

## 右归饮对肺纤维化大鼠的疗效评价及作用机制

唐磊<sup>1</sup>, 申萌萌<sup>1</sup>, 朱曼<sup>2</sup>, 康荻<sup>1</sup>, 李彧<sup>3</sup>, 李健<sup>3</sup>, 张林<sup>3</sup>,  
牛建昭<sup>3</sup>, 王继峰<sup>3</sup>, 李亚东<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029; 2. 淄博市中西医结合医院, 山东 淄博 255000;  
3. 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨温补肾阳的代表方剂右归饮对博来霉素致肺纤维化大鼠的药效作用和相关机制。**方法:**SPF级雄性SD大鼠25只,采用随机数字法,将SD大鼠分为正常组、模型组、右归饮高、中、低剂量组,每组各5只。气管内注射博来霉素( $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )建立实验性肺纤维化模型,并于造模后第15天开始灌胃高、中、低剂量( $20, 10, 5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )右归饮,连续给14 d。用动物肺功能仪检测大鼠吸气阻力(Ri),呼气阻力(Re),肺顺应性(Cdyn),用力肺活量(FVC), $0.4\text{ s}$ 率( $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$ ),呼气峰值流速(PEF),最大呼气中期流速(MMF),计算质量FVC;称量脏器质量和大鼠体质量,计算脏器系数;用血气分析仪检测腹主动脉酸碱度(pH),氧分压( $\text{PO}_2$ ),二氧化碳分压( $\text{PCO}_2$ ),氧饱和度( $\text{SO}_2$ );用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中肾素,前列腺素 $\text{E}_2$ ( $\text{PGE}_2$ ),基质金属蛋白酶-1(MMP-1)含量;取左肺进行马松(Masson)染色观察肺组织的病理变化。**结果:**与正常组比较,气管内注射 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 博来霉素能够明显增加SD大鼠肺脏质量和肺脏系数( $P < 0.05$ ),降低Cdyn,FVC和质量FVC( $P < 0.05$ ),增加Ri( $P < 0.05$ ),升高 $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$ ( $P < 0.05$ ),升高腹主动脉血中 $\text{PCO}_2$ 水平( $P < 0.05$ ),明显降低 $\text{PO}_2$ , $\text{SO}_2$ 水平( $P < 0.05$ ),升高血清中 $\text{PGE}_2$ 水平( $P < 0.05$ ),病理显示模型大鼠肺组织形成大量实变区,发生实变的肺组织以细胞异常增殖为主的非纤维化区和伴有大量细胞外基质沉积的纤维化区为主。与模型组相比,右归饮中剂量组肺脏质量明显回落( $P < 0.05$ ),Cdyn,FVC和质量FVC回升( $P < 0.05$ ),Ri, $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$ 下降( $P < 0.05$ ),血清中 $\text{PGE}_2$ 水平下降( $P < 0.05$ );右归饮高剂量组能够明显升高动脉血中 $\text{PO}_2$ , $\text{SO}_2$ 水平( $P < 0.05$ )。病理显示右归饮中剂量组能够抑制肺组织实变区向非实变区的炎性浸润。**结论:**右归饮能够改善实验性肺纤维化SD大鼠的肺功能,与右归饮降低血清中 $\text{PGE}_2$ 水平,抑制炎性浸润区的扩散,延缓纤维化进程有关。

**[关键词]** 肺纤维化; 博来霉素; 右归饮; 肺功能检测; 前列腺素 $\text{E}_2$ ; 血气分析

**[中图分类号]** R22;R242;R285.5;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0093-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181210

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1424.018.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-27 14:56

## Efficacy Evaluation and Mechanisms of Youguiyin in Rats with Pulmonary Fibrosis

TANG Lei<sup>1</sup>, SHEN Meng-meng<sup>1</sup>, ZHU Man<sup>2</sup>, KANG Di<sup>1</sup>, LI Yu<sup>3</sup>, LI Jian<sup>3</sup>,  
ZHANG Lin<sup>3</sup>, NIU Jian-zhao<sup>3</sup>, WANG Ji-feng<sup>3</sup>, LI Ya-dong<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Zibo Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zibo 255000, China;

3. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the efficacy and mechanism of Youguiyin, a representative decoction of tonifying kidney yang, in the rats with bleomycin induced pulmonary fibrosis. **Method:** A total of 25

**[收稿日期]** 20171226(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202787,81573716);教育部国家外专局创新引智基地项目(B07007);北京中医药大学科研发展基金项目(2017-ZXFZJJ-022);北京中医药大学校级自主课题项目(2017-JYB-JS-175,2017-JYB-XS-034)

