

清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响

张伟¹ 张雪玲² 朱雪¹ 王国梁² 孟芸² 张莉² 张晓蕾²

(1.山东中医药大学附属医院,山东济南 250014; 2.山东中医药大学,山东济南 250011)

摘要 目的:通过检测痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠应用清金益肺汤后肺组织 IL-8、TGF- β 1 的表达水平及光镜下的病理变化,探讨清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响。方法:清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只,随机分为 5 组:空白对照组、痰热蕴肺型特发性肺纤维化模型组(模型组)、中药治疗组(中药组)、激素治疗组(激素组)、中药加激素治疗组(综合治疗组)。采用气管内滴入博来霉素的方法建立肺纤维化模型。造模结束后第 2 天气管内滴加脂多糖建立痰热蕴肺证模型。ELISA 法检测各组大鼠肺组织 IL-8、TGF- β 1 的表达水平,光镜下观察各组大鼠肺组织的病理改变。结果:模型组、中药组、激素组、综合治疗组大鼠肺组织在光镜下均有肺纤维化的特征性病理改变,但程度有所不同。与空白对照组相比,其余各组大鼠 IL-8 及 TGF- β 1 的表达水平均明显增高;模型组表达水平明显高于中药组、激素组和综合治疗组;综合治疗组明显低于中药组和激素组;中药组和激素组 IL-8 的表达水平差异无统计学意义;激素组 TGF- β 1 水平明显高于中药组。结论:清金益肺汤可改善痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠的呼吸功能、结构改变,并能调节免疫,与激素联合可增强抗纤维化力度。

关键词 特发性肺纤维化 痰热蕴肺 清金益肺汤 IL-8 TGF- β 1 病理学 实验研究

中图分类号 R563.905 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)07-0074-03

特发性肺纤维化(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)是一组主要累及肺间质、肺泡和(或)细支气管的肺部弥漫性疾病,主要表现为渐进性劳力气促、限制性通气功能障碍伴弥散功能降低、低氧血症和影像学上的双肺弥漫性病变,其后多因并发呼吸衰竭而死亡^[1]。本病因未明,发病机制亦未完全明确,但已有足够证据表明与免疫炎症损伤有关。清金益肺汤是在清金化痰汤的基础上,根据中医辨证论治理论而确立的有确切临床疗效的方剂,功在清热化痰、肃肺祛痰。本实验拟通过检测痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠应用清金益肺汤后肺组织 IL-8、TGF- β 1 的表达水平及光镜下的病理变化,以期探讨清金益肺汤对痰热蕴肺型特发性肺纤维化大鼠病理及免疫功能的影响,为临床提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只,鼠龄 10~12 周,体重(200 \pm 20)g。动物来自山东中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(鲁)20110003。

1.2 实验试剂和药物 博来霉素(BLM),invitrogen 公司,批号:1134142;脂多糖(LPS),美国 Sigma 公司;10%水合氯醛,山东大学齐鲁医院,批号:20130305;PBS 缓冲液(pH=7.4);清金益肺汤(药物组成:炙麻黄 9g,炒白果 12g,炒杏仁 12g,桔梗 12g,川贝 12g,浙贝 12g,黄芩 12g,川芎 12g,栀子 12g,桑白皮 12g,知母 12g,瓜蒌 30g,金银花 30g,清半夏 9g,丹参 18g,蒲公英 30g,蜈蚣 2 条,生甘草 6g),煎液由山东中医药大学附属医院制备;泼尼松片,天津药业集团新郑股份有限公司,批号:20130123。

基金项目:泰山学者建设工程专项经费资助项目(ts20110819);山东省中医药科技发展计划(2011-050)

