

理肺化纤方对肺纤维化大鼠的防治作用 和对肺功能及血清、组织羟脯氨酸含量的影响

杨成林, 周语平*

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:以经方升降散为基础,加味组成理肺化纤方,研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用以及对肺纤维化大鼠肺功能及血清和组织羟脯氨酸含量的影响。方法:Wistar 大鼠 100 只,体重(200±20)g,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 20 只。模型组与各治疗组实验大鼠气管内注入博莱霉素 A5 复制肺纤维化模型,正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig、理肺化纤方治疗组给药剂量为 4.41 g·kg⁻¹·d⁻¹、强的松对照组给药剂量为 1.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹、强的松合理肺化纤方治疗组给等量的强的松和理肺化纤方水煎液 ig,实验分两批,分别于 7,28 d 末次给药后,采用 Anires2005 动物肺功能分析系统测试肺功能和样本碱水解法检测实验大鼠的血清和组织羟脯氨酸(Hyp)的含量。结果:肺组织病理学方法观察苏木精-伊红及 Masson 染色切片,观察显示造模成功,检测实验大鼠的肺功能用力肺活量(FVC)、最大呼出量(PEF)和第 0.25 s 用力呼出容积占用力肺活量百分比(FEV 0.25/FVC%)、最大通气量(MVV)等指标表明各治疗组与模型组对比肺功能和血清及组织 Hyp 含量均有显著改善,以中西药结合组效果更为明显。结论:理肺化纤方能明显改善肺纤维化大鼠的肺功能和降低血清及组织 Hyp 含量,尤其在加用激素强的松治疗时能明显减轻肺纤维化大鼠的肺纤维化程度。

[关键词] 理肺化纤方;肺纤维化;肺功能;羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0194-05

Prevention and Treatment of Pulmonary Fibrosis by Lifei Huaxian Prescription and its Influence on Lung Function and Content of Hydroxyproline

YANG Cheng-lin, ZHOU Yu-ping*

(Gansu College of Traditional Chinese medicine, Lanzhou 730000, China)

[收稿日期] 20101209(003)

[基金项目] 甘肃省卫生厅中医药科研项目(甘科鉴字[2009]043号)

[第一作者] 杨成林, Tel:15117078625, E-mail:503282482@qq.com

[通讯作者] *周语平, Tel:0931-8765600, E-mail:zypjwc@163.com

- [5] Bonnardel-Phu E, Wantier J L, Vicaut E, et al. Advanced glycation end products are involved in microvascular permeability changes observed in microcirculation of diabetic rats *in vivo* [J]. J Mal Vasc, 2000, 25(2):122.
- [6] Amano S, Kaji Y, Oshika T, et al. Advanced glycation end products in human optic nerve head [J]. Br J Ophthalmol, 2001, 85(1):52.
- [7] Fridman E A. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications [J]. Diabetes Care, 1999, 22(suppl 2): B65.
- [8] 刘立群. 2 型糖尿病合并脑血管病与脂代谢紊乱的关系 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2006, 8(14):655.
- [9] 马博清, 魏立明, 霍丽梅, 等. 2 型糖尿病的血脂代谢异常 [J]. 中华临床医药, 2002, 13(3):36.
- [10] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 11 版. 北京:人民卫生出版社, 2004:952.
- [11] 陆筱云, 练向阳, 王敏. 糖尿病患者血液流变学改变与分析 [J]. 重庆医学, 2006, 35(2):162.
- [12] 梁煜, 胡勇. 糖尿病及其并发症辨证论治体会 [J]. 陕西中医, 2008, 29(6):768.
- [13] 梁煜, 胡勇. 中药复方治疗糖尿病及其慢性并发症用药规律探讨 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(12):87.

[责任编辑 聂淑琴]

[**Abstract**] **Objective:** To study prevention and treatment of pulmonary fibrosis by Lifei Huaxian prescription (LHP), a formulated prescription based on traditional prescription Shengjiang San. And to investigate its influence on pulmonary function and the content of hydroxyproline in serum and in tissue. **Method:** One hundred Wistar rats (half male and half female), weighing (200 ± 20) g, were randomly divided into 5 groups evenly (20 in each). Model of pulmonary fibrosis was established by injection of amphotericin A5 in the airway. Normal controls and model group were given the same volume of physiological saline. The dosage of LHP was $4.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, prednisone dosage was $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, prednisone + LHP treatment group was given the same amount of prednisone and LHP. The experiment lasted for 7, 28 d. Afterwards, animal lung function was analyzed and the serum and lung tissue hydroxyproline content was determined. Pathological method was used for morphological observation with sappanwood fine-Iraq red and Masson dyeing slice. **Result:** The lung tissue morphology showed that the model establishment was successful. The lung function of forced vital capacity (FVC), largest exhaled quantity (PEF) and the first 0.25 s hard exhaled volume percentage of forced vital capacity (FEV 0.25/FVC%), maximum volume (MVV) were investigated. Testss showed that the treatment group and model group had significant differences in lung function and serum and tissue hydroxyproline content. They were significantly improved by the combination of LHP and prednisone. **Conclusion:** Lifei Huaxian prescription can significantly improve pulmonary fibrosis and lung function in rats with pulmonary fibrosis, and reduce serum and tissue hydroxyproline content, especially when applied with prednisone treatment.

