

不同治则对肺间质纤维化大鼠氧自由基损伤的干预作用

黄霞*, 刘惠霞, 孙为

(河南省中医药研究院, 郑州 450004)

[摘要] 目的:观察血府逐瘀汤(XF)、沙参麦冬汤(SM)、三子养亲加二陈汤(SE)对肺间质纤维化(PF)模型大鼠的影响。方法:大鼠气管内注射平阳霉素复制 PF 模型后分为模型组、XF 组、SM 组、SE 组, PA 对照组, 设正常对照组。连续 ig 给药 28d。检测体重、肺指数、以及血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量的动态变化。结果:与正常对照组相比,模型组动物同期体重均明显下降,肺指数增加,血清 SOD 活性降低,MDA 升高并均有显著性差异;与模型组比较,各治疗组动物的体重下降、肺指数和血清 MDA 含量均不同程度减少,而血清 SOD 活性增加。结论:中医不同治则对 PF 模型动物的氧自由基损伤均有不同程度的干预作用。

[关键词] 肺纤维化;中医治则;方剂;氧自由基损伤

[中图分类号] R 285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)06-0188-04

Effect of Different Therapeutics on Damage of Pulmonary Fibrosis Induced by Oxygen Free Radicals in Rats

HUANG Xia, LIU Hui-xia, SUN Wei

(Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of different therapeutics on damage of pulmonary fibrosis (PF) induced by oxygen free radicals in rats. **Method:** The rats were randomly divided into the groups (normal control group, model group, Xuefu Zhuyu group, Shashen Maidong group, Sanzi Yangqin and Erchen group and Prednisolone group). The rats were injected with bleomycin A5 hydrochloride solution into the lung through trachea for duplicating the PF model except for the normal control group. The rats were continuously given the different drugs by gavage for 28 days. The dynamic changes of body weight, pulmonary index, the activity of SOD and the contents of MDA in serum were measured. **Result:** The pulmonary index in the model group was increased and the body weight significantly decreased, and SOD activity was lowed and MDA was elevated than those of the normal control group at the same period ($P < 0.05$). Compared with the model group, the weight loss, pulmonary index and MDA in serum in the treatment groups were lessened while the SOD activity increased at different levels. **Conclusion:** The different therapeutics of Traditional Chinese Medicine has intervention effect to different degrees on the damage induced by oxygen free radicals for PF model rats.

[Key words] pulmonary fibrosis; therapeutic principle of traditional chinese medicine; proprietary; damage induced by oxygen free radicals

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是临床常见的

慢性疾病,随着自由基医学基础的迅速发展,大量研究已表明自由基损伤在肺纤维化形成过程中起着重要作用^[1]。正常体内存在酶及非酶类清除自由基的抗氧化防御体系,肺部炎症、损伤等发生时,自由基代谢失衡,机体自由基不能有效清除而引发脂质过氧化作用,导致细胞代谢或功能障碍,促进 PF 进程,

[收稿日期] 20100112(004)

[基金项目] 河南省科技厅项目(072102310029)

[作者简介] *黄霞,研究员,从事中药药理学、毒理学研究, E-mail: huangyal@126.com

因此提高肺组织抗氧化能力对 PF 治疗或预防都具有积极意义。很多中药都具有清除或抑制氧自由基生成的作用,本实验选择治疗 PF 不同治则的代表方药血府逐瘀汤、沙参麦冬汤、三子养亲加二陈汤,动态观察其对 PF 大鼠氧自由基损伤的干预作用,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

受试药物选用活血化瘀法、养阴润肺法、燥湿化痰法的代表方剂血府逐瘀汤(简称 XF)、沙参麦冬汤(简称 SM)、三子养亲加二陈汤(简称 SE)分别经煎煮、提取挥发油后合并成浓缩液,每毫升含原生药分别为 1.45 g, 1.09 g, 2.20 g, 冷藏备用。平阳霉素,哈尔滨博莱制药有限公司生产。批号 07010203。戊巴比妥钠,北京化学试剂公司进口分装。批号 060222。醋酸泼尼松片(Prednisolone acetate, PA)浙江仙据制药股份有限公司产品,批号 080777。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。批号 20081216。

