河车虫草胶囊对慢性阻塞性肺疾病大鼠肿瘤坏死因子-α 蛋白表达的影响

董克州　朱益敏

摘要　目的　观察慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)大鼠肺组织中肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)蛋白的表达及中药复方河车虫草胶囊对其干预的效果及机制。**方法**　采用熏烟加气道内注入脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的方法制备 COPD 大鼠模型。将造模成功的 40 只 SD 大鼠按随机数字表法分为模型组、对照组、河车虫草胶囊低、中、高 3 个剂量组(简称河车低、中、高剂量组)每组 8 只,同时设正常组(6 只),共 6 组。河车低、中、高剂量组分别灌胃给予河车虫草胶囊(0.25、0.5、1.0 g/kg)联合茶碱缓释片(4.5 mg/kg),对照组灌胃给予茶碱缓释片(4.5 mg/kg),1 次 1 mL/100 g,1 天 1 次,共 4 周;同时正常组和模型组予等量蒸馏水。电镜下观察各组 COPD 大鼠肺组织形态学的变化;Real-time RT-PCR 法检测肺组织中 TNF-α 蛋白表达情况。**结果**　电镜下可见模型组支气管上皮纤毛排列紊乱,Ⅰ、Ⅱ型肺泡上皮细胞变性,内质网线粒体肿胀,板层小体排空,肺泡腔内游离碎片,各药物干预组较模型组病变程度减轻,其中河车中剂量组改善较明显。与模型组比较,各药物干预组 TNF-α 蛋白表达量均降低,以河车中、低剂量组更为明显($P<0.05$, $P<0.01$);与对照组比较,河车低、中剂量组 TNF-α 蛋白表达量均降低($P<0.05$)。**结论**　河车虫草胶囊能有效调节 COPD 大鼠 TNF-α 蛋白的表达,抑制气道炎症反应。

关键词　河车虫草胶囊;慢性阻塞性肺疾病;肿瘤坏死因子-α

Effect of Heche Chongcao Capsule on Expression of TNF-α Protein in Rats with Chronic Obstructive Pulmonary Disease　DONG Ke-zhou and ZHU Yi-min　*Department of Respiratory Medicine, Second Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210000), China*

ABSTRACT　**Objective**　To observe the expression of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) protein in the lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and to evaluate the intervention and mechanism of Heche Chongcao Capsule (HCC). **Methods**　The COPD rat model was prepared by exposure to cigarettes smoke plus intratracheal injecting lipopolysaccharide (LPS). Forty successfully modeled SD rats were randomly divided into the COPD model group, the control group, the low dose HCC group, the medium dose HCC group, and the high dose HCC group, 8 in each group. Meanwhile, a normal control group consisting of 6 rats was also set up. HCC at 0.25, 0.5, and 1.0 g/kg was administered to rats in the 3 dose HCC groups respectively by gastrogavage combined with Theophylline Sustained Release Tablet (TSRT). Rats in the control group were administered with TSRT by gastrogavage at 4.5 mg/kg, 1 mL/100 g each time, once daily. All medication lasted for 4 successive weeks. Equal volume of distilled water was administered by gastrogavage to rats in the COPD model group and the normal control group. Morphological changes of the lung tissue were observed under microscope. The expression of TNF-α protein in the lung tissue were also detected using Real-time PCR. **Results**　Under electron microscope, the cilium in the tracheal epithelium was disorderly arranged, type Ⅰ and Ⅱ alveolar cells were degenerated, endoplasmic reticulum and mitochondria were swollen, the lamellar body was

基金项目:江苏省中医药局科技项目(No. LZ09077)
作者单位:江苏省第二中医院呼吸科(南京 210000)
通讯作者:朱益敏, Tel:025-83291153, E-mail: dongfei713@126.com
DOI: 10.7661/CJIM.2014.11.1342

中国中西医结合杂志

emptied, and free fragment could be seen inside alveolar space. Compared with the model group, all lesions were somewhat ameliorated in all medicated groups, especially in the medium dose HCC group. Compared with the model group, the expression of TNF-α protein decreased in all medicated groups, especially in the medium and low dose HCC groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the control group, the expression of TNF-α protein decreased in the medium and low dose HCC groups ($P<0.05$). Conclusion HCC could effectively regulate the expression of TNF-α protein and inhibit airway inflammation reaction in COPD rats.