**[第一作者]** 唐磊,在读硕士,从事中医药防治肺纤维化的系统生物学研究,E-mail:956268183@qq.com

**[通信作者]** \*李亚东,博士,副教授,从事中医药防治肺纤维化的系统生物学研究,E-mail:lyd@buem.edu.cn

SPF male rats were divided into five groups by the method of random number table, namely normal group, model group, as well as Youguiyin high, medium and low dose groups, with 5 rats in each group. Pulmonary fibrosis models were established by intratracheal injections of bleomycin ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), and the rats were treated with high, medium and low doses ( $20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) of Youguiyin for 14 days from day 15 after modeling. Then the inspiratory resistance (Ri), expiratory resistance (Re), lung compliance (Cdyn), forced vital capacity (FVC), 0.4 second rate ( $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$ ), peak expiratory flow rate (PEF), and maximum mid expiratory flow velocity (MMF) were tested by animal lung function instrument, and FVC/lung weight were calculated; the weights of organs were recorded and the organ coefficient was calculated. The pH values of abdominal aorta (pH), oxygen partial pressure ( $\text{PO}_2$ ), carbon dioxide pressure ( $\text{PCO}_2$ ), oxygen saturation ( $\text{SO}_2$ ) were detected by blood gas analyzer. Renin, prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) levels in serum were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Histopathological abnormalities in left lungs were evaluated by Masson's trichrome stain. **Result:** As compared with the normal group, intratracheal injection of  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  bleomycin can significantly increase the lung weight and lung coefficient ( $P < 0.05$ ), decrease Cdyn, FVC and FVC/lung weight ( $P < 0.05$ ), increase Ri ( $P < 0.05$ ), increase  $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$  ( $P < 0.05$ ), increase  $\text{PCO}_2$  in abdominal aortic blood ( $P < 0.05$ ), decrease  $\text{PO}_2$  and  $\text{SO}_2$  significantly ( $P < 0.05$ ), and increase  $\text{PGE}_2$  levels in serum ( $P < 0.05$ ) of SD rats. Pathological examination of lung tissues showed large area of consolidation in lung tissue of model rats, and those lung tissues with consolidation were mostly formed by the non-fibrosis area with abnormal cell proliferation and fibrosis area with a large number of extracellular matrix deposition. As compared with the model group, Youguiyin medium dose group decreased the lung weight significantly ( $P < 0.05$ ), increased Cdyn, FVC and FVC/lung ( $P < 0.05$ ), decreased Ri and  $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$  ( $P < 0.05$ ), decreased  $\text{PGE}_2$  levels ( $P < 0.05$ ); while  $\text{PO}_2$  and  $\text{SO}_2$  levels in arterial blood were significantly increased in high dose group ( $P < 0.05$ ). Pathological examination showed Youguiyin can inhibit chronic inflammatory infiltration from pulmonary consolidation to normally aerated lung parenchyma. **Conclusion:** Youguiyin could improve the pulmonary function of model rats, which may be associated with lowering  $\text{PGE}_2$  in serum, inhibiting the diffusion of chronic inflammatory infiltration, and delaying pulmonary fibrosis.

[ **Key words** ] pulmonary fibrosis; bleomycin; Youguiyin; respiratory function tests; prostaglandin  $\text{E}_2$ ; blood gas analysis

肺纤维化是以结缔组织增生、进行性疤痕代替正常肺间质,引起肺泡隔增厚,导致肺功能下降和血液供氧减少为主要特征的多种肺系疾病的转归。曹孟淑等<sup>[1]</sup>解读特发性肺纤维化临床指南(2015ATS/ERS/JRS/ALAT)报道的临床用药全部为条件推荐,目前仍缺乏被广泛认可的有效药物。中医在治疗肺纤维化过程中有其独到之处,认为肺肾两脏经脉相连,经气互通<sup>[2]</sup>。崔红生等<sup>[3]</sup>对 130 例肺纤维化晚期患者进行中医证候学分布规律的研究发现,其中 46% 的患者具有肾气虚的表现。滑振等<sup>[4]</sup>对 2000 至 2014 年中文文献报道的肺纤维化中医证候及证素进行数据挖掘,结果显示病位证素以肺、肾为主。李建生<sup>[5]</sup>在特发性肺纤维化中医辨证治疗中也指出特发性肺纤维化疾病中期、后期的病机重点为肺肾气虚。肾气虚已成为肺纤维化晚期患者的常见证候。疏欣杨等<sup>[6]</sup>对 40 例肺肾两虚、气虚血瘀的特

发性肺纤维化患者进行治疗 6 个月治疗后,患者肺功能中一氧化碳弥散量、蜂窝网评分及 6 min 步行试验等方面明显优于对照组;柴秀娟等<sup>[7]</sup>常用六味地黄汤滋补肾阴进行肺纤维化的治疗,可见从肾虚进行肺纤维化的中医治疗是一条可行的临床路径。

