

· 论著 ·

## 不同剂量凉血活血方防治大鼠放射性肺损伤的研究

杨明会, 窦永起, 林明雄, 冯林春, 刘毅, 杨艳

(解放军总医院, 北京 100853)

**【摘要】** 目的 评价不同剂量凉血活血方对大鼠放射性肺损伤的防治作用。方法 采用多次重复照射右肺的方法建立大鼠放射性肺损伤模型。72 只 Wistar 大鼠被随机分为单纯照射组和凉血活血方大、中、小剂量组, 分批处死大鼠, 对各组大鼠的生物学特征、肺脏外观及组织病理进行观察和比较。结果 凉血活血方大、中剂量组大鼠鼻周红赤、大便干硬等表现轻于小剂量组及单纯照射组; 凉血活血方大、中、小剂量组除放射后 26 周时肺系数与单纯照射组差异无统计学意义外, 其右肺湿重和肺系数在各时间点均明显低于单纯照射组, 且照射 5 周时凉血活血方大、中剂量组右肺湿重亦明显低于小剂量组, 差异有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ )。组织病理学观察显示, 凉血活血方大、中剂量组肺脏表面肿胀、出血, 肺间质充血、水肿以及肺泡结构破坏程度等也明显轻于小剂量组及单纯照射组。结论 凉血活血方能减轻早期放射性肺损伤的炎症反应, 减轻放射性肺纤维化的程度; 而且凉血活血方大、中剂量组的防治效果明显好于小剂量组和单纯照射组。

**【关键词】** 凉血活血方; 中医药防治; 肺损伤, 放射性

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)01-0006-04

**Study on dose-effect relationships in prevention and treatment of radiation-induced lung injury of rat with blood-cooling and blood flow-promoting drugs (凉血活血方)** YANG Ming-hui, DOU Yong-qi, LIN Ming-xiong, FENG Lin-chun, LIU Yi, YANG Yan. People's Liberation Army's General Hospital, Beijing 100853, China

**【Abstract】 Objective** To evaluate the therapeutic effects and dose-effect relationships of different doses of the blood-cooling and blood flow-promoting drugs (凉血活血方) on radiation-induced lung injury of rat. **Methods** Seventy-two Wistar rats were randomly allocated into four groups: irradiation group (group A), small-dose group (group B,  $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), middle-dose group (group C,  $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and high-dose group (group D,  $36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). All groups were repeatedly exposed to small dose of X-ray in the right hemi-thorax, and then the mice were sacrificed at different time points. The living animal features, the macro-changes of lung were observed, and pulmonary histopathological changes in all the groups were investigated, and the results of observation were compared. **Results** The symptoms of red patches around the nose and dry stool in groups C and D were less than those of groups A and B. After 26 weeks, lung coefficient in groups B, C and D was the same as that in group A, but right lung wet weights and lung coefficients at each time point in groups B, C and D were significantly lower than those in group A, and during 5th week, the right lung wet weights in groups C and D were obviously lower than the weight in group B (all  $P < 0.01$ ), the macro-changes and histopathological observations indicated that the swelling appearance and hemorrhage at the lung surface, lung interstitial congestion and edema, and the destruction of alveoli in groups C and D were lower than those in groups A and B. **Conclusion** Using blood-cooling and blood flow-promoting drugs may ameliorate the early radiation-induced inflammatory reaction of lung injury, and decrease the severity of radioactive pulmonary fibrosis; the therapeutic effects in the middle-dose and high-dose groups are much better than those in the small-dose and simple radiation groups.

**【Key words】** prescription for cooling and promoting blood; prevention and treatment of traditional Chinese medicine; radioactive lung injury

放射性肺损伤是胸部肿瘤放射治疗(放疗)常见

并发症, 严重限制了胸部肿瘤放疗的剂量, 从而直接影响了肿瘤局部控制率、患者的预后及放疗后的生存质量<sup>[1]</sup>。放射性肺损伤产生的机制目前尚未完全阐明, 多数研究表明其与多种细胞因子过度表达有关<sup>[2-4]</sup>。为研究应用中医药防治放射性肺损伤的方

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371826); 全军“十一五”课题基金资助项目(06MA251)

作者简介: 杨明会(1962-), 男(汉族), 河北省人, 教授, 博士生导师, Email: ymh9651@yahoo.com.cn.