KEYWORDS Heche Chongcao Capsule; chronic obstructive pulmonary disease; tumor necrosis factor-alpha

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种具有气流受限特征的可以预防和治疗的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与肺部对香烟烟雾等有害气体或颗粒的异常炎症反应有关[1]。由于其患病人数多,病死率高,社会经济负担重,已成为一个重要的公共卫生问题。积极探索应用中医中药治疗 COPD 对于降低病死率、减轻社会负担具有重要的意义。目前普遍认为气道炎症是 COPD 发病的中心环节。在肺的不同部位有肺泡巨噬细胞、T 淋巴细胞和中性粒细胞增加,激活的炎性细胞可释放肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等多种炎性介质。这些炎性介质能破坏肺的结构和促进中性粒细胞炎症反应。本实验通过观察肺组织中 TNF-α 蛋白在 COPD 大鼠肺组织中的表达及中药复方河车虫草胶囊对 COPD 大鼠气道炎症的干预作用,为其在临床中的进一步应用提供理论和实验依据。

材料与方法

1 动物 46 只健康 SD 大鼠,清洁级,雄性,体重(250 ±30)g,鼠龄 12 周,由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(苏)2010 -0007。

2 药物 河车虫草胶囊粉末由紫河车 30 g 红参 30 g 参三七 30 g 蛤蚧 2 对 鹿角霜 20 g 川贝 30 g 虫草菌丝 30 g 组成,江苏省第二中医院药剂科加工。茶碱缓释片:0.1g/片,北京紫竹药业有限公司提供,批号为 1006302。

3 主要试剂及仪器 LPS(美国 Sigma 公司,批号:L2332);TRIzol Reagent(美国 Invitrogen 公司,批号:AE9033);焦碳酸二乙酯(DEPC)(美国 BBI 公司,批号:D5752);SYBR Green PCR Master Mix Kit(美国 Applied Biosystems 公司);逆转录酶、随机引物、dNT(南京基天生物技术有限公司);氯仿、异丙醇、无水乙醇,均为市售分析醇;TNF-α、18 s 引物(上海普飞生物技术有限公司设计合成)。造模用大前门香烟(上海卷烟厂);自制熏烟箱(体积 60 cm ×40 cm ×35 cm);JEM-1230 透射电子显微镜(日本电子株式会社);5701 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);FSH-2A 可调高速匀浆机(江苏金坛医疗仪器厂);752 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);PTC100 多功能基因扩增仪(美国 MJ 公司);ABI7000 荧光定量分析仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

4 实验方法

4.1 模型制备 参照宋一平等[2]烟熏加气道内注入脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的造模方法。40 只大鼠在实验的第 1、14 天上午称重后,用 4% 水合氯醛按 0.4 mL/100 g 行腹腔注射麻醉。麻醉后仰卧位将大鼠固定在操作板上,将耳镜深入口腔在灯光的照射下以深入暴露声门,用静脉穿刺针套管(长度 7.2 cm,内径 0.1 cm)代替气管导管沿耳镜镜头中央紧贴咽上壁插入气道,将注有 LPS 溶液(0.2 mg/0.2 mL)的 1 mL 注射器接在套管上,将溶液 0.2 mL 注入气道内,立即直立动物并旋转,使药液在动物肺内分布均匀。清醒后随意进食,于实验的第 14 天按上法再次注入 LPS。首次气道内注入 LPS 后,次日始每日上午予熏香烟,第 2 次注入 LPS 当天不熏香烟,共熏 28 天。熏烟方法:除正常组外将其余各组大鼠置于自制的熏烟箱内(体积 30 cm ×40 cm ×60 cm,容积 72 L),箱壁留有 1.5 cm 的通气孔,将剪掉滤嘴后的大前门牌香烟点燃后接于烟嘴上,用 100 mL 注射器连续吸入香烟烟雾并注入熏烟箱内,每箱 4 支,持续熏烟 30 min。40 只大鼠均造模成功。

