

复方当归贝母苦参不同给药方式对早期慢性阻塞性肺病小鼠模型的药效学评价

葛婷^a, 甘礼社^a, 陈金杰^a, 宋顺德^b, 章哲文^b, 莫建霞^a, 汤慧芳^b, 周长新^{a*} (浙江大学, a.药学院, b.医学院, 杭州 310058)

摘要: 目的 观察复方当归贝母苦参气雾和灌胃给药方式对吸烟致慢阻肺模型小鼠的影响, 对其药效进行评价, 并对其作用机制进行剖析讨论。方法 收集了肺泡灌洗液(BALF)和肺组织, BALF 进行细胞分类计数及细胞因子测定。取肺组织做组织切片进行 HE 染色, 观察炎症细胞状况。取左上肺提取 mRNA 进行 KC、Muc5AC 的检测。结果 与模型组对比, 复方灌胃和气雾组均能减轻肺组织病理切片上的炎症细胞浸润, 其中气雾组较灌胃组缓减轻效果更明显; 与模型组相比, 灌胃和气雾给药均能显著降低 KC、MIP-2 含量及 Muc5AC 的 mRNA 表达; 另外气雾组还可显著降低 TNF- α 含量及 KC 的 mRNA。结论 复方当归贝母苦参气雾给药较灌胃给药对吸烟模型小鼠的肺部炎症反应、黏液分泌具有更强的抑制作用, 其作用机制可能与气雾给药降低 TNF-a 的含量及 KC 的 mRNA 表达更明显有关。

关键词: 复方当归贝母苦参; 气雾给药; 慢性阻塞性肺病

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)07-0964-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.07.007

引用本文: 葛婷, 甘礼社, 陈金杰, 等. 复方当归贝母苦参不同给药方式对早期慢性阻塞性肺病小鼠模型的药效学评价[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 964-968.

Evaluation of Chinese Classic Herbal Formula Danggui-beimu-kushen by Aerosol and Oral Administration on Chronic Obstructive Pulmonary Mice Model

GE Ting^a, GAN Lishe^a, CHEN Jinjie^a, SONG Shunde^b, ZHANG Zhewen^b, MO Jianxia^a, TANG Huifang^b, ZHOU Changxin^{a*} (Zhejiang University, a.College of Pharmaceutical Sciences, b.School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of different formulation (aerosol and oral) of Chinese classic formula Danggui-beimu-kushen on chronic obstructive pulmonary(COPD) murine model and to study its mechanisms. **METHODS** The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were collected. Differential WBC count and content of cytokine(KC, MIP2, TNF- α) in BALF, HE staining for lung biopsy, KC and Muc5AC mRNA expression of lung and content in BALF were determined. **RESULTS** Both the gavage and aerosol groups decreased infiltration of the inflammatory cells than that of the control group, moreover, the aerosol group showed better effect than that of gavage group. The gavage and aerosol groups could further decrease the content of KC, MIP-2 and mRNA expression of Muc5AC. In addition, aerosol group could substantially suppress the content of TNF-a and inhibited mRNA expression of KC. **CONCLUSION** Aerosol formula showed better effect on the pulmonary inflammation and mucus secretion in COPD murine model than that of gavage formula. The mechanism were involved in decreasing TNF- α content, and mRNA expression of KC.

KEY WORDS: formula Danggui-beimu-kushen; aerosol; chronic obstructive pulmonary disease

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有危害性的慢性呼吸系统疾病, 其特征在于持续存在的气流受限, 且呈进行性发展, 常伴有气道和肺对有害颗粒或气体所致慢性炎症反应的加重^[1]。在欧洲, 治疗 COPD 的费用占有所有呼吸系统疾病的 56%^[2]。据调查显示, COPD 在 40 岁以上人群中发病率为 8.2%, 并逐年上升, 2020 年将位居全球死亡缘由

的第 3 位^[3]。2002 年起, 世卫组织将每年 11 月第 3 周的周三定义为世界慢阻肺日。据统计, 在我国, 40 岁及以上人群中, COPD 的患病率已达 9.9%^[4]。目前, 虽然有多种化学药物应用于临床治疗^[5-6], 如糖皮质激素、支气管扩张剂、磷酸二酯酶-4 抑制剂、黏液溶解剂、抗氧化剂等, 但治疗效果有限, COPD 仍被认为是不能够完全治愈的疾病^[1]。由于其病程长, 化学药物昂贵且疗效有限, 加上

