临床研究 文章编号：0253-3626(2009)04-0469-03

慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织中 LTB4 和 15-HETE 的含量变化及异丙托溴铵对其影响

吴忠练[1]，徐 玲[2]

（1. 重庆医科大学中医药学院中医临床基础教研室，重庆 400331；
2. 重庆医科大学附属第一医院呼吸内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨慢性阻塞性肺疾病（Chronic obstructive pulmonary disease，COPD）大鼠模型肺组织中白三烯 B4（Leukofriene B4，LTB4）与 15- 羟化二十碳四烯酸（15-hydroxyeicosatetraenoic acid，15-HETE）含量的变化以及异丙托溴铵对其的影响。方法：36 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 A 组（对照组）、B 组（COPD）、C 组（异丙托溴铵组），每组 12 只。测定各组大鼠肺功能、肺组织匀浆液中的 LTB4/5-HETE 的含量。结果：COPD 大鼠用力呼吸量（Forced expirafory volum in the 0.3 scond，FEV0.3）/ 用力肺活量（Forced vifal capacity，FVC）%较对照组显著下降（$P<0.001$），Ri 和 Re 较对照组显著增加（$P<0.001$，$P<0.05$），肺组织匀浆液 LTB4 和 15-HETE 较对照组显著升高（$P<0.001$）；异丙托溴铵的干预可显著降低肺组织中 LTB4 和 15-HETE 的水平（$P<0.001$），但对肺功能无明显改善。结论：COPD 大鼠 LTB4/15-HETE 水平增高，参与气道炎症过程。异丙托溴铵的治疗可降低肺组织中的 LTB4、15-HETE 水平，改善气道炎症。

【关键词】白三烯 B4；15- 羟化二十碳四烯酸；肺疾病；慢性阻塞性；疾病模型；动物；异丙托溴铵
【中国图书分类法分类号】R563 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-06

Changes of LTB4 and 15-HETE in lung of rats with chronic obstructive pulmonary disease and the effects of ipratropium

WU Zhong-lian, et al

(*Department of Clinical basic of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of leukotriene B4 (LTB4), 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE) in lung of an animal model with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and the effects of ipratropium. *Methods*: Thirty-six male Wistar rats were randomized into three groups, Group A (normal controls, group B (COPD), group C (smoking + ipratropium), with 12 rats in each group. Group C receiving inhaling ipratropium 0.025% 10ml and once a day for 23 days. Pulmonary functions of the rats were assessed, concen-trations of LTB4 15-HETE in lung tissue were measured by RP-HPLC. *Results*: The lung functions of FEV0.3/FVC% in COPD rats declined obviously ($P<0.001$), While LTB4, 15-HETE concentrations in lung tissue and lung functions of Ri, Re increased significantly as compared with the normal controls ($P<0.001$, $P<0.05$). Treatment with ipratropium Obviously increased the levels of LTB4 and 15-HETE in lung tissue of the COPD rats ($P<0.001$). However ipratropium had little effect on FEV0.3/FVC%, Ri and Re ($P>0.05$). *Conclusion*: Our results suggest that LTB4 and 15-HETE are involved in airway inflammation in COPD. Ipratropium is effective in decreasing the levels of LTB4 and 15-HETE in lung tissue of COPD rats, and attenuating inflammatory changes of airways.

【Key words】Leukotriene B4; 15-hydroxyeicosatetraenoic acid; Pulmonary disease, Chronic obstructive; Disease models; Animal; Ipratropium

慢性阻塞性肺病（Chronic obstructive pulmonary disease，COPD）是一种以气流受限为特征的疾病，患者气流受限不完全可逆，并进行性发展，与有害颗粒和气体导致的肺部炎症反应有关。白三烯 B4（LTB4）与 15-羟化二十碳四烯酸（15-HETE）在 COPD 的发病中起重要作用，但相关研究较少，且多限于 COPD 患者尿液中 LTB4 检测，而对于药物干预白三烯（LTs）合成或者阻断其效应后气道炎症、气道重塑情况、肺功能有无改善尚无相关报道。本研究旨在探讨 COPD 大鼠模型肺中 LTB4 与 15-HETE 的变化，为 COPD 发病机制作一探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

