

如意定喘丸对肺气肿大鼠的保护作用

谭显曙¹, 刘立涛¹, 万莉红¹, 陈瑾², 沈咏梅², 杜江², 周黎明^{1*}
(1. 四川大学华西基础医学与法医学院药理学教研室, 成都 610041;
2. 山西佳能达华禹制药有限公司, 山西 运城 044400)

[摘要] 目的:研究如意定喘丸对肺气肿大鼠的保护作用,为其临床运用提供理论依据。方法:60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、如意定喘丸高、中、低剂量组(420, 630, 840 mg·kg⁻¹)、桂龙咳喘宁对照组(450 mg·kg⁻¹),每组 10 只;采用气管内注入脂多糖(LPS)及烟熏的混合刺激方法建立肺气肿大鼠模型,造模 3 周后各组 ig 给予相应药物,连续 14 d。血气分析检测血氧含量的变化,ELISA 法测定血清中 IL-10 与 TNF- α 的浓度,进行肺组织病理切片观察形态学改变并采用图像分析系统分析肺气肿程度。结果:模型组大鼠肺组织可见肺大泡形成,且有明显的炎症细胞浸润,认为本实验造模成功;模型组大鼠平均肺泡面积为(2 922.4 ± 981.5) μm^2 ,血氧含量为(75.65 ± 9.97) mmHg,血清中 TNF- α 与 IL-10 分别为(132.17 ± 13.46) ng·L⁻¹和(28.03 ± 1.53) ng·L⁻¹,与正常组相比有显著性的差异($P < 0.05$)。如意定喘丸(840 mg·kg⁻¹)能减少平均肺泡面积(974.6 ± 282.3) μm^2 ,提高血氧含量(87.94 ± 3.08) mmHg,并能显著降低血清中 TNF- α (119.80 ± 5.53) ng·L⁻¹的表达及增加 IL-10(33.59 ± 7.92) ng·L⁻¹的表达,与模型组相比有显著性的差异($P < 0.05$),与桂龙咳喘宁组(450 mg·kg⁻¹)相比无显著性的差异。结论:如意定喘丸对肺气肿大鼠具有明显的保护作用。

[关键词] 如意定喘丸;肺气肿;血氧含量;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-10

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0185-04

Protective Effects of Ruyi Dingchuan Pill on Emphysema in Rats

TAN Xian-shu¹, LIU Li-tao¹, WAN Li-hong¹, CHEN Jin², SHEN Yong-mei², DU Jiang², ZHOU Li-ming^{1*}
(1. Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China;
2. Shanxi Jianengda Huayu Pharmaceutical Co., Ltd, Yuncheng 044400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protection of Ruyi Dingchuan pill on emphysema rat, and provides theoretical basis for its clinical application. **Method:** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group, Ruyi Dingchuan pill of high, medium and low dose groups, Guilong Kechuanning capsule control group. Rat model of emphysema was established by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) twice and exposed to cigarette smoke daily. After 3 weeks, the rats were administrated by gastric lavage of corresponding drugs for 14 days. Artery blood gas analysis and pathological changes in the lungs were observed. The expression of IL-10 and TNF- α was examined by ELISA. **Result:** Pathological changes with obvious emphysema and inflammation cell infiltrates were found after modeling. Average alveolar area and the levels of TNF- α in the model group were higher than those in the normal group($P < 0.05$). The arterial oxygen content and the levels of IL-10 in the model group were lower than those in the normal group($P < 0.05$). Ruyi Dingchuan pill could obviously lessen the infiltrations of inflammatory cells and formation of emphysema, increase arterial oxygen content, and significantly reduce the expression of TNF- α (119.80 ± 5.53) ng·L⁻¹ and increase the expression of IL-10 (33.59 ± 7.92) ng·L⁻¹ in the blood serum($P < 0.05$). Its effect was statistically insignificant compared with the positive drug. **Conclusion:** Ruyi

[收稿日期] 20101229(011)

[第一作者] 谭显曙, 硕士研究生, 从事呼吸系统药理研究, Tel: 15008269442, E-mail: tanxianshu@126.com

[通讯作者] * 周黎明, 教授, 博士生导师, 从事中药药理研究, Tel: 028-85503767, E-mail: zhou108@163.com

Dingchuan pill had apparent protective effect for emphysema rats.