基金项目: 浙江省中医药管理局重点项目(2012ZZ009)

作者简介: 葛婷, 女, 硕士生 Tel: 18257169770 E-mail: 737799101@qq.com *通信作者: 周长新, 男, 博士, 副教授 Tel: (0571)88208457 E-mail: zhoucxl0@zju.edu.cn

大多数药物具有一定不良反应,临床上迫切需要新型的 COPD 药物。中药复方医治 COPD 具备疗效确切、治疗时间短、不良反应小等特点^[7-8]。

COPD 的病因主要包括中心细胞炎症,小气道的细支气管周围炎和纤维化引起气道重构,腺病毒感染等^[9],与中性粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞有关,其中炎症趋化因子在免疫炎症反应中意义重大。目前广泛认为 COPD 是以气道、肺实质和肺血管的慢性炎症为特征的,在肺的不同部位,肺泡巨噬细胞、T 淋巴细胞和中性粒细胞会有所增加,其释放的生物活性物质在不同环节可促进气道慢性炎症的发生和发展,其中,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种广泛的前炎症细胞因子,可促进炎症细胞趋化和活化,破坏气道结构,它在 COPD 的发病过程中起着关键作用,而黏蛋白 5AC(mucin5AC, Muc5AC)是一种主要的黏蛋白基因,已证实在 COPD 患者气道中是增加的^[10]。角蛋白趋化因子(keratinocyte chemoattractant, KC)和巨噬细胞炎症蛋白 2 (macrophage-inflammatory protein 2, MIP-2)是 CXC 类趋化因子中的重要成员^[11]。这些趋化因子和蛋白基因的表达水平反映了机体炎症情况。

中药复方由于多种成分的协同作用,可作用于 COPD 发病的多个靶点或环节,较化学药物相比具有明显的优势。“当归贝母苦参丸”方为《金匱要略》所载经方,主治妇人产后小便不畅。现代药理学研究表明,该方中的当归挥发油具有较好的平喘、治疗支气管哮喘的作用^[12];贝母是国家批准的止咳化痰保健食品^[13],其中的贝母生物碱具备镇咳、祛痰、平喘等活性^[14];另外,苦参生物碱具有平喘、抗肿瘤、免疫调节等药理功效^[15]。本课题组前期观察了中药复方当归贝母苦参提取物对吸烟致小鼠 COPD 模型的影响,结果显示该复方对 COPD 具备较好的疗效。基于前期的工作基础^[16-17]。本实验继续研究该复方不同给药方式的药效结果,通过比较分析灌胃及气雾 2 种不同给药方式对吸烟模型小鼠的炎症及趋化因子的影响,进而评估复方对 COPD 的医治作用,为进一步将该复方开发成治疗 COPD 的新型中药制剂提供参考。

1 材料

1.1 动物

清洁级(Grade II)C57BL/6 小鼠,体质量(20 \pm 2)g,♂,由上海斯莱克实验动物有限责任公

司提供,实验动物质量合格证:SCXK(沪)2012-0002。本次实验中所有的操作和实验流程均符合《实验动物管理条例》,日照周期由人工照明控制,每天日照 12 h(早 8 点到晚 8 点),夜照 12 h(晚 8 点到早 8 点)。

1.2 药品与试剂

当归油、贝母总生物碱和苦参总生物碱的复方药物由本实验室制备,浓度为 10 mg·mL⁻¹;复方气雾剂由本实验室自制,每揆平均含药量为 0.5 mg^[16],地塞米松注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:061007,规格:5 mg·mL⁻¹);香烟(Marlboro,焦油 12 mg,烟碱 0.9 mg);无水乙醇、丙二醇(药用级,天津市永大化学试剂有限公司);吐温-80(药用级,上海凌峰化学试剂有限公司);TNF- α 、KC、MIP-2 ELISA 试剂盒(Duaset, R&D Systems,批号分别为 840143, 840171, 840135)。

1.3 仪器

ELX800UV 酶标仪(美国 Bio-tek instrument INC);BX51 型光学显微镜(日本 Olympus);纯水仪(美国 Labconco);FA1104 型和 JY6001 型电子天平(上海天平仪器厂);AG245 型精密天平(瑞典 Mettler Toledo);百瑞压缩雾化吸入机(PARI BOY N 085,德国百瑞有限公司);低温冰箱(美国 Forma Scientific)。模型制备仪器为实验室自制,包括烟室、真空泵、燃烟器。