相关研究采用温补肾阳治法治疗实验性肺纤维化,显示金匮肾气丸、加味参附汤等对肺纤维化大鼠模型均具有一定的抑制作用<sup>[8-9]</sup>,但未能阐明肺肾相关的具体机制。而且据臧凝子等<sup>[10]</sup>报道,目前国内临床疗效评价的指标在前期肺功能和血气分析的基础上增加了影像学检查,但至今未见基于临床疗效评价的相关实验报道。右归饮作为温补肾阳的代表方剂,其水煎液成分稳定,已建立高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱<sup>[11]</sup>。因此,本研究拟采用温补肾阳的经典方剂右归饮进行干预,通过肺功能、血气

分析结合形态学观察等临床疗效评价方法进一步研究药效,并从肺肾相关的角度深入探讨温肾补肺法对模型大鼠肺纤维化阶段的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD 大鼠 25 只,10 周龄,体质量  $380 \pm 10$  g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0011,由北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审核,审核批号为 BUCM-4-2017020910-1010。在符合清洁级标准的实验室(温度  $22 \sim 25$  °C,湿度  $50\% \sim 70\%$ )适应饲养 2 周。

**1.2 药物** 熟地黄、枸杞子、山萸肉<sup>(酒)</sup>、麸炒山药、炙淫羊藿(代杜仲)、黑顺片、肉桂、炙甘草由河北美威药业股份有限公司提供,并经该公司王海洋药师鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》规定。上述饮片根据《景岳全书》<sup>[12]</sup>记载的右归饮处方配制,依次按 3:3:2:3:3:2:1:1 称量,水煎后浓缩至生药质量浓度  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,4 °C 冰箱冷藏备用。

**1.3 试剂** 注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社,批号 650472,15 mg/瓶),注射用氢化可的松琥珀酸钠(天津生物化学制药有限公司,批号 011501077,50 mg/瓶),肾素,前列腺素  $E_2$  ( $\text{PGE}_2$ ),基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京德易临床检验所有限公司,批号均为 20170620),血气生化多项测试卡片(雅培贸易上海有限公司,批号 2403114)。

**1.4 仪器** AL204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),ABL 型动物血气分析仪(丹麦雷度公司),AniRes 2005 型动物肺功能仪(北京贝兰博科技有限公司),Multiskan Mk3 型酶标仪(中国赛默飞世尔仪器有限公司),NanoZoomer-SQ 型数字切片扫描仪(日本滨松光子学株式会社)。

## 2 方法

**2.1 模型制备及分组** SD 大鼠按照随机数字表随机分为正常组、模型组、右归饮高、中、低剂量组,每组 5 只。正常组不加任何干预,对模型组和右归饮高、中、低剂量组气管内注射博莱霉素  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,建立肺纤维化动物模型<sup>[13-14]</sup>。

**2.2 给药方法** 造模后第 15 天开始,每天 17:30 定时灌胃。右归饮高、中、低剂量组分别按生药 20,10,5  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  折算<sup>[15]</sup>,连续灌胃右归饮水煎液 14 d,模型组灌胃等体积饮用水。

**2.3 肺功能检测** 按设备提供的实验技术指导调试确认系统正常。1%戊巴比妥钠( $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )腹

腔内注射麻醉,调整麻醉剂量以确保麻醉深度合适,防止麻醉过浅出现动物自主呼吸与呼吸机辅助通气对抗。行气管切开术后气管插管,并将插管与气管结扎固定。大鼠以仰卧位置于体描箱内,连接呼吸机,设置呼吸比 20:10,呼吸频率 65 次/min。以 30 cm  $\text{H}_2\text{O}$  压力控制方式检测用力肺活量(FVC),肺顺应性( $C_{\text{dyn}}$ ),0.4 s 率( $\text{FEV}_{0.4}/\text{FVC}\%$ ),呼气峰值流速(PEF),最大呼气中期流速(MMF)等。

**2.4 脏器系数计算** 肺功能检测完成后,腹主动脉取血,并继续放血处死动物,取出肺脏,去除肺外气管;取肾脏,剔除脂肪组织及系膜。电子天平称重,根据脏器系数公式<sup>[16]</sup>,脏器系数 = 脏器质量(g)/动物体质量(g)  $\times 100\%$  进行计算。

**2.5 血气检测** 肺功能检测结束后,迅速打开腹腔,腹主动脉抽取动脉血 0.5 mL。立即进行血气分析,测定酸碱度(pH),氧分压( $\text{PO}_2$ ),二氧化碳分压( $\text{PCO}_2$ ),氧饱和度( $\text{SO}_2$ )等。

**2.6 ELISA 检测血清中肾素,  $\text{PGE}_2$ , MMP-1** 肺功能检测完成后,使用促凝采血管进行腹主动脉取血 4 mL,凝血后  $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液用 ELISA 检测血清中肾素,  $\text{PGE}_2$ , MMP-1。

**2.7 马松(Masson)染色病理观察** 各组大鼠经麻醉后进行腹主动脉放血处死,取左肺,经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,冠状面切片,行 Masson 染色进行病理观察,用数字切片扫描仪获取切片图像进行肺组织病理观察。