1.2 动物 清洁级 Wistar 大鼠 100 只,雄性,体重 180 ~ 200 g,由河南省实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.3 方法 动物以 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉后固定,常规消毒,方法参考文献^[2] 气管内注射平阳霉素 5 mg/kg 复制 PF 模型,术后随机分为模型对照组、XF 组、SM 组、SE 组、PA 组。正常对照组动物手术操作

同模型组,气管内注射等体积生理盐水。次日各治疗组动物开始 ig 给药,连续 28 d。每天观察记录动物一般体征,分别于实验 7 d, 14 d 和 28 d 各组处死 6 只动物,解剖肺脏称重,计算脏器指数;分离血清检测 SOD, MDA 含量。

1.4 实验数据 采用 SPSS. 16.0 软件统计分析。计量资料用单因素方差分析,组间均值比较 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 对 PF 模型大鼠体重、肺指数的影响

以大鼠 PF 手术当天体重为 0 d 体重,各组体重均值差异无统计学意义。每周对大鼠体重均值进行动态观察显示,正常组动物体重每周逐增;模型组动物随试验周期体重递减且同期体重均低于正常组;PA 对照组动物体重变化除 1 周略低 0 周外,2 ~ 3 周增长同正常对照组,并与模型对照组比较具有显著差异;XF 组、SM 组 1 ~ 2 周体重略有下降,但降幅低于模型组,3 ~ 4 周体重增长并高于 0 周体重,其中 XF 组与模型组比较具有显著意义;SE 组 1 ~ 2 周体重变化同模型组,3 ~ 4 周体重虽高于模型组但无显著性差异,见表 1。各组肺指数比较从表 2 可见,模型组均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$),且 1 周与 4 周肺指数无明显变化。各给药组 1 周肺指数均高于空白组但无统计学意义,而 4 周肺指数均低于模型组并且较 1 周均明显降低,其中 XF 组、PA 组有显著性意义。

表 1 各组大鼠体重的经时变化/(g, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
空白对照	—	240.80 ± 41.56	270.10 ± 46.24 ²⁾	297.00 ± 58.58 ²⁾	320.80 ± 65.60 ²⁾	342.70 ± 78.34 ²⁾
模型对照	—	238.80 ± 33.56	216.20 ± 39.34 ¹⁾	227.71 ± 66.76 ¹⁾	197.00 ± 77.83 ¹⁾	201.00 ± 87.05 ¹⁾
XF 治疗	25.0	241.70 ± 26.89	223.2 ± 39.68 ¹⁾	239.79 ± 46.59 ¹⁾	280.12 ± 47.95 ²⁾	302.75 ± 60.99 ²⁾
SM 治疗	17.5	226.00 ± 18.73	206.82 ± 34.76 ¹⁾	220.42 ± 55.23 ¹⁾	246.83 ± 70.65 ¹⁾	250.00 ± 80.25 ¹⁾
SE 治疗	22.0	231.75 ± 23.72	211.69 ± 38.81 ¹⁾	201.45 ± 58.70 ¹⁾	211.13 ± 46.39 ¹⁾	215.17 ± 48.49 ¹⁾
PA 对照	0.006 25	252.30 ± 19.36	249.30 ± 47.90 ²⁾	307.20 ± 32.29 ²⁾	334.00 ± 37.86 ²⁾	360.20 ± 40.91 ²⁾

注:与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$,与模型组比较 ²⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠肺指数比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	肺指数/(mg/100 g)	
		7 d	28 d
空白对照	—	68.85 ± 9.54	61.25 ± 14.02
模型对照	—	119.18 ± 16.97 ¹⁾	109.90 ± 25.86 ¹⁾
XF 治疗	25.0	123.70 ± 35.29	79.98 ± 15.65 ^{2,3)}
SM 治疗	17.5	116.85 ± 43.19	105.64 ± 39.03
SE 治疗	22.0	112.60 ± 34.14	95.29 ± 30.52
PA 对照	0.006 25	145.14 ± 40.98	59.05 ± 8.76 ^{2,3)}

注:与空白组相比, ¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$;与同组 7 d 比较, ³⁾ $P < 0.05$ (下同)。