将清洁 Wistar 雄性大鼠 36 只，鼠龄 10 周，体重 120~240 g 之间（由中国人民解放军第三军医大学大坪医院动物中心提

作者介绍：吴忠练（1961- ），男，讲师，
研究方向：慢性阻塞性肺疾病机制及药效研究。
通讯作者：徐 玲，女，副教授，E-mail：xl6534@yahoo.com.cn。
基金项目：重庆市卫生局（04-2-104）。

供),用随机数字表分成 3 组,每组 12 只,即 A 组(正常对照组)、B 组(COPD 组)和 C 组(吸烟 + 异丙托溴铵组)。

1.1.1 COPD 模型的制作 参照宋一平等人的方法[1],B、C 两组大鼠 Wistar 分别于第 1、15 气道内注入生理盐水溶解的 LPS (Lipopdy 细菌脂多糖) sacoharide (200 μg/100 μl);第 2 ~ 14 d,16 ~ 31 d 每隔 6 h 将大鼠置于密闭玻璃染毒箱中,将香烟插在 50 ml 注射器针头上点燃后连续抽吸将烟雾注入箱内达到 5%左右浓度(3 600 ml/ 每次),使大鼠被动吸烟,持续 30 min 后将大鼠移出箱子,每天 2 次,其余时间正常喂养。

1.1.2 给药方法 自第 8 d 起每日 1 次将 C 组大鼠置于密闭玻璃箱中, 雾入 0.025%的异丙托溴铵溶液 10 ml (10 min 内雾完),持续吸入气溶胶 20 min 后取;其余两组用同样方法吸入等量的生理盐水。

1.2 肺功能测定

10%乌拉坦 10 ml/kg 腹腔内注射麻醉后,行气管切开置入气管导管,将大鼠放入体描箱内,外接小动物肺功能检测分析系统(北京航天新概念软件公司),记录大鼠 8 个自主呼吸周期,获得气道压力 P,容积变化 V,相应计算得到呼吸相气道阻力(Re)、吸气相气道阻力(Ri);快速向大鼠气道内注入 6 ml 空气造成大鼠被动深呼吸,即刻测定用力肺活量(FVC)、0.3 s 呼气容积(FEV 0.3)及 0.3 s 用力呼气容积/用力肺活量(FEV 0.3/FVC)等指标。

1.3 肺组织匀浆 LTB4、15-HETE 的测定

反相高效液相色谱法(RP-HPLC)、以 PGB2 为内标,测定各组肺组织匀浆液中的 LTB4、15-HETE 的含量。参照 Jörg Eberhard 等[2]人的方法。

1.3.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配置 Agilent 1100 UV 检测器及色谱数据处理系统;TGL-16 高速台式离心机(上海医用分析仪器厂),超声波清洗器(KQ2200B 型,昆山市超声仪器有限公司),SK-1 快速混匀器 (江苏国华仪器)。固相萃取仪(Agilent 公司),Bond—Elut C18 固相萃取小柱(Analytichem Internation 公司)

1.3.2 试剂 PGB2 标准品(Prostaglandin B2 前列 B2)(美国 Sigma 公司产品);LTB4 标准品 (美国 Sigma 公司产品);15-HETE 标准品(美国 Sigma 公司产品);甲醇、乙晴(色谱纯,Merck 公司),其他试剂均为分析纯。

1.3.2.1 溶液的配制

1.3.2.1.1 LTB4、15-HETE、PGB2 标准品储备液配制

(1) LTB4 储备液:精密称取 LTB4 标准品 10 mg,于 10 ml 容量瓶中,加入 2 ml 甲醇溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,LTB4 的质量浓度为 1 mg/ml。

(2)15-HETE 储备液:精密称取 15-HETE 标准品 10 mg,于 10 ml 容量瓶中,加入 2 ml 甲醇溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,15-HETE 的质量浓度为 1 mg/ml。

(3)PGB2 储备液:精密称取 PGB2 标准品 10 mg,于 10 ml 容量瓶中,加入 2 ml 甲醇溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,PGB2 的质量浓度为 1 mg/ml。

1.3.2.1.2 LTB4、15-HETE、PGB2 工作液配制

(1) LTB4 工作液: 精密吸取浓度为 1 mg/ml LTB4 储备液 0.5 ml,于 50 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,LTB4 的质量浓度为 1 μg/ml。

(2) 15-HETE 工作液:精密吸取浓度为 1 mg/ml LTB4 储备液 5 ml,于 50 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,15-HETE 的质量浓度为 100 μg/ml。

