

益肺化纤方治疗肺纤维化的实验研究

张纾难 王辛秋 李兰群 韩春生 晁恩祥

(中日友好医院, 北京 100029)

提要 肺纤维化是现代临床难治病, 迄今缺乏有效疗法。为探讨经验方“益肺化纤方”治疗本病的机理, 选用 Wistar 大鼠 40 只, 随机分组。采用雾化吸入平阳霉素的方法造模成功后, 通过与对照组的比较, 观察“益肺化纤方”对鼠纤维化的作用; 病理学实验证实, 中药对于肺纤维化具有良好的拮抗作用。初步认为其作用机理与调节免疫功能、改善血液流变学状态有关; 因此认为, “益肺化纤方”是一种符合中西医理论的安全有效防治肺纤维化的方药, 具有广泛的应用前景, 值得进一步开发研究。

关键词 肺纤维化 中医药 实验研究

肺纤维化是临床难治病。目前尚无有效治法。“益肺化纤方”主要由黄芪、太子参、麦冬、三七、苏子、牛膝、虎杖、鱼腥草、甘草等药物组成, 是我科在近 7 年的临床实践中反复摸索逐渐形成的协定方。具有益气润肺、化痰解毒、止咳平喘祛涎之功效, 通过长期临床观察, 发现此方对肺纤维化具有良好的治疗效果。为进一步探讨其作用机制, 用该药对大鼠肺纤维化模型的有关指标进行实验研究。

实验材料

1. 实验动物 健康 Wistar 大鼠 40 只, 雌雄不拘, 体重 200 ± 20 克。购自中国中医研究院实验动物研究所。

2. 实验药物

2.1 益肺化纤方 依临床配伍方法, 选用地道药材按传统方法煎煮, 配成 1 克生药/毫升。具体方法参照《中医科研设计与统计方法》执行⁽¹⁾。

2.2 平阳霉素 天津太河制药有限公司生产。规格: 8 毫克/支, 批号: 960802。

2.3 氢化考的松 天津市生物化学制药

厂生产, 规格: 50 毫克/支, 批号: 950908。

2.4 实验仪器 日本产 NJ-2000 酶标仪; 军事医学科学院实验仪器厂产 LTP-A 离心涂片机; 日本产 05PR-22 冷冻离心机。

实验方法

1. IPF 大鼠模型的制备 在清醒状态下, 每次将 2 只大鼠放入一长、宽、高各 40cm 与超声雾化器相连通的透明玻璃盒中。通过雾化管向盒内喷入雾化液。2.0ml 雾化液中平阳霉素用 0.9% NaCl 稀释至 2mg/ml。各组均喷入一次, 每次 10 分钟。

2. 分组及给药方法 随机分为四组, 每组 10 只。单纯造模组: 生理盐水灌胃, 0.5ml/次, 3 次/周。中药治疗组: 益肺化纤方煎剂灌胃, (50mg/kg) /次, 3 次/周。激素治疗组: 肌注氢化考的松, (25mg/kg) /次, 3 次/周。正常对照组: 常规饲养, 未经造模处理。四周实验完成后, 取血, 杀鼠, 开胸, 分离肺脏, 称重后, 制备并送检标本, 光学显微镜观察。

3. 观察内容及方法

3.1 一般情况 大鼠的活动, 神情, 毛发的光泽及体重, 死亡情况, 肺系数。

生化指标: ①血清肿瘤坏死因子 (TNF) 测定: 方法采用 Elisa 双抗体夹心法。②全血 T 淋巴细胞亚群测定: 方法采用单克隆抗体 APAAP 法。③血液流变学测定: 方法因具体指标不同而异 (略)。

3.2 肺组织学检查 取肺组织灌注固定于 10% 福尔马林液中, 保持 25cmH₂O 的压力 30 分钟, 最后投入 10% 福尔马林溶液内浸泡固定 24 小时, 每侧肺于外侧方矢状切面取材

两块,自来水冲洗数小时,酒精、正丁醇脱水,石蜡包埋,切成 $5\mu\text{m}$ 厚的切片,HE和Masson氏三色染色,光学纤维镜下观察。

4. 统计学处理 不同组间均数($\bar{X} \pm S$)比较采用t检验;比较两组率的差别是否有统计学意义采用卡方检验。

实验结果

1. 外观变化 单纯造模组几乎所有大鼠

都出现“气阴虚”表现,眯眼,不活泼好动,拱背蜷缩,毛枯,体弱瘦小;正常组则活泼好动,强壮肥硕,皮毛光泽发亮;用药组介于单纯造模组与正常组之间,而更接近于正常组。

2. 死亡情况 正常组无一例死亡;单纯造模组,中药治疗组,激素治疗组各死亡1只,死亡率为10%。

3. 体重变化情况 见表1。

表1 造模前后各组体重变化 (g, $\bar{X} \pm S$)

