

- Stem cell transplantation in multiple sclerosis : current status and future prospects [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(5): 247- 255.
- [6] 程建华, 刘双, 韩钊. 姜黄素通过调控 Notch 通路促进大鼠脑缺血后神经干细胞增殖和迁移[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(5): 44- 47.
- [7] 胡建鹏, 周会, 王键, 等. 益气活血方和补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带 Notch- 1 和 Jagged1 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(3): 483- 486.
- [8] 行妍妍, 汪军兵, 谢赛, 等. 姜黄素对放线菌素 D/TNF- α 诱导的 PC12 细胞和大鼠海马神经元损伤的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(10): 1746- 1750.
- [9] He K, Yan L, Pan CS, et al. ROCK- dependent ATP5D modulation contributes to the protection of notoginsenoside NR1 against ischemia/reperfusion- induced myocardial injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 10(1): 572- 581.
- [10] Tetzlaff W, Okon EB, Karimi- Abdolrezaee S, et al. A systematic review of cellular transplantation therapies for spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(8): 1611- 1682.
- [11] Snegovskikh V, Mutlu L, Massasa E. Identification of putative fallopian tube stem cells [J]. *Reprod Sci*, 2014, 21(12): 1460- 1464.
- [12] Sato A, Sunayama J, Matsuda K, et al. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR[J]. *Neurosci Lett*, 2010, 470(2): 115- 120.
- [13] Fujimoto S, Negishi M, Katoh H. RhoG promotes neural progenitor cell proliferation in mouse cerebral cortex[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(23): 4941- 4950.

(责任编辑: 吴凌)

益气化痰方对慢性阻塞性肺疾病小鼠肺功能及 IL-17、TNF- α 的影响

詹少锋¹, 单丽囡², 冯立志²

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 观察益气化痰方对慢性阻塞性肺疾病小鼠的肺功能及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-17 (IL-17) 的影响。方法: 将 60 只 C57BL 小鼠随机分成 6 组, 分别是正常对照组、COPD 模型组、低剂量中药组、中剂量中药组、高剂量中药组、地塞米松组, 每组 10 只。香烟熏染方法建立慢性阻塞性肺疾病小鼠模型, 给药后分别观察小鼠肺功能以及对肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-17 的变化。结果: 与正常对照组相比, COPD 模型组吸气峰流量 (PIF)、呼气峰流量 (PEF) 及每分钟通气量 (MV) 数值均降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 低、中、高剂量的益气化痰方均能明显改善 COPD 小鼠气道的高反应状态, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 COPD 模型组比较, 中、高剂量组肺泡灌洗液中 IL-17 和 TNF- α 逐渐降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 益气化痰方能明显改善 COPD 小鼠的气道高反应, 同时降低气道炎症反应。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病; 益气化痰方; 肺功能; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-17 (IL-17); 动物实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 03-0221-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.03.087

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是我国呼吸系统的常见病、多发病, 患病率居高不下, 目前尚无确切方法阻断慢性阻塞性肺疾病肺功能下降的进程。虽然现代医学治疗方法在本病急性加

重期较为多样化和效果显著, 但从本病全程防治来讲, 中医药疗法仍然有重要的地位和作用。主要体现在稳定期扶助正气, 减少未来急性加重急性发作次数和风险, 提高运动耐量, 减少

[收稿日期] 2015-11-20

[基金项目] 广东省中医药局项目 (20121231); 广州中医药大学邓铁涛基金项目 (25012604)

[作者简介] 詹少锋 (1979-), 男, 医学博士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治慢性阻塞性肺疾病。

合并症和改善生活质量^[1]。本研究从中医学“肺主气”“肺主通调水道”的理论出发,通过观察益气化痰方对肺功能及气道炎症作用,探讨益气化痰方对 COPD 可能的作用机制,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组 60 只 C57BL 小鼠(广州中医药大学实验动物中心),适应性饲养 1 周,随机分为 6 组,每组 10 只,分别为正常对照组, COPD 模型组,低剂量中药组,中剂量中药组,高剂量中药组,地塞米松组。

