DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.042

论著

文章编号:1000-5404(2001)05-0576-03

溴化异丙托品抑制慢性支气管炎大鼠气道粘蛋白高分泌的观察

刘维会,杨肇亨,黄 勇,洪 新 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨毒蕈碱乙酰胆碱能受体拮抗剂溴化异丙托品及阿托品对气道粘蛋白高分泌的作用。方法 采用一次性气管内注入脂多糖复制大鼠慢支炎模型,观察3周后的病理学改变、支气管肺泡灌洗液和气管环培养液中粘蛋白量的变化,以及雾化吸入溴化异丙托品及阿托品的影响。结果 注入脂多糖后的病理学表现符合慢支炎的改变。溴化异丙托品和阿托品都显著减少气管上皮杯状细胞数目及粘蛋白的分泌。但溴化异丙托品抑制粘蛋白分泌的作用显著强于阿托品。结论 毒蕈碱乙酰胆碱能受体途径在慢支炎大鼠气道粘蛋白的高分泌中起重要作用,溴化异丙托品明显抑制粘蛋白高分泌,其作用强于阿托品,且对粘液纤毛清除功能无阿托品样抑制作用。

关键词:慢性支气管炎;粘蛋白;溴化异丙托品;阿托品;毒蕈碱乙酰碱能受体
中图法分类号:R562.210.2;R971.92 文献标识码:A

Inhibition of airway mucin hypersecretion by ipratropium bromide in chronic bronchitis of rats

LIU Wei-hui, YANG Zhao-heng, HUANG Yong, HONG Xin (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ipratropium bromide and atropine on airway mucin hypersecretion in the chronic bronchitis model of rats. Methods The model was established by intratracheal instillation of small dose of lipopolysaccaride (200 μg) ipratropium bromide and atropine were administrated 3—21 d after the model was established. Pathological changes, mucin in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and tracheal ring culture medium were examined before and after the adnsinistration of ipratropium bromide and atropine. Results Characteristic pathological manifestions of chronic brochitis were found after instillation of LPS. Significant decrease in the number of tracheal epithelia goblet cells, secretion of mucin were observed in ipratropium bromide and atropine treated rats. The effect of inhibiting the secretion of mucin of ipratropium bromide was higher than atropine. Conclusion It suggests that muscarinic acetylcholine receptor plays an important role in airway mucin hypersecretion in chronic bronchitis model of rat. Ipratropium bromide exhibit a stronger inhibition effect on mucin hypersecretion than atropine, moreover no inhibition effect on mucociliary clearance which was observed in atropine.

Key words: chronic bronchitis; mucins; muscarinic receptors; ipratropium bromide; atropine

慢性支气管炎的一个重要病理生理特征是粘液分泌细胞(主要是上皮杯状细胞和粘膜下腺体细胞)的增生肥大、分泌亢进,粘液纤毛清除功能受损。粘液潴留可加重感染和气道阻塞,并使气体交换障碍[1,2]。毒蕈碱乙酰胆碱能受体(mAChR)支配气道平滑肌和分泌细胞[3],mAChR拮抗剂已经成为慢性支气管炎主要的治疗手段之一,但目前研究较多的是其解除气道痉挛的作用,而对粘液分泌和清除的研究较少。我们采用脂多糖气管内注入的方法复制了大鼠慢性支气管炎模型,对mAChR拮抗剂溴化异丙托品及阿托品在气道粘液的核心成分-粘蛋白高分泌中的作用进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 大鼠慢性支气管炎模型制作、处理

49只健康雄性Wistar大鼠,体重200~250 g,随机分为正常对照组、慢性支气管炎组各14只,溴化异丙托品组、阿托品组、生理盐水组各7只。

除正常对照组外,其余大鼠麻醉后经气管插管注入200 μg脂多糖(Lipopolysaccharide, *E. coli* O111:B4,用生理盐水配制成1 mg/ml溶液)。第8~21天,每天2次,将药物干预组大鼠置于69 cm×49 cm×39 cm有机玻璃箱内,分别雾入0.025%溴化异丙托品溶液、硫酸阿托品溶液或生理盐水80 ml。

分离暴露每组各7只大鼠气管并插管,无钙镁Hanks液5 ml灌注2次,支气管肺泡灌洗液(BALF)1 h内行细胞计数,其余BALF 1 000 r/min离心10 min,上清液-70 ℃保存,沉淀物涂片,白细胞分类。

