

# 芪蛭皱肺胶囊对弹性蛋白酶活性的抑制作用

李金田, 李娟, 刘永琦  
(甘肃中医学院, 甘肃兰州 730000)

**摘要:**目的: 观察纯中药制剂芪蛭皱肺胶囊对弹性蛋白酶活性的抑制作用, 探讨其防治慢性阻塞性肺疾病的作用机理。方法: 在复制豚鼠肺气肿的基础上, 应用琼脂弹性蛋白板方法, 观察芪蛭皱肺胶囊治疗后肺气肿豚鼠血清、肺泡灌洗液对弹性蛋白酶活性的抑制作用。结果: 通过体外实验证明芪蛭皱肺胶囊治疗组豚鼠血清、肺泡灌洗液对弹性蛋白酶活性有明显抑制的作用。结论: 抑制弹性蛋白酶活性可能是该制剂对慢性阻塞性肺疾病发挥较好防治作用的机理之一。

**关键词:** 芪蛭皱肺胶囊; 肺疾病; 阻塞性; 弹性蛋白酶

**中图分类号:** R285.5    **文献标识码:** B    **文章编号:** 1005-9903(2003)04-0039-03

慢性阻塞性肺疾病(COPD) 主要因支气管的慢性炎症持续刺激而继发引起的病征, 近年研究表明, 体内弹性蛋白酶及其抑制因子(主要为 $\alpha_1$ -抗胰蛋白酶,  $\alpha_1$ -AT) 平衡系统失衡, 即弹性蛋白酶增多或抑制因子减少时, 是引起 COPD 的主要原因<sup>[1]</sup>。因此, 若能较好地抑制弹性蛋白酶活性, 则不失为阻止慢性阻塞性肺疾病发生和发展的一种方法。动物实验证实, 应用弹性蛋白酶抑制剂可明显减轻弹性蛋白酶引起的肺气肿病变程度<sup>[2]</sup>。但迄今为止, 尚未找到一种理想的弹性蛋白酶抑制剂用于临床慢性阻塞性肺病患者。中药复方芪蛭皱肺胶囊具有益气培元、活血化瘀、瘪皱肺胀之功, 经临床及动物实验研究表明, 该制剂对慢性阻塞性肺疾病有较好的防治作用<sup>[3]</sup>。本实验采用琼脂弹性蛋白板的方法, 观察纯中药制剂芪蛭皱肺胶囊对弹性蛋白酶活性的抑制作用。

## 1 材料与方方法

**1.1 试剂与药品** 弹性蛋白酶(ELASTASE), 由上海北中达医学应用研究所提供, 批号 30J4178。芪蛭皱肺胶囊, 主要由黄芪、党参、麦冬、五味子、枳实、丹参、水蛭等组成, 甘肃神龙药业有限公司及甘肃中医学院药物制剂教研室加工。

**1.2 琼脂弹性蛋白板的制备** 将琼脂、弹性蛋白、十二烷基硫酸钠叠氮钠溶于 0.05M TriS-HCl 缓冲液(pH7.60) 中, 100 水浴中煮 15min。溶液中含 1% 琼脂 0.08% 弹性蛋白 0.02% 十二烷基硫酸钠 0.08%

叠氮钠。待冷却至 70~80 时, 将配好的溶液倾入直径为 80cm 的玻璃平皿中, 每个平皿注 10ml。置 4℃ 冰箱内 12h, 临用前打成直径 4mm 的孔。

**1.3 动物分组** 将体重 380±20g 的豚鼠 48 只(雌雄各半, 由卫生部兰州生物制品研究所提供) 随机分为正常对照组、肺气肿模型组、阳性药物治疗组、芪蛭皱肺胶囊小剂量治疗组、芪蛭皱肺胶囊中剂量治疗组、芪蛭皱肺胶囊大剂量治疗组 6 组。

