

肺纤方对放射性肺损伤大鼠 模型影响的初步实验研究

胡作为^{*}, 郭志伟, 李林, 唐婷婷, 明国联, 蔡煜
(武汉市中西医结合医院肿瘤科, 武汉 430022)

[摘要] 目的: 观察中药肺纤方防治放射性肺损伤模型大鼠的疗效和对血清内生长转化因子-1(TGF-1)、肺组织羟脯氨酸(HPY)的影响, 探讨其相关机制。方法: 60只SD雌性大鼠随机分为4组, 正常组、放射(模型)组、肺纤方组和地塞米松组。造模动物麻醉后用直线加速器单次照射右背20GY, 照射次日开始给药, 至56d后处死。观察大鼠死亡、体重和肺系数; 病理组织学做肺泡炎及肺纤维化镜下评分; 用ELISA法检测血清内TGF-1水平; 碱水解法测定羟脯氨酸含量等指标。结果: 肺纤方组可明确地降低肺损伤的程度, 且有降低TGF-1和HPY的作用, 与放射组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论: 肺纤方治疗放射性肺损伤有较好的疗效, 其作用机理与降低TGF-1的水平、减少肺组织HPY的合成有关。

[关键词] 肺纤方; 放射性肺损伤; 生长转化因子-1; 羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0088-03

放射性肺损伤(radiation-induced pulmonary injury, RPI)是胸部肿瘤(肺癌、乳腺癌、食管癌等)放射治疗和骨髓移植后的常见并发症, 实质是肺组织受到射线引起的炎性损伤后, 受各种细胞因子的介导而导致胶原纤维的合成与降解失衡, 并引起胶原过度沉积及各型胶原排列、分布及含量的改变, 从而使肺实质被胶原纤维组织取代的过程^[1]。国内外许多研究证明抑制转化生长因子(TGF-1)的生成可以缓解症状并改善肺纤维化的程度。近年来, 中医药在防治肺纤维化方面取得了一定进展。本实验旨在通过观察照射后大鼠肺组织TGF-1的表达及羟脯氨酸(HYP)含量的影响, 探讨自拟中药肺纤方早期防治放射性肺损伤的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物 60只8周龄健康SD雌性大鼠, 体重(230±20)g(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。在清洁动物房常规饲养3d, 观察无异常入实验计划组。

1.2 药物 肺纤方由沙参20g, 百合20g, 石斛20g, 紫菀20g, 枇杷叶30g, 杏仁20g, 百部20g, 当归

20g, 按文献方法常规水煎后, 在压力真空度0.097MPa、温度50~60℃条件下, 减压浓缩, 制成浓度2g·mL⁻¹的溶液, 高压灭菌冰箱4℃保存; 地塞米松片75mg/片, 由天津力生制药股份有限公司生产, 批号03050860, 用生理盐水溶解制成相应浓度溶液2mL。

1.3 主要仪器和试剂 6MV-X直线加速器(德国西子公司); 紫外分光光度计(上海仪器三厂); 酶标仪(北京市六一仪器厂); TGF-1酶联免疫吸附试剂盒(公司产品); HYP羟脯氨酸测试盒(南京建成生物工程研究所)。

2 方法

2.1 模型建立 根据文献及预实验结果, 单次照射20GY更符合实验预期计划。以10%的水合氯醛腹腔麻醉后鼠板固定, 模拟机下定位, 照射视野为2cm×3cm, 置2cm厚铅块屏蔽大鼠左胸后, 行直线加速器6MV-X线照射右背, 吸收剂量单次右胸20GY, 吸收剂量率200CGy/min, 距离1m。正常对照组大鼠同时进行相同麻醉, 不进行照射。

2.2 动物分组及给药方法 随机分为4组: 正常组、放射组、中药组和地塞米松组, 对照组12只, 其余每组16只。照射次日开始给药。中药组ig肺纤方40生药g·kg⁻¹(成人用量200生药g/d的10倍), 地塞米松组ig地塞米松25mg·kg⁻¹(成人用量的5倍)。正常组和放射组按2mL/100g生理盐

[收稿日期] 2009-05-12

[基金项目] 武汉市卫生局资助项目 武卫[2005]294号

[通讯作者] * 胡作为, Tel: (027) 85332248; E-mail: huzuowei@sohu.com

水。

2.3 标本处理 各组每周称体重直至实验结束, 56 d 后处死动物。由腹主动脉采血 5 mL, 于 4 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 分离血清, -70 ℃ 保存, 供测 TGF-1 含量用。并取左肺组织, 称量肺组织, 求肺系数 = 肺重 (mg) / 体重 (g)。取右肺经 4% 多聚甲醛固定, HE 染色, Masson 三色染色; 取右肺组织在液氮中保存供测 HYP 用。