4.2 动物分组及干预方法 将造模成功的 40 只 SD 大鼠按随机数字表法分为模型组、对照组、河车虫草胶囊低、中、高剂量组(简称河车低、中、高剂量组),每组 8 只,同时设正常组(6 只),共 6 组。根据药物临床用量,按大鼠与人的体表面积比计算大鼠的用药量[3],各组大鼠灌药剂量为:河车低、中、高剂量组分

别予河车虫草胶囊 0.25、0.50、1.00 g/kg 联合茶碱缓释片 4.5 mg/kg（中药分别相当于成人用量的 5、10、20 倍，茶碱缓释片相当于成人用量的 2.5 倍）；对照组予茶碱缓释片 4.5 mg/kg；同时正常组和模型组灌胃给予等量蒸馏水。灌胃前用蒸馏水将河车虫草胶囊配置成混悬液，河车低、中、高剂量组配制浓度分别为 25、50、100 mg/mL。将茶碱缓释片研成粉末配置成浓度为 0.45 mg/mL 的混悬液。首次气道内注入 LPS 后，次日起每天下午 15:00 按上述浓度分别给予各药物干预组大鼠灌胃，灌胃量 1 mL/100 g，1 天 1 次，第 2 次注入 LPS 当天不灌胃，共 28 天；模型组和正常组则予等量蒸馏水灌胃。实验第 31 天称重大鼠，用 4% 水合氯醛按 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉，取部分右肺下叶组织，用 2% 戊二醛固定，按常规方法制成超薄切片，待病理组织电镜观察。取右肺中叶组织 0.2 g，于液氮内速冻 5 min，然后置于 −80 ℃ 冰箱保存待检。

5　观察指标及检测方法

5.1　肺组织形态学变化　采用电镜观察。固定好的标本经磷酸缓冲液冲洗（pH 7.4，0.1 mol/L，4 ℃）3 次，每次 15 min，置入 0.1% 四氧化锇液中，4 ℃温度下固定 2 h，0.1 mol/L（pH 7.4）的 PB 缓冲液冲洗 3 次，每次 10 min，标本经梯度乙醇逐级脱水至环氧丙烷.每个梯度 20 min，用环氧树脂浸透包埋，制备成超薄切片，经醋酸双氧铀和枸橼酸染色后，JEM-1230 透射电子显微镜观察肺泡上皮细胞、线粒体、内质网等情况。

5.2　大鼠肺组织中 TNF-α 蛋白的表达（表 1）　采用 Real-time RT-PCR的检测方法。以 18 s 为内参，检测肺组织中 TNF-α mRNA 的表达。TRIzol 法抽提组织总 RNA，逆转录 RT-PCR 步骤严格按照试剂盒说明书进行。RNA 定量：用 DEPC 水溶解 RNA 沉淀至 40 μL。取 10 μL 稀释 100 倍至 1 mL，用 752 紫外分光光度计测量 OD_{260} 与 OD_{280} 值，以 OD_{260}/OD_{280} 比值确定 RNA 的完整性与纯度，以 OD_{260} 值确定 RNA 的量并稀释到终浓度为 0.5 μg/μL。RT 反应：以 1 μg 大鼠肺组织 Total RNA 为模板进行逆转录反应，分别加入各试剂使反应体系总体积为 25 μL，加液均在冰上进行，加液结束稍离心后置于反转录仪上进行逆转录反应，反应条件为 42 ℃，10 min，1 个循环；95 ℃，10 min，1 个循环。反应结束将逆转录反应产物保存于 −20 ℃ 冰箱内。PCR 扩增：取实时荧光定量 PCR 反应专用管放置好后置冰上分别加入相应剂量 0.01% DEPC 水、上下游引物，再在避光条件下加入 SYBR Green PCR Master Mix，最后加入 2 μL 逆转录产物，小心混匀后置于 PCR 仪上进行实时荧光定量 PCR 反应。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法分析各组 TNF-α 基因表达的差异，以正常对照组作为参照因子，其余各组基因的数量用相对于参照因子基因表达的倍数来表示。