组别	n	前	n	后
正常组	10	200 ± 1.80	10	268 ± 22.80
单纯造模组	10	208 ± 11.78	9	226 ± 17.78
中药治疗组	10	206 ± 10.88	9	252 ± 21.35
激素治疗组	10	201 ± 16.70	9	261 ± 21.66

注:正常组与中药治疗组比较 $p < 0.05$;单纯造模组与中药治疗组比较 $p < 0.01$;正常组与中药治疗组比较 $p < 0.01$;正常组与激素治疗组比较 $p < 0.01$ 。

如表1所见,造模前4组大鼠体重差别无统计意义($p > 0.05$),而造模后单纯造模组大鼠体重明显低于其它3组,差异非常显著($p < 0.01$),中药治疗组与激素治疗组无显著差异($p > 0.05$),但此两组均低于正常组,其改变有统计学意义($p < 0.05$)。说明单纯造模组大鼠生长缓慢,但造模同时灌服益肺化纤方或注射激素则对大鼠生长影响相对减轻,证明益肺化纤方对肺纤维化形成过程中的生长缓慢现象有一定的拮抗作用。在早期用药防止肺纤维化形成方面与激素有相似效应。

4. 造模大鼠肺系数的变化情况

肺系数(肺重mg/体重g)是反映肺纤维化程度的指标之一,本研究观察造模前后肺系数的变化情况,结果见表2。

表2 肺系数变化情况 (肺重mg/体重g; $\bar{X} \pm S$)

组别	n	肺系数
正常组	10	1.07 ± 0.68
单纯造模组	9	3.59 ± 0.87
中药治疗组	9	2.78 ± 1.04
激素治疗组	9	2.86 ± 1.08

表2表明,单纯造模组肺系数明显高于其它3组($p < 0.01$);中药治疗组与激素治疗组低于单纯造模组($p < 0.05$),但此两者比较无显著差异($p > 0.05$),说明灌服益肺化纤方在拮抗纤维化形成过程中的肺脏纤维化程度方面与激素有相似效应,但未能达到正常水平。

5. 对造模大鼠全血T淋巴细胞亚群的影响 见表3。

表3 各组全血T淋巴细胞亚群比较 (%; $\bar{X} \pm SD$)

组别	n	CD ₃	CD ₄	CD ₈	CD ₄ /CD ₈
正常组	10	67.7 ± 4.18	41.4 ± 4.18	24.7 ± 3.05	2.04 ± 0.96
单纯造模组	9	59.1 ± 1.74	36.8 ± 7.56	21.9 ± 6.11	1.56 ± 0.48
中药治疗组	9	55.6 ± 1.74	34.1 ± 5.41	20.1 ± 4.33	1.21 ± 0.78
激素治疗组	9	41.2 ± 7.46	28.6 ± 0.78	18.7 ± 1.65	1.03 ± 1.34

表3表明,灌服益肺化纤方后,中药治疗组与激素治疗组均使各指标改变。与单纯造模组比较,CD₄降低显著($p < 0.05$);中药治疗

组与激素治疗组两者比较 $p > 0.05$,说明两者均是通过免疫抑制达到抗纤维化作用。

6. 对造模大鼠肿瘤坏死因子的影响见表4。

表 4 各组血浆肿瘤坏死因子水平比较

(X̄ ± S)		
组 别	n	TNF (ng/ml)
正常组	10	0.004 ± 1.15
单纯造模组	9	4.237 ± 3.16
中药治疗组	9	1.016 ± 1.77
激素治疗组	9	0.008 ± 0.79

表 4 表明,灌服益肺化纤方后,中药治疗组与激素治疗组同样能明显降低 TNF,与单纯造模组比较 $p < 0.01$;此两者比较 $p > 0.05$ 。说明益肺化纤方虽未能使 TNF 降至正常水平,但在此方面的效应与激素相近。

7. 对造模大鼠血液流变学影响 见表 5。

表 5 各组血液流变学比较 (nPa. s; X̄ ± S)

组 别	n	全血粘度	血浆粘度	纤维蛋白原 (g%)
正常组	10	2.62 ± 0.18	1.21 ± 0.06	0.76 ± 4.01
单纯造模组	9	6.68 ± 1.16	2.48 ± 1.17	0.86 ± 1.13
中药治疗组	9	3.35 ± 3.61	2.06 ± 2.14	0.81 ± 3.04
激素治疗组	9	5.19 ± 2.28	2.31 ± 1.11	0.79 ± 0.61