**1.4 肺气肿模型复制及给药方法** 按参考文献方法复制豚鼠肺气肿模型<sup>[4]</sup>, 超声波雾化吸入 0.85% NaCl 0.0ml/只·d; II、III、IV、V、VI 组均吸入 0.85% NaCl 稀释为 3mg/ml 的弹性蛋白酶 1.0ml/只·d, 各组均吸入 1 次。21d 后, IV、V、VI 组分别灌胃芪蛭皱肺胶囊液 2.30g/Kg、3.45g/Kg、4.60g/Kg, III 组灌胃等体积氨茶碱及先锋 VI(分别按 0.12g/Kg、0.03g/Kg 服用), I、II 组灌服等体积生理盐水, 以上均每天 1 次, 连续灌胃 4 周。

**1.5 血清及肺泡灌洗液的收集** 实验结束后, 用戊巴比妥钠腹腔麻醉, 心尖部取血 3ml, 静置 2h 以上, 3500r/分离心 20min, 收集血清备用。开胸取出肺脏, 分离左肺, 将一特制顶端膨大的注射器针头置入左主支气管中, 结扎。每次用 1.0ml 生理盐水进行支气管肺泡灌洗, 共 5 次。灌洗液在 1500r/分离心 10min 后收集上清备用。制备血清备用。

**1.6 实验动物血清抑制弹性蛋白酶活力的测定** 将各实验组血清、肺泡灌洗液各 10 $\mu$ l 分别加入琼脂弹性蛋白板孔内; 同时各取 5 $\mu$ l 与 5 $\mu$ l 浓度为 0.2mg/ml 的弹性蛋白酶溶液混匀后, 亦分别加入琼脂弹性蛋白板孔内, 每组加 7 个孔。每一平皿内均设一酶

对照孔(单纯加 0.1mg/ml 的弹性蛋白酶溶液, 每孔 10 $\mu$ l)。37 温箱中温育 24h 后取出, 加 33% 乙酸中止反应, 测量各孔溶解环直径。

1.7 统计学分析 采用 SPSS for Windows 10.0 进行数据分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

2.1 实验豚鼠血清对体外弹性蛋白酶活性的抑制作用 单纯向琼脂弹性蛋白板孔内加入血清时无溶解环出现。当向孔内同时加入血清和弹性蛋白酶溶液后, 各孔周围均出现了溶解环, 正常对照组溶解环明显小于弹性蛋白酶液对照孔 ( $P < 0.01$ ), 肺气肿模型组溶解环明显大于正常对照组及弹性蛋白酶液对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 肺气肿模型豚鼠经药物治疗后溶解环较模型组明显缩小 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 并且芪蛭皱肺胶囊大剂量组与正常对照组相比无明显区别 ( $P > 0.05$ )。

2.2 实验豚鼠肺泡灌洗液对体外弹性蛋白酶活性的抑制作用 单纯向琼脂弹性蛋白板孔内加入肺泡灌洗液时无溶解环出现。当向孔内同时加入肺泡灌洗液和弹性蛋白酶溶液后, 各孔周围均出现了溶解环, 正常对照组溶解环明显小于弹性蛋白酶液对照孔 ( $P < 0.05$ ), 肺气肿模型组溶解环明显大于正常对照组及弹性蛋白酶液对照组 ( $P < 0.01$ ), 肺气肿模型豚鼠经药物治疗后溶解环较模型组明显缩小 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 豚鼠血清和肺泡灌洗液对体外弹性蛋白酶活性的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	血清	灌洗液 (cm)
酶对照孔	1.10 $\pm$ 0.08	1.10 $\pm$ 0.08
健康对照组	0.89 $\pm$ 0.11**	0.99 $\pm$ 0.12*
肺气肿模型组	1.21 $\pm$ 0.06* $\Delta\Delta$	1.25 $\pm$ 0.09** $\Delta\Delta$
阳性药物组	1.09 $\pm$ 0.11 $\Delta\#$	1.14 $\pm$ 0.13
中药小剂量组	1.13 $\pm$ 0.13	1.16 $\pm$ 0.12 $\Delta\Delta$
中药中剂量组	1.06 $\pm$ 0.14 $\Delta\#\#$	1.13 $\pm$ 0.10 $\#$
中药大剂量组	0.98 $\pm$ 0.10 $\Delta\#\#$	1.04 $\pm$ 0.11 $\#\#$

注: 与酶对照孔比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与正常组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与模型组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

