

痰热清注射液对慢性阻塞性肺疾病大鼠 支气管上皮多药耐药相关蛋白 1 水平的影响

黄燕玲 罗光伟 杨硕

(武汉市第一医院呼吸内科, 湖北 武汉 430022)

【摘要】目的 观察痰热清注射液对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠支气管上皮多药耐药相关蛋白 1(MRP1)表达水平的影响,探讨痰热清治疗 COPD 的作用机制。**方法** 选择雄性 Wistar 大鼠 30 只,按随机数字表法分为正常对照组、COPD 模型组和痰热清治疗组,每组 10 只。采用气管内滴入脂多糖(LPS)加香烟烟熏方法复制 COPD 模型,正常对照组不予任何处理。制模后痰热清治疗组尾静脉注射痰热清注射液 2 mL/kg, COPD 模型组和正常对照组则注射 0.9% 氯化钠注射液 2 mL/kg; 各组均连续给药 14 d,然后观察大鼠体质量及呼吸功能,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定肺组织 MRP1 蛋白表达,取肺组织观察大鼠肺组织病理学改变。**结果** 治疗 14 d 后 3 组大鼠体质量均较治疗前增加,但 COPD 模型组增加缓慢且低于痰热清治疗组($g: 247.8 \pm 15.9$ 比 265.4 ± 18.7 , $P < 0.05$)。COPD 模型组 0.3 s 用力呼气容积占用力肺活量的比值(FEV0.3/FVC)较正常对照组明显降低(0.688 ± 0.213 比 0.973 ± 0.052),呼气峰流速[PEF(mL/s): 3.28 ± 0.74 比 4.58 ± 1.48],肺顺应性[Cydn(mL/cmH₂O): 317.1 ± 130.3 比 515.1 ± 140.2]和 MRP1 蛋白水平[吸光度(A)值: 0.698 ± 0.103 比 1.318 ± 0.169]均较正常对照组明显降低,残气容积/肺总量比值(RV/TLC)较正常对照组明显升高(0.502 ± 0.128 比 0.316 ± 0.153);痰热清治疗组 FEV0.3/FVC(0.801 ± 0.142 比 0.688 ± 0.213)、PEF(mL/s: 4.24 ± 0.36 比 3.28 ± 0.74)、Cydn(421.2 ± 342.0 比 317.1 ± 130.3)、MRP1 蛋白(A 值: 0.964 ± 0.095 比 0.698 ± 0.103)均较 COPD 模型组增高, RV/TLC 较 COPD 模型组降低(0.411 ± 0.105 比 0.502 ± 0.128),差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。光镜下可见: COPD 模型组大鼠肺泡壁变薄、断裂,肺泡融合扩大,支气管黏膜大量上皮纤毛脱落、倒伏、粘连,杯状细胞增生,各级细支气管壁可见大量炎性细胞浸润,管腔内有炎性分泌物滞留;痰热清治疗组上述变化较 COPD 模型组有一定程度改善。**结论** 痰热清注射液可能通过增加大鼠支气管上皮细胞中 MRP1 的表达起到有效减轻 COPD 气道炎症、延缓 COPD 肺功能恶化和改善症状的作用。

【关键词】 痰热清注射液; 肺疾病,阻塞性,慢性; 多药耐药相关蛋白 1

Effects of Tanreqing injection on expression levels of multidrug resistance-associated protein 1 in bronchial epithelial cells of rats with chronic obstructive pulmonary disease Huang Yanling, Luo Guangwei, Yang Suo. Department of Respiratory Medicine, Wuhan No.1 Hospital, Hubei 430022, Wuhan, China
Corresponding author: Luo Guangwei, Email: whyyy191@sina.com