2 方法

2.1 分组

将 C57BL/6 小鼠分成 5 组,每组 10 只:①模型组;②复方灌胃组(100 mg·kg⁻¹);③复方气雾组(100 mg·kg⁻¹);④地塞米松组(阳性对照,5 mg·kg⁻¹, ip);⑤空白对照组。除空白对照组外各组小鼠进行连续 4 d 的烟雾暴露,每一天暴露前后 30 min 分别给药,模型组和空白对照组给予同等剂量的生理盐水。

2.2 小鼠吸烟模型的制备

参照文献方法^[18],在自制的包括烟室、真空泵、燃烟器的设备中,使用香烟使小鼠连续暴露于烟雾中 4 d,温度维持在 25 °C 左右。第 1 天每半天(4 h)各使用 2 包(40 支)万宝路香烟进行烟雾暴露;第 2 天和第 3 天每半天各使用 3 包(60 支)香烟进行暴露;第 4 天每半天各使用 4 包(80 支)香烟进行暴露。每包香烟烟雾暴露持续 20 min,

同时进行通风。香烟的具体暴露情况为每次 1 支,由燃烟器自动吸,中间无间隔,小鼠每笼 5 只放在吸烟室(体积约 200 cm×200 cm×50 cm),烟全部吸完再放置 20 min,烟雾暴露期间小鼠活动减少,身体蜷缩。最后一次香烟烟雾暴露 15 h 后对实验动物进行处理。空白组使用空气进行暴露。

2.3 对吸烟模型小鼠的影响

最后一次给药结束 15 h 后,取左下肺做组织切片进行苏木精-伊红染色(HE 染色),观察炎症细胞情况。取肺泡灌洗液(BALF)进行相关表达量检测。取左上肺提取信使 RNA(mRNA)进行 KC、Muc5AC 的检测。

2.3.1 石蜡切片制作及 HE 染色 取置于 10% 的福尔马林溶液中进行固定的部分左肺组织,常规脱水、透明、浸蜡、包埋。切片厚度 5 μm,常规脱蜡、脱水、透明,苏木精染色 30 s,自来水冲洗 1 min,伊红着色 10 s,再进行常规脱水、透明,最后滴加中性树胶封片。光学显微镜下观察吸烟引起的巨噬细胞、中性粒细胞聚集的影响。

2.3.2 BALF 中 TNF-α、KC、MIP-2 的表达量测定 采用 ELISA 法测定。采用 Duoset 试剂盒(R&D Systems),按说明书操作。采用全自动酶标仪在 450 nm 波长下进行测定(操作时间控制在 5 min 以内),记录测量结果并进行分析。

2.3.3 总 RNA 的提取和 RT-PCR 采用 Trizol 试剂一步法提取左上肺组织总 RNA。取左上肺组织在 1 mL Trizol 裂解液,使蛋白和 RNA 分离,离心,取上清加入氯仿,振荡,4 °C 离心,小心取出无色上清,加入异丙醇沉淀 RNA,离心。小心去上清,沿壁加入 75%乙醇 1 mL,4 °C,7 500 r·min⁻¹离心,弃去上清室温干燥沉淀,加 RNAase 水溶解 RNA 沉淀。取 RNA 样品稀释 100 倍,在 260 nm 和 280 nm 测 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值以判断 RNA 的纯度和浓度。半定量 PCR 中,取 4 μg RNA 逆转录成互补脱氧核糖核酸(cDNA),以此为模板进行荧光定

量 PCR 扩增,将目的基因与内参照 β-actin 的比值作为其 mRNA 表达水平的指标;定量 PCR 中,检测 CT 值,将目的基因与内参照 β-actin 的比值作为其 mRNA 表达水平的指标,引物详见表 1(引物均由上海生工生物技术有限公司合成)。

2.4 统计学处理

数据均用 Graphpad prism V5.0 处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间和组内差异比较选用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 β-actin 和 Muc5AC 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of β-actin and Muc5AC

名称	序列
Muc5AC-F	AAAGACACCAGTAGTCACTCAGCAA
Muc5AC-R	CTGGGAAGTCAGTGTCAAACCA
β-actin-F-F	CTGTCCTGTATGCCTCTG
β-actin-R-R	ATGTCACGCACGATTTC
KC-F	CACCCTCTGTACCTGCTCAA
KC-R	ATGGCGCTGAGAAGACTTGGT

