

生地提取物对肺纤维化大鼠血气分析影响及抗纤维化机制研究^{*}

张 兴, 陈 麒, 张一乐, 宋秀明, 刘鲁炯, 徐贵华, 张艺宝, 张 炜[△]

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要: **目的** 研究生地提取物对肺纤维化模型大鼠血气分析、肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及干扰素- γ (IFN- γ) 的影响。**方法** 博莱霉素气管内注入法复制大鼠肺纤维化模型, 随机分为正常组、假手术组、模型组、生地注射组、生地口服组和甲强龙组。观察大鼠血气分析、肺组织匀浆 TNF- α 及 IFN- γ 指标。**结果** 与模型组相比, 生地注射组 PaO₂ 增大 ($P < 0.05$), 余各给药组 PaO₂ 有增大趋势; 各给药组 SaO₂ 有增大趋势; 生地注射组 P_{A-a}O₂ 减小 ($P < 0.05$), 余各给药组 P_{A-a}O₂ 有减小趋势; 生地注射组和生地口服组第 7 天和第 28 天 TNF- α 降低 ($P < 0.01-0.05$); 生地注射组第 28 天、生地口服组第 3 天 IFN- γ 升高 ($P < 0.05$), 生地注射组 (第 3 天、第 7 天)、生地口服组 (第 7 天、第 28 天) IFN- γ 有升高趋势。**结论** 生地提取物可改善肺纤维化大鼠动脉血气分析指标, 从而有效治疗肺纤维化, 其机制可能和抑制 TNF- α 表达及促进 IFN- γ 分泌有关。

关键词: 生地; 肺纤维化; 血气分析; 肿瘤坏死因子- α ; 干扰素- γ

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2019)01-0019-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.004

肺间质纤维化属于炎症性疾病, 病变常累及肺泡上皮细胞、肺间质等^[1], 是一种进行性、致死性的肺纤维化疾病^[2], 其发病机制尚未明确^[3], 有效的治疗手段亦未被明确^[4-5]。肺间质纤维化已成为呼吸系统领域研究公认的难点和热点。中医药治疗肺间质纤维化的研究近年来广受关注^[6-10], 为肺间质纤维化的治疗提供了参考。

现代研究表明, 生地的主要成分是梓醇等苷类成份、糖类和多种氨基酸等, 生地的药理作用包括调节免疫功能、抗氧化损伤等^[11]。我们前期研究^[12-13]发现生地注射液可减轻肺纤维化模型动物肺泡炎及肺纤维化程度, 并能改善胶原代谢和对氧自由基的清除能力; 还证实生地对肺纤维化干预可能是通过转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 表达, 从而减轻Ⅲ型胶原 (Col Ⅲ) 的异常沉积这一途径而发挥作用。前期临床研究^[14]还发现生地注射液能改善肺纤维化患者的主要症状, 提

高血氧分压、血氧饱和度和 6 min 步行距离。

本研究采用博莱霉素气管内注入法制作大鼠肺纤维化模型, 重点探究生地提取物对肺纤维化大鼠血气分析、肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 及干扰素- γ (IFN- γ) 指标的影响情况, 以研究生地对肺纤维化的治疗作用及其可能的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠 216 只, 体质量 (200 ± 5) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司 (合格证编号 2016000577159), 饲养于上海中医药大学附属曙光医院动物实验中心。

1.2 药物及试剂 生地提取物 (10 mL/支, 2 g 生药/mL, 生地水煎醇提物, 上海中医药大学附属曙光医院中药制剂室, 批号 160910); 甲强龙粉剂 (注射用甲泼尼龙琥珀酸钠, 40 mg/支, 法玛西亚·普强公司卡拉玛祖分厂, 批号 160JTB); 注射用盐酸博莱霉素

收稿日期: 2018-08-03

^{*} 基金项目: 上海市科委基金资助项目 (16401930100); 上海中医临床重点实验室 (14DZ2273200); 上海中医药大学附属曙光医院四明青年基金 (SGKJ-201809)

第一作者简介: 张兴 (1989-), 男, 硕士, 住院医师, 研究方向: 中西医结合呼吸系统疾病的临床与基础。

[△]通信作者: 张炜, E-mail: zhangw1190@sina.com

(Bleomycin)(15 mg/支, 日本化药株式会社, 批号 J162310); 盐酸氯胺酮注射液(50 mg/mL, 上海中西药业股份有限公司新冈制药厂, 批号 160408); 地西洋注射液(5 mg/mL, 上海旭东海普药业有限公司, 批号 160501); 肝素钠注射液(6250 单位/mL, 中国江苏常州生化千红制药有限公司, 批号 160512); TNF- α 检测试剂盒(晶美生物工程有限公司); IFN- γ 检测试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