法,我们模拟临床放疗过程,采用剂量分隔照射大鼠制模,早期应用凉血活血中药进行干预,通过对大鼠活体、肺标本及肺组织的病理观察,了解大鼠放射性肺损伤的动态变化及证候特点,证明早期应用凉血活血中药对放射性肺损伤有明显的防治作用。为进一步研发防治放射性肺损伤中药新药,我们对不同剂量凉血活血方进行了疗效对比观察,报告如下。

## 1 材料与方

**1.1 动物:**健康成年清洁级雌性 Wistar 大鼠 72 只,体重 180~220 g,由解放军总医院医学实验动物中心代购(动物许可证编号:SCXK-2005-0013);实验前常规饲养 3 d,观察无异常者入组实验。

**1.2 中药来源及质控标准:**凉血活血方由生地、川芎、牡丹皮、桃仁、莪术、地龙、连翘等组成,以上中药均购自解放军总后卫生部药材供应站,经中国中医研究院中药研究所鉴定,符合 2000 版《药典》规定。煎制并浓缩成含生药 2.0 kg/L 的汤剂,真空包装,4℃冰箱保存。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组:**按随机数字表法将大鼠随机分为单纯照射组(A组)及凉血活血方小剂量组(B组)、中剂量组(C组)、大剂量组(D组),每组 18 只。

**1.3.2 照射方法:**用速眠新注射液 0.05 ml 肌肉注射麻醉大鼠,于俯卧位固定在照射平台上,模拟机下定位,用直线加速器产生的 6 mV X 线照射,铅块遮挡左肺和纵隔,右肺照射野 2 cm×3 cm。每次 3 Gy,每周 2 次,连续照射 5 周,最高累积剂量 30 Gy。

**1.3.3 给药方法及观察指标:**3 个中药治疗组分别按成人(60 kg 计算)每公斤体重剂量的 5、10 和 20 倍计算给药量,B 组为  $9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、C 组为  $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、D 组为  $36\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,于照射前 1 周开始用灌胃法给药,每日 1 次;A 组给予 2 ml 生理盐水灌胃。每日观察大鼠活动情况,计算前日的进食量,每周称量体重,并调整给药量。

**1.3.4 观察指标:**①大鼠一般情况:包括精神状况、进食量、活动量、毛发、眼睛、粪便等;②双肺大体及切面观察;③右肺湿重并计算右肺系数(右肺系数=右肺湿重/体重×100%);④苏木素-伊红(HE)染色:光镜下观察肺组织形态学变化。

**1.3.5 取材及标本处理:**在完成 10 次照射后,以及在照射完成后的第 12 周和第 26 周,每组随机抽取 6 只大鼠,处死并迅速剖开胸腔,剪断左右主支气管,取大鼠右肺中叶,置于体积分数为 10%的甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋,连续 4 μm 石蜡切

片,行 HE 染色。

**1.3.6 病理学观察:**标本行 HE 染色后,在 20 倍显微镜下观察切片,扫描整个肺段并通过盲法评估肺实质损伤程度之后,以系统抽样法每张切片取 5 个视野进行分析。

**1.4 统计学处理:**数据均以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多个样本均数比较用方差分析, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般情况:**各组大鼠每次照射结束后均出现精神萎靡,进食量、活动量减少,对刺激反应迟钝,且随照射剂量增加而逐渐加重。自照射第 2 周开始,A 组大鼠出现鼻周及眼周红赤、眼睛黄色分泌物和大便干硬;第 3 周后,大鼠皮毛色泽变暗,有个别大鼠出现呼吸急促现象,持续至第 8 周上述症状逐渐消失。与 A 组比较,B、C 和 D 组大鼠精神状态较好,鼻周及眼周红赤、大便干硬发生率低等症状出现时间较晚,持续时间也较短,无呼吸急促现象。至第 7 周时上述表现消失。中药各剂量组间比较,C 组和 D 组大鼠鼻周红赤、大便干硬发生率较 B 组低,但出现时间及持续时间差异无统计学意义。

