

肺痹汤 2 号对二氧化硫染毒小鼠肺氧化损伤的影响

吴志松, 曹芳, 牛洁, 马瑞鸿, 焦扬*

(北京中医药大学东方医院, 北京市丰台区方庄芳星园一区 6 号, 100078)

摘要 目的 观察肺痹汤 2 号对于二氧化硫 (SO_2) 染毒小鼠肺组织氧化损伤的影响。方法 48 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、中药预防组、中药治疗组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组小鼠进行 SO_2 静式吸入染毒 21 天处理, 中药治疗组自染毒后 1 周开始予肺痹汤 2 号方溶液 (浓度为 1 g/ml) 10 ml/(kg · d) 灌胃, 共 14 天。中药预防组自染毒前 1 周开始予肺痹汤 2 号方溶液 10 ml/(kg · d) 灌胃, 空白组及模型组予生理盐水 10 ml/(kg · d) 灌胃, 3 组均灌胃 28 天。检测小鼠肺组织中丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 含量和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性, 并对肺组织进行病理 HE 染色观察。结果 HE 染色结果显示, 模型组小鼠肺组织肺泡壁连续性破坏, 出现肺大泡, 肺泡壁内大量炎性细胞浸润。中药治疗组和中药预防组小鼠肺组织肺泡壁内炎性细胞浸润程度较模型组减轻, 且中药预防组减轻更明显。与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中 MDA 含量升高, 而 GSH、GSH-Px、SOD、CAT 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药预防组和中药治疗组小鼠肺组织 MDA 含量高于空白组, GSH、CAT 含量亦低于空白组 ($P < 0.01$), GSH-Px、SOD 含量与空白组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 肺痹汤 2 号可以减轻染毒小鼠肺组织的氧化损伤可能与促进 SO_2 染毒小鼠肺组织炎性渗出的吸收有关。

关键词 肺损伤; 二氧化硫; 肺痹汤 2 号; 炎性渗出; 氧化应激

随着全球经济发展以及气候变化, 空气污染问题日益严重, 其中二氧化硫 (SO_2) 是大气中最常见的污染物之一, 严重危害人类的健康^[1]。既往研究表明, 大气 SO_2 污染可明显增加呼吸系统疾病的发病率和死亡率, 其机制与 SO_2 对肺组织的氧化损伤有关^[2-3]。中医学认为, SO_2 等细颗粒物应属于外来毒邪, 但不同于传统中医理论的六淫邪气、疫疠之邪。它存在于人类难以控制的环境空气中, 不可避免要吸入, 因此对机体的损害具有不确定性、潜伏期长的特点^[4]。肺痹汤 2 号方是由全国名老中医周平安教授的经验方肺痹汤化裁而来。前期研究^[5]结果显示, 肺痹汤能明显减轻博来霉素所致肺纤维化大鼠肺组织损伤。本研究探讨了肺痹汤 2 号对 SO_2 染毒小鼠肺组织损伤的干预作用及可能机制, 为 SO_2 污染的防治提供理论基础。

基金项目: 国家自然科学基金 (8157151685); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (20130013110002); 北京中医药大学东方医院“1166”人才培养项目 (030903010301)

* 通讯作者: yangjiao2013@sina.cn

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 ICR 小鼠 48 只, 体重 (20 ± 2) g, 购买于维通利华实验动物发展有限公司, 实验动物合格证号: 11400700059072。

1.2 药物

肺痹汤 2 号方处方: 黄芪、红景天、金银花、黄芩、丹参、甘草, 比例为 1.5 : 1.5 : 1.5 : 1 : 1 : 1, 药物由北京康仁堂药业有限公司提供, 制备成含生药 1 g/ml 溶液。

1.3 主要试剂及仪器

高压液化 SO_2 , 纯度 99.99%, 由北京海普科技术有限公司提供。丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号: 20140917)、谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒 (批号: 20140926)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (批号: 20140928)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号: 20140916)、过氧化氢酶 (CAT) 试剂盒 (批号: 20140715), 均由南京建成生物工程研究所提供; HE 染色液 (货号: G1120), 北京

