

## 方药研究

## 肺舒灵对金黄地鼠肺泡巨噬细胞表达一氧化氮合酶及产生一氧化氮的影响

张旭晨<sup>1</sup> 阮英茆<sup>1</sup> 韩晓男<sup>1</sup> 卢建秋<sup>2</sup>

**摘要** 观察中药复方肺舒灵对金黄地鼠肺泡巨噬细胞表达一氧化氮合酶及产生一氧化氮的影响,以探讨肺舒灵防治慢性阻塞性肺疾病的作用机理。方法:经支气管肺泡灌洗获得肺泡巨噬细胞并进行培养。在脂多糖刺激同时或刺激 6 小时后加入不同剂量的肺舒灵,应用比色法测定上清液中反映一氧化氮(NO)含量的亚硝酸盐含量,免疫组织化学技术检测细胞中诱生型一氧化氮合酶(iNOS)的表达情况。结果:应用肺舒灵后,上清液中 NO 含量和细胞中 iNOS 表达均明显低于脂多糖刺激组( $P<0.01$ ),且呈剂量依赖关系。结论:减少肺泡巨噬细胞表达 iNOS 和产生 NO,减轻 NO 介导的肺组织损伤,可能是肺舒灵防治慢性阻塞性肺疾病的机理之一。

**主题词** 巨噬细胞,肺泡/药物作用 一氧化氮/代谢 @ 肺舒灵

内源性一氧化氮是由内皮细胞、神经细胞、巨噬细胞等产生的一种多功能分子,在肺部炎症性疾病时,肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages)诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达明显增强,呼出气中一氧化氮(nitric oxide, NO)含量明显增加。此时,NO 作为一种前炎症因子,在介导炎症反应和组织损伤中起重要作用,从而加重和维持气道及肺内的炎症反应,导致肺组织破坏和病变加重。临床初步观察表明,具有固本理气、化痰祛瘀功效的中药复方肺舒灵煎剂对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)具有较好的防治作用,但其详细作用机理尚不清楚。为了探讨肺舒灵的作用机理,本研究应用肺泡巨噬细胞培养的方法,观察了其对金黄地鼠肺泡巨噬细胞表达 iNOS 及产生 NO 的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 肺泡巨噬细胞的分离与培养:用体重 $120\pm 8\text{g}$ 雄

1 中国医学科学院阜外心血管病医院中国协和医科大学心血管病研究所,北京市西城区北礼士路(100037)

2 北京中医药大学中药学院

收稿日期:1998-11-26;修回日期:1998-12-28

性叙利亚金黄地鼠(购自卫生部生物制品研究所),进行在体支气管肺泡灌洗。灌洗液在离心后弃掉上清,将沉淀的细胞混悬于含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基(Gibco/BRL)中并调整细胞数为  $5\times 10^5$ 。将细胞接种于内置盖玻片的 12 孔培养板(Corning)中,每孔 1ml,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 2 小时后,洗去未贴壁细胞。然后每孔加入含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基 1ml 并分为以下各组进行细胞培养:Ⅰ组:脂多糖(LPS, Escherichia coli O127: B8, Sigma)刺激组( $10\mu\text{g/ml}$ );Ⅱ组:单纯培养基培养组;Ⅲ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )与肺舒灵(主要由黄芪、连翘、莱菔子、淫羊藿、当归、桔梗等药组成,每 ml 含生药 1g)共孵育小剂量( $50\text{mg/ml}$ )组;Ⅳ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )与肺舒灵共孵育中剂量( $100\text{mg/ml}$ )组;Ⅴ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )与肺舒灵共孵育大剂量( $200\text{mg/ml}$ )组;Ⅵ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )刺激 6 小时后再加肺舒灵小剂量( $50\text{mg/ml}$ )组;Ⅶ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )刺激 6 小时后再加肺舒灵中剂量( $100\text{mg/ml}$ )组;Ⅷ组:LPS( $10\mu\text{g/ml}$ )刺激 6 小时后再加肺舒灵大剂量( $200\text{mg/ml}$ )组。