[Key words] Ruyi Dingchuan pill; emphysema; blood oxygen content; TNF- α ; IL-10

肺气肿是指终末细支气管远端气道弹性减退, 气腔过度充气增大, 出现异常持久性扩张, 并伴有呼吸性细支气管、肺泡管、肺泡囊直至肺泡腔壁膨胀及破坏性病理损害而无明显纤维化为特征的一种慢性病^[1]。该病病因众多, 发病机制未明, 病程迁延, 病变类型复杂, 因而给治疗药物的研究带来了一定的困难, 已引起学者的高度重视。

中医认为肺为一身之气, 气为血之帅, 血为气之母, 气行血则行, 气滞则血瘀, 肺佐心脏运行血脉, 百脉朝于肺, 肺气肿首损于主气之症^[2]。蛤蚧、黄芪、甘草等能行气解郁、止咳化痰、益气活血化瘀而改善病情。如意定喘丸是由蛤蚧、黄芪、甘草、五味子、熟地黄、党参、地龙等多味中药组成的复方丸剂, 本文拟观察其对实验性肺气肿大鼠的治疗作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 雌雄各半, 体重约 180 ~ 200 g, 由成都达硕生物科技有限公司提供, 许可证号 SCXK(川)2009-09。

1.2 仪器与设备 自制的烟熏铁皮密闭箱, 规格为 80 cm × 60 cm × 50 cm (上方有一直径为 1 cm 的通气孔), 快速血气分析仪, Rapidlab348, 美国 Bayer 公司产品, 倒置荧光相差数码照相显微镜, 型号 TE2000-S, Nikon。

1.3 试剂 脂多糖 (LPS), 10 mg/支, 购自美国 Sigma 公司, 用生理盐水配成 1 g · L⁻¹ 溶液, IL-10 与 TNF- α 试剂盒, 购自美国 R&D 公司, 天下秀牌过滤嘴型香烟, 焦油量 13 mg, 烟气烟碱量 1.0 mg, 烟气一氧化碳量 14 mg, 川渝中烟工业公司生产, 水合氯醛 (AR), 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号 Q/12HB 4218-2009, 桂龙咳喘宁胶囊, 0.3 g/粒 (相当于原药材 1 g), 桂龙药业 (安徽) 有限公司, 批号 091109。

1.4 受试药物 如意定喘丸, 黑褐色浓缩水丸, 气微, 味微甜, 微苦, 每丸相当于原药材 0.7 g, 由山西佳能达华禹制药有限公司生产, 批号 100102。其处方组成: 蛤蚧 150 g, 黄芪 500 g, 甘草 (蜜炙) 500 g, 五味子 (酒蒸) 500 g, 熟地黄 500 g, 党参 500 g, 地龙 500 g, 蟾酥 (制) 9 g, 麻黄 500 g, 白果 500 g, 苦杏仁 800 g, 天冬 400 g, 枳实 300 g, 麦冬 400 g, 紫菀

400 g, 百部 200 g, 枸杞子 300 g, 远志 200 g, 葶苈子 200 g, 洋金花 200 g, 石膏 200 g。以上 21 味, 除蟾酥外, 蛤蚧、麻黄、枳实、洋金花、石膏、黄芪 (部分)、甘草 (部分) 粉碎成细粉, 苦杏仁加水煎煮, 其余地龙等 12 味及剩余的黄芪、甘草加水煎煮 3 次, 第 1 次 3 h, 第 2, 3 次各 1.5 h, 合并煎液, 滤过, 滤液与苦杏仁煎液合并, 减压浓缩成稠膏, 加入蟾酥及上述粉末, 混匀, 制成浓缩水丸, 低温干燥, 打光, 即得。

