

益气化纤汤对博来霉素 A₅ 诱导的大鼠肺纤维化的影响

★ 郑洁 刘良倚 姜瑞姣 (江西中医学院附属医院呼吸科 南昌 330006)

摘要:目的:研究益气化纤汤对博来霉素 A₅ (BLMA₅) 诱导的大鼠肺间质纤维化的治疗作用。方法:利用博来霉素气管内注射制作大鼠肺纤维化模型。90 只健康雄性 SD 大鼠被随机分为正常组、模型组、强的松组和小、大剂量益气化纤汤组。在同样条件下,药物灌胃饲养 28 d 后,断颈处死。取双肺标本进行病理切片、测定转化生长因子(TGF-β₁) 表达和羟脯氨酸(HYP)含量。结果:从病理切片、肺组织中 TGF-β₁ 表达和肺组织匀浆中羟脯氨酸的含量方面来看,药物治疗各组的肺纤维化均比模型组轻。结论:益气化纤汤对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化有一定的治疗作用,其作用机制可能通过抑制 TGF-β₁ 生成实现。

关键词:益气化纤汤;博来霉素;肺纤维化;TGF-β₁;羟脯氨酸

中图分类号:R 285.4 **文献标识码:**A

Effect of Yiqihuaxian Decoction on Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats

ZHENG Jie, LIU Liangji, JIANG Ruijiao.

Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Jiang xi college of Traditional Chinese Medicine. Nanchang, Jiangxi, 330006

Abstract: Objective: To study the inhibitory effects of Yiqihuaxian (YQH) decoction on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Methods: Bleomycin was injected intratracheally to make rats lung fibrosis model. The rats were randomly divided into normal group, model group, prednisone group and YQH decoction group (small dose, large dose). All rats were raised under the same conditions. After 28 days, the rats were killed and the lungs were examined pathologically and the expression of TGF-β₁ and the content of hydroxyproline were determined. Results: The changes of pulmonary fibrosis reflected by lung pathological examination, TGF-β₁ expression and hydroxyproline content were lighter in the drug therapy groups than those in the model group. Conclusion: YQH decoction has a certain treating effect on the pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats, possibly through inhibition of TGF-β₁ expression.

Key words: Yiqihuaxian decoction; Bleomycin; Pulmonary fibrosis; TGF-β₁; Hydroxyproline

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明、以弥漫性肺炎和肺泡结构紊乱最终导致肺间质纤维化为特征的疾病。西医治疗以肾上腺皮质激素及免疫抑制剂为主,但效果不甚理想而且副作用明显^[1]。近年来,中医药在防治肺间质纤维化方面取得了一定的进展,显示出良好的前景。我们复制以博来霉素 A₅ (BLMA₅) 诱导大鼠肺纤维化模型,观察益气化纤汤对大鼠肺间质纤维化过程中肺肺炎、肺纤维化程度、肺组织形态学改

变和转化生长因子(TGF-β₁) 表达、羟脯氨酸(HYP)的含量变化,以探讨其对肺纤维化的影响,为临床防治肺纤维化提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物:90 只健康雄性 SD 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供,体重 180 ~ 200 g。

实验药物:益气化纤汤由生黄芪、白术、人参、当归、陈皮、升麻、柴胡、山茱萸、桂枝、丹皮、赤芍、茯

苓、桃仁、地龙组成,加水浸泡 1 h 后煮沸 30 min,滤过取汁,再加水煎煮 30 min,滤过取汁,合并两次药液,水浴浓缩药液至每 1 ml 含生药 1 g, 高压灭菌保存,用时摇匀。强的松 5 mg/片,由天津力生制药股份有限公司生产,津卫准字(1981)第 00132 号,批号 03050860,用生理盐水溶解制成相应浓度溶液 2 ml。

