

• 论著 •

宣肺通腑化痰法对肺间质纤维化小鼠羟脯氨酸
和转化生长因子- $\beta 1$ 含量的影响胡 静¹, 郭永洁¹, 刘旭凌²

(上海中医药大学①基础医学院, ②研究生部, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨宣肺通腑化痰法防治肺间质纤维化(PF)的作用及其机制。方法 将 28 只 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、宣肺通腑化痰法(中药)组、泼尼松组 4 组, 每组 7 只。经鼻滴入博来霉素建立小鼠 PF 模型。中药组和泼尼松组于制模 8 h 内开始分别灌胃中药组方 15.86 g/kg 或泼尼松 1.3 mg/kg, 每日 1 次, 连用 28 d; 对照组及模型组给予等量生理盐水。于制模 28 d 取小鼠肺组织观察病理学改变及纤维化程度; 用酶联免疫吸附法测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)含量; 用样本碱水解法检测肺组织中羟脯氨酸(HYP)含量。结果 模型组小鼠肺炎症及纤维化程度均明显重于对照组; 肺组织中 HYP 含量及 BALF 中 TGF- $\beta 1$ 含量均较对照组显著升高(P 均 <0.01)。中药组和泼尼松组炎症及纤维化程度明显改善, HYP 及 TGF- $\beta 1$ 含量均明显低于模型组(P 均 <0.01), 且中药组 TGF- $\beta 1$ 降低程度更为显著($P<0.05$)。结论 宣肺通腑化痰法能明显减轻博来霉素致小鼠 PF 程度, 降低肺组织中 HYP 含量, 其机制可能是通过抑制 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达, 减少胶原蛋白产生, 使 PF 病变减轻。

【关键词】 肺间质纤维化; 转化生长因子- $\beta 1$; 羟脯氨酸; 中药疗法; 宣肺通腑化痰法

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.015

Effect of dispersing lung-qi combined with purgation and eliminating stasis method (宣肺通腑化痰法) on contents of hydroxyproline and transforming growth factor- $\beta 1$ in mice with pulmonary fibrosis HU Jing*, GUO Yong-jie, LIU Xu-ling. * Preclinical Medicine College of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

【Abstract】 **Objective** To explore the effect and mechanism of dispersing lung-qi combined with purgation and eliminating stasis method (宣肺通腑化痰法) on prevention and treatment of pulmonary fibrosis (PF). **Methods** Twenty-eight ICR mice were randomly divided into four groups: control, model, dispersing lung-qi combined with purgation and eliminating stasis [traditional Chinese medicine (TCM)] and prednisolone groups ($n=7$, each). The PF model of mouse was established by bleomycin (BLM) nasal instillation. In 8 hours after the model establishment, the mice were respectively treated with intra-gastric infusion of 15.86 g/kg herb decoction in TCM group and 1.3 mg/kg dehydrocortisone in prednisolone group, once a day for 28 days; while in the control and model groups, an equivalent amount of normal saline was given by gavage once daily. On the 28th day after the model establishment, the lung tissues were taken from the mice for histopathology study to observe the degree of airsacculitis and fibrosis. The transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) content of the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and the hydroxyproline (HYP) level in lung tissues was measured by alkaline hydrolysis. **Results** The degrees of airsacculitis and fibrosis in model group were obviously higher than those in the control group. Compared with control group, the HYP content in lung tissues and the level of TGF- $\beta 1$ in BALF were increased significantly in model group (all $P<0.01$). In TCM and prednisolone groups, the pathological degrees of airsacculitis and fibrosis were improved obviously; the contents of HYP and TGF- $\beta 1$ were lower than those in the model group (all $P<0.01$), and the content of TGF- $\beta 1$ was decreased more evidently in TCM group than that in the prednisolone group ($P<0.05$). **Conclusion** In the mouse model of PF induced by BLM, the TCM therapy, method of dispersing lung-qi combined with purgation and eliminating stasis, can reduce the degree of PF and decrease the HYP content in the lung tissues. Its possible mechanism might be related to the inhibition of TGF- $\beta 1$ protein expression and in turn decrease of collagen protein production, eventually leading to the amelioration of PF.

