

## 加减补肺汤对肺纤维化大鼠的抗氧化作用

谢高宇<sup>1</sup>, 杨冰瑶<sup>2</sup>, 欧江琴<sup>3</sup>, 林昶<sup>1</sup>, 陈云志<sup>1</sup>, 王建科<sup>1</sup>, 杨长福<sup>\*</sup>

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省凯里市第一人民医院, 贵州 凯里 556000;  
3. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550004)

**[摘要]** **目的:**探讨加减补肺汤对肺纤维化(PF)大鼠抗氧化作用。**方法:**SD 雄性大鼠 40 只,随机分为假手术组、模型组、加减补肺汤组,采用一次性气管滴注博来霉素复制 PF 模型(1 mg/只),假手术组滴注等量的生理盐水。术后 2 d 加减补肺汤组 ig 中药水煎液 10 mL·kg<sup>-1</sup>(含生药 16 g·kg<sup>-1</sup>),模型组和假手术组 ig 等量生理盐水,14,28 d 处死动物,取血和肺脏,测定血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)和肺组织中羟脯氨酸(Hyp)的含量,实时荧光 PCR 测定肺组织中细胞外超氧化物歧化酶(ECSOD)mRNA 的表达。**结果:**加减补肺汤明显改善肺纤维化大鼠的生存状态,降低肺组织中 Hyp 的含量,降低血清 MDA 含量,增加 ECSOD mRNA 的表达。**结论:**加减补肺汤能提高肺纤维化大鼠生存状态,改善纤维化指标,其机制可能与降低血清中 MDA 含量,上调 ECSOD mRNA 表达有关。

**[关键词]** 加减补肺汤;超氧化物歧化酶;特发性纤维化;抗氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0236-04

## Antioxidant Effects of Addition and Subtraction Bufei Decoction on Pulmonary Fibrosis in Rats

XIE Gao-yu<sup>1</sup>, YANG Bing-yao<sup>2</sup>, OU Jiang-qin<sup>3</sup>, LIN Chang<sup>1</sup>,  
CHEN Yun-zhi<sup>1</sup>, WANG Jian-ke<sup>1</sup>, YANG Chang-fu<sup>\*</sup>

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550004, China;

2. Kaili First People's Hospital, Kaili 556000, China;

3. First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antioxidant effects of addition and subtraction Bufei decoction (ASBD) on pulmonary fibrosis (PF) in rats. **Method:** Forty male Sprague-Dawley rats were divided randomly into sham operation group, model group, ASBD group. The PF model was reproduced by intratracheal injection of bleomycin. ASBD group was given traditional Chinese medicine decoction (ig, 2 times to clinic dose, 16 g·kg<sup>-1</sup>) starting from 2 days after operation. The sham operation group and model group were given the same amount of normal saline. The blood and lung tissue of rats were took on the 14 d and 28 d. The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in serum were measured. The content of hydroxyproline in lung tissue was detected. The mRNA of extracellular SOD (ECSOD) was measured by real-time PCR. **Result:** ASBD significantly improved the survival state of PF rats, reduced content of hydroxyproline in the lung tissue, decreased the level of MDA in the serum, improved the expression of ECSOD mRNA. **Conclusions:** ASBD could improve the survival rate of PF rats, and the fibrosis index. The mechanism might be related to decrease in the level of serum MDA and up-regulation of the expression of ECSOD mRNA.

**[收稿日期]** 20120502(321)

**[基金项目]** 贵州省科技厅 贵阳中医学院联合基金(黔科合中药字[2011]LKZ7026);贵阳中医学院博士启动基金(中医研[2011]009);贵州省中药、民族药炮制技术研究平台建设项目(黔科合社字[2009]5001)

**[第一作者]** 谢高宇,讲师,从事中西医结合基础研究,Tel: 0851-5606145,E-mail:xiegaoyu2000@163.com

**[通讯作者]** \*杨长福,博士,副教授,从事中医药防治肺纤维化作用机制研究,Tel:0851-5606148,E-mail:yangchangfu@126.com

[ **Key words** ] Addition and Subtraction Bufei decoction; superoxide dismutase; idiopathic fibrosis; antioxidant

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是由多种病因引起的具有相似病理过程的一类弥漫性肺疾病。以早期肺泡结构破坏和弥漫性肺泡炎,继后出现细胞外基质过度沉积,并逐渐演变为弥漫性肺间质纤维化。其发病机制至今尚不完全明确。目前,本病除肺移植术外,尚无其他有效的治疗方法,发病率逐年增加,病人在确诊后生存期常<5年。寻找有效的改善肺纤维化患者生存质量的药物及治疗手段是目前医学领域需要解决的问题之一。本实验拟选用临床上有效的方药——加减补肺汤,探讨其对博来霉素诱导的肺纤维化大鼠的影响,为临床应用提供实验基础。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD雄性大鼠40只,体质量(200±20)g,由重庆滕鑫生物技术有限公司提供,合格证号SCXF(渝)2007-005,饲养于贵阳中医学院动物研究所恒温恒湿空调房内。