索莱宝科技有限公司; 碳酸氢钠分析纯 (批号: 14897), 南京化学试剂股份有限公司。

小鼠染毒箱 (PSU 材质, 规格 330 mm × 215 mm × 200 mm), 由北京丹瑞林科技发展有限公司提供; WAT80 型泵吸式二氧化硫检测仪, 济南万用电子有限公司; AC15 型负压吸引器, 北京佰利天成科贸有限公司; DH4000A 型电热恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; EG1160 型包埋机, 德国 Leica 公司; ECLIPSELV100POL/50IPOL 型显微镜, 日本尼康公司。

1.4 分组及造模

48 只小鼠适应性喂养 3 天后, 采用随机数字表法分为空白组、模型组、中药预防组、中药治疗组, 每组 12 只。除空白组外, 其余各组小鼠进行 SO₂ 静式吸入染毒处理^[9]。将吸入 SO₂ 的第 1 天设为实验第 1 天。染毒方法: 将小鼠分组置于小鼠染毒箱中, 染毒箱有一个进气孔, 其他部位均为密封状态。根据染毒箱大小计算出所需 99.99% SO₂ 的体积, 约 14.19 L, 针管抽取相应体积的 SO₂, 经进气孔打入染毒箱后, 迅速密封住进气孔, 待 SO₂ 在染毒箱中扩散一段时间后再开启进气孔。通过泵吸式 SO₂ 检测仪监测染毒箱中 SO₂ 浓度, 使 SO₂ 浓度保持在 (28 ± 2) mg/m³ 范围内。熏气染毒每天 8 h, 结束后在出气孔处连接一负压吸引器, 负压吸引器的另一头通向饱和碳酸氢钠溶液, 以回收 SO₂ 气体, 以免造成实验室空气污染。吸入时间: 每日上午 8:00 ~ 12:00, 吸入 4 h, 连续 21 天。空白组给予新鲜空气。

1.5 给药方法

中药治疗组自实验第 8 天起开始予肺痹汤 2 号方溶液 10 ml/(kg · d) 灌胃, 至实验第 21 天止, 共灌胃 14 天。中药预防组自染毒前 1 周予肺痹汤 2 号方溶液 10 ml/(kg · d) 灌胃, 至实验第 21 天止, 共灌胃 28 天。空白组及模型组在染毒前 1 周至实验第 21 天止予生理盐水 10 ml/(kg · d) 灌胃, 共灌

胃 28 天。

1.6 观察指标及方法

实验第 21 天染毒结束后, 小鼠禁食、自由饮水 20 h, 于第 22 天早上 8:00 称重后以脱颈椎法处死。立即打开小鼠胸腔, 以 5 ml 冰冷生理盐水从右心室处注入, 通过肺循环灌洗肺脏, 反复几次, 至双肺呈白色, 立即将肺脏采出。取小鼠左侧肺脏在 0 ~ 4℃ 下研磨制成匀浆液, 匀浆液 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液即得到肺组织的粗酶提取液。按试剂盒说明书检测肺组织粗酶提取液中 MDA、GSH 含量和 GSH-Px、SOD、CAT 活性。右侧肺脏置入 10% 甲醛固定液固定, 取病变部位处, 切取 3 mm 大小的组织块后, 脱水透明, 浸蜡包埋, 切成厚约 5 μm 的组织片, 进行 HE 染色。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理, 计量资料用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织 HE 染色结果

图 1 示, 空白组小鼠肺组织形态完整, 肺泡壁正常, 未见炎性细胞浸润。模型组小鼠肺组织肺泡壁出现连续性破坏、增宽, 肺泡壁内有大量炎性细胞浸润, 可见肺大泡。中药治疗组小鼠肺组织肺泡壁有轻度增宽, 连续性破坏及肺泡壁内炎性细胞浸润亦减轻, 出现肺大泡程度较模型组轻。中药预防组小鼠肺组织肺泡壁未见明显增宽和连续性破坏, 肺泡壁内炎性细胞浸润程度和肺大泡出现程度较中药治疗组减轻。