2.4 观察项目及检测方法

2.4.1 病理学观察 依照 Szapiel^[2] 法在光镜下确定肺泡炎和肺纤维化的程度: 0 级: 无肺泡炎; 1 级: 轻度肺泡炎, 病变区域 < 全肺的 20%, 肺泡结构正常; 2 级: 中度肺泡炎受累面积占全肺的 20% ~ 50%; 3 级: 弥漫性肺泡炎; 病变范围 > 50%。分别以 0、1、2、3 分表示。

2.4.2 血清 TGF-1 含量检测 ELISA 法检测按试剂盒说明进行。

2.4.3 肺组织 HPY 含量测定 取各大鼠右肺叶组织 50 mg 湿重样本碱水解法检测, 按试剂盒说明进行。

2.5 统计学方法 采用 SPSS13.00 统计软件, 数据用 (̄x±s) 表示, 多组两两比较用方差分析, 以 P < 0.05 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 各组大鼠存活数、体重和肺系数的比较 见表 1。正常组体重增加明显, 至 56 d 均存活; 放射组体重逐渐减少, 反应迟钝, 活动少, 食欲减低明显, 体毛晦暗, 死亡 8 只, 存活 8 只。与模型组组比, 肺纤方组和地塞米松组实验结束时体重明显增加。肺系数明显下降 (P < 0.01)。

表 1 各组大鼠存活数、体重和肺系数的比较 (̄x±s)

组别	存活数	体重 / g (药前)	体重 / g (药后)	肺系数 (mg · g ⁻¹)
正常组	12	237 ± 0.39	256 ± 0.69 ²⁾	2.28 ± 0.09 ²⁾
模型组	8	241 ± 0.45	212 ± 0.47	4.92 ± 0.14
肺纤方组	14	235 ± 0.19	245 ± 0.51 ²⁾	3.09 ± 0.12 ²⁾
地塞米松组	11	236 ± 0.23	239 ± 0.64 ²⁾	3.87 ± 0.15 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01 (下同)

3.2 各组大鼠肺组织病理形态学变化

3.2.1 肺组织形态学变化 大体肉眼观察: 正常组双肺表面光滑, 呈粉红色, 质地均匀; 放射组表面凹凸不平, 呈暗红色, 边缘有少量散在出血点, 部分

肺叶呈苍白色, 体积缩小, 硬度增加, 且表面有白色结节; 肺纤方组和地塞米松组部分暗红色, 部分肺叶表面光滑; 组织学光镜观察: 正常组结构正常, 偶见胶原纤维; 放射组可见肺泡间隔明显增厚, 局部炎细胞浸润, 肺泡腔腔变小, 肺泡壁结构破坏, 肺水肿明显, 局部肺实变, 有多发肺脓肿, 灶性纤维化形成, 分布不均, 肺泡炎与肺间质纤维化多为中重度; 肺纤方组肺泡间隔增厚程度减轻, 肺水肿、炎症细胞有所减少; 地塞米松组可见炎性细胞较少, 肺泡结构大致正常, 肺泡炎与肺纤维化多为轻度, 可见少量胶原纤维。见图 1。

3.2.2 各组大鼠肺泡炎评分的比较 见表 2。模型组肺泡炎评分较正常组明显增加 (P < 0.01), 肺纤方组和地塞米松组肺泡炎评分均明显低于模型组 (P < 0.05)。