**1.2 药品和试剂** 盐酸博来霉素系浙江海正药物股份有限公司产品(批号110201);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号201111031)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号20111101)、羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(批号20111111)均由南京建成生物工程研究院提供;RNAiso Plus提取试剂盒(D9108A)、上下游引物、One Step SYBR® Prime Script™ RT-PCR试剂盒(DRR066A)由宝生物工程(大连)有限公司提供。

**1.3 中药制备** 加减补肺汤所需药材黄芪、党参、补骨脂、百部、桑白皮、丹参购自贵州省济仁堂药店,按处方配比称取各药材,加水适量浸泡至透心后,分别加入8,8,6倍量的水提取3次,每次1h,滤过,合并滤液,浓缩成含生药1.6g·mL<sup>-1</sup>,置4℃冰箱保存备用。

**1.4 仪器** 721B型分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),酶标仪(Biotek),NANO DROP 2000 Spectrophotometer(Thermo scientific),IKA匀浆器,AE-160型分析天平,7500Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)。

## 2 方法

**2.1 造模方法及分组** 适应性喂养1周的动物,随机分为3组:假手术组8只,模型组和加减补肺汤组,每组16只。大鼠用1.5%戊巴比妥钠ip麻醉(2.5mL·kg<sup>-1</sup>)后,仰卧位固定于鼠板上,颈部正中

切开,逐层剥离气管周围肌肉,充分暴露气管,从气管软骨环间歇向心端一次性滴注0.3mL博来霉素生理盐水溶液(1mg/只),立即左右旋转动物,使博来霉素在两肺内分布均匀。同法滴注0.3mL的生理盐水溶液作为假手术对照组。

**2.2 给药** 术后次日起,加减补肺汤组按10mL·kg<sup>-1</sup>ig加减补肺汤水煎液(含生药16g·kg<sup>-1</sup>,相当于成人等效剂量的2倍),假手术组和模型组10mL·kg<sup>-1</sup>ig生理盐水。

**2.3 取材** 分别于造模后14d,28d,每组随机抽取动物8只大鼠(假手术组第28天取材),末次给药后1h,股动脉取血,分离血清,置4℃冰箱备用;快速开胸,取出双肺,生理盐水漂去血污,称重,分成小块液氮速冻,放于-80℃冰箱保持备用。

**2.4 血清SOD,MDA检测** 取血清样本,室温放置30min,每1样本取100μL血清,按试剂盒说明书进行操作,分别于酶标仪450nm、分光光度计532nm处测定SOD和MDA的吸光度(A)。

**2.5 肺组织匀浆中Hyp含量测定** 取肺组织0.1g,精密称定,剪碎后置于15mL的磨口刻度试管中,加入6mol·L<sup>-1</sup>的盐酸溶液1mL,95℃水浴5h充分水解,调pH后加水至10mL,充分混匀,取水解液4mL,加入活性碳,漩涡混匀,3500r·min<sup>-1</sup>离心10min,取1mL上清液按试剂盒说明书进行操作,蒸馏水调零,分光光度计550nm处测定A。

**2.6 实时荧光定量PCR检测肺组织中细胞外SOD(ECSOD)mRNA的相对表达** 肺组织按50mg加入1mL总RNA提取液,高速匀浆器匀浆,冰上放置10min;加入0.2mL氯仿,颠倒混合15s,冰上放置5min;4℃12000r·min<sup>-1</sup>离心15min;转移水相至一新离心管中,加入等量的异丙醇,-20℃放置1h;4℃12000r·min<sup>-1</sup>离心10min;弃上清,用1mL预冷的75%乙醇洗涤沉淀;4℃7500r·min<sup>-1</sup>离心5min;空气干燥后,用40μLRNase-free水溶解RNA,取1μL总RNA于260nm,280nm检测RNA的含量和纯度。调整模板浓度,根据试剂盒推荐的条件制作预混体系,加入PCR反应板中,混合,使用7500Fast Real-Time PCR System进行一步法扩增,测定目的基因的相对表达量。PCR中所用引物序列:β-actin Forward primer: 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', Reverse primer: 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTT

GCTG-3', 长度 150 bp; ECSOD-Forward primer: 5'-GGGTC-TGTCCTGTACTTCACCAGAG-3', Reverse primer: 5'-CTGACA TGGTCCAGGTGACAGAG-3', 长度 136 bp。

**2.7 统计分析** 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验,  $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 大鼠一般行为学和体重变化 假手术大鼠活