**2.8 统计学分析** 应用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析,计量资料应用  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布的计量资料,采用单因素 ANOVA 进行检验(方差齐采用 LSD 检验,方差不齐采用 Tamhane 检验);对于不符合正态分布的计量资料,采用秩和检验。所有检验  $\alpha = 0.05$  为检验水准,以双侧  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 右归饮对大鼠脏器质量及脏器系数的影响** 正常动物脏器质量与脏器系数与文献[17]报道的生理参考值一致,与正常组比较,模型组由于博莱霉素引起炎症及肺间质增生造成肺脏质量、肺脏系数病理性升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,造模大鼠灌胃右归饮中剂量组肺脏质量明显下降( $P < 0.05$ )。肺系数虽然可以平衡正常动物由于体质量的个体差异造成的肺脏质量变化,但右归饮对模型大鼠肺脏质量和体质量的影响并不同步,大鼠体质量基数大且恢复较慢,影响了肺系数的灵敏性,因此

肺脏质量变化更有参考意义。与正常组比较,各组肾脏质量左右肾均明显降低 ( $P < 0.05$ ),模型组和

右归饮高剂量组的肾脏系数均明显升高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 右归饮对肺纤维化大鼠脏器质量和脏器系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 1 Effect of Youguiyin on organ quality and organ coefficient in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肺质量/g	左肾/g	右肾/g	取材体质量/g	肺系数/%	左肾系数/%
正常	-	1.77 ± 0.12	1.53 ± 0.10	1.47 ± 0.10	545.95 ± 21.42	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.02
模型	-	2.97 ± 0.42 <sup>1)</sup>	1.35 ± 0.29 <sup>1)</sup>	1.28 ± 0.18 <sup>1)</sup>	386.66 ± 33.87 <sup>1)</sup>	0.78 ± 0.18 <sup>1)</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>1)</sup>
右归饮	5	2.66 ± 0.25 <sup>1)</sup>	1.19 ± 0.12 <sup>1)</sup>	1.18 ± 0.17 <sup>1)</sup>	372.12 ± 26.37 <sup>1)</sup>	0.72 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.32 ± 0.05
	10	2.48 ± 0.23 <sup>1,2)</sup>	1.21 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.24 ± 0.04 <sup>1)</sup>	397.06 ± 29.77 <sup>1)</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.31 ± 0.03
	20	2.75 ± 0.49 <sup>1)</sup>	1.34 ± 0.24 <sup>1)</sup>	1.38 ± 0.27 <sup>1)</sup>	407.92 ± 67.98 <sup>1)</sup>	0.70 ± 0.21 <sup>1)</sup>	0.33 ± 0.03 <sup>1)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2~6 同)。

### 3.2 右归饮对大鼠气道阻力和动态顺应性的影响

AniRes2005 动物肺功能监测分析系统是将微压力传感器连接到动物吸气通道中直接测量动物的气道压力,该压力主要与肺和胸廓形成的弹性阻力以及气体在气道内流动产生的摩擦阻力有关<sup>[18]</sup>。与正常组比较,各组吸气阻力 (Ri) 和呼气阻力 (Re) 均明显升高 ( $P < 0.05$ ),说明气管内注射博莱霉素对通气功能造成障碍。肺功能检测时呼气终端与仪器负压系统相连,而吸气过程的终端为肺泡,造成 Re 较 Ri 低,且各用药组与模型组比较 Re 无差异,说明各造模组大气道阻力接近;与模型比较,各用药组 Ri 明显降低 ( $P < 0.05$ ),可能与模型组肺的弹性阻力较高有关。所有造模组肺动态顺应性 (Cyd) 相对正常组明显下降 ( $P < 0.05$ ),这可能与病变引起肺间质异常增生导致肺的弹性阻力增加有关;与模型组比较,右归饮中剂量组 Cydn 下降 ( $P < 0.05$ ),结合各用药组与模型组比较 Re 无差异,说明右归饮中剂量组对肺纤维化大鼠肺动态顺应性具有一定的改善作用。见表 2。

表 2 右归饮对肺纤维化大鼠肺顺应性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect Youguiyin on airway resistance and lung dynamic compliance in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Ri/ $cmH_2O$ / $mL \cdot s^{-1}$	Re/ $cmH_2O$ / $mL \cdot s^{-1}$	Cydn / $mL \cdot cmH_2O^{-1}$
正常	-	0.57 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.39 ± 0.05
模型	-	0.81 ± 0.06 <sup>1)</sup>	0.51 ± 0.08 <sup>1)</sup>	0.13 ± 0.02 <sup>1)</sup>
右归饮	5	0.69 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.16 ± 0.04 <sup>1)</sup>
	10	0.67 ± 0.06 <sup>1,2)</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.19 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>
	20	0.66 ± 0.07 <sup>1,2)</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>1)</sup>

