

补阳还五汤对博莱霉素所致肺纤维化大鼠肺指数 及肺组织病理的影响

杨晗, 王飞*, 王全林, 杨昆
(成都中医药大学, 四川 成都 610075)

[摘要] 目的:观察补阳还五汤对博莱霉素致肺纤维化大鼠肺指数的影响。方法:将 144 只 SD 大鼠随机分成 6 组,即假手术组、模型组、强的松($4.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、补阳还五汤高、中、低剂量组($18.48, 9.24, 4.62 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组各 24 只。除假手术组外,其余各组采用一次性气管滴注博莱霉素复制肺纤维化大鼠模型,假手术组气管内滴注等量生理盐水,于造模第 2 天起,各给药组分别给予相应药物灌胃,动态观察模型大鼠在实验期间的一般情况(包括精神、摄食、毛色、活动等),于造模后第 7、14、28 天,分 3 批处死动物,分离肺组织并计算肺指数;取左肺制备病理切片,行 HE 染色观察肺泡炎及肺纤维化程度改变情况。结果:①肺指数:与假手术组相比,模型组大鼠各时间点肺指数增加明显($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肺指数有不同程度的下降($P < 0.01$);与强的松对照组相比,补阳还五汤中剂量组第 14、28 天及低剂量组第 28 天肺指数降低较明显($P < 0.05$);高剂量组 3 个时间点肺指数均高于强的松对照组,但与同期模型组相比仍较有明显的降低。②肺组织形态学:与假手术组相比,模型组及各给药组大鼠可见肺泡结构有不同程度的破坏,肺间质增生,有炎细胞浸润和胶原纤维增生形成;与模型组相比,给药组各时间点的肺泡炎和肺纤维化程度均有不同程度的改善($P < 0.01$);其中补阳还五汤中剂量组在中后期降低肺泡炎及纤维化程度方面明显优于同期强的松对照组($P < 0.05$)。结论:补阳还五汤能够较好地控制模型大鼠肺指数的增长,抑制早期的肺泡炎和中后期的肺纤维化,其具体机制有待进一步研究。

[关键词] 肺纤维化;补阳还五汤;肺指数;肺组织病理

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0142-05

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2014220142

Effects of Buyang Huanwu Tang on Lung Index and Pathomorphology of Pulmonary Fibrosis Rats by Bleomycin

YANG Han, WANG Fei*, WANG Quan-lin, YANG Kun
(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Buyang Huanwu Tang on lung index of pulmonary fibrosis (PF) rats induced by bleomycin (BLM). **Method:** Ninety healthy male SD rats were randomly divided into six groups: sham operation group, model group, prednisone group ($4.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Buyang Huanwu Tang high-dose, middle-dose, low-dose groups ($18.48, 9.24, 4.62 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 24 rats in each group. Pulmonary fibrosis model was established by injected with BLM by tracheal intubation, sham operation group was intratracheally instilled with equal NS, then every rats was raised drugs through a gastric tube one times a day. To observing general status of PF rats (such as the condition of mental, diet, hair, behavioral activity), the changes of lung index, to measure alveolar catarrh and pulmonary fibrosis degrees in left lung dyed with HE. **Result:** ①Lung index: at all time points, a significant increase in lung index of model group were higher than that of sham operation group ($P < 0.01$); other medicated groups had different decreases in lung index by comparison with

[收稿日期] 20140211(006)

[基金项目] 中国教育部博士点基金项目(20115132110002)

[第一作者] 杨晗,博士,讲师,主治医师,从事中医药防治肺系病证的临床与实验研究, Tel:15882458490, E-mail:15882458490@163.com

