

小青龙汤对肺纤维化大鼠肺组织的改善作用及机制研究*

卞玉凡¹, 李京¹, 赵春江¹, 赵凌杰^{1△}, 方申存²

(1. 南京大学医学院附属泰康仙林鼓楼医院, 江苏 南京 210046; 2. 南京市胸科医院, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 观察小青龙汤对肺纤维化大鼠肺组织病理变化及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)表达的影响并探讨其作用机制。**方法** 选取 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 60 只,随机数字表法将大鼠分成 4 组,正常组、模型组、阳性对照组、小青龙汤组,除正常组外,其他 3 组大鼠制备肺纤维化模型,造模后第 2 天给药,阳性对照组大鼠灌胃 3.15 mg/kg 强的松药液,小青龙汤组大鼠灌胃 270 mg/kg 的小青龙汤药液,正常组和模型组大鼠灌胃等剂量生理盐水,1 次/d,连续给药 14 d。观察组大鼠一般状况、体质量、肺组织病理变化和肺组织 TGF- β 1、TNF- α 表达。**结果** 给药后第 7 天、第 14 天,和正常组相比,模型组大鼠体质量降低;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠体质量升高,差异有统计学意义($P<0.05$);和正常组相比,模型组大鼠肺纤维化病理积分升高;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠肺纤维化病理积分降低,差异有统计学意义($P<0.05$);和正常组相比,模型组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1 表达升高;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 小青龙汤可改善肺纤维化大鼠肺组织病理变化,其作用机制可能和降低肺组织 TGF- β 1、TNF- α 表达有关。

关键词: 肺纤维化; 小青龙汤; 病理; 肿瘤坏死因子- α ; 转化生长因子- β 1; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)04-0017-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.004

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是指在多种致病因素诱导下出现炎症受损与异常修复过程,导致机体肺间质内胶原纤维与胶原蛋白增生,造成组织结构破坏,为一系列间质性肺疾病的终末期病理改变。患者主要表现为咳嗽、气急及劳力性气促等,随着病情发展,劳力性气促逐渐严重,同时肺泡毛细血管网络的结构单位及功能丧失^[1-2]。在 PF 疾病进展中,肺内多种免疫细胞通过分泌细胞因子和炎症介质等直接或间接影响了疾病的严重程度。目前西医治疗 PF 采用免疫抑制剂和糖皮质激素等,疗效一般,且长期服用产生不良反应。近年来,中医药在肺纤维化治疗取得较好进展^[3-4]。本实验观察小青龙汤对肺纤维化大鼠肺组织改善情况和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达的影响并探讨其作用机制,以期临床治疗提供借鉴。

1 资料与方法

1.1 实验大鼠 选取 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 60 只,6 周龄,购自南京亚东实验动物公司,许可证号:SCXK(苏):2018-23,体质量 180~200 g,平均(192.44 $\pm$ 3.87)g。常规饲养 1 周后开始实验,大鼠分笼饲养,每笼 5 只,温度 22 $^{\circ}$ C~26 $^{\circ}$ C,相对湿度在 55%~65%间,昼夜循环,保持 12 h 光照,大鼠灌胃、添加饲料及换水等都有专人负责。

1.2 实验药物、试剂与仪器 药物:小青龙汤加减方(五味子 6 g,干姜 12 g,炙甘草 6 g,桂枝 9 g,细辛 6 g,芍药 9 g,法半夏 9 g,麻黄 9 g),加清水煎熬,药液浓缩为含生药 1 g/mL;盐酸博来霉素(日本化药株式会社),强的松片(规格:5 mg/片,上海信谊药厂)。试剂:水合氯醛(青岛海慈医疗集团),TGF- β 1、TNF- α 试剂盒(欣博盛生物科技公司),DAB 显色试剂盒(武

收稿日期: 2018-07-16

* 基金项目: 江苏省卫生计生委医学科研项目(Q201614)

第一作者简介: 卞玉凡(1987-)女,硕士,住院医师,主要从事中医肺病治疗工作。

△通信作者: 赵凌杰,Email:billy114@aliyun.com

汉博士德生物公司)。仪器:旋涡混合仪(型号:WH3,上海沪西分析仪器厂),低温冰箱(青岛海尔公司),光学显微镜(型号:Nikon YS100,日本 Olympus 公司),病理组织漂烘仪(型号:PHY-Ⅲ,由常州中威电子仪器厂生产),转轮式切片机(型号:莱卡-2016,由德国莱卡公司生产),包埋机(型号:BMJ-Ⅲ,由常州中威电子仪器厂生产),全自动封闭式组织脱水机(型号:TSJ-Ⅱ,由常州中威电子仪器厂生产)。