【Abstract】Objective To observe the effects of Tanreqing injection on the expression levels of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mRNA in bronchial epithelial cells of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model and to explore the mechanism of Tanreqing for treating COPD. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into normal control, COPD model and Tanreqing treatment groups, 10 rats in each group. The COPD rat model was established with the methods of tracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) and quantitative stimulation with tobacco smoke; no treatment was given to the normal control group. After the model was established, the Tanreqing therapy group was injected with Tanreqing injection 2 mL/kg; the COPD model and the normal control groups were injected with 0.9% sodium chloride injection 2 mL/kg through caudal vein; in each group, the respective agent was administered continuously for 14 days, and then the body mass and respiratory function were observed, the MRP1 protein expression of pulmonary tissue was detected by Western Blot and the pathological changes of rat lung tissues were observed in each group. **Results** The body mass of three groups was increased after 14 days of treatment, but the increase of body mass in the COPD model group was slower than that in the Tanreqing therapy group ($g: 247.8 \pm 15.9$ vs. 265.4 ± 18.7 , $P < 0.05$). Compared with the normal control group, the forced expiratory volume in 0.3 second/forced vital capacity (FEV0.3/FVC) was decreased significantly in the COPD model group (0.688 ± 0.213 vs. 0.973 ± 0.052); the peak expiratory flow rate [PEF(mL/s): 3.28 ± 0.74 vs. 4.58 ± 1.48], the lung compliance [Cydn (mL/cmH₂O): 317.1 ± 130.3 vs. 515.1 ± 140.2] and the protein expression of the bronchial epithelial MRP1 [absorbance (A) value: 0.698 ± 0.103 vs. 1.318 ± 0.169] in the COPD model group were decreased obviously, residual volume/total lung capacity (RV/TLC) was increased significantly (0.502 ± 0.128 vs. 0.316 ± 0.153). Compared with the COPD model group, FEV0.3/FVC (0.801 ± 0.142 vs. 0.688 ± 0.213), PEF (mL/s: 4.24 ± 0.36 vs. 3.28 ± 0.74), Cydn (mL/cmH₂O: 421.2 ± 342.0 vs.

317.1 ± 130.3), the protein expression of MRP1 (*A* value: 0.964 ± 0.095 vs. 0.698 ± 0.103) in Tanreqing treatment group were increased significantly, RV/TLC was decrease significantly (0.411 ± 0.105) vs. (0.502 ± 0.128) in the Tanreqing treatment group (all *P* < 0.05). Under light microscope: in COPD model group, the alveolar wall became thin and broken, the alveoli fused and enlarged, a large quantity of cilia of bronchial mucosal epithelium detached, fallen down and adherent together, goblet cell proliferating, a large amount of inflammatory cell infiltration in various levels of bronchiole mucosal epithelial walls and retention of inflammatory secretion in lumens could be seen; in Tanreqing treatment group, the above changes were improved to a certain degree compared with those in COPD model group. **Conclusions** Tanreqing can effectively alleviate the lung bronchial inflammation, postpone deterioration of lung function and improve the symptoms in rats with COPD; the mechanism is possibly related to the increase of MRP1 expression of bronchial epithelial cells.

【Key words】 Tanreqing; Chronic obstructive pulmonary disease; Multidrug resistance-associated protein 1

慢性阻塞性肺疾病(COPD)临床表现为不能完全逆转的气流受限,气流受限常呈渐进性发展,常伴有气道、肺实质与肺血管对有害颗粒和(或)气体的炎症反应^[1-3]。COPD 多见于中老年人,在全球范围内有较高的发病率和病死率,急性加重可降低肺功能,促进疾病进展,影响疾病恢复,降低患者生存质量,严重增加了患者的经济负担,给患者的生活带来极大影响。COPD 的主要特征是气道的慢性炎症和全身系统性炎症反应^[4],其发生发展与炎症和氧化应激密切相关。多药耐药相关蛋白 1(MRP1)在肺支气管上皮有很强的表达,可作用于内源性代谢产物,有调节细胞内药物、毒物及代谢产物浓度的作用,是机体自身防御解毒体系的重要组成部分^[5]。