2.2 各组小鼠肺组织中 MDA、GSH 含量及 GSH-Px、SOD、CAT 活性比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠肺组织中 MDA 含量升高, 而 GSH 含量及 GSH-Px、SOD、CAT 活性降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药预防组和中药治疗组小鼠肺组织 MDA 含量亦高于空白

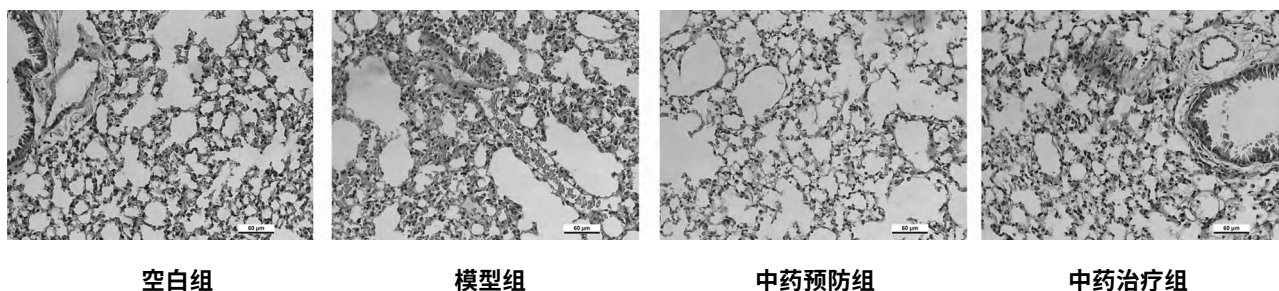


图 1 各组小鼠肺组织 HE 染色病理图

表 1 各组小鼠肺组织中 MDA、GSH 含量及 GSH-Px、SOD、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA (nmol/mgprot)	GSH (μ mol/gprot)	GSH-Px (U/mgprot)	SOD (U/ml)	CAT (U/mgprot)
空白组	12	2.02 $\pm$ 0.64	14.56 $\pm$ 10.83	38.57 $\pm$ 19.02	67.34 $\pm$ 25.86	4.70 $\pm$ 1.68
模型组	12	3.70 $\pm$ 0.42 **	3.52 $\pm$ 1.31 **	22.82 $\pm$ 9.20*	45.10 $\pm$ 17.26*	1.93 $\pm$ 1.05 **
中药预防组	12	3.28 $\pm$ 0.73 **	3.64 $\pm$ 1.18 **	27.48 $\pm$ 15.62	54.08 $\pm$ 25.13	2.09 $\pm$ 1.42 **
中药治疗组	12	3.18 $\pm$ 0.47 **	3.75 $\pm$ 1.25 **	31.58 $\pm$ 15.27	56.71 $\pm$ 25.66	2.35 $\pm$ 1.38 **

注: MDA, 丙二醛; GSH, 谷胱甘肽; GSH-Px, 谷胱甘肽过氧化物酶; SOD, 超氧化物歧化酶; CAT, 过氧化氢酶; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$

组, GSH、CAT 活性低于空白组 ($P < 0.01$), 与空白组 GSH-Px、SOD 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 中药治疗组及中药预防组小鼠肺组织 MDA 含量有下降趋势, GSH、GSH-Px、SOD、CAT 活性有上升趋势, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药治疗组及中药预防组各指标组间比较, 差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

