¹, 蒋玲^{1*}, 屈相玲¹, 李玲², 王翠茹²

(1. 贵阳中医学院第二附属医院药剂科, 贵阳 550001; 2. 贵阳医学院机能学实验室, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**观察补肺胶囊对大鼠慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型肺功能的影响以及其对 COPD 病程中主要临床症状的治疗效果。**方法:**取清洁级雄性 SD 大鼠,采用被动吸烟法(每天 1 次,每次 30 min,连续 32 d),并于吸烟第 1 天和第 16 天时,采用气管滴注脂多糖(每只大鼠给予 0.1% 脂多糖水溶液 200 μ L)的方法复制 COPD 大鼠模型,筛选造模成功的大鼠 60 只,按体重随机分为 6 组,即补肺胶囊高、中、低剂量组(2.1, 1.05, 0.53 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、模型组、氨茶碱阳性药组(氨茶碱 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和空白对照组。各实验组 ig 给药,每天给药 1 次,连续给药 4 周,对照组、模型组灌服同体积生理盐水,观察各组大鼠肺功能的改变情况;依次采用鼠耳肿胀法及碳粒廓清实验、氨水引咳法、组胺诱喘法及酚红法分别观察补肺胶囊的抗炎免疫调节、止咳、平喘及化痰作用。**结果:**与模型组比较,补肺胶囊组大鼠的 0.3 s 用力呼气量[FEV_{0.3}, (3.715 \pm 0.399) mL, $P < 0.05$], 0.3 s 用力呼气量占用力肺活量 FVC 比值[FEV_{0.3}/FVC(75.239 \pm 3.847)%, $P < 0.01$]均升高,另外与空白对照组比较,补肺胶囊组的咳嗽潜伏期延长[(89.0 \pm 19.4) s, $P < 0.01$],而 2 min 咳嗽次数减少[(23 \pm 10)次, $P < 0.01$],鼠耳肿胀度也明显减轻,祛痰指数及廓清指数均显著增高($P < 0.01$)。**结论:**补肺胶囊能改善 COPD 模型大鼠的肺功能;并能有效改善贯穿 COPD 病程始终的各种临床表现。

[关键词] 补肺胶囊;慢性阻塞性肺疾病;肺功能;免疫调节;止咳;平喘;化痰

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)09-0210-04

The Effect of Bufe Capsule on Chronic Obstructive Pulmonary Diseases in Rat Model

HAN Yun-xia¹, JIANG Ling^{1*}, QU Xiang-ling¹, LI Ling², WANG Cui-ru²

(1. The Second Affiliated Hospital of Guiyang Traditional Chinese Medical College,

Guiyang 550001, China; 2. Guiyang Medical College, Function laboratory, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact of bufei capsule on chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in rats model. **Method:** The model of COPD was established by applying intra-tracheal injection of lipodysaccharide (LPS) and smoking. The drugs was given by gavages for four weeks, and the changes of lung function was observed. The ear swelling method and the carbon clearance test, ammonia cited cough, histamine induced asthma method and phenol red method were used to observe the anti-inflammatory, immunity regulation and relieving cough, asthma and phlegm. **Result:** Compared with the model group, the indexes of forced expiratory volume in 0.3 second (FEV_{0.3}), forced vital capacity (FVC), FEV_{0.3}/FVC and arterial pH, partial pressure of oxygen (PaO₂) increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), and carbon dioxide partial pressure (PaCO₂) decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in the bufei capsule group. The relieving cough, asthma and phlegm anti-inflammatory effects and immunoregulation were more significant in bufei casule group than that in modle group. ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** The Bufe capsule can improve lung function and a variety of clinical manifestations in COPD.