- [7] QIAN Y,ZHU P,WANG WM,et al.Study of the PKA and PKC signal transduction pathway of regulation of OPG and RANKL mRNA expression by hPTH (1-34). Journal of Chinese Micro-circulation,2007,11(5):293
- [8] 刘亦恒,臧洪敏,张海英,等.淫羊藿总黄酮对成骨细胞中 OPG 和 RANKL mRNA 基因表达影响的实验研究. 中药材,2005,28(12):1076
- [9] 周乐,吴焯,崔铁.淫羊藿对肾虚雄性大鼠肾脏和股骨 BMP-7 表达的影响.中国骨质疏松杂志,2008,14(2):90
- [10] 邹新蓉,王小琴,马晓红,等.肾安颗粒对 ROD 模型大鼠骨组织

FGF-23 表达及骨代谢的影响. 临床肾脏病杂志,2012,12(9):418

- [11] 邹新蓉,王小琴,王长江,等.肾安颗粒对肾性骨病模型大鼠骨组织 BMP-7 表达及骨代谢的影响. 湖北中医杂志,2013,35(4):11

第一作者:邹新蓉(1972-),女,博士,副主任医师,研究方向:中医药防治肾病。frank_judy@163.com

收稿日期:2014-03-14

编辑:吴宁

1.3 主要仪器和设备 AE200 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 微量高速离心机 (国产), 型号: TG16W; Labsystems Multiskan MS 酶标仪 (芬兰), 型号: 352; Thermo Labsystems 洗板机 (芬兰), 型号: AC8; 隔水式恒温培养箱 (国产), 型号: GNP-9080; 病理图像分析 (CX41-32rfl, OLYMPUS); 美国 GATAN CCD 图像处理系统。

2 实验方法

2.1 分组与造模 大鼠适应性喂养 7d 后, 采用随机数字表法分为 5 组: 空白对照组 (空白组)、痰热蕴肺型特发性肺纤维化模型组 (模型组)、中药治疗组 (中药组)、激素治疗组 (激素组)、中药加激素治疗组 (综合治疗组)。除空白组外, 其余各组大鼠参照 Szapiel^[2]的方法造模。试验第 1 天, 在室温环境下, 将大鼠逐一称质量, 按 0.4mL/100g 体质量腹腔注射浓度为 10% 水合氯醛溶液, 待大鼠麻醉后, 将其固定于解剖台上, 头低位暴露声门, 将 16 号静脉套管针沿气管走行快速插入气管, 拔出针芯, 接 1mL 注射器, 1s 内注入博莱霉素 A5 药液 (5mg/kg), 左右旋转鼠板, 使博莱霉素 A5 药液均匀分布于两肺, 制成肺纤维化模型。试验第 3 天将大鼠麻醉, 暴露气管, 一次性注入溶于注射用生理盐水的浓度为 1g/L 的脂多糖 0.2mL/200g, 将大鼠直立, 左右旋转, 使脂多糖在肺内均匀分布, 造成痰热蕴肺证模型。^[3-4]

2.2 给药方法 造模完成后, 于实验第 5 天开始, 中药组大鼠给予中药煎液 10mL/kg 灌胃, 激素组大鼠用强的松 (3mg/kg) 和生理盐水的混合制剂 10mL/kg 灌胃, 综合治疗组大鼠用中药煎剂 10mL/kg 加强的松 10mL/kg 灌胃, 频次均为每天 1 次, 灌胃 14d。空白、模型组正常饮食, 不予特殊处理。各组动物分别于实验第 19 天处死。大鼠药物用量根据公式计算, 人服用药物总量为 N, 人体重量按 70kg 算, 大鼠重量为 m, 则大鼠所需药量 $n=N/70 \times m \times 6^{[5]}$ 。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 动物一般情况监测 每天观察大鼠的活动度、对外界反应的灵敏度、皮毛光泽、口唇鼻毛色泽、体重、饮食、呼吸、死亡等情况。

2.3.2 ELISA 法检测肺组织 IL-8、TGF- β 1 的表达水平 大鼠麻醉后取出右肺上叶组织 200~500mg, 制备成 10% 的匀浆, 离心取上清, ELISA 法检测 IL-8、TGF- β 1 的含量。

2.3.3 光镜下肺组织病理观察 各组大鼠用 10% 水合氯醛 (0.4mL/100g) 麻醉后, 取新鲜左肺下叶组织经 10% 中性福尔马林 48h 充分固定, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续 4 μ m 切片 4 张, 常规 HE 染色, 光镜下观察。

