

【药效学评价】

润肺止嗽丸对慢性阻塞性肺疾病大鼠细胞凋亡的改善作用及其机制研究

耿立梅^{1,2}, 陈志强^{1,2}, 王亚利², 闫红倩¹

1. 河北省中医院, 河北 石家庄 050001

2. 河北医科大学, 河北 石家庄 050001

摘要: **目的** 研究中成药润肺止嗽丸对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠细胞凋亡的影响,并探讨其作用机制。**方法** 32只雄性Wistar大鼠随机分为对照组、模型组、润肺1月和3月组;使用烟熏联合气道滴入脂多糖法制备COPD大鼠模型;润肺1、3月组ig给予润肺止嗽丸0.9 g/kg,每天给药1次,分别连续给药1、3个月,对照组和模型组给予等体积的超纯水1个月;HE染色观察慢阻肺大鼠肺组织变化;TUNEL法检测凋亡细胞并计算凋亡指数(AI);Elisa法检测肺泡灌洗液(BALF)中血管内皮生长因子(VEGF)水平;Western blotting法检测肺组织中VEGF和血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)的蛋白表达。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠肺组织形态病变明显;AI显著升高;BALF中VEGF、肺组织中VEGF和VEGFR2水平均显著下降。与模型组比较,润肺1月和3月组肺组织形态明显好转;AI显著下降;BALF中VEGF、肺组织中VEGF和VEGFR2水平显著升高;且润肺3月组效果好于1月组。**结论** 润肺止嗽丸可以改善慢阻肺细胞凋亡,机制可能与上调VEGF和VEGFR2相关。

关键词: 润肺止嗽丸;慢阻肺;细胞凋亡;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体2

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)04-0487-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.04.009

Effect of Runfei Zhisou Pills on cell apoptosis in rats with chronic obstructive pulmonary disease

GENG Li-mei¹, CHEN Zhi-qiang^{1,2}, WANG Ya-li¹, YAN Hong-qian¹

1. Hebei Provincial Hospital of traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050001, China

2. Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050001, China

Abstract: **Objective** To study the effect of Runfei Zhisou Pills (RZP) on cell apoptosis in rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and its mechanism. **Methods** Totally 32 male Wistar rats were randomly divided into control group, model group, 1-month RZP group, and 3-month RZP group. Rats in 1-month and 3-month RZP group, received RZP of 0.9 g/kg once daily for 1 and 3 months respectively, and rats in control and model groups received water with equal volume for 1 month. The rat COPD model was established using tobacco smoke combined with intratracheal instillation of LPS. Morphological changes of lung tissue in COPD rats were observed with HE staining under light microscope. The VEGF levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA. The VEGF and VEGFR2 protein expression in lung tissues was measured by Western blotting. Cell apoptosis in lung tissues was detected with TUNEL method, and apoptosis index (AI) was counted. **Results** Compared with control group, the pathological changes of lung tissue in model group were obvious, the AI significantly increased, VEGF in BALF and VEGF and VEGFR2 in lung tissue decreased significantly. Compared with model group, morphological improvement of lung tissue was obvious, the AI significantly decreased, and VEGF in BALF, VEGF and VEGFR2 in lung tissue increased significantly in 1-month and 3-month RZP groups. **Conclusion** RZP can inhibit cell apoptosis of COPD, and the mechanism may be related with up-regulation of VEGF and VEGFR2.

Key Words: Runfei Zhisou Pills; chronic obstructive pulmonary disease; cell apoptosis; vascular endothelial growth factor; vascular epidermal growth factor receptor-2

收稿日期: 2016-12-10

基金项目: 河北省卫生厅基础医学研究专项项目(2014131015)

作者简介: 耿立梅(1964—),女,河北人,教授,博士,研究方向为中西医结合呼吸研究。

Tel: (0311)69095128 13832300950 E-mail: glm2018@126.com

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD, 简称慢阻肺), 是一种严重危害人类健康的常见病、多发病, 严重影响患者的生活质量, 病死率较高, 并给患者及其家庭、社会带来沉重的经济负担^[1]。其发病机制主要与慢性炎症相关, 而伴有吸烟的肺气肿患者其肺组织细胞凋亡数量多于不吸烟患者^[2-3], 因此细胞凋亡在慢阻肺发病机制中发挥着作用。润肺止咳丸是中成药制剂, 临床发现, 可有效改善慢阻肺患者症状、体征。本研究旨在通过炎症及细胞凋亡研究, 探讨其治疗慢阻肺的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 240~260 g, 购自河北医科大学实验动物中心, 生产许可证号 SCXK (冀) 2013-4-002, 自由饮水及进食。

