

复方苦参注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究

李 晗, 高云航, 宋 玲, 陈腾飞, 侯红平, 叶祖光, 张广平*

中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

摘要: **目的** 探讨复方苦参注射液对博来霉素诱导肺纤维化模型大鼠的影响及相关机制。**方法** 将120只SD大鼠随机分为对照组、假手术组、模型组及复方苦参注射液低、中、高剂量(注射液原液1、2、4 mL·kg⁻¹)组, 每组20只, 采用气管内注射博来霉素方法制备肺纤维化大鼠模型, 造模24 h后给药组ip复方苦参注射液, 第14、28天取材。观察大鼠一般状态、肺系数、肺功能、肺组织病理变化, 并采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的水平, 进一步检测肺组织中羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)表达量的变化。**结果** 大鼠的一般情况观察发现, 与假手术组比较, 模型组大鼠食量及饮水量均有所下降, 精神萎靡, 毛色暗淡发黄, 同时模型组大鼠出现拱背及口唇、爪甲及尾尖均呈现紫黯现象, 部分大鼠出现口鼻出血, 呼吸困难现象。给予复方苦参注射液后, 肺纤维化模型大鼠的活动和精神状态均有改善作用。与假手术组比较, 模型组大鼠体质量明显降低($P<0.01$ 、 0.001), 肺系数显著增加($P<0.001$), 肺功能指标潮气量下降($P<0.001$), 气道阻力升高($P<0.001$), 动态肺顺应性降低($P<0.001$), 肺组织发生纤维化、炎细胞浸润等明显损伤, 血清中TNF- α 和IL-1 β 水平显著升高($P<0.001$), 肺组织中HYP水平显著升高($P<0.001$), 而SOD活性则显著下降($P<0.001$), MDA水平有增加趋势。与模型组比较, 复方苦参注射液低、中剂量组大鼠体质量显著增加($P<0.05$ 、 0.001), 大鼠肺系数显著降低($P<0.05$ 、 0.001), 潮气量显著上调($P<0.001$), 气道阻力显著降低($P<0.01$ 、 0.001), 动态肺顺应性显著上调($P<0.01$ 、 0.001), 大鼠肺组织纤维化程度明显减轻, 血清中TNF- α 水平降低($P<0.01$ 、 0.001), 肺组织中HYP含量显著降低($P<0.01$), SOD活性则显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), MDA有下调趋势, 但差异不显著。**结论** 复方苦参注射液可改善肺纤维化模型大鼠肺功能与肺部形态学病变, 降低血清中TNF- α 水平, 以及下调肺组织中HYP含量与提高SOD活性, 减轻炎症反应并增加抗氧化能力, 对肺纤维化大鼠产生保护作用。

关键词: 复方苦参注射液; 肺纤维化; 博来霉素; 肺功能; 炎症反应; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)02-0241-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.006

Pharmacodynamic study of Compound Kushen Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats

LI Han, GAO Yunhang, SONG Ling, CHEN Tengfei, HOU Hongping, YE Zuguang, ZHANG Guangping

Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Compound Kushen Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** 120 SD rats were randomly divided into control group, Sham operation group, model group, low-, middle- and high-dose (1, 2, 4 mL·kg⁻¹) groups of Compound Kushen Injection, with 20 rats in each group. The rat model of pulmonary fibrosis was established by exposed injection of bleomycin into trachea. Compound Kushen Injection was intraperitoneally injected 24 h after the model was established. The rats were killed on the 14th and 28th day. The general state, lung coefficient, lung function and pathological changes of lung tissue were observed. The serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of hydroxyproline (HYP), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue were detected. **Result** Through the observation of the general situation of rats, it is found that compared with the sham operation group, the food and water consumption of the model group decreased, the spirit was

收稿日期: 2021-07-10

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFC1602104); 中国中医科学院中药研究所自主选题项目(ZXKT20015)

第一作者: 李 晗(1989—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药理研究。E-mail: wzf38@126.com

*通信作者: 张广平, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药药理研究。E-mail: iamzgp@163.com

depressed, and the hair color was dim and yellow. At the same time, the model group rats had arched back, and the lips, claw nails and tail tips were purple. Some rats had mouth and nose bleeding and dyspnea. After administration of Compound Kushen Injection, the activity and mental state of pulmonary fibrosis model rats were improved. Compared with the Sham operation group, the body mass of the model group decreased significantly ($P < 0.01, 0.001$), the lung coefficient increased significantly ($P < 0.001$), the tidal volume of pulmonary function index decreased ($P < 0.001$), the airway resistance increased ($P < 0.001$), the dynamic lung compliance decreased ($P < 0.001$), and the lung tissue suffered obvious injury such as fibrosis and inflammatory cell infiltration, the levels of TNF- α and IL-1 β in serum increased significantly ($P < 0.001$), the level of HYP in lung tissue increased significantly ($P < 0.001$), while the activity of SOD decreased significantly ($P < 0.001$), and the level of MDA increased. Compared with the model group, the body mass of rats in the low- and medium-dose groups of Compound Kushen Injection increased significantly ($P < 0.05, 0.001$), the lung coefficient decreased significantly ($P < 0.05, 0.001$), the tidal volume increased significantly ($P < 0.001$), the airway resistance decreased significantly ($P < 0.01, 0.001$) and the dynamic lung compliance increased significantly ($P < 0.01, 0.001$), and the degree of pulmonary fibrosis decreased significantly, the level of TNF- α in serum decreased ($P < 0.01, 0.001$), the content of HYP in lung tissue decreased significantly ($P < 0.01$), and the activity of SOD increased significantly ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). MDA decreased, but the difference was not significant. **Conclusion** Compound Kushen Injection can improve pulmonary function and pulmonary morphological changes, and reduce serum TNF- α in rats with pulmonary fibrosis, and down regulate the content of HYP in lung tissue, increase SOD activity, reduce inflammatory reaction and increase antioxidant capacity, which has a protective effect on pulmonary fibrosis rats.