[收稿日期] 20111016(002)

[基金项目] 贵州省科技厅项目(黔科合社字[2009]5021号)

[第一作者] 韩云霞,药学学士,副主任药师,从事医院制剂的开发与研究,Tel:0851-5283051,E-mail:han8151957@163.com

[通讯作者] *蒋玲,药理学硕士,药师,从事医院制剂开发与药理学研究,Tel:0851-5283051,E-mail:jiangling_820127@yahoo.com.cn

[Key words] Bufe capsule; chronic obstructive pulmonary diseases; lung function; immune; cough effect; effective of asthma; phlegm

补肺胶囊是拟开发为治疗慢性阻塞性肺疾病(COPD)缓解期的有效药物。COPD是一种具有气流受限特征的可以预防和治疗的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与肺部对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症有关^[1],可伴有气道高反应性。其患病率、致残率及病死率均较高,2000年全世界有6亿患者罹患COPD,3百万人死于该病,居全球死亡原因的第四位,因此有效防治COPD是摆在医务工作者面前一项艰巨的任务。

目前对COPD的治疗主要着眼于抗炎、镇咳、化痰、平喘等方面,补肺胶囊由黄芪、党参、北沙参等12味中药组成,本实验拟通过观察补肺胶囊对COPD模型大鼠肺功能及COPD患者各主要临床表现的作用影响,来系统论证补肺胶囊的基本药理作用,为临床合理使用补肺胶囊治疗COPD提供可靠的理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康SD雄性大鼠60只,体重(220±20)g,合格证号SCXK(渝)2007-0005,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供。

1.2 受试药物 补肺胶囊,由黄芪、党参、北沙参等12味中药经水提、浓缩、干燥、打粉、填充而成(每1g胶囊含原生药材7.56g),按《中国药典》2010年版一部“硬胶囊剂”项进行质量控制,由贵阳中医学院第二附属医院药剂科提供,批号20110121。取补肺胶囊用生理盐水配制成0.1g·mL⁻¹的混悬液备用。

1.3 仪器与试剂、药品 有机玻璃熏烟箱(70cm×50cm×50cm,右上方带有1.5cm×1.5cm通气孔),自制,BL-420S生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),HX200型呼吸流量换能器(北京新航兴业科贸有限公司),血气分析仪(南昌新长征医疗科技发展有限公司),脂多糖(LPS,美国Sigma公司),氨茶碱片(汕头金石制药总厂,批号100502),磷酸可待因溶液(南昌立健药业有限公司,批号110127),盐酸氨溴索分散片(山西仟源制药股份有限公司,批号100712),醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号100321),水合氯醛(成都金山化学试剂有限公司),“黄果树”牌过滤嘴香烟(烤烟型,焦油量13mg,烟气烟碱量1.2mg,烟气一氧化碳量14mg,贵州中烟工业有限责任公司)。

2 方法

2.1 补肺胶囊对COPD大鼠肺功能的影响

2.1.1 造模方法^[2] 将大鼠放入熏烟箱内,点燃香烟,用60mL注射器吸满烟雾,通过三通管将烟雾快速注入熏烟箱内,让大鼠被动吸烟,每天1次,每次30min,连续32d。在实验开始第1天和第16天时,大鼠ip10%水合氯醛4mL·kg⁻¹进行麻醉后固定,备皮,常规消毒,分离暴露气管,4号针头穿刺气管并缓慢注入0.1%LPS水溶液200μL,注完立即将大鼠直立并旋转,缝合皮肤切口消毒,待大鼠清醒后放回鼠笼中饲养,给药当日不予被动熏烟。第32天随机抽取造模大鼠5只处死,取肺组织切片行HE染色,观察其病理改变,判断COPD模型是否成功。

2.1.2 分组与给药 成年雄性SD大鼠60只,按体重随机分为6组,即补肺胶囊高、中、低剂量组(2.1, 1.05, 0.53g·kg⁻¹),模型组,氨茶碱阳性药组(氨茶碱60mg·kg⁻¹)和空白对照组。各实验组造模结束后第2天开始ig给药,每天给药1次,连续给药4周,对照组、模型组灌服同体积生理盐水。