1.2 药物及主要试剂

润肺止咳丸, 购自修正药业有限公司, 批号 130322, 规格: 6 g/丸, 由浙贝、瓜蒌、桔梗、前胡、苦杏仁、紫苏子、紫菀、款冬花、桑白皮、黄芩、知母、淡竹叶、天花粉、地黄、黄芪、甘草、青皮、陈皮、天冬、五味子、酸枣仁药物组成, 执行标准出自《中华人民共和国药典临床用药须知》中药成方制剂卷。

TUNEL 试剂盒, 德国 Boehringer Mannheim 公司; TNF- α 放射免疫分析药盒, 北京华埠力特生物技术有限公司; VEGF 试剂盒, 上海西唐生物科技有限公司; 血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGFR2)、GAPDH 抗体, Santa Cruz Biotechnology, Inc; 香烟, 新石家庄牌, 焦油量 12 mg, 烟气烟碱量 1.0 mg, 烟气一氧化碳量 13 mg, 石家庄卷烟厂。

1.3 实验仪器

自制熏烟箱: 80 cm×60 cm×50 cm 有机玻璃箱; 导烟装置: Longer-Pump 兰格恒流泵有限公司; 酶联免疫检测仪 MK3, 芬兰雷勃公司; 全自动洗板机, 美国 BioTek 公司; DP73 数码显微镜, 日本 Olympus; 超净工作台, 苏州净化设备厂。

2 方法

2.1 实验用药配制

根据润肺止咳丸临床用药剂量, 通过大鼠与人体表面积计算给药量, 大鼠日服润肺止咳丸量为 0.9 g/kg, 超纯水配制相应浓度放 4 °C 冰箱冷藏保存备用。

2.2 动物模型制备与分组

32 只雄性 Wistar 大鼠按照随机数字法分为: 对照组、模型组、润肺 1 月组及润肺 3 月组, 每组 8 只。模型制备: 使用烟熏联合气道滴入脂多糖法^[4]制备 COPD 大鼠模型。气管注入脂多糖: 造模第 1、14 天, 对照组给予气管内滴入超纯水 200 μ L, 其余各组大鼠戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉后, 气管插管滴入脂多糖 (1 g/L) 200 μ L。熏烟: 在造模的第 2~13、15~30 天, 将造模大鼠放入熏烟箱, 每次 15 只香烟, 每天 2 次, 每次 20 min, 两次间隔 4 h。熏烟箱实际熏烟容积为 160 L, 每只香烟约产烟 500 mL, 每次熏烟浓度在 5% 左右。

造模结束后, 润肺 1、3 月组 ig 给予润肺止咳丸 0.9 g/kg, 给药体积 2 mL, 每天给药 1 次, 分别连续给药 1、3 个月。对照组和模型组给予等体积的超纯水。

2.3 实验取材

对照组、模型组、润肺 1 月组在给药第 31 天、润肺 3 月组在给药第 91 天, 取大鼠 8 只, 麻醉, 取心脏血 0.5~1.0 mL/只, 置于血清管中, 2 000 r/min 离心 10 min; 结扎左侧肺叶, 行右肺灌洗后, 反复提取灌洗液, 将收集的液体 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 得肺泡灌洗液 (BALF), 储存在 -80 °C 冰箱备用; 切取部分左下肺组织放于 10% 甲醛溶液内固定 24 h; 剩余左肺叶, 置于冻存管中, 与离心血标本一起置于 -80 °C 低温冰箱中保存。

2.4 HE 染色

将组织包埋切片后通过反复脱蜡、脱水、1% 盐酸乙醇分化、0.2% 稀氨水返蓝、0.5% 伊红液染色继续脱水、脱蜡后, 经苏木精染色, 待分析。

2.5 肺组织细胞凋亡的检测

细胞凋亡的检测按 TUNEL 检测试剂盒步骤操作, 细胞凋亡阳性判断标准: TUNEL 染色后细胞核为棕黄色颗粒证实为凋亡细胞。凋亡指数 (AI) 计算^[5]: 将每张切片在光镜 400 倍视野下随机取 10 个视野, 将 10 个视野的阳性细胞进行百分计数, 取其平均数, 即为 AI。