### 3.3 右归饮对大鼠肺功能的影响

与正常组比较,各造模组 FVC 均降低 ( $P < 0.05$ ), $FEV_{0.4}/FVC\%$  均升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,右归饮中剂量组 FVC 升高, $FEV_{0.4}/FVC\%$  下降 ( $P < 0.05$ ),结合各造模组之间气道参数没有统计学差异,提示右归饮中剂量组的改善作用受气道影响较小,主要与肺容量增加和限制性通气功能障碍缓解有关。见表 3。

表 3 右归饮对肺纤维化大鼠肺功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of Youguiyin on lung function in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FVC / $mL$	$FEV_{0.4}$ / $FVC\%$	$FEF_{25}$ / $mL \cdot s^{-1}$	$FEF_{50}$ / $mL \cdot s^{-1}$	$FEF_{75}$ / $mL \cdot s^{-1}$	MMF / $mL \cdot s^{-1}$	PEF / $mL \cdot s^{-1}$
正常	-	13.34 ± 1.78	74.94 ± 8.81	30.65 ± 2.43	25.73 ± 2.21	19.61 ± 1.89	24.98 ± 2.15	31.85 ± 2.47
模型	-	5.58 ± 0.26 <sup>1)</sup>	98.41 ± 1.06 <sup>1)</sup>	27.62 ± 3.00 <sup>1)</sup>	23.86 ± 3.06 <sup>1)</sup>	16.49 ± 1.79	22.37 ± 2.68 <sup>1)</sup>	27.77 ± 3.08 <sup>1)</sup>
右归饮	5	6.85 ± 1.42 <sup>1)</sup>	93.49 ± 5.75 <sup>1)</sup>	26.55 ± 0.97 <sup>1)</sup>	22.41 ± 1.74 <sup>1)</sup>	15.94 ± 1.07 <sup>1)</sup>	21.30 ± 1.42 <sup>1)</sup>	26.95 ± 0.74 <sup>1)</sup>
	10	8.26 ± 1.67 <sup>1,2)</sup>	88.56 ± 8.77 <sup>1,2)</sup>	26.98 ± 2.37 <sup>1)</sup>	21.88 ± 1.96 <sup>1)</sup>	15.45 ± 1.28 <sup>1)</sup>	20.98 ± 1.75 <sup>1)</sup>	27.55 ± 2.37 <sup>1)</sup>
	20	6.82 ± 1.68 <sup>1)</sup>	94.22 ± 5.01 <sup>1)</sup>	28.97 ± 2.53	24.78 ± 2.35	17.37 ± 1.17	23.42 ± 1.97 <sup>1)</sup>	29.27 ± 2.38

3.4 右归饮对大鼠质量 FVC 的影响 质量 FVC, 即 FVC/肺质量<sup>[19]</sup>,与正常组比较,各造模组质量

FVC 明显降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,右归饮中剂量组质量 FVC 上升最明显 ( $P < 0.05$ )。见

表 4。

表 4 右归饮对肺纤维化大鼠质量 FVC 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of Youguiyin on FVC/lung weight in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	FVC/肺质量/mL·g <sup>-1</sup>
正常	-	7.59 ± 1.41
模型	-	1.91 ± 0.33 <sup>1)</sup>
右归饮	5	2.61 ± 0.66 <sup>1)</sup>
	10	3.32 ± 0.57 <sup>1,2)</sup>
	20	2.59 ± 0.95 <sup>1)</sup>

表 5 右归饮对肺纤维化大鼠血气的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Effect of Youguiyin on blood gas in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	pH	PCO <sub>2</sub> /mmHg	PO <sub>2</sub> /mmHg	BE/mmol·L <sup>-1</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /mmol·L <sup>-1</sup>	TCO <sub>2</sub> /mmol·L <sup>-1</sup>	SO <sub>2</sub> /%
正常	-	7.38 ± 0.03	46.06 ± 8.19	72.80 ± 8.17	5.20 ± 0.84	30.34 ± 1.19	31.80 ± 1.48	93.40 ± 3.21
模型	-	7.35 ± 0.03	60.86 ± 7.45 <sup>1)</sup>	37.40 ± 7.02 <sup>1)</sup>	7.80 ± 2.17 <sup>1)</sup>	33.54 ± 2.53 <sup>1)</sup>	35.40 ± 2.7 <sup>1)</sup>	65.20 ± 12.28 <sup>1)</sup>
右归饮	5	7.34 ± 0.02	60.74 ± 2.25 <sup>1)</sup>	41.80 ± 7.16 <sup>1)</sup>	6.80 ± 1.30	32.70 ± 1.32 <sup>1)</sup>	34.40 ± 1.52 <sup>1)</sup>	71.00 ± 11.47 <sup>1)</sup>
	10	7.34 ± 0.01 <sup>1)</sup>	60.15 ± 1.69 <sup>1)</sup>	45.00 ± 8.08 <sup>1)</sup>	6.75 ± 1.26	32.53 ± 1.04 <sup>1)</sup>	34.25 ± 0.96 <sup>1)</sup>	75.25 ± 8.26 <sup>1)</sup>
	20	7.35 ± 0.01	57.17 ± 3.66 <sup>1)</sup>	55.67 ± 10.12 <sup>1,2)</sup>	6.00 ± 1.73	31.77 ± 1.72	33.33 ± 2.08	85.00 ± 7.81 <sup>2)</sup>