2.1.3 指标测定 大鼠以10%水合氯醛(4mL·kg⁻¹)ip进行麻醉,固定后暴露气管,在气管软骨环之间行气管倒T形切口,插入Y形管,一端连接呼吸流量换能器,另一端连接三通管,记录一段平静呼吸后,在呼气末以注射器经三通管迅速打进6mL空气(相当于深吸气),然后立即脱开,用BL-420S生物机能实验系统记录并计算0.3s用力呼气量(FEV_{0.3})及0.3s用力呼气量占用力肺活量比值(FEV_{0.3}/FVC)。

2.2 止咳试验(氨水引咳法)^[3] 取18~22g小鼠50只,雌雄各半,随机分为空白对照组(等体积生理盐水),补肺胶囊高、中、低剂量组(2.1, 1.05, 0.53g·kg⁻¹)及磷酸可待因组(0.03g·kg⁻¹)。均ig给药,1次/d,连续5d。末次给药后1h进行氨水(25%~28%)引咳实验,各组小鼠罩于500mL烧杯中,放入带有0.1mL氨水的棉球,立即开始计时。观察记录每只小鼠的咳嗽潜伏期(s)和2min内的咳嗽次数。

2.3 平喘试验(组胺诱喘法) 取体重180~200g豚鼠若干只,用喷雾器对准豚鼠的鼻腔喷入1g·L⁻¹磷酸组胺1mL后,记录豚鼠产生哮喘反应的时间,以抽搐或跌倒的时间作为潜伏期,超过150s的豚

鼠不予选用。选用符合标准的小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为生理盐水阴性对照组(30 mL·kg⁻¹)、补肺胶囊组(剂量同 2.2)及氨茶碱阳性对照组(0.25 g·kg⁻¹)。以上 5 组均 ig 给药,1 次/d,连续 5 d。第 5 天服药后 40 min 后用喷雾器对准豚鼠的鼻腔喷入 1 g·L⁻¹磷酸组胺 1 mL 后,记录由喷雾开始至豚鼠跌倒的时间作为引喘潜伏期(s),并计算有效率。

2.4 祛痰试验(酚红法)^[4] 取 18~22 g 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为阴性对照组(等体积生理盐水),补肺胶囊组(剂量同 2.2)及氨溴索组(1 g·kg⁻¹)。以上 5 组均 ig 给药,1 次/d,连续 5 d。末次给药 1 h 后,由腹腔注射 0.5% 酚红溶液 0.5 mL。只,30 min 后,颈椎脱臼处死小鼠。仰位固定,分离气管,剥去气管周围组织,剪下自甲状腺骨至气管分支处的一段气管,放进盛有 3 mL 生理盐水的试管中冲洗,再加入 5% 碳酸氢钠溶液 0.1 mL 离心。取上清液,用分光光度计(波长 546 nm)测定吸光度(A),计算祛痰指数。

$$\text{祛痰指数} = \text{给药组 } A / \text{对照组 } A \times 100\%$$

2.5 抗炎试验(鼠耳肿胀法)^[5] 取 18~22 g 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,分别为阴性对照组(等体积生理盐水),补肺胶囊组(剂量同 2.2)及地塞米松阳性药组(0.02 g·kg⁻¹)。以上 5 组均 ig 给药,1 次/d,连续 5 d。末次给药 1 h 后,给小鼠右耳涂以二甲苯 0.05 mL,左耳作自身空白对照。30 min 后,将小鼠颈椎脱臼处死,用内径 6 mm 打孔器打下左、右双耳相应部位的圆片,迅速在精密天平上称质量,记录右耳片与左耳片质量之差的肿胀度

$$\text{肿胀度} = \text{致炎侧耳片质量} - \text{正常侧耳片质量}$$

2.6 炭粒廓清实验 取 18~22 g 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,分别为阴性对照组(等体积生理盐水),补肺胶囊组(剂量同 2.2)及地塞米松阳性药组(0.02 g·kg⁻¹)。以上 5 组均 ig 给药,1 次/d,连续 5 d。末次给药 1 h 后,给小白鼠尾静脉注射印度墨汁(稀释 4 倍)10 mL·kg⁻¹,分别于静脉注射后

