

慢性阻塞性肺疾病西北寒燥证模型 全身炎症反应状态研究

李凤森¹, 高振^{1,2}, 荆晶¹, 徐丹¹, 杨剑^{1,2}, 哈木拉提·吾甫尔^{1,2}

1. 新疆医科大学附属中医医院;慢性阻塞性肺疾病国家中医临床研究基地, 乌鲁木齐 830000
2. 新疆医科大学维吾尔医药系, 乌鲁木齐 830011

摘要 通过测定慢性阻塞性肺疾病 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) 西北寒燥证模型外周血中炎症因子 IL-1 β 、IL-8、IL-10、TNF- α 含量的变化, 揭示 COPD 西北寒燥证模型全身炎症反应状态。利用气管滴注弹性蛋白酶结合熏烟的方法建立 COPD 模型, 在此基础上施以寒燥环境应激以建立 COPD 西北寒燥证模型。利用酶联免疫吸附测定 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 法测其外周血清中 IL-1 β 、IL-8、IL-10、TNF- α 含量。结果表明, 大鼠血清中弹性蛋白酶加熏烟加寒燥组 (酶加 CS 加寒燥组) 的 IL-1 β 含量高于空白对照组 ($P < 0.05$); 模型组 IL-8、IL-10、TNF- α 含量较空白对照组虽有增高趋势, 但 3 组均不具有统计学差异。故而认为, 西北寒燥证 (寒燥) 引起的全身炎症反应主要以增加血清中 IL-1 β 含量为主, 提示西北寒燥证具有加重 COPD 全身炎症的趋势, 方域特色 COPD 的治疗应引起重视; 西北寒燥证参与了 COPD 的发病, 但其不是 COPD 中较重的证型, 应尽早对其加以调控和预防。

关键词 慢性阻塞性肺疾病; 西北寒燥证; 模型; 炎症反应

中图分类号 R2-031

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.18.010

Systemic Inflammatory Response in Cold Dry Syndrome of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Model

LI Fengsen¹, GAO Zhen^{1,2}, JING Jing¹, XU Dan¹, YANG Jian^{1,2}, UPUR Halmurat^{1,2}

1. National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine of Chronic Obstructive Pulmonary Disease; Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China
2. Faculty of Traditional Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract By measuring the contents of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-8, IL-10 and TNF- α in peripheral area of cold dry syndrome of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) model, the cold dry syndrome of the COPD model of systemic inflammatory response is characterized. The COPD model is established by combined cigarette smoke and tracheal instillation of elastase, and in pulse cold and dry environment, the cold dry syndrome of COPD is established. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method is used to measure the blood serum of IL-1 β , IL-8, IL-10 and TNF- α . The results show that in the serum, the cold and dry environment plus CS plus tracheal instillation of elastase group makes the IL-1 β content higher than that in the control group ($P < 0.05$); IL-8, IL-10 and TNF- α are in higher levels than in the control group, in general, but not with a significant difference between the three groups. So it may be concluded that the cold dry syndrome (cold and dry environment) leads to the systemic inflammatory response primarily due to the increase of IL-1 β ; the cold dry syndrome may increase the systemic inflammation level in COPD in some extent; in different areas, different treatments should be used; the cold dry syndrome takes part in COPD, but it does not belong to the heavy type of COPD, and, of course, it should be controlled and prevented.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; cold dry syndrome in the northwest of China; model; inflammation reaction

收稿日期: 2011-04-06; 修回日期: 2011-05-09

基金项目: 新疆名医名方与特色方剂学重点实验室开放课题 (XJDX0910-2009-17)

作者简介: 李凤森, 教授, 研究方向为呼吸系统疾病的中西医结合, 电子信箱: fengsen602@163.com; 哈木拉提·吾甫尔 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S253002398M), 教授, 研究方向为复杂性疾病的中维西医结合, 电子信箱: halmurat@263.net