1.3 研究方法 随机数字表法将大鼠分成 4 组,正常组、模型组、阳性对照组、小青龙汤组,每组 15 只。除正常组外,其他 3 组大鼠依据叶清^[5]等方法制备肺纤维化模型,大鼠腹腔注射剂量为 0.8 mL/100g 的 2.4%水合氯醛麻醉,四肢和背部固定在鼠板内,持一细绳挂在大鼠上方门齿,细绳牵拉将口腔暴露,维持头部后仰状态,口腔内分泌物清理干净,卵圆钳把大鼠舌头向右侧拉伸,同时弯钳伸入到口腔内将舌根压住以防其后坠,下颌向上提拉,气管内插入泵前软管,若大鼠发生气粗、呼吸急促同时软管中水柱没有伴随大鼠的呼吸进行上下移动则说明已经进入到气管,而后弯钳拔出,快速将剂量为 1 mg/kg 的博来霉素溶液注入气管中,再注入 1 至 2 次 1 mL 空气,以便博来霉素可完全进入到气管中,而后将导管拔出,旋转数次鼠板,以使药物在肺组织内均匀分布。

造模后第 2 天给药,依据大鼠和人每公斤体重折算系数对药量进行计算,阳性对照组大鼠灌胃 3.15 mg/kg 强的松药液,小青龙汤组大鼠灌胃 270 mg/kg 的小青龙汤药液,正常组和模型组大鼠灌胃等剂量生理盐水,1 次/d,连续给药 14 d。

1.4 观察指标 ①观察给药后各组大鼠一般状况,包含呼吸变化、精神、饮食饮水、活动和体重情况。②给药第 7 天、第 14 天分别随机处死 7、8 只大鼠,腹腔注射剂量为 0.8 mL/100g 的 2.4%水合氯醛麻醉,断颈处死后选取肺组织,缓冲液冲洗,10%甲醛固定,而后行酒精梯度脱水、二甲苯透明,石蜡包埋后切片,厚度为 0.4 mm,常规 HE 染色,在光镜下查看各组大鼠肺组织的病理状况,同时依据半定量法检测各组大鼠肺泡纤维化与炎症程度,随机选取一张肺组织切片,在左、中、右分别选取一个视野,光镜下查看定量肺泡的纤维化与炎症程度:0 分,无纤维化、无肺炎;1 分,纤维化程度低,面积低于全肺的 20%,有炎症细胞浸

润,肺泡间隔变厚;2 分,肺纤维化程度达全肺 20%~50%,由胸膜处伸展,但仍局限;3 分,肺纤维化程度达全肺的 50%以上,呈弥漫性,肺泡腔出血,肺泡受损。③免疫组化检测大鼠肺组织内 TGF- β 1、TNF- α 表达状况,石蜡切片脱蜡后将内源性过氧化物酶灭活,热修复暴露抗原位点,置入孵育盒内,使用 PBS 溶液冲洗 3 次,每次 3 min,加入山羊血清,孵育 10 min,在加入一抗兔多克隆抗体,在 4 ℃下过夜。PBS 溶液冲洗 3 次,每次 5 min,滴入二抗在室温下孵育 10 min,使用 PBS 溶液冲洗 3 次,每次 3 min,在滴入辣根酶标记链酶卵白素,采用 DAB 显色,中性树胶封片。棕黄色为染色阳性,使用 Image-Pro Plus 6.0 图片分析检测图像光密度。

1.5 统计学分析 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状况及体质量改变 正常组大鼠气息调匀,呼吸顺畅,活动敏捷,反应灵敏,饮食饮水正常,精神饱满,毛发有光泽,体质量逐渐增大;模型组大鼠饮食饮水减少,活动不够灵活,活动量变少,呼吸急促气粗,咳喘显著,目光呆滞,精神不佳,皮毛无光泽,体质量增长比较慢;阳性对照组和小青龙汤组大鼠气息调匀,呼吸顺畅,活动敏捷,反应比较灵敏,饮食饮水正常,皮毛有光泽,体质量较模型组增长速度快。