2 方法

2.1 动物分组 取 60 只 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 180 ~ 200 g, 采用随机、均衡的方法分为 6 组, 即正常对照组、模型组、如意定喘丸高、中、低剂量组、桂龙咳喘宁对照组, 每组 10 只; 造模 3 周后开始 ig 给药, 连续给药 14 d, 每天给药 0.5 h 后照常烟熏。

2.2 模型制作 造模组于实验第 1, 14 天, 大鼠经水合氯醛 ip 麻醉后, 气管内注入 LPS (1 g · L⁻¹) 200 μ L, 并适度摇动, 使 LPS 分布均匀。正常对照组气管内注入等体积生理盐水。次日起, 将大鼠分批置于烟熏室中, 用 20 支香烟点燃烟熏, 每日烟熏 30 min, 烟熏 3 周后各药物治疗组开始 ig 给药。给药剂量: 如意定喘丸按人每次口服 2, 3, 4 丸分别换算成大鼠的低、中、高剂量, 分别为 420, 630, 840 mg · kg⁻¹; 桂龙咳喘宁胶囊的剂量为 450 mg · kg⁻¹。然后再继续烟熏 2 周。正常对照组于手术次日起, 将大鼠置于无烟熏同样环境中饲养。

2.3 标本采集 实验满 5 周后大鼠禁食不禁水 24 h, 经水合氯醛麻醉后, 采集各标本并检测。

2.3.1 肺病理组织检查 取右肺中叶靠近肺门处的组织, 用 10% 甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋切片, 常规 HE 染色, 显微镜观察肺组织病理改变。

2.3.2 动脉血氧含量测定 经腹主动脉取血 2 mL, 抗凝后作血气分析用。

2.3.3 IL-10 与 TNF- α 含量测定 经腹主动脉采血 8 mL, 室温静置 10 min, 以 3 000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 留取上清液, 采用免疫酶联法 (ELISA) 测定血清中 IL-10 与 TNF- α 含量水平, 检测方法严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行

数据分析,计量资料的各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,并进一步用 LSD 法两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺气肿模型大鼠肺部病理组织学的影响 如图1所示:正常对照组肺泡大小均一,肺泡壁无明显增厚,肺泡腔干净、匀称,未见肺气肿及肺大泡形成,肺泡间隔无水肿及炎症细胞浸润等异常征象。模型组肺气肿明显,肉眼见肺体积略增大,肺边缘变钝,弹性较正常对照组降低;镜下见纤毛减少、变短,大部分纤毛脱落,单位面积内平均肺泡数明显减少,平均肺泡内衬间隔显著增大,细支气管及肺泡管、肺泡囊均扩张,肺泡壁变薄,并有不同程度的断裂或消失,部分融合成肺大泡,呈肺泡型肺气肿,且肺泡间隔可见瘀血、水肿和炎症细胞浸润。如意定喘丸治疗组炎症细胞浸润明显减轻,无肺大泡形成,肺泡间隔无水肿,肺泡平均面积明显缩小,且与剂量成正比,剂量越大,肺泡平均面积缩小越明显,与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$),其疗效与桂龙咳

喘宁组相当,经图像分析处理,各组肺泡平均面积的变化情况如表1所示。

表1 如意定喘丸对肺气肿大鼠平均肺泡面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肺泡面积/ μm^2
正常对照	-	744.0 ± 186.3 ¹⁾
肺气肿模型	-	2 922.0 ± 981.5
如意定喘丸	840	974.6 ± 282.3 ¹⁾
	630	1 436.3 ± 98.7 ¹⁾
	420	1 959.5 ± 512.4 ¹⁾
桂龙咳喘宁	450	1 075.3 ± 227.1 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$ (表2~3同)。