0 引言

新疆地处中国西北,乃传统中医所谓西北方域,寒燥为主。近有流行病学调查显示,西北(新疆)居民存在不同程度的燥证,且有方域性的特点,同时,分析认为“燥”是诸如过敏性鼻炎、皮肤病、支气管炎,甚至某些心血管疾病等西北(新疆)高发疾病有多发倾向的共同原因^[1]。研究发现,环境温度降低会削弱气道防御能力,导致气道反应性增高,容易诱发慢性支气管炎^[2]。如果寒冷和干燥相配合,那么人体的呼吸道黏膜干燥、弹性减少,免疫力下降,排泄异物的功能减退,导致细菌及病毒在呼吸道生长^[3]。但多年来具有西北特点的高发疾病慢性阻塞性肺疾病 (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD)的病证结合研究尚停留在理论和流行病学调查层面,缺少进一步的微观揭示,不利于疾病地域化、个性化治疗的开展。本研究拟在建立 COPD 西北寒燥证模型的基础上揭示西北寒燥证(寒燥)模型全身炎症反应的影响,为 COPD 的地域化治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 27 只,体重(100±20)g,新疆医科大学实验动物中心有偿提供,许可证号:SCXK(新)2003-001。

1.2 仪器与试剂

FLI-2000H 型人工气候箱 (日本 EYELA 公司,NO:10908061),BS-1105 型电子天平 (北京赛多科斯天平有限公司),香烟(雪莲牌,新疆卷烟厂出品,焦油量 12mg,烟气烟碱量 1.0mg,烟气 CO 量 13mg),弹性蛋白酶(上海华壹生物科技有限公司),大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒、大鼠 IL-8 ELISA 试剂盒、大鼠 IL-10 ELISA 试剂盒、大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (Benter Medsystems)。

1.3 分组与造模

27 只 Wistar 大鼠适应性喂养 2d 后按照随机数字表法随机分为 3 组,即弹性蛋白酶加熏烟组(酶加 CS 组)、弹性蛋白酶加熏烟加寒燥组(酶加 CS 加寒燥组)、空白对照组,每组 9 只。酶加 CS 组于第 30 天按每 100g 体重气管滴注溶于 0.8mL 生理盐水的 20U 弹性蛋白酶,第 1—29 天,31—90 天每天将其置于容积为 420L 的自制亚克力染毒箱内(长、宽、高分别为 60、70、100cm,顶部有一直径为 2.0cm 的排气孔,箱内中部悬挂一台 CPU 风扇,使烟雾均匀分布,并于每次熏烟开始前在箱内放入 250g 硅胶干燥剂),染毒箱连接吸烟装置,用三通管及 100mL 喂食器将香烟抽吸后注入染毒箱内,以 15 吸/min 随时补充烟雾,保持烟雾浓度的相对稳定,每次 9 只大鼠吸烟 1h。期间适当驱赶动物,防止动物聚堆,影响吸烟。在两组动物吸烟中间清洁染毒箱,并打开入口及排气口,电风扇鼓风通气 5min 驱散残存烟雾。酶加 CS 加寒燥组参考前期建立西北寒燥证模型的方法^[4-5]于第 60 天开始每天晚上将大鼠置于系统设置为温度 6℃、相对湿度 25%—32.8%的人工气候箱,每天 10h,建立西北寒燥证模型,其他因素同酶加 CS 组。

空白对照组则在第 30 天以与模型组的相同术式在气管滴注等体积的生理盐水。

气管内滴注弹性蛋白酶方法:手术器械术前进行高压蒸汽灭菌(121℃,120kPa,30min),将大鼠逐一称重,按 50mg/kg 体质量腹腔注射浓度为 0.4%戊巴比妥钠溶液,以钳夹爪尖无反应为麻醉成功标准,将大鼠钝固定于鼠板上,使用 16 号套管针顺大鼠舌头慢慢送入气管,拔出针,接 1mL 针管(内含所需剂量的弹性蛋白酶),置头高脚低位,呈 45°,向左倾斜,缓慢推入半量溶液,向右倾斜,再缓慢推入另外半量溶液。回到中间,注入 1mL 空气,使剩余的液体全部进入肺部,再轻拍老鼠背部,使弹性蛋白酶溶液在肺内均匀分布。注意保温,待大鼠清醒后放回原鼠盒中饲养。

