

泻肺平喘灵及其拆方对大鼠肺泡表面活性物质的影响

倪新强 韩新民*

南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市仙林大学城仙林大道 138 号, 210046)

基金项目: 南京中医药大学儿科学科开放课题资助项目 (EZK2009014)

* 通讯作者: hxm1nj@163.com, 15195996828

[摘要] 目的 探讨泻肺平喘灵及其拆方阻断“肺合大肠”模型大鼠内毒素血症肺组织损伤的机制。方法 将 70 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、解扎组、三拗组、三通组、三活组、全方组, 每组 10 只, 采用直肠体外不全结扎法制备“肺合大肠”动物模型, 造模 72h 后处死模型组, 各药物干预组解扎后每天分别灌胃给予 1ml/100g 体重三拗汤、三通方、三活方和泻肺平喘灵, 解扎组和正常组给予等体积生理盐水。3 天后观察大鼠肺泡灌洗液中磷脂及白蛋白水平的改变。结果 模型组大鼠造模后肺泡灌洗液中白蛋白含量明显升高 ($P < 0.01$), 磷脂含量降低 ($P < 0.01$), 解扎组、泻肺平喘灵及其拆方组白蛋白含量均降低, 磷脂水平升高, 与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 泻肺平喘灵及其拆方均能够有效清除模型大鼠肺泡灌洗液中白蛋白, 从而减少磷脂的耗损, 有效阻断内毒素血症对模型大鼠肺组织及功能的损伤。

[关键词] 泻肺平喘灵; 支气管哮喘; 肺合大肠; 磷脂; 白蛋白; 大鼠

Influence of Xiefei Pingchuanling and Its Decomposed Formulas on the Pulmonary Surfactant in Rats

NI Xinqiang, HAN Xinmin

(The First College of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046)

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of Xiefei Pingchuanling (Formula for clearing the lung to stop asthma) and its decomposed formulas in blocking the endotoxemia causing the pulmonary injury of the Lung and Large Intestine Interiorly-exteriorly Related Model rats. **Methods** Seventy SD rats were randomized into blank group, model group, ligation-removed group, Xiefei Pingchuanling group, decomposed formula San'ao, Santong, and Sanhuo groups, with 10 in each. The Lung and Large Intestine Interiorly-exteriorly Related models were made by incomplete ligation of the rectum in vitro. Seventy-two hours after modeling the rats of model group were killed. All other medicinal intervention groups were treated with intragastric feeding 1ml/100g body weight of San'ao, Santong, and Sanhuo decoctions, and Xiefei Pingchuanling respectively everyday after ligation removed. The ligation-removed group and blank group were given the same volume normal saline. Three days later the changes of phospholipid and albumin in pulmonary alveoli lavage fluid were observed. **Results** The level of albumin in pulmonary alveoli lavage fluid of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), while the level of phospholipid decreased ($P < 0.01$). The level of albumin of the ligation-removed group, Xiefei Pingchuanling group, and decomposed formula groups was decreased, while the level of phospholipid increased, there existed a significant difference in comparing with that of the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Xiefei Pingchuanling and its decomposed formulas could effectively decrease the albumin in pulmonary alveoli lavage fluid of model rats, thus reducing the exhaustion of phospholipid to block endotoxemia causing the injury of lung tissues and functions.

Key Words Xiefei Pingchuanling (Formula for clearing the lung to stop asthma); branchial asthma lung and large intestine interior-exterior relation; phospholipids; albumin; rats

支气管哮喘是常见的一种气道慢性炎症性疾病, 其中热性哮喘的中医治疗多遵循清热宣肺化痰平喘之法, 本课题组提出痰瘀胶结是哮喘反复发作的重要病机特点, 通腑涤痰是控制哮喘发作不容忽视的重要环节, 提出“哮喘必当活血通腑”^[1-2] 的治法, 由此创制了治疗小儿热性哮喘的泻肺平喘灵, 在临床上取得了较好的疗效^[3]。但其药理作用机制尚