1.3 实验仪器 轮转切片机(Leizi Jung RM 2035 Germany); 显微镜(Olympus BX-6 Japan); 血液气体分析仪(Roche OMNI modular system); 生化分析仪(Abbott Aeroset); 免疫酶标仪(Labsystems Dragon Wellscan MK3); 722 分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

2 方法

2.1 模型制备 大鼠购回后于室温 20 $^{\circ}\text{C}$, 自然光照条件下适应性饲养 1 周。采用博来霉素气管内注入法复制大鼠肺纤维化模型。予地西洋(20 mg/kg)腹腔注射, 再予盐酸氯胺酮(20 mg/kg)腹腔注射麻醉。待麻醉后将大鼠仰卧固定, 消毒并切开颈部皮肤, 逐层钝性分离软组织, 暴露气管。在肉眼直视下, 将已抽取博来霉素溶液(8 mg: 2 mL)的 1 mL 注射器经两气管软骨间隙向心刺入气管并继续进针约 0.75 cm, 回抽无阻力后迅速注入 0.3 mL 药液, 随即将大鼠直立旋转, 使药液在肺内均匀分布。缝合切口, 局部皮肤作抗感染处理。正常组动物不造模, 假手术组动物造模方法同造模组, 仅用生理盐水替换博来霉素进行气管内注入。

2.2 大鼠分组 随机分出正常组(27 只)、假手术组(27 只)和博来霉素造模组(108 只) 3 组, 108 只大鼠造模成功后, 按随机数字表随机分入 4 个治疗组: 模型组、生地注射组、生地口服组和甲强龙组, 每组 27 只。

2.3 药物干预 据“人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表”折算^[15], 以临床剂量换算大鼠用药剂量。生地注射组每日按 10 mL/kg 体重腹腔注射生地提取物; 生地口服组每日按 1.5 mL/kg 体重腹腔注射生地提取物; 甲强龙组每日按 2 mg/kg 体重腹腔注射甲强龙, 正常组和模型组每日予注射用水按 10 mL/

kg 体重灌胃。上述各组均造模后第 1 天开始干预, 直至处死日。

2.4 大鼠处理 各组分别于造模后第 3 天、第 7 天及第 28 天各处死 1/3 大鼠, 即 9 只大鼠。大鼠称重后予盐酸氯胺酮(30 mg/kg)腹腔注射麻醉, 大鼠仰卧固定, 打开腹腔, 予 1 mL 肝素化针筒经腹主动脉穿刺采动脉血 0.6 mL, 即刻封闭针孔送血气分析检测。采血后立即延长切口打开胸腔, 于近甲状软骨处切断气管, 完整取出心肺。先将心脏和胸腺摘除干净取出完整肺脏组织, 用 0.9% 生理盐水将取出的肺脏冲洗干净, 放入无菌样品管中, 置低温冰箱中保存待测。

2.5 动物肺组织匀浆的制取 先将组织标本从低温无菌样品管中取出, 在微量天平上剪取组织样品约 3 mg, 在清洁的生物组织碾钵中先加入 0.9% 生理盐水 1 mL, 放入上述肺组织样品, 反复加液氮, 在液氮中迅速碾磨至组织完全粉碎, 用移液器将碾钵中组织匀浆液移至清洁试管中, 用 0.9% 生理盐水 1 mL 冲洗碾钵共 2 次, 将冲洗液移至清洁试管中, 低温离心 2 000 r/min 共 10 min, 用移液器将上清液吸出移至清洁尖底管中, 置低温冰箱待检。

2.6 观察指标 (1) 动脉血气分析: 第 28 天进行血气分析检测, 观察动脉氧分压(PaO_2)、动脉氧饱和度(SaO_2)、肺泡-动脉血氧分压差($\text{P}_{\text{A-aO}_2}$)。(2) 测定 TNF- α 和 IFN- γ 含量: 肺组织匀浆总蛋白(TP)含量测定采用双缩脲法; 肺组织匀浆 TNF- α 和 IFN- γ 含量测定均采用酶联免疫吸附法(ELISA)法, 按照 TNF- α 和 IFN- γ 的 ELISA 试剂盒使用说明书检测 TNF- α 和 IFN- γ 的含量。TNF- α 和 IFN- γ 相对含量采用其与肺组织匀浆 TP 的比值来表示。