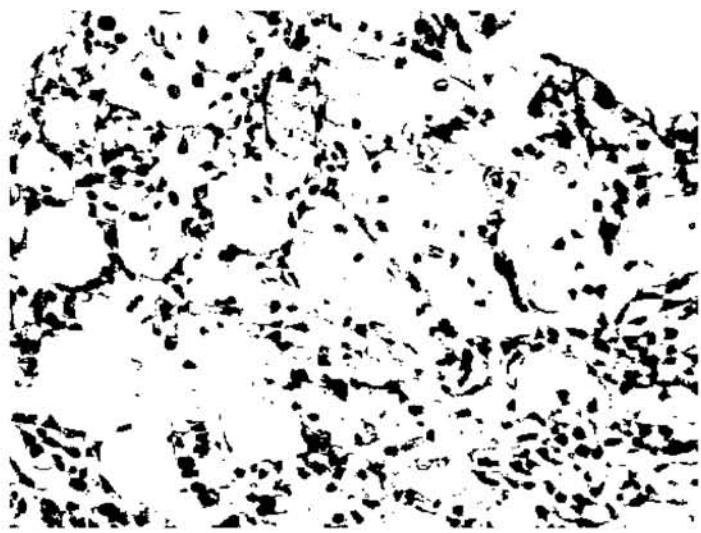
3.3 各组大鼠肺组织中的 HYP 和血清中的 TGF-1 含量比较 见表 2。模型组肺组织中的 HYP 含量达明显高于正常组 P < 0.01; 肺纤方组和地塞米松组均低于模型组, 差异均有显著性 (P < 0.01), 且中药组低于地塞米松组 (P < 0.05)。放射组血清中的 TGF-1 含量达明显高于正常组 (P < 0.01); 肺纤方组和地塞米松组均低于放射组, 差异均有有显著性 (P < 0.01), 且肺纤方组低于地塞米松组 (P < 0.05)。

表 2 各组肺纤维化大鼠肺泡炎评分、肺组织 HYP 和血清中 TGF-1 含量比较

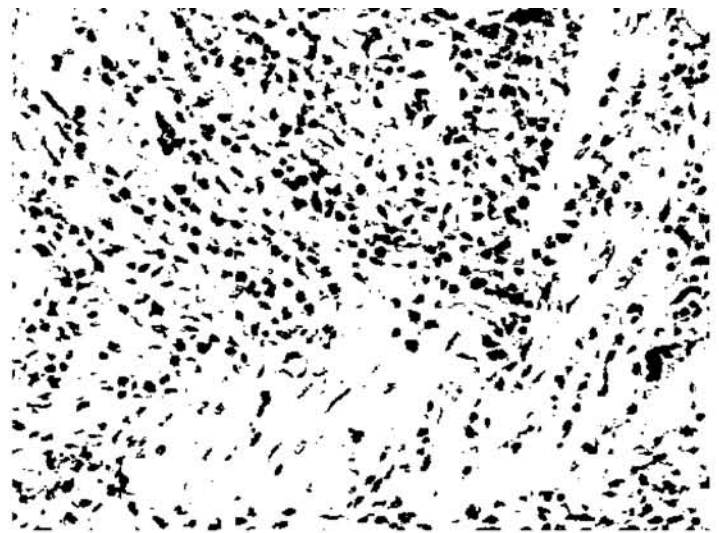
组别	n	肺泡炎 评分	HYP /(μg · L ⁻¹)	TGF-1 /(pg · mL ⁻¹)
对照组	12	0.72 ± 0.62 ²⁾	353.57 ± 27.38 ²⁾	141.12 ± 13.52 ²⁾
模型组	8	2.73 ± 0.64	638.92 ± 37.47	411.90 ± 17.67
肺纤方组	14	1.29 ± 0.76 ^{2,3)}	492.36 ± 17.45 ³⁾	194.34 ± 18.65 ^{2,3)}
地塞米松组	11	1.92 ± 0.58 ¹⁾	515.34 ± 29.39 ²⁾	237.45 ± 19.86 ²⁾

4 讨论

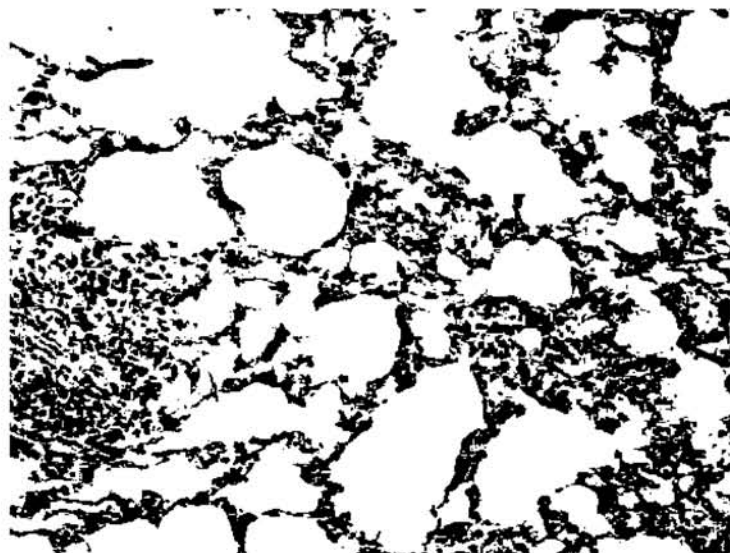
中医学者普遍认为 RPI (放射性肺损伤) 症状属于中医“肺痿”“喘证”范畴。在整体局部兼顾的原则下, 针对气阴两伤和肺燥咳喘的主证, 我们自拟中药肺纤方。经过 300 多例临床观察, 结果显示该方能明显改善放射性肺损伤的临床症状, 具有防治放射性肺损伤的作用^[3]。南沙参止咳润肺、养胃生津, 可提高机体免疫功能, 升高白细胞, 提高淋巴细胞转化率及 T、B 细胞值, 增强巨噬细胞功能, 延长抗体存在时间, 对放化疗后提高机体免疫力、抗感染治疗