Key words: Compound Kushen Injection; pulmonary fibrosis; bleomycin; pulmonary function; inflammatory reaction; oxidative stress

肺纤维化(pulmonary fibrosis)是由多种因素引起肺泡上皮反复破坏修复,导致肺泡持续损伤,同时成纤维细胞过度增殖,并大量分化为肌成纤维细胞,引发大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积并伴随炎症损伤,最终导致肺间质、肺泡等肺组织结构破坏,肺功能下降的一种慢性、致死性肺疾病^[1-2]。目前肺纤维化发病机制不明确,且没有理想的治疗方法^[3-4]。随着大众科学意识的提高与医疗条件的不断完善,被诊断为肺纤维化的患者明显增多。现阶段临床多选用糖皮质激素、免疫抑制剂和细胞毒性药物进行治疗,治疗效果欠佳,不良反应较大^[5-6]。肺纤维化在中医古籍中并无完全对应的病名,但多数现代医家认为其属于“肺痿”“肺痹”等范畴,其病机要点为热毒、气虚、阴虚与血瘀。根据其证候特点,应当选择清热解毒、活血散结为治法^[7]。复方苦参注射液主要由苦参和白土苓2味中药组成,具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛的功效^[8]。研究表明复方苦参注射液通过调控上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT)相关的TGF- β_1 /Smads及Wnt/ β -catenin信号通路^[9],进而对放射性肺损伤小鼠产生保护作用。与此同时,EMT作为肺纤维化发生与发展的重要环节,复方苦参注射液是否具有治疗肺纤维化的作用尚未见相关研究。因此本实验通过气管内注射博来霉素制备大鼠肺纤维化模型,观察复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠的肺功能、肺系数、肺组织

病理以及与肺纤维化相关生物标志物的影响,为复方苦参注射液治疗肺纤维化的作用与机制研究提供实验基础。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级健康Wistar大鼠,雄性,120只,鼠龄8~10周,体质量180~220 g,购自北京维通利华试验动物技术有限公司,动物许可证编号:SCXK(京)2016-0006。饲养于中国中医科学院中药研究所SPF级动物房,大鼠饲养条件:12 h明暗交替,温度(23±1)℃,湿度(50±15)%,自主饮水及进食。本实验经中国中医科学院中药研究所医学伦理委员会审核通过,实验动物伦理审查表编号为2020B033。

1.2 药物及主要试剂

注射用盐酸博来霉素,瀚晖制药有限公司,批号:19033911;复方苦参注射液,山西振东制药股份有限公司,批号:20181034,规格:每支5 mL;大鼠血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)与肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号:CSB-2206804r、CSB-2311258r);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo SCIENRIFIC公司,批号:SK258368);大鼠羟脯氨酸(HYP)ELISA测定试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号:CSB-E08839r);大鼠丙二醛(MDA)与超氧化物歧化酶(SOD)ELISA试剂盒(武汉云克隆科技股份有

限公司,批号:L200715112、L2007161023);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

ME204E电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);DSI/BUXCO气道阻力和肺顺应性监测系统(美国DSI公司);Bioprep-24生物样品均质仪(杭州奥盛仪器有限公司);Finesse 325切片机(美国Thermo公司);VIP-6全自动脱水机(日本樱花公司);KD-BM石蜡包埋机(科迪仪器设备有限公司);Varistain Gemini ES全自动染色机(美国Thermo公司);NIKON CI-S型倒置显微镜(日本尼康公司);5810R型台式高速离心机(德国Eppendorf公司);SpectraMax i3x型多标记酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

2 方法

2.1 剂量设置及药品配制

复方苦参注射液每日临床使用最高用量:每次20 mL,每天1次。成人以70 kg为标准体质量计算,等效剂量为原液 $20\text{ mL}/70\text{ kg}\times 6.3=1.8\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\approx$ 原液 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,设为中剂量组。复方苦参注射液低剂量($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$):取复方苦参注射液原液10 mL,加入生理盐水稀释至40 mL;复方苦参注射液中剂量($2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$):取原液20 mL,加入生理盐水稀释至40 mL;复方苦参注射液高剂量($4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$):取原液40 mL,加入生理盐水稀释至40 mL;给药体积均为 $4\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药方式均为ip。博来霉素(15 mg):每瓶博来霉素溶于3 mL生理盐水,质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 模型制备与分组给药

将适应性喂养5 d后的大鼠,按照体质量进行随机分组,分为对照组、假手术组、模型组及复方苦参注射液低、中、高剂量(注射液原液1、2、4 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组20只。除对照组外,对其余5组大鼠进行造模。实验采用最常用的造模方式,即气管内注射博来霉素致肺纤维化^[10],具体操作如下:大鼠ip 10%水合氯醛 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,待麻醉后,将大鼠仰面并把头部与四肢固定在鼠板上,颈部脱毛后,手术部位碘伏消毒,纵向剪开颈正中部位皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉,避开唾液腺,暴露气管,用1 mL注射器轻轻插进气管,拔出针芯,将棉絮置于注射器管外口,若棉絮随呼吸摆动,说明注射器成功插进气管。用该注射器快速注射注射用盐酸博来霉素($2.5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),其中假手术组注射相同体积的生理盐水。并用注射器继续推注0.2 mL空气,拔出注射器后,直立大鼠,将其左右摇摆,以便药液均匀到达肺部,缝合皮

肤,待大鼠自然苏醒后常规饲养。对照组不予任何处理。造模24 h后开始给药,复方苦参注射液各剂量组每日ip对应剂量的复方苦参注射液,对照组和假手术组每日ip对应剂量的生理盐水,造模第14、28天分别每组处死10只大鼠。