1.2 试剂 小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (上海依科赛生物制品有限公司)、白细胞介素-17(IL-17)ELISA 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司)。

1.3 方药组成及制备 益气化痰方选自《时氏医道》保元汤:由黄芪、党参、炙甘草组成;合二陈汤(取自《太平惠民和剂局方》):由陈皮、半夏、茯苓组成。具体实验动物用量折算标准如下^[2]:小鼠(20 g)用量 = 中药总量 / 人的剂量 \times 0.0028 = 0.147 g; 0.147/2 mL = 0.735 g/mL, 即为中剂量; 0.147 g/mL 即为高剂量; 0.367 g/mL 即为低剂量。中药煎剂制作过程如下:将上方中药置 8 倍温水中浸泡 0.5 h, 沸腾后文火煎煮 4 h, 注意均匀搅拌, 取汁后经三层纱布过滤; 第 2 次和第 3 次煎煮均分别以 6 倍水文火煎煮 2 h, 同样方法取汁, 合并 3 次药液, 置水浴箱内浓缩。药液常温冷却后, 至 4℃ 冰箱内保存备用。

1.4 COPD 小鼠模型建立 采用熏烟的方法建立小鼠 COPD 模型^[3], 将小鼠置于 PAB-S200 被动吸烟动物染毒系统的染毒箱内, 箱体的顶部有两个 1.5 cm \times 1.5 cm 的小孔, 可以让箱体内空气与箱外保持相通, 有效避免箱内的小鼠因缺氧而导致死亡。点燃 10 根椰树牌香烟(焦油量 12 mg, 烟气烟碱量 1.2 mg, 烟气一氧化碳量 14 mg), 放入染毒箱内, 关闭染毒箱, 1 h 后将小鼠取出, 休息 15 min 后, 再次点燃 10 根香烟, 将小鼠继续放置染毒箱内 1 h。每天熏烟 1 次, 每次 2 h, 每周连续熏烟 6 天, 熏烟 20 周。

1.5 方法 正常对照组小鼠, 正常饲养, 除生理盐水灌胃外, 不加任何其他干预; COPD 模型组小鼠, 按照上述造模方法, 连续熏烟 20 周; 低、中、高剂量中药组小鼠, 按照上述造模方法连续熏烟 4 周, 第 5 周开始, 每天在熏烟前 1 h, 低、中、高剂量中药组小鼠分别按照 0.147 g/mL、0.735 g/mL、0.367 g/mL 的 3 个剂量给予灌胃益气化痰中药汤剂处理, 给药处理一直持续 16 周到实验结束; 地塞米松组小鼠则在熏烟处理的第 5 周开始, 每天在熏烟前 30 min, 按照 10 μ g/10 g 体重的剂量腹腔注射地塞米松剂, 一直持续 16 周到实验结束。

1.6 肺功能检测 小鼠肺功能测定: 采用 Buxco 的非束缚清醒动物全身体积描记系统检测各组小鼠的肺功能, 具体检测指标为吸气峰流量(peak inspiratory flow, PIF)、呼气峰流量(peak expiratory flow, PEF)及每分钟通气量(minute volume,

MV)。

1.7 肺泡灌洗液检测 小鼠支气管肺泡灌洗液(Bronchial Alveolar Lavage Fluid, BALF)的收集及处理: 用细棉线在左肺门根部结扎左侧肺叶。在胸部切口处向上沿正中中线剪开颈部皮肤, 钝性分离软组织, 暴露气管, 在甲状腺位置做 T 型切口切开气管, 用头皮留置针的塑料管做气管插管, 用注射器吸取 PBS 溶液 0.5 mL 通过插管缓慢注入右肺, 可见右侧肺部逐渐膨胀, 颜色由暗红色变成粉白色, 待所有 PBS 注入完毕, 轻轻按摩肺部, 10 s 后回抽液体, 重复此过程 2 次, 回收率在 80% 左右, 回抽的液体放入 1.5 mL 无菌 EP 管中, 1500 rpm, 离心 10 min, 将上清转移到 EP 管, -80℃ 冷冻保存。