表 5 表明,灌服益肺化纤方后可使三项指标不同程度降低,其中全血粘度的改变与单纯造模组比较有极显著差异 ($p < 0.01$),且与激素治疗组比较亦有显著差异 ($p < 0.05$)。说明中药治疗在此方面疗效优于激素治疗。

8. 对造模大鼠肺组织病理变化的影响

正常组鼠肺叶轮廓清楚,大小正常,色白稍粉;而单纯造模组鼠肺明显萎缩变小,质地变实,肺叶轮廓不清,外观呈灰褐色,有大小不等的灰白色结节状物及串珠状充气空泡;激素治疗组与中药治疗组介于两者之间,前者更接近于正常组。正常鼠肺组织,肺泡隔纤细,肺泡腔无渗出 (HE × 100)。鼠肺炎改变,肺泡隔增宽,成纤维细胞增生,并可见梭形细胞和胶原基质,毛细血管扩张瘀血,伴淋巴细胞、浆细胞、吞噬细胞浸润,肺瘀血、水肿、(HE × 100)。鼠肺纤维化改变,在炎性病灶扩大或融合的基础上,肺泡间隔明显增宽,胶原性基质增多,肺泡壁组织增生,结构增厚,间质纤维化疤痕形成 (HE × 200)。

分析与讨论

1. 对肺纤维化动物模型的评价

近年来,尽管关于肺纤维化的有限研究主要集中在实验方面,但其造模方法仍较单纯。公认较为成功且成熟的主要是气管内滴入博莱霉素 (BLM)。BLM 是从轮生链霉菌中提取的一种抗癌抗生素。本世纪 70 年代,Snider

等⁽²⁾首次用博莱霉素 A₂ 造模成功,认为与人类相似。其后不断有学者在此基础上重复和改进,但均无大的更新。80 年代末至 90 年代初,国内不少学者进行了有关研究^(3,4,5)。

Snider 及 Thrall 等⁽⁶⁾经研究证实,BLM 复制的动物模型与人类的病变类似。实验动物的肺生理变化 (肺容量、容量-压力关系、弥散功能及动物血气变化等)与人类一致。故运用这一模型对中药治疗本病的机理进行探讨,无论从多项有关指标的观测,还是病理组织形态的观察等方面,均与人类有一定的相关性。

考虑到造价及易操作性等因素,本实验选用的方法较为理想。首先,从方法上讲,迄今为止肺纤维模型的制备,无论选用何种药物或动物,给药方式均是气管切开滴入或经咽喉注入。其优点是药物剂量易掌握,较为成熟可靠。而不足之处也显而易见,即操作不便,有一定的技术难度,必须经过专门训练才能熟练掌握与运用。我们所采用的雾化吸入法则操作简便,容易掌握。但其缺点是剂量无前例可循,需要摸索。我们经过预实验,初步找出其致纤维化的药物剂量,并基本获得成功。各有一例大鼠在造模完成后死亡,考虑与大鼠自身机能状态 (特别是呼吸功能) 有关;目前造模所用药物多用 BLM,近年国内学者亦多沿用之,但有少数学者用平阳霉素菌 (streptomyces pingyangensis, SP) 亦成功复制了肺纤维化模

型,如金洪用平阳霉素复制小白鼠肺纤维化模型⁽⁷⁾,四周完成。基于前人的成功经验和我们的实际情况(主要是经费问题所限),本研究采用平阳霉素雾化吸入的造模方法,初步获得成功。

国产平阳霉素是一单体,是由SP产生的BLM类抗肿瘤抗生素,能抑制癌细胞DNA的合成和切断DNA链,影响癌细胞代谢功能,促进癌细胞变性、坏死。研究表明,经雾化吸入给药,四周后可形成肺纤维化模型。表现为肺系数增加,组织学检查可证实纤维化病变。因此,用该方法复制模型并用以研究纤维化发病及疗愈机理是简便切实可行的。而且平阳霉素价格低廉,易于购得。

本研究的不足之处是,未能在大批量造模基础上分期、分组观察肺纤维化形成过程不同阶段的病理学特征,且未能对实验对象的BALF进行分析测定,以发现其在肺内表达的变化,即局部病变的特异性,有待今后进一步深入研究。