2.3 大鼠一般状态观察

每天观察实验期间各组大鼠的呼吸、活动、摄食、精神、皮毛等情况,并在造模第1、7、14、21、28天称量大鼠体质量,观察大鼠的体质量变化情况。

2.4 大鼠肺功能检测

DSI/BUXCO气道阻力和肺顺应性监测系统仪器校准后,运行10 min达到稳定状态,随后大鼠ip 10%水合氯醛 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,待大鼠麻醉后,纵向剪开颈正中部位皮肤,钝性分离皮下组织和肌肉,暴露气管,用眼科剪将气管横向剪开一小口,插入软管后用缝合线系紧并将大鼠转移至RC系统的密闭腔体中,气管插管与腔体的气路相连。通过计算机实时监测并记录大鼠潮气量、气道阻力及动态肺顺应性。

2.5 大鼠肺系数测定

待肺功能检测完成后,大鼠腹主动脉取血,随后打开大鼠胸腔,充分暴露并剥离左右肺组织,生理盐水清洗数次,滤纸轻轻拭干肺组织表面水分后称质量记录,并计算肺系数。

肺系数=肺脏质量/体质量

2.6 大鼠肺组织病理学观察

取左肺组织转移至4%的多聚甲醛溶液中,固定24 h后,进行常规脱水、石蜡包埋、切片,随后进行HE与Masson染色,光学显微镜下观察其病理形态。HE染色用于判断肺泡炎症程度,Masson染色用于判断肺纤维化程度。

2.7 ELISA法检测血清TNF- α 和IL-1 β 水平

待肺功能检测完成后,大鼠腹主动脉取血,取全血于离心管中,室温下静置30 min,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。按照大鼠TNF- α 和IL-1 β 酶联免疫检测试剂盒说明书进行测定。

2.8 ELISA法检测肺组织HYP、MDA和SOD水平

将右肺剪成 1 cm^3 左右小块放入冻存管中,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。测定时从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出右肺组织,称取肺组织100 mg,剪碎后放入加有钢珠的研磨管内,并向研磨管中加入1 mL预冷并含有1% Protease Inhibitor Cocktail蛋白裂解液,匀浆机进行4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 匀浆处理后,冰上裂解30 min,并于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,提取上清后,采

用BCA法进行蛋白质含量测定,随后按照HYP、MDA和SOD酶联免疫检测试剂盒说明书进行检测。

2.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS Statistics 20 统计软件对各组数据进行统计分析,采用单因素方差分析(One-Way-Anova)进行组间比较分析, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 一般状态观察

观察可知,对照组及假手术组大鼠精神状态良好,活泼好动,毛色有光泽,饮水、进食及二便均正常,体质量持续增长。造模组大鼠食量及饮水量均有所下降,精神萎靡,毛色暗淡发黄。同时模型组大鼠出现拱背和口唇、爪甲及尾尖均呈现紫黯现象,部分大鼠出现口鼻出血,呼吸困难现象。复方苦参注射液低、中、高剂量组的大鼠部分出现拱背和口唇、爪甲及尾尖轻微紫黯现象,整体状态优于模型组。

在体质量方面,模型组大鼠体质量在造模后7 d 时开始显著低于假手术组($P < 0.01$),在造模14、

21、28 d 的结果中,虽然伴随造模时间的延长,模型组大鼠体质量也逐渐增加,但始终与假手术组有显著性差异($P < 0.001$)。与模型组比较,在14、21、28 d 的结果中,复方苦参注射液低、中剂量组的大鼠体质量均高于模型组大鼠,其中复方苦参低剂量组在14、21、28 d 出现显著性差异($P < 0.001$),复方苦参注射液中剂量组在14、21、28 d 出现显著性差异($P < 0.05, 0.001$)。结果见表1。

3.2 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺系数的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的肺系数显著升高($P < 0.001$)。造模14 d 时,与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组大鼠肺系数有所下降,其中复方苦参注射液低剂量组出现显著性差异($P < 0.05$);造模28 d 时,与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组大鼠肺系数有所下降,其中复方苦参注射液低剂量和中剂量组出现显著性差异($P < 0.001$)。结果见表2。

表1 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Compound Kushen Injection on body weight of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	体质量/g				
		1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照	—	237.95±6.87	297.37±16.54	369.49±10.05	420.28±14.41	464.11±13.88
假手术	—	238.37±7.48	281.89±10.85	341.41±8.60	392.98±18.18	437.68±9.70
模型	—	234.75±6.26	248.04±40.36**	272.37±15.96***	306.42±6.80***	361.27±13.48***
复方苦参注射液	1	239.15±6.82	241.30±23.81**	296.27±12.00###	342.48±15.80###	404.85±16.92###
	2	238.23±9.48	231.73±19.16**	279.08±13.05#	347.39±17.64###	398.26±18.33###
	4	239.17±6.98	221.06±29.83**	258.66±19.20	312.35±14.07	384.06±12.94

与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

表2 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Compound Kushen Injection on lung coefficient in rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	14 d		28 d	
		肺质量/g	肺系数/%	肺质量/g	肺系数/%
对照	—	1.38±0.14	0.37±0.05	1.54±0.07	0.33±0.02
假手术	—	1.56±0.13	0.46±0.04	1.65±0.12	0.38±0.03
模型	—	2.25±0.45*	0.83±0.18***	2.49±0.27***	0.69±0.06***
复方苦参注射液	1	1.72±0.22	0.58±0.08#	2.01±0.20##	0.50±0.05###
	2	1.92±0.35	0.69±0.14	1.96±0.27##	0.49±0.07###
	4	1.70±0.33	0.66±0.15	2.14±0.43	0.56±0.11

与假手术组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.001$ ### $P < 0.001$ vs model group

3.3 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响

造模14 d时,与假手术组比较,模型组大鼠的各项肺功能指标已经出现了较为明显的改变,主要表现为潮气量下降($P<0.001$),气道阻力升高($P<0.001$),动态肺顺应性降低($P<0.001$);与模型组比较,复方苦参注射液低剂量和中剂量均能显著上调潮气量($P<0.001$),显著降低气道阻力($P<0.001$)和显著上调动态肺顺应性($P<0.001$)。造模28 d时,与假手术组比较,模型组大鼠潮气量和动态肺顺应性降低($P<0.001$),气道阻力升高($P<0.001$);与模型组比较,复方苦参注射液能显著上调潮气量($P<0.001$),并降低气道阻力($P<0.01$),同时低剂量和高剂量均能显著上调肺顺应性($P<0.01, 0.001$)。结果见表3。