2.7 统计学方法 实验数据经正态性检验后均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS21.0 统计软件, 组间多样本均数的比较经方差齐性检验后采用单因素方差分析, 两组间比较经 q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺组织标本大体观察 第 3 天正常组肺脏呈均匀粉红色, 质地柔软; 余各组肺脏粉白相间, 质地稍硬, 部分肺脏组织表面有出血点。第 7 天正常组肺脏

呈均匀粉红色,质地柔软;余各组肺脏粉白相间,质地稍硬,部分肺脏组织表面出现片状出血。第 28 天正常组和假手术组肺脏呈均匀粉红色,质地柔软;生地注射组和生地口服组粉白相间,肺脏表面稍见凹凸不平,但无结节,质偏硬;甲强龙注射组粉白相间,肺脏表面部分凹凸不平,有 1 例肺脏表面有结节、质偏硬;模型组肺脏苍白,体积略小,肺脏表面凹凸不平,甚至有结节,质硬。该观察亦提示肺间质纤维化模型大鼠造模成功。

3.2 动脉血气分析 与假手术组相比,模型组 PaO_2 减小($P<0.01$);与模型组相比,生地注射组 PaO_2 增大($P<0.05$),生地口服组和甲强龙组 PaO_2 有增大趋势。与假手术组相比,模型组 SaO_2 减小($P<0.05$);各给药组 SaO_2 较模型组有增大趋势。与假手术组相比,模型组 $\text{P}_{\text{A-a}}\text{O}_2$ 增大($P<0.01$);与模型组相比,生地注射组 $\text{P}_{\text{A-a}}\text{O}_2$ 减小($P<0.05$),其余各给药组 $\text{P}_{\text{A-a}}\text{O}_2$ 有减小趋势。正常组、假手术组两组之间各指标均无显著差异。见表 1。

表 1 第 28 天各组大鼠动脉血气分析结果比较($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	PaO_2/mmHg	$\text{SaO}_2/\%$	$\text{P}_{\text{A-a}}\text{O}_2/\text{mmHg}$
正常组	9	83.69±3.15	86.41±1.47	23.37±9.38
假手术组	9	82.40±4.15	91.03±5.25	23.42±6.79
模型组	9	59.61±1.67**	72.00±2.72*	36.60±8.88**
生地注射组	9	74.82±2.80 [△]	85.53±6.28	25.81±7.96 [△]
生地口服组	9	68.13±3.13	72.81±2.04	35.96±1.99
甲强龙注射组	9	67.83±4.61	82.21±5.55	31.64±1.36

注:与假手术组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$

3.3 肺组织匀浆 $\text{TNF-}\alpha$ 相对含量 第 3 天、第 7 天、第 28 天,与假手术组相比,模型组 $\text{TNF-}\alpha$ 升高($P<0.01$);正常组、假手术组两组之间均无显著差异。第 3 天与模型组相比,生地注射组 $\text{TNF-}\alpha$ 降低($P<0.05$),生地口服组和甲强龙组有降低趋势。第 7 天各组 $\text{TNF-}\alpha$ 均升高,达到高峰;与模型组相比,生地注射组($P<0.01$)、生地口服组($P<0.01$)、甲强龙组($P<0.05$)均降低。第 28 天各组 $\text{TNF-}\alpha$ 均较低 7 天降低;与模型组相比,各给药组均降低($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 相对含量($\text{TNF-}\alpha/\text{TP}$)

比较($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	第 3 天	第 7 天	第 28 天
正常组	9	10.74±0.36	16.04±1.02	8.06±1.87
假手术组	9	9.08±0.87	16.36±1.59	7.34±0.37
模型组	9	10.35±1.10**	16.94±1.99**	11.59±0.81**
生地注射组	9	7.98±0.19 [△]	11.45±0.16 ^{△△}	10.76±1.52 [△]
生地口服组	9	7.03±1.72	14.00±0.91 ^{△△}	8.69±0.92 [△]
甲强龙注射组	9	9.87±0.42	14.07±2.49 [△]	11.04±1.96 [△]

注:与假手术组相比,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

3.4 肺组织匀浆 $\text{IFN-}\gamma$ 相对含量 第 3 天、第 7 天、第 28 天,与假手术组相比,模型组 $\text{IFN-}\gamma$ 降低($P<0.01$);正常组、假手术组两组之间均无显著差异。第 3 天与模型组相比,生地口服组($P<0.05$)、甲强龙组($P<0.01$) $\text{IFN-}\gamma$ 升高,生地注射组有升高趋势。第 7 天各给药组 $\text{IFN-}\gamma$ 较模型组有升高趋势。第 28 天与模型组相比,生地注射组和甲强龙组 $\text{IFN-}\gamma$ 升高($P<0.05$),生地口服组有升高趋势。见表 3。