给药后第 7 天、第 14 天,和正常组相比,模型组大鼠体质量降低;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠体质量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠体质量改变状况($\bar{x} \pm s, n=15, g$)

组别	第 7 天	第 14 天
正常组	286.34 $\pm$ 5.31	305.41 $\pm$ 6.84
模型组	253.24 $\pm$ 5.19 ^a	261.37 $\pm$ 6.38 ^a
阳性对照组	275.13 $\pm$ 5.42 ^b	295.60 $\pm$ 6.27 ^b
小青龙汤组	278.43 $\pm$ 5.25 ^b	298.86 $\pm$ 6.15 ^b

注:与正常组对比,^a $P < 0.05$;与模型组对比,^b $P < 0.05$

2.2 各组大鼠肺组织病理及病理学积分状况 正常组大鼠肺脏组织及肺泡结构完整、清晰,肺泡壁与肺泡间隔形态完整,无渗出物,未变厚,无炎症细胞浸润

和充血水肿;模型组大鼠肺组织病理变化主要为肺炎,肺泡壁和肺间质大量组织细胞、单核细胞、中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,严重的有脓肿灶出现,肺泡间隔变厚,血管炎病变和局灶性肺水肿,少量肺泡腔内巨噬细胞渗出等;阳性对照组大鼠部分肺泡壁与肺泡间隔变厚,肺间质内有少量炎性细胞浸润,肺泡腔变少,无实变;小青龙汤组大鼠肺脏组织结构清晰,肺泡壁、肺泡间隔及肺泡形态完整,无充血水肿,没有明显变厚,有少量炎性细胞浸润,见图1。

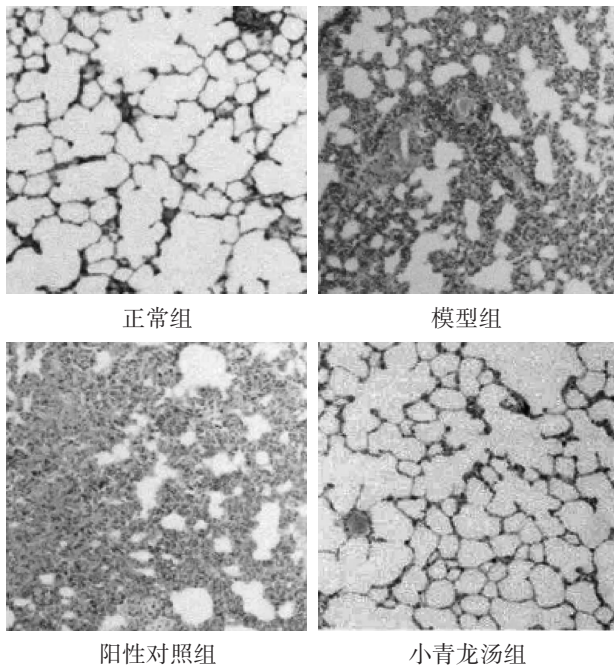


图1 各组大鼠肺组织病理状况(HE×100)

给药后第7天、第14天,和正常组相比,模型组大鼠肺纤维化病理积分升高;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠肺纤维化病理积分降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表2。

表2 各组大鼠肺纤维化病理积分改变状况($\bar{x}\pm s$,分)

组别	第7天	第14天
正常组	0.13±0.05	0.26±0.10
模型组	1.95±0.08 ^a	2.48±0.13 ^a
阳性对照组	0.95±0.07 ^b	1.16±0.13 ^b
小青龙汤组	0.92±0.05 ^b	1.13±0.11 ^b

注:与正常组对比,^a $P<0.05$;与模型组对比,^b $P<0.05$

2.3 各组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1 表达情况
给药后第7天、第14天,和正常组相比,模型组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1 表达升高;和模型组相比,阳性对照组、小青龙汤组大鼠肺组织 TNF- α 、TGF- β 1

表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表3。

表3 各组大鼠肺组织内 TNF- α 、TGF- β 1 表达($\bar{x}\pm s$,IOD)