3.4 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织病理学的影响

3.4.1 肺组织HE染色 造模14 d时,HE染色结果

中可以看出,对照组和假手术组大鼠肺泡结构完整,支气管上皮完整未脱落,未见明显的淋巴细胞和中性粒细胞浸润。模型组主要损伤表现为支气管黏膜破坏和周围肺组织肺泡间隔增厚伴炎症细胞浸润,以及纤维组织增生、水肿,泡沫细胞聚集和出血,炎症反应表现为肺泡间隔以淋巴细胞为主的炎细胞浸润。复方苦参注射液能不同程度减轻模型大鼠炎细胞浸润情况。给药后,复方苦参注射液低剂量组中重度炎细胞浸润发生率为1/10,模型组为4/10,结果见图1。

造模28 d时,HE染色结果中可以看出,对照组和假手术组大鼠肺泡结构完整,未见明显的炎细胞浸润。模型组主要损伤为炎症反应和纤维组织增生,炎症反应表现为肺间质以淋巴细胞为主(伴少量中性粒细胞)的炎细胞浸润,肺出血和色素沉着等改变。整体上与14 d组织改变相似,均表现为以

表3 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Compound Kushen Injection on pulmonary function in rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mL·kg ⁻¹)	14 d			28 d		
		潮气量/ mL	气道阻力/ (cm H ₂ O·s ⁻¹ ·mL ⁻¹)	肺顺应性/ [mL·(cm H ₂ O) ⁻¹]	潮气量/ mL	气道阻力/ (cm H ₂ O·s ⁻¹ ·mL ⁻¹)	肺顺应性/ [mL·(cm H ₂ O) ⁻¹]
对照	—	2.34±0.16	0.42±0.02	0.49±0.04	2.50±0.06	0.36±0.06	0.51±0.05
假手术	—	2.50±0.05	0.42±0.02	0.49±0.04	2.46±0.06	0.38±0.06	0.44±0.06
模型	—	2.34±0.06 ^{***}	0.55±0.04 ^{***}	0.22±0.03 ^{***}	2.14±0.30 ^{***}	0.72±0.34 ^{***}	0.28±0.11 ^{***}
复方苦参注射液	1	2.47±0.03 ^{###}	0.44±0.03 ^{###}	0.43±0.07 ^{###}	2.42±0.05 ^{###}	0.48±0.09 [#]	0.42±0.09 ^{###}
	2	2.48±0.10 ^{###}	0.45±0.03 ^{###}	0.45±0.16 ^{###}	2.38±0.04 ^{###}	0.46±0.06 [#]	0.35±0.07
	4	2.41±0.05	0.46±0.03 ^{###}	0.34±0.10 [#]	2.41±0.05 ^{###}	0.46±0.05 [#]	0.41±0.11 [#]

与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$, 1 cm H₂O=0.098 kPa

*** $P<0.001$ vs sham group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group, 1 cm H₂O=0.098 kPa

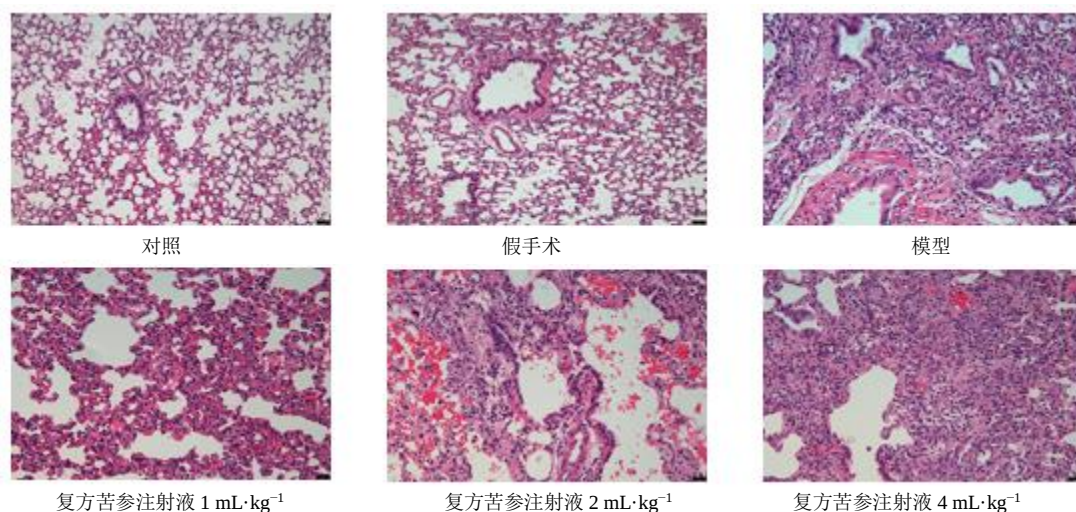


图1 造模14 d各组大鼠肺组织HE染色(×200)

Fig. 1 HE staining of lung tissue of rats in each group 14 d after modeling (×200)

支气管为中心向周围肺组织扩散性的实变,肺脏局部结构部分破坏,肺功能受到影响,远处可见肺泡代偿性扩张。造模后,动物均可见炎细胞浸润,模型组及复方苦参注射液低、中、高剂量组发生率分别为9/10、8/10、8/10、10/10,复方苦参注射液高剂量组中有1/10只大鼠表现为中重度炎细胞浸润,模型组为3/10只,在炎细胞浸润指标比较中,各给药组均少于模型组。结果说明复方苦参注射液可减轻肺脏炎细胞浸润。同时,模型组及复方苦参注射液低、中、高剂量组均可见肺泡间隔增厚,模型组中有3/10只大鼠出现中重度肺泡间隔增厚,各给药组发生率为1/10、2/10、1/10,均显著少于模型组。结果见图2。