注:1 mmHg = 0.133 kPa。

表 6 右归饮对肺纤维化大鼠血清学指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

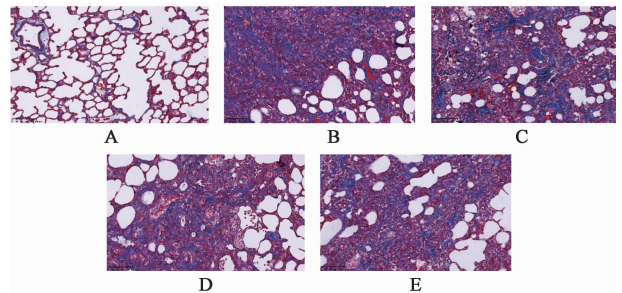
Table 6 Effect of Youguiyin on serological indexes in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肾素/ng·L <sup>-1</sup>	PGE <sub>2</sub> /ng·L <sup>-1</sup>	MMP-1/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	72.67 ± 27.38	28.83 ± 8.34	0.61 ± 0.28
模型	-	84.41 ± 24.18	54.37 ± 11.27 <sup>1)</sup>	0.79 ± 0.29
右归饮	5	77.27 ± 22.19	47.90 ± 6.03 <sup>1)</sup>	0.72 ± 0.25
	10	68.24 ± 15.59	47.99 ± 10.92 <sup>1)</sup>	0.65 ± 0.43
	20	70.37 ± 30.86	34.13 ± 9.44 <sup>1,2)</sup>	0.60 ± 0.24

**3.7 右归饮对大鼠病理变化的影响** 正常肺泡结构清晰,少量胶原分布于基底膜。模型大鼠第 28 天肺组织病变严重,可见实变区和非实变区,实变区无肺泡结构,以亮蓝染色的胶原沉积为主的纤维化区和伴有异常细胞增生的非纤维化区为主;实变区与非实变区的边界弥漫大量巨噬细胞为主的炎性细胞,并向非实变区浸润,导致肺泡壁增厚。右低组实变区细胞增生得到缓解,右中组和右高组实变区在整个肺组织中占比明显减少,尤其是右中组与非实变区的边界锐利,肺泡壁明细收窄,间质巨噬细胞少见,提示右中组能够限制炎性样边界向非实变区的浸润。见图 1。

**3.5 右归饮对大鼠动脉血气的影响** 与正常组比较,模型组腹主动脉血 PCO<sub>2</sub> 升高 ( $P < 0.05$ ), PO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> 均明显下降 ( $P < 0.05$ ),提示模型大鼠肺泡的气体交换功能下降;与模型组比较,右归饮高剂量组 PO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> 明显升高 ( $P < 0.05$ ),提示右归饮高剂量能够改善纤维化大鼠肺脏的换气功能。见表 5。

**3.6 右归饮对大鼠血清学指标的影响** 与正常组比较,各造模组 PGE<sub>2</sub> 水平均有所升高 ( $P < 0.05$ ),其中模型组升高近 1 倍;与模型组比较,右归高剂量组 PGE<sub>2</sub> 水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 6。



A. 正常组;B. 模型组;C. 右低组;D. 右中组;E. 右高组

图 1 右归饮对肺纤维化大鼠肺组织病理形态的影响 (Masson, × 200)

Fig.1 Effect of Youguiyin on lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (Masson, × 200)

## 4 讨论

肺纤维化是以进行性呼吸困难、喘息、气短、干咳、喘憋为临床表现、以限制性通气功能障碍、低氧血症、慢性进行性弥漫性肺间质纤维化为特点的肺间质性疾病<sup>[20]</sup>。临床诊断的肺纤维化患者,绝大多数纤维化已经形成,并不断进展<sup>[21]</sup>。本实验采用气管内注射博莱霉素第 15 天为给药时间窗,以更贴近临床实际;根据姚成增等<sup>[22]</sup>报道,每天灌胃时间选择在 17:30,即酉时用药以符合大鼠的生物节律。Chaudhary 等<sup>[23]</sup>报道 Wistar 大鼠造模 21 d 后胶原