2. 益肺化纤方法疗肺纤维化机理探讨及其意义

糖皮质激素是治疗肺纤维化推荐治疗方案的首选药物⁽⁸⁾,但其受限制颇多且疗效不够满意。本研究将用诸临床获良好疗效的具有益气润肺、化痰解毒功效的益肺化纤方与皮质激素进行对比,试图探索其疗效机理。从“痰证”角度认识本病,临床与实验研究均有报道^(9,10)。本研究通过测定肺纤维化模型的血液流变学、T淋巴细胞亚群、肿瘤坏死因子,发现益肺化纤方能改善血液流变学状态,从而反证了属“痰证”的观点。并进一步认为,通过对炎症的抑制作用,进而抑制肺纤维化的形成是其疗效机理的一个重要环节。

一般认为⁽¹¹⁾,肺纤维化模型形成的机理主要包括:(1)自由基损伤机制;(2)免疫机制(包括炎症细胞及炎症介质);(3)胶原调节失衡机制。围绕其主要作用机制,本研究测定了TNF含量。巨噬细胞是分泌TNF的主要细胞,TNF有多种生物活性。是一种17KD的

多肽激素,与淋巴细胞产生的淋巴毒素比较有30%氨基酸是同源的。它是一种细胞反应因子,当肺组织损伤后,巨噬细胞募集到损伤组织周围而被激活,释放大量TNF,一方面加重炎症反应,另一方面能促进纤维母细胞增生并分泌大量的胶原;另外在巨噬细胞释放的纤维结合素(FN)共同作用下形成初期的肺泡炎症,最终可导致肺纤维化的形成。研究表明,通过抑制TNF的释放达到防治肺纤维化的效应,是益肺化纤方的作用机制之一。

参 考 文 献

- (1) 贺石林. 中医科研设计与统计方法. 长沙. 第1版. 湖南科学技术出版社, 1989:60
- (2) Snider JG, et al. Collagen biosynthesis in bleomycin induced Pulmonary fibrosis in hamster. J Lab Clin Med. 1980; 96:943
- (3) 刘兴汉等. 博莱霉素A₅引起豚鼠弥漫性肺间质纤维化的实验研究, 中华结核和呼吸杂志 1986; 9(1):28
- (4) 陈银祥等. 丹参、川芎嗪及糖皮质激素对肺纤维化保护作用 and 实验研究, 中华结核和呼吸杂志 1987; 10(3):152
- (5) 王晓芝等. BLM致鼠肺损伤过程中丙二醛及羟脯氨酸的动态变化, 中华结核和呼吸杂志 1992; 15(3):158
- (6) Thrall RS, et al. Differential cellular analysis of BALF obtained at various stages during the development of bleomycin induced pulmonary fibrosis in the rat. Am Rev Respir Dis, 1982; 126:488
- (7) 金洪. 汉防己甲素阻断平阳霉素致肺纤维化模型的实验研究. 中华结核和呼吸杂志 1991; 14(6):359
- (8) 中华医学会呼吸病学会. IPF诊断及治疗(试行方案). 中华结核和呼吸杂志 1994; 1:8
- (9) 张纾难. 试论痰血肺痿, 上海中医药杂志 1994; (1):7
- (10) 朱建伟. 丹参、当归对小鼠肺纤维化的抑制作用, 山东中医学院学报 1995; 19(4):267
- (11) 王昌明等. 丹参酮对鼠肺纤维化过程中组织学变化的影响. 中华结核和呼吸杂志 1994; 17(5):308

(收稿日期 1999年1月10日)

Experimental Study on the Pulmonary Fibrosis Treated with

Yifei Huaxian Fang

Zhang Shunan (张纾难), et al

(Sino - Japanese Friendship Hospital, Beijing)

40 wistar rats were used and randomly divided into groups, aerosol inhalation of Pinyangmeisu (western medicine) was used to replicate the pulmonary fibrosis model, as comparing with the control group, the Yifei Huaxian Fang had antugonism to the puomary fibrosis, and its mechanism may be related to the regulating immune function, and improving the state of blood rheology.

(Original article on page 22)

Study of Zhechong on Promoting Blood Circulation to Remove Blood Stasis and Red Cell Immune Response Decorating

Yuan Jing (袁 静), et al.

(Anhui College of TCM, Anhui)

The paper observed the influence of Zhechong on red cell immune function and activating blood circulation against stasis in aging blood stasis model. The results showed that Zhechong not only lowered markedly whole blood viscosity, plasmatic viscosity and packed cell volume and resisted thrombosis, but also promoted red cell immune function, which may be: (1) Rates of RBC C3b receptor and cooperate tumor - RBC rosette enhanced; (2) RBC immune complexes rosette rate could be reduced. Therefore Zhechong may delay aging by effects of activating blood circulation against stasis and red cell immune regulation.

(Original article on page 26)