3.4.2 肺组织 Masson 染色 造模 14 d 时, Masson 染色结果可见, 模型组 7/10 只动物均可见明显的纤维结缔组织增生, 其中中度纤维组织增生发生率为 4/10 只。主要分布在受损支气管周围的肺泡间质, 提示肺纤维化模型复制成功。复方苦参注射液低、中、高剂量组亦可见部分动物纤维组织增生, 发生率为 2/10、7/10、6/10, 以轻度和中度为主, 其中中度纤维组织增生各有 0/10、3/10、1/10 只, 均少于模型组。结果见图 3。

造模 28 d 时, 对照组和假手术组未见明显纤维结缔组织增生。模型组 5/10 只大鼠可见中度纤维组织明显增生, 复方苦参注射液低、中、高剂量组亦分别可见 0/10、4/10、3/10 只大鼠出现中度纤维化, 均少于模型组。结果见图 4。

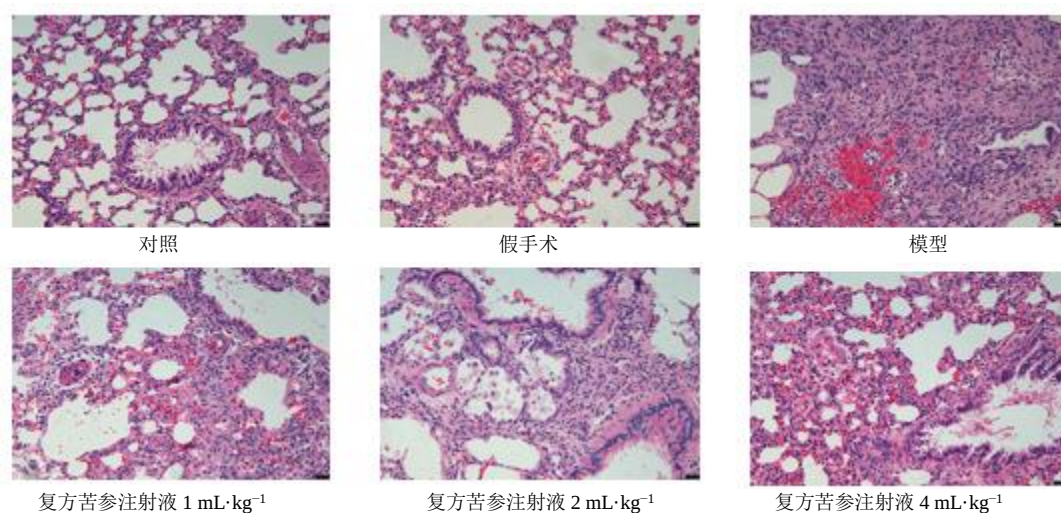


图2 造模 28 d 各组大鼠肺组织 HE 染色 (×200)

Fig. 2 HE staining of lung tissue of rats in each group 28 d after modeling (× 200)

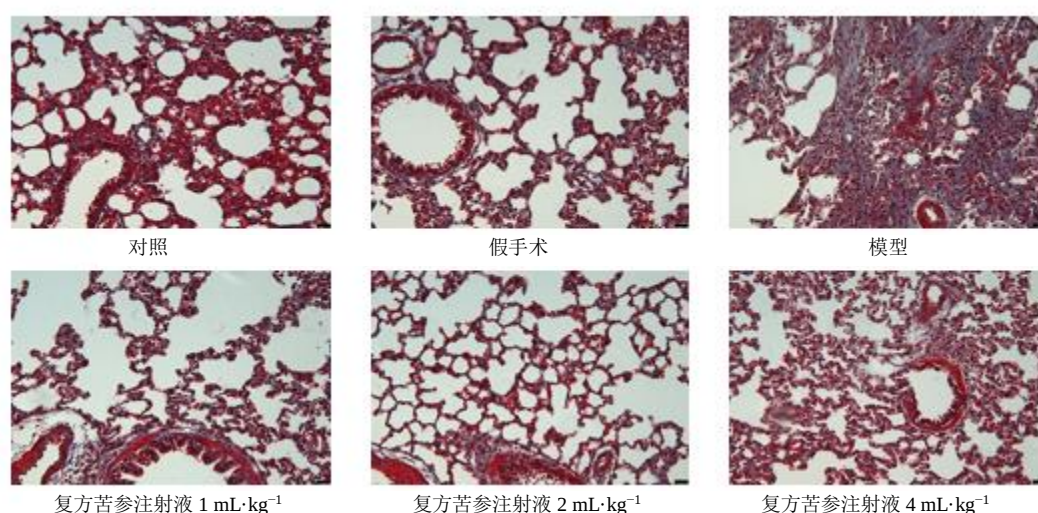


图3 造模 14 d 各组大鼠肺组织 Masson 染色 (×200)

Fig. 3 Masson staining of lung tissue of rats in each group 14 d after modeling (× 200)