[通讯作者] *王飞,教授,博士生导师,从事中医药防治老年病与肺系病证的临床与实验研究, Tel:18980880213, E-mail:wangfei896@163.com

model group ($P < 0.01$); compared with the prednisone group, the lung index of Buyang Huanwu Tang middle-dose group showed an obviously decreased tendency on the 14th and 28th day ($P < 0.05$), this condition of that in Buyang Huanwu Tang low-dose group on the 28th day ($P < 0.05$), Buyang Huanwu Tang high-dose group than in prednisone group the lung index of some high at there time points, but were significantly lower than the same period in the model group. ② Pathomorphology: compared with the sham operation group, the model group and each medicated groups were mainly featured with destroyed alveoli, thickened alveoli septum and the deposition of collagen fibers on different level; the medicated groups could improve the alveolar catarrh and pulmonary fibrosis on pathomorphology in varying degree by comparison with the model group ($P < 0.01$); the effect of reducing alveolar catarrh and pulmonary fibrosis of Buyang Huanwu Tang middle-dose group had an advantage over that of the prednisone group on the 14th and 28th day ($P < 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu Tang could obviously control the growth of lung index, and alleviate alveolar catarrh and pulmonary fibrosis, the specific mechanism of that were expecting for further study.

[**Key words**] lung fibrosis; Buyang Huanwu Tang; lung index; pathomorphology

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种慢性的进行性肺间质疾病 (interstitial lung disease, ILD), 其病理特征是肺泡壁 (包括呼吸性细支气管) 弥漫性慢性炎症和间质纤维化, 最终肺实质逐渐被纤维瘢痕组织代替而失去呼吸功能。近年来, 这一类疾病的发病人数在国内外均有显著上升的趋势, 由于 PF 起病隐匿、无特异的临床表现, 早期诊断较困难, 加之目前尚无特殊的治疗方法, 其死亡率极高, 确诊后平均存活期为 2~4 年, 5 年生存率仅为 30%~50%^[1], 已成为严峻的健康问题, 因此对肺纤维化发生机制和有效药物的研究具有非常重要的科学价值。本研究采用一次性气管滴入博莱霉素经典造模方法复制肺纤维化大鼠模型, 用补阳还五汤进行干预性治疗, 以强的松为对照药物, 观察补阳还五汤对实验性大鼠肺指数及肺组织病理的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠 144 只, 雄性, 体质量 (200 ± 20) g, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(川)2012-18, 并饲养于成都中医药大学中医脏腑病证实验室清洁动物室。

1.2 药物 硫酸博莱霉素 (美仑生物, 批号 20111111), 强的松 (浙江仙琚制药股份有限公司, 批号 120447), 补阳还五汤由黄芪、赤芍、桃仁、红花、当归、川芎、地龙组成, 用药比例为 5:1:1:1:1:1 (均为浓缩颗粒, 由四川新荷花中药饮品有限公司)。Masson 试剂盒 (Maixin-Bio 生物技术公司), 10% 乌拉坦、4% 多聚甲醛溶液、0.9% 氯化钠注射液、乙醇、甘油、冰乙酸 (成都中医药大学中医脏腑病证实验室提供)。

1.3 仪器 石蜡包埋机 (Histocentre, 英国),

RM2016 型轮转式切片机 (德国徕卡), PHY-III 型全自动病理组织漂烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司), GZX-DH400-S-II 型电热恒温干燥箱, 上海跃进医疗仪器厂), BSA224S-CW 型分析天平 (Sartorius 公司), BX51 型正置显微 (日本 Olympus), Cmias 真彩色医学图像分析系统 (空军总医院生物医学工程研究所、北京航空航天大学研制)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 大鼠在实验条件下饲养 1 周, 随机分为 6 组, 即假手术组、模型组、强的松组、补阳还五汤高、中、低剂量组, 每组各 24 只。大鼠适应环境后, 除 NS 组外, 余各组以 1.5% 戊巴比妥钠 (40 mg·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉后固定, 将大鼠仰卧固定于实验台, 经气管软骨环间隙向气管内缓慢注入博莱霉素生理盐水溶液 (5 mg·kg⁻¹) 0.2~0.3 mL, 注射后迅速将大鼠直立并旋转, 使药液在肺内均匀分布, 假手术组注入等容量生理盐水 (NS)。

2.2 给药 模型成功后第 2 天开始灌胃给药, 假手术组、模型组给予 NS (10 mL·kg⁻¹), 强的松组予强的松混悬液 (4.2 mg·kg⁻¹), 补阳还五汤高、中、低组分别予 18.48, 9.24, 4.62 g·kg⁻¹, 连续 ig 给药 28 d。

