

# 肺络通合剂对肺纤维化大鼠肺组织病理形态学 和纤维连接蛋白含量的影响

王斌胜, 刘孟安\*

(滨州医学院烟台校区中西医结合学院, 山东烟台 264003)

**[摘要]** **目的:**探讨肺络通合剂对肺纤维化大鼠肺组织病理形态学的影响。**方法:**选择 Wistar 大白鼠, 气管内注入博莱霉素建立肺纤维化模型。随机分为正常对照组、模型组、中药高、低剂量组和强的松组。除正常对照组外, 其余 4 组均制成肺纤维化动物模型, 模型组用生理盐水 ig, 中药高、低剂量组用肺络通合剂(相当于生药 18,9 g·kg<sup>-1</sup>) ig。强的松组用强的松(2.04 mg·kg<sup>-1</sup>) ig。各组于用药后 28,56 d 各随机处死一半大鼠取材送检, 观察肺泡炎症病理变化, 肺纤维化病理变化和纤维连接蛋白(FN)含量。**结果:**模型组大量胶原纤维增生, 呈重度肺纤维化改变, 平均病理积分(56 d, 下同)为 2.50 ± 0.71; 肺络通合剂高剂量组呈轻度肺纤维化(1.00 ± 0.82); 低剂量组(1.50 ± 0.85)病变程度较中药高剂量组略重, 强的松组(1.80 ± 0.92)病变程度较模型组轻, 但较中药高剂量组为重; FN 含量平均 A 值(28 d)肺络通高剂量组(49.55 ± 6.57)明显低于模型组(272.11 ± 40.12), 且作用优于强的松组(73.25 ± 11.11)。**结论:**肺络通合剂能有效抑制博莱霉素引起的肺纤维化形成。

**[关键词]** 肺络通合剂; 肺纤维化; 病理形态学; 实验研究

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0195-04

## Influence of Feiluotong Mistura on Pathomorphological Changes and Fibronectin Content in Rats with Pulmonic Fibrosis

WANG Bin-sheng, LIU Meng-an\*

(College of Combined Traditional Chinese Medicine with Western Medicine, Binzhou Medical College, Yantai 246003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the Pathomorphological changes in rats with pulmonic fibrosis treating by Feiluotong Mistura. **Method:** Wistar rats were divided into normal group, model group, herbal therapy high dose group, herbal therapy low dose group, western medicine (WM) group. In addition to the normal group, the other four groups were reproduced animal model of pulmonic fibrosis. The model group were given normal saline gavage. The herbal therapy high dose group was given Feiluotong Mistura (18 g·kg<sup>-1</sup>) gavage. The herbal therapy low dose group was given Feiluotong Mistura (9.0 g·kg<sup>-1</sup>) gavage. WM group given prednisone gavage. Half of each group were taken lung to test in the 28<sup>th</sup> day and the 56<sup>th</sup> day. **Result:** Large collagen fibers hyperplasia was founded in the model group, a severe pulmonary fibrosis in WM group. Mild pulmonary fibrosis was founded in the herbal therapy high dose group, fibrosis in the herbal therapy low dose group was more severe than that in the herbal therapy high dose group, Lesions of WM group were milder than that of the model group. **Conclusion:** Feiluotong Mistura can effectively inhibit the formation of pulmonary fibrosis induced by bleocin.

**[Key words]** Feiluotong Mistura; pulmonic fibrosis; pathomorphology; experimental study

**[收稿日期]** 20101231(005)

**[通讯作者]** \*刘孟安, Tel: 05356913229, E-mail: byliumengan@126.com

肺间质纤维化是以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱最终导致肺间质纤维化为特征的疾病。西医对肺纤维化的治疗, 一般首选糖皮质激素, 但疗效欠佳并具有一定的副作用。近年来中医中药防治肺纤维化

的研究逐渐成为业内关注的热点。肺络通合剂是本研究小组在临床中总结出的经验方,对本病有较好疗效。为了进一步明确其作用机制,作者进行了肺络通合剂对肺纤维化大鼠病理变化影响的研究。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重(120 ± 10)g,购于山东大学医学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK(鲁)20090001。

