

实验研究

中药对支气管扩张症气道淋巴细胞凋亡的影响

万毅刚¹ 范 钰² 曹世宏³

摘要 为了探讨中药与氧氟沙星对大鼠支气管扩张症(支扩)模型气道淋巴细胞凋亡的影响。建立大鼠叶支气管内注射绿脓杆菌的支扩模型。以中药和氧氟沙星进行治疗,采用 TUNEL 法进行气道凋亡淋巴细胞的标记,对淋巴细胞的凋亡指数(AI)进行比较。结果,中药治疗组(AI)与对照组比较,差异有显著性($P < 0.05$);并且气道组织也显示出炎症细胞浸润改善。结果表明,中药可能是通过促进气道淋巴细胞凋亡,清除炎症细胞,以改善气道炎症反应。

主题词 支气管扩张症/中医药疗法 淋巴细胞/药物作用 细胞凋亡/药物作用

淋巴细胞等炎症细胞的大量聚集,浸润粘膜下层、平滑肌层、支气管周围肺组织是支气管扩张症(支扩)动物模型的主要病理改变^[1]。中药对支扩的抗炎作用可能是通过抑制气道粘膜白介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等细胞因子活性而实现的^[2]。中药对气道炎症细胞的清除作用尚未阐明。本课题揭示中药与氧氟沙星对大鼠支扩模型气道淋巴细胞凋亡的影响。

1 研究材料

1.1 实验动物与分组:体重 200~300g SD 大鼠(SPF)40 只,由南京医科大学实验动物中心提供。先按随机方法将 40 只大鼠分为 4 组。中药治疗组(A 组)10 只,其中雄性 6 只,雌性 4 只;氧氟沙星对照组(B 组)10 只,其中雄性 6 只,雌性 4 只;生理盐水对照组(C 组)10 只,其中雄性 7 只,雌性 3 只;空白治疗组(D 组)10 只,其中雄性 6 只,雌性 4 只。

1.2 绿脓杆菌液:从支扩病人的痰中分离得到绿脓杆菌,接种于培养基上,在 37℃ 的温育箱中培养 24 小时后选择典型菌落冲洗,以此法调配 10^5 CFU/ml 菌液 2ml。

1.3 中药:曹世宏教授方,由江苏省中医院制药厂提

供药液,批号 970034,组成:黄芩 10g,桑白皮 10g,杏仁 10g,枳壳 10g,郁金 10g,南沙参 10g,麦冬 10g,慈苡仁 15g,冬瓜仁 15g,全瓜蒌 15g,黛蛤散 15g,丹参 15g,白茅根 30g。该方为 60kg 标准体重患者的有效治疗量,相当于生药 $2.083\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。以 200g 大鼠有效治疗量的 5 倍(生药 11.4g/d)为低浓度治疗量。

1.4 氧氟沙星(北京制药厂,批号 970312):据报道^[4],人类支扩的氧氟沙星有效剂量为 0.6g/d,按陈奇动物剂量的换算公式,大鼠的有效剂量相当于 $0.0549\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,以 200g 大鼠有效治疗量的 5 倍浓度配制药液。

1.5 标准酚红溶液:按文献^[3]方法配制,用分析天平准确称取 1mg 酚红,加 5%碳酸氢钠溶液配制成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液,再稀释为 0.1、0.3、0.5、0.7、1、3、5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准溶液,用 7550 G 分光光度计(波长 546nm)测其 OD 值为 0.035、0.064、0.9、0.128、0.483、0.633、1.144、1.485,以此 OD 值绘制标准酚红曲线。