2.6 肺泡灌洗液 (BALF) 中 VEGF 水平检测

应用 ELISA 法检测 BALF 中 VEGF 水平, 按照试剂盒说明书进行操作。

2.7 Western blotting 法测定肺组织内 VEGF 和 VEGFR2 的蛋白表达

取出约 500 mg 肺组织, 加入 1 mL 提取液进行

匀浆,并于4℃、12 000 r/min离心5 min,取将离心后的上清液,蛋白浓度测定,100℃放置5 min进行蛋白变性;SDS-PAGE凝胶电泳分离,转膜、封闭、孵育VEGF、VEGFR2、GAPDH抗体过夜;洗膜、加入相应二抗,室温孵育1 h;洗膜,使用DAB显色液显色,照相分析,待测蛋白质与内参GAPDH表达量进行对比,表示蛋白质的相对表达水平。

2.8 统计学分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 13.0软件,多组间比较时,满足正态性及方差齐性时采用方差分析,组间两两比较采用 q 检验。两组间比较,满足正态性及方差齐性时采用 t 检验,不满足正态性及方差齐性时,用两个独立样本的非参数检验。

3 结果

3.1 光镜下大鼠肺组织病理形态学观察结果

对照组气管黏膜纤毛排列整齐,未见黏液栓形成,少量炎性细胞,部分细支气管有少量杯状细胞,管壁无增厚、水肿;模型组气管黏膜纤毛变短、排列不齐,管腔内可见淋巴细胞为主的炎性细胞浸润;气道内可见黏液栓形成及炎性细胞浸润,周围肺组织有肺泡扩大,泡壁变薄、断裂;管壁增厚、水肿。润肺1、3月组与模型组比较,肺组织形态有明显的好转。结果见图1。