2.3 标本采集 于造模后第 7, 14, 28 天分 3 批处死动物, 每组随机 8 只, 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 将麻醉后的大鼠, 仰卧定位于手术台上, 腹主动脉放血后, 迅速开胸, 分离肺脏, 在预冷的生理盐水中快速洗去血液, 剔除结缔组织, 用滤纸吸取肺组织表面的水分, 称肺湿重; 取左肺放入经 DEPC 水处理的 4% 多聚甲醛固定, 脱钙、脱水, 常规石蜡包埋切片, 备作病理检测。

2.4 检测指标方法 监测实验期间各组大鼠精神活动、体重变化、摄食、饮水、毛色、呼吸及对外界刺激的反应情况,根据动物体重与肺湿重计算肺指数。

$$\text{肺指数} = \text{肺湿重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

观察不同时间点各组大鼠肺指数变化情况。病理切片行 HE 染色,光镜下观病理组织学变化并摄片,参照文献[2]方法评价各组大鼠肺组织肺泡炎程度及肺纤维化程度。

2.5 统计学处理 数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析和组间比较(方差齐用 LSD 检验,不齐用 Games-Howell 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺纤维化大鼠一般情况的影响 实验期间共有 5 只大鼠死亡。其中模型组 4 只,强的松组 1 只,死亡原因考虑与 BLM 的细胞毒性有关,亦不排除与大鼠自身体质及对毒性耐受能力等因素的相关性。

假手术组大鼠反应灵敏,精神好,呼吸平稳,身

体壮硕,摄食饮水良好,毛色光泽,体重逐渐增加;模型组大鼠表现出精神萎靡不振,呼吸急促,动作迟缓,弓背蹠缩,皮毛稀疏无光泽甚至污秽成束,摄食饮水量下降,在造模后前 7 d 体重增加不明显,随后体重缓慢上升,但明显低于同期各给药组;各给药组大鼠精神较好,呼吸较平稳,毛色光泽度良好,反应较迅速。强的松组在 14 d 后体重增加不明显,一般状况不如早期;补阳还五汤干预组造模后前 7 d 体重增加不明显,随后体重很快增加,但与同期强的松对照组相比差异不大。

3.2 对致肺纤维化大鼠肺指数的影响 与假手术组相比,模型组大鼠各时间点肺指数增加明显($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠肺指数有不同程度的下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);与强的松组相比,补阳还五汤中剂量组第 14,28 天肺指数降低较明显($P < 0.05$);补阳还五汤低剂量组第 28 天肺指数有所降低($P < 0.05$);高剂量组 3 个时间点肺指数均高于强的松组,但与同期模型组相比仍有明显的降低。见表 1。

表 1 补阳还五汤对大鼠肺指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肺指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		
		7 d	14 d	28 d
假手术	-	6.74 ± 0.25 (n=8)	5.61 ± 0.38 (n=8)	5.82 ± 0.29 (n=8)
模型	-	10.33 ± 1.16 ¹⁾ (n=6)	12.07 ± 0.64 ¹⁾ (n=7)	14.21 ± 0.53 ¹⁾ (n=7)
强的松	4.2 × 10 ⁻³	8.65 ± 1.49 ²⁾ (n=8)	9.52 ± 1.08 ²⁾ (n=8)	10.36 ± 1.37 ²⁾ (n=7)
补阳还五汤	18.48	8.72 ± 1.19 ²⁾ (n=8)	9.67 ± 1.24 ²⁾ (n=8)	10.54 ± 1.31 ²⁾ (n=8)
	9.24	8.54 ± 1.22 ²⁾ (n=8)	9.33 ± 1.17 ^{2,3)} (n=8)	9.94 ± 1.06 ^{2,3)} (n=8)
	4.62	8.60 ± 1.36 ²⁾ (n=8)	9.59 ± 1.31 ²⁾ (n=8)	10.03 ± 1.02 ^{2,3)} (n=8)