2, 10 min 眼眶取血 25 μL,各加入 0.1% Na₂CO₃ 2 mL,摇匀,在波长 600 nm 处测吸光度(A),于末次取血后将小鼠处死,称肝脾质量,按下式计算廓清指数(K)、吞噬指数(α)。

$$K = \log A_2 - \log A_{10} / t_{10} - t_2 \quad (t_{10} - t_2 \text{ 为取血实际间隔时间})$$

$$\alpha = K^{1/3} \times \text{体重(g)} / \text{肝质量(g)} + \text{脾质量(g)}$$

2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析,采用 LSD 法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺功能测定 模型组大鼠 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 较对照组均降低,其差异有显著意义($P < 0.01$),说明 COPD 大鼠气流受限,肺通气功能障碍。补肺胶囊高剂量组 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 较模型组均升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);补肺胶囊中、低剂量组、阳性药组仅 FEV_{0.3}/FVC 升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示各剂量补肺胶囊均能不同程度的改善 COPD 大鼠的肺功能,其中高剂量的作用比较好。见表 1。

表 1 补肺胶囊各剂量对大鼠肺功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	FEV _{0.3} /mL	FEV _{0.3} /FVC /%
正常对照	-	3.776 ± 0.357	81.925 ± 2.718
模型	-	3.272 ± 0.395 ²⁾	59.260 ± 5.662 ²⁾
补肺胶囊	2.10	3.715 ± 0.399 ³⁾	75.239 ± 3.847 ⁴⁾
	1.05	3.457 ± 0.403	71.343 ± 4.087 ⁴⁾
	0.53	3.287 ± 0.351	63.654 ± 3.752 ³⁾
氨茶碱	0.06	3.477 ± 0.366	70.862 ± 3.571 ⁴⁾

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

3.2 抗炎、止咳实验 与模型组比较,补肺胶囊高、中剂量组及阳性对照组的咳嗽潜伏期明显延长,而 2 min 咳嗽次数明显减少,鼠耳肿胀度也明显减轻,其差异有显著意义($P < 0.01$),但与阳性药(磷酸可待因)相比,补肺中、低剂量组的止咳、抗炎作用逐渐减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),说明补肺胶囊高剂量组,其中的止咳、抗炎作用比较好。见表 2。

表 2 补肺胶囊与阳性对照药的止咳、抗炎效果对比($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	止咳实验		抗炎实验
		咳嗽潜伏期/s	2 min 咳嗽次数/次	鼠耳肿胀度/g
模型	-	30.8 ± 10.0	60 ± 15	0.006 7 ± 0.002 3
补肺胶囊	2.10	89.0 ± 19.4 ²⁾	23 ± 10 ²⁾	0.002 2 ± 0.002 1 ²⁾
	1.05	74.1 ± 21.7 ^{2,3)}	27 ± 11 ^{2,3)}	0.004 3 ± 0.001 8 ^{2,3)}
	0.53	53.6 ± 22.8 ⁴⁾	38 ± 15 ^{2,4)}	0.004 4 ± 0.001 3 ^{2,3)}
	磷酸可待因	0.03	97.3 ± 26.7 ²⁾	13 ± 6 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.01$;与磷酸可待因组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 平喘、化痰实验 用药前各组引喘潜伏期无显著差异,说明实验选用动物对组胺引喘的反应性无偏差;给药后,与模型组比较,各给药组的潜伏期均

有不同程度的延长,但仅阳性对照组的差异有显著意义 ($P < 0.05$);补肺胶囊中、高剂量组的祛痰指数较模型组都有增高 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 补肺胶囊与阳性药的平喘效果对比 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	平喘实验		化痰实验
		用药前 引喘潜伏期/s	用药后 引喘潜伏期/s	祛痰指数/%
模型	-	83.3 ± 24.0	106.8 ± 68.6	0.41 ± 0.35
补肺胶囊	2.10	83.7 ± 26.8	174.4 ± 75.2	1.27 ± 0.32 ²⁾
	1.05	84.2 ± 25.1	169.7 ± 100.5	1.09 ± 0.44 ²⁾
	0.53	84.6 ± 25.1	149.4 ± 78.0	0.59 ± 0.30 ⁴⁾
氨茶碱	0.25	78.0 ± 14.4	223.0 ± 98.4 ¹⁾	-
氨溴索	1.0	-	-	1.13 ± 0.41 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与西药组比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 免疫调节功能 补肺胶囊各剂量组的廓清指数与正常对照组比,差异具有统计意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但吞噬指数却无明显变化。见表 4。