3 结果

3.1 病理切片

吸烟模型组小鼠肺组织的病理切片结果表明肺部有明显炎症细胞浸润,可见大量的淋巴细胞、单核细胞及中性粒细胞。复方灌胃组的肺组织中炎症细胞数量有所减少,复方气雾组减少效果更为明显,与地塞米松组相当。提示气雾给药较灌胃给药能更有效减轻肺部炎症。见图 1。

3.2 复方气雾给药对 COPD 小鼠模型 BALF 液中细胞因子的影响

COPD 模型组肺泡灌洗液的 KC、MIP-2 及 TNF-α 含量上升,与空白对照组相比,差异极显著(*P*<0.001)。与模型组比较,复方气雾组 KC、MIP-2 和 TNF-α 含量均显著下降,差异具有统计学意义。复方灌胃组 KC 和 MIP-2 含量也显著降低(*P*<0.05),但对 TNF-α 的含量影响不明显。在 TNF-α 的分泌上,复方气雾组的抑制作用甚至优于灌胃组(*P*<0.001)。结果见图 2。提示复方气雾给药可能产生更好的抗炎作用。

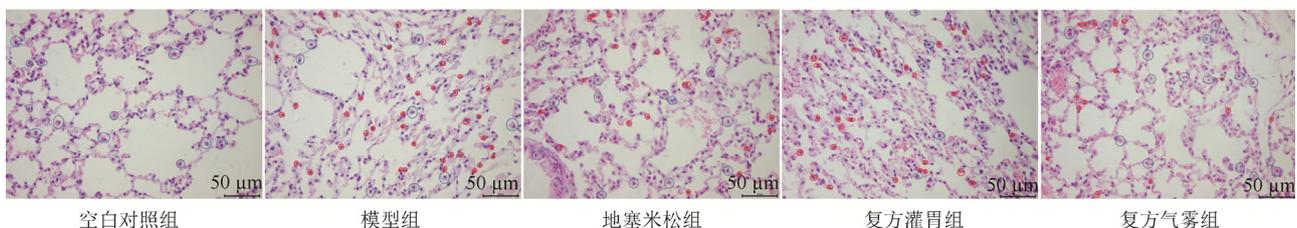


图 1 小鼠肺组织炎症程度比较(400×)

Fig. 1 The changes of inflammation in the lung among groups with aerosol and gavage administration(400×)

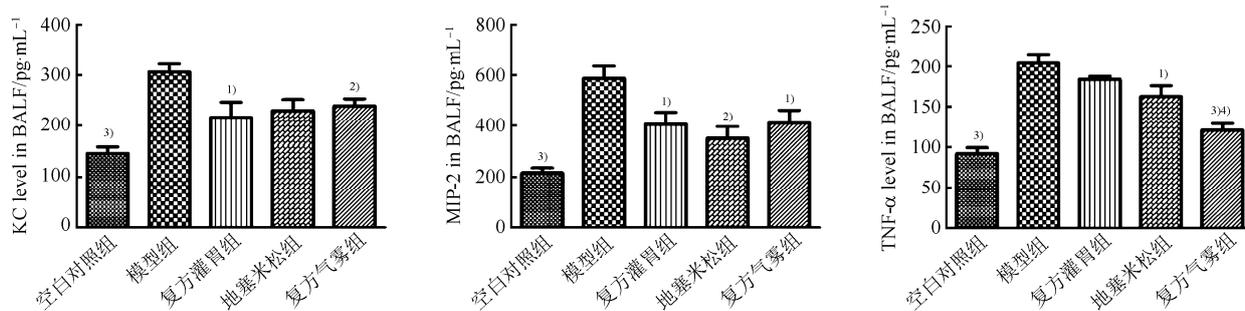


图2 复方气雾及灌胃给药对吸烟模型小鼠 BALF 液中细胞因子分泌影响
与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; 与复方灌胃组比较, ⁴⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 Effect of compound aerosol and gavage on cytokine secretion of mice with smoking
Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with gavage and aerosol group, ⁴⁾ $P<0.001$.