3.2 TUNEL法标记各组的细胞凋亡情况

对照组可见凋亡细胞少量、散在分布;模型组中有较多的肺组织细胞TUNEL染色阳性;润肺1、3月组则较模型组凋亡细胞减少。结果见图2。

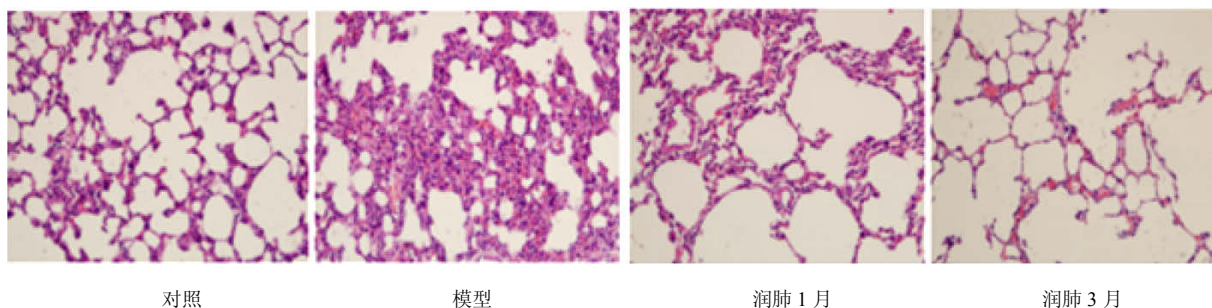


图1 各组大鼠肺组织染色

Fig. 1 Lung tissue of rats in each group

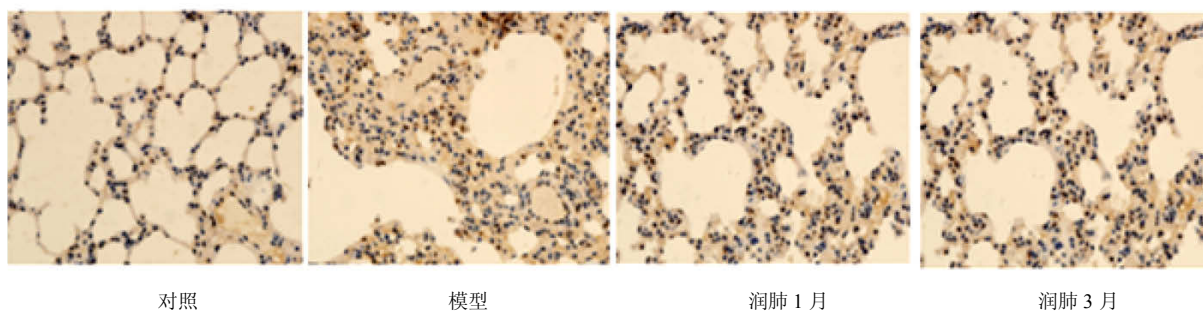


图2 TUNEL标记各组凋亡细胞

Fig. 2 Apoptotic cells found in TUNEL staining of each group

与对照组比较,模型组AI显著升高($P<0.01$);与模型组比较,润肺1、3月组AI均显著降低($P<0.05$);润肺3月组较1月组凋亡指数显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

3.3 BALF中VEGF水平检测

与对照组比较,模型组BALF中的VEGF水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,润肺1、3月组VEGF水平均显著升高($P<0.05$);润肺3月组

较润肺1月组VEGF水平显著增加($P<0.05$)。结果见表2。

3.4 肺组织VEGF和VEGFR2蛋白表达检测结果

与对照组比较,模型组VEGF和VEGFR2蛋白表达降低;润肺1月组和润肺3月组的VEGF和VEGFR2蛋白表达均高于模型组,其中润肺3月组高于1月组。组间数据趋势明显,但因误差较大,没有统计学差异。结果见图3。

表1 各组 AI 比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Comparison on AI of each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AI/%
对照	—	6.84±2.42
模型	—	20.12±4.41 ^{##}
润肺 1 月	0.9	15.07±4.07 [*]
润肺 3 月	0.9	10.66±3.66 ^{*△}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与润肺 1 月组比较: [△] $P<0.05$

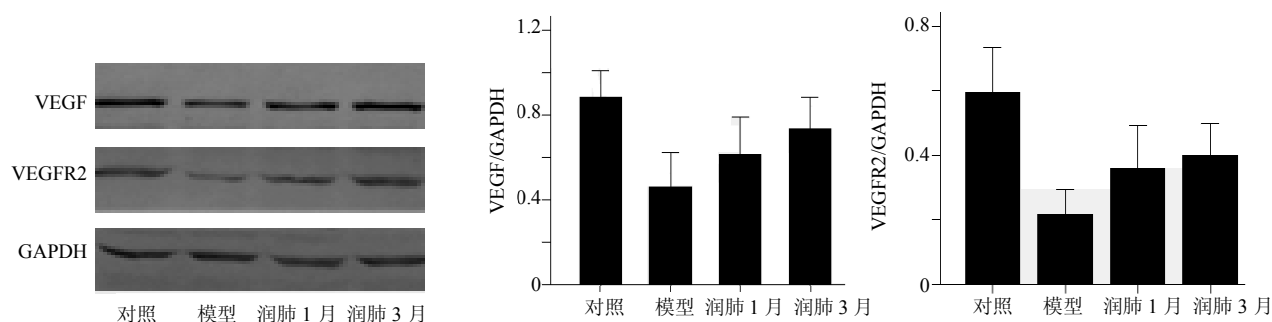
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs 1-month RZP group

表2 各组细胞 BALF 中 VEGF 比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 2 Comparison on VEGF in BALF of each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	VEGF/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	639.79±39.25
模型	—	250.40±31.47 ^{##}
润肺 1 月	0.9	465.76±33.13 [*]
润肺 3 月	0.9	398.21±29.77 ^{*△}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$; 与润肺 1 月组比较: [△] $P<0.05$

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs 1-month RZP group

图3 各组 VEGF、VEGFR2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 3 Comparison on VEGF and VEGFR2 protein in lung tissues of each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

4 讨论

现代研究证实, 细胞凋亡 (apoptosis) 又称“程序性细胞死亡”, 由基因介导的、细胞主动的、有序的死亡^[4]。异常情况下, 细胞凋亡可以导致机体内多细胞平衡紊乱、从而使疾病发生, 因此, 不管是凋亡增加还是减少, 都可能导致机体异常而发病^[5]。Taraseviciene-Stewart 等^[6]为了建立由细胞凋亡所致的大鼠肺气肿模型, 将促凋亡因子注入大鼠腹腔内, 模型复制成功, 说明肺组织细胞凋亡是引起慢阻肺发病机制之一。本实验应用烟熏及气管滴入脂多糖所致的慢阻肺大鼠模型, 证实肺组织中存在细胞凋亡, 且 COPD 模型组凋亡指数明显高于对照组。本实验发现凋亡细胞在光镜下, 表现为细胞皱缩, 核染色质浓集, 边缘化, 呈深棕褐色, 胞核裂解, 含核碎片及凋亡小体等典型的凋亡形态。