表 1 加减补肺汤对 PF 大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	0 d	7 d	14 d	28 d
假手术	-	202.22 ± 7.00	238.44 ± 43.36	305.78 ± 40.25	361.56 ± 36.81
模型	-	205.00 ± 6.86	208.44 ± 53.69 <sup>2)</sup>	253.33 ± 39.90 <sup>2)</sup>	316.67 ± 66.23 <sup>2)</sup>
加减补肺汤	16	204.22 ± 10.46	204.00 ± 61.05 <sup>2)</sup>	263.89 ± 55.63 <sup>1)</sup>	320.89 ± 60.70 <sup>1)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.2 对 PF 大鼠血清 SOD, MDA 水平的影响** 模型组大鼠血清 SOD 活性随时间的延长逐步降低, 28 d 时较假手术组显著降低 ( $P < 0.05$ ); 加减补肺汤组大鼠血清 SOD 下降的趋势更明显, 与假手术组和模型组比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。模型组大鼠血清 MDA 含量随时间延长逐渐增加, 28 d 时较假手术组增加明显 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 加减补肺汤组 28 d 时明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 加减补肺汤对 PF 大鼠血清中 SOD, MDA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	时间/d	n	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
假手术	-	28	8	21.21 ± 0.47	1.98 ± 0.45
模型	-	14	7	20.09 ± 0.60	2.34 ± 0.79
	-	28	5	19.62 ± 0.90 <sup>1)</sup>	3.84 ± 0.72 <sup>1)</sup>
加减补肺汤	16	14	8	19.25 ± 0.24 <sup>1,2)</sup>	2.00 ± 0.47
	16	28	8	18.37 ± 0.57 <sup>1,2)</sup>	2.24 ± 0.53 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与同时点模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$  (表 3 同)。

**3.3 对 PF 大鼠肺组织匀浆中 Hyp 的影响** PF 模型组中 Hyp 含量较假手术升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比, 28 d 时加减补肺汤组 Hyp 明显降低 ( $P < 0.05$ ), 接近假手术组。见表 3。

#### 3.4 对 PF 大鼠肺组织中 ECSOD mRNA 表达的影响

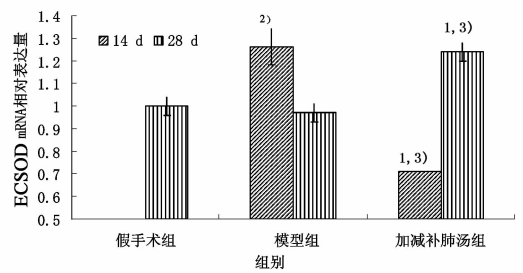
PCR 结果显示, 与假手术组相比, 14 d 模型大鼠 ECSOD mRNA 表达显著增强 ( $P < 0.05$ ), 28 d 显著下降; 14 d 时, 加减补肺汤 ECSOD mRNA 表达较模型组明显下降 ( $P < 0.01$ ), 28 d 时, 加减补肺汤组较模型组 ECSOD mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ )。见

泼, 皮毛有光泽, 体重随饲养时间的延长逐步增加, 呼吸状况良好。模型组和给药组大鼠在术后 1 周, 少有进食, 体重不增。7 d 时, 与假手术组相比, 各组大鼠体重呈明显下降 ( $P < 0.05$ ), 14 d 后体重开始逐渐上升, 但与假手术组相比仍有明显差异 ( $P < 0.05$ )。模型组皮毛枯燥, 少动, 呼吸有啰音, 术后 3, 16, 17, 24 d 有动物死亡, 尸检发现肺部有瘀血, 肠道呈透明状。加减补肺汤组毛发光泽度优于模型组, 偶有啰音。体重变化见表 1。

表 3 加减补肺汤对 PF 大鼠肺组织中 Hyp 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	时间/d	n	Hyp/ $\mu g \cdot mg^{-1}$
假手术	-	28	8	0.67 ± 0.12
模型	-	14	7	0.75 ± 0.09
	-	28	5	0.73 ± 0.27
加减补肺汤	16	14	8	0.87 ± 0.13 <sup>1)</sup>
	16	28	8	0.69 ± 0.14 <sup>2)</sup>

图 1。



与假手术组比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;  
与模型组比<sup>3)</sup> $P < 0.05$

图 1 加减补肺汤对大鼠肺组织 ECSOD mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 4 讨论

肺纤维化是由多种病因引起的具有相似病理过程的一类弥漫性肺疾病, 肺间质广泛而严重的纤维化病变使肺组织的顺应性下降, 弥散功能减退, 通气/血流比例失调, 临床表现为干咳无痰、呼吸困难等, 病程一般呈进行性发展。最终可以引起呼吸功能衰竭而死亡<sup>[1]</sup>。本病目前唯一有效的治疗方法是采用肺移植, 由于受供体缺乏、术后并发症多和费