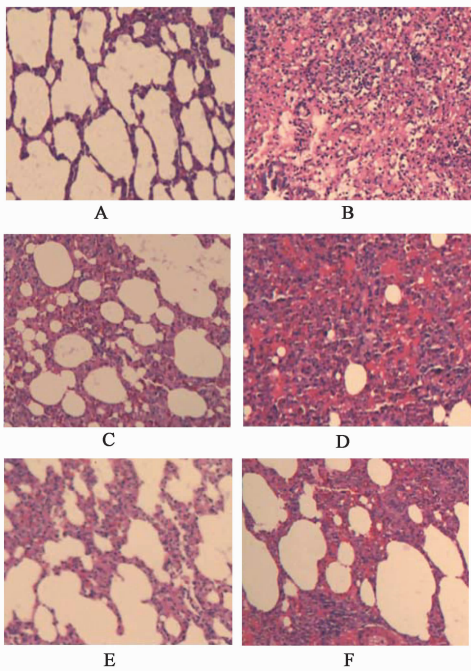
注:与假手术组比¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比²⁾ $P < 0.01$;与强的松组比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对肺纤维化大鼠肺泡炎和肺纤维化程度的影响 NS 组肺组织结构正常,肺泡结构清晰,无间隔水肿、炎细胞浸润和胶原纤维沉积;模型组第 7 天可见肺毛细血管充血,肺泡间隔水肿,肺泡壁增厚,肺泡腔内出现以巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,成纤维细胞增生;第 14 天肺泡炎逐渐减轻,肺泡间隔明显增宽,仅见少量炎症细胞浸润,成纤维细胞明显增多;第 28 天肺泡炎基本消失,肺泡结构破坏,肺泡间隔明显增厚、断裂,可见大量成纤维细胞,肺组织以胶原沉积、肺纤维化改变为主,肺纤维化瘢痕形成。给药组与同期模型组相比,肺组织病理变化有不同程度的改善。见图 1~3。

由表 2 可知,与假手术相比,模型组及给药组大鼠肺泡炎积分均有增高,模型组明显高于同期假手术组($P < 0.01$);与模型组比较,给药组各时间点肺

泡炎程度均有不同程度的改善($P < 0.01$);与强的松对照组相比,补阳还五汤中剂量组、低剂量组在第 14,28 天肺泡炎积分降低明显($P < 0.05$),补阳还五汤高剂量组虽与同期模型组相比肺泡炎程度有明显降低,但与强的松组比较无明显差异。

由表 3 可知,与假手术相比,模型组及给药组大鼠肺纤维化积分均有增高,但模型组明显高于同期假手术组($P < 0.01$);与模型组比较,给药组各时间点的肺纤维化程度均有不同程度的改善($P < 0.01$);与强的松对照组相比,补阳还五汤中剂量组在第 28 天肺纤维化积分降低明显($P < 0.01$),低剂量组在第 28 天肺纤维化积分降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),补阳还五汤高剂量组虽与同期模型组相比肺泡炎程度有明显降低,但与强的松对照组比较无统计学意义。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 强的松 $4.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
D. 补阳还五汤 $18.48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 补阳还五汤 $9.24 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;
F. 补阳还五汤 $4.62 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图 2~3 同)
图 1 造模 7 d 后各组大鼠肺组织病理学改变(HE, $\times 100$)

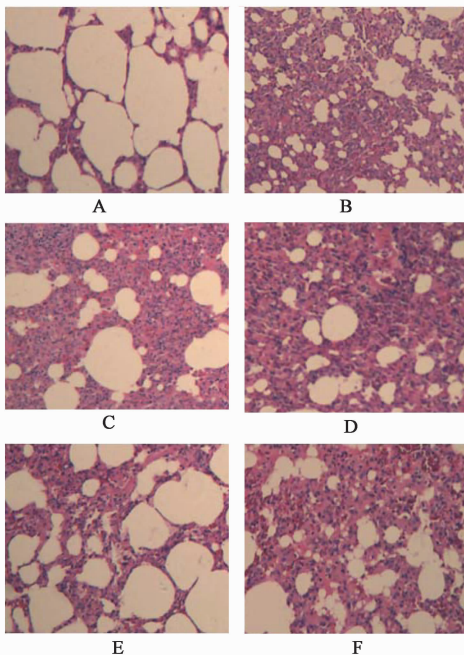


图 2 造模 14 d 后各组大鼠肺组织病理学改变(HE, $\times 100$)