沉积达到峰值,而 Della 等<sup>[24]</sup>报道小鼠造模 28 d 后进入自限期,本研究结果显示造模 40 d 的 SD 大鼠肺脏质量仍然维持高位,与 28 d 肺脏质量接近;金晓光等<sup>[25]</sup>则观察了 SD 大鼠 56 d 的病理改变,发现中央气道和大血管周围仍可见一些炎性细胞, I 型胶原成分仍量多且致密。因此,右归饮中剂量组降低肺脏质量主要与药物作用有关,而较少受到自限的影响。结合 Cydn, FVC, 质量 FVC 回升, FEV<sub>0.4</sub>/FVC% 下降,而这些改变伴随气道状态未见明显差异,由此反映右归饮中剂量组主要药效作用在于改善博莱霉素所致肺纤维化大鼠的肺功能。值得注意的是右归饮高剂量组虽然未见肺脏质量和肺功能的明显缓解,但对血气改善的作用明显,这与康获等<sup>[26]</sup>报道的甘草干姜汤的药效作用类似,组方中存在作用于非实变区的药效成分,能够改善非实变区肺泡的换气功能,且与用药剂量有关。这也提示右归饮的给药剂量可能需要在中剂量和高剂量之间寻找平衡。

博莱霉素所致肺纤维化大鼠的肺组织在实变区与非实变区边界存在弥漫性炎性样改变,与王恺京等<sup>[27]</sup>报道临床特发性肺纤维化(IPF)的弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱十分相似。这些慢性炎性浸润、以及由此引发的间质细胞增生和胶原沉积等病理改变都会使纤维化大鼠的肺脏组织质量增加。从病理结果显示右归饮中剂量组能够限制炎性样弥漫区域的浸润迁延。因而从一定程度上减少了实变区在肺脏组织中的占比,起到了降低肺脏质量的作用。徐涛涛等<sup>[28]</sup>研究发现右归饮含药血清在一定程度上能够促进人血管内皮细胞的增殖,保护人血管内皮细胞的氧化损伤。而 LU 等<sup>[29]</sup>发现博莱霉素诱导产生的活性氧能够促进肺成纤维细胞表达 VEGF 而导致异常修复和血管生成紊乱。结合临床宋菲菲等<sup>[30]</sup>应用右归饮治疗过敏性鼻炎;赵文韬等<sup>[31]</sup>用右归饮加减治疗肾阳虚型膝关节效果良好,提示右归饮可能通过抑制博莱霉素所致活性氧造成的炎性损伤发挥抗炎作用。

肺组织中的 PGE<sub>2</sub> 可由巨噬细胞, II 型上皮细胞通过自分泌和旁分泌的方式作用于自身或邻近组织, Klapholz-Brown 等<sup>[32]</sup>报道肺间质成纤维细胞也可作为急性炎症效应细胞在损伤部位分泌 PGE<sub>2</sub>, 李今朝等<sup>[33]</sup>报道特发性肺纤维化患者肺泡灌洗液中 PGE<sub>2</sub> 水平明显升高。可见 PGE<sub>2</sub> 是肺纤维化过程中重要的炎性因子,而 PGE<sub>2</sub> 可依赖 4 种功能互相拮抗的不同亚型的受体发挥致炎和抗炎作用<sup>[34]</sup>。

Nakanishi 等<sup>[35]</sup>发现 PGE<sub>2</sub> 可以通过 EP<sub>2</sub> 受体/PKA 途径调节人肺成纤维细胞释放 VEGF。Ando 等<sup>[36]</sup>检测 43 位健康志愿者, 41 位特发性肺纤维化(IPF)患者, 14 位肺癌患者血清中的 VEGF 发现, IPF 患者肺功能会随血清中 VEGF 水平升高而降低, AaDO<sub>2</sub> 明显升高。本研究病理结果显示肺纤维化 SD 大鼠模型实变区存在大量间质成纤维细胞增殖和 II 型上皮细胞增生,并伴有巨噬细胞浸润,都有可能成为动脉血清中 PGE<sub>2</sub> 明显升高的来源。灌胃右归饮能够降低模型大鼠血清中的 PGE<sub>2</sub> 水平,抑制博莱霉素所致肺组织的炎性损伤,延缓动物模型的纤维化进程,改善肺功能,从而发挥抗肺纤维化的作用。

#### [参考文献]

- [1] 曹孟淑,蔡后荣,代华平. 2015ATS/ERS/JRS/ALAT 官方的临床实践指南:特发性肺纤维化的治疗(执行摘要)——对 2011 年临床指南的更新[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2016, 15(2): 189-197.
- [2] 张朝宁,李金田.“肺肾相关”理论探讨及现代研究进展[J]. 新中医, 2016, 48(1): 200-201.
- [3] 崔红生,谢淑华,靳锐锋. 肺间质纤维化临床分期与证候分布规律探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1443-1445.
- [4] 滑振,吕晓东,庞立健,等. 基于现代文献的肺纤维化中医证候及证素特征数据挖掘[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(9): 1188-1191.
- [5] 李建生. 特发性肺纤维化中医辨证治疗概要[J]. 中医学报, 2017, 32(6): 929-931.
- [6] 疏欣杨,韩春生,杨道文,等. 肺痿冲剂方治疗肺肾两虚,气虚血瘀型特发性肺纤维化临床观察[J]. 世界中医药, 2014, 9(8): 983-986.
- [7] 柴秀娟,李国平,周颖. 治肺痿重肺肾祛瘀通络有奇功[C]//浙江省中西医结合呼吸病诊治进展暨第六次学术年会论文汇编,杭州, 2008: 177-186.
- [8] 张瑞,宋建平,李瑞琴,等. 金匮肾气丸对肺纤维化大鼠肺组织中血小板衍生因子 BB 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 173-176.
- [9] 赵敏,徐安莉,周艳艳,等. 温补肾阳法对肾阳虚肺纤维化大鼠肺内 CTGF 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(2): 421-424.
- [10] 臧凝子,庞立健,刘创,等. 特发性肺纤维化在病证结合模式指导下的疗效评价体系框架[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(10): 2118-2123.
- [11] 曾杰,肖亚平,安尧,等. 右归饮 HPLC 指纹图谱研究及 9 种成分定量分析[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5143-5150.
- [12] 张介宾. 景岳全书[M]. 上海:上海卫生出版社,