2.4 统计学方法 连续型变量用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时采用 *t* 检验, 方差不齐时采用 *t'* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义, P<0.01 为差异有显著统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 空白组大鼠毛发亮白, 有光泽, 反应灵敏, 呼吸平稳, 体重逐日增加, 无特殊不良表现。造模后各组大鼠出现不同程度的毛发发黄、凌乱、脱落、缺少光泽, 舌质暗红, 呼吸喘促, 食量减少, 体重增幅减轻。中药组、激素组、综合治疗组大鼠在毛发、灵敏度等方面均较模型组表现良好, 尤以综合治疗组为优。治疗结束后, 中药组、激素组、综合治疗组大

鼠灵敏度、毛发光泽度、舌色、呼吸等均较用药前有明显改善。

3.2 各组大鼠肺组织 IL-8 及 TGF- β 1 表达水平 见表 1。

表 1 各组大鼠肺组织 IL-8 及 TGF- β 1 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	动物数	IL-8	TGF- β 1
空白组	8	386.62 \pm 7.54	143.19 \pm 3.05
模型组	8	516.58 \pm 16.5**	195.24 \pm 5.48**
综合治疗组	8	427.72 \pm 8.26***	155.41 \pm 4.61***
中药组	8	485.49 \pm 16.1*** $\Delta\Delta$	183.28 \pm 2.42*** $\Delta\Delta$
激素组	8	498.29 \pm 8.34*** $\Delta\Delta$	167.77 \pm 5.55*** $\Delta\Delta\Delta$

注: 与空白组比较, **P<0.01; 与模型组比较, ***P<0.01; 与综合治疗组比较, Δ Δ P<0.01; 与中药组比较, $\Delta\Delta$ P<0.05。

3.3 光镜下各组大鼠肺组织病理改变 见图 1。空白组双肺呈粉红色, 表面光滑, 弹性良好; 各造模组可见不同程度的点状出血、灶状瘀斑, 肺脏表面苍白, 体积缩小, 硬度增加, 表面呈结节样改变。空白组 (图 1-K①、K②); 肺内结构清晰, 肺泡间隔未见增厚, 无水肿、炎症及纤维化表现, 肺泡腔内无明显渗出; 模型组 (图 1-M①、M②) 肺毛细血管明显充血、出血, 肺泡间隔明显增宽变形, 肺泡壁增厚水肿, 肺泡结构紊乱, 有大量炎性细胞浸润, 纤维细胞和胶原纤维显著增生; 综合治疗组 (图 1-H①、H②) 支气管、肺泡间隔轻度水肿, 肺毛细血管无明显充血、出血, 无明显炎性细胞渗出; 中药组 (图 1-Z①、Z②) 肺毛细血管轻度充血、出血, 肺泡壁水肿, 肺泡结构接近正常, 轻度炎性细胞浸润; 激素组 (图 1-J①、J②) 支气管、肺泡壁中度水肿, 有炎性细胞浸润表现, 肺毛细血管可见轻度充血、出血, 成纤维细胞增多。

4 讨论

本研究所采用的肺纤维化造模方法源于 Szapiel 等^[2]的方法, 痰热蕴肺证病理模型的建立采用气管内滴入脂多糖的方法, 我们过往的研究表明, 采用这种方法处理后的模型大鼠, 其临床表现、病理及病理生理改变与人类肺部炎症病变非常相似^[3-4]。我们通过预实验发现, 在给药后第 3 天大鼠肺组织纤维化程度最为明显, 而前期动物实验证实脂多糖给药后第 2 天出现明显的炎症反应^[3]。我们此次实验中光镜下病理结果均符合人类特发性肺纤维化的病理表现, 同时又有炎症存在, 说明痰热蕴肺型特发性肺纤维化模型复制成功。