1.2 上清液收集及盖玻片贮存:以上各实验组细胞在培养 24 小时后,吸取上清液至微量离心管中,每管中加蛋白酶抑制剂苯甲基氟磷酸(PMSF)至  $1\text{mmol/ml}$ ,以防蛋白酶的降解作用。上清液及保留于 12 孔培养板中的上有肺泡巨噬细胞贴壁生长的盖玻片均于  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

1.3 比色法测定上清液中亚硝酸盐含量:按 NO 比色检测试剂盒(军事医学科学院)说明书要求,建立亚硝酸盐标准曲线,分别将各实验组上清液用 721 分光光度计在  $545\text{nm}$  波长处测定亚硝酸盐含量( $\mu\text{M/L}$ )。

1.4 免疫组织化学技术检测 iNOS 表达情况:将有肺泡巨噬细胞贴壁生长的盖玻片取出,经 4% 多聚甲醛固定,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  阻断内源性过氧化物酶,经稀释的兔抗 iNOS 多克隆抗体(Santa Cruze 公司)、稀释的通用型生物素化第二抗体(GBI 公司)、稀释的链霉亲和素/过氧化物酶复合物(GBI 公司)分别孵育。DAB 显色、苏木素复染、逐级酒精脱水、二甲苯透明后封片,显微镜下观察并对 iNOS 阳性细胞进行定量。每实验组中各计数

3 张盖玻片,每张中计数 100 个细胞,结果以阳性细胞所占百分率表示。

1.5 统计学分析:采用 SPSS for Windows 6.0 进行方差分析及组间  $t$  检验,结果以  $(\bar{X} \pm S)$  表示。

## 2 结果

2.1 肺舒灵对上清液中亚硝酸盐含量的影响:当向培养基加入 LPS 进行刺激后,上清液中反映 NO 含量的亚硝酸盐含量明显高于单纯培养基培养组 ( $P < 0.01$ );当向培养基中加入小剂量中药肺舒灵后,上清液中亚硝酸盐含量明显低于 LPS 刺激组 ( $P < 0.01$ ),但与单纯培养基培养组相比仍有明显差异 ( $P < 0.01$ );当同时加入中或大剂量肺舒灵后,亚硝酸盐含量与单纯培养基培养组相比无明显差异 ( $P > 0.05$ )。当预先应用 LPS 刺激 6 小时再加入小或中剂量肺舒灵后,上清液中亚硝酸盐含量明显低于 LPS 刺激组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但与单纯培养基培养组相比仍有明显差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );当加入大剂量肺舒灵后,亚硝酸盐含量与单纯培养基培养组相比无明显差异 ( $P > 0.05$ ),见附表。

2.2 肺舒灵对肺泡巨噬细胞 iNOS 表达的影响:单纯用培养基对巨噬细胞进行培养时,即可见少量巨噬细胞胞浆中有 iNOS 表达,阳性细胞胞浆呈棕黄色。当向培养基中加入 LPS 进行刺激后,巨噬细胞 iNOS 表达阳性细胞数明显高于单纯培养基培养组 ( $P < 0.01$ )。当向培养基中同时加入中药肺舒灵后,巨噬细胞 iNOS 表达阳性细胞数明显低于 LPS 刺激组 ( $P < 0.01$ ),但小、中剂量组阳性细胞数仍明显高于单纯培养基培养组 ( $P < 0.01$ ),而大剂量组与单纯培养基培养组相比无明显差异 ( $P > 0.05$ )。当预先应用 LPS 刺激 6 小时再加入中药肺舒灵后,巨噬细胞 iNOS 阳性细胞数明显低于 LPS 刺激组 ( $P < 0.01$ ),而大剂量组与之相比则无明显差异 ( $P > 0.05$ ),见附表。

附表 肺舒灵对肺泡巨噬细胞  
iNOS 表达 NO 产生的影响 ( $\bar{X} \pm S$ )

| 组别   | 亚硝酸盐含量 ( $\mu\text{M/L}$ ) | iNOS 表达 (%)      |
|------|----------------------------|------------------|
| I    | 91.45 ± 22.58**            | 89.67 ± 2.52**   |
| II   | 17.72 ± 4.55△△             | 16.67 ± 2.52△△   |
| III  | 45.73 ± 11.29△△**          | 45.67 ± 4.16△△** |
| IV   | 25.04 ± 9.11△△             | 33.33 ± 5.13△△** |
| V    | 19.60 ± 4.87△△             | 20.67 ± 2.08△△   |
| VI   | 58.79 ± 10.47△△**          | 50.33 ± 3.22△△** |
| VII  | 34.84 ± 11.29△△*           | 33.67 ± 3.77△△** |
| VIII | 18.51 ± 6.21△△             | 22.33 ± 3.22△△   |