3.3 肺组织 Muc5AC、KC 的 mRNA 表达

模型组的 Muc5AC、KC 表达明显上调, 复方灌胃组和气雾组对 Muc5AC 的 mRNA 表达均有抑制作用, 效果相当; 复方气雾组 KC 的 mRNA 表

达明显降低, 而复方灌胃组和地塞米松组变化不明显, 气雾组和灌胃组比较有显著性差异 ($P<0.05$)。结果见图 3。

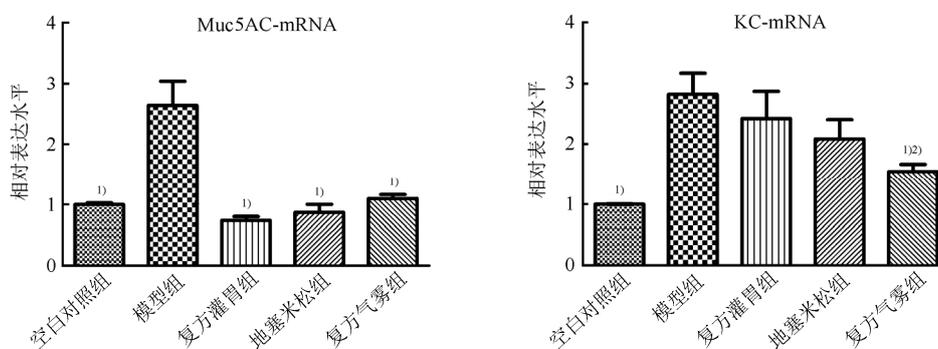


图3 复方气雾及灌胃给药对急性吸烟模型小鼠 Muc5AC、KC 的 mRNA 表达的影响
与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与复方灌胃组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of compound aerosol and gavage on mRNA expression of Muc5AC and KC in mice with acute model of smoking
Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with gavage and aerosol group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

COPD 的发病机制与肺部的中粒细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞等密切相关, 这些是 COPD 发生、发展过程中的重要参数^[19]。其中, TNF- α 是肺部炎症反应过程中产生的重要前炎症因子, 它可以刺激肺内的其他细胞产生更多的炎症因子, 如 MIP-2、KC, 它们对中性粒细胞又具有显著的趋化和活化作用, 从而放大局部的炎症反应^[20-22]。

本实验中使用了 4 d 吸烟制备早期 COPD 模型, 该模型的优点是造模周期短、效率高, 又具有早期 COPD 病变特征, 如 Muc5AC 的增加、趋化因子 KC 分泌增加、中性粒细胞增加等; 缺点是因为造模时间短, 肺部晚期病变如肺气肿、肺纤维化等无法体现^[18]。

本实验结果显示, 通过对吸烟模型组小鼠进

行复方不同方式的给药, 病理切片显示气雾给药对炎症细胞浸润的减轻作用更为显著, 另复方气雾组能显著降低 KC、MIP-2 和 TNF- α 的含量, 特别是前炎症因子 TNF- α 的分泌, 气雾给药的抑制作用甚至优于灌胃组。此外, 该复方灌胃组和复方气雾组对 Muc5AC 的 mRNA 表达均有抑制作用; 比较而言, 复方气雾组的抑制作用更加明显, 本实验设定剂量下的复方气雾组的作用与地塞米松组相当。提示复方气雾给药可有效抑制 COPD 炎症的发生和发展。

综上所述, 复方当归贝母苦参灌胃和气雾给药对吸烟模型小鼠的肺部炎症反应均具有一定的抑制作用, 其作用机制可能与复方降低了细胞因子 KC、MIP-2、TNF- α 的含量及 Muc5AC、KC 的 mRNA 的表达有关。

除此之外,气雾给药治疗炎症的效果比灌胃给药更好,能够降低 TNF- α 的含量及 KC 的 mRNA 表达,可能与减弱巨噬细胞和上皮细胞的炎症反应有关。曾有研究报道^[23],以中药雾化吸入的方式可改善稳定期重度 COPD 患者的肺功能,有效控制气道炎症反应,提高患者生活品质。因此,将该复方制成气雾剂,用于临床治疗 COPD 可能具有较好的前景。