2.2 对 PF 模型大鼠血清 SOD, MDA 含量的影响

实验结果显示,模型组 SOD 值均随实验时间延长逐渐下降,1 周与 4 周同组比较也有显著差异,第 4 周与空白组比较也具有显著差异;给药各组 SOD 均值也低于同期空白组,但第 1 周与 4 周同组比较均无显著意义;各给药组 28 d SOD 测定值均高于模型组,其中 XF 组、SM 组具有显著差异。见表 3。模型组 MDA 各周值均高于正常组并有显著性意义;与

模型组比较, 给药各组均能降低血清 MDA 水平, SM 组、SE 组、PA 组有显著性意义。SM 组、SE 组 MDA 水平随实验时间逐渐下降, 其中 SM 组 7 d 与 28 d

比较有显著意义; XF 组、SE 组、PA 组 7 d MDA 水平与空白组比较无显著意义, 与模型组比较差异显著, 详见表 4。

表 3 各组大鼠血清 SOD 水平动态检测结果/(U · mL⁻¹, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
空白对照	-	56.18 ± 2.75	56.33 ± 1.95	57.17 ± 0.99
模型对照	-	53.34 ± 2.88	53.14 ± 3.25	47.23 ± 4.35 ^{1,3)}
XF 治疗	25.0	53.18 ± 3.19	52.25 ± 3.92	54.44 ± 1.85 ^{1,2)}
SM 治疗	17.5	54.07 ± 2.31	54.53 ± 1.51 ¹⁾	54.56 ± 0.72 ^{1,2)}
SE 治疗	22.0	53.75 ± 3.03	51.69 ± 5.21	51.38 ± 1.21 ¹⁾
PA 对照组	0.006 25	56.33 ± 3.88	53.78 ± 4.82	51.22 ± 1.85 ¹⁾

表 4 各组大鼠血清 MDA 水平动态检测结果/(nmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 g · kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
空白对照	-	9.16 ± 4.81	9.52 ± 5.46	10.12 ± 3.60
模型对照	-	17.81 ± 5.58 ¹⁾	16.72 ± 5.69 ¹⁾	18.19 ± 3.09 ¹⁾
XF 治疗	25.0	15.14 ± 7.90	10.82 ± 4.09	12.12 ± 5.82
SM 治疗	17.5	16.16 ± 2.98 ¹⁾	11.62 ± 2.66 ³⁾	9.52 ± 1.09 ^{2,3)}
SE 治疗	22.0	10.79 ± 2.42	9.88 ± 3.61 ²⁾	9.03 ± 2.70 ²⁾
PA 对照	0.006 25	7.58 ± 1.52 ²⁾	9.21 ± 2.31	10.84 ± 3.41 ²⁾

3 讨论

机体细胞代谢形成的中间产物 - 活性氧大部分是氧自由基 (Oxygen Free Radicals, OFR), 通常包括超氧阴离子自由基 (O₂^{-·})、羟自由基 (·OH) 和过氧化氢 (H₂O₂)。随着自由基医学研究的不断深入, 人们认识到 OFR 诱发的细胞损伤是许多肺部疾病的病理生理基础^[3]。

OFR 能攻击生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFA) 引发脂质过氧化作用, 并由此形成脂氢过氧化物如醛基 (丙二醛 MDA)、酮基等以及新的 OFR。脂质过氧化作用不仅把活性氧转化成活性化学剂, 即非自由基的脂类分解产物, 而且通过链式和链式支链反应, 放大活性氧的作用, 引起细胞代谢和功能障碍, 甚至死亡。因此 OFR 不但通过生物膜 PUFA 的过氧化引起细胞损伤, 而且还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤^[4]。正常机体内细胞代谢不断地产生自由基, 这些自由基又及时被体内抗氧化防御系统所清除, 二者保持相对平衡状态。如果这种平衡被打破, 体内抗氧化能力减弱, 氧自由基不能及时清除则引起组织细胞损伤。大量研究提示氧自由基和抗氧化自由基系统的失衡是 PF 发病机制之一^[3]。MDA 是脂氢过氧化物的分解产物之一, 其含量可反映体内脂