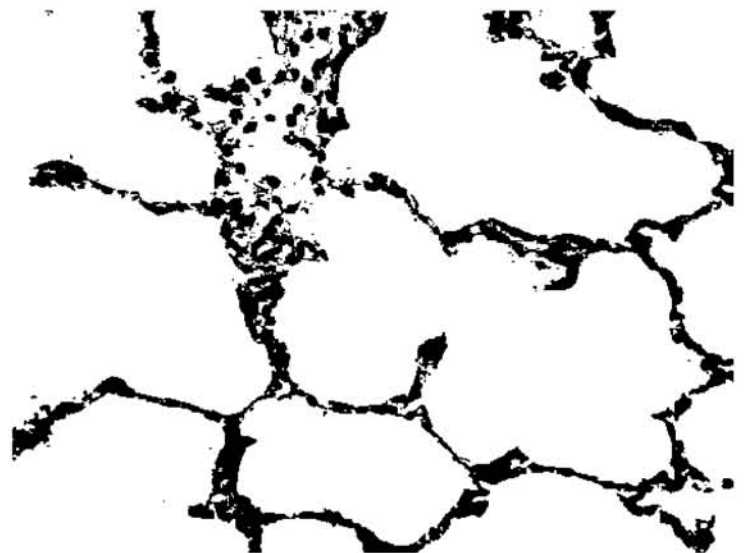
模型组 肺水肿明显, 局限性肺实变



模型组 肺泡炎和肺纤维化多为中重度



肺纤方组 肺水肿、炎症细胞有所减少



地塞米松组 肺泡炎症细胞大面积减少

图 1 肺组织病理切片(HE, ×200)

效果起积极的作用。百合宁心安神、润肺止咳, 尤适用于放化疗后气阴两虚的癌症患者。石斛润肺益肾、养胃除热, 百部润肺止咳, 杏仁宣肺祛痰、止咳定喘, 体外实验中证明它们对肿瘤细胞有抑制作用和抗噬菌体的作用。当归补血活血, 体外实验证实对肿瘤细胞有抑制作用, 当归水提取物可诱导干扰素产生活性而增强免疫作用, 尤以放化疗后血虚停滞、正气虚弱征象^[4]。

通过直线加速器复制的大鼠放射性肺损伤模型组有程度不等的肺泡炎和中到重度肺纤维化, 说明造模成功。肺纤方组大鼠的肺泡炎及纤维化程度较放射组明显减轻, 说明肺纤方对肺纤维化有一定的治疗作用。与模型组比较, 肺纤方组大鼠体重和肺系数、肺泡炎评分、肺组织 HYP 和血清中 TGF-1 含量均有明显的改善。在肺泡炎评分、肺组织 HPY 和血清 TGF-1 的改善方面, 肺纤方组优于地塞米松组。

从以上实验可以证明, 中药肺纤方能较好的改

善大鼠放射性肺组织中的 HPY 和 TGF-1 的含量, 而且死亡大鼠最少, 安全范围大, 是可靠的防治放射性肺损伤的经验方, 其作用机理值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Anscher MS, Vujaskovic Z. Mechanisms and potential targets for prevention and treat for normal tissue injury after radiation the rapy [J]. Sem in Oncol, 2005, 32: S86.
- [2] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. BLcomycin induced intersitial pulmonary diseases in the nude athymic mouse [J]. Am Rev Respire Dis, 1979, 120: 893.
- [3] 胡作为, 孙忠义. 中药肺纤方防治放射性肺损伤的临床疗效观察 [J]. 湖北中医杂志, 2005.
- [4] 宋明志, 刘鲁明. 于尔辛肝癌经验集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 105.