**1.2 药物与试剂** 博莱霉素 A5 (Bleomycin, BLM) 由日本华药株式会社高崎制药厂生产,批号 950330,强的松由浙江仙琚制药厂生产,批号 040406,肺络通合剂(含生药 1.5 g·mL<sup>-1</sup>)由滨州医学院中药研究所提供。试剂 FN 小鼠抗大鼠一抗(批号 11204D02),生物素化山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 94372),辣根酶标记链霉亲和素三抗(批号 11993401),均购于北京中山生物技术有限公司。

**1.3 仪器** Olympus BX51 显微镜日本;KD-BM III 组织包埋机(上海京工实业有限公司);YD-12G 全自动组织脱水机;RM2255 石蜡切片机(德国莱卡);IMAGE-PRO PLUS 病理图像分析系统(美国 MediaCybernetics 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与造模** 将大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 5 组:正常对照组、模型组、中药高剂量组、中药低剂量组、强的松组,每组 20 只。除正常对照组外,其余 4 组均采用陈氏<sup>[1]</sup>报道的方法复制肺纤维化动物模型:将动物麻醉后,取仰卧位,切开颈部皮肤,钝型分离暴露气管,于气管软骨环间隙穿刺注入 BLM A5 生理盐水溶液 0.2~0.3 mL(BLM 5 mg·kg<sup>-1</sup>体重),立即将动物直立并行旋转,缝合皮肤,待动物自然清醒后置笼内常规饲养。

**2.2 给药方法** 建立动物模型 2 d 后,正常对照组、模型组用生理盐水 12 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig。中药高剂量组用肺络通合剂(1.5 g·mL<sup>-1</sup>)12 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig;低剂量组用肺络通合剂(0.75 g·mL<sup>-1</sup>)12 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig;强的松组用强的松混悬液(0.17 mg·mL<sup>-1</sup>)12 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig。每周称重,调整用药量,各组于第 28,56 天随机抽取一半大鼠,称重后处取材送检。

**2.3 检测指标** 分别于第 28,56 天取材观察肺泡炎症病理变化,肺纤维化病理变化和 FN(纤维连接蛋白)含量。

**光镜观察** 分离肺组织,取右肺中叶组织,约 5 mm × 5 mm × 5 mm 大小,用 10% 的中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片厚 5 μm,HE 染色,Masson 三色胶原染色,光镜观察。根据 Szaipil<sup>[2]</sup> 等方法,HE 染色切片将肺泡炎症程度分为(-~Ⅲ)级,Masson 染色切片将肺纤维化程度分为(-~Ⅲ)。计算病理积分的均值(即平均积分)。病理积分标准为 0 = (-),1 = (+),2 = (++) ,3 = (+++),平均积分 = 每组病理总积分/每组例数。

**免疫组织化学指标** 观察 FN 在大鼠肺组织中的含量,经图像分析仪测定吸光度(A),求各组平均 A。

**2.4 统计学处理** 各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠肺组织病理形态学变化** 肉眼观察:正常对照组双肺呈淡粉色,质地柔软,表面光滑,模型组 28,56 d 肺体积增大,呈苍白色,质地变硬、变脆,可见小片状,凹凸不平的灰黑灶,表面肿胀明显,甚至出现肺大泡,部分肺组织替代以黄色肿块,颜色呈暗红色,甚至紫褐色,可见包膜下点片状出血,切面疏松,可见大量血性泡沫样液体。治疗组 28,56 d 肺组织鲜活,表面肿胀明显减轻,未见紫褐色,略有暗红色,可有少许肺泡,未见肺内肿块。

**光镜观察:** 正常对照组大鼠气管、各级支气管,肺泡及肺泡间隔组织结构正常,肺泡间隔无充血、水肿及急慢性炎症等改变;模型组第 28 天见少量的炎性细胞浸润,肺组织结构破坏,肺泡腔明显缩小,部分肺泡腔呈囊状扩张,肺间质被胶原纤维和成纤维细胞替代,形成灶状纤维化;56 d 时有大量胶原纤维增生,呈重度肺纤维化改变,胸膜增厚,肺泡结构严重破坏,部分肺泡融合成大泡,呈囊状扩张,肺泡间隔明显增宽,成纤维细胞大量增生,有少量炎症细胞浸润;高剂量组 28,56 d 均呈轻~中度肺纤维化改变,病变范围局限,胸膜和肺泡间隔成纤维细胞增多,少量炎性细胞浸润,病变程度明显轻于模型组( $P < 0.01$ );强的松组 28,56 d 时病变程度较模型组轻( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),但较高剂量组为重,尤其 28 d 肺纤维化和炎症病理积分均明显重于高剂量组( $P < 0.05$ ),低剂量组 28d 及 56 d 时病变程度明显轻于模型组( $P < 0.01$ ),较高剂量组略重,较强的松组轻,但未见统计学差异,见表 1~2,图 1。