经左心室→主动脉弓灌注固定及气管内固定,支气管肺标本在相同固定液继续固定24 h,常规脱水,石蜡包埋,HE、阿尔辛蓝-过碘酸雪夫氏染色(AB-PAS),并用免疫组化S-P法染分泌细胞内粘蛋白(RTE11单克隆抗体)。

图像分析:HE染色切片测定腺体及气管厚度,AB-PAS染色切片测定每平方毫米气管上皮中杯状细胞数目,免疫组化染色切片测定腺体和杯状细胞阳性染色的平均光密度(AOD)、粘蛋白面积%(阳性染色面积与腺体细胞面积或气管上皮面积之比)。

1.2 气管环的制备及培养

离断摘出另外14只对照组和慢支组大鼠气管,切成1 mm厚气管环,每只随机取6个气管环放入培养板的3个孔内,分

作者简介:刘维会(1969—),男,黑龙江省人,主治医师,主要从事慢性支气管炎发病机制方面的研究,现在沈阳军区大连疗养院。电话:(0411)2389860

收稿日期:2000-11-14;修回日期:2001-02-23

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

别加入 1 ml RPMI-1640 培养基、1 ml RPMI-1640+10^{-6} mol/L 溴化异丙托品、1 ml RPMI-1640+10^{-6} mol/L 阿托品, 37 ℃及 5% CO_2、95%空气中培养 24 h。培养液经 1 000 r/min 离心 10 min, 上清液−70 ℃保存。

1.3　ELISA 法粘蛋白含量测定

待测品包被酶标板, 40 ℃过夜, 稀释液室温孵育 1 h, RTE11 单抗稀释液 37 ℃孵育 1 h, HRP 标记羊抗小鼠 IgG 稀释液室温密封孵育 3 h, 加入底物溶液 37 ℃避光显色 15 min 后终止, 于 492 nm 处测 D_{492}值。

1.4　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　病理组织学及细胞学改变

慢性支气管炎组大鼠气管支气管上皮脱落, 纤毛缺失、倒伏或变短, 杯状细胞增生, 粘膜下腺体增生肥大, 分泌亢进; 气管壁增厚, 淋巴细胞、浆细胞, 及少量中性粒细胞浸润; BALF 细胞总数及中性粒细胞比例显著增高, 肺泡巨噬细胞比例显著下降。雾化吸入溴化异丙托品、阿托品及生理盐水后改变不明显, 见表 1。

2.2　分泌细胞增生肥大相关指标

慢性支气管炎组气管壁显著增厚, 腺体厚度/气管壁厚度、上皮杯状细胞数都显著增加。溴化异丙托品、阿托品可显著抑制杯状细胞增生, 两组作用强度无统计学差异, 生理盐水组没有明显改变, 见表 2。

表 1　BALF 中细胞分类计数($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The cell count of BALF($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Total cell number ($\times10^6$/ml)	Cell count(%)		
			Alveolar monophage	Neutrophil	Lymphocyte
Control	7	9.80±0.76	86.50±2.57	3.36±0.99	10.14±1.68
Chronic bronchitis	7	40.89±6.92**	57.14±10.38**	34.00±7.26**	8.86±3.54
Ipratropium bromide	7	35.68±4.56	59.64±5.87	32.07±4.74	8.29±2.81
Atropine	7	36.29±5.24	55.71±4.59	33.43±3.66	10.86±2.17
Normal saline	7	41.32±8.21	53.93±6.16	36.57±4.45	9.50±1.78

**: $P<0.01$ *vs* control

表 2　气管壁增厚及分泌细胞肥大增生指标($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Index of hypertrophy and hyperplasia of secretion cells and thickening of the tracheal wall($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Thinkness of tracheal wall(μm)	Reid index	Number of goblet cells(/mm^2)
Control	7	353.57±25.12	0.061±0.015	11.05±1.94
Chronic bronchitis	7	533.31±42.29**	0.402±0.040**	52.81±7.72**
Ipratropium bromide	7	524.16±26.84	0.403±0.028	42.90±6.64#
Atropine	7	525.25±33.08	0.407±0.030	43.67±5.45#
Normal saline	7	532.53±28.17	0.432±0.037	53.48±6.16

**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* chronic bronchitis

2.3　分泌细胞合成及分泌亢进指标

2.3.1　分泌细胞阳性染色区(粘蛋白)的 AOD 各组间无差异, 但慢性支气管炎大鼠气管粘膜下腺体细胞和上皮粘蛋白面积%、未分泌指数(AOD 与粘蛋白面积%的乘积)均极显著增加。雾化吸入溴化异丙托品、阿托品可以明显降低分泌细胞粘蛋白面积%和未分泌指数, 且溴化异丙托品的作用显著强于阿托品, 生理盐水组无明显改变, 见表 3。