【Key words】 pulmonary fibrosis; transforming growth factor- $\beta 1$; hydroxyproline; traditional Chinese medicine therapy; dispersing lung-qi combined with purgation and eliminating stasis method

肺间质纤维化(PF)以成纤维细胞增殖和细胞外基质(ECM)在肺内过度沉积为特征^[1],同时也是许多不同肺间质疾病的共同结局。西医以皮质激素和细胞毒药物治疗,但临床上仅有 10%~30%的 PF 患者经糖皮质激素治疗有一定的疗效^[2],而且激素副作用很大,限制了其临床应用。因此,中医药抗 PF 治疗有其应用前景和治疗优势。本研究中通过观察转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 含量变化,探讨宣肺通腑化痰法对 PF 的干预作用及其可能机制,为 PF 提供中医辨证论治新治法和有效方剂。

1 材料与方法

1.1 主要药品:泼尼松片由上海医药(集团)有限公司信谊制药总厂生产(批号:071201);宣肺通腑化痰药物购于上海中医药大学附属曙光医院,按常规方法煎制成含生药 1 g/ml。天狼星红购自德国默克公司。小鼠 TGF- $\beta 1$ 定量酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒由上海森雄科技实业有限公司生产;羟脯氨酸(HYP)试剂盒由南京建成生物工程有限公司生产。博来霉素(BLM)粉剂每支 15 mg,由日本化药株式会社生产(批号:270560)。

1.2 动物分组和模型建立:雄性清洁级 ICR 小鼠 28 只,体重 25~28 g,由上海中国医学科学院药物研究所实验动物中心提供。按随机数字表法将小鼠分为对照组、PF 模型组、宣肺通腑化痰法组(中药组)、泼尼松组 4 组,每组 7 只。采用经鼻滴入 BLM 7 $\mu\text{g/g}$ (20 μl) 的方法^[3]建立 PF 模型;对照组经鼻滴入生理盐水 20 μl 。

1.3 给药方法和剂量:宣肺通腑化痰药物组成:生石膏 15 g,生大黄(后下)9 g,杏仁 6 g,瓜蒌皮 30 g,桃仁 9 g,土鳖虫 12 g。中药组于制模 8 h 开始按 15.86 g/kg 灌胃;泼尼松组同时给予 1.3 mg/kg 泼尼松;对照组及模型组给予等量生理盐水灌胃;均每日 1 次,连用 28 d。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 肺组织病理学观察:各组小鼠于制模 28 d 处死,取新鲜分离的右下叶肺组织,常规固定、石蜡包埋,每个蜡块连续切片 2 张,1 张行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织病理学变化;1 张行天狼星红染色,光镜下观察有无 PF 及其程度。

1.4.2 肺组织 HYP 含量测定:取于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻

存的肺组织,用样本碱水解法检测肺组织 HYP 含量,按测试盒说明书操作。

1.4.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)中 TGF- $\beta 1$ 含量测定:用 ELISA 检测 BALF 中 TGF- $\beta 1$ 蛋白含量,操作均按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析:数据用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。结果以均数士标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,对各组数据行单因素方差分析(one-way ANOVA)和组间比较(方差齐用 LSD 检验,不齐用 Games-Howell 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宣肺通腑化痰法对 BLM 致 PF 小鼠肺组织 HYP 含量的影响(表 1):制模 28 d 模型组 HYP 含量较对照组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,泼尼松组、中药组 HYP 含量均显著下降,差异有统计学意义(P 均 < 0.01),中药组 HYP 含量较泼尼松组低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 HYP 及 BALF 中 TGF- $\beta 1$ 含量的比较($\bar{x} \pm s_x$)

组别	动物数	HYP 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$)	TGF- $\beta 1$ 含量($\mu\text{g}/\text{L}$)
对照组	7	1.02 $\pm$ 0.03	4.45 $\pm$ 0.28
模型组	7	1.22 $\pm$ 0.33 ^a	8.05 $\pm$ 0.43 ^a
中药组	7	0.96 $\pm$ 0.03 ^b	6.07 $\pm$ 0.09 ^b
泼尼松组	7	1.00 $\pm$ 0.02 ^b	6.94 $\pm$ 0.13 ^{bc}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与中药组比较,^c $P < 0.05$