3.2 血气分析 肺气肿模型组大鼠 PaCO_2 明显升高, PaO_2 与 pH 明显降低,与正常对照组相比有显著性差异 ($P < 0.05$);如意定喘丸高剂量组、中剂量组与模型组相比,可明显降低大鼠动脉二氧化碳分压值 ($P < 0.05$) 以及升高氧气分压值 ($P < 0.05$),其疗效比桂龙咳喘宁胶囊略好,但对其余各血气指标均无明显改善作用,如表2所示。

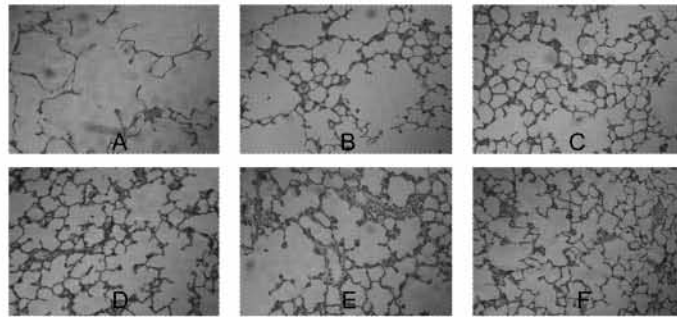


图1 如意定喘丸对肺气肿大鼠肺组织的影响 (HE 染色, $\times 110$)

A. 模型组; B. 如意定喘丸 $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; C. 如意定喘丸 $630 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 如意定喘丸 $840 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 桂龙咳喘宁 $450 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 正常对照组

表2 如意定喘丸对肺气肿大鼠血气的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	pH	$\text{PaCO}_2/\text{mmHg}$	PaO_2/mmHg
正常对照	-	7.33 ± 0.02 ¹⁾	55.04 ± 4.37 ¹⁾	88.18 ± 10.79 ¹⁾
肺气肿模型	-	7.25 ± 0.02	66.87 ± 4.19	75.65 ± 9.97
如意定喘丸	840	7.26 ± 0.08	49.68 ± 2.26 ¹⁾	87.94 ± 3.08 ¹⁾
	630	7.25 ± 0.06	50.08 ± 3.73 ¹⁾	86.63 ± 3.52 ¹⁾
	420	7.26 ± 0.05	54.10 ± 15.08	75.24 ± 8.81
桂龙咳喘宁	450	7.26 ± 0.04	43.77 ± 3.51 ¹⁾	78.23 ± 9.30

注:1 mmHg = 0.133 kPa。

3.3 对血清中 TNF- α 与 IL-10 的影响 如表3所示:与正常对照组相比,肺气肿模型组大鼠血清细胞

因子 TNF- α 表达量明显增加 ($P < 0.05$)、IL-10 表达量明显降低 ($P < 0.05$);如意定喘丸高剂量以及桂

龙咳喘宁胶囊可明显降低 TNF- α 的表达量、增加 IL-10 的表达量,如意定喘丸中剂量也可明显降低 TNF- α 的表达量,且与模型组相比具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 3 如意定喘丸对肺气肿大鼠血清细胞因子的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
正常对照	-	116.56 \pm 7.85 ¹⁾	34.07 \pm 2.24 ¹⁾
肺气肿模型	-	132.17 \pm 13.46	28.03 \pm 1.53
如意定喘丸	840	119.80 \pm 5.53 ¹⁾	33.59 \pm 7.92 ¹⁾
	630	120.43 \pm 4.71 ¹⁾	28.4 \pm 5.99
	420	121.96 \pm 6.3	27.86 \pm 2.49
桂龙咳喘宁	450	117.8 \pm 8.75 ¹⁾	37.57 \pm 3.9 ¹⁾