表 3　气管上皮及粘膜下腺体细胞内粘蛋白含量($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Content of mucin protein in tracheal epithelia and submucosal gland cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Tracheal epithelia			Submucosal gland cells		
		AOD	Mucin area(%)	Index on unsecretive(%)	AOD	Mucin area(%)	Index on unsecretive(%)
Control	7	1.149±0.052	6.0±0.4	6.8±0.5	113.3±9.8	12.0±2.3	13.5±1.7
Chronic bronchitis	7	1.183±0.096**	40.4±5.3**	47.5±5.0**	115.8±6.7	30.4±7.6##	34.9±7.0##
Ipratropium bromide	7	1.165±0.063	35.8±4.7##	41.5±3.6##	21.0±20.9**	55.6±12.1**	65.2±7.4**
Atropine	7	1.167±0.041	37.9±3.8#△	44.2±3.4##△	116.1±8.2	35.7±8.1##△	40.8±6.9##△△
Normal saline	7	1.176±8.2	40.6±5.0	47.7±5.2	118.5±14.0	56.1±7.8	65.7±4.1

**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* chronic bronchitis; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* ipratropium bromide

2.3.2　慢性支气管炎组 BALF 和气管环培养液的 D_{492}值(粘蛋白相对含量)显著增加($P<0.01$), 加入溴化异丙托品($P<0.01$)、阿托品($P<0.05$)对其有明显抑制作用, 溴化异丙托品的抑制程度显著强于阿托品($P<0.05$)。正常对照组气管环培养液加入溴化异丙托品或阿托品后其 D_{492}值无明显改变, 见表 4、5。

表 4　BALF 中粘蛋白含量(D_{492}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Content of mucin in BALF(D_{492}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Mucin
Control	7	0.206±0.027
Chronic bronchitis	7	0.535±0.098**
Ipratropium bromide	7	0.349±0.046##
Atropine	7	0.412±0.057#△
Normal saline	7	0.546±0.105

**: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* chronic bronchitis; △: $P<0.05$ *vs* ipratropium bromide

表 5　气管环培养液粘膜下腺体细胞内粘蛋白含量(D_{492}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Content of mucin in tracheal ring cultrue medium(D_{492}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal culture (n=7)	Ipatropium bromide culture (n=7)	Atropine culture (n=7)
Control	0.046±0.008	0.039±0.009	0.042±0.010
Chronic bronchitis	0.105±0.023**	0.067±0.011##	0.083±0.014#△

**: $P<0.01$ *vs* tracheal rings of control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* normal cultrue; △: $P<0.05$ *vs* ipratropium bromide cultrue

3　讨论

3.1　动物模型与高分泌

大鼠气管内注入脂多糖 3 周后的病理学改变与《中国 COPD 和哮喘诊治指南》中的病理学特征相似, 表明模型复制成功[4]。粘蛋白的合成和分泌亢进, 包括 BALF 和气管环培养液中粘蛋白量明显增加, 杯状

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞和粘膜下腺体增生肥大，腺体细胞和上皮粘蛋白含量显著增加。气道粘液的粘滞性、粘附性和弹性主要来自粘蛋白，粘蛋白的高分泌不仅增加了粘液量，也使其特性改变，不易被清除。

3.2 抗胆碱能药物对高分泌的抑制作用

支配粘膜下腺体的主要是M_3受体[5]，通过磷脂酶C(PLC)及蛋白激酶C(PKC)途径促进粘蛋白及粘液的合成和分泌[6]。M_1受体主要分布在气道副交感神经节，能增加胆碱能神经功能。副交感神经节后纤维末梢突触前膜上的M_2受体通过反馈性抑制ACh的释放，可间接作用于腺体分泌。气道平滑肌上的M_2、M_3受体通过调节平滑肌收缩，也可以影响气道分泌物释放[7]。COPD患者胆碱能神经张力增加与粘液过度分泌有着密切的关系。

阿托品是非选择性毒蕈碱乙酰胆碱受体(mAChR)拮抗剂，可抑制气管内滴入放线杆菌、乙酰胆碱等对气道粘蛋白分泌的刺激作用，还可以抑制卡巴胆碱等通过刺激前列腺素合成对粘蛋白分泌的促进作用。在本研究中，阿托品显著降低慢性支气管炎大鼠BALF、气管环培养液中及气管上皮和粘膜下腺体细胞中的粘蛋白含量，以及气管上皮杯状细胞增生，提示其对粘蛋白的合成和分泌都有抑制作用。但由于阿托品是叔胺盐，能通过血脑屏障，有中枢神经系统的副作用，且抑制气道粘液纤毛清除功能，限制了其在COPD治疗中的应用。