表 4 补肺胶囊对廓清指数(K)和吞噬指数(α)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	K	α
正常对照	-	0.023 0 ± 0.004 2	4.555 1 ± 0.299 0
补肺胶囊	2.1	0.017 3 ± 0.006 4 ²⁾	4.396 9 ± 0.828 9
	1.05	0.025 0 ± 0.005 4 ¹⁾	4.803 8 ± 0.501 5
	0.53	0.023 4 ± 0.006 3 ¹⁾	4.638 9 ± 0.397 4

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医学认为 COPD 的发生发展是因为七情所伤及六淫之邪侵袭,导致肺、脾、肾功能失调,从而引起咳、痰、喘的主证。气道的慢性炎症,诱导炎症细胞释放各种炎症介质,引起气道重塑是 COPD 不完全可逆气流受限产生和发展的重要原因。呼气气流受限是 COPD 病理生理改变的标志,是疾病诊断的关键。肺功能检查是判断气流受限的客观指标,其对 COPD 诊断、严重度评价、疾病进展、预后及治疗反应等均有重要意义。在中华医学会呼吸分会《慢性阻塞性肺疾病诊治指南》中把肺功能测定作为诊断 COPD 的金标准^[1],目前临床上 COPD 的诊断是以 FEV₁、FEV₁/FVC 降低来确定的^[6],因大鼠呼吸较快,实验中作者用 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 代替 FEV₁、FEV₁/FVC 进行测定。

本实验中采用被动熏烟加气管内滴注脂多糖的方法复制 COPD 大鼠模型,脂多糖是革兰阴性细菌细胞壁中的一种成分,可趋化炎症细胞,促进合成炎症因子介导肺组织炎症反应,用两次气道内滴入脂多糖的方法模拟机体的反复感染;烟雾中的多种成分如羟自由基(HO)、过氧化氢(H₂O₂)等可直接或间接导致

气道炎症、肺组织破坏、气道阻塞、肺内弹性蛋白酶-抗蛋白酶失衡,加重病变。吸烟与反复感染是 COPD 最重要的两种诱发因素,脂多糖加吸烟制备模型更符合 COPD 临床发病过程,本法较单纯吸烟模型更省时,成功率更高,较反复单用脂多糖气道内滴入更经济安全。本实验模型组大鼠 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC,动脉血 pH,PaO₂ 显著降低,PaCO₂ 显著升高,且肺组织及支气管有慢性支气管炎、阻塞性肺气肿的特征性病理改变,说明造模成功。

本实验结果显示:补肺胶囊能提高 COPD 模型大鼠的 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC,动脉血 pH,PaO₂,降低 PaCO₂,具有改善肺功能的主要功效,同时具有较显著的抗炎、止咳、平喘及化痰功效,并能提高机体的免疫力,可见其标本兼治。补肺胶囊中黄芪、党参具有益肺健脾,增强免疫之功效;补骨脂、炒白术等具有温肾健脾之功效;陈皮、法半夏等有化痰止咳之功效,全方合用,共奏补益肺肾、肺胃得固,达到减缓或阻止 COPD 的进一步发展、恶化。

[参考文献]

[1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2007年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8.

[2] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 军医进修学院,2001,22(2):99.

[3] 刘晋华,李玉萍,尤光甫. 清肺消咳颗粒药效学实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(1):33.

[4] 李洪梅,康旭亮,李小芹,等. 苏黄止咳颗粒平喘止咳作用的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(8):51.

[5] 张广伟,张黎莉,周继春,等. 顽痹清片的抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(8):57.

[6] 蔡柏蔷,李龙芸. 协和呼吸病学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005. [责任编辑 聂淑琴]