

方药研究

扶正化痰方对博莱霉素诱发大鼠肺间质纤维化的干预作用

陆 雄* 叶伟成* 刘 平* 蔡贞贞* 刘成海*
张 炜* 谭善忠* 王宝妹* 林 敏*

摘要 目的:探讨扶正化痰方对肺纤维化的干预作用。方法:采用博莱霉素诱导肺间质纤维化模型,分别观察各组大鼠的死亡率、肺系数、肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量以及肺组织形态学变化。结果:与模型对照组比较,扶正化痰方能显著降低大鼠肺系数和肺组织Hyp含量,改善肺组织纤维化程度。结论:扶正化痰方具有明显的抗博莱霉素所致的大鼠肺纤维化的作用。

主题词 肺纤维化/中医药疗法 @ 扶正化痰方

Therapeutic Effect of Fuzheng Huayu Recipe on Bleomycin-induced Pulmonary Interstitial Fibrosis in Rats

Lu Xiong, Ye Weicheng, Liu Ping, et al.

(Shanghai University of TCM, Shanghai 201203)

Objective: To observe therapeutic effect of Fuzheng Huayu Recipe on pulmonary fibrosis. **Methods:** Pulmonary fibrosis model rat was induced with bleomycin. Changes of the death rate, lung coefficient, hydroxyproline content (Hyp) in the lung tissue and morphology of the lung were investigated. **Results:** Compared with the model group, Fuzheng Huayu Recipe could significantly decrease the lung coefficient and Hyp content in the lung tissue and improve fibrosis of the lung tissue. **Conclusion:** Fuzheng Huayu Recipe has significant effect on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats.

Key Words Pulmonary fibrosis/TCM therapy; @Fuzheng Huayu Recipe

扶正化痰方为抗肝纤维化的有效方剂,基于组织纤维化这一共同的病理变化及中医“异病同治”的特点,本研究采用博莱霉素诱导肺纤维化模型,通过观察大鼠的死亡率、肺系数、肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量以及肺组织形态学变化,研究扶正化痰方对肺纤维化的干预作用,以期肺纤维化的防治提供新的思路,现将结果报告如下。

1 材料

1.1 动物:SD 雄性大鼠(中科动管第 003 号) 52 只,SPF 级,体重(200±20)g,由中科院上海实验动物中心提供。大鼠均饲养于上海中医药大学实验动物中心。

1.2 药物及试剂:博莱霉素(15mg/ml)由日本化药株式会社提供。扶正化痰方由冬虫夏草菌丝、桃仁、丹参、绞股蓝、松花粉等组成,由上海现代中医药技术发展公司提供,稀释成浓度为每毫升含生药 460mg 的灌胃液。甲强龙(每支 40mg)由法玛西亚—普强公司提供。对二甲基氨基苯甲醛,分析纯,购自上海试剂三厂。氯氨-T,分析纯,购自上海余山化工厂。Hyp 标准品,分析纯,日本ナカライテスケ株式会社产品。高氯酸,分

析纯,购自上海桃浦化工厂。

1.3 主要仪器:RM 2035 石蜡轮转切片机、HI 1220 烤片机,德国 Leica 公司产品。AA-200 分析天平, Densere 仪器公司产品。pH 计为 Beckman 公司产品。紫外分光光度计 UV 2102 C 型, Unico 公司产品。TECNAI-12 透射电镜,荷兰飞利浦公司产品。

2 方法

2.1 动物造模及处理:大鼠 52 只,体重(200±20)g,随机取 10 只为正常组,余 42 只参考文献^[1]进行造模,方法如下:大鼠经乙醚麻醉后行仰卧位固定,消毒后在颈部沿正中中线切开皮肤,分离暴露气管,用 1ml 注射器经两气管软骨间隙向心方向行气管内穿刺,以 8mg/kg 大鼠体重计量气管内一次性注入的博莱霉素溶液。注药完毕后缝合皮肤,将大鼠直立、旋转,尽量使药液在肺内均匀分布。大鼠经造模后随机分成 3 组,即模型对照组(模型组, 14 只)、扶正化痰方组(14 只)、甲强龙组(14 只)。扶正化痰方以 10ml/kg 大鼠体重灌胃(10ml 灌胃液含生药 4.6g,相当于 65kg 成人等体重用量的 8 倍)。甲强龙以 15mg/kg 大鼠体重腹腔注射,每日 1 次。正常对照组(正常组)、模型组灌以同容积的生理盐水,每日 1 次,共 4 周。

2.2 取材及组织处理:大鼠用 2% 戊巴比妥钠以 2ml/

基金项目:上海市科委“非典型”专项基金资助(03DZ149130)

* 上海中医药大学,上海市浦东新区蔡伦路 1200 号(201203)