1.4 观测指标

经下腔静脉抽血离心,取其上清液移入无菌瓶内,并放在-70℃的超低温冰箱中待测。检测时采用双抗体夹心 ELISA 法测定,严格按照试剂盒说明步骤操作。

1.5 统计方法

实验数据采用 SPSS 11.5 统计软件分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,凡符合正态分布和方差齐的数据采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),多组间两两比较采用 LSD 检验,若方差不齐则用 Tamhane 方法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 各组模型血清中 IL-1 β 含量比较

表 1 为三组大鼠血清中 IL-1 β 含量比较。IL-1 β 是前炎症免疫反应的主要诱导剂,动物实验证明其可诱发厌食、体重减轻等不良反应。由表 1 可以看出,酶加 CS 加寒燥组 IL-1 β 含量高于空白对照组 ($P < 0.01$),酶加 CS 组和空白对照组相比、酶加 CS 组和酶加 CS 加寒燥组相比,差异不具有统计学意义,但酶加 CS 加寒燥组高于酶加 CS 组,酶加 CS 组高于对照组。

表 1 三组大鼠血清中 IL-1 β 含量比较

Table 1 Comparison of IL-1 β content among three groups

组别	例数	IL-1 β 含量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
酶加 CS 组	5	12.41±1.33
酶加 CS 加寒燥组	7	15.38±1.52*
空白对照组	6	11.57±0.80

注:*,与空白对照组比较 $P < 0.05$ 。

Note: *, contract with control group $P < 0.05$.

2.2 各组模型血清中 IL-8、IL-10、TNF- α 含量比较

IL-8 是全身炎症反应的一种重要炎症因子,在炎症反应中起重要作用。它不仅能吸引中性粒细胞、T 细胞和嗜碱粒细胞,还能刺激中性粒细胞产生白细胞三烯 B₄。TNF- α 是一种多功能的细胞因子,在 COPD 炎症反应中,能诱导内皮细胞表

达黏附分子,从而介导白细胞黏附于血管内皮细胞,导致白细胞在炎症部位聚集,还可引起动物和人类的气道高反应性。IL-10 是一种抑制炎症反应的细胞因子,可抑制促炎细胞因子(TNF- α 、IL-8 等)的合成和释放,在细胞免疫中具有调节免疫的功能。表 2—表 4 分别给出了三组大鼠血清中 IL-8、IL-10 和 TNF- α 的含量。由表 2—表 4 可知,三组大鼠血清中 IL-8、TNF- α 、IL-10 含量比较,均不具有统计学差异,但对 IL-8、TNF- α 含量来说酶加 CS 加寒燥组高于酶加 CS 组,酶加 CS 组高于空白对照组;IL-10 酶加 CS 加寒燥组和酶加 CS 组含量基本相同,均低于空白对照组。

表 2 三组大鼠血清中 IL-8 含量比较

Table 2 Comparison of IL-8 content among three groups

组别	例数	IL-8 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
酶加 CS 组	7	139.83 $\pm$ 9.35
酶加 CS 加寒燥组	7	141.01 $\pm$ 5.40
空白对照组	5	128.89 $\pm$ 5.80

表 3 三组大鼠血清中 IL-10 含量比较

Table 3 Comparison of IL-10 content among three groups

组别	例数	IL-10 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
酶加 CS 组	5	26.35 $\pm$ 1.38
酶加 CS 加寒燥组	7	26.74 $\pm$ 1.85
空白对照组	7	30.64 $\pm$ 1.83