(3)PGB2 工作液: 精密吸取浓度为 1 mg/ml PGB2 储备液 5 ml,于 50 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,PGB2 的质量浓度为 100 μg/ml。

1.3.2.2 样品的预处理 取出大鼠肺,生理盐水洗净组织表面残血,滤纸吸干后,精密称取组织样品 0.3 g,加入内标 PGB2 溶液(100 μg/ml)20 μl,加入 0.7 ml PBS(pH7.4)缓冲液,手动匀浆,4 000 r/min 离心 10 min,取匀浆液 0.4 ml,加入 0.8 ml 乙晴沉淀蛋白,混匀,15 000 r/min 离心 15 min,将上清液倒入 10 ml 刻度试管中,加水至 10 ml,混匀后上 C18 固相萃取小柱(小柱预先用甲醇 3 ml 活化,3 ml 双蒸水平衡),然后依次用 10 ml 双蒸水,10 ml 15%甲醇洗小柱,抽干,最后以 0.5 ml 甲醇洗脱待测组分,收集甲醇洗脱液,混匀,取 100 μl 进行 HPLC 分析,记录峰面积,内标法定量。

1.3.2.3 色谱条件 色谱柱:ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm);流速:1 ml/min;柱温:30℃LTB4:流动相:

A 液:乙腈:水:乙酸(75:25:0.002)

B 液:7.5 超纯水/38.5%乙腈/54%甲醇/0.002%乙酸(V/V)

C 液:7.5 超纯水/38.5%乙腈/54%甲醇/0.018%乙酸(V/V)

检测波长:280 nm 15-HETE:流动相:A 液:乙腈:水:乙酸(75:25:0.002)

B 液:7.5 超纯水/38.5%乙腈/54%甲醇/0.002%乙酸(V/V)

C 液:7.5 超纯水/38.5%乙腈/54%甲醇/0.018%乙酸(V/V)

检测波长:237 nm

1.4 统计处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计计算均由 SPSS11.0 软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 q 检验。

2 结 果

2.1 一般情况

在测定肺功能时,3 组大鼠的体重无显著性差异 (分别为 238 g ± 43.0 g、237 g ± 47.7 g、235 g ± 30.9 g)。实验过程中 B 组有 2 只大鼠于第 5 d 死亡,C 组大鼠于第 11 d 死亡 1 只。导致死亡的主要原因考虑为自相残杀、麻醉过量、感染,部分死亡大鼠解剖发现肺脓肿形成、肺实变坏死。B、C 组大鼠在后期逐渐出现倦怠、不思饮食、毛发光泽度下降、脱落,同对照组比较体重无差异,可能与实验时间较短有关。

2.2 肺功能检测

B、C 组的 FEV0.3/FVC%较 A 组显著下降($P<0.001$),Ri 和 Re 较 A 组显著增加($P<0.001$,$P<0.05$)。B、C 组两组间比较,C 组 FEV0.3/FVC%稍有减退,Ri、Re 有增高,但差异无统计学意义(表 1)。

2.3 肺组织匀浆中 LTB4、5-HETE 的含量

B、C 组 LTB4 及 15-HETE 较 A 组显著升高($P<0.001$),与 B 组比较,C 组的肺组织匀浆中 LTB4 和 15-HETE 有显著

下降(P<0.001)(表 2)。

表 1 各组肺功能测定指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	$FEV_{0.3}$/FVC(%)	Ri ((KPa·s)/L)	Re ((KPa·s)/L)
A 组	84.22 ± 9.51	27.220 ± 1.372	30.300 ± 4.937
C 组	70.68 ± 4.64	36.391 ± 6.274	36.283 ± 5.804
B 组	72.13 ± 4.81	33.870 ± 3.64	35.750 ± 2.89
P 值	<0.001	<0.001	<0.05

表 2 各组肺组织匀浆 LTB4 和 15-HETE 的测定结果比较($\bar{x}\pm s$;单位:ng/g;n=6)

组别	LTB4	15-HETE
A 组	10.36 ± 0.51	265.27 ± 9.44
C 组	33.71 ± 1.21	385.41 ± 15.19
B 组	56.04 ± 2.98	681.29 ± 31.82
P 值	<0.001	<0.001