收稿日期:2005-05-13;修回日期:2005-07-20

Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

kg 体重剂量腹腔注射麻醉后,打开胸腔取肺脏左叶称重;右肺取 $1.0\text{cm} \times 0.8\text{cm} \times 0.3\text{cm}$ 大小肺组织,以 10% 中性甲醛固定,24 小时后逐级酒精脱水,二甲苯透明,60℃ 石蜡包埋,5 μm 厚切片,常规 HE 染色。每组另取 3 只动物,切取 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小肺组织数块,于 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中固定 2 小时,经 0.1M 二甲砷酸钠缓冲液(pH7.4)冲洗后入 1% 锇酸磷酸缓冲液中固定 2 小时,饱和醋酸铀块染,常规脱水,环氧树脂 618 包埋,超薄切片,柠檬酸铅染色,TECNAI-12 透射电镜观察标本备用。

2.3 肺系数测定:称取大鼠体重与左肺湿重,肺系数=(左肺湿重×2)/体重,以“mg/g”表示。

2.4 肺组织 Hyp 含量测定:用 Jamall 法^[2],用肺组织湿重校正,Hyp 含量以“mg/g”表示。

2.5 肺组织形态学观察:在光镜下观察肺组织纤维化程度,将纤维化分为 5 级,并制订半定量分级标准:(-):无纤维化;(+):纤维化程度小于整个视野的 10%;(++) :纤维化程度大于整个视野的 10%,小于 25%;(+++) :纤维化程度大于整个视野的 25%,小于 40%;(++++) :纤维化程度大于整个视野的 40%。电镜下观察肺组织超微结构。

2.6 统计学方法:分类变量资料用 χ^2 检验;数值变量资料用 t 检验;级差资料用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 各组大鼠大体观察及大鼠死亡率情况比较:正常组大鼠活动自如,毛发光亮。模型组大鼠消瘦,无力,进食减少,眼无神,毛无光泽,4 周时最为明显。与模型组大鼠比较,各药物组大鼠的精神状态有一定改善,以扶正化瘀方组的改善较为明显。正常组无死亡动物,模型组死亡 2 只(第 1 周和第 2 周各 1 只),死亡率为 14.29%。扶正化瘀方组死亡 1 只(第 1 周),死亡率为 7.14%。甲强龙组死亡 2 只(第 2 周和第 4 周各 1 只),死亡率为 14.29%。

3.2 各组大鼠肺系数变化比较:表 1 示,正常组大鼠体重上升明显,高于其他各组,模型组与正常组相比差异有显著性($P<0.05$)。扶正化瘀组高于模型组,甲强龙组反低于模型组。模型组较正常组肺系数显著升高($P<0.05$),扶正化瘀方组较模型组肺系数显著降低($P<0.05$),甲强龙组变化不显著。

3.3 各组大鼠肺组织 Hyp 含量变化比较:表 2 示,与正常组比较,模型组大鼠肺组织 Hyp 含量显著增高($P<0.05$)。与模型组比较,扶正化瘀方组大鼠肺组织 Hyp 含量显著下降($P<0.05$),甲强龙组大鼠肺组织 Hyp 含量也有所下降,但无统计学意义。

表 1 各组大鼠肺系数变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	左肺重(g)	体重(g)	肺系数(mg/g)
正常组	10	0.49 ± 0.05	$378 \pm 30^*$	$2.61 \pm 0.27^*$
模型组	12	0.55 ± 0.14	316 ± 82	3.59 ± 1.21
扶正化瘀方组	13	0.52 ± 0.10	339 ± 31	$2.89 \pm 0.26^*$
甲强龙组	12	0.54 ± 0.13	289 ± 29	3.59 ± 0.62

与模型组比较, * $P<0.05$; 下表同

表 2 各组大鼠肺组织 Hyp 含量变化比较(mg/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Hyp
正常组	10	$1.36 \pm 0.15^*$
模型组	12	1.89 ± 0.34
扶正化瘀方组	13	$1.66 \pm 0.30^*$
甲强龙组	12	1.70 ± 0.29

3.4 各组大鼠肺组织形态学变化:光镜下观察结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肺泡壁明显增厚,肺泡间隔增宽,部分肺泡塌陷实变,纤维结缔组织增生。表 3 示,与模型组比较,扶正化瘀方组大鼠肺泡间隔轻度增宽,纤维化程度显著减轻($P<0.05$);甲强龙组肺纤维化程度也有所减轻,但无统计学意义。

表 3 各组大鼠胶原纤维增生程度分级变化比较(只)

组别	鼠数	胶原纤维增生程度分级					Ridit R 值
		-	+	++	+++	++++	
正常组	10	10	0	0	0	0	0.9348*
模型组	12	5	1	3	1	2	0.5444
扶正化瘀方组	13	7	2	4	0	0	0.6973*
甲强龙组	12	5	2	4	0	1	0.6042