表 4 三组大鼠血清中 TNF- α 含量比较

Table 4 Comparison of TNF- α content among three groups

组别	例数	TNF- α 含量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
酶加 CS 组	7	55.42 $\pm$ 3.14
酶加 CS 加寒燥组	7	59.10 $\pm$ 4.20
空白对照组	5	48.96 $\pm$ 1.14

3 讨论

新疆地处中国西北,气候干燥寒冷,取暖期长,每年需供暖 6 个月以上,目前以燃煤为主要取暖燃料,加重了大气污染,而大气污染又与 COPD 的发病^[6]及死亡^[7]有着很大关系,并且取暖月份长短与 COPD 患病率存在剂量反应关系^[8]。同时,西起吐鲁番、哈密地区,直至延伸到河套地区是中国西北地区最大的强沙尘暴出现区域,北疆克拉玛依地区、南疆和田地区和青海西北地区还有 3 个局地性沙尘暴区^[9]。沙尘暴是潜在的过敏性和非过敏性系统疾病的激发因素^[10]。凡此导致了 COPD 在新疆的高发。同时有研究认为,温、压、湿等气象因子对 COPD 的发生具有十分显著的影响,不同地区的气候条件对疾病的影响既有普遍相似的共性,也存在一些地区性的差异^[11]。前期基于大规模流行病学调查的数据结果也显示,西北(新疆)确实存在不同程度的燥证,而且有着方域性的特点^[1]。故可以认为燥证可能为西北(新疆)人群主要基础证(或曰体质),正是由于这种基础证的存在,导致了 COPD 的

高发倾向。而对于基础证的存在相当于为“病”的发生提供了滋生的土壤,影响“病”的特点和治疗,如果不及时对其加以治疗,必将影响“病”的疗效。在多年临床的基础上,总结 COPD 西北寒燥证的临床特点为“局部燥,全身寒”、“内燥外寒”,并将温肺润燥法作为治疗 COPD 的干预手段之一,取得一定的临床疗效。

本研究综合考虑了目前建模的各种利弊,选择相对比较成熟的建模方法,并适当延长建模时间和叠加进行,选择熏烟复合气管滴注弹性蛋白酶的方法。以前有研究认为单纯气管滴注弹性蛋白酶的方法可以造成 COPD^[12],但也有研究认为该法虽简便稳定,造成的病变却与人类常见的由长期吸烟引起的病变不完全一致,且病变往往分布不均。为了弥补这种不足,本研究在气管滴注弹性蛋白酶的同时,给予大鼠熏烟 90d,主要基于以下实验结果考量:(1)用 Wistar 大鼠 8 周单纯熏烟即可以建立很好的 COPD 模型^[13];(2)在自制的染毒箱中采用烟草雾模拟吸烟,发现吸烟 7 周后的大鼠出现支气管上皮细胞明显脱落、肺泡结构紊乱、部分肺泡壁变薄、肺泡融合、肺泡腔扩大、气道阻力增加及动态呼吸系统总顺应性下降,呈现出 COPD 的主要特征^[14];(3)采用熏吸香烟法^[15],3 次/d,每次 10 支,45d 和 90d 后均成功复制大鼠肺气肿模型;(4)以弹性蛋白酶气管滴注后熏烟 30d 即成功建立 COPD 模型^[16-17]。本实验滴注弹性蛋白酶的同时熏烟 90d,确保了模型建立的成功性。