痰热清注射液是在清开灵、双黄连两种清热解毒中成药方基础上优选而成,具有清热解毒和化痰镇惊的功效^[6],对 COPD 急性加重期(AECOPD)患者有一定疗效^[7]。但关于痰热清注射液治疗 COPD 的机制研究较少,本研究通过制备 COPD 大鼠模型,观察痰热清注射液对 COPD 大鼠支气管上皮细胞多药耐药相关蛋白 1(MRP1)的影响及其治疗 COPD 的可能机制,为临床用药提供评价依据。

1 资料与方法

1.1 实验动物及分组:选择 SPF 级健康 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,体质量 180~220 g,购于武汉大学医学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(鄂)2003-0004。按随机数字表法将大鼠分为正常对照组、COPD 模型组、痰热清治疗组,每组 10 只。

1.2 COPD 模型复制:采用气管内注入脂多糖(LPS)加熏香烟方法复制大鼠 COPD 模型。将大鼠全麻,于入组第 1 天和第 14 天 COPD 模型组气道注入 LPS 200 μL(1 mg/mL),正常对照组大鼠注入等量生理盐水。第 2~28 天(第 14 天除外)将 COPD 模型组和痰热清治疗组大鼠置于自制的被动熏吸箱内(50 cm×50 cm×50 cm),注入香烟烟雾〔牡丹牌香

烟,上海卷烟厂生产,每支焦油、尼古丁和一氧化碳(CO)含量分别为 11.0、0.9 和 12 mg〕,体积浓度 5%,每次 1 h,每日 2 次,连续 14 d。正常对照组大鼠不进行熏吸。

1.3 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 治疗方法:制模成功后,痰热清治疗组尾静脉注射痰热清注射液(上海凯宝药业股份有限公司生产,批号:20131001)2 mL/kg,连续给药 14 d;COPD 模型组和正常对照组尾静脉注射 0.9% 氯化钠注射液 2 mL/kg。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 观察各组大鼠治疗前后体质量的变化。

1.5.2 大鼠呼吸功能测定:腹腔注射 10% 水合氯醛 3 mL/kg 麻醉大鼠,仰卧位固定于操作台。采用动物肺功能测定系统检测大鼠 0.3 s 用力呼气容积占用力肺活量的比值(FEV0.3/FVC)、残气量/肺总量比值(RV/TLC)、呼气峰流速(PEF)以及肺顺应性(Cydn)。

1.5.3 肺组织病理学观察:夹闭大鼠左主支气管,将硅胶管固定于右主支气管,检测前将血浆标本用 SepPack C18(美国 Cayman Chemical 公司)分离柱抽提,洗出液用 N₂ 吹干,置入试管内,右肺内注射 10% 甲醛水溶液至右肺膨胀边缘变锐,结扎右主支气管,置于 10% 甲醛水溶液中固定、脱水、包埋、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.5.4 蛋白质免疫印迹试验(Western-Blot)测定肺组织 MRP1 蛋白水平:取大鼠肺组织,用细胞裂解液裂解,10 mg/mL 苯甲基磺酰氟(PMSF)进行匀浆,4 ℃离心后,收集上清液(内含组织蛋白),采用 BCA 法检测蛋白。上清液与十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液按 1:1 混合均匀,沸水浴加热 3~5 min,冷却至室温,把蛋白样品上样到 SDS-PAGE 加样孔内电泳,

转膜,再加入 Western 封闭液室温封闭 2 h;依次加入兔抗鼠 MRP1 抗体过夜、漂洗 3 次,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(山羊抗兔)封闭 2 h、漂洗 3 次;加电化学发光(ECL)试剂检测蛋白,曝光 30 min,最后用凝胶成像系统观察结果并拍照,结果采用 Quantity One 4.6.2 软件分析。

1.6 统计学处理:使用 SPSS 16.0 软件处理数据,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