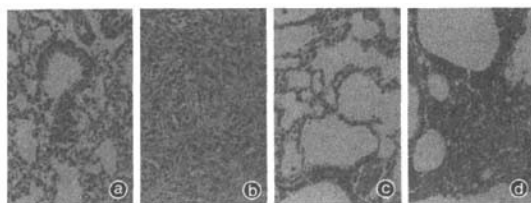
2.2 宣肺通腑化痰法对 BLM 致 PF 小鼠 BALF 中 TGF- $\beta 1$ 含量的影响(表 1):制模 28 d 模型组 TGF- $\beta 1$ 含量较对照组显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,泼尼松组、中药组 TGF- $\beta 1$ 水平均显著下降(P 均 < 0.01),且中药组 TGF- $\beta 1$ 含量较泼尼松组低($P < 0.05$)。

2.3 宣肺通腑化痰法对 BLM 致 PF 小鼠肺组织病理学改变的影响(图 1~2):对照组小鼠肺组织结构清晰,肺被膜未见纤维素渗出及炎性细胞浸润,肺泡壁完整,肺泡隔完整、无增宽,无肺萎陷及血管壁增厚,支气管腔及肺泡腔内未见炎性渗出物,少数小鼠各级支气管壁及肺泡间隔可见少量炎性细胞浸润。模型组制模 28 d 时肺组织可见实变区呈斑片状分布,在支气管周围病变尤为明显。肺泡间隔增宽充血,可见大量炎性细胞浸润。局部 I 型肺泡上皮细胞增生,肺泡腔内可见巨噬细胞簇集成团,局部可见陈旧性出血灶,纤维母细胞及纤维细胞增生,纤维化区可见大量增生的纤维细胞和胶原纤维沉积,炎性细

基金项目:上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目(szy05003);辽宁省自然科学基金资助项目(2001101029)

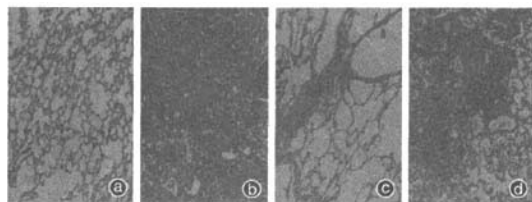
作者简介:胡 静(1975-),女(汉族),黑龙江省人,博士研究生,讲师,主要从事温病治法防治肺纤维化研究。

胞相对较少,可见大小不等的囊性纤维气腔形成,即“蜂窝肺”。制模 28 d 时已具备成纤维细胞灶、伴胶原沉积的瘢痕化、蜂窝等可诊断为普通型间质性肺炎/特发性肺间质纤维化(UIP/IPF)的病变^[4]。中药组和泼尼松组在制模 28 d 后病变程度较模型组有所减轻,而且中药组胶原沉积、成纤维细胞灶较泼尼松组减少,炎性细胞浸润也减轻。



①:对照组;②:模型组;③:中药组;④:泼尼松组

图 1 各组制模 28 d 小鼠肺组织病理学变化(HE, ×400)



①:对照组;②:模型组;③:中药组;④:泼尼松组

图 2 各组制模 28 d 小鼠肺组织纤维化程度(HE, ×200)

3 讨论

PF 的特点是 ECM 过度沉积,胶原蛋白合成的速度大于降解的速度^[5],因此胶原纤维显著增多,最终导致胶原的逐渐累积。HYP 是胶原纤维中特有的一种氨基酸,约占胶原蛋白的 13.4%,其他除弹性硬蛋白含少量 HYP(约 1%)外,均不含 HYP。因此, HYP 含量的测定成为间接反映胶原含量的敏感指标而被广泛应用于 PF 的研究。TGF- β 1 亦参与纤维增殖性病变,是间叶细胞分化的重要调节因素,是强效的致纤维化因子^[6]。本实验中用宣肺通腑化痰法防治 PF 28 d 后, HYP 和 TGF- β 1 含量显著下降,这说明宣肺通腑化痰法能明显减轻 BLM 所致的小鼠肺泡炎症及纤维化程度,其机制可能是通过抑制 TGF- β 1 蛋白的表达,减少了胶原蛋白的产生。

中医认为 PF 的病机主要是毒、瘀、痰、虚。唐容川在《血证论》中精辟地指出“瘀血乘肺,咳逆喘促”,强调瘀血是本病的主要病机之一。当代医家邱颂平^[7]也认为,“瘀”作为主轴贯穿本病的整个过程,提倡在此基础上要辨证施治。现代医学认为 PF 的病理过程分为渗出期、增生期、纤维化期 3 个阶段。实