不明确。哮喘时肺泡表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 不足或功能不良是哮喘气道炎症和气道高反应性的重要原因之一^[4]。本研究通过拆方观察泻肺平喘灵对“肺合大肠”模型大鼠肺泡灌洗液中白蛋白及 PS 主要成分磷脂的影响, 比较各拆方组间异同, 以探讨其可能作用机制, 以指导临床遣方用药。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级SD大鼠70只,雌雄各半,鼠龄4周,体重 (100 ± 10) g,浙江省实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(浙)2008-0033。

1.2 药物及制备

泻肺平喘灵:(炙)麻黄 5g,杏仁 10g,甘草 3g,葶苈子(包煎)10g,瓜蒌皮 10g,丹参 12g,虎杖 12g,大黄(后下)3g,细辛(后下)3g。泻肺平喘灵拆方组三拗汤:(炙)麻黄 5g,杏仁 10g,甘草 3g。三拗汤+活血药(简称“三活方”):(炙)麻黄 5g,杏仁 10g,甘草 3g,丹参 12g,虎杖 12g。三拗汤+通腑药(简称“三通方”):(炙)麻黄 5g,杏仁 10g,甘草 3g,大黄(后下)3g,瓜蒌皮 10g。以上药物均购自南京中医药大学附属医院。泻肺平喘灵制备:将药物分2份浸泡,一份为大黄、细辛,其余另泡,其中葶苈子以纱布包裹,先浸泡30min,按1:8比例加蒸馏水,先用武火煎至水沸,然后改用文火保持微沸状态,煎至25min时,加入大黄、细辛及其浸液,再煎10min,8层纱布过滤,过滤后的药滓再加入6倍量的蒸馏水,以前法煎煮,取滤液,将两次所得药液合并,4000r/min离心10min后,取上清液在水浴中蒸发浓缩至所需浓度后,置于4℃冰箱保存备用。临用时加温至37℃,用蒸馏水配成所需浓度的溶液。各拆方药液制备同上。

1.3 试剂与主要仪器

考马斯亮兰试剂盒(南京建成生物工程研究所提供,批号:20091027);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9076A型,上海精宏实验设备有限公司);紫外可见分光光度计(UV1600型,上海美谱达仪器有限公司)。

1.4 分组与模型制备^[5-6]

70只大鼠适应性喂养1周后,按随机数字表法分为7组,分别为正常组、模型组、解扎组、三拗组、三通组、三活组、全方组各10只,雌雄各半。正常组正常饮食。其余6组采用直肠体外不全结扎法制备“肺合大肠”动物模型:大鼠禁食不禁水12h后,腹部皮肤常规消毒,用1%戊巴比妥钠以3ml/kg体重剂量大鼠腹腔注射麻醉,以耻骨联合上2cm为中心点并切开,暴露并游离直肠,以10号丝线经腹壁从距肛门1.2~1.5cm处以“8”字型从直肠下方绕过,再经腹壁引出,在引出的丝线内套入直径为0.4cm的

圆线打结,退出圆线后,再逐层缝合腹腔,苏醒后正常饮食。

1.5 给药方法

模型组术后72h处死并立即进行实验观察,其余6组于术后72h从体外解除直肠结扎线并继续饲养,同时于解扎当日开始分别灌胃相应药物。三拗组予三拗汤 3.92g/(kg·d);三通组予三通方 7.11g/(kg·d);三活组予三活方 10.54g/(kg·d);全方组予泻肺平喘灵 16.66g/(kg·d),在保证药物剂量的前提下,调整浓度使每只动物给药容积均为10ml/(kg·d),正常组和解扎组给予等体积生理盐水灌胃。