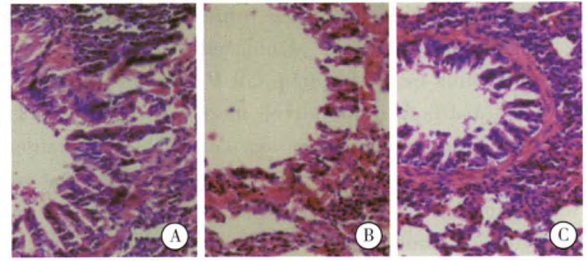
2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后体质量比较(表 1):各组治疗后体质量均较治疗前增加,模型大鼠体质量增加较正常对照组缓慢,但痰热清治疗组体质量增加较 COPD 模型组明显(均 $P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠肺功能比较(表 1):COPD 模型组和痰热清治疗组大鼠肺功能指标 FEV0.3/FVC、PEF、Cyd_n 均较正常对照组有不同程度的降低,RV/TLC 较正常对照组明显增高(均 $P < 0.05$);痰热清治疗组 FEV0.3/FVC、PEF、Cyd_n 均明显高于 COPD 模型组,RV/TLC 则明显低于 COPD 模型组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠肺组织病理学变化比较(图 1):正常对照组大鼠肺泡大小正常,支气管黏膜纤毛柱状上皮排列整齐,黏膜与固有层细胞数较少,仅有少量杯状细胞;各级细支气管壁黏膜上皮均完整,少见炎性细胞浸润;COPD 模型组大鼠肺泡壁变薄、断裂,肺泡融合扩大,支气管黏膜大量上皮纤毛脱落、倒伏、粘连,杯状细胞增生,各级细支气管壁可见大量炎性细胞浸润,管腔内有炎性分泌物潴留;痰热清治疗组,支气管黏膜上皮细胞脱落、倒伏、杯状细胞增生与炎性细胞浸润等征象均较 COPD 模型组有一定程度改善。

2.4 各组大鼠 MRP1 蛋白表达水平比较(表 1;图 2):与正常对照组比较,COPD 模型组 MRP1 蛋白表达明显降低,与 COPD 模型组比较,痰热清治疗组 MRP1 蛋白水平增高(均 $P < 0.05$)。



A 为正常对照组;B 为 COPD 模型组;C 为痰热清治疗组

图 1 各组肺组织病理学变化比较 (HE 染色 高倍放大)

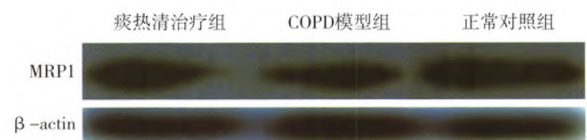


图 2 各组大鼠肺组织 MRP1 蛋白表达水平比较

3 讨论

COPD 以气道、肺实质与肺血管发生慢性炎症为主要特征,其发生发展与炎症和氧化应激密切相关^[8]。慢性气道炎症在 COPD 急性发作中起重要作用^[9],气道炎症反复可造成患者气道重构和进行性气道阻塞。支气管细胞可表达三磷酸腺苷结合盒转运体(ABC),ABC 可吸入体外化学异物或有毒物质,通过外排功能达到减弱肺毒性的效应,作为肺的天然屏障,ABC 中的重要一员 MRP1 在健康人肺支气管上皮有较强的表达。由于 MRP1 有较多的结合底物、广泛的跨膜转运功能,使其通过作用于内源性代谢物,达到调节肺组织氧化应激,减少异物或毒物对人体损伤的作用,是人体天然防御解毒的重要因素。MRP1 对白细胞三烯 4(LTC₄)具有较强的亲和力,LTC₄ 与 MRP1 结合并与 MRP1 一起排出细胞外,因此 COPD 患者支气管上皮细胞 MRP1 表达减少,重度 COPD 较中度 COPD 支气管上皮细胞的 MRP1 表达更少,随着病情的加重,MRP1 表达随之降低。本研究结果显示,与正常对照组比较,COPD 模型组大鼠支气管上皮细胞 MRP1 表达降低,可见 MRP1 在 COPD 的发生发展过程起保护作用^[10-13]。