用昂贵等因素的影响,使大多数患者不能或不适合接受肺移植术<sup>[2]</sup>,从而严重限制了其临床广泛应用。最新流行病学调查显示本病的发病率呈逐年增加的趋势,患者中位生存期为3~5年,5年生存率约为20%~40%<sup>[3]</sup>。

补肺汤出自元代李仲南所著《永类铃方》。加减补肺汤由补肺汤化裁而来,为贵阳中医学院第一附属医院呼吸科治疗 COPD 临床经验方,临床疗效显著。该方由黄芪、党参、补骨脂、百部、桑白皮、丹参组成。其中,黄芪配伍党参,补脾益肺、扶正固本;补骨脂温肾化饮、止咳平喘为臣药;活血化瘀的丹参与润肺止咳平喘的百部、桑白皮为佐药,共奏补肺健脾、活血化瘀之功效。全方针对该病病理核心及中心环节治疗。临床和动物实验发现,加减补肺汤可以改善 COPD 稳定期肺脾气虚证临床缺氧状态,缓解呼吸困难症状,延缓肺功能下降,改善生活质量,降低患者血清 IL-8, TNF- $\alpha$  含量,减轻和控制气道炎症,防治气道重塑<sup>[4]</sup>;通过显著降低 COPD 肺气虚证大鼠肺泡灌洗液中 IL-8, TNF- $\alpha$  含量,达到减少支气管及肺泡腔内有炎性细胞浸润、杯状细胞增生、气管平滑肌增厚、肺泡融合等方面的作用发挥缓解气道炎症的目的<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,加减补肺汤能显著的降低肺纤维化大鼠肺组织中 MDA 的含量,减少细胞外基质 Hyp 的沉积,以提高肺纤维化大鼠生存率。然而,在既往的抗氧化研究中,在血清学指标中 MDA 降低的同时,常伴有 SOD 的升高<sup>[6]</sup>,该现象在本研究中并未观察到,这可能与中药在体内吸收、分布、代谢过程中加重了机体抗氧化失衡,导致血中 SOD 的活性反而下降。为分析可能的原因,进一步检测了肺组织中的 ECSOD。ECSOD 是肺组织中主要的抗氧化物<sup>[7]</sup>,可通过清除多余的超氧阴离子恢复机体内的氧化/抗氧化体系平衡,其在抵抗肺组织损伤方面起着极为重要的作用。结果显示,加减补肺汤能显著提高肺纤维化期大鼠(28 d) ECSOD mRNA 的表达。这是因为在组织中 ECSOD 主要存在于细胞外基质中及细胞表面,其含量为血浆中 ECSOD 的 20 倍<sup>[8]</sup>。上调的 ECSOD mRNA 改善了肺纤维化的生存状态,提高其存活率,这与其他实验室的研究结果相一致:ECSOD 的高表达对实验性肺

纤维化具有明显的防治作用<sup>[9-10]</sup>。

综上所述,加减补肺汤通过提高纤维化期 PF 大鼠肺组织中 ECSOD mRNA 的表达,降低 ECM 的沉积和 MDA 的含量,进而提高 PF 大鼠的生存率,显示了初步抗肺纤维化的药理活性,但具体机制还需进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] Gross T J, Hunninghake G W. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2001, 345 (7):517.
- [2] Williams T J, Wilson J W. Challenges in pulmonary fibrosis:7-novel therapies and lung transplantation[J]. Thorax, 2008, 63 (3):277.
- [3] Fernandez Perez E R, Daniels C E, Schroeder D R, et al. Incidence prevalence, and clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis: A population-based study [J]. Chest, 2010, 137 (1):129.
- [4] 欧江琴,刘良丽,刘华蓉. 补肺汤加减治疗慢性肺原性心脏病 20 例[J]. 河南中医,2006,26(2):69.
- [5] 张葵,刘良丽,欧江琴,等. 加减补肺汤对 COPD 肺气虚证模型大鼠支气管肺泡灌洗液 TNF- $\alpha$ , IL-8 的影响[J]. 天津中医药,2008,25(6):491.
- [6] 黄霞,刘惠霞,孙为. 不同治则对肺间质纤维化大鼠氧自由基损伤的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):188.
- [7] Ganguly K, Depner M, Fattman C, et al. Superoxide dismutase 3, extracellular (sod3) variants and lung function[J]. Physiol Genomics, 2009, 37 (3):260.
- [8] Fattman C L, Schaefer L M, Oury T D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine[J]. Free Radic Biol Med, 2003, 35 (3):236.
- [9] Rabbani Z N, Anscher M S, Folz R J, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase reduces acute radiation induced lung toxicity[J]. BMC Cancer, 2005, 5:59.
- [10] Van Rheen Z, Fattman C, Domarski S, et al. Lung ecsod overexpression lessens bleomycin induced pulmonary hypertension and vascular remodeling [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010,44:500.

[责任编辑 何伟]