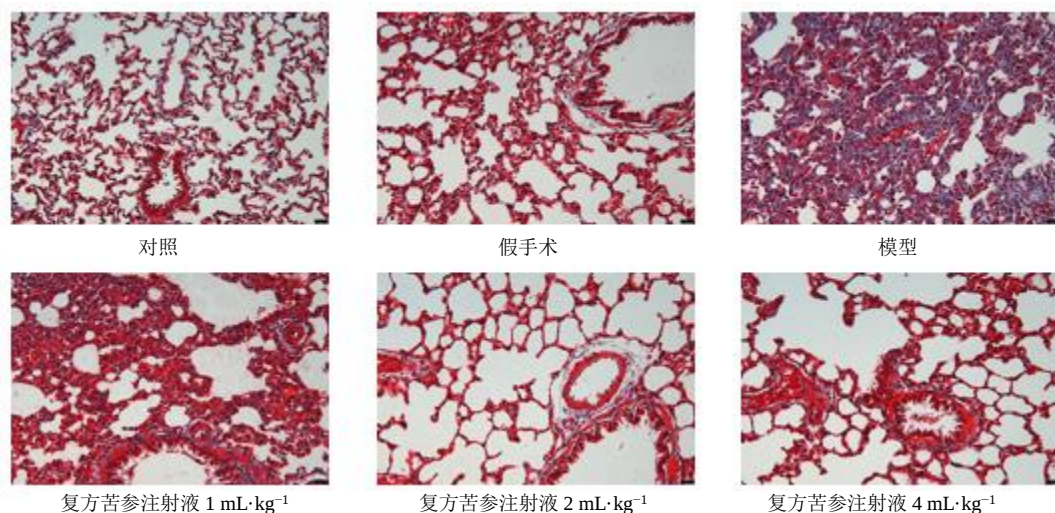


图4 造模28 d各组大鼠肺组织Masson染色(×200)

Fig. 4 Masson staining of lung tissue of rats in each group 28 d after modeling (×200)

3.5 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平的影响

造模后,与假手术组比较,肺纤维化模型大鼠血清中TNF- α 和IL-1 β 水平显著升高($P<0.001$);造模14 d时,与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组大鼠血清中的TNF- α 水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001);同时,与模型组比较,复方苦参注射液虽可下调血清IL-1 β 水平,但未出现显著性差异($P>0.05$)。造模28 d时,与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组大鼠血清TNF- α 水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001),同时复方苦参注射液低剂量组可显著下调IL-1 β 水平($P<0.01$),结果见表4。

3.6 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织HYP、MDA和SOD水平的影响

造模后,与假手术组比较,肺纤维化模型大鼠

肺组织中HYP水平显著升高($P<0.001$),而SOD活性则显著下降($P<0.001$),MDA虽有上调,但未呈现显著性差异。造模14 d时,与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组肺组织HYP水平显著降低($P<0.001$),而SOD活性则显著升高($P<0.001$),MDA有下调趋势,但差异不显著。造模28 d时,与假手术组比较,肺纤维化模型大鼠肺组织中HYP水平显著升高($P<0.001$),而SOD活性则显著下降($P<0.001$)。与模型组比较,复方苦参注射液低、中、高剂量组的肺组织HYP水平显著降低($P<0.001$),而SOD活性则显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),MDA有下调趋势,但差异不显著。结果见表5。

4 讨论

现代医学概念中,肺纤维化是一种慢性、进行性、病因未明的致死性肺部疾病。肺泡上皮有效地

表4 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠血清TNF- α 和IL-1 β 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 4 Effect of Compound Kushen Injection on levels of TNF- α and IL-1 β in serum of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mL·kg ⁻¹)	14 d		28 d	
		TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	123.31±7.29	27.78±4.65	135.74±6.69	21.36±4.99
假手术	—	127.35±6.47	29.18±5.90	137.06±8.56	20.17±5.64
模型	—	234.08±12.37***	68.26±7.60***	264.40±15.58***	49.50±5.43***
复方苦参注射液	1	179.22±9.68##	53.69±7.82	160.19±7.82###	42.31±3.67##
	2	184.85±6.54###	64.86±6.89	185.61±7.81##	47.82±6.12
	4	209.63±9.55###	63.11±7.04	196.71±10.94##	51.24±6.53

与假手术组比较:*** $P<0.001$;与模型组比较:## $P<0.01$ ### $P<0.001$

*** $P<0.001$ vs sham group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group

表5 复方苦参注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织 HYP、MDA 和 SOD 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Effect of Compound Kushen Injection on levels of HYP, MDA and SOD in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mL·kg ⁻¹)	14 d			28 d		
		HYP/ (μg·mg ⁻¹)	MDA/ (μmol·g ⁻¹)	SOD/ (kU·g ⁻¹)	HYP/ (μg·mg ⁻¹)	MDA/ (μmol·g ⁻¹)	SOD/ (kU·g ⁻¹)
对照	—	0.62±0.02	16.58±1.46	97.50±6.27	0.63±0.06	15.50±1.76	100.58±6.82
假手术	—	0.67±0.05	17.05±1.85	90.65±6.80	0.64±0.05	17.96±2.70	103.72±4.82
模型	—	1.20±0.10***	24.21±3.98	43.54±4.63***	1.22±0.10***	23.78±3.70	50.57±2.11***
复方苦参注射液	1	0.82±0.06###	18.20±1.56	79.15±6.66###	0.83±0.06###	18.20±1.56	84.51±6.52##
	2	0.64±0.09###	22.70±2.00	80.38±5.02###	0.65±0.07###	22.70±2.00	88.23±5.50###
	4	0.94±0.10###	22.01±2.63	67.02±5.01###	0.88±0.06###	22.01±2.63	69.05±5.48#

与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:## $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs sham group; ## $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs model group

将 CO₂ 和 O₂ 运转是肺部的气体交换的关键因素。当患者出现通气功能障碍时,会导致肺容积和肺功能下降,气体交换出现障碍,患者可能出现低氧血、咳嗽、呼吸困难等症状,严重时可能引发呼吸衰竭^[11]。在寻找防治肺纤维化疾病的药物与治疗机制中,选择与人类肺纤维化过程相似的动物模型是首要任务。常见引发大鼠发生肺纤维化的诱导剂主要包括:博来霉素^[12]、石棉^[13]、胺碘酮^[14]和百草枯等^[15]。其中,作为广谱抗肿瘤药的博来霉素,在治疗肿瘤过程中,以铁为代表的重金属产生螯合物,同氧反应产生氢氧自由基和超氧自由基,破坏 DNA 链,加速脂质过氧化反应,引发肺组织氧化损伤,诱导肺泡发生炎症反应,引发肺毒性此过程的病理组织学与人类肺纤维化最为接近^[16-17]。由于造模途径的不同,肺组织发生损伤的部位与程度会出现较大差异。相较于经鼻给药、尾 iv 与 ip 给药方式,气管内注射博来霉素能使得药物直接接触肺部,是较为成熟的造模方式。因此,本实验选择气管内注射博来霉素制备肺纤维化大鼠模型。