**2.2 肺脏大体与切面观察:**照射第 5 周时 A 组右肺充血、肿胀明显,色红,可见片状出血斑,切面有泡沫样血性渗出;B 组右肺略肿胀,表面可见散在鲜红点状出血,切面有少量渗出;C 组和 D 组右肺肿胀不明显,表面散在点状出血较 B 组少,切面有少量渗出。各组左肺正常,呈浅粉红色。彩色插页图 1 显示,第 12 周时 A 组肺脏肿胀减退,质地偏硬,表面紫黯色瘀斑,切面无渗出;B 组可见少量暗红色瘀点,切面无渗出;C 组和 D 组见散在暗红色瘀点。第 26 周时 A 组右肺质地硬,表面暗紫,见片状苍白实变灶,切面质地不均匀,无渗出;B 组右肺质地稍硬,表面略暗,见散在瘀斑,苍白实变灶较小;C 组和 D 组右肺与左肺相似,质地正常,未见明显瘀斑及实变灶,切面无渗出。

**2.3 右肺湿重及肺系数结果(表 1):**第 5 周时,B、C 和 D 组右肺湿重均明显低于 A 组,而且 C 组和 D 组右肺湿重均低于 B 组( $P$  均  $<0.01$ ),而 C 组与 D 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。第 12 周和第 26 周时,B、C 和 D 组右肺湿重明显均低于 A 组( $P$  均  $<0.01$ ),而 B、C 和 D 组间比较差异无统计学意义( $P$  均  $>0.05$ )。肺系数测量结果显示:第 5 周和第 12 周时,B、C 和 D 组右肺系数均明显低于 A 组( $P$  均  $<0.01$ ),而 B、C 和 D 组间比较差异无统计学意义

表 1 不同剂量中药对放射性肺损伤大鼠右肺湿重及肺系数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数	右肺湿重(mg)			肺系数(%)		
		5 周	12 周	26 周	5 周	12 周	26 周
A 组	6	1 163±58	1 060±61	998±21	0.447±0.036	0.375±0.028	0.333±0.020
B 组	6	978±66 <sup>a</sup>	890±21 <sup>a</sup>	933±64 <sup>a</sup>	0.377±0.034 <sup>a</sup>	0.325±0.022 <sup>a</sup>	0.315±0.015
C 组	6	875±39 <sup>ab</sup>	866±38 <sup>a</sup>	878±15 <sup>a</sup>	0.344±0.023 <sup>a</sup>	0.310±0.019 <sup>a</sup>	0.282±0.023
D 组	6	875±22 <sup>ab</sup>	858±43 <sup>a</sup>	861±19 <sup>a</sup>	0.358±0.027 <sup>a</sup>	0.311±0.019 <sup>a</sup>	0.281±0.012

注:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

义( $P$ 均 $>0.05$ )。第 26 周时,各组肺系数比较差异均无统计学意义( $P$ 均 $>0.05$ )。

**2.4 病理学观察(彩色插页图 2):**HE 染色观察,第 5 周(累积剂量 30 Gy)时,A 组急性炎症反应严重,肺间质充血、出血、水肿明显,肺泡结构破坏;B 组肺泡间质中度水肿及少量炎细胞浸润;C 组和 D 组肺泡间质轻度水肿及少量炎细胞浸润。第 12 周时,A 组大鼠急性炎症消退,肺泡间质增厚,肺泡腔变小;B、C 和 D 组肺间质增厚不明显,肺泡结构破坏程度较轻。第 26 周时,A 组大鼠肺泡间质被大量纤维组织充填而明显增厚,毛细血管减少,肺泡腔明显萎陷乃至消失,部分区域发生肺实变固缩;B 组大鼠肺泡结构少量破坏,肺泡腔轻度萎陷,纤维组织少于 A 组;C 组和 D 组肺泡结构破坏程度明显减轻,纤维组织均明显少于 A 组,而两组之间差别不大。