文献报道, 使用 VEGF 受体阻滞剂或者 VEGF 基因敲除能使肺泡细胞凋亡增多, 形成肺气肿^[7-9]。在维持肺泡结构方面 VEGF 是不可缺少的, 本实验中, 与对照组比较, 模型组 VEGF 水平显著下降, 细胞凋亡指数显著升高, VEGF 水平与细胞凋亡指数呈负相关性。应用润肺止嗽丸治疗后, 可以提高

VEGF、VEGFR-2 的表达, 增加肺泡灌洗液中的 VEGF 水平, 具有抑制细胞凋亡的作用; 实验证实延长润肺止嗽丸治疗对慢阻肺的改善优于短疗程。

润肺止嗽丸为中成药, 由浙贝、瓜蒌、桔梗、前胡、苦杏仁、紫苏子、紫菀、款冬花、桑白皮、黄芩、知母、淡竹叶、天花粉、地黄、黄芪、甘草、青皮、陈皮、天冬、五味子、酸枣仁药物组成。方中瓜蒌、黄芩、知母、天花粉具有清热化痰、养阴清热功效; 地黄、黄芪、陈皮、天冬、五味子、酸枣仁有补气健脾滋肾功效, 可能与抑制了细胞凋亡有关。总之多药组成的润肺止嗽丸润肺临床治疗慢阻肺有效, 其机制可能与降低细胞凋亡相关。

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(2013 年修订版) [J]. 中国医学前沿杂志, 2014, 2(6): 73-86.
- [2] Kasahara Y, Tudor R M, Cool C D, et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(3 Pt1): 737-744.

- [3] Imai K, Mercer B A, Schulman L L, et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema [J]. Eur Respir J, 2005, 25(2): 250-258.
- [4] 陈益华, 张华杰, 南发俊. Caspases 抑制剂的研究进展 [J]. 生命科学, 2006, 18(3): 247-254.
- [5] 宋 宁, 张聪敏, 石玉珍. COPD 与细胞凋亡 [J]. 国外医学呼吸系统分册, 2001, 21(4): 184-185.
- [6] Taraseviciene-Stewart L, Douglas I S, Nana-Sinkam P S, et al. IS alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease ? [J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(8): 687-690.
- [7] 王悦红, 白春学, 毛 翎, 等. 血管内皮生长因子及其受体在肺气肿患者肺组织中的表达 [J]. 中华内科杂志, 2005, 44(4): 276-279.
- [8] Kasahara Y, Tudor R M, Taraseviciene-Stewart L, et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema [J]. clin Invest, 2000, 106(11): 1311-1319.
- [9] Tudor R M, Fook B E, Voelkel N F. Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/VEGR-2 and Flt in lungs exposed to chronic hypoxia [J]. J Clin Invest, 1995, 95(4): 1798-1807.

(上接第 436 页)

- [6] 王建京, 郭巧珍, 吴纯启, 等. 质量风险管理在新药 GLP 安全性评价研究中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 593.
- [7] OECD. OECD Series on principles of GLP and compliance monitoring number 4 [EB/OL]. (1999-10-26) [2016-11-14]. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(99\)20&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(99)20&doclanguage=en).
- [8] 金 毅. QA 对计算机化系统验证审计重点——数据流认知和控制 [A]//中国毒理学会第七次全国学术大会暨第八届湖北科技论坛 [C]. 武汉: 中国毒理学会. 2015: 104-105.
- [9] ISPE Good Automated Manufacturing Practice 2007. GAMP®5-A Risk Based Approach to Compliant GxP Computerized Systems [EB/OL]. (2008-02-01) [2016-11-14]. <https://www.ispe.org/gamp-5>.
- [10] OECD. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring number 15 [EB/OL]. (2007-06-11) [2016-11-14]. [https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2007\)10](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2007)10).