与第 I 组相比,△ $P < 0.05$ ,△△ $P < 0.01$ ;与第 II 组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

## 3 讨论

最初,NO 仅被认为是存在于烟雾中的一种有毒分子,近年来研究发现,NO 在机体的许多生理病理过程中起着重要的调节作用。内源性 NO 来源广泛,可由气道和肺泡上皮、血管平滑肌细胞和内皮细胞、神经细胞及巨噬细胞等从左旋精氨酸 (L-arginine) 经一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 作用而生成。NOS 包括原生型 (constitutive, cNOS) 和诱生型 (inducible, iNOS) 两大类。前者主要存在于神经细胞和内皮细胞,其生物活性依赖于钙离子和钙调蛋白存在。后者主要存在于血管平滑肌细胞和巨噬细胞,其生物活性不依赖于钙离子和钙调蛋白的存在。正常情况下,cNOS 有生物活性,维持机体内一定数量的 NO 产生,此对于机体调节血管紧张度、松弛气道平滑肌、抗炎防御功能有重要作用。iNOS 一般不表达,但可被某些细胞因子 (如  $\text{INF-}\gamma$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ ) 和 LPS 等诱导激活,激活后产生的高浓度的 NO 可诱发多种炎症性疾病,引起组织损伤<sup>[1]</sup>。

炎症性肺部疾病时,呼出气中 NO 含量明显增加。Lundberg 等认为呼出气中 NO 含量的升高,可以作为气道及肺部炎症存在的标志<sup>[2]</sup>。NO 作为前炎症因子,在介导炎症反应和组织损伤中起重要作用。当给大鼠静脉注射 LPS 后,肺内反映 NO 含量的亚硝酸盐含量及反映炎症程度的髓过氧化物酶活性明显升高<sup>[3]</sup>。给大鼠气管内注入 LPS 后,亦观察到肺内中性白细胞和巨噬细胞明显增多,肺泡巨噬细胞 iNOS mRNA 表达明显增强<sup>[4]</sup>。LPS 激活 iNOS 后产生的 NO 还可以作用于肺内血管床,破坏内皮细胞的完整性,使血管壁通透性增加,引起肺部水肿和炎细胞浸润<sup>[5,6]</sup>。浸润的炎细胞可释放中性白细胞弹性蛋白酶和基质金属蛋白酶,对肺组织的弹性纤维、胶原纤维等进行破坏。此外,NO 作为含氮自由基,可与肺内的超氧阴离子反应生成过氧亚硝酸离子和过氧亚硝酸盐,前者为强氧化剂,后者有细胞毒作用。两者可以诱导产生脂质过氧化物,干扰多种酶的作用途径,也可以与铁及铁蛋白酶反应生成毒性亚硝基化合物,从而造成肺部损伤。

COPD 是一常见病、多发病,其发病机理尚不清楚。目前认为,弹性蛋白酶/抗弹性蛋白酶系统失衡、肺及气道内炎症等是 COPD 的主要发病因素<sup>[7]</sup>。研究表明,COPD 患者肺和气管内以及肺泡灌洗液中有大量的中性白细胞、巨噬细胞等炎细胞存在,呼出气中 NO 含量明显增高<sup>[8]</sup>。Cruz 等观察到,应用 iNOS 抑制剂后,可明显降低肺组织的 iNOS 表达和 NO 的产生,减少肺内炎细胞的浸润,减轻肺组织损伤<sup>[9]</sup>。在急性胰腺炎时,常常伴有肺组织的损伤。研究表明,胰腺炎时的肺组织损伤是由于肺内巨噬细胞 iNOS 活性增强,产生

