

参芪补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气虚证大鼠肺细胞外基质的影响

张培琴*, 张葵, 刘瑶, 陈昱江

(贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:观察参芪补肺汤对慢性阻塞性肺疾病(COPD)肺气虚证大鼠肺细胞外基胶原和纤维连接蛋白(FN)的影响。方法:用烟、SO₂定量熏吸并复合木瓜蛋白酶雾化吸入法,建立 COPD 肺气虚证大鼠模型;60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、参芪补肺汤高、中、低剂量组、激素组;肺 Masson 染色观察胶原纤维的分布情况;放射免疫法检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中 FN 的含量。结果:与正常组比较,模型组支气管肺组织单位面积内胶原面积和积分吸光度(IA)显著增加($P \leq 0.01$);BALF 中 FN 的含量显著增加($P < 0.01$)。经治疗后,与模型组比较,参芪补肺汤高、中剂量组胶原面积和积分吸光度(IA)显著降低($P < 0.05$);FN 含量显著减少($P < 0.01$)。结论:参芪补肺汤可能通过抑制 COPD 肺气虚证大鼠肺细胞外基质的过度沉积,而对阻止 COPD 气道重构有一定作用。

[关键词] 参芪补肺汤;慢性阻塞性肺疾病;肺气虚证;胶原;纤维连接蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0168-03

Effects of Shenqi Bufe Tang on Bronchus Tissue Conformation and Lung Function of Chronic Opstructive Pulmonary Disease Rat Model with Lung-qi Deficiency Syndrome

ZHANG Pei-qin, ZHANG Kui, LIU Yao, CHEN Yu-jiang

(Fist Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Shenqi Bufe Tang on collagen deposition and fibronectin (FN) of COPD rat model with lung-qi deficiency syndrome. **Method:** COPD rat model with lung-qi deficiency syndrome was established by quantitative stimulation with tobacco, SO₂ and papain. Sixty male rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, low dose treatment group, medium dose treatment group, high dose treatment group, and glucocorticoid treatment group. Collagen deposition in Masson stained slides was observed under light microscope and expression of collagen was determined by computer image analyzer. The contents of FN in the BALF were tested by radioimmunoassay. **Result:** The expressions of collagen in small brouch and lung tissue and the contents of FN in the BALF of the model group were significantly higher than those of the normol group ($P < 0.01$). After treatment, the expressions of collagen and the contents of FN in the BALF in the high and middle dose group were remarkably decreased than those in the modle group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Shenqi Bufe Tang may inhibit the deposition of collagen and fibronectin, influence airway remodeling of COPD rat model with lung-qi deficiency syndrome.

[Key words] Shenqi Bufe Tang; chronic obstructive pulmonary disease; lung-qi deficiency syndrome; collagen; lung function; fibronectin

[收稿日期] 2010-06-07

[通讯作者] * 张培琴, 副主任药师. 研究方向: 中药学, Tel: 13809433744, E-mail: zky0696@126.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以不完全可逆性气流阻塞、气道慢性炎症和气道重构为特征的疾病。参芪补肺汤

从《永类铃方》中的补肺汤化裁而来,是治疗肺气虚证稳定期 COPD 患者的有效方剂。本研究拟通过观察参芪补肺汤对 COPD 肺气虚证大鼠肺细胞外基质的影响,探讨其抗 COPD 气道重构作用机制,为临床防治 COPD 提供药效学基础。

1 材料

1.1 药物和试剂 参芪补肺汤由黄芪 30 g, 党参 15 g, 补骨脂 15 g, 丹参 30 g, 百部 15 g, 桑白皮 30 g 组成, 贵阳中医学院一附院药剂科提供, 水煎 2 次浓缩为含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液; 吸入用布地奈德混悬液 (AstraZenec 公司生产, 批号 300229) $4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$; 木瓜蛋白酶, Sigma 公司产品 (批号 900173); 均购自贵阳医学院附属医院。

1.2 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 180 ~ 200 g, 购自重庆腾鑫生物技术有限公司合格证号 0052543。动物饲养室为清洁级。

1.3 仪器 超声雾化器, 德国白瑞公司; 自制透明塑料箱 $40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$; BX51 显微镜, 日本 Olympus。