## 3 讨论

COPD 是一组以气道不可逆性阻塞, 并伴有肺间质破坏、气腔扩大为特征的疾病。弹性蛋白酶是一种蛋白水解酶, 对肺间质, 特别是对弹力纤维具有降解作用, 在慢性阻塞性肺疾病的发生、发展中起重要作用。弹性蛋白酶主要来源于中性白细胞, 肺泡巨

噬细胞、支气管上皮细胞亦可分泌弹性蛋白酶<sup>[5]</sup>。研究证实, 给动物气管内一次性滴入或雾化吸入适量的弹性蛋白酶液, 可形成实验性肺气肿<sup>[6-7]</sup>。临床观察亦发现, 慢性阻塞性肺疾病患者肺泡灌洗液和血清中弹性蛋白酶活性明显增强<sup>[8]</sup>。应用弹性蛋白酶抑制剂后, 可明显减轻实验动物气道内滴入弹性蛋白酶引起的肺气肿病变<sup>[2]</sup>。因此检测慢性阻塞性肺疾病患者弹性蛋白酶活性及寻找抑制该酶的理想药物具有重要意义。

COPD 属于中医学“痰饮”、“虚喘”、“肺胀”等范畴, 中医辨证多属本虚标实、气虚血瘀, 以正气虚弱为本, 痰饮、血瘀、气滞等邪实为标, 其治则宜益气培元、活血化瘀、瘪皱肺胀。芪蛙皱肺胶囊主要由黄芪、党参、麦冬、丹参等药物组成, 黄芪补气固表, 丹参能活血祛瘀、破瘀除痕, 党参能补中益气、健脾益肺。现代药理学研究证实黄芪、党参均具有调节免疫、清除自由基等功效; 党参还能保护肺上皮细胞和毛细血管内皮细胞, 使气体通过气-血屏障的弥散基本正常; 丹参可抑制弹性蛋白酶活力, 保护弹力蛋白免受弹性酶的破坏, 预防弹性酶引起的实验性肺气肿, 降低肺损伤支气管肺泡清洗液中 LDH、白蛋白、过氧化脂质含量, 保护肺泡 II 型上皮细胞, 加快损伤肺组织的修复, 减轻或预防呼吸窘迫综合症的病变和发生<sup>[9]</sup>; 诸药合奏益气培元、活血化瘀、瘪皱肺胀之功, 研究表明该制剂对豚鼠肺气肿模型血 ET、NO 水平具有明显调节作用<sup>[10]</sup>。我们采用琼脂弹性蛋白板的方法, 进一步观察了芪蛙皱肺胶囊对弹性蛋白酶活性的抑制作用。

琼脂弹性蛋白板法是一种简便且又敏感用于测定弹性蛋白酶活性的方法。其原理是将底物弹性蛋白与琼脂混合后铺板, 琼脂起一种支持物的作用。当弹性蛋白酶分解底物弹性蛋白后, 即出现透明区, 其大小与酶分解弹性蛋白的量呈正相关。十二烷基硫酸钠具有增强弹性蛋白酶活性, 并使透明区边缘清晰的作用。叠氮钠是一种防腐剂, 利于标本长期保存。温育结束后, 立即加入乙酸, 可终止分解反应继续进行。在琼脂弹性蛋白板上溶解环边缘清晰, 与未被分解的乳白色琼脂弹性蛋白板区域形成较为鲜明的对比。这就提示琼脂弹性蛋白板法是测定弹性蛋白酶活性的一种切实可行的方法。并且 Senior 等应用琼脂弹性蛋白板法研究了弹性蛋白酶的活性, 结果证明琼脂弹性蛋白板上的溶解环大小与酶活性呈正相关<sup>[11]</sup>。