表 3 各组大鼠肺组织匀浆 $\text{IFN-}\gamma$ 相对含量($\text{IFN-}\gamma/\text{TP}$)

比较($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	第 3 天	第 7 天	第 28 天
正常组	9	36.13±1.72	62.89±3.56	67.61±3.86
假手术组	9	34.99±1.10	56.50±3.71	79.42±1.27
模型组	9	20.12±1.05*	32.68±2.99*	39.28±1.98*
生地注射组	9	31.94±2.76	34.24±2.57	59.88±1.73 [△]
生地口服组	9	37.07±3.16 [△]	41.57±1.26	78.65±2.12
甲强龙注射组	9	43.23±2.06 ^{△△}	45.30±3.88	52.98±3.07 [△]

注:与假手术组相比,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

4 讨论

生地治疗肺纤维化的临床研究主要包括改善血气分析及肺功能指标、降低 $\text{TGF-}\beta_1$ 、降低 $\text{TNF-}\alpha$ 、调节体液免疫和血液流变学;基础研究主要包括改善肺系数及肺组织病理变化、抑制胶原表达、清除氧自由基、调节细胞因子、改善细胞外基质代谢等。

曙光医院肺病科在以往研究工作基础上,提出“气络伤”是肺纤维化病机核心理论,“气络伤”即气

络的损伤。从肺之气络探讨肺纤维化的病机有两方面^[16]：其一为气络本身及功能失调；其二为邪犯气络，具体包括邪伤卫气、痰瘀伏络、阴伤肺热、他脏失调而内邪干肺络。据此，肺纤维化的治疗原则乃气络虚者宜通补、气络瘀者宜通、通络宜味辛、调补他脏通络。生地清热养阴生津、补肾通痹的作用为肺纤维化的治疗提供了新的方向。

在临床肺纤维化阶段，动脉血气分析通常显示轻度低氧血症，但活动时弥散量减少、 $P_{A-a}O_2$ 加大，使 PaO_2 进一步降低，而动脉血二氧化碳分压 ($PaCO_2$) 即使在病程后期通常能维持在正常范围。患者低氧血症是由通气/血流比例失衡和弥散功能异常产生的；弥散功能异常是由于肺泡毛细血管的横截面积减少和红细胞通过具有功能的肺毛细血管床的单位时间过短以致不能使血红蛋白与氧充分饱和所致^[17]。我们的前期研究^[14]显示表明生地可抑制炎症反应，减少气道腺体分泌，促进肺泡气体交换，从而改善 PaO_2 和 SaO_2 。本研究表明生地注射组在第 28 天可提高 PaO_2 、减少 $P_{A-a}O_2$ ($P<0.05$)；生地口服组在改善 PaO_2 、 SaO_2 及 $P_{A-a}O_2$ 方面显示出优于模型组的趋势。提示生地提取物显示出一定的改善肺纤维化大鼠动脉血气分析指标的能力，且腹腔注射的给药方式疗效更加显著。

肺纤维化的基础是细胞因子网络调控失衡导致大量趋化因子释放而引起炎症细胞聚集、活化^[18]，其中 $TNF-\alpha$ 是肺纤维化过程中起重要作用且具有广泛生物活性的细胞因子，由巨噬细胞分泌，可参与局部损伤和炎症反应。当肺组织损伤后，巨噬细胞募集到损伤组织周围并被激活，释放出 $TNF-\alpha$ ，一方面 $TNF-\alpha$ 加重炎症反应，另一方面能促进纤维母细胞增生，分泌大量胶原^[19]。现在普遍认为 $TNF-\alpha$ 与 IL-1 起协同作用，激活中性粒细胞，介导了早期肺泡炎症反应。本研究表明第 7 天和第 28 天，生地注射组和生地口服组可降低 $TNF-\alpha$ ($P<0.01-0.05$)，提示生地提取物可使肺纤维化模型大鼠肺组织 $TNF-\alpha$ 含量降低。