2 方法

2.1 动物造模 采用《中医实验动物学》之“肺气虚证动物模型”复制法^[1], 并复合木瓜蛋白酶雾化吸入法^[2]复制“肺气虚证”稳定期 COPD 大鼠模型。用刨花、锯末、烟叶各 30 ~ 50 g, 另加 SO_2 粉 10 g, 点燃烟熏, 模型大鼠暴露于烟雾浓度 300×10^{-6} 的烟室中, 每日 2 次, 每次 1 h, 并于造模开始后第 30, 32, 34, 36 天将超声波雾化器与 $40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$ 透明塑料箱相连, 通过雾化管向箱中模型大鼠吸入浓度为 0.3% 的木瓜蛋白酶, 每 5 只大鼠 2 mL。造模期 60 d。

2.2 分组与给药方法 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 每组 10 只。正常组: 置于正常无烟环境中饲养, 不予处理。模型组: 生理盐水 $\text{ig } 10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 参高组: 给参芪补肺汤 $\text{ig } 3.52 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 参中组: 给参芪补肺汤 $\text{ig } 1.76 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 参低组: 给参芪补肺汤 $\text{ig } 0.88 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于成人常规临床用量等效量), 除正常组外, 给药同时均同时雾化吸入生理盐水 $4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$; 激素组: 雾化吸入布地奈德 $4 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$, 同时 ig 生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 均造模结束后开始给药, 1 次/d, 共 30 d。

2.3 观察及检测指标

2.3.1 一般情况 观测大鼠的活动度、对外界反应

的灵敏度、皮毛光泽、饮食、饮水、体重、死亡情况。

2.3.2 纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 测定 获取支气管肺泡灌洗液 (BALF), 采用放射免疫分析法测定 BALF 中的 FN 含量变化。

2.3.3 肺 MASSON 染色观察胶原纤维 大鼠处死后, 取左肺上叶置 10% 福尔马林中固定, 常规制片, MASSON 染色。光学显微镜下观察组织形态学改变和胶原纤维的分布情况, 以图像分析软件分析并测量各组大鼠肺组织单位面积内胶原纤维面积和积分吸光度 (IA), 以代表胶原纤维含量的变化。

2.4 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS15.0 软件, 多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 一般情况 正常组动物状态良好。模型组逐渐活动量减少, 不活泼, 拱背蜷卧, 毛发稀疏, 竖毛, 无光泽, 食量减少, 行动迟缓, 体弱瘦小, 从第 20 天起开始咳嗽喷嚏频作, 后期呼吸加深急促; 给药组介于空白组与模型组之间。

3.2 支气管肺组织形态学及胶原分布 光镜下肺组织中的胶原呈蓝色。正常组肺、支气管结构正常, 支气管壁、肺泡区有少量胶原表达。模型组小支气管上皮增生增厚, 部分上皮脱落, 管壁增生增厚, 支气管平滑肌不规则增厚, 小中支气管壁、肺泡隔、肺间质及血管壁周围胶原纤维明显增多, 以淋巴细胞为主的炎细胞侵及支气管壁各层及周围, 肺泡结构紊乱, 肺泡壁变薄或断裂, 肺泡弹性减弱, 呈囊状扩张, 肺泡腔扩大, 部分融合成肺大泡。参芪补肺高、中剂量组病理改变较模型组减轻, 其中高剂量组在炎症细胞浸润、杯状细胞增生、管壁增生增厚、肺泡融合等方面较中剂量组和激素组明显减轻, 参芪补肺高、中剂量组支气管肺组织胶原明显减少。见图 1。

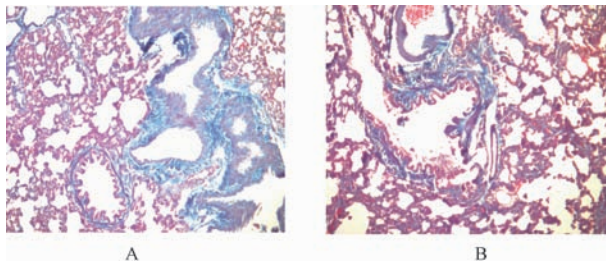


图 1 大鼠肺组织病理切片 (MASSON 染色, $\times 100$)

A. 模型组; B. 参芪补肺汤 $7.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

3.3 BALF 中 FN 含量测定 与正常组比较,模型组、参芪补肺汤高、中、低剂量组及激素组大鼠 BALF 中 FN 表达显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,参芪补肺汤高、中组 FN 表达显著减少($P < 0.01$),低剂量组和激素组减少不明显,差异无统计学意义。见表 1。