4 讨论

本实验采用气管内注入脂多糖(LPS)及混合烟熏刺激复制实验性肺气肿大鼠模型,结果表明,模型组大鼠出现明显的肺气肿改变,肺体积增大,肺泡结构紊乱,肺泡管、肺泡囊等明显扩张,肺泡壁明显变薄、断裂或消失,并局部融合形成肺大泡,且组织间炎症细胞浸润明显。经形态学定量分析,平均肺泡面积与正常对照组相比明显增大($P < 0.05$),血气分析的结果进一步发现,模型组大鼠 PaCO₂ 明显升高,PaO₂ 与 pH 明显降低($P < 0.05$)。

近年来研究表明,炎症反应在肺气肿的发生发展中起到重要的作用,而炎症细胞激活并聚集在局部部位是引起炎症的关键^[3]。而这一过程主要由细胞因子介导,并通过级联反应形成复杂的细胞因子网络,促进炎症进一步发展^[4]。TNF- α 作为免疫反应和炎症反应的重要递质,可调节机体的免疫功能,并参与炎症多方面病理变化^[5-6]。当 TNF- α 过度表达时,动物可出现慢性炎症并逐步形成肺气肿样损伤^[7]。IL-10 是天然免疫过程中重要的负调节因子,具有广泛的抗炎作用,能够抑制 TNF- α 的产生^[8]。本实验通过 ELISA 法研究发现,与对照组比较,模型组大鼠的血清细胞因子 TNF- α 表达量显著增高以及 IL-10 表达量显著降低($P < 0.05$),因而抗炎可能是治疗肺气肿的一个重要途径。

目前西医治疗肺气肿的目标主要是延缓肺气肿的发展,发挥机体的代偿能力,改善呼吸功能,但肺气肿一旦形成,肺组织的破坏是不可逆的难以修复,因此西医治疗十分有限。而中医能够从根本上控制病情,延缓疾病的进展,而且具有多途径、多靶点以及毒副作用小的特点,因而只要辨证得法,用药准

确,疗效是显著的^[9-10]。本实验证实,复方丸剂如意定喘丸能够明显的提高肺气肿模型大鼠的血氧分压以及降低二氧化碳的分压值;明显增加血清中 IL-10 的表达量以及降低 TNF- α 得表达量;同时,如意定喘丸各剂量组的肺泡扩张,肺泡间隔断裂及肺泡融合等情况均得到了显著的改善。

综上所述,如意定喘丸对肺气肿大鼠的肺气肿症状具有明显的改善作用,且可能与保护肺泡间隔相关,具体保护机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Mahadeva R, Shapiro S D. Animal models of pulmonary emphysema [J]. *Curt Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 46(6): 671.
- [2] 刘治,王秀杰. 中医治疗肺气肿[J]. *中国伤残医学*, 2010, 18(4): 65.
- [3] Wiedermann F J, Mayr A J, Hohiseh H P, et al. Association of endogenous G-CSF with anti-inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Interferon Cytokine Res*, 2003, 23(12): 729.
- [4] 卫张蕊,周国锋. 炎症细胞和细胞因子在肺纤维化中作用的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(Suppl): S 85.
- [5] Takabatake N, Nakamura H, Abe S, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patient with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 116(4pt): 1182.
- [6] Bach P B, Brown C, Gelfand S E, et al. Management of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a summary and appraisal of published evidence [J]. *Ann Intern Med*, 2001, 134(7): 604.
- [7] Fujita M, Shannon J M, Irvin C G, et al. Over expression of tumor necrosis factor-alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(1): L45.
- [8] 姚婷,王慧娟,秦浚川,等. 巨噬细胞集落刺激因子和白细胞介素-10 对人外周血单核巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-8 的相互作用[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2002, 22(5): 362.
- [9] 易桂生. 中医辨治慢性阻塞性肺气肿 48 例[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(5): 101.
- [10] 李艳. 中医中药治疗慢性阻塞性肺疾病的临床探讨[J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(5): 183.

[责任编辑 聂淑琴]