IFN- γ 由 Th1 淋巴细胞和自然杀伤细胞分泌，具有强大的免疫调节作用，是一种抗纤维化的细胞因

子，可拮抗 Th2 细胞因子白介素-4 (IL-4)、白介素-5 (IL-5) 等的促纤维化活性，也可拮抗 TGF- β 促胶原合成作用，同时能抑制纤维母细胞合成胶原。在大鼠肺纤维化模型中，IFN- γ 可明显抑制纤维化的进展。曾有研究发现 IFN- γ 加小剂量激素长期治疗对单用激素无效的特发性肺纤维化患者，可使高表达的 TGF- β_1 下调，病情得到实质性改善，肺总量、氧分压均有明显增加^[20]。本研究表明生地注射液 (第 28 天)、生地口服组 (第 3 天) 能升高 IFN- γ 含量 ($P<0.05$)，生地注射组 (第 3 天、第 7 天)、生地口服组 (第 7 天、第 28 天) 在升高 IFN- γ 方面均显示出优于模型组的趋势，提示以生地提取物能使肺纤维化大鼠的肺组织 IFN- γ 含量升高。

本研究结果表明生地提取物可改善肺纤维化大鼠动脉血气分析指标，从而有效治疗肺纤维化，其机制可能和抑制 $TNF-\alpha$ 表达以及促进 IFN- γ 分泌有关。

参考文献：

- [1] KONISHI S, ARITA M, ITO I, et al. Composite physiologic index, percent forced vital capacity and percent diffusing capacity for carbon monoxide could be predictors of pirfenidone tolerability in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Internal Medicine, 2015, 54 (22): 2835-2841.
- [2] RICHELDI L, COLLARD H R, JONES M G. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2017, 389(5): 1941-1952.
- [3] PENG D, SI D, ZHANG R, et al. Deletion of SMARCA4 impairs alveolar epithelial type II cells proliferation and aggravates pulmonary fibrosis in mice [J]. Genes & Diseases, 2017, 4(4): 204-214.
- [4] ORI W, KREMER M R. Novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Harefuah, 2015, 154(7): 446-450.
- [5] PEIX L, EVANS I C, PEARCE D R, et al. Diverse functions of clusterin promote and protect against the development of pulmonary fibrosis [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 1906.
- [6] SUXIAN Z, HAO W, JIE L, et al. Medication regularity of pulmonary fibrosis treatment by contemporary traditional Chinese medicine experts based on data mining[J].

- Journal of Thoracic Disease, 2018, 10(3):1775-1787.
- [7] LI M, LI Y, LI J S, et al. Long-term effects of TCM Yangqing Kangxian Formula on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via regulating nuclear factor- κ B signaling [J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2017(3):1-16.
- [8] CHENG L, LI R, ZHOU M, et al. Moxibustion has a positive effect on pulmonary fibrosis: an alternative approach [J]. African Journal of Traditional Complementary & Alternative Medicines, 2017, 14(2):125-129.
- [9] CHU H, SHI Y, JIANG S, et al. Treatment effects of the traditional Chinese medicine Shenks in bleomycin-induced lung fibrosis through regulation of TGF- β /Smad3 signaling and oxidative stress [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1):2252.
- [10] LI L C, KAN L D. Traditional Chinese medicine for pulmonary fibrosis therapy: progress and future[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 198(2):45-63.
- [11] 黄春林, 朱晓新. 中药药理与临床手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:514-515.
- [12] 张炜, 毕小利, 张卓成. 生地注射液对实验性大鼠肺纤维化的胶原代谢影响的实验研究 [J]. 中华实用中西医杂志, 1999, 10(12):1706-1707
- [13] 张炜, 毕小利, 马文欢. 生地对特发性肺间质纤维化基质重建调控作用的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(6):34-36.
- [14] 闫国良, 毕小利, 史苗颜. 生地注射液对肺间质纤维化患者运动耐量影响的临床研究[J]. 中国中医急症, 2010, 19(3):374-375.
- [15] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006:294.
- [16] 王春榆, 张炜. 从气络探讨特发性肺间质纤维化病机[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(6):110-112.
- [17] 侯显明, 于润江. 间质性肺病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:142
- [18] 吕晓东, 庞立健, 王琳琳, 等. 参龙煎剂对博来霉素致大鼠肺纤维化肺组织肿瘤坏死因子- α 及 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(1):171-174.
- [19] BISSONNETTE E, ROLA -PLESZCZYNSKI M. Pulmonary inflammation and fibrosis in a murine model of asbestosis and silicosis. Possible role of tumor necrosis factor[J]. Inflammation, 1989, 13(3):329-339.
- [20] ZIESCHE R, HOFBAUER E, WITTMANN K, et al. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. [J]. N Engl J Med, 1999, 341(17):1264-9.