[**Key words**] Lifei Huaxian prescription, pulmonary fibrosis, lung function, hydroxyproline

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是多种病因不同的肺间质疾病发展到晚期的共同病理变化,其发生发展是以肺泡及间质性肺炎,肺泡上皮受损及胶原异常聚集为特征,主要症状为进行性呼吸困难,最终导致呼吸衰竭而死亡。PF疾病包砂肺、风湿肺、结节病、药物、聚氯乙烯和放射线等导致的纤维化^[1],也是多种肺疾病发展到晚期的共同病理变化,对人类生命健康危害极大。

本课题在研究历代文献和总结多年临床实践的基础上,在经方升降散(僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄)的基础上加味组成理肺化纤方,具有宣肃肺气,利湿化浊,活血通络的功效。临床已初步证实理肺化纤方具有抗肺纤维化的疗效,为进一步探讨其防治肺纤维大鼠的作用机制,我们选择肺功能和血清、组织羟脯氨酸含量等指标研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级3~4月龄Wistar大鼠,雌雄各半,体重 (200 ± 20) g,由甘肃中医学院SPF实验中心提供,动物合格证SCXK(甘)2004-0006,动物实验设施使用证SYXK(甘)2004-0006。动物在SPF条件下,普通饲料喂养,自由饮水。每周称体重,观察食量、尿量及精神状态。

1.2 药物 理肺化纤方由(僵蚕6g,蝉蜕3g,姜黄9g,大黄9g,葶苈子9g,白芥子6g)组成,每日1剂,共28剂。所用药物由甘肃中医学院附院提供,在甘肃中医学院实验中心进行中药提取,理肺化纤方加水1000mL浸泡30min后煮沸30min滤过取汁,再加水1000mL煮30min滤过取汁,合并2次药液,水浴浓缩成含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,高压灭菌后消毒分装,4℃冰箱保存备用。博莱霉素(哈尔滨博莱霉素制药有限公司,批号090903);强的松片(湛江仙璐制药股份有限公司,批号090681);0.9%生理盐水注射液(兰州制药厂,批号0906201220);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号090822)。

1.3 试剂 羟脯氨酸(Hyp)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20091225)。

1.4 仪器 离心机(XYJ-80-2 金坛市恒丰仪器厂),双目生物显微镜(XS-212-202,江南光学仪器厂),紫外分光光度计(UV-2401PC,日本岛津光学仪器科技有限公司),肺功能测试仪(Anires2005 动物肺功能分析系统,北京贝兰博科技有限公司)。

2 方法

2.1 造模分组 Wistar大鼠100只,适应性喂养1周,体重 (200 ± 20) g,雌雄各半,随机分为5组:正常对照组、模型组、理肺化纤方治疗组、强的松对照组、

理肺化纤方合强的松治疗组, 每组 20 只。实验大鼠 3% 戊巴比妥钠 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后, 无菌操作下行颈部正中切口, 暴露气管。模型组与治疗组气管内注入博来霉素 A5 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 水溶液 $0.2 \sim 0.3 \text{ mL}$, 正常对照组注入等量生理盐水, 注药完将大鼠直立旋转 30 s, 尽量使药液在肺内均匀分布, 然后缝合切口。

2.2 给药 造模第 2 日, 按人与大鼠体表面积公式计算出大鼠每天每千克体重的给药量^[2]。强的松对照组用强的松 ig, 给药剂量为 $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。理肺化纤方治疗组用理肺化纤方水煎液为 $4.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 再核算成溶液 ig; 强的松加理肺化纤方治疗组, 给强的松 $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和理肺化纤方为 $4.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig, 各组分别连续给药 28 d。