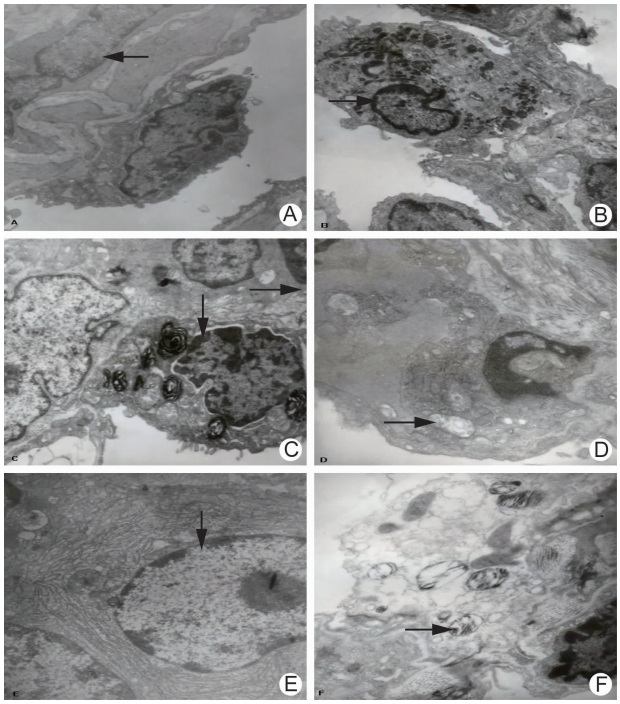
表 1　目的基因引物序列

基因	引物序列	产物长度（bp）
TNF-α	上游：F5′-CCTCAGGAACGGGACTCGAA-3′ 下游：R5′-ATGTACACCAAGTCGGTAGCACCA-3′	86
18 s	上游：F5′-TACCACATCCAAAGAAGGCAG-3′ 下游：R5′-TCGATCCCGAGATCCAACTAC-3′	92

6　统计学方法　数据采用 SPSS 13.0 软件处理，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本比较采用单因素方差分析，两两比较采用 *LSD* 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1　各组肺组织形态学电镜观察（图 1）　正常组支气管上皮排列正常，无线粒体肿胀及空泡变，Ⅰ型、Ⅱ型肺泡上皮细胞正常，板层小体无排空现象；模型组可见支气管上皮纤毛脱失、排列紊乱。线粒体肿胀，嵴

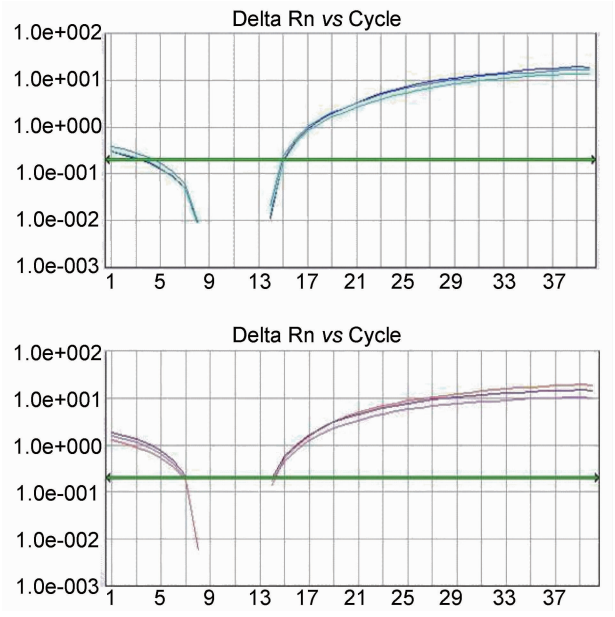


注：A 为正常组；B 为模型组；C 为对照组；D 为河车低剂量组；E 为河车中剂量组；F 为河车高剂量组；箭头所指为阳性区域

图 1　各组大鼠肺组织形态学电镜观察图（醋酸双氧铀和枸橼酸双重染色，A、D、E、F，×12 000；B，×8 000；C，×10 000）

断裂、消失，空泡变，内质网扩张，核固缩。Ⅰ型细胞肿胀，杯状细胞分泌增加。Ⅱ型细胞变性板层小体排空，内质网线粒体肿胀，肺泡腔内游离碎片。改变符合 COPD 病理学特征。对照组和河车低、中、高剂量组病理改变较模型组均有一定改善，其中河车中剂量组改善更为明显，可见正常的Ⅰ型或Ⅱ型肺泡上皮细胞，线粒体肿胀和空泡变不是很明显，炎症细胞浸润亦减轻。