质过氧化的程度, 间接反映细胞受 OFR 攻击的损伤程度, SOD 是主要抗氧化酶之一, 在体内分布广泛, 在防止组织氧代谢物的损伤中具有重要作用。SOD 活力的高低间接反应机体清除 OFR 的能力。作者前期研究结果表明 PF 小鼠肺组织胶原蛋白、羟脯氨酸 (HYP) 含量显著增加, 而弹性蛋白降低, PF 程度显著高于对照组^[5]。在此基础上, 本研究观察了 PF 模型大鼠体重、肺指数及血清 SOD、MDA 水平的动态变化, 结果显示模型组动物血清 SOD 活力持续下降而 MDA 含量升高, 提示在肺纤维化发生发展过程中出现自由基损伤。研究结果显示拮抗模型大鼠体重下降作用以血府逐瘀汤效果较好, 其次为沙参麦冬汤、三子养亲加二陈汤, 与前期研究结果一致^[5], 而 PA 组作用优于各中药组; 模型组动物肺指数显著高于对照组, 提示模型动物肺组织出现炎性充血水肿, 各治疗组均可减少模型动物的炎性渗出和水肿等损伤, 从而降低肺指数, 以血府逐瘀汤效果较好, 其次为三子养亲加二陈汤、沙参麦冬汤, 而 PA 组作用优于各中药组; 模型组血清 SOD 活力随实验周期呈持续下降趋势, 表明 PF 动物体内清除 OFR 的能力在逐渐降低, 各治疗组 SOD 活力检测值基本保持稳定, 28 d SOD 均值高于模型组, 提示各治疗组具有提高 PF 模型动物血清 SOD 活力的作用, 其效

果依次为沙参麦冬汤、血府逐瘀汤、三子养亲加二陈汤、强的松,其中沙参麦冬汤、血府逐瘀汤提高 SOD 活力作用优于强的松组;模型组血清 MDA 含量持续高于对照组,提示 PF 动物体内脂质过氧化及细胞损伤现象在延续,各治疗组均显著降低其 MDA 含量,具有不同程度的拮抗脂质过氧化作用,效果依次为三子养亲加二陈汤、沙参麦冬汤、血府逐瘀汤,PA 组降低 MDA 的效应较各中药组为早并保持稳定,三子养亲加二陈汤、沙参麦冬汤随实验周期 MDA 含量呈持续降低,28 d MDA 含量均低于 PA 组,其结果提示了中药复方抗自由基损伤长期治疗具有一定优势。

上述研究结果显示,活血化瘀法、养阴润肺法、燥湿化痰法对实验性 PF 动物氧自由基损伤均有不同程度的干预作用,充分体现了中医同病异治的治疗原则,其中活血化瘀法综合疗效优于养阴润肺法、燥湿化痰法。强的松组与中药治疗组也各具有优势,综合比较可以看出,强的松组疗效发挥较快,短期作用优于中药各组;中药治疗组显效较慢,但持续治疗作用优于强的松组。PF 的发生发展是一个复杂的病理过程中,其中炎症细胞聚集和巨噬细胞的

激活、花生四烯酸的代谢、血管活性物质、细胞因子之间的相互作用等,都与氧自由基代谢密切相关,血府逐瘀汤、沙参麦冬汤、三子养亲加二陈汤可能作用于自由基代谢过程的不同环节,或阻断自由基生成,或抑制其链式反应等从而发挥其抗氧化效应,具体作用环节和信号转导途径有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 黄霞,袁效涵,徐立然. 肺纤维化病因学及中医药实验研究现状[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(12): 217.
- [2] 吕晓东,庞立健. 气管内注入博莱霉素致大鼠肺纤维化动物模型方法优化分析[J]. 实用中医内科杂志,2007,21(2):3.
- [3] 赵俭,王晓平,薛关生,等. 抗氧化剂在治疗肺间质纤维化中的作用[J]. 锦州医学院学报,2001,22(3): 52.
- [4] 陈媛,周玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 北京: 人民卫生出版社,2002:8,12,14,36.
- [5] 袁效涵,黄霞,徐立然,等. 不同方剂对肺纤维化模型小鼠的比较研究[J]. 中成药,2009,31(12):1827.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国实验方剂学杂志》入编中文核心期刊信息

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、计算和分析,以及学科专家评审,《中国实验方剂学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版)之中国医学类的核心期刊。该核心期刊按《中国图书馆分类法》的学科体系,列出了 73 个学科的核心期刊表,并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括:题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。该研究成果只是一种参考工具书,主要是为图书情报部门对中文期刊的评估与订购、为读者导读提供参考。