主要试剂:博来霉素(bleomycin)8 mg/支,由天津太河制药有限公司提供(批号 040314),以生理盐水稀释为 5 mg/ml 备用;TGF- β_1 兔多克隆抗体 IgG,由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,规格 200 mg/ml,抗原决定簇位于 TGF- β_1 的羧基端,相对分子质量 15×10^3 ;阳性对照,MCF7WCL、sc22206;兔二抗试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司提供;羟脯氨酸试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型制备 参照 Szapiel^[2] 方法。将大鼠麻醉,暴露气管,一次性注入 BLMA₅ 注射液(5 mg/kg),左右旋转鼠板,使 BLMA₅ 注射液均匀分布于两肺,制成模型。

1.2.2 实验动物分组及给药方法 实验动物按体重分层随机分为 5 组,每组 18 只。每天灌胃 1 次,每周复查体重,调整给药量。分组:正常组、模型组、强的松组、益气化纤汤低剂量组(1.5 g/kg)、益气化纤汤高剂量(3.0 g/kg)组。强的松组建模后第 2 天始予以强的松 6.25 mg/kg 灌胃。益气化纤汤低剂量组、益气化纤汤高剂量组在建模后第 2 天分别予以益气化纤汤提取液 1.5 g/kg、3.0 g/kg 灌胃。正常组、模型组建模后第 2 天起每日予以等容生理盐水灌胃。以上各组均在相同条件下饲养,自由饮水进食,连续给药 28 d。所有实验大鼠于第 29 天断颈处死取材。

1.2.3 标本处理、检测指标及方法、病理检查 处死动物后,统一取左肺,置入 4% 中性甲醛溶液固定 48 h,逐级酒精脱水,二甲苯透明、浸蜡,石蜡包埋,常规切片 4 μ m,并行 HE、Masson 染色和免疫组化。病理标本编号由病理科医生观看,每张切片观察 8 个视野。肺泡炎的分级(光镜下)参照 Szapiel 等^[3] 的方法确定肺泡炎的程度;免疫组织化学测定肺组织中 TGF- β_1 表达。肺组织匀浆羟脯氨酸含量测定:处死动物后,取鼠右肺,精确称取湿重 50 mg,加水解液 1 ml 混匀,95 $^{\circ}$ C 水浴水解 20 min,流水冷却后调 pH 值至 6.10~6.18,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液 1 ml 作检测。

1.2.3 统计学处理 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,将 TGF- β_1 阳性细胞阳性率平方根作角度变换为计量资料,组间均数差异统计比较用单因素方差分析,等级资料采取多个样本比较的秩和检验,两两比较采用 Nemenyi 法;以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 一般状态

正常对照组大鼠皮肤光滑,身体健壮,饮食如常,善打斗,体重增加;模型组很快出现皮毛干枯、稀疏,精神不振,饮食减少,28 d 时明显消瘦,懒动,咳嗽;益气化纤汤高剂量组皮肤尚可,较活泼,饮食较模型组好;低剂量组和泼尼松组开始尚可,后期出现消瘦,懒动,皮毛干枯,咳嗽等。

2.2 组织病理学改变

整体观察:正常对照组肺外观无明显异常,呈粉红色,表面光滑;模型组呈暗红色,部分肺叶呈灰白色,有大小不等的白色小结节,部分体积缩小,硬度增加。益气化纤汤高剂量组与正常组相近;低剂量组和泼尼松组 7 d 时与正常组相近,但 28 d 时,呈暗红色。

光镜观察:正常组肺内结构清晰,肺泡间隔未见增厚,无水肿、炎症及纤维化表现,肺泡腔内无明显渗出;模型组均表现有程度不等的肺泡炎,肺泡腔及肺间质内有大量炎性细胞浸润,肺泡隔水肿,明显增宽。间质胶原纤维增生呈带状,纤维化已经形成。部分出现中重度肺纤维化改变,肺泡结构破坏或消失,肺组织以胶原沉积、纤维化改变为主;强的松组肺泡炎及纤维化程度均较模型组轻,肺泡隔增厚程度相对较轻,病变范围局限,肺泡炎及纤维化从轻度到重度变化(I~III级)均有。不同剂量益气化纤汤组肺泡炎及纤维化程度均较模型组轻,炎症细胞浸润少,与强的松组比较病变程度类似。肺组织病理学检查结果见表 1。