2 肺组织中 TNF-α 蛋白的表达情况（图 2，表 2）通过Real-time RT-PCR 法对内参及目的基因进行扩增，分别得到了 18 s 和 TNF-α 的扩增曲线，曲线光滑。各组大鼠肺组织目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析：与模型组比较，河车各剂量组和对照组 TNF-α 蛋白表达量均降低，其中河车中、低剂量组更为明显（$P<0.05$，$P<0.01$）；与对照组比较，河车中、低剂量组 TNF-α 蛋白表达量亦降低（$P<0.05$）。



注：A 为 18 s 实时荧光定量 PCR 扩增曲线；B 为 TNF-α 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

图 2 实时荧光定量 PCR 扩增曲线图

表 2 各组大鼠肺组织 TNF-α 蛋白表达量比较

组别	n	TNF-α CT（$\bar{x}\pm s$）	18 s CT（$\bar{x}\pm s$）	ΔCT	$2^{-\Delta\Delta CT}$
正常	6	24.69 ±3.67	19.18 ±6.12	5.51	—
模型	8	24.29 ±3.76	20.93 ±8.86	3.36	4.44
对照	8	20.21 ±2.29	16.08 ±2.05	4.13	2.60 *
河车低剂量	8	20.47 ±2.06	15.82 ±2.01	4.65	1.82 ** △
河车中剂量	8	24.35 ±4.31	19.65 ±6.86	4.70	1.75 ** △
河车高剂量	8	20.21 ±2.26	15.97 ±2.03	4.24	2.41 *

注：与模型组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$；与对照组比较，△ $P<0.05$

讨 论

近年来研究表明，炎症细胞被激活并聚集在局部部位是引起炎症反应的关键，而这一过程由相关细胞因子介导[4]。TNF-α 是近年研究较多的一种细胞因子，主要由单核/巨噬细胞产生，具有重要的抗感染及介导炎症反应的生物学活性，常与其他细胞因子共同参与机体的生长发育和维持内环境稳定[5]，同时又可诱导其他炎症因子的释放，从而加重炎症反应[6]。TNF-α 具有多种前炎症介质的功能，在 COPD 气道炎症中，TNF-α 产生增多可刺激中性粒细胞产生黏附分子增加，从而有利于中性粒细胞在血管壁的黏附，而中性粒细胞在 IL-8 和白三烯 B_4（LTB_4）等趋化因子的趋化下向肺组织迁移，在迁移过程中，中性粒细胞呼吸爆发释放的炎性颗粒及氧化产物进一步导致肺组织损伤[7]。

中医学认为 COPD 以肺肾亏虚为本，痰浊瘀血为标，虚实夹杂，相兼为病。依据“治病求本”的治疗原则，以扶正为先，而扶正以补肺纳肾为主，则作用专一，针对性强，佐以祛痰活血治标之品，则作用更加全面。河车虫草胶囊由紫河车、虫草菌丝、红参、蛤蚧、鹿角霜、参三七、川贝组成。紫河车、虫草菌丝补益肺肾、纳气平喘合而为君，红参、蛤蚧、鹿角霜补肺肾、定喘嗽共用为臣，佐以参三七祛瘀生新，川贝母止咳化痰。纵观全方药少力专，扶正为主，兼顾祛邪，作用全面。

从河车虫草胶囊组方来看，其寒温并用，扶正基础上兼具止咳化痰、祛瘀生新之功，切合 COPD“肺肾亏虚、痰瘀阻滞”的病理特征。结合现代药理，该药的作用是多方面的。研究显示冬虫夏草具有显著的抗氧化作用，能有效阻止阻塞性肺气肿病理改变的进一步发展，并在一定程度上抑制肺功能的进行性恶化和改善通气功能[8]。紫河车能显著增加小鼠负荷游泳时间，具有明显的抗疲劳作用，能显著延长小鼠耐缺氧时间，提高机体的血氧利用率，降低机体耗氧量，从而增强机体对缺氧状态的耐受性[9]。三七中主要药理成分为三七总皂甙、人参皂甙，有较强改善血瘀模型大鼠血液“浓、黏、凝、聚”状态的能力，使血瘀大鼠低切全血黏度、红细胞压积显著降低，并可使红细胞变形性增大，并有类似人参样的抗疲劳，耐缺氧，增强机体非特异性抵抗力的作用[10]。川贝母主要成分为生物碱及皂甙类，其中贝母总碱部分具有显著的镇咳作用，总皂甙部分则有明显的祛痰作用[11]。