3 讨 论

肺功能检查对 COPD 的诊断及评价其严重程度具有重要意义。在肺功能检测指标中,1 s 用力呼吸容积(FEV1)与肺活量(FVC)的比值是检测有无气流阻塞的一项敏感指标,如有 FEV1/FVC%下降即可诊断有气流阻塞,Re 则在大气道通畅的情况下反映了小气道的阻力情况。本实验中,B、C 组的 FEV0.3/FVC%较对照组显著下降(P<0.001),表明两组大鼠均存在气流阻塞;Ri 和 Re 较对照组显著增加(P<0.001,P<0.05),表明两组大鼠小气道阻力增加;B、C 组两组间比较,C 组 FEV0.3/FVC%稍有减退,Ri、Re 增高,但是两组间差异无显著性(P>0.05),表明异丙托溴铵对 COPD 的肺功能有一定影响,但作用不明显。

反相高效液相色谱法具有简便快速、专属性强、准确可靠的特点[3,4]。因此,本实验采用此法进行 LTB4、15-HETE 的检测。

LTB4 是体内产生的最强的白细胞趋化因子之一,参与了体内多种免疫和炎症的发生发展过程。外周血细胞在钙离子诱导剂 A23187 作用下产生 LTB4、LTC4 水平在 COPD 患者较正常对照有显著增加,且同 FEV1 水平呈负相关,说明 LTB4 参与了 COPD 的发病[5]。在慢支炎患者痰中可溶性 15-HETE 和细胞 15-HETE 均较正常人群有显著升高,巨噬细胞、中性粒细胞表达 15-LOmRNA 的细胞百分比增加,而外周血中性粒细胞不表达,提示 15-LOmRNA 的合成发生在中性粒细胞迁徙入气道时。因此,通过抑制花生四烯酸的代谢可减少中性粒细胞的浸润,打断炎性细胞自身趋化作用从而减轻气道炎症[6]。因此认为,LTB4、15- 羟化二十碳四烯酸参与 COPD 的发病过程,而阻断其生物合成或拮抗其作用,则可能成为 COPD 治疗的新途径之一[7]。运用原位杂交测定诱导痰中细胞 15-LOmRNA 的表达,反相高效液相层析法测定花生四烯酸的代谢产物 15-HETE (15- 羟甘碳四烯酸),本实验中,B、C 组的肺组织 LTB4 和 15-HETE 较 A 组显著升高(P<0.001),表明两组大鼠肺部存在较明显的炎性反应;与 B 组比较,C 组的肺组织 LTB4 和 15-HETE 有显著下降(P<0.001),表明异丙托溴铵对 COPD 大鼠的肺组织炎性反应有明显的抑制作用。

异丙托溴胺是季胺类抗胆碱能药物,可选择性的阻断支气管平滑肌上的 M 受体,减轻副交感神经张力,促进黏稠的清除,舒张支气管平滑肌,从而减轻气道阻力,在 COPD 患者的治疗中常作为一线治疗药物。本实验结果可见,异丙托溴铵对 COPD 大鼠气道阻塞、总的阻力改善不明显,可能与样本量小、给药时间短有关,对于其作用机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] 宋一平,崔德健,茅培英.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.

[2] Jrg Eberhard et al. Quantitation of arachidonic acid metabolites in small tissue biopsies by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry,2000,280(2):258-263.

[3] 康博欣,马丽丽,门金玉,等.反相高效液相色谱法同时测定心宁片中盐酸川芎嗪和羟基红花黄色素 A 的含量[J].药物分析杂志,2008,28(12): 2015-2017.

[4] 杜建红,李云兰,李青山.反相高效液相色谱法测定抗癌原料药二氯二茂钛的含量[J]. 中国现代药物应用,2009,3(1):28-29.

[5] Fumihiro, Mitsunobu, Takashi, et al. Enhanced production of Leukotrienes by peripheral leukocytes and speacific IgE antibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Journal of Allergy Clinical Immunology,2001,107(3):492-498.

[6] Profita M, Sala A, Riccobono L, et al.15(S)-HETE modulates LTB(4)production and neutrophil chemotaxis in chronicbronchitis[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2000,279(4):1249-1258.

[7] Stephen Kilfeather. 5-lipoxygenase inhibitors for the treatment of COPD[J]. Chest,2002,121 (S 5):197-200.

(责任编辑:关蕴良)