际上纤维增生过程在渗出期即已发生,构成炎症反应和修复过程同时存在的不均一性特征。一般而言,渗出期多以邪、痰、瘀为主,包括风热邪毒犯肺、肺络痹阻型,痰热壅肺、痰瘀互阻型。国内外医学专家建议,尽可能在疾病的早期进行干预治疗^[8]。其中,痰热壅肺、痰瘀互阻型非常常见,为急性发病,病程很短,病死率最高,此型为 PF 治疗中的关键所在,治以清热化痰、宣肺平喘、活血化痰^[9]。为此,宋建平等^[10]用乌蛇散、瓜蒌薤白汤、复方丹参片治疗;殷明伟等^[11]用清燥救肺汤合活血化痰药治疗;于慎中^[9]老中医在临床自拟方中重用丹参、赤芍、川芎活血化痰,加上黄芩、瓜蒌、桔梗、杏仁清热化痰治疗。在诸多临床经验报道中均未结合运用通腑法进行治疗。因此,我们拟定宣肺通腑化痰法,选用宣白承气汤(《温病条辨》)合下瘀血汤(《金匱要略》)对 PF 进行早期防治。宣肺通腑化痰法是宣肺通腑法与活血化痰法合用治法的简称。宣肺通腑法就是依据肺与大肠的表里关系而设立的肺肠合治法,其核心是肺气宣降与大肠的腑气承顺密切相关,其特点强调了肺肠气机的“升降出入”,顺应了肺主宣发肃降、六腑以通为用的生理特点,充分体现了肺肠相关性。本课题组发现宣肺通腑化痰法能明显减轻 BLM 致小鼠 PF 程度,降低肺组织中 HYP 含量;机制可能是通过抑制 TGF- β 1 蛋白表达,减少胶原蛋白产生,使 PF 病变减轻。PF 是临床难治病,病理机制非常复杂,还有待进一步深入研究宣肺通腑化痰法的作用机制,以期提高宣肺通腑化痰法在 PF 治疗中的应用价值,减少 PF 给国家带来的经济和社会负担。

参考文献

- [1] 李莉,李燕芹,格列卫对博来霉素致小鼠肺纤维化的干预作用[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(4): 229-232.
- [2] 罗玲,刘忠. 特发性肺纤维化的治疗现状[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(9): 967-969.
- [3] 胡萍,高占成. 博来霉素致小鼠肺纤维化模型的动态演变及其发生机制[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8): 474-478.
- [4] 易祥华. 介绍特发性间质性肺炎的 ATS/ERS 分类及病理诊断[J]. 诊断病理学杂志, 2005, 12(6): 401-404.
- [5] 刘爱华,黄炎,魏江磊. 复元愈肝胶囊抗大鼠肝纤维化的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 180-182.
- [6] 周长福,李志军,刘红栓. 血必净联合前列腺素 E1 对肺纤维化大鼠转化生长因子- β 1 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 186.
- [7] 邱颂平. 活血化痰药治疗肺纤维化之思考[J]. 福建中医学院学报, 2007, 17(4): 8-10.
- [8] 武慧,冯一中,顾振纶. 肺间质纤维化的治疗现状[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(8): 620-624.
- [9] 于慎中. 特发性肺纤维化的治疗体会[J]. 山西中医, 2007, 23(2): 3-4.

[10] 宋建平,李瑞琴,刘方洲,等. 中药防治肺纤维化的实验研究[J]. 医学研究通讯,2004,33(2):24-25.
[11] 殷明伟,刘敏. 特发性肺纤维化的中医辨证治疗探讨[J]. 浙江

中医杂志,2007,42(7):414-415.
(收稿日期:2009-01-20 修回日期:2009-07-10)
(本文编辑:李银平)

• 经验交流 •

愈脑丹治疗急性脑出血疗效观察

袁丹桂,徐成森

(湖北省公安县中医医院脑病专科,湖北 公安 434300)

【关键词】 脑出血,急性;愈脑丹;中西医结合疗法

中图分类号:R242 文献标识码:B DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.04.016

在常规治疗基础上加用愈脑丹治疗急性脑出血患者疗效显著,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料:65 例均为本科 2006 年 3 月—2009 年 4 月住院患者,符合中华医学会制定的脑血管疾病诊断标准并经颅脑 CT 或磁共振成像(MRI)确诊为急性脑出血,且排除外伤、血液病所致脑出血的患者。按随机原则将患者分为治疗组和对照组,两组患者入院时均有昏迷、嗜睡或昏睡,一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$),有可比性。