2 研究方法

2.1 造模方法:方法参照文献^[1],以 2%戊巴比妥钠 30mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠。仰卧位固定,选择唇下 3cm 处,常规消毒,做纵向 1cm 切口,暴露颌下肌群,纵向分离出气管。选择甲状软骨下较宽的气管软骨间隙做 2mm 的横向切口,进行气管插管。将自制气管插管缓慢伸至胸骨角下约 3cm 处,出现抵触感,即是右侧肺底叶。以微量进样器从插管中快速注入 0.02ml 10^5 CFU/ml 菌液和 1ml 气体。迅速拔出插管并竖起固定板,保持大鼠垂直体位,以缓解呼吸障碍。待大鼠呼吸平衡后纵向缝合气管切口及横向两层缝合颈部肌群及皮肤。以青霉素 G1 万 U $\cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射 3 天,以防伤口感染。以 50%葡萄糖溶液 10ml $\cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃 3 天。对于造模过程中因创伤等非感染因素死亡者给予补充。

2.2 给药方法:选择造模成功的 A、B、C、D 组大鼠各 10 只,准备中药 3000ml(相对密度 1.14g/ml),氧氟沙星 3000ml(相对密度 0.0274g/ml),生理盐水 3000ml。取中药 5ml 给 A 组大鼠灌胃,每日 2 次,连续 28 天:

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39830460)

1 南京大学医学院附属鼓楼医院,江苏省南京市中山路 321 号(210008)

2 上海医科大学

3 南京中医药大学附属医院

收稿日期:2000-01-07

取氧氟沙星 2ml 给 B 组大鼠灌胃,每日 2 次,连续 28 天;取生理盐水 5ml 给 C 组大鼠灌胃,每日 2 次,连续 28 天。D 组大鼠不做任何处理,喂养 28 天。对给药过程中由于操作失误而致死亡者给予补充。

2.3 观察项目与检测方法

2.3.1 组织切片:第 28 天处死大鼠,取大鼠右肺底叶,剥离气管、支气管、肺做病理检查。沿叶支气管剪开底叶,用静脉输液皮管插入叶支气管充气膨胀后,放入 10% 甲醛溶液中固定 72 小时,再经乙醇脱水、浸蜡、包埋等处理,从底叶的不同部位(肺门、肺实质、肺膜)切取 5 μ m 三层薄片。经 HE 染色、Masson 染色、TUNEL 标记。

2.3.2 凋亡细胞的标记:原理:DNA 断裂并暴露出 3 羟基端,在 TDT 的作用下,各种脱氧三磷酸核苷可以连接到 3 羟基端上,预先标记一种 DNTP,即可检测出 DNA 的断裂点,此为凋亡细胞的特征。试剂盒购自德国宝灵曼公司。主要过程按试剂说明书进行,改良部分步骤:(1)石蜡切片经脱蜡及梯度酒精脱水,PBS 洗 2 次,各 5 分钟;(2)3% 过氧化氢封闭 10 分钟,PBS 洗 2 次,各 5 分钟;(3)浸于 0.1 μ mol 枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中,用微波(750W)处理 2 分钟,PBS 洗 2 次,各 5 分钟;(4)浸入 10% 胎牛血清中 30 分钟,PBS 洗 2 次,各 5 分钟;(5)加入 TUNEL 工作液(包含有 TDT 等),室温下孵育 90 分钟,PBS 洗 3 次,各 5 分钟;(6)加入过氧化物酶标记的抗荧光抗体(CONVERTER-POD),室温下孵育 40 分钟,PBS 洗 3 次,各 5 分钟;(7)3,3'-二甲基联苯氨(DAB)显色,苏木素及伊红复染,流水冲洗 15 分钟,中性树胶封片。

观察 TUNEL 标记阳性细胞(凋亡细胞),在高倍镜下选择 5 个不少于 1000 个细胞的代表视野,计数阳性细胞,以凋亡细胞所占淋巴细胞的百分数为凋亡指数(AI)。