1.6 样品采集及处理

大鼠肺泡灌洗液的采取^[7]:模型组大鼠于造模后72h处死,其余组大鼠于造模后6天处死,经1%戊巴比妥钠以3ml/kg体重剂量腹腔麻醉后,开胸心脏放血处死,结扎右肺叶,行左肺叶支气管肺泡灌洗术(BAL),每次以4℃PBS按15ml/kg体重的量灌洗,共3次,支气管肺泡灌洗液(BALF)总回收率 $\geq 85\%$,灌洗液回收后双层无菌纱布过滤,然后以4℃离心(3000r/min,10min),取上清于-20℃冻存待检。

1.7 指标检测

1.7.1 肺组织湿/干重比值(W/D)测定 取右肺上叶组织,置于无菌4℃PBS液中反复漂洗,然后用滤纸吸干肺表面的血液,于分析天平称湿重(W)后,置于80℃烤箱中,48h后取出称重至恒重后,称干重(D),计算W/D。

1.7.2 肺泡灌洗液中白蛋白及磷脂含量测定 考马斯亮兰染料结合法测定BALF蛋白质含量,定磷法测定BALF总磷脂含量,测定步骤按试剂盒说明的要求进行。

1.8 统计学方法

采用SPSS 15.0统计软件进行数据处理,计量数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

模型组造模后,逐渐出现发热、蜷缩、纳差,呼吸加快,有喘息样动作出现;毛发略黄少光泽,直立、杂乱;鼻腔有血性分泌物流出,眼球充血,眼周出现分泌物,腹部胀大明显,大便变干变硬,粒形短小;舌体

表 1 各组大鼠肺组织 W/D 和 BALF 磷脂、总蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	W/D	磷脂(mg/L)	白蛋白(g/L)
正常组	10	3.35±0.13	169.75±12.18	0.05±0.02
模型组	9	5.81±1.00*	58.14±5.39*	0.21±0.05*
解扎组	10	4.68±0.06*△	79.41±7.42*△	0.21±0.03*
三拗组	10	4.20±0.09*△▲	86.85±7.17*△	0.14±0.02*△▲
三通组	9	4.08±0.08*△▲○	103.26±9.93*△▲○	0.13±0.05*△▲
三活组	10	3.92±0.18*△▲●	103.95±12.39*△▲○	0.10±0.03*△▲○
全方组	9	3.59±0.13*△▲○□	138.68±9.68*△▲○□	0.08±0.02*△▲○●

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.01$;与解扎组比较,▲ $P<0.01$;与三拗组比较,○ $P<0.01$;与三通组比较,● $P<0.05$;与三活组比较,□ $P<0.01$

瘦小,舌质稍紫,上罩白苔,个别有黄白苔。其余各组大鼠解扎并给药后,一般状况较模型组改善明显,呼吸频率渐至正常,表明给予泻肺平喘灵及各拆方药后,模型大鼠肺气宣降恢复,机体气机升降出入恢复正常,呼吸急促渐纠正。

2.2 各组大鼠肺组织 W/D 和 BALF 磷脂、总蛋白含量比较

表 1 示,与正常组相比,模型组大鼠肺组织 W/D 和 BALF 白蛋白含量显著增高($P<0.01$),总磷脂含量显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组肺组织 W/D 和 BALF 白蛋白含量明显降低($P<0.01$),磷脂含量呈显著增加($P<0.01$)。各药物组 W/D 依次为全方组<三活组<三通组<三拗组,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与三拗组相比,三通组、三活组及全方组白蛋白含量明显降低,磷脂水平相应增加($P<0.01$);三通组与三活组间白蛋白及磷脂含量差异无统计学意义($P>0.05$);全方组较各拆方组更能明显降低白蛋白含量,增加磷脂含量($P<0.01$)。提示泻肺平喘灵及其各拆方药均能不同程度减轻模型鼠肺组织水肿,同时降低 BALF 中白蛋白含量,增加磷脂含量,以泻肺平喘灵最优,部分药组之间呈协同的作用趋势。