随着吡非尼酮和尼达尼布获批用于纤维化疾病的治疗,抗纤维化药物的研发取得了一定进展。但吡非尼酮的确切作用机制尚不完全清楚,且对已形成肺纤维化的动物模型,其虽然可以减缓肺组织 HYP 含量的增加,但不能逆转已经形成的纤维化。同时,尼达尼布常规治疗的抗炎效果弱于干预治疗。不难看出,现阶段针对肺纤维化治疗药物的研究尚未取得令人满意的结果。在我国传统医学中并没有与“肺纤维化”完全对应的病名,根据临床表现为咳嗽、咳痰与后期进行性呼吸困难加重等症状,且具有慢性、反复发作的特点,大多学者将其归

于“肺痹”“肺痿”和“咳喘”等病证范畴^[18-19]。中医认为肺纤维化的病位主要在肺,病因为热毒,热毒贯穿于肺纤维化发病的始终,因此本病宜选用清、补为治则,并根据证候特点,可分别采用清热解毒、益气养阴和宣肺化痰等治法。复方苦参注射液是以苦参、白土茯苓为原料经提取加工精制而成的中药制剂,具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛之功效,其中苦参清热燥湿,白土茯苓清热解毒。临床上多用于治疗肿瘤^[20],并具有抗炎、抗病毒、免疫调节^[21]、促进肝细胞再生与修复和抗肝纤维化等作用^[22]。

本实验研究发现,气管滴注博来霉素后,大鼠食量及饮水量均有所下降,精神萎靡,毛色暗淡发黄,体质量明显减轻。同时模型组大鼠出现拱背现象,口唇、爪甲及尾尖均呈现紫黯现象,部分大鼠出现口鼻出血,呼吸困难现象。复方苦参低、中、高剂量组的大鼠部分出现拱背现象,口唇、爪甲及尾尖轻微紫黯现象,整体状态优于模型组。模型组大鼠在造模后 7 d 时体质量减轻,在 14、21、28 d 时,虽然随造模时间的延长,大鼠体质量也逐渐增加,但始终低于假手术组,而复方苦参注射液低剂量组和中剂量组的大鼠体质量均高于模型组大鼠。随着肺部炎症与纤维化的发展,肺部的渗出液增多,蛋白浸润,纤维结缔组织异常增生,ECM 沉积,导致肺脏质量增加,肺系数也随之升高。肺系数是反映肺组织炎症与肺纤维化程度的指标之一,本研究结果显示,模型组大鼠的肺系数显著升高,造模 14 d 后,复方苦参注射液低、中和高剂量组大鼠肺系数有所下降;造模 28 d 后,复方苦参注射液中和高剂量组肺系数下降明显。在肺功能检测中,潮气量、气道阻力与动态肺顺应性等为常规检测指标。其中,潮气

量为大鼠平静呼吸状态下每次吸入或呼出的气量;气道阻力反映大鼠气道内单位流量所产生的压力差,此指标用于判断气道是否发生阻塞现象;肺顺应性为单位压力改变时所引起的肺容积的变化^[23]。结果显示,造模14 d时,模型组大鼠的各项肺功能指标已经出现了较为明显的改变,复方苦参注射液低、中剂量均能显著上调潮气量,显著降低气道阻力和上调动态肺顺应性;在28 d时,复方苦参注射液能显著上调潮气量并降低气道阻力,同时低剂量和高剂量均能显著上调肺顺应性。Masson 镜检结果主要反映纤维组织增生的程度,HE 切片用于显示病变的全面的情况。造模14 d结果显示,模型组中7/10只动物均可见明显的纤维结缔组织增生,主要分布在受损支气管周围的肺泡间质,也提示了造模有效,肺纤维化模型复制成功。给予复方苦参注射液后炎细胞浸润略减轻,且能略减轻纤维组织增生的严重程度(中重度发生率下降)。与造模14 d相比较,造模28 d的炎细胞略轻于14 d。综合考虑,复方苦参注射液对病变有一定的干预作用,综合来看低剂量组效果略优于中、高剂量组。

炎症反应是特发性肺纤维化过程中的重要病理特征,博来霉素可引发肺部炎症,伴有中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润现象^[24],这些炎症细胞释放出促炎细胞因子,例如TNF- α 和IL-1 β ^[25],导致炎症反应加重。本结果显示,模型组大鼠血中TNF- α 和IL-1 β 水平显著性增多,表明大鼠出现严重的炎症反应。给予复方苦参注射液后,TNF- α 和IL-1 β 水平下降,其中TNF- α 下降呈现显著性差异。提示复方苦参注射液可以减轻肺纤维化模型大鼠的炎症反应。肺组织中HYP是合成结缔组织中胶原蛋白所特有的氨基酸,通过测定血液或者组织中的含量,可以直接反映出肺组织中胶原纤维含量变化,因此HYP是肺纤维化程度的重要标志。本结果显示,模型组HYP含量显著性增高,表明博来霉素可使大鼠肺组织中胶原纤维含量增多。给予复方苦参注射液后,HYP含量显著性下降。同时,氧化应激也是引发肺纤维化发生与发展的重要因素^[26]。MDA作为脂质过氧化物含量的生物标志物,其含量的改变可以反映机体氧化应激的程度。SOD作为内源性抗氧化酶之一,可用于清除自由基,保护细胞不被自由基损伤,其活力的改变能够反映机体清除氧自由基的能力。本结果显示,模型组大鼠MDA含量有增加趋势,SOD活性显著性降低,表明大鼠体内氧化/抗氧化系统失衡^[27],大鼠出现肺组织