2 统计学方法

数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS16.0 统计软件包统计分析。不同组间比较采用 One-way ANOVA 进行方差分析。

3 结果

3.1 基本情况 在建模开始前, 模型组和对照组小鼠体质量差异无统计学意义($P > 0.05$), 建模开始后对照组小鼠体质量呈稳定上升趋势, 而建模组小鼠在熏烟开始的第 1 月精神萎靡、厌食水, 体质量进行性下降, 直到 1 月之后才逐渐适应, 体质量缓慢上升, 至建模成功的 6 月后模型组小鼠和对照组小鼠体质量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2 各组小鼠肺功能数值情况比较 见表 1。与正常对照组比较, COPD 模型组 PIF、PEF 和 MV 均降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与 COPD 模型组比较, 低、中、高剂量中药组 PIF, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。低、中、高剂量中药组 PEF 和 MV 比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。地塞米松组 PIF、PEF 和 MV, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺功能数值情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PIF(mL/s)	PEF(mL/s)	MV(mL/s)
正常对照组	10	4.49 \pm 0.23	3.20 \pm 0.15	38.90 \pm 2.39
COPD 模型组	10	2.73 \pm 0.27 ^①	1.83 \pm 0.18 ^①	25.31 \pm 1.99 ^①
低剂量中药组	10	2.97 \pm 0.19 ^②	2.02 \pm 0.16 ^③	29.05 \pm 1.94 ^③
中剂量中药组	10	3.21 \pm 0.23 ^③	2.23 \pm 0.16 ^③	32.33 \pm 1.44 ^③
高剂量中药组	10	3.44 \pm 0.13 ^③	2.48 \pm 0.10 ^③	35.1 \pm 0.86 ^③
地塞米松组	10	2.65 \pm 0.14	1.94 \pm 0.15	25.94 \pm 1.76

与正常对照组比较, ① $P < 0.01$; 与 COPD 模型组比较, ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$

3.3 各组小鼠 BALF 中 IL-17 和 TNF- α 含量情况比较 见表 2。与正常对照组比较, COPD 模型组 BALF 中 IL-17 和 TNF- α , 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与 COPD 模型组比较, 低、中、高剂量中药组及地塞米松组 BALF 中 IL-17, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 中、高剂量中药组及地塞米松组 BALF 中 TNF- α , 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表2 各组小鼠 BALF 中 IL-17 和 TNF- α 含量情况($\bar{x} \pm s$) pg/mL

组别	n	IL-17	TNF- α
正常对照组	10	18.96 \pm 5.81	22.05 \pm 4.33
COPD模型组	10	158.81 \pm 20.30 ^①	151.22 \pm 30.00 ^①
低剂量中药组	10	121.08 \pm 18.00 ^②	123.11 \pm 22.79
中剂量中药组	10	98.00 \pm 12.69 ^②	92.80 \pm 15.56 ^②
高剂量中药组	10	66.22 \pm 13.03 ^②	53.94 \pm 15.51 ^②
地塞米松组	10	40.81 \pm 10.15 ^②	37.86 \pm 10.69 ^②

与正常对照组比较, ① $P < 0.01$; 与 COPD 模型组比较, ② $P < 0.01$

4 讨论

慢性阻塞性肺疾病是一种气流受限的慢性气道炎症性疾病。有毒颗粒或气体(如香烟烟雾、生物燃料等)刺激支气管黏膜上皮, 募集中性粒细胞、巨噬细胞等天然免疫细胞, 并进一步激活获得性免疫细胞, 天然免疫与获得性免疫协同作用, 造成持续的炎症损伤与异常修复, 从而造成不可逆性气流受限, 导致黏液高分泌状态^[2]。目前认为, COPD 的发病是由遗传、环境、感染及免疫等多因素相互作用所致, 已知气道免疫系统异常所致的炎症反应在 COPD 发病中起着重要作用, 其中细胞炎症因子是多种气道类疾病如哮喘、COPD 和肺部感染的重要介质之一。研究发现, Th17 细胞及其分泌的细胞因子 IL-17 在 COPD 发病机制中发挥着关键调控作用^[4]。