目前认为, 肺纤维化的发病最初就有成纤维灶的形成, 伴或不伴间质性炎症, 最终形成肺纤维化^[6-7]。且血管的生成在肺纤维化发生早期可能起重要作用, 调节过度的血管生成有可能延缓肺纤维化的发展进程^[8]。

IL-8 是一种由肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞等多种细胞产生的具有多种生物活性的细胞因子。研究表明, IL-8 在肺纤维化患者肺组织中中性粒细胞及其他炎症细胞狙击、介质释放等炎症过程中起关键作用, 可作为判断肺纤维化炎症程度的指标之一^[9]。我们认为, 特发性肺纤维化痰热蕴肺型主要表现为炎症的改变。本实验中, 与空白组比较, 模型组 IL-8 有显著升高, 经治疗后各组 IL-8 均明显降低, 以综合治疗组降低最为明显, 中药组、激素组次之且组间无明显差异, 提示了不管是中药清金益肺汤还是激素强的松均抑制了肺组织 IL-8 的表达, 减轻了炎症反应, 激活和调

节了免疫细胞,尤以中药与激素联用的效果最著。虽然中药组和激素组比较差异无统计学意义,但是光镜下我们发现,中药组大鼠不管是在炎症浸润、肺毛细血管充血还是成纤维细胞形成方面,都较激素组表现良好,这就说明与强的松相比,清金益肺汤在改善气道功能、抑制炎症反应、调节免疫应答方面有其独特的优势。同时我们可以看到,单纯的中药或激素虽然对肺纤维化的治疗有一定作用,但二者协同联用效果会更好。

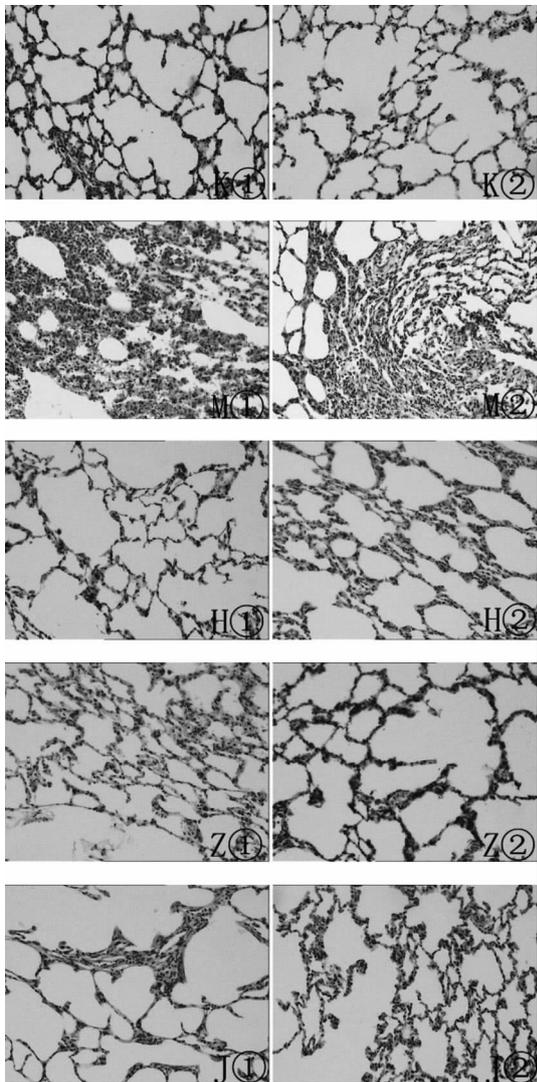


图1 各组大鼠肺组织病理图片(x10)