表 1 各组肺泡炎、肺纤维化组织病理分级

组别	n	各组肺泡炎组织病理分级				各组肺纤维化组织病理分级			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
益气化纤汤高剂量组	18	0	9	6	3	3	8	5	2
益气化纤汤低剂量组	18	0	8	6	4	2	7	6	3
强的松组	18	0	7	8	3	3	7	6	2
模型组	18	0	3	7	8	1	4	6	5
正常对照组	18	18	0	0	0	18	0	0	0

2.3 TGF- β_1 免疫组化的结果和肺组织匀浆羟脯氨酸含量比较

见表 2。

表 2 各组免疫组化检测肺
TGF- β_1 表达和肺组织匀浆羟脯氨酸含量

组别	n	TGF- β_1 阳性细胞率 (%)	羟脯氨酸含量 /ng · mg ⁻¹
益气化纤汤高剂量组	18	0.2056 ± 0.0510 **	805.03 ± 174.69 **
益气化纤汤低剂量组	18	0.1984 ± 0.0648 **	726.23 ± 173.25 **
强的松组	18	0.2128 ± 0.4913 **	804.69 ± 169.86 **
模型组	18	0.3086 ± 0.0423 **	1021.11 ± 181.46 **
正常对照组	18	0.0815 ± 0.0695	590.41 ± 132.51

注: * $P < 0.05$, 与模型组比较; ** $P < 0.01$, 与正常组比较; # $P > 0.05$, 与模型组比较。

3 讨论

IPF 在中医传统著述中没有与其完全相对应的病名, 结合该病的临床表现可属中医的“肺痹”或“肺痿”的范畴, 我们认为 IPF 的病位重点在肺脾肾, 病机关键在于气虚血瘀, 气行则血行, 气虚则血滞, 滞而不去则为痰, 故治疗大法为补(益)气化瘀为主^[1]。根据此法则我们拟定了益气化纤汤, 主要成分由古方补中益气汤合桂枝茯苓丸加味组成。补中益气汤出自李杲《脾胃论》, 由黄芪、人参、当归、陈皮、升麻、柴胡、白术、炙甘草等八味药物组成, 是益气健脾的代表方, 有补中益气、升阳举陷的功用。桂枝茯苓丸出自张仲景《金匮·妇人妊娠脉证并治篇》, 本方为仲景活血化瘀、消癥除积的名方, 由桂枝、茯苓、丹皮、桃仁、赤芍五味药物组成, 为历代医家所喜用, 多用于治疗癥瘕、积聚。益气化纤汤中黄芪、人参大补肺气, 黄芪又能“补五脏诸虚”, 还取其“通调血脉, 流行经络”之意, 为补气诸药之最。药理研究表明黄芪具有抑制纤维增生, 促进纤维吸收, 逆转肺、肝纤维化的作用^[3,4]。桂枝、茯苓、丹皮、桃仁、赤芍及当归具有活血化瘀、抗纤维化之功效。现代药理研究表明, 补中益气汤和桂枝茯苓丸均具有改善微循环、增强机体免疫力、抗感染、抑制慢性增生性炎症的作用^[5,6]。最近, 张氏^[7]报道, 桂枝茯苓丸可有效的防治大鼠肝纤维化, 减轻肝脏胶原纤维增生程度。本试验病理结果显示, 模型组有程度不等的肺泡炎, 肺泡隔水肿增宽, 成纤维细胞增生, 肺泡腔变窄, 间质胶原纤维增生, 部分肺泡结构破坏或消失。正常组无肺泡炎、纤维化, 与模型组比较有显著统计学差异, 说明博来霉素有确切的致肺纤维化作用, 大鼠肺纤维化模型符合试验要求。小、大剂量益气化纤汤组肺泡炎、纤维化程度, 较模型组明显减轻, 有统计学意义, 说明益气化纤汤对肺纤维化有一定的治疗作用。