电镜观察结果显示,正常肺组织结构清晰。肺呼吸部可见肺泡囊、肺泡上皮细胞和肺泡隔。Ⅰ型肺泡细胞扁平,上皮细胞与肺泡隔内的毛细血管内皮细胞之间有连续的基膜。Ⅱ型肺泡细胞呈圆形,凸入肺泡腔内,表面有较多微绒毛,胞质内富含线粒体、内质网等细胞器,还可见大小、形状不一的板层小体。模型组可见肺组织结构破坏,肺泡塌陷闭塞,间质细胞及纤维细胞大量增生,胶原纤维沉积,Ⅱ型肺泡细胞增生较明显,多数细胞微绒毛减少甚至缺失,板层小体多少不一,部分空化,部分电子密度增强,可见吞噬有板层小体和空泡的巨噬细胞增生。甲强龙组肺组织结构破坏以及胶原纤维沉积程度略好于模型组,微绒毛减少甚至缺失的Ⅱ型肺泡细胞增生较明显。扶正化瘀方组Ⅱ型肺泡细胞增生也较明显,但多数细胞表面有较多微绒毛,肺组织结构破坏较轻,间质细胞及纤维细胞增生以及胶原纤维沉积程度明显轻于模型组。

4 讨论

肺间质纤维化是多种肺部疾患的主要结局,对人

体健康危害大,与患者的预后康复有密切关系。目前,肺间质纤维化的首选药物为糖皮质激素,但临床治疗效果不理想,长期使用副作用多。甲强龙为一种短效糖皮质激素,实验结果显示,其对博来霉素所致的大鼠肺纤维化虽有一定的抑制作用,但效果不太明显。

中医古代文献中无此病的记载,结合该病的临床表现可将肺纤维化归入“短气”、“咳嗽”、“肺痿”、“肺胀”、“肺痹”、“喘证”等范畴。对本病病因病机的认识,中医各家多立足于病因以正虚为主,邪犯为标,病机特点虚实夹杂,以虚为主,痰瘀内阻^[3]。肝纤维化的基本病机也在于血瘀和正气虚损^[4],尽管两者涉及脏腑不一,但基本病机有一定的相似性。近年来的研究表明,虽然不同组织和器官纤维化的具体发生机制有些差别,但具有许多共性。类似于肝纤维化的形成过程,肺间质纤维化的形成也是一个缓慢的动态过程,涉及细胞、细胞因子和细胞外基质等多种因素、多个环节间相互作用和相互调节的复杂过程,由于胶原的沉积及降解系统的平衡失调,最终可导致肺间质大量的细胞外基质沉积。扶正化痰方是新研制的抗肝纤维化中药复方,多年来的临床及体内外实验研究表明,扶正化痰方可以通过多环节、多途径作用于细胞外基质生成细胞,抑制胶原合成以及促进细胞外基质降解等达到抗纤维化的目的^[5~7],用该方治疗肺纤维化是中医异病同治思想的体现。本实验大鼠肺系数、肺组织 Hyp 含量以及肺组织形态学变化的观察结果均显示,扶正化痰方

能显著改善博来霉素诱发肺纤维化大鼠的肺部病理变化,具有明显的抗肺纤维化作用。超微结构观察结果同时显示,模型组及扶正化痰方组均可见较多的Ⅱ型肺泡细胞增生,但两组增生的Ⅱ型肺泡细胞在形态学上有明显差异,提示增生的Ⅱ型肺泡细胞可能有不同的分化方向,在肺损伤修复及纤维化形成过程中的作用不一。有关Ⅱ型肺泡细胞在肺损伤修复及纤维化形成过程中的具体作用及扶正化痰方抗肺纤维化的作用机理,值得进一步研究探索。

参考文献

- 1 Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, et al. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *AM J Respir Crit Care Med*, 1997, 156(1): 260~265.
- 2 Jamall IS, Finelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 1981, 112(1): 70~75.
- 3 曹红平, 张伟. 中医药治疗肺间质纤维化的研究近况. *中华实用中西医杂志*, 2001, 1(14): 1672~1673.
- 4 陆雄, 刘平, 刘成海, 等. 扶正化痰方促进二甲基亚硝胺肝纤维化大鼠肝窦毛细血管化逆转作用的实验研究. *中医杂志*, 2003, 44(2): 136~139.
- 5 刘平, 刘成. 扶正化痰 319 方抗肝纤维化的实验研究. 见: 周金黄主编. *中药药理与临床研究进展*. 北京: 军事医学科学出版社, 1996: 314~321.
- 6 刘平, 胡义杨, 徐列明, 等. 扶正化痰 319 方抗大鼠肝纤维化的研究. *中国实验方剂学杂志*, 1997, 3(4): 20~24.
- 7 刘平, 刘成海, 刘成, 等. 扶正化痰方抑制大鼠肝贮脂细胞增殖及胶原生成的血清药理学研究. *肝脏*, 1996, 1(3): 152~154.



垂询热线: 800-810-0359
ISO9001 质量认证企业

开创科学煎药新领域

20000多家医院、药店、诊所
正在使用



- ▶ 优良的品质
- ▶ 卓越的性价比
- ▶ 完善的售后服务体系
- ▶ 知名品牌 值得信赖



北京东华原医疗设备有限公司

地址: 北京市中关村昌平科技园区振超路1号

电话: 010-89718013

传真: 010-89718217

邮编: 102200

网址: www.donghuagroup.com

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>