注:K①、K②——空白组;M①、M②——模型组;H①、H②——综合治疗组;Z①、Z②——中药组;J①、J②激素组。

TGF- β 1 具有多重的生物学作用。研究表明,TGF- β 1 是一种促血管生成因子,可能通过调节内皮细胞的成活及 VEGF 的表达而促进新生血管的生成^[10-11],最终导致纤维化。本实验中,模型组大鼠肺组织 TGF- β 1 的表达水平与空白组比较明显升高,表明模型组的肺损害明显;治疗后以综合治疗组肺组织 TGF- β 1 表达最低,这彰显了清金益肺汤和激素联用的优越性;中药组肺组织 TGF- β 1 表达低于激素组,且光镜下中药组的肺损伤明显低于激素组,表明清金益肺汤可能通过抑制 TGF- β 1 的表达而调控了细胞反应,调节了大鼠的免疫功能,减轻了大鼠的肺纤维化。

目前,特发性肺纤维化的西医疗法多采用糖皮质激素联合细胞毒药物。近年来,中医界关于肺纤维化的病机存在诸多争论,但越来越多的学者提出血瘀内阻贯穿本病始终^[12-14]。清金益肺汤是由《医学统旨》中所载的清金化痰汤化裁而来。方中蜜麻黄、炒杏仁、炒白果宣肃肺气,提壶揭盖;川贝、浙贝、桑白皮之类肃肺清热,化痰平喘;因该病多见瘀血表现,方中加入川芎、丹参之类活血祛瘀;蜈蚣一味更妙,可加强逐瘀之力。本方是经临床和实验验证的对痰热蕴肺型特发性肺纤维化行之有效的方剂。痰热蕴肺是肺纤维化的常见证型,在辨证施治中,当注重清热化痰药与活血祛瘀药配伍,并联合西药糖皮质激素,势必会收到事半功倍之效。

5 参考文献

- [1] Durcan N, Murphy C, Cryan SA. Inhalable siRNA: potential as a therapeutic agent in the lungs. *Mol Pharm*, 2008, 5(4): 559
- [2] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893
- [3] 张伟, 张心月, 邵雨萌. 五种不同中药经典方剂影响各型慢性阻塞性肺疾病大鼠气道病理改变的特点. *中国临床康复*, 2006, 10(47): 75
- [4] 马楠, 崔德健, 梁延杰, 等. 气道内注入脂多糖建立大鼠慢性支气管炎模型. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22(6): 371
- [5] 章元沛. *药理学实验*. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 238
- [6] Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and therapeutic approaches. *Drugs*, 2004, 64(5): 405
- [7] Crijm K, Verberna HJ, Krouwels FH, et al. Semiquantitative ⁶⁷Ca scintigraphy as an indicator of response to and prognosis after corticosteroid treatment in idiopathic interstitial pneumonia. *J Nucl Med*, 2005, 46(9): 1421
- [8] 何彦侠, 辛建保. 血管生成在肺纤维化发病机制中的意义. *国外医学·呼吸系统分册*, 2004, 24(增刊): 42
- [9] 张才擎, 梁铁军, 张伟, 等. 金水宝胶囊对肺肾两虚型 COPD 大鼠病理及免疫功能的影响. *首都医药*, 2008(16): 41
- [10] Vinals F, Pouyssegur J. Transforming growth factor beta (TGF-beta) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Bio*, 2001, 21(21): 7218
- [11] Behzadian MA, Wang XL, Shabraway M. Effects of hypoxia on glial cell expression of angiogenesis-regulation factors VEGF and TGF-beta. *Glia*, 1998, 24(2): 216
- [12] 考希良, 张伟. 从痰探讨肺间质纤维化中医病因病机. *中医学报*, 2012, 27(10): 1250
- [13] 张心月, 贾新华, 张伟, 等. 从气血变化看肺间质纤维化. *中医学报*, 2012, 40(3): 56
- [14] 张心月. 血瘀贯穿间质性肺疾病始终探析. *中医研究*, 2013, 26(2): 1

第一作者: 张伟(1963-), 男, 博士, 中医肺病学泰山学者岗位特聘专家, 二级教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合呼吸系统疾病的临床诊疗及基础研究。

通讯作者: 张雪玲, zxl89124@126.com

收稿日期: 2013-12-24

编辑: 吴宁