### 3 讨论

我们在前期实验中模拟临床放疗的过程,采用剂量分隔照射的制模方法,成功建立了大鼠放射性肺损伤模型。该模型动物死亡率低、模型稳定、可重复性好,更符合临床放疗实际,便于动态观察放射性肺损伤的变化规律,有利于准确认识和把握临床放射性肺损伤的发生发展过程,并为研究放射性肺损伤的发生机制,评价早期干预防治放射性肺损伤的效果提供了一个方便、有效的平台<sup>[5-7]</sup>。本实验仍采用此方法制模成功。

根据中医学理论,我们认为放射线当属“热毒之邪”,由于其具有穿透性,致病与一般热毒之邪不同,不遵循卫气营血传变规律,而是直接损伤肺脏血络。《金匱要略·脏腑经络先后病脉证第一》记载:“极寒伤经,极热伤络”。而临床放疗中,由于要多次重复接受照射,如同反复感受热毒侵袭,不仅热伤肺络证持续发生,而且久则热毒壅滞、脉络瘀阻,或因血溢脉外而成瘀血,从而出现瘀阻肺络证。这一认识在我们前期的实验及本实验中都得到证实。如从大鼠活体来说,大鼠受照射后,出现鼻周及眼周红赤、眼睛内黄色分泌物、大便干硬,甚至出现呼吸急促,呈典型

的中医热毒内盛证表现。从动物肺脏标本及病理组织学观察来看,照射初期大鼠肺脏表面肿胀、颜色鲜红、有片状出血斑,肺间质细胞肿胀、血管充血、出血、渗出明显,这些都与中医热盛则肺、热伤血络、迫血妄行的理论非常相符;实验后期,大鼠肺脏质硬而弹性差,外观颜色晦暗,有明显的暗红色瘀斑,肺组织被大量纤维组织充填,肺泡结构萎陷,毛细血管减少、管腔阻塞,这与中医瘀血阻络证的表现相符。而经凉血活血中药早期干预后,其动物活体、肺脏大体观察及肺组织微观察都显示上述表现均明显减轻,表明凉血活血法防治放射性肺损伤是有效的,同时也验证了上述对放射性肺损伤病因病机的认识。

本实验中不同剂量治疗组大鼠均表现出早期应用凉血活血中药的干预效果,相互之间进行比较显示,C 组和 D 组大鼠肺脏表面的出血点较 B 组少,甚至未见出血点,肺间质充血、水肿轻,肺泡结构破坏更轻,说明大、中剂量凉血活血方效果优于小剂量;而大剂量和中剂量间的差别不大,提示剂量加倍而疗效并不明显增强。因此,中剂量为本实验较理想的有效剂量。