4 讨论

PF 属于纤维增殖性疾病的范畴,是多种原因所致 ILD 共有的病理基础过程,其病变主要累及肺间质,也可累及肺泡上皮细胞及肺血管,以肺成纤维细胞的异常增生和胶原蛋白为主的细胞外基质过度沉

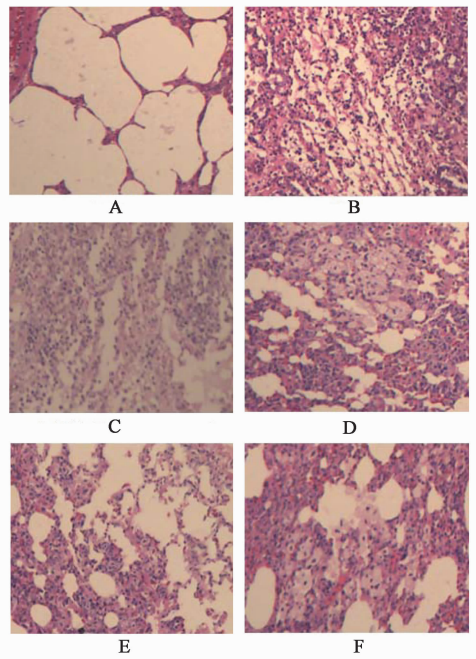


图 3 造模 28 d 后各组大鼠肺组织病理学改变(HE, $\times 100$)

积为主要表现,至今发病机制不明,且没有理想的治疗方法^[3-4]。由于大多数肺部疾病最终转归为肺纤维化,并且随着污染、环境恶化等因素,肺纤维化当今在全球的发病率呈不断上升的趋势,已成为严峻的健康问题^[5],因此对肺纤维化发生机制和有效药物的研究具有非常重要的科学价值。肺指数是动物肺湿重与体质量的比值,从肺纤维化的病理发展来看,早期的肺部急性炎症、肺水肿以及后期肺内逐渐形成胶原纤维沉积等因素均可导致肺实质质量的增加,使肺指数增加,故肺指数是反应肺炎症及肺纤维化程度的指标之一^[6],然而动物自身体质量的增加则可导致肺指数的降低。肺纤维化归属于中医“肺痿”、“肺痹”等范畴。本病多责之肺肾气虚,邪气入中,久留肺络,气血因瘀而滞,肺络因痹而痿,故气虚血瘀是肺纤维化的主要病机,益气活血法是治其之基本大法。补阳还五汤出自清代名医王清任的《医林改错》,是益气活血法的代表方剂。本课题组在前期对益气活血法干预肺纤维化的研究中发现,补阳还五汤具有抑制实验性肺纤维化大鼠 $\text{TGF-}\beta_1$ 的过度表达,减少肺组织中 HYP 含量,降低肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子含量的作用,在肺纤维化的治疗中具有潜在应用价值^[7]。本实验结果显示,与假手术相比,各给药组大鼠肺指数均有所增加,且与时间的推进呈上升趋势,模型组大鼠在第 7 天即有明显升高,说明此阶段肺内炎细胞大量渗出,导致肺泡水肿、毛细血管充血,使肺重增加;至中期(14 d),由于