本研究在建立 COPD“病”的同时加以模拟西北寒燥环境复合因素建立 COPD 西北寒燥证的模型,旨在揭示寒冷干燥环境对 COPD 发病的影响。目前笔者未见相关实验报道。研究发现,除 IL-1 β 外,IL-8、IL-10、TNF- α 含量相比均不具统计学意义,但有增加炎症反应的趋势,一定程度上证实了 COPD 不仅是一种局限于肺部的炎症反应性疾病,而且有着全身的炎症反应状态,并且寒燥环境具有促进 COPD 患者全身炎症反应的趋势。IL-1 β 具有多种生物学作用,具有介导炎症反应、促进 T 细胞和 B 细胞增殖和分化,参与免疫调节、影响代谢、刺激造血细胞和引起发热等作用。IL-8 能够趋化、活化白细胞,抑制中性粒细胞凋亡,延长中性粒细胞寿命,对 COPD 的气道炎症起着引发、维持、甚至加重的重要作用^[18]。TNF- α 可以增强白细胞对损伤的免疫反应,以自分泌形式作用于单核巨噬细胞使其释放各种炎性介质,增加对病原体的吞噬和消化,并促进炎性细胞因子的释放,但同时也扩大了炎症反应,引起组织损伤。周立新等^[19]的实验结果显示,COPD 病人血清 IL-10 水平明显低于正常组,在急性加重期尤为明显。由以上实验结果可以认为,西北寒燥证在新疆虽广泛存在,但并非特别严重,可以调控和预防。

4 结论

(1) 西北寒燥证(寒燥)引起的全身炎症反应主要以增加血清中 IL-1 β 含量为主,提示西北寒燥证具有加重 COPD 全身炎症的趋势,方域特色 COPD 的治疗应引起重视。

(2) 西北寒燥证参与了 COPD 的发病,但其不是 COPD 中较重的证型,应尽早对其加以调控和预防。

参考文献 (References)

- [1] 周铭心. 西北燥证概述[J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(11): 43-45.
Zhou Mingxin. *Shanghai Journal of TCM*, 2005, 39(11): 43-45.
- [2] 岳海燕, 申双和. 呼吸道和心脑血管疾病与气象条件关系的研究进展 [J]. 气象与环境学报, 2009, 25(2): 57-61.
Yue Haiyan, Shen Shuanghe. *Journal of Meteorology and Environment*, 2009, 25(2): 57-61.
- [3] 梁剑辉. 冬春须防寒—认识低温对 COPD 的影响[J]. 澳门医疗与健康, 2010, 11(1): 11-12, 14.
Liang Jianhui. *Macao Medical and Health*, 2010, 11(1): 11-12, 14.
- [4] 高振, 阿地力江·阿不力米提, 哈木拉提·吾甫尔. 干燥寒冷环境对小鼠生物表征的影响[J]. 科技导报, 2008, 26(14): 84-87.
Gao Zhen, Abulimiti Adilijiang, Upur Halmurat. *Science and Technology Review*, 2008, 26(14): 84-87.
- [5] 高振, 胡汉华, 刘莹莹, 等. 西北寒燥证候模型下丘脑-垂体-肾上腺轴紊乱状态研究[J]. 中医杂志, 2010, 51(10): 928-930.
Gao Zhen, Hu Hanhua, Liu Yingying, et al. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 51(10): 928-930.
- [6] Kara M. Preparing nurses for the global pandemic of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Nurs Scholarsh*, 2005, 37(2): 127-133.
- [7] 阚海东, 陈秉衡, 贾健. 上海市大气污染与居民每日死亡关系的病例交叉研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10): 864-866.
Kan Haidong, Chen Bingheng, Jia Jian. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2003, 24(10): 864-866.
- [8] 李小芡, 胡志, 李守田, 等. 安徽农村不同居住环境对慢阻肺患病率的影响[J]. 中国农村卫生事业管理, 2002, 22(4): 46-48.
Li Xiaoqian, Hu Zhi, Li Shoutian, et al. *Chinese Rural Health Service Administration*, 2002, 22(4): 46-48.
- [9] 孟紫强, 胡敏, 郭新彪, 等. 沙尘暴对人体健康影响的研究现状 [J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 471-472.
Meng Ziqiang, Hu Min, Guo Xinbiao, et al. *China Journal of Public Health*, 2003, 19(4): 471-472.
- [10] Kwaasi A A, Parhar R S, Al-Mohanna F A, et al. Aeroallergens and viable microbes in sandstorm dust, Potential triggers of allergic and nonallergic respiratory ailments[J]. *Allergy*, 1998, 53(3): 255-265.
- [11] 阴俊, 谈建国, 竺丽明, 等. 不同地区慢性阻塞性肺病与气象因子相关性分析[J]. 气象科技, 2007, 35(6): 843-845.
Yin Jun, Tan Jianguo, Zhu Liming, et al. *Meteorological Science and Technology*, 2007, 35(6): 843-845.
- [12] Mahadeva R, Shapiro S D. Chronic obstructive pulmonary disease: Experimental animal models of pulmonary emphysema[J]. *Thorax*, 2002, 57(10): 908-914.
- [13] 宋小莲, 王昌惠, 白冲. 脂多糖结合熏烟法和单纯熏烟法建立慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的比较 [J]. 第二军医大学学报, 2010, 31(3): 248-250.
Song Xiaolian, Wang Changhui, Bai Chong. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2010, 31(3): 248-250.
- [14] 迟春花, 何冰, 汤秀英, 等. 烟草雾吸入导致慢阻肺机制的实验研究—大鼠 Clara 细胞结构及其分泌蛋白的变化 [J]. 心肺血管病杂志, 2000, 19(3): 224-227.
Chi Chunhua, He Bing, Tang Xiuying, et al. *Journal of Cardiovascular and Pulmonary Disease*, 2000, 19(3): 224-227.