### 参考文献

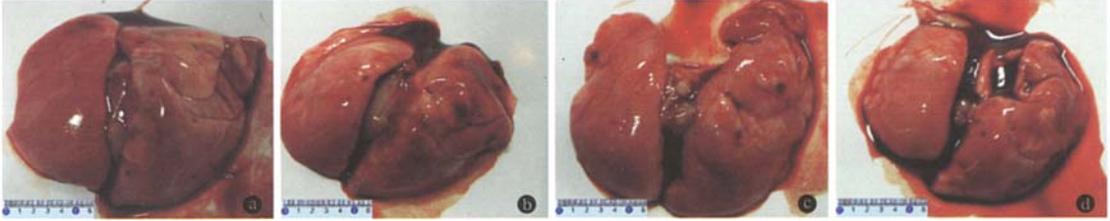
- [1] Anscher M S, Kong F M, Jirtle R L. The relevance of transforming growth factor beta 1 in pulmonary injury after radiation therapy[J]. Lung Cancer, 1998, 19(2):109-120.
- [2] Anscher M S, Chen L, Rabhani Z, et al. Recent progress in defining mechanisms and potential targets for prevention of normal tissue injury after radiation therapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005, 62(1):255-259.
- [3] 曹京旭,张旭志. 细胞因子与放射性肺损伤[J]. 国外医学放射医学核医学分册, 2001, 25(4):181-185.
- [4] 马力文,贾廷珍. 放射性肺损伤[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2004, 24(6):503-505.
- [5] 杨明会,张利军,冯林春,等. 小剂量多次照射大鼠放射性肺损伤模型的评价[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(6):415-417.
- [6] 杨明会,莫永起,刘哲峰. 活血化痰药物防治放射性肺损伤的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(12):1096-1099.
- [7] 臧倩,杨明会. 放射性肺损伤大鼠血清白介素-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  的动态变化[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(2):88-90.

(收稿日期:2007-08-05 修回日期:2007-10-26)

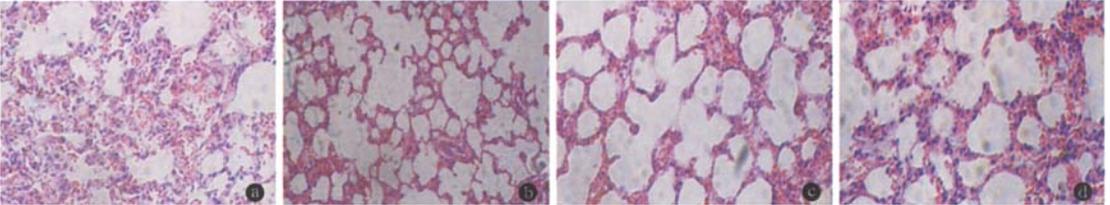
(本文编辑:李银平)

# 不同剂量凉血活血方防治大鼠放射性肺损伤的研究

(正文见6页)



②:单纯照射组;③:凉血活血方小剂量组;④:凉血活血方中剂量组;⑤:凉血活血方大剂量组  
图1 各组大鼠照射右肺第12周肺大体标本



②:单纯照射组;③:凉血活血方小剂量组;④:凉血活血方中剂量组;⑤:凉血活血方大剂量组  
图2 各组大鼠照射右肺第5周(急性炎症期)肺组织病理学观察(HE, ×200)

# 当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响

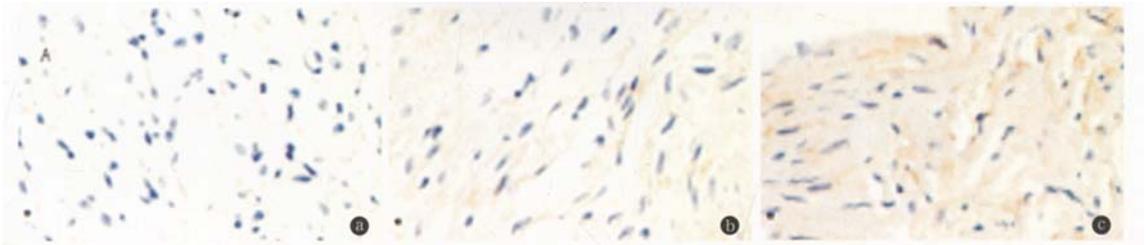
(正文见39页)



①:大体观察;②:光镜观察(HE, ×20)  
图1 AMI大鼠心肌组织病理学观察(箭头示心肌梗死灶)



②: sham组;③: AMI组;④: 当归干预组  
图3 各组大鼠术后1周心肌细胞凋亡情况(TUNEL, ×400)



②: sham组;③: AMI组;④: 当归干预组  
图5 各组大鼠术后1周心肌细胞中Bcl-2的表达(免疫组化SP法, ×400)