IL-17 具有强大的致炎和免疫趋化的作用, 能够诱导早期炎症发生, 使气道中性粒细胞募集和活化增强, 促进气道炎症的发生^[5]。IL-17 还可协同活化的巨噬细胞产生 TNF- α , 进一步放大炎症反应, 刺激支气管上皮杯状细胞与黏膜下腺体使黏液分泌增加, 导致气流受限, 从而在气道重塑中发挥作用^[6]。研究发现, 在 COPD 小鼠模型的 BALF 及肺组织中 IL-17 浓度较正常组升高, 且肺组织中 IL-17 的浓度与 BALF 的中性粒细胞百分比呈正相关^[7]。使用 IL-17 气道给药刺激后, 支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞的绝对数量增加, 但以 IL-17 中和抗体预处理的小鼠组肺灌洗液中中性粒细胞绝对数量则显著减少。IL-17 是中性粒细胞强效的活化剂, 研究发现 IL-17 能够上调趋化因子的表达升高, 招募中性粒细胞和炎症因子到达靶部位, 从而造成感染部位的组织破坏^[8]。本研究结果提示, 益气化痰方能够降低 COPD 小鼠 BALF 的 IL-17、TNF- α 的含量, 减轻 COPD 小鼠肺组织病理损害, 保护肺通气功能。随着炎症指标的改善, 益气化痰方可以降低 COPD 小鼠肺通气功能 PIF、PEF 和 MV 数值, 从而改善 COPD 小鼠气道的气流受限状态。

根据 COPD 的中医病因病机特点, 外邪袭肺或痰浊阻肺, 引发咳嗽, 久咳久喘必伤肺气, 肺气耗伤, 宣肃无力, 通调失

司, 又致痰浊内生, 如此肺虚与痰浊互为因果, 往复无端循环, 迁延不愈, 故气虚痰阻贯穿整个疾病过程。肺胀病既是肺气虚痰阻的结果, 又是再致肺气耗伤的直接原因。因此, 益气化痰方治疗肺之本虚兼以痰阻标实, 有利于肺气的恢复。

综上所述, 通过对 COPD 中西医学特点的剖析, 探讨益气化痰中药对 COPD 小鼠模型气道炎症、气道高反应性的调节作用, 深入挖掘中医药疗法的优点, 并结合现代医学进行研究作用机制, 为中医“肺主气”“肺主通调水道”理论与益气化痰治法的科学内涵提供实验依据。同时这对于发挥中医药治疗优势, 提高本病的防治效果有着重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] 杨峰, 敖素华. 中医药对慢性阻塞性肺疾病气道粘液高分泌粘蛋白 Muc5ac 的影响研究概况[J]. 四川中医, 2012, 30(8): 157-159.
- [2] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [3] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志, 2000, 39(8): 51-52.
- [4] Vazquez-Tello A, Halwani R, Hamid Q, et al. Glucocorticoid receptor- β up-regulation and steroid resistance induction by IL-17 and IL-23 cytokine stimulation in peripheral mononuclear cells [J]. J Clin Immunol, 2013, 33(2): 466-478.
- [5] Park SJ, Lee KS, Kim SR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation[J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3259-3267.
- [6] Grine L, Dejager L, Libert C, et al. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17 [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2015, 26(1): 25-33.
- [7] Lu XX, McCoy KS, Hu WK, et al. Dexamethasone reduces IL-17 and Tim-3 expression in BALF of asthmatic mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013, 33(4): 479-484.
- [8] Zhang JQ, Lao QF, Chu SY, et al. [Interleukin-17 expression and significance in normal lung function smokers and chronic obstructive pulmonary disease patients][J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2010, 90(20): 1431-1435.

(责任编辑: 刘淑婷)