2.3 标本采集 各组分别于第 7, 28 天末次给药后 2 h, 以 3% 的戊巴比妥钠进行麻醉大鼠并进行气管插管, 气管插管的另一端连接到肺功能测试机, 采用肺功能测试仪和计算机分析系统测试肺功能的各项指标。然后采用股动脉放血法处死法, 采集动脉血, 静置 2 h 后, 离心机离心 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 提取上清液, 置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 供测血清 Hyp 用。准确称取右肺下叶组织 80 mg, 置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 供测肺组织羟脯氨酸用。右肺中叶经 4% 多聚甲醛固定, 进行苏木精-伊红 (HE) 染色、Masson 三色染色及免疫组化染色。

2.4 主要观察指标及方法 ①一般情况观察; ②肺组织病理学观察: 利用苏木精-伊红及 Masson 三色染色切片在光学显微镜下观察各组肺纤维化的程度; ③肺功能测试采用肺功能测试仪, 检测肺功能的各项指标, 包括用力肺活量 (FVC)、最大呼出量 (PEF) 和第 0.25 s 用力呼出容积占用力肺活量百分比 (FEV_{0.25}/FVC%)、最大通气量 (MVV); ④采用样本碱水解法分别检测实验大鼠的血清和组织 Hyp 的含量。

2.5 统计处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计处理, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异的显著性分析采用单因素方差分析, 方差齐时采用 LSD 法检验, 方差不齐时采用 Tamhane 法检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 正常组体重增加明显, 喜活

动, 体格健壮, 毛发有光泽, 食欲旺盛, 至 28 d 全部存活; 模型组体重增加缓慢, 精神差, 活动少, 瘦弱, 毛发无光泽, 食少, 实验 7 d 中死亡 1 只, 实验 7 d ~ 28 d 中死亡 2 只。各药物治疗组一般情况观察介于正常组与模型组之间, 实验 7 d ~ 28 d 中各死亡 1 只。

3.2 肺组织病理学观察

3.2.1 HE 染色 正常对照组支气管腔内干净, 皱壁完整, 内膜完整, 外周间质狭窄, 肺泡壁薄; 模型组支气管腔有脱落的黏膜上皮, 局限性肌层增厚, 支气管外壁明显增厚; 理肺化纤方治疗组黏膜完整, 支气管增厚不明显, 大部分肺泡壁增厚; 强的松对照组支气管黏膜完整, 管壁增厚不明显, 大部分肺泡壁增厚; 理肺化纤方合强的松治疗组支气管黏膜完整, 管壁增厚不明显, 部分肺泡壁增厚。见图 1。

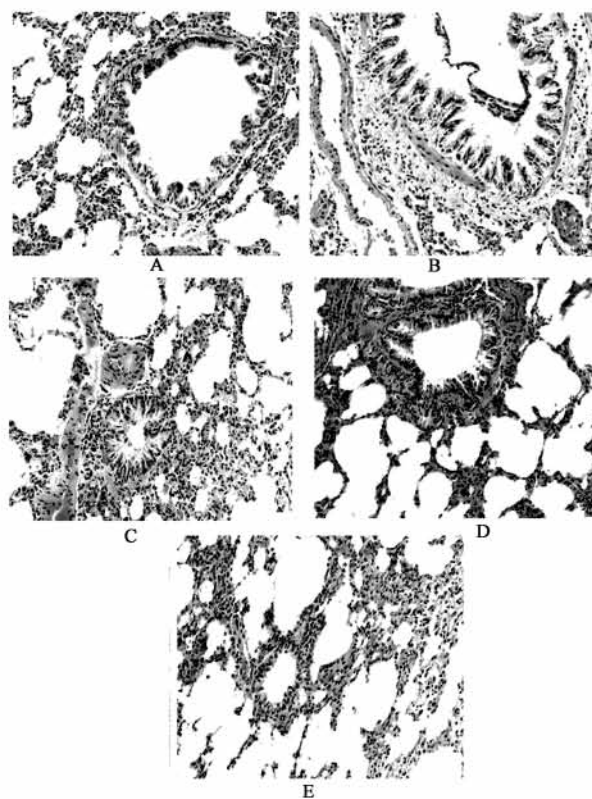


图 1 各组大鼠实验 7 d 肺组织病理切片对比 (HE 染色, $\times 20$)

A. 正常对照组; B. 模型组; C. 理肺化纤方
 $4.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组; D. 强的松 $1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
对照组; E. 理肺化纤方 ($4.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
加强的松 ($1.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗组