本实验结果发现,将正常对照组豚鼠血清加入琼脂弹性蛋白板孔中时,未见溶解环出现。此说明正常血清中弹性蛋白酶含量或活性较低,不足以引起弹性蛋白的溶解;也可能与正常血清中弹性蛋白酶抑制因子( $\alpha_1$ -AT)含量较高,从而抑制了弹性蛋白酶活性有关。当向血清中加入等体积的浓度为0.2mg/ml的弹性蛋白酶后,即可见溶解环出现,但溶解环小于弹性蛋白酶对照孔,表明正常血清中含有一定量的弹性蛋白酶抑制因子,抑制了体外弹性蛋白酶的活性。肺气肿模型豚鼠血清组溶解环大于弹性蛋白酶对照孔及正常血清对照组,表明模型豚鼠血清弹性蛋白酶及其抑制因子( $\alpha_1$ -AT等)平衡系统失衡,弹性蛋白酶活性升高或抑制因子减少;而应用芪蛭皱肺胶囊治疗后,特别是芪蛭皱肺胶囊大剂量组与正常对照组相比无明显区别( $P > 0.05$ ),提示药物治疗后豚鼠血清,抑制了病理损伤时弹性蛋白酶活性的过度升高。说明应用芪蛭皱肺胶囊对豚鼠肺气肿进行治疗有较好的调节血清弹性蛋白酶及其抑制因子( $\alpha_1$ -AT等)系统的平衡,抑制血清中弹性蛋白酶活性的作用。

将正常对照组豚鼠肺泡灌洗液加入琼脂弹性蛋白板孔中时,亦未见溶解环出现。表明正常情况下肺泡灌洗液中弹性蛋白酶含量或活性较低,弹性蛋白酶及其抑制因子系统处于平衡状态。当向肺泡灌洗液中加入等体积的浓度为0.2mg/ml的弹性蛋白酶后,即可见溶解环出现。肺气肿模型豚鼠肺泡灌洗液中弹性蛋白酶活性明显升高,应用芪蛭皱肺胶囊治疗后,治疗组溶解环较模型组缩小,弹性蛋白酶活性较模型组明显下降,提示治疗组肺脏弹性蛋白酶及其抑制因子平衡系统失衡同样得以纠正。说明应用芪蛭皱肺胶囊对豚鼠肺气肿进行治疗亦可有效抑制肺泡灌洗液中弹性蛋白酶的活性过度升高。

综上所述,芪蛭皱肺胶囊对肺气肿豚鼠血清及肺泡灌洗液中弹性蛋白酶活性的过度升高均具有较明显的抑制作用。提示调节弹性蛋白酶及其抑制因子( $\alpha_1$ -AT等)系统的平衡,抑制弹性蛋白酶活性的过

度升高作用,可能是芪蛭皱肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病发挥较好防治作用的机理之一。根据“弹性酶及其抑制因子平衡”学说,研究中草药防治肺气肿具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] 叶任高. 内科学[M]. 第五版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 15.
- [2] Shinguh Y, Yamazaki A, Inamura N, et al. Biochemical and pharmacological characterization of FR 134043, a novel elastase inhibitor[J]. Eur J Pharmacol. 1998, 345(3): 299-308.
- [3] 李金田, 刘永琦, 李娟. 芪蛭皱肺胶囊对肺气肿动物模型血清NO的影响[J]. 新中医, 2002, (11): 76.
- [4] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1997. 214.
- [5] Knight KR, Burdon JG, Cook L, et al. The proteinase anti-proteinase theory of emphysema: a speculative analysis of recent advances into the pathogenesis of emphysema[J]. Respirology, 1997, 2(2): 91-95.
- [6] 高和, 纪树国, 沈丽英, 等. 运动锻炼对弹性蛋白酶诱导大鼠肺气肿的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21(12): 714.
- [7] 张宏, 斯勤, 陈祥银, 等. 中药814对地鼠实验性肺气肿的保护作用[J]. 浙江中西医结合杂志, 2001, 11(4): 214.
- [8] Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, et al. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema[J]. Eur Respir J, 1998, 12(5): 1033-1039.
- [9] 王浴生, 邓文龙, 甄春生. 中药药理与应用[M]. 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 190-562.
- [10] 李金田, 李娟, 刘永琦. 芪蛭皱肺胶囊防治肺气肿的实验研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(5): 598.
- [11] Senior RM, Huebner PF, Pierce JA. Measurement of elastase activity by elastin agar and its use in the detection of antitrypsin deficiency. J Lab Clin Med. 1971. 77(3): 510-516.