肺纤维化的发病机制迄今尚未完全阐明。TGF- β_1 是参与肺纤维化的重要因子, 是细胞分化的重要调节因素, 同时检测 TGF- β_1 表达水平可以从

一个方面说明肺损伤修复纤维化情况。我们的试验结果表明, 模型组大鼠肺组织中 TGF- β_1 表达水平明显增强; 正常组大鼠肺组织中存在一定水平的 TGF- β_1 弱表达, 与模型组比较显著减少; 小、大剂量益气化纤汤组大鼠肺组织的 TGF- β_1 表达水平明显较模型组下降。本试验说明益气化纤汤可能通过抑制 TGF- β_1 表达发挥其抗肺纤维化的作用。因此我们认为益气化纤汤抗肺纤维化的机制之一可能为抑制 TGF- β_1 的生成。羟脯氨酸是机体胶原蛋白的主要成分之一, 在弹性蛋白中含量极少, 而在其它蛋白则不存在。因此, 羟脯氨酸为胶原纤维所特有, 以此作为肺纤维化的指标, 可以判断肺纤维化的程度。在本试验中我们观察到, 模型组羟脯氨酸含量显著高于正常组, 博来霉素引起大鼠肺组织胶原大量沉积; 小、大剂量益气化纤汤组羟脯氨酸含量明显低于模型组, 说明益气化纤汤能够抑制胶原的产生和沉积, 减轻肺纤维化, 进一步分析, 其结果可能是益气化纤汤通过抑制 TGF- β_1 的产生和肺成纤维细胞的增殖协同产生的。

目前临床上治疗肺纤维化主要使用皮质激素, 特别是肺纤维化早期即肺肺炎期, 因此我们采用强的松作为益气化纤汤治疗对照。本试验中, 小、大剂量益气化纤汤组、强的松组之间在病理结果、羟脯氨酸含量、TGF- β_1 表达水平上两两比较无显著差异, 说明益气化纤汤治疗大鼠肺纤维化的疗效与强的松相仿, 但强的松有诸如向心性肥胖、高血压、糖尿病、抵抗力下降、骨质疏松等不良反应, 而益气化纤汤副作用少。从本试验我们发现小、大剂量益气化纤汤, 尽管剂量成倍增加, 治疗结果无明显差异, 而且未发现药物中毒致死大鼠, 说明益气化纤汤药物治疗安全范围大。

参考文献

- [1] 郑洁, 洪广祥. 肺间质纤维化的中医药研究进展[J]. 中医杂志, 2001, 42(7): 438-440.
- [2] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse. Am Rev Respir Dis, 1979, 120 (4): 893.
- [3] 武蕾, 严玲, 孙彩霞. 肺纤 1 号治疗肺间质纤维化的临床体会[J]. 河北中医, 2004, 26(8): 604.
- [4] 柴文成, 李永春, 王洪新, 等. 中药当归治疗肺间质纤维化的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(7): 819-822.
- [5] 洪长福, 姜金萍, 周华仕, 等. 桃仁提取物对大鼠实验性矽肺纤维化的影响[J]. 浙江省医学科学院学报, 2000, 11(1): 7-8.
- [6] 吴宗群, 解建国. 补中益气汤提高机体免疫力的实验研究进展[J]. 中成药, 2002, 24(1): 62-64.
- [7] 张晓丽. 桂枝茯苓丸防治肝纤维化的实验研究[J]. 湖北中医学院学报, 2005, 7(1): 16-18.

(收稿日期: 2008-04-01)