表1 各组第28天肺泡炎症及肺纤维化病理积分的变化( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	肺泡炎症积分					肺纤维化病理积分				
		-	+	++	+++	平均积分	-	+	++	+++	平均积分
正常	-	9	1	0	0	0.10 ± 0.32	9	1	0	0	0.10 ± 0.32
模型	-	0	3	4	3	2.00 ± 0.82	0	1	6	3	2.20 ± 0.63
肺络通	18	5	4	1	0	0.60 ± 0.70 <sup>2,3)</sup>	2	7	1	0	0.90 ± 0.57 <sup>2,3)</sup>
	9	3	5	1	1	1.00 ± 0.94 <sup>2)</sup>	1	6	3	0	1.20 ± 0.63 <sup>2)</sup>
强的松	2.04 × 10 <sup>-3</sup>	1	6	2	1	1.30 ± 0.82 <sup>1)</sup>	1	4	4	1	1.50 ± 0.85 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01;与强的松组比较<sup>3)</sup> P < 0.05(表2~3同)。

表2 各组第56天肺泡炎症及肺纤维化病理积分的变化( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	肺泡炎症积分					肺纤维化病理积分				
		-	+	++	+++	平均积分	-	+	++	+++	平均积分
正常	-	8	2	0	0	0.20 ± 0.42	8	2	0	0	0.20 ± 0.42
模型	-	0	2	4	4	2.20 ± 0.79	0	1	3	6	2.50 ± 0.71
肺络通	18	6	2	2	0	0.60 ± 0.84 <sup>2)</sup>	3	4	3	0	1.00 ± 0.82 <sup>2,3)</sup>
	9	4	5	1	0	0.70 ± 0.67 <sup>2)</sup>	1	4	4	1	1.50 ± 0.85 <sup>2)</sup>
强的松	2.04 × 10 <sup>-3</sup>	2	6	2	0	1.00 ± 0.67 <sup>2)</sup>	1	2	5	2	1.80 ± 0.92 <sup>1)</sup>

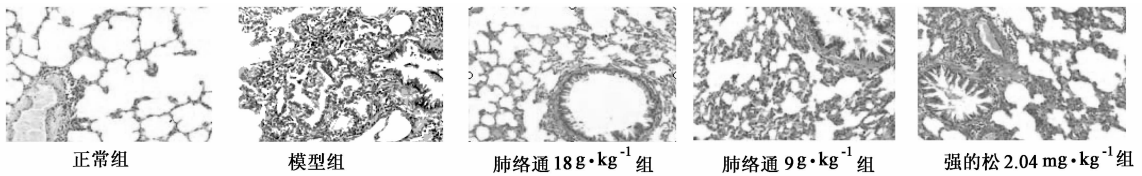


图1 各组肺组织56d病理形态学变化(HE, ×100)

**3.2 免疫组织化学指标** FN在正常组大鼠肺组织中含量少,主要分布于血管、支气管周围、肺泡间隔以及肺泡囊开口处,呈细纤维状。模型组较空白组FN明显增多( $P < 0.01$ ),尤以支气管周围、肺泡间隔更为严重。各治疗组FN含量均较空白组增多( $P < 0.01, P < 0.05$ ),较模型组明显减少( $P < 0.01$ ),高剂量组28d FN明显轻于强的松组( $P < 0.05$ ),见表3。

表3 各组FN含量图像分析测量(A)( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	28 d	56 d
正常	-	29.76 ± 4.31	39.57 ± 4.19
模型	-	272.11 ± 40.12	372.42 ± 47.78
肺络通	18	49.55 ± 6.57 <sup>2,3)</sup>	75.40 ± 8.51 <sup>2)</sup>
	9	67.45 ± 11.15 <sup>2)</sup>	90.91 ± 14.25 <sup>2)</sup>
强的松	2.04 × 10 <sup>-3</sup>	73.25 ± 11.11 <sup>2)</sup>	93.20 ± 12.12 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