1.2 治疗方法:两组均予西医常规治疗,根据病情予以吸氧、保持呼吸道通畅、营养支持疗法、镇静、控制脑水肿、调控血压、维持水和电解质及酸碱平衡、防止并发症等对症处理。治疗组在常规治疗基础上,加用愈脑丹口服或鼻饲,基础方为例扣草 30 g,益母草 30 g,地精草 30 g,土鳖虫 10 g,西洋参 15 g,车前子 15 g,三七粉 15 g,水蛭 12 g,茯苓 10 g,石菖蒲 10 g,胆南星 10 g;每日 1 剂,水煎服取汁 300 ml,每次 100 ml、每日 3 次,两组均治疗 30 d。

1.3 观察指标:观察两组患者治疗前后中医证候积分、神经功能缺损程度评分(NDS)及颅内血肿吸收情况。

1.4 疗效判定标准:疗效评定参照中华神经科学会和中华神经外科学会制定的相关标准。

1.5 统计学处理:计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据处理采用 χ^2 检

表 1 两组患者临床疗效比较

例(%)

组别	例数	基本痊愈	显著进步	进步	无变化	恶化	死亡	总有效
治疗组	33	6(18.2)	15(45.4)	7(21.2)	2(6.1)	1(3.0)	2(6.1)	28(84.8) ^b
对照组	32	4(12.5)	10(31.3)	9(28.1)	4(12.5)	2(6.2)	3(9.4)	23(71.9)

注:与对照组比较,^b $P < 0.05$;总有效=基本痊愈+显著进步+进步

表 2 两组患者治疗前后中医证候积分、NDS 及颅内血肿吸收情况比较

组别	例数	中医证候积分($\bar{x} \pm s$,分)		NDS($\bar{x} \pm s$,分)		颅内血肿吸收情况(例(%))	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	完全吸收	部分吸收
治疗组	33	49.87±4.25	14.86±3.28 ^{ab}	39.26±2.07	9.16±2.35 ^{ab}	21(67.74)	10(32.26) ^b
对照组	32	48.46±4.57	23.94±3.36 ^a	38.79±2.49	16.81±2.58 ^a	16(55.17)	13(44.83)

注:与本组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

验、 t 检验和 Ridit 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1~2 结果显示:治疗组综合疗效明显优于对照组($P < 0.05$)。两组患者治疗后中医证候积分、NDS 及颅内血肿吸收情况均较治疗前明显改善,且治疗组改善程度明显优于对照组,差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。

3 讨论

现代医学认为,急性脑出血主要病理表现是脑组织局部出血以及血肿形成所致脑水肿,治疗的关键在于降低颅内压,减轻脑水肿。急性脑出血属中医“中风”范畴,一般认为其病因主要是风、火、痰、瘀、虚,病机为阴阳失调、气血逆乱、上犯于脑,其根本在于离经之血瘀于脑脉,脉道不利则津液循行不畅,津液外渗而致脑组织水肿,由此而诸症俱生。瘀血、水肿为中风急性期的重要环节之一,因此活血化瘀、利水消肿是中风急性期治疗的关键。

愈脑丹系本科徐成森主任医师的经验方,该方选用土鳖虫、三七、水蛭、倒扣草、益母草、茯苓、车前子活血化瘀、利水消肿;地精草、胆南星、石菖蒲清热熄风、化痰开窍;西洋参补气养阴、清火生津。诸药合用以取逐瘀、消肿、熄风、豁痰、补虚之功效,可谓切中病机。

药理研究表明,活血化瘀类中药可促进脑血管侧支循环建立,增加脑缺血区的血流分布,提高神经细胞的耐缺氧能力,促进血肿吸收^[1]。茯苓、车前子有明显的利尿作用^[2],可促进脑水肿的消退,因此使用愈脑丹治疗急性脑出血在临床收到了良好的效果。

参考文献

[1] 陈汝兴. 应加强脑血管疾病活血化瘀治疗的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2000,7(3):131-132.
[2] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:6,403,1597.

(收稿日期:2009-06-22)
(本文编辑:李银平)

基金项目:湖北省中医药中西医结合科研项目(20081-B07)

作者简介:袁丹桂(1959-),男(汉族),湖北省人,副主任医师。