中医学认为, SO_2 是一种外来毒邪, 其损伤人体先经鼻咽, 邪气壅塞脉络, 损伤局部血络; 邪毒入肺后直接耗伤肺气, 肺卫不固则抗邪无力, 肺之宣发、肃降功能受损; 对于宿有肺疾者, 其气本虚, SO_2 可致肺气更虚, 气虚不能行血、布津, 则血行瘀滞、痰浊内盛, 导致疾病加重或诱发宿疾; SO_2 持续损伤人体, 毒邪壅塞, 使气血津液运行失常, 可产生气滞、痰凝、血瘀等病理变化, 蕴滞于肺, 相互搏结, 闭阻肺络。肺痹汤是周平安教授治疗肺间质纤维化的经验方。他认为肺间质纤维化的病机为肺气虚损, 外邪乘虚而内舍于肺, 气血失和, 日久血瘀与痰浊搏结, 痰瘀痹阻肺络而发为“肺痹”^[9]。观此病机与 SO_2 肺损伤相近, 不同之处在于 SO_2 的肺损伤除肺气虚损、痰瘀阻络外, 还有邪毒内盛, 治疗需扶正祛邪, 故将肺痹汤化裁, 减少其化痰通络之药味, 增强解毒祛邪之力, 故定名为肺痹汤 2 号。方中黄芪味甘、性微温, 补益肺脾之气, 益卫固表, 升阳举陷, 利水消肿, 托毒生肌; 红景天始载于藏药典籍《四部医典》, 具有补益肺气、健脾补虚、收涩止血、活血散瘀之功效, 与黄芪相配合补益肺气, 扶助正气, 二者共为君药。金银花味甘、性寒, 清热解毒, 散瘀消肿, 疏散风热, 黄芪补益肺脾之气, 配金银花则扶正不上火, 金银花解毒散邪, 配黄芪则祛邪不伤正。黄芩味苦、性寒, 清热燥湿, 泻火解毒, 与金银花配合增强解毒祛邪之力, 二者为臣药。丹参味苦、性微寒, 活血通经, 凉血消肿, 在本方中为佐药, 针对

肺气受损、血行迟滞的病机变化。甘草味甘、性平, 具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、调和诸药的作用, 既可助黄芪补益肺气, 又能祛痰止咳解毒, 还可调和诸药, 为佐使药。全方共奏补益肺气、解毒、化痰、活血之效。

MDA 是脂质过氧化的产物之一, 其可反映机体内脂质过氧化的程度, SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用, 能清除超氧阴离子自由基, 发生歧化反应生成 H_2O_2 ^[10]。研究显示, 急性肺损伤时肺组织发生了强烈的氧化性应激损伤, 同时伴有机体抗氧化能力相对不足, 即 MDA 水平上升, SOD 活性下降^[11]。GSH 是一种低分子自由基清除剂, 是组织中主要的非蛋白质的巯基化合物, 并且是 GSH-Px 和谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 两种酶类的底物; GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化酶, 它特异催化 GSH 对 H_2O_2 的还原反应^[12]。急性肺损伤早期给予 GSH 可减轻体内氧化应激状态, 减少炎症因子释放^[13]。CAT 可进一步将 H_2O_2 分解为 H_2 和 O_2 , 可抑制氧自由基反应, 对急性肺损伤有预防保护作用^[14]。

本研究结果显示, 镜下模型组小鼠肺组织出现明显炎症反应, 而中药干预组和中药预防组小鼠肺组织炎性变化程度较轻, 并且中药预防组小鼠的肺组织病变程度又较中药治疗组减轻, 说明肺痹汤 2 号对于 SO_2 染毒小鼠肺组织损伤具有一定保护作用, 促进了肺组织炎性渗出的吸收。另外, 与模型组比较, 中药干预组和中药预防组 MDA、GSH 含量和 GSH-Px、SOD、CAT 活性差异无统计学意义, 同时中药干预组和中药预防组 GSH-Px 和 SOD 的活性与空白组比较差异无统计学意义, 提示肺痹汤 2 号对小鼠肺组织氧化损伤起到了一定的保护作用, 但中药修复组织氧化损伤、恢复组织抗氧化系统活力可能需要较长的时间, 故未较模型组显示明显改善, 今后需延长实验时间进行观察。

参考文献

[1] 何丽. 二氧化硫及其酸雨(雾)对人体的危害 [J]. 湖北

气象, 1999(1): 42-44.

④ 刘楠媚, 莫运政, 刘利群, 等. 大气二氧化硫与居民每日呼吸系统疾病死亡相关性的时间序列分析 [J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(5): 385-388.