表 1 各组大鼠治疗前后的体质量、肺功能及 MRP1 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	体质量(g)		FEV0.3/FVC	RV/TLC	PEF(mL/s)	Cyd _n (mL/cmH ₂ O)	MRP1(A 值)
		治疗前	治疗后					
正常对照组	10	210.2 ± 15.6	289.7 ± 28.1 ^a	0.973 ± 0.052	0.316 ± 0.153	4.58 ± 1.48	515.1 ± 140.2	1.318 ± 0.169
COPD 模型组	10	215.4 ± 14.8	247.8 ± 15.9 ^{ab}	0.688 ± 0.213 ^b	0.502 ± 0.128 ^b	3.28 ± 0.74 ^b	317.1 ± 130.3 ^b	0.698 ± 0.103 ^b
痰热清治疗组	10	208.7 ± 13.7	265.4 ± 18.7 ^{abc}	0.801 ± 0.142 ^b	0.411 ± 0.105 ^c	4.24 ± 0.36 ^c	421.2 ± 342.0	0.964 ± 0.095 ^c

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$;与正常对照组比较,^b $P < 0.05$;与 COPD 模型组比较,^c $P < 0.05$

COPD 属中医“肺胀”“喘病”、“咳嗽”范畴^[14]。在《黄帝内经》记载“皮毛者，肺之合也，皮毛先受邪气，邪气以从其合也。寒饮食入胃，从肺脉上至于肺，则肺寒，肺寒则外内合邪，因而客之，则为肺咳……肺咳之状，咳而喘息有音，甚则唾血（《素问·咳论》）；“诸气愤郁，皆属于肺（《素问·至真要大论》）”。本病病机在于本虚标实，急性期以标实为急，多见痰、瘀和热；AECOPD 则因感受风热或痰郁化热表现为痰热证；稳定期以本虚为主，肺脾肾虚损，外感是主要诱因，痰浊可导致肺胀。

痰热清注射液是由黄芩、山羊角、熊胆粉、连翘和金银花等中药组成，是基于中医常用药“双黄连”和“清开灵”两种清热解毒的药方改进而成^[15-16]。方中以黄芩为君药，味苦性寒，能宣肺化痰、清热燥湿、泻火解毒；以山羊角、熊胆粉为臣药，山羊角味咸性寒，可平肝熄风、清热镇惊、解毒明目，熊胆粉，味苦、性寒，可清热解毒，解痉化痰；两药合用可加强全方的化痰解痉功效；连翘与金银花均为佐药，连翘味苦微寒，与金银花合用可助全方的清热解毒和化痰宣肺功效，连翘兼有佐药功能，引诸药入肺经。诸药合用具有清热解毒和化痰镇静的作用^[17-18]。

本研究显示，痰热清注射液可明显缓解 COPD 大鼠的症状，改善肺功能，增加 MRP1 蛋白表达，从而减轻了 COPD 大鼠的气道炎症。也映证了痰热清注射液在呼吸系统疾病防治中的临床疗效，尤其在 AECOPD 的治疗中更具优势，能有效缓解咳嗽、咯痰、喘息等症状，提高患者生活质量^[19]。

痰热清注射液缓解 COPD 症状、增加 MRP1 蛋白表达与痰热清的物质基础有关。现代药理学研究显示，痰热清注射液中君药黄芩含有黄芩苷和黄芩素等黄酮类化合物，黄芩苷可显著抑制细胞内 LTC₄ 的生物合成^[20-21]，而 MRP1 是 LTC₄ 的重要转运蛋白，黄芩苷能阻止 Ca²⁺ 通道以缓解支气管痉挛；黄芩素通过抗过敏降低支气管腺体分泌以干扰 LTC₄ 代谢、改善 COPD 症状；黄芩本身具有抗菌、抗病毒、抗氧化及抗炎等多种药理作用，可缓解 COPD 临床症状^[22]；黄芩还有调节免疫功能和保护心脑血管等系统的作用，尤其适用于老年 COPD 伴心脑血管并发症患者^[23]。熊胆含有熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸，两种去氧胆酸均具有镇惊、抑菌、镇咳和平喘等功能。