表 1 参芪补肺汤对大鼠 BALF 中 FN 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FN/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常	-	6.07 \pm 2.60 ²⁾
模型	-	20.70 \pm 1.95
参芪补肺	1.76	18.90 \pm 4.25
	3.52	15.17 \pm 2.97 ²⁾
	7.04	13.97 \pm 1.66 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.4 肺组织中胶原面积和吸光度测定 与正常组比较,模型组、参芪补肺汤高、中、低剂量组及激素组大鼠支气管肺组织单位面积内胶原面积和 IA 显著增加,差异均有统计学意义($P \leq 0.01$)。与模型组比较,参芪补肺汤高、中剂量组胶原纤维面积和 IA 显著减少, ($P < 0.05$),低剂量组和激素组减少不明显,差异无统计学意义。见表 2。

表 2 参芪补肺汤对大鼠肺组织单位面积内胶原面积和 IA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	胶原面积/%	IA
正常	-	2.84 \pm 2.20 ²⁾	0.16 \pm 0.17 ²⁾
模型	-	7.69 \pm 2.09	0.51 \pm 0.18
参芪补肺	1.76	7.39 \pm 2.06	0.52 \pm 0.16
	3.52	5.58 \pm 1.03 ^{1,2)}	0.36 \pm 0.19 ¹⁾
	7.04	5.64 \pm 1.17 ¹⁾	0.34 \pm 0.12 ¹⁾

4 讨论

本试验采用烟熏并复合木瓜蛋白酶雾化吸入法复制肺气虚证 COPD 模型大鼠。模型大鼠的症状符合肺气虚证的表现^[3],病理形态学符合 COPD 的病理改变^[4]说明模型是成功的。

目前认为 COPD 是具有不完全可逆性气流受限为特征的慢性气道炎症性疾病。气道重构(Remodelling)是 COPD 气流受限的主要原因^[5]和肺功能降低的直接原因。肺细胞外基质(ECM)过度沉积是气道重构的显著特点之一。目前认为气道重构和肺气肿的形成是 ECM 合成与降解失衡的结果。其中胶原蛋白和 FN 是气道 ECM 中的主要成分。本试验结

果显示,模型组大鼠,肺组织单位面积内胶原纤维面积和积分吸光度显著增加($P \leq 0.01$);BALF 中 FN 含量显著增加($P < 0.01$)。在模型组大鼠小气道管壁增厚的同时伴随支气管壁、肺泡隔、肺间质及血管壁周围胶原纤维明显增多和 FN 显著增加,说明 COPD 稳定期肺气虚证大鼠模型存在肺细胞外基质的过度沉积。可能由于肺细胞外基质的过度沉积造成支气管壁的增厚,而阻止 COPD 气道重构的发生。

中医认为肺气虚是 COPD 发生的首要条件,且始终贯穿 COPD 的整个病理过程,COPD 形成并持续发展会进一步加重肺气虚。现代中医研究认为肺气虚的初期表现就是开始出现小气道功能减损,此时肺通气功能减退是可逆的,随着肺气虚的加重,发展成不可逆通气功能障碍,病情加重^[6]。肺气虚还可导致痰瘀的生成,痰瘀的生成又可带来 COPD 气道结构等的病理改变,导致气机失常,阻碍肺气宣发肃降之功,加重肺通气功能障碍。因此重视 COPD 肺气虚证的治疗尤为重要。参芪补肺汤由黄芪、党参、补骨脂、丹参、百部、桑白皮组成。诸药合用共奏益气补肺兼化痰活血之功。本实验结果表明,与模型组比较,参高组、参中组肺组织单位面积内胶原纤维面积和积分吸光度显著减少($P < 0.05$);BALF 中 FN 含量显著减少($P < 0.01$)。说明中药可以减少肺组织中胶原蛋白和 FN 产生。提示中药可能通过抑制肺细胞外基质的过度沉积,对阻止 COPD 气道重构有一定作用。

[参考文献]

- [1] 邹移海,黄韧,连至诚,等,中医实验动物学[M].广州:暨南大学出版社,1999:160.
- [2] 韩春生,张洪春,杨道文,等,中医虚喘动物模型的建立[J].北京中医药大学学报,1999,22(1):47.
- [3] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行)[M].北京:中国医药科技出版社,2002:36.
- [4] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J].中华结核和呼吸杂志,2007,30(1):8.
- [5] Nagase H. Activation mechanisms of metalloproteinase [J]. Biol Chem,1997,378:151.
- [6] 彭波,李泽庚.中医药治疗肺气虚证述评[J].辽宁中医学院学报,2003,5(4):340.

[责任编辑 何伟]