⑤ 张波, 秦国华, 孟紫强. 二氧化硫对小鼠肺组织氧化损伤的效应 [J]. 工业卫生与职业病, 2004, 30(4): 212-216.

⑥ 焦扬, 吴志松, 曹芳. 雾霾致病的病因病机特征初探 [J]. 中医杂志, 2016, 57(9): 740-742.

⑦ 焦扬, 关天宇, 周平安. 肺痹汤对肺纤维化大鼠肺组织中 p38 分裂原激活蛋白激酶及转化生长因子 $\beta 1$ 的影响 [J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 259-261.

⑧ DEMLING RH. Current concepts on the adult respiratory

distress syndrome [J]. Circ Shock, 1990, 30(4): 297-309.

⑨ 李新甫, 汪建新, 翁翠莲. 内毒素致兔急性肺损伤时 MDA、SOD 的变化 [J]. 军医进修学院学报, 2007, 28(5): 339-341.

⑩ 付瑞燕, 陈坚, 李寅. 谷胱甘肽过氧化物酶系统在微生物细胞抗氧胁迫系统中的作用 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 770-775.

⑪ 刘慧. 还原型谷胱甘肽对油酸致家兔急性肺损伤的影响及机制研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2008.

⑫ 彭文鸿, 黄念秋, 毛宝龄, 等. 超氧化物歧化酶和过氧化氢酶对大鼠急性肺损伤的预防作用 [J]. 解放军医学杂志, 2016, 21(5): 339-341.

Effect of *Feibi Decoction* II (肺痹汤二号) on Lung Oxidative Injury in Mice Exposed to Sulfur Dioxide

WU Zhisong, CAO Fang, NIU Jie, MA Ruihong, JIAO Yang

(Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Feibi Decoction* II (肺痹汤二号) on oxidative damage of lung tissue in mice exposed to sulfur dioxide (SO_2). **Methods** A total of forty-eight ICR mice were randomly divided into blank group, model group, traditional Chinese medicine prevention group, and traditional Chinese medicine treatment group with 12 mice in each group. Except for the blank group, the other groups of mice were treated with SO_2 static inhalation for 21 days. The Chinese medicine treatment group began to administer *Feibi Decoction* II (concentration 1 g/ml) 10 ml/(kg · d) intragastrically for 14 days from 1 week after exposure. In the Chinese medicine prevention group, 10 ml/(kg · d) of *Feibi Decoction* II was intragastrically administered from 1 week before exposure, and 10 ml/(kg · d) of normal saline was intragastrically administered to the blank group and model group, and all the treated groups were intragastrically administered for 28 days. The contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) and the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in lung tissue of mice were detected, and the lung tissues were observed by pathological HE staining.

Results The results of HE staining showed that the alveolar walls of the mice in the model group were continuously destroyed, bullae appeared, and a large number of inflammatory cells infiltrated in the alveolar walls. Compared with the model group, the degree of inflammatory cell infiltration in the lung tissue of the Chinese medicine treatment group and the Chinese medicine prevention group was reduced, and the reduction was more obvious in the Chinese medicine prevention group. Compared with the blank group, the MDA content in the lung tissue of the model group increased, while the GSH, GSH-Px, SOD, and CAT contents decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the MDA contents in the lung tissue of the Chinese medicine prevention group and the Chinese medicine treatment group were higher than that of the blank group, and the GSH and CAT contents were also lower than those of the blank group ($P < 0.01$). The GSH-Px and SOD contents were not significantly different from the blank group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Feibi Decoction* II could reduce the oxidative damage of lung tissue in mice exposed to SO_2 , which may be related to the promotion of the absorption of inflammatory exudate in lung tissue of mice exposed to SO_2 .

Keywords lung injury; sulfur dioxide; *Feibi Decoction* II; inflammatory exudation; oxidative stress

(收稿日期: 2018-06-21; 修回日期: 2018-08-30)

编辑: 邓媛