组别	TNF- α		TGF- β 1	
	第7天	第14天	第7天	第14天
正常组	0.49±0.12	0.29±0.10	0.18±0.06	0.54±0.12
模型组	11.02±0.15 ^a	5.78±0.12 ^a	3.92±0.09 ^a	6.83±0.15 ^a
阳性对照组	2.46±0.16 ^b	1.79±0.10 ^b	0.96±0.07 ^b	1.43±0.14 ^b
小青龙汤组	2.41±0.14 ^b	1.76±0.11 ^b	0.99±0.08 ^b	1.40±0.16 ^b

注:与正常组对比,^a $P<0.05$;与模型组对比,^b $P<0.05$

3 讨论

中医学无肺纤维化病名,依据其劳力性气促、临床咳嗽等症状可归于“肺胀”“痰饮”“咳嗽”“肺痹”等范畴。PF病因复杂,外因是由于环境邪毒、外邪袭肺等使肺络受损,内因是肺肾虚损,气阴两虚,病机是痰瘀痹阻肺络。肺主气,司呼吸,肾纳气,肺肾虚损或外邪袭肺导致肺的宣发肃降功能障碍,引起肺气上逆,发生咳喘;长时间咳喘又会引起肺脏虚损,脾为肺之母,肺虚子盗母气,进而脾虚气弱,无法运化水湿,湿聚成痰;气为血之帅,气虚则无力推动血行,内生血瘀^[6-7]。痰瘀互结,肺脾两虚,耗损肾精,其病机归为肺肾两虚,痰瘀痹阻肺络。依据病机本实验采用小青龙汤治疗,方中麻黄宣肺平喘,桂枝化气行水;干姜、细辛温化痰饮;五味子敛肺止咳,白芍和养营血,五味子与白芍配伍,一散一收,散中有收,开中有合,使水饮去,宣降复;半夏燥湿化痰;炙甘草兼为佐使之药,既可益气和中,又能调和辛散酸收之品。上述药物配伍共起温化痰饮、止咳平喘之功。研究表明,麻黄主要成分是麻黄碱,能缓解支气管平滑肌痉挛,兴奋 β 1与 β 2受体,白芍含有鞣质酸与芍药苷,对细菌与病毒增殖有抑制作用。

PF病变主要累及肺间质与肺泡,病理特点是细胞外基质(ECM)过度沉积与FB的大量聚集,同时伴随不同因素所造成炎症损伤与病变和肺组织结构受损等。肺间质纤维化发病机制未完全明确,相关研究证实,细胞因子介入并介导PF患者病情发展,并起到了重要影响^[8-11]。TNF- α 有广泛生物活性,参加机体内炎症反应,可以介导很多免疫应答反应与炎症反应,其中内源性TNF- α 表达过度可造成肺间质纤维化。TNF- α 能够使炎症细胞聚集,协同白细胞介素-1(IL-1)使嗜中性粒细胞激活同时介导了肺泡的炎症

反应,加速并刺激合成胶原,另外 $\text{TNF-}\alpha$ 还能与其位于肺泡上皮细胞表面的受体结合,使细胞代谢变化,诱使细胞的坏死与凋亡,导致机体肺间质纤维化的形成^[12-16]。 $\text{TGF-}\beta 1$ 是 Th2 型的细胞因子,为对胶原纤维合成最有效物质,从分子水平上对胶原蛋白产生影响,加速形成肺间质纤维化,参加了肺间质纤维化启动与诱导进程,对肺间质纤维化进展方向有直接影响,在肺间质纤维化过程中 $\text{TGF-}\beta 1$ 表达的改变是间质纤维化过程的关键。首先 $\text{TGF-}\beta 1$ 可使 fibroblast 的增殖与转化加速,同时 $\text{TGF-}\beta 1$ 还可使 ECM 降解抑制,增大 ECM 含量,并诱导上皮向间质进行转化^[17-20]。 $\text{TGF-}\beta 1$ 还能够对 VEGF、PDGF 等表达、干扰素和白介素等细胞的分泌与合成影响,加速形成肺纤维化。本文研究显示,给药后第 7 天、第 14 天,和模型组相比,小青龙汤组大鼠肺纤维化病理积分降低,小青龙汤组大鼠肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ 表达降低,差异有统计学意义,说明小青龙汤可改善大鼠肺组织纤维化程度,降低 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{TGF-}\beta 1$ 表达。