3.2.2 Masson 染色 正常对照组血管壁、支气管壁有少量的胶原纤维组织, 肺泡和肺间质部分没有胶

原纤维组织;模型组可见支气管壁、肺间质大量胶原纤维明显增生;理肺化纤方治疗组血管壁、肺泡壁仅有少量的胶原纤维增生,纤维化程度较模型组明显减少,提示治疗有效;强的松对照组血管壁、有小量胶原纤维增生,纤维化程度较模型组明显减少,提示治疗有效;理肺化纤方合强的松治疗组血管壁,肺泡壁仅有极少量的胶原纤维增生,提示中药合强的松组疗效最好。

3.3 各组大鼠实验 7 d 肺功能测定 结果见表 1。实验 7 d 各组与正常组比较,各项肺功能指标均有显著差异($P < 0.01$);与模型组比较,除强的松对照组的 MVV 与模型组无显著差异外,包括各药物治疗组各项肺功能指标均与模型组有显著差异($P <$

$0.05, P < 0.01$)。

3.4 各组大鼠实验 28 d 肺功能测定 结果见表 2。实验 28 d,理肺化纤方治疗后肺功能各项指标明显改善,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),大鼠的 FVC 增加,FEV 0.25/FVC % 比值下降,PEF 上升,MVV 增加。

3.5 各组大鼠血清、组织 Hyp 含量变化比较 见表 3。实验 7,28 d 各药物组血清及肺组织 Hyp 含量均有明显下降,与模型组比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。实验 28 d 理肺化纤方组血清 Hyp 含量低于强的松对照组($P < 0.01$);理肺化纤方含强的松组血清及肺组织 Hyp 含量低于强的松对照组($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠实验 7 d 肺功能测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	FVC/mL	FEV 0.25/FVC%	PEF/mL·s ⁻¹	MVV/mL·min ⁻¹
正常对照	-	10	6.36 ± 0.53	61.72 ± 5.63	27.03 ± 1.88	130.86 ± 12.63
模型	-	9	3.43 ± 0.68 ²⁾	89.94 ± 6.41 ²⁾	15.73 ± 2.29 ²⁾	92.13 ± 12.22 ²⁾
理肺化纤方	4410	10	4.70 ± 0.41 ^{2,4)}	72.37 ± 6.23 ^{2,4)}	20.14 ± 2.11 ^{2,4)}	109.72 ± 9.29 ^{2,3)}
强的松对照	1.05	10	4.64 ± 0.55 ^{2,4)}	73.38 ± 5.82 ^{2,4)}	19.55 ± 1.79 ^{2,3)}	107.59 ± 11.04 ²⁾
理肺化纤 + 强的松	4410 + 1.05	10	4.77 ± 0.58 ^{2,4)}	70.47 ± 5.22 ^{2,4)}	21.02 ± 1.71 ^{2,4)}	115.55 ± 9.73 ^{2,4)}

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与强的松对照组比⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)

表 2 各组大鼠实验 28 d 肺功能测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	FVC/mL	FEV 0.25/FVC%	PEF/mL·s ⁻¹	MVV/mL·min ⁻¹
正常对照	-	10	6.48 ± 0.41	64.72 ± 5.54	28.61 ± 1.39	133.88 ± 12.29
模型	-	8	3.50 ± 0.51 ²⁾	92.60 ± 7.74 ²⁾	13.71 ± 1.80 ²⁾	91.02 ± 12.80 ²⁾
理肺化纤方	4410	9	5.13 ± 0.57 ^{2,4)}	71.82 ± 7.15 ⁴⁾	22.07 ± 2.67 ^{2,4)}	117.70 ± 11.74 ⁴⁾
强的松对照	1.05	9	4.95 ± 0.43 ^{2,4)}	73.36 ± 6.24 ^{1,4)}	20.62 ± 1.92 ^{2,4)}	109.82 ± 8.09 ^{2,4)}
理肺化纤 + 强的松	4410 + 1.05	9	5.51 ± 0.50 ^{2,4,5)}	69.47 ± 3.09 ⁴⁾	23.55 ± 1.67 ^{2,4,5)}	121.84 ± 8.55 ^{4,5)}