3 讨论

泻肺平喘灵由“三拗汤”加味而来。方中麻黄宣发肺气、降气平喘,杏仁化痰降气、润肠通便,麻黄配杏仁升降并用、宣肺平喘;丹参活血凉血、化瘀通络,虎杖活血通经、清热解毒,生大黄清热泻火、凉血祛瘀、通腑泄毒,三者合用活血解毒通腑泄热祛邪;葶苈子泻肺涤痰、下气平喘,细辛宣肺温化痰饮,瓜蒌皮清热化痰,兼能滑痰,使痰出易咯,又有润下滑肠之功,三药增强麻黄、杏仁宣肺降气,化痰平喘之力;甘草性平,调和诸药。全方共具清热解毒、活血通

腑、泻肺平喘之功,使热清毒解血行,肺气宣降,肠腑通畅,痰祛喘平,疾病自愈。全方以通调肺气为核心,宣发以使“天气通于肺”,肃降以使“地气纳于肾”,充分体现了宣肺、肃肺、泻肺、化痰、通腑、活血的功效,切中病机,及时恢复肺之宣降功能。本方宣肺通腑,泻肺热有助于通大肠,攻热结有助于降肺气,为多法联用、脏腑同治之剂,体现肺肠气机相关,为肺肠合治的代表方之一。

本研究采用直肠体外半结扎法制备的“肺合大肠”模型,旨在模拟中医的“阳明喘满”病证。而肠源性肺损伤的呼吸窘迫、紫绀、神志改变、便秘、鼓肠及程度不等的肠鸣音减弱、高热等症状,中医学概括为“喘”、“昏”、“满”、“热”,尤以“喘”、“满”为突出表现,这些症状与阳明腑实喘满证颇有相似之处,有人将其与中医阳明腑实之“喘满证”相联系^[8],故此模型亦即“肠源性肺损伤”动物模型。冯立民等认为内毒素血症很可能是阳明腑实证之主要病理生理基础^[9]。ET 通过激活体内的单核巨噬细胞系统等释放大炎症介质如 TNF- α 等,TNF- α 对肺有强烈毒性作用,使肺泡、毛细血管内皮细胞的屏障破坏,肺内液体渗出与吸收动态平衡遭到破坏,大量富含蛋白质的液体渗入组织间隙,引起肺水肿,同时灭活以磷脂为主要成分的 PS,使其功能下降^[10]。PS 失活或功能不足,一方面导致肺泡表面张力增加,使得肺间质静水压降低,另一方面因 PS 对肺泡—毛细血管屏障通透性的限制作用减弱,进一步促进肺水肿的形成,如此便形成恶性循环^[11]。

本研究中模型组大鼠肺组织 W/D 明显增加,BALF 中总蛋白水平显著增加,总磷脂含量明显降低,用解扎、泻肺平喘灵及其拆方等处理可在不同程度上减轻肺组织 W/D 水平,同时降低 BALF 中白蛋白含量,增加磷脂含量。可能因各干预组均能降

低肺毛细血管内皮细胞的损伤程度,同时也可以减少血浆蛋白向肺泡腔内渗出,从而使肺毛细血管通透性降低,蛋白渗漏减少,在一定程度上减轻肺水肿,且全方组表现为臭秽的黑色稀便,说明泻肺平喘灵泻肺以解毒,邪气渐退,正气渐复,恢复肺脏之通调水道之功,使水液代谢趋于正常而改善模型大鼠的肺水肿状态。本研究表明,在三拗汤基础上配伍通里攻下药、活血化瘀药组成的泻肺平喘灵,能降低肺泡灌洗液中白蛋白,从而减少磷脂的耗损,其整体疗效明显优于各拆方单用。泻肺平喘灵组成中因有大黄,实验大鼠多数出现大便稀,小便增多,是痰饮由二便排出之故。这与临床应用时情况类似。腹泻导致水、电解质紊乱,甚至血容量不足而影响循环功能。但腹泻很可能也是大黄等通下药发挥泻下作用,消除肠道内及其他部位细菌和毒素的重要方式。如何解决这个矛盾,使各药既能发挥疗效又减少副反应,值得进一步研究。