2.4 统计学方法:计量资料多样本均数比较在方差齐性检验基础上运用 *F* 检验,组间比较运用 *q* 检验。计量资料配对设计两样本均数比较运用 *t* 检验。

3 结果

3.1 A 组大鼠气道组织学特征:叶支气管管壁完整,被复上皮细胞增生,但未见合体状或出芽状态改变。无鳞状化生趋势。管腔与同级支气管比较有扩张,腔内散在脓细胞及脱落上皮细胞。少量单核细胞浸润粘膜下层、平滑肌层、支气管周围肺组织。粘膜下层、平滑肌层完整、无萎缩。肺泡腔清晰,有少量炎细胞浸润。间质腔内见少量毛细血管充血。与 C、D 组比较,提示扩张程度减轻、炎性破坏减小,组织结构有较好恢复。

3.2 B 组大鼠气道组织学特征:叶支气管管壁完整,被复上皮细胞增生至 5、6 层,偶见合体状改变,部分呈鳞状化生。管腔与同级支气管比较有扩张,但腔内脓细胞及脱落上皮细胞减少。大量炎性细胞浸润粘膜下层、平滑肌层、支气管周围肺组织。粘膜下层受扩张管腔压迫而萎缩,平滑肌层亦萎缩,但无断裂。肺泡腔内及肺间质腔见大量炎细胞浸润。部分毛细血管及小动、静脉血管充血、瘀血。与 C、D 组比较提示扩张程度减轻、炎性破坏减小,组织结构有较好恢复。

3.3 C、D 组大鼠气道组织学特征:叶支气管管壁有不同程度破坏、断裂。支气管被复柱状纤毛上皮细胞增生到 6、7 层,局部甚至呈合体状或出芽状改变,部分坏死、脱落形成溃疡或鳞状化生。管腔与同级支气管比较显著扩张,腔内充满脓细胞及脱落上皮细胞。大量炎性细胞浸润粘膜下层、平滑肌层、支气管周围肺组织,炎细胞以单核细胞、脓细胞为主,浸润处形成支气管炎、支气管周围炎、肺炎等斑片状病灶。粘膜下层受扩张管腔压迫而萎缩。经 Masson 染色证实平滑肌萎缩、断裂,为增生纤维组织代替。扩张支气管周围肺组织,部分萎缩或代偿性气肿。肺毛细血管或部分支气管伴行小动、静脉充血、出血。

3.4 4 组大鼠淋巴细胞凋亡指数(AI):A 组为 6.61 ± 0.72 ,B 组为 5.70 ± 0.81 ,C 组为 4.63 ± 0.14 ,D 组为 4.41 ± 0.87 ,B、C、D 三组与 A 组比较,差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),D、C 两组与 B 组比较差异有显著性($P < 0.01$)。说明中药可以诱导气道淋巴细胞凋亡。

4 讨论

支扩因多种易感因素,反复作用于支气管,使支气管及其周围肺组织发生慢性炎症,损伤支气管壁而引起支气管扩张和变形。近年来有关支扩的研究集中于参与支扩发病的炎症介质和影像学诊断,而中医药有关支扩的研究偏重于总结辨证论治支扩的临床疗效。中药治疗支扩的报道充分肯定中药的临床疗效,但未能阐明中药治疗支扩的机理。据报道^[2],支扩的病机重点是痰、热、瘀、虚,病位在肺,与肝、胃、肾有关。病性为本虚标实,因实致虚,虚实夹杂,肺肾阴虚为本,风热、风燥、痰热、瘀血为标。幼年宿疾,气阴脉络受损,痰瘀伏肺是支扩发病的夙根。治疗支扩当分标本,治本宜养阴润肺体,益气复肺用;治标宜清热化痰行瘀。在此原则指导下创立的方剂由《景岳全书》桑白皮汤、《统脂方》清金化痰汤演化而来。其中黄芩、桑白皮味苦气寒、清泄肺热;杏仁、全瓜蒌清热化痰、降气止咳;薏苡仁、冬瓜仁健脾益气、化痰利湿、清热排脓,两药配伍取大