表 3 各组大鼠血清、组织 Hyp 含量 ($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 /mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	实验 7 d			实验 28 d		
		n	血清 Hyp /mg·L ⁻¹	组织 Hyp /mg·g ⁻¹	n	血清 Hyp /mg·L ⁻¹	组织 Hyp /mg·g ⁻¹
正常对照	-	10	22.37 ± 4.55	456.3 ± 66.49	10	23.03 ± 3.22	464.5 ± 69.93
模型	-	9	40.51 ± 7.05 ²⁾	743.5 ± 97.72 ²⁾	8	63.40 ± 8.04 ²⁾	1119.3 ± 89.51 ²⁾
理肺化纤方	4410	10	33.84 ± 4.13 ^{2,4)}	615.6 ± 75.32 ^{2,4)}	9	41.02 ± 4.77 ^{2,4,6)}	778.1 ± 85.89 ^{2,4)}
强的松对照	1.05	10	34.49 ± 2.86 ^{2,3)}	649.0 ± 145.08 ^{2,3)}	9	50.46 ± 4.56 ^{2,4)}	879.6 ± 89.07 ^{2,4)}
理肺化纤 + 强的松	4410 + 1.05	10	30.07 ± 6.19 ^{2,4,6)}	579.0 ± 51.95 ^{2,4)}	9	37.31 ± 6.41 ^{2,4,6)}	760.7 ± 80.86 ^{2,4,5)}

4 讨论

理肺化纤方由温病学的经典名方升降散(僵蚕、

蝉蜕、姜黄、大黄)的基础上加葶苈子、白芥子组成,升降散源自清代杨栗山所著《伤寒瘟疫条辨》一书,

该方由白僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄 4 味药组成,僵蚕祛风除湿,清热解郁;蝉蜕祛风胜湿,涤热解毒;姜黄行气解郁;大黄上下通行。全方取僵蚕、蝉蜕之气分药升阳中之清阳,取姜黄、大黄之血分药降浊中之浊阴,寒热并用,升降同施,表里双解,以行升清降浊、宣郁散邪、活血通络之功^[3]。原方中加入白芥子归肺经,具有温肺豁痰利气,散结通络止痛。葶苈子归肺、膀胱经,功能泻肺平喘,行水消肿。全方各药,相得益彰,共奏宣肃肺气,利湿化浊,活血通络之功效。

本实验采用肺功能测试仪检测肺功能的各项指标,其中用力肺活量(forced vital capacity, FVC)是指深吸气至肺总量位后以最大力量、最快的速度所能呼出的全部气量。第 0.25 s 用力呼出容积(Fev0.25)是指最大吸气至肺总量位后,开始呼气第 0.25 s 内的呼出气量、Fev0.25/FVC% 是指最大呼出量(PEF)和第 0.25 s 用力呼出容积占用力肺活量百分比,它的临床意义是测定呼吸道有无阻力的重要指标。最大呼气流量(peak expiratory flow, PEF)是指用力肺活量测定过程中,呼气流速最快时的瞬间流速,主要反映呼吸肌的力量及气道有无阻塞。最大自主通气量(maximal voluntary ventilation, MVV)是指在 1 min 内以最大的呼吸幅度和最快的呼吸频率呼吸所得的通气量,可用于评估肺组织弹性、气道阻力、胸廓弹性和呼吸机的力量,临床常用作通气功能障碍、通气功能储备能力考核的指标^[4]。实验结果表明,理肺化纤方组可有效改善肺纤维化后异常的肺功能,理肺化纤方治疗后,肺功能各项指标明显好转,与模型组比较有显著性差异($P < 0.01$, $P <$

0.05),其可通过改善肺功能而对肺纤维化具有一定的治疗作用。

Hyp 是组成机体胶原蛋白的一种特有氨基酸,除弹性蛋白含有少量 Hyp(约 1%)外,几乎所有 Hyp 都存在于胶原中。因此羟脯氨酸含量的测定已成为研究组织胶原代谢的重要方法。胶原是器官纤维化时 ECM 的主要成分,所以组织中 Hyp 含量能反应器官纤维化的程度^[1]。实验结果提示,理肺化纤方组的血清及组织 Hyp 与模型组比较均有显著性差异($P < 0.01$),实验 28 d 理肺化纤方组血清 Hyp 低于强的松对照组($P < 0.01$),实验 28 d 中药合强的松治疗组血清及组织 Hyp 均明显低于强的松对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$),疗效更为明显。

综合以上分析和 HE 和 Masson 染色切片对比,理肺化纤方能够改善肺纤维化大鼠的肺功能和降低血清及组织 Hyp 含量,尤其在加用激素强的松治疗时能够明显减轻肺纤维化大鼠的肺纤维化程度。

[参考文献]

- [1] 李才. 器官纤维化基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:188.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:203.
- [3] 赵进喜, 张金宝, 吴书君, 等. 温病学与中医现代临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007:231.
- [4] 陈文彬, 潘祥林, 康熙熊, 等. 诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:555.

[责任编辑 聂淑琴]