博莱霉素复制的大鼠肺纤维化模型与人类肺纤

维化病相似<sup>[3]</sup>,已成为肺纤维化研究工作者普遍采用的动物模型。本实验结果表明,气管内注入BLM后,模型组大鼠光镜下见肺泡壁明显增厚,以单核巨噬细胞为主的炎性细胞浸润到肺泡腔及肺间质内,成纤维细胞增生,肺泡间隔和胸膜层胶原纤维明显增生,部分肺泡腔变小呈裂隙状,部分肺泡扩张成囊状,说明BLM复制的大鼠肺纤维化模型是成功的。

目前,西医治疗肺纤维化首选糖皮质激素,但仅对部分病人有效,而且,应用激素可引起严重的代谢紊乱、免疫抑制、继发感染等副作用<sup>[4]</sup>。近年来中医药防治肺纤维化显示出良好的前景,活血化瘀、补肺益肾、化痰通络等治法与方药证实对肺纤维化形成有预防和治疗效果<sup>[5]</sup>。作者认为肺纤维化属本虚标实之证,虚多属于肺肾气虚,实多属于痰瘀阻滞。据此,研究组经过长期的临床实践与药物筛选,拟定了肺络通合剂。方中用黄芪、冬虫夏草金水相生,补益肺肾之气;丹参、三七、地龙活血化瘀通络,炙麻黄、

瓜蒌化痰,止咳平喘,诸药相伍,具有补益肺肾,化痰祛痰的功效。本实验结果表明,肺纤维化大鼠经肺络通合剂治疗后,光镜观察结果显示,中药高剂量组 28,56 d 呈轻~中度肺纤维化改变,病变程度明显轻于模型组,强的松组 28,56 d 病变程度较模型组轻,但较中药高剂量组为重。说明肺络通合剂治疗肺纤维化的作用优于强的松。

FN 对间质细胞有趋化作用,促进成纤维细胞分裂、增殖。研究发现肺纤维化患者血浆 FN 含量并无明显变化,而肺泡灌洗液中 FN 的含量明显高于正常人。肺泡巨噬细胞和间质成纤维细胞 FNmRNA 及其蛋白的表达也明显增强。FN 能否直接促进肺成纤维细胞胶原的合成、分泌尚不清楚,在大鼠肺成纤维细胞的无血清培养液中加入 FN 结果显示,经 FN 作用后,肺成纤维细胞 I, III 型前胶原 mRNA 及蛋白的表达增强,说明 FN 可以促进 I、III 型前胶原的合成,这很可能是导致肺纤维化进行性加重的重要原因<sup>[6]</sup>。本实验结果表明,模型组动物病灶内 FN 的含量明显增多,其沉积部位与胶原沉积的部位相似。经肺络通合剂治疗后 FN 含量明显降低,强的松组 FN 含量也降低,但不如中药高剂量组效果好。

据以上研究结果,作者认为肺络通合剂治疗肺纤维化具有明显疗效,其作用机制可能是通过补益

肺肾,化痰祛痰,以改善肺脏血液循环,清除有害物质,保护肺泡上皮细胞,改善炎症反应,抑制成纤维细胞的活化和增殖,阻抑肺纤维化的发展。本研究为肺络通合剂治疗肺纤维化临床进一步推广应用提供了科学的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 陈祥银,严仪昭,曾卫东,等. 丹参,川芎嗪及糖皮质激素对肺纤维化保护作用的实验观察[J]. 中华结核和呼吸杂志,1987,10:152.
- [2] Szaipil S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120:893.
- [3] Fireman E, Shahar I, Shoval S. Morphological and biochemical properties of alveolar fibroblasts in interstitial lung diseases [J]. Lung, 2001, 179(2):105.
- [4] 高晓方,崔社怀. 特发性肺纤维化的抗纤维化治疗研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(6): 366.
- [5] 崔青荣. 中医防治肺纤维化的研究进展[J]. 长春中医药大学学报,2009,25(2):295.
- [6] 吴浩,许祖德,张月娥,等. 纤维连接蛋白在大鼠肺纤维化中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(1):41.

[责任编辑 聂淑琴]

---

## 本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 [www. syfjxzz. com](http://www.syfjxzz.com) 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约。