参考文献

- [1]倪新强,韩新民.肺与大肠相表里发生学研究[J].安徽中医学院学报,2010,29(5):1-3.
- [2]韩新民,李江全,任现志.活血通腑法是治疗哮喘发作期的重要法则[J].南京中医药大学学报,2003,19(5):304.
- [3]韩新民,杨江,孙轶秋,等.“泻肺平喘灵”治疗小儿热性哮喘 55 例临床观察[J].江苏中医药,2007,39(11):39-41.
- [4]Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung disease: state of the art[J]. Eur Respir J, 1999,13(6): 1455-1476.
- [5]韩国栋,常繁华,冯学瑞,等.对“肺与大肠相表里”理论的实验研究[J].中医杂志,1990,31(2):48-50.
- [6]杨胜兰,王鹏,李道木,等.通腑法对大鼠肠源性肺损伤保护作用机制的研究[J].中国中西医结合消化杂志,2003,11(3):154-156.
- [7]史菲,邱晨.大鼠支气管肺泡灌洗术标准化操作的探讨[J].中国现代医学杂志,2002,12(24):67-69.
- [8]薛芳.急性呼吸窘迫综合征与阳明腑实喘满证[J].辽宁中医杂志,1982,5(4):10-11.
- [9]冯立民,陈海龙,关凤林.阳明腑实证时内毒素与炎症介质的变化及复方大承气汤的治疗作用[J].中国中西医结合外科杂志,2003,9(5):351-353.
- [10]赵丹虹,吴肇汉,孙波.内毒素致急性肺损伤时内源性肺表面活性物质的改变[J].上海医科大学学报,1999,26(3):169-171.
- [12]张绍芬,邓继岩,李晶,等.肺炎患儿支气管肺泡灌洗液中 PS 水平的变化[J].青岛大学医学院学报,2009,45(6):542-543,546.

(收稿日期:2010-12-29,修回日期:2011-03-17)

[编辑:行之]

(上接第 1592 页)

- [4]郭丽娥,陈晓虎,张如升.丹参对经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的预防机制[J].中国民族民间医药,2009,4(1):1.
- [5]Erdem O, Erdem M, Erdem A, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and assessment of microvascular density with CD34 and endoglin in proliferative endometrium, endometrial hyperplasia, and endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer, 2007, 17(6): 1327-1332.
- [6]Tanigawa N, Lu C, Mitsui T, et al. Quantitation of sinusoid-like vessels in hepatocellular carcinoma: Its clinical and prognostic significance[J]. Hepatology, 1997, 26(5): 1216-1223.
- [7]Kimura H, Nakajima T, Kagawa K, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma as evaluated by CD34 immunohistochemistry[J]. Liver, 1998, 18(1): 14-19.
- [8]Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia[J]. Am J Physiol, 1996, 270 (5 Pt 2): H1791-1802.
- [9]Ehrlich M, Rao J, Pabby A, et al. Improvement in the appearance of wrinkles with topical transforming growth factor beta (1) and L-ascorbic acid[J]. Dermatol Surg, 2006, 32(5): 618-625.
- [10]黄晨,张春蕾,李源,等.老年大鼠心肌缺血后心脏 VEGF-1 和 VEGFR-2 表达的研究[J].中国老年学杂志,2007,27(2):113-115.
- [11]尹瑞兴,冯建章,姚震.急性心肌梗死大鼠血清血管内皮生长因子含量的变化[J].中国病理生理杂志,2000,16(1):30-32.
- [12]汪姗姗,李勇,范维琥,等.麝香保心丸对实验性心肌梗塞大鼠心脏的促血管生成作用[J].中成药,2002,24(6):446-449.
- [13]王大英,李勇,范维琥.麝香保心丸对心肌梗死大鼠梗死面积和血管新生的作用[J].中成药,2004,26(11):912-915.

(收稿日期:2010-12-13,修回日期:2011-03-09)

[编辑:行之]