TNF-α 基因位于第 6 号染色体的短臂上，与主要组织相容性复合物基因组相关联，正常中性粒细胞内

仅有少量 TNF-α 蛋白表达，而在 LPS 刺激下，TNF-α 蛋白表达量迅速增加[12]。在本实验研究中，TNF-α 蛋白在模型组中表达量明显增加，各药物干预组与模型组比较有不同程度的降低，以河车中、低剂量组较为明显。研究表明，TNF-α 可直接作用于上皮细胞，引起气道黏液细胞增生，高分泌，导致肺气肿和肺泡胶原细胞沉积、细胞器的破坏，直接参与 COPD 的气道重塑[13]，在 COPD 的发病过程中起着非常重要的作用[14]。通过病理组织透射电镜观察本研究发现，河车虫草胶囊能够显著改善 COPD 大鼠肺组织的病理改变，其中以河车中剂量组更为明显，可见正常的肺泡上皮细胞，线粒体肿胀和空泡变不是很明显，炎症细胞浸润亦有所减轻。因此推测中药复方河车虫草胶囊通过降低 TNF-α 蛋白的表达，抑制炎症细胞浸润及细胞器的降解和破坏，保护肺组织，对气道炎症起到一定的抑制作用。需要说明的是在实验过程中，由于部分客观原因，投入的标本量有限，本次实验结果仅能做为河车虫草胶囊对 COPD 大鼠 TNF-α 蛋白表达影响的初步观察，具体机制还有待于进一步深入研究。

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]. 中华结核和呼吸杂志，2013，36(4)：255 -264.

[2] 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)：556 -557.

[3] 张元沛主编. 药理学实验[M]. 北京：人民卫生出版社，1996：238.

[4] Moermans C, Heinen V, Nguyen M, et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Cytokine, 2011, 56(2): 298 -304.

[5] Ko FW, Leung TF, Wong GW, et al. Measurement of tumor necrosis factor-alpha, leukotriene B4, and interleukin 8 in the exhaled breath condensate in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2009, 4(1): 79 -86.

[6] 王丽，谭焰，谷伟，等. 慢性阻塞性肺病缓解期患者血清中 TNF-α、IL-6 和 IL-8 表达的研究[J]. 临床肺科杂志，2011，16(6)：835 -836.

[7] Nogrera M, Batle S, Miralles C, et al. Enhanced neutrophil response in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Thorax, 2001, 56(6): 432 -437.

[8] 廖东江，卢心鹏，赵瑾，等. 人工冬虫夏草在大鼠慢性阻塞性肺疾病中的治疗作用和机制研究[J]. 国际呼吸杂志，2012，32(13)：969 -973.

[9] 章生银. 紫河车对小鼠学习记忆的影响[J]. 上海实验动物科学，2001，21(1)：45 -46.

[10] 郑颖，徐治国. 人参与三七的药效学比较研究[J]. 中药药理与临床，2000，16(5)：22 -24.

[11] 王天志，杜蕾蕾，王曙. 川贝母的研究进展[J]. 华西药学杂志，2001，16(3)：200 -203.

[12] 池信锦，程南，黑子清，等. 双异丙酚预处理对内毒素诱导的人中性粒细胞释放白细胞介素 -8 和肿瘤坏死因子-α 及相应 mRNA 表达的影响[J]. 中国急救医学，2010，30(1)：65 -68.

[13] Sulkowska M, Sulkowski S, Terlikowski S, et al. Tumor necrosis factor-alpha induce emphysema-like pulmonary tissue rebuilding: changes in type Ⅱ alveolar epithelial cells [J]. Pol J Pathol, 1997, 48(3): 179 -188.

[14] Hacievliyagil SS, Mutlu LC, Temel L, et al. Airway inflammatory markers in chronic obstructive pulmonary disease patients and healthy smokers [J]. Niger J Clin Pract, 2013, 16(1): 76 -81.

（收稿：2013 -06 -12　修回：2014 -07 -24）

中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志　中国中西医结合杂志