过量 NO 所致。应用 iNOS 抑制剂 L-NMMA 后, 可通过抑制 iNOS, 减少 NO 产生, 阻止胰腺炎时发生的肺组织损伤<sup>[10]</sup>。因此, 抑制肺组织特别是肺泡巨噬细胞 iNOS 活性, 减少过量的 NO 产生, 可以减轻肺内炎症程度, 减少中性粒细胞弹性蛋白酶和基质金属蛋白酶的含量, 抑制肺基质的降解和破坏, 从而对肺组织起到保护作用, 阻止和减轻 COPD 的发生和发展。

中医学将 COPD 归之于“咳嗽”、“痰饮”、“喘症”、“肺胀”等范畴, 其病机以正气虚弱为本, 痰饮、血瘀、气滞等邪实为标, 其治则宜固本理气、化痰祛瘀。肺舒灵主要由黄芪、当归、连翘、莱菔子、淫羊藿、桔梗等药组成, 方中黄芪补益脾肺, 淫羊藿补肾壮阳、助黄芪扶正固本, 二者合用, 使正盛则足以制邪; 桔梗开宣肺气、祛痰利咽, 莱菔子消食导滞、降气化痰, 二者一升一降, 理气开胸化痰; 当归善活血化瘀, 与桔梗、莱菔子相伍, 一入血分, 一入气分, 并行不悖, 气血同调; 连翘清热解毒散结, 助桔梗、当归涤除顽疾痰瘀。诸药合用, 补其虚, 祛其痰, 行其滞, 调其血, 使脾肾强健, 肺治节有权, 则诸症自除。临床初步观察发现, 肺舒灵对 COPD 有较好的防治作用, 但其作用机理尚不清楚。前已述及, 肺泡巨噬细胞在受到 LPS 等刺激后 iNOS 表达明显增强, NO 含量明显增加。本实验中应用 LPS 对支气管肺泡灌洗液中肺泡巨噬细胞进行刺激后发现, 细胞中 iNOS 表达明显增强, 培养液上清中反映 NO 含量的亚硝酸盐含量明显升高。本实验通过比色法检测亚硝酸盐含量及免疫组织化学技术检测 iNOS 表达和 NO 含量明显下降且呈剂量依赖关系; 当应用 LPS 刺激 6 小时后再向培养基中加入不同剂量的肺舒灵时, 亦可见到 iNOS 表达和 NO 含量有较明显的下降, 并有剂量依赖关系。以上结果提示, 降低肺内 NO 含量, 减轻 NO 介导的肺组织损伤, 可能是肺舒灵对 COPD 发挥防治作用的机理之一。

#### 4 参考文献

- Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade; fact or fiction. Eur Respir J, 1997, 10(3): 699.
- Lundberg JO. Airborne nitric oxide; inflammatory marker and aerocrine messenger in man. Acta Physiol Scand Suppl, 1996, 633(1): 1.
- Hock CE, Yin K, Yue G, et al. Effect of inhibition of nitric oxide synthase by aminoguanidine in acute endotoxemia. Am J Physiol, 1997, 272(2 pt 2): H843.
- Shellito JE, Kolls JK, Summer WR. Regulation of nitric oxide release by macrophages after intratracheal lipopolysaccharide. Am J Respir Cell Mol Biol, 1995, 13(1): 45.
- Worrall NK, Chang K, Lejeune WS, et al. TNF- $\alpha$  causes reversible in vivo systemic vascular barrier dysfunction via NO-dependent and independent mechanisms. Am J Physiol, 1997, 273(6 pt 2): H2565.
- Bernareggi M, Mitchell JA, Barnes PJ, et al. Dual action of nitric oxide on airway plasma leakage. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(3): 869.
- Stockley RA. The pathogenesis of chronic obstructive lung disease; implication for therapy. QJM, 1995, 88(2): 141.
- Barnes PJ. New therapies for chronic obstructive lung disease. Thorax, 1998, 53(2): 137.
- Cruz WS, Moxley MA, Corbett JA, et al. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates NNMU-induced alveolar injury in vivo. Am J Physiol, 1997, 273(6 pt 1): L1167.
- Tsukahara Y, Horiya Y, Anan K, et al. Role of nitric oxide derived from alveolar macrophages in the early phase of acute pancreatitis. J Surg Res, 1996, 6(1): 43.