表 2 补阳还五汤对大鼠肺炎病理学积分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺炎病理学积分/分					
		7 d		14 d		28 d	
假手术	-	1.33 ± 0.23	(n = 8)	1.26 ± 0.19	(n = 8)	1.21 ± 0.08	(n = 8)
模型	-	3.64 ± 0.52 ¹⁾	(n = 6)	3.37 ± 0.22 ¹⁾	(n = 7)	3.18 ± 0.13 ¹⁾	(n = 7)
强的松	4.2 × 10 ⁻³	3.17 ± 0.37 ²⁾	(n = 8)	2.95 ± 0.31 ²⁾	(n = 8)	2.84 ± 0.26 ²⁾	(n = 7)
补阳还五汤	18.48	3.28 ± 0.15 ²⁾	(n = 8)	3.06 ± 0.48 ²⁾	(n = 8)	2.91 ± 0.17 ²⁾	(n = 8)
	9.24	3.14 ± 0.55 ²⁾	(n = 8)	2.80 ± 0.17 ^{2,3)}	(n = 8)	2.78 ± 0.35 ^{2,3)}	(n = 8)
	4.62	3.20 ± 0.26 ²⁾	(n = 8)	2.84 ± 0.43 ^{2,3)}	(n = 8)	2.79 ± 0.08 ^{2,3)}	(n = 8)

表 3 补阳还五汤对大鼠肺纤维化病理学积分的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺纤维化积分/分					
		7 d		14 d		28 d	
假手术	-	0.12 ± 0.01	(n = 8)	0.10 ± 0.01	(n = 8)	-	(n = 8)
模型	-	2.34 ± 0.41 ¹⁾	(n = 6)	2.69 ± 0.17 ¹⁾	(n = 7)	3.37 ± 0.25 ¹⁾	(n = 7)
强的松	4.2 × 10 ⁻³	2.06 ± 0.33 ²⁾	(n = 8)	2.18 ± 0.28 ²⁾	(n = 8)	2.40 ± 0.22 ²⁾	(n = 7)
补阳还五汤	18.48	2.13 ± 0.25 ²⁾	(n = 8)	2.27 ± 0.33 ²⁾	(n = 8)	2.41 ± 0.38 ²⁾	(n = 8)
	9.24	2.07 ± 0.14 ²⁾	(n = 8)	2.14 ± 0.37 ^{2,3)}	(n = 8)	2.20 ± 0.06 ^{2,4)}	(n = 8)
	4.62	2.11 ± 0.22 ²⁾	(n = 8)	2.21 ± 0.13 ²⁾	(n = 8)	2.32 ± 0.38 ^{2,3)}	(n = 8)

炎性渗出减少,胶原纤维尚属缓慢沉积,此时肺指数增加不明显,随着病情的发展,肺内结构破坏并逐步被异常修复所形成的胶原纤维所替代,故肺指数在 28 d 时又呈明显升高趋势。与模型组相比,各给药组在不同时间点的肺指数均明显降低,与强的松对照组相比,补阳还五汤中剂量组第 14,28 天肺指数降低较明显,补阳还五汤低剂量组第 28 天肺指数有所降低,补阳还五汤高剂量组虽与同期强的松对照相比并无统计学意义,但与模型组大鼠相比,下降仍比较显著。提示补阳还五汤能够较好地控制 BLM 所致肺纤维化大鼠的肺指数,且在中后期抑制肺纤维化的效果明显优于强的松。

[参考文献]

[1] Douglas W W, Ryu J H, Schroeder D R. Idiopathic pulmonary fibrosis: impact of oxygen and colchicines, prednisone, or no therapy on survival[J]. Am J Respir Crit Care Med,2000,161(4Pt1):1172.

[2] 王飞,陈平,曹国平,等.补阳还五汤对肺纤维化大鼠肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子的影响[J].中药药理与临床,2005,21(3):5.

[3] Gharaee K M, Phan S H. Molecular mechanisms of and possible treatment strategies for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Curr Pharm Des,2005,11(30):3943.

[4] Hunninghake G W. Antioxidant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2005, 353(21):2285.

[5] Tashkin D P, Elashoff R, Clements P J, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma a lung disease[J]. Am J Respir Crit Care Med,2007,176(10):1026.

[6] 魏茂提,王世鑫,张国辉,等.染矽尘大鼠肺脏系数和肺胶原含量的变化[J].工业卫生与职业病,2001,27(6):351.

[8] 曹国平,王飞,陈平.补阳还五汤对博莱霉素诱导大鼠肺纤维化过程中羟脯氨酸的含量影响[J].甘肃中医,2007,20(2):51.

[责任编辑 聂淑琴]