REFERENCES

- [1] AUMANN I, TEDJA L, VON DER SCHULENBURG J M. Experiences of COPD patients with existing smoking cessation programs and their preferences for improvement - a qualitative analysis [J]. *Tob Induc Dis*, 2016, 14(1): 31-42.
- [2] GIBSON G J, LODDENKEMPER R, LUNDBACK B. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book [J]. *Eur Respir J*, 2013, 42(3): 559-563.
- [3] 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(2013 年修订版)[J]. *中国医学前沿杂志*, 2014, 6(2): 67-80.
- [4] BAO H L, FANG L W, WANG L H. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease among community population aged ≥ 40 in China: a Meta-analysis on studies published between 1990 and 2014 [J]. *Chin J Epidemiol*(中华流行病学杂志), 2016, 37(1): 119-124.
- [5] XU S, JIN P F, XU Q L, et al. Advances in the chemical substances illegally adulterated in traditional Chinese medicines and health foods [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2015, 24(16): 1843-1850.
- [6] CAI J Y, XIE X H. Comparison of pharmacotherapies of bronchial asthma and COPD in the latest guidelines [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2016, 36(21): 1897-1900.
- [7] TUO M F, GUO L L, ZHAO B B. Study on the clinical efficacy and economics of intravenous combined with inhalation of tanreqing treatment on moderate and severe acute [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2016, 33(4): 484-488.
- [8] 郭小明. 中药治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期的临床疗效观察[J]. *中外医学研究*, 2015, 13(20), 40-42.
- [9] GAO X. The effect and mechanism of autophagy in virus infection accelerating the process of COPD [D]. University of Zhejiang, 2015.
- [10] ZHOU C N, HAN D E, XU R B. Effects of Shufei Plaster on the expressions of IL-8, TNF- α and mucin MUC5AC in lung tissue of COPD rats [D]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2016, 38(11): 2319-2324.
- [11] CUI W L. Effects of collaborative signal molecule B7-H3 in the expressions of chemokines KC, MIP-2 and TLR-2 in streptococcus pneumococcal meningitis mouse [D]. Soochou University, 2013.
- [12] WANG Z W, SUN S B, WANG Y H. Anti-asthma effects of VOA and its effects on the expression of IL-4 and IFN- γ in a rat asthmatic model [J]. *Immun J*(免疫学杂志), 2013, 29(5): 391-394.
- [13] LIN X, PENG X S. Experimental study on percutaneous absorption of main alkaloids in fritillaria thunbergi in vitro [J]. *Asia-Pacific Tradit Med*(亚太传统医药), 2011, 7(4): 15-18.
- [14] 张勇慧, 阮汉利, 皮慧芳. 湖北贝母生物碱单体的镇咳、祛痰和平喘作用[J]. *中草药*, 2005, 36(8): 1205-1207.
- [15] JI X W, ZHANG G W. Pharmacological effects and clinical applications of sophora alkaloids [J]. *Med Res Edu*(医学研究与教育), 2014, 31(6): 85-88.
- [16] CHEN J J. Studies on homoisoflavonoids and effective fraction of Danggui-beimu-kushen Formula [D]. University of Zhejiang, 2014.
- [17] 刘欣, 王真真, 周长新. 复方哮喘宁滴丸的制备研究[C]. 《中国中药杂志》第九届编委会暨中药新药研发理论与技术创新论坛, 2009: 283-289.
- [18] GUAN Y, LI F F, HONG L. Protective effects of liquiritin apioside on cigarette smoke-induced lung epithelial cell injury [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2012, 26(4): 473-483.
- [19] LIU C C. Macrophage migration inhibitory factor in T cells from induced sputum of patients with COPD [D]. Southern Medical University, 2014.
- [20] WANG P, NIE Q, MA L. The influence of bFGF gene transfected BMSCs on inflammatory cytokines expression of COPD rat [J]. *J Pract Med*(实用医学杂志), 2016, 32(3): 355-358.
- [21] HU W H. Effect of Ailuo Kechuaning on interleukin-8, tumor necrosis factor- α , macrophage inflammatory protein-2 levels and Mucin5AC, aquaporin 5 gene expression in pulmonary Qi deficiency rats with chronic obstructive pulmonary disease [D]. Henan University of Chinese Medicine, 2015.
- [22] DONG X W. Effect of M₃ muscarinic receptor antagonist beacloquodum bromide on airway inflammation and remodeling in mice [D]. Zhejiang University, 2011.
- [23] HUO R L. Effects of Chinese herb inhalation on the treatment of severe chronic obstructive pulmonary diseases in stable phase: a controlled clinical study [J]. *Hebei J Tradit Chin Med*(河北中医), 2016, 38(3): 348-352.

收稿日期: 2016-11-30

(本文责编: 曹粤锋)