综上所述,小青龙汤可明显改善肺纤维化大鼠肺组织病理状况,其作用机制可能和降低肺组织 $\text{TGF-}\beta 1$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 表达有关。

参考文献:

- [1] 杜全宇,王飞.益气活血法治疗肺纤维化的研究进展[J].环球中医药,2016,9(1):119-122.
- [2] FROESE A R, SHIMBORI C, BELLAYE P S. Stretch-induced Activation of Transforming Growth Factor- $\beta 1$ in Pulmonary Fibrosis [J]. American Journal of Respiratory Critical Care Medicine, 2016, 194(1): 84-96.
- [3] 杨小瑜,吴玲,李国平,等.阿尔法骨化醇联合地塞米松减轻小鼠的肺纤维化及其机制[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(4):488-491.
- [4] 吴晓瑛,苟运浩,吕铁锋.丹参川芎嗪对乙型肝炎大鼠转化生长因子- $\beta 1$ 、肿瘤坏死因子- α 表达影响[J].中国卫生检验杂志,2017,6(4):498-501.
- [5] 叶清,李燕芹.肺纤维化动物模型 [J]. 临床肺科杂志,2011,16(8):1248-1249.
- [6] 钱康,范永升.清肺方对结缔组织病相关间质性肺炎模型大鼠抗纤维化作用的实验研究[J].浙江中医药大学学报,2017,41(10):784-789.
- [7] 杨颖溪,柴立民,吴甜甜,等.补肾益肺消癥方对特发性肺纤维化大鼠 Caspase-12 信号通路关键分子基因和蛋白表达的影响[J].北京中医药大学学报,2016,39(7):575-579.
- [8] ZHANG K E, SI X P, JIAN H, et al. Preventive Effects of Rhodiola rosea L. on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(6): 879.
- [9] 刘翔,陈嘉,顾丰华,等.鳖甲煎丸对百草枯致大鼠肺纤维化的改善作用研究[J].世界临床药物,2016,4(3):160-165.
- [10] BECK B. Transforming growth factor - $\beta 1$ and tumor necrosis factor - α concentration in serum during disturbed lymph flow from a liver in rats [J]. Journal of Physiology Pharmacology, 2017, 68(1): 91-98.
- [11] 王清华,姚旭,魏新智,等.黄芩苷对肺纤维化大鼠肺组织氧化应激的反应及炎症细胞的影响[J].中华中医药学刊,2017,35(6):1382-1384.
- [12] 吕昂,王海红,俞文英,等.石荠苎总黄酮对博来霉素致大鼠肺纤维化的治疗作用及其机制[J].中国现代应用药学,2017,34(4):488-491.
- [13] 徐博,王甜,郭伟,等.白藜芦醇联合厄贝沙坦对博来霉素所致大鼠肺纤维化肺组织的保护作用及机制研究[J].解放军医药杂志,2017,29(7):1-4.
- [14] 李德军,靳长俊,纪洪生,等.乌司他丁对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的保护作用 [J]. 中国急救医学,2017,37(9):827-829.
- [15] DI P R, IMPELLIZZERI D, FUSCO R, et al. Ultramicronized palmitoylethanolamide in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Pharmacological Research, 2016, 111: 405-412.
- [16] 赵兴友,周旭,李燕宁.温肺合剂对闭塞性细支气管炎模型大鼠肺组织纤维化和半胱氨酰白三烯受体 1 表达的影响[J].中医药导报,2018,24(8):6-10.
- [17] 蔡琳,李理,江丹.黄芪注射液对肺纤维化小鼠肺组织上皮-间质转分化的影响 [J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(28):3087-3089.
- [18] 柴立民,刘涓,王珍,等.补肾益肺消癥方干预肺纤维化大鼠 $\text{TGF}\beta$ 信号通路的作用机制[J].中国中医基础医学杂志,2013,19(9):1022-1024.
- [19] 彭红,王高峰,牛美兰,等.五羟黄酮对博来霉素诱导大鼠肺纤维化模型的预防及治疗作用 [J]. 广东医学,2017,38(15):2290-2294.
- [20] 李戎,常全颖,牛美兰,等.上皮细胞-间充质细胞转分化 (EMT) 理论环境中的化纤 III 号方调节肺纤维化大鼠 I/II 型细胞因子平衡研究[J].四川中医,2018,36(1):57-59.