- [15] Cendon S P, Battlehner C, Lorenzi Filho G, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: An experimental study in rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 1997, 30(10): 1241-1247.
- [16] 曾祥伯. COPD 模型大鼠骨骼肌细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 表达的实验研究[D]. 长沙: 中南大学, 2008.
Zeng Boxiang. Experimental study on skeletal muscle apoptosis and the expression of Bcl-2 and Bax in COPD rats[D]. Changsha: Central South University, 2008.
- [17] 孙圣华. TNF- α 对 COPD 营养不良动物模型骨骼肌蛋白质分解代谢的影响及可能的机制[D]. 长沙: 中南大学, 2006.
Sun Shenghua. Effect of TNF- α on proteolysis of skeletal muscle in rats with COPD and its mechanism [D]. Changsha: Central South University, 2006.
- [18] 侯静静, 朱蕾. 白介素-8 与慢性阻塞性肺疾病 [J]. 国外医学: 呼吸系统分册, 2005, 25(6): 427-429.
Hou Jingjing, Zhu Lei. *International Journal of Respiration*, 2005, 25(6): 427-429.
- [19] 周立新, 陈凤娥, 张秀平, 等. 白细胞介素-10 在慢性阻塞性肺病患者血清中的表达及意义[J]. 数理医药学杂志, 2000, 13(6): 499-500.
Zhou Lixin, Chen Feng'e, Zhang Xiuping, et al. *Mathematics and Physics Medicine Journal*, 2000, 13(6): 499-500.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·



2011 中国汽车工程学会 越野车技术分会 学术年会暨中国越野车 发展高峰论坛

中国汽车工程学会越野车技术分会将于 2011 年 9 月 14—15 日在北京召开“2011 中国汽车工程学会越野车技术分会学术年会暨中国越野车发展高峰论坛”。

本届会议是我国首次针对越野车技术发展和产品交流的盛会,会议秉承和弘扬“绿色畅想、激情驾驭”的理念,针对我国越野车行业发展政策、技术革新、节能减排等问题进行交流讨论;是集高层论坛、主题报告、技术交流、车辆及零部件展示和实地参观考察等形式于一体的综合性盛会。

通信地址: 北京市海淀区中关村南大街 5 号院;联系电话: 010-52718630;电子邮箱: milauto@126.com。