综上所述，痰热清注射液可能通过增加 MRP1

的蛋白表达，从而减轻 COPD 气道炎症，延缓 COPD 肺功能恶化，改善临床症状。

参考文献

- [1] 郭子强,王心旺.慢性阻塞性肺疾病住院患者的疾病经济负担研究[J].中国卫生统计,2010,27(4):345-347,350.
- [2] 刘蕾,李宇航.慢性阻塞性肺疾病(COPD)相关生物学标志物研究进展[J].中华中医药学刊,2010,29(9):1857-1861.
- [3] 王成阳,刘向国,彭青和,等.Foxp3/Treg 与 ROR γ t/Th17 细胞失衡在慢性阻塞性肺疾病大鼠中的作用[J].中华危重病急救医学,2014,26(12):860-864.
- [4] 李蓓,周璇,陈力,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织微小 RNA 的表达[J].中华危重病急救医学,2014,26(12):905-909.
- [5] 汪辰吟,陶秀华,张弦,等.慢性阻塞性肺疾病进程与肺支气管上皮细胞 MRP1 功能改变的相关性研究[J].中国临床药理学与治疗学,2014,19(1):8-14.
- [6] 周明华.痰热清注射液加抗菌药物治疗老年性肺炎 50 例疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(4):200.
- [7] 刘永生,段莉,周成鸿.痰热清注射液对 COPD 急性发作期患者血清 IL-13、LTB-4 表达和肺功能的影响[J].中国中医急症,2011,20(8):1297-1298.
- [8] 王素梅.RELM β 在大鼠 COPD 模型肺组织的表达及与 IL-8、IL-10 和 TNF- α 的相关性[D].广州:暨南大学,2013.
- [9] 杨国辉,王广发.慢性阻塞性肺疾病机械通气患者呼出气冷凝液中过氧化氢和白细胞介素-6 的监测及意义[J].中华危重病急救医学,2010,22(8):455-458.
- [10] 曹银.基于药代动力学及对 MRP1 功能的影响探讨异硫氰酸烯丙酯治疗 COPD 的机制[D].合肥:安徽中医药大学,2013.
- [11] 汪辰吟,汪电雷,陶秀华,等.化痰降气方对大鼠支气管上皮细胞多药耐药相关蛋白 1 的影响[J].中药材,2014,37(2):280-283.
- [12] 汪珊珊,汪电雷,陶秀华,等.脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮 MRP1 功能分析[J].中国实验动物学报,2014,22(3):30-34.
- [13] 张弦,汪电雷,陶秀华,等.慢性阻塞性肺疾病与多药耐药相关蛋白 1 的相关性研究进展[J].安徽医药,2012,16(5):573-575.
- [14] 俞凤英.慢性阻塞性肺疾病稳定期中医辨证论治与预防体会[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(2):77.
- [15] 彭丹.痰热清注射液对 COPD 急性加重期患者血浆细胞因子及 C-反应蛋白的影响[J].海南医学,2012,23(20):107-108.
- [16] 闫涛.痰热清治疗 COPD 的临床观察[J].中国城乡企业卫生,2013,28(6):38-39.
- [17] 刘春鹏.痰热清注射液的药物分析及临床运用[J].中医临床杂志,2013,25(1):8-9.
- [18] 赵海萌,刘宏锦,郭新丽.痰热清雾化吸入治疗 COPD 急性加重期疗效观察和护理[J].首都医药,2014,21(4):29-30.
- [19] 李冉.痰热清注射液对 ALI/ARDS 机械通气患者 Murray 评分的影响[D].广州:广州中医药大学,2013.
- [20] 史雪靖.黄芩药理作用研究进展[J].中医药信息,2010,27(4):128-130.
- [21] 徐玉田.黄芩的化学成分及现代药理作用研究进展[J].光明中医,2010,25(3):544-545.
- [22] 邱家章.黄芩苷抗金黄色葡萄球菌 α -溶血素作用靶位的确证[D].长春:吉林大学,2012.
- [23] 马春花.黄芩中黄酮成分药理研究进展[J].养殖技术顾问,2011,39(10):190-191.

(收稿日期:2015-04-14)

(本文编辑:邸美仙 李银平)