注: 本研究为国家“九五”科技攻关课题(课题号 96-906-02-16)

## 北京明驰医药信息中心经销下列商品

风湿骨质增生治疗仪 3700 元/台  
HT-1 电子痔疮治疗仪 13900 元/台  
HP-1 型脑瘫治疗仪 580 元/台  
HP-1 型脑瘫治疗仪 2300 元/台  
KWD808 1 全能脉冲电疗仪 480 元/台  
韩氏穴位神经刺激仪  
LH-202 型 680 元/台  
高性能针灸治疗仪 1280 元/台  
HXY-1 手穴诊疗仪 740 元/台  
DAJ-10 多功能艾灸仪 3980 元/台  
DAJ-4 多功能艾灸仪 580 元/台  
糖尿病治疗仪 398 元/台  
三特针灸按摩仪 398 元/台  
程控针灸按摩治疗仪 398 元/台  
多用电子穴位测定治疗仪 260 元/台  
中风治疗仪 890 元/台  
超低波治疗仪 450 元/台  
G6805 1 型 216 元/台  
G6805 1 型(青岛产) 286 元/台  
G6805-2A 型(上海产) 330 元/台

韩氏治疗仪 WQ1002 型 318 元/台  
WQ1002F 型(离子导入) 328 元/台  
WQ1002K 型(8 路输出) 2100 元/台  
智能型关节炎治疗仪 398 元/台  
808 理疗枪式拔罐 54 元/套(4 只)  
808 理疗枪式拔罐 98 元/套(精装)  
奇罐 325 元/套  
TDP 神灯治疗仪(双头) 940 元/台  
海华治疗仪 328 元/台  
五星磁吸针 150 元/套  
橡胶火罐 25 元/套  
医用定时钟 198 元/台  
吴氏十八罐 198 元/套  
汉章小刀针 140 元/套  
小刀针疗法 11 元/册  
大针包 62 元  
小针包 22 元/套  
单头火针 6 元/支  
可调单头火针 18 元/支

多头火针 15 元/支  
可调多头火针 28 元/支  
弹簧火针 38 元/支  
新九针包 310 元/套  
大号氧气袋 58 元/只  
太极保健笔 75 元/只  
王不留行贴 20 元/包  
磁珠贴 80 元/包  
医用耳穴定向磁珠 30 元/袋  
耳穴板 10 元/片  
耳穴板 15 元/片(新型)  
中国温灸器 78 元/套  
微烟灸灸器 18 元/套  
新型灸灸 12 元/只  
制艾柱模具 28 元/套  
微烟灸条(福建) 6 元/盒  
温灸纯艾条 6 元/盒  
太乙艾条 7 元/盒  
金盏艾条 7 元/盒

无烟艾条 7 元/盒  
头针模型 36 元/个  
手针模型 19 元/个  
足针模型 21 元/个  
耳针模型(22CM) 35 元/个  
耳针模型(13CM) 16 元/个  
耳穴挂图 12 元/套  
女性人体穴位挂图 34 元/套  
男性人体穴位挂图 20 元/套  
颈椎牵引器 165 元/个  
腰椎牵引器 190 元/个  
颈椎牵引器(充气) 96 元/个  
骨骼模型 160 元/套  
人体解剖模型(男性) 220 元/套  
人体解剖模型(女性) 240 元/套  
84cm 人体穴位模型 340 元/个  
50cm 男性穴位模型 55 元/个  
26cm 男性穴位模型 32 元/个  
50cm 女性穴位模型 58 元/个  
磁圆梅针 85 元/只(带教材盒)

装)  
师怀堂九针包 580 元/套(带教材)  
太极平衡刮痧用具 50 元/套  
各种规格针灸针  
中国图书医学影像带详细目录备索  
以上商品 50 元以上  
办理邮寄, 另加 10% 邮费。款到 3 日内必发货, 对所售商品实行三包。在汇款单附言内写明所购商品名称和数量。邮政编码: 100007, 地址: 北京市东直门内南小街 16 号, 联系人: 李维明。电话(传真): (010) 64033987, 手机: (0) 1381089887。

(广告编号: 9906-15)