- 1958;980.
- [13] Thrall R S, McCormick J R, Jack R M, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin[J]. *Am J Pathol*, 1979, 95(1):117-130.
- [14] 齐曼古丽·吾守尔, 夏宇, 巴哈尔古丽·米吉提, 等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型的建立方法及比较[J]. *新疆医科大学学报*, 2005, 28(6):495-498.
- [15] 蔡定芳, 沈自尹, 张玲娟, 等. 右归饮对大鼠下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴抑制模型的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 1994, 9(4):236-239.
- [16] 孙建新, 安娟, 连军. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析[J]. *实验动物科学*, 2009, 26(1):49-51.
- [17] 董延生, 尹纪业, 陈长, 等. SD大鼠脏器重量及脏器系数正常参考值的确立与应用[J]. *军事医学*, 2012, 36(5):351-353.
- [18] 朱蕾. 临床肺功能[M]. 人民卫生出版社, 2004:57-82.
- [19] 朱曼, 康荻, 张慧, 等. 脾虚复合肺纤维化影响大鼠肺功能的初步研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(2):130-134.
- [20] Moore B, Lawson W E, Oury T D, et al. Animal models of fibrotic lung disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49(2):167-179.
- [21] Geiser T. Idiopathic pulmonary fibrosis-a disorder of alveolar wound repair? [J]. *Swiss Med Weekly*, 2003, 133(29/30):405-411.
- [22] 姚成增, 胡剑北. 右归饮择时使用对肾虚大鼠睾酮昼夜节律的影响[J]. *上海中医药杂志*, 2005, 50(2):53-55.
- [23] Chaudhary N I, Schnapp A, Park J E. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(7):769-776.
- [24] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97:122-130.
- [25] 金晓光, 代华平, 庞宝森, 等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的动态病理变化及其发生机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(4):708-714.
- [26] 康荻, 李彧, 朱曼, 等. 肺痿论治干预肺纤维化大鼠肺功能的实验研究[J]. *世界中医药*, 2017, 12(2):390-393, 397.
- [27] 王恺京, 陆英, 赵倩, 等. 特发性肺纤维化的发病机制和临床治疗[J]. *中国医药导报*, 2015, 12(12):32-35, 39.
- [28] 徐涛涛, 金红婷, 廖菲, 等. 右归饮含药血清促进人血管内皮细胞增殖及抗氧化损伤的作用研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2014, 38(8):933-938.
- [29] LU Y J, Azad N, WANG L Y, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase/akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(4):432-441.
- [30] 宋菲菲, 何迎春. 右归饮治疗过敏性鼻炎临床举例[J]. *陕西中医学院学报*, 2014, 37(2):54-55.
- [31] 赵文韬, 李帆冰, 王琦, 等. 右归饮治疗肾虚型膝关节骨性关节炎 65 例[J]. *现代中西医结合杂志*, 2009, 18(7):790.
- [32] Klapholz-Brown Z, Walmsley G G, Nusse Y M, et al. Transcriptional program induced by Wnt protein in human fibroblasts suggests mechanisms for cell cooperativity in defining tissue microenvironments[J]. *PLoS One*, 2007, 2(9):945.
- [33] 李今朝, 李振华, 康健, 等. 特发性肺纤维化患者肺泡灌洗液及血清中前列腺素 E<sub>2</sub> 和白细胞介素 12、13 水平变化的意义[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2004, (6):21-23.
- [34] 薛瑞, 苗一非, 杨吉春, 等. 前列腺素 E<sub>2</sub> 对免疫细胞及炎症相关疾病的调控作用[J]. *生理科学进展*, 2011, 42(3):165-168.
- [35] Nakanishi M, Sato T, LI Y, et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates the production of vascular endothelial growth factor through the E-prostanoid-2 receptor in cultured human lung fibroblasts[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(2):217-223.
- [36] Ando M, Miyazaki E, Ito T, et al. Significance of serum vascular endothelial growth factor level in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lung*, 2010, 188(3):247-252.

[责任编辑 张丰丰]