溴化异丙托品是非选择性拮抗mAChR吸入剂的代表，系水溶性季铵类合成拮抗剂，不能透过血脑屏障，不易被全身吸收，吸入后血药浓度上升极慢，几乎无阿托品样的不良反应，是抗胆碱能药物中最先获美国FDA批准的局部吸入药。溴化异丙托品可以有效地舒张支气管平滑肌，与β_2受体激动剂合用时作用更突出。本研究直接证实了溴化异丙托品吸入后可以显著地减少慢性支气管炎大鼠BALF、气管环培养液以及上皮和粘膜下腺体细胞中粘蛋白的含量，抑制气管上皮杯状细胞增生，且作用强于阿托品，对粘液纤毛清除功能无阿托品样抑制作用，其在COPD的治疗中更具有优越性。

由于溴化异丙托品、阿托品都是非亚型选择性的，同时阻断了M_1、M_2、M_3受体，M_2受体自身反馈作用的抑制可降低药物的治疗效果。因此，高选择性的M_3受体或M_1、M_3受体拮抗剂具有更大的临床优势，有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Kim W D. Lung mucus: a clinician's view[J]. Eur Respir J, 1997, 10(8): 1914—1917.
[2] Vestbo J, Prescott E, Lange P. Association of chronic mucus hypersecretion with FEV1 decline and chronic obstructive pulmonary disease morbidity. Copenhagen City Heart Study Group[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(5): 1530—1535.
[3] White M V. Muscarinic receptors in human airways[J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95(5pt2): 1065—1068.
[4] 马 楠, 崔德健, 梁研杰, 等. 气管内注入脂多糖法建立大鼠慢性支气管炎模型[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(6): 371—372.
[5] Barnes P J. Muscarinic receptor subtype in airways[J]. Eur Respir J, 1993, 6(3): 328—331.
[6] Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function[J]. Trends Pharmacol Sci, 1993, 14(8): 308—313.
[7] Mak J C, Barnes P J. Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung[J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 141(6): 1559—1568.

(编辑 薛国文)

(上接575页)

常规及出凝血时间检查仅3.0%。术后医师检查拔牙创及所拔除牙齿不仔细造成根残留、碎骨片遗留及切口未缝合等。

③由统计资料可以看出：拔牙创异常出血有主观原因也有客观原因，有局部原因也有全身原因，有医师处置不当的原因亦有患者本身的原因，尤其值得我们重视的是仅患者术后不遵守医嘱一项就占25.1%，而这又恰恰是最好预防的出血原因。只要我们对那些易出血人群及患牙如分析中所列举的在术前仔细检查、询问相关病史，严格掌握拔牙适应症及手术时机[2]，术中正确处理拔牙创、仔细检查拔除牙是否完整，术后耐心向患者叮嘱注意事项，求得患者的正确配合，把握好了这3个环节绝大部分的拔牙后异常出血急诊是完全可以避免的。

2.2 处理

总的原则是针对出血原因正确及时处理，有效止血。如清理拔牙创、骨折复位固定、降血压、缝合切口等等。查明拔牙创异常出血的原因是临床治疗的关键，正确的顺序是先查找局部原因，再找全身可疑的出血性原因。

一般不严重的出血可用云南白药、止血消炎粉、立止血针剂、明胶海棉或棉球、纱卷压迫止血；非高血压、心脏病、甲亢等患者还可用浇以肾上腺素针剂、麻黄素针剂的棉球或纱卷压迫止血；对于小面积明确的顽固性渗血亦可以石炭酸、地卡因酚烧灼止血，或以牙周塞治剂塞治；稍严重的出血可以碘仿纱条加压填塞配以缝合固定多可有效止血；能找到断端的小静脉或小动脉出血最好予以结扎或缝扎；大量的严重出血应局部与全身治疗同时进行，全身治疗包括紧急补充血容量、吸氧、镇静、止血针的应用等一系列内科抗休克抢救措施。

关键词：拔牙创；异常出血
中图法分类号：R782.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张震康 主编. 实用口腔科学[M]. 北京：人民卫生出版社, 1993. 952—958.
[2] 黎介寿, 吴孟超. 手术学全集口腔颌面外科卷[M]. 北京：人民军医出版社, 1996. 21—22.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net