损伤。给予复方苦参注射液后,大鼠SOD活力上升,表明其可以提高肺纤维化模型大鼠体内氧化还原能力,加快体内氧自由基的清除。

本研究结果表明,复方苦参注射液对博来霉素诱导的肺纤维化模型大鼠具有一定的抗肺纤维化作用。究其原因可能是该药物通过(1)抑制炎症反应,阻碍或者减轻肺水肿和纤维化的形成;(2)抑制氧化应激,减少肺纤维化模型大鼠体内的活性氧(如过氧化氢、羟自由基等)致使肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤,从而减少大鼠的肺组织损伤。由于肺纤维化发病机制复杂,对于复方苦参注射液抗肺纤维化的具体作用机制仍需进一步的实验和探讨。同时,结果显示,复方苦参注射液低、中剂量组效果优于高剂量组,推测因为苦参提取物所含的生物碱类(苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱和槐果碱等)具有毒性,剂量过大时会引起肺、肾、肝和脑损伤,并对中枢神经过度兴奋可导致癫痫样惊厥发作,严重时可能因呼吸麻痹而死^[28]。因此,后续研究时,应特别注意剂量设置。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hou J W, Ma T, Cao H H, et al. TNF- α -induced NF- κ B activation promotes myofibroblast differentiation of LR-MSCs and exacerbates bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3): 2409-2419.
 - [2] Bendstrup E, Hyldgaard C, Altraja A, et al. Organisation of diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis and other interstitial lung diseases in the Nordic countries [J]. Eur Clin Respir J, 2015, 2(1):28348.
 - [3] Montes E, Ruiz V, Checa M, et al. Renin is an angiotensin-independent profibrotic mediator: Role in pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J, 2012, 39(1): 141-148.
 - [4] Santos-Silva M A, Pires K M P, Trajano E T L, et al. Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(5): 731-741.
 - [5] Cottin V, Crestani B, Valeyre D, et al. Diagnosis and management of idiopathic pulmonary fibrosis: French practical guidelines [J]. Eur Respir Rev, 2014, 23(132): 193-214.
 - [6] 丛鲁红, 吴依娜, 段 军, 等. 可吸入颗粒物_{2.5}对大鼠肺纤维化的影响及糖皮质激素的干预作用 [J]. 心肺血管病杂志, 2017, 36(6): 482-487.
- Cong L H, Wu Y N, Duan J, et al. Effect of particulate matter 2.5 on pulmonary fibrosis in rats and the intervention of glucocorticoid [J]. J Cardiovasc Pulm Dis,

- 2017, 36(6): 482-487.
- [7] 董广通, 祁鑫, 李铮, 等. 中医药防治放射性肺纤维化的临床及实验研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(5): 733-735, 739.
- Dong G T, Qi X, Li Z, et al. Clinical and experimental research progress of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of radiation pulmonary fibrosis [J]. J Basic Chin Med, 2017, 23(5): 733-735, 739.
- [8] 吴恩慧, 王琪瑞, 来梦茹, 等. 复方苦参注射液在肺癌联合治疗中的应用与机制研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2020(20): 59-63.
- Wu E H, Wang Q R, Lai M R, et al. Research progress on the application and regulatory mechanisms of the therapeutic combination with compound Kushen injection and other methods against lung cancer [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm, 2020(20): 59-63.
- [9] 王文龙, 卢宏达, 林胜友, 等. 复方苦参注射液对放射性肺损伤的肺保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 42-49.
- Wang W L, Lu H D, Lin S Y, et al. Lung protective mechanism of Compound Kushen Injection on radiation induced pulmonary injury [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(7): 42-49.
- [10] Thannickal V J, Zhou Y, Gaggar A, et al. Fibrosis: ultimate and proximate causes [J]. J Clin Invest, 2014, 124(11): 4673-4677.
- [11] Ben Salem C, Slim R, Fathallah N. Fibrosis: A common pathway to organ injury and failure [J]. N Engl J Med, 2015, 373(1): 95.
- [12] Liu T J, de Los Santos F G, Phan S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1627: 27-42.
- [13] Barber C M, Fishwick D. Idiopathic pulmonary fibrosis and asbestos use [J]. BMJ, 2019, 364: 11041.
- [14] Arslan D, Aslan N, Yıldızdaş D, et al. Pulmonary toxicity secondary to amiodarone use [J]. Cayd, 2019, 6(1): 51-53.
- [15] Sun Z R, Yang Z Z, Wang M M, et al. Paraquat induces pulmonary fibrosis through Wnt/ β -catenin signaling pathway and myofibroblast differentiation [J]. Toxicol Lett, 2020, 333: 170-183.
- [16] Zhuang L F, Jiang H H, Qiao S C, et al. The roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in regulating osteogenic differentiation of murine preosteoblasts MC3T3-E1 cells on roughened titanium surfaces [J]. J Biomed Mater Res, 2012, 100A(1): 125-133.
- [17] Ahn J, Joo H, Park J, et al. The effects of lung-moistening herbal medicines on bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse model [J]. Processes, 2020, 8(1): 102.
- [18] 林咏梅, 肖勇洪. 中医药治疗特发性肺纤维化研究进展 [J]. 世界中医药, 2020, 15(21): 3348-3350.
- Lin Y M, Xiao Y H. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with traditional Chinese medicine [J]. World Chin Med, 2020, 15(21): 3348-3350.
- [19] 付际游, 马子凤, 鹿振辉, 等. 中药治疗特发性肺纤维化相关机制的研究进展 [J]. 中医药导报, 2020, 26(6): 109-111.
- Fu J Y, Ma Z F, Lu Z F, et al. Advances in research on the mechanism of Chinese medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 26(6): 109-111.
- [20] 张丽惠, 张琬莹, 张国伟, 等. 复方苦参注射液诱导自噬促进膀胱癌细胞凋亡机制的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(21): 5516-5522.
- Zhang L H, Zhang W Y, Zhang G W, et al. Study on mechanism of Compound Kushen Injection inducing autophagy to promote apoptosis of bladder cancer cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(21): 5516-5522.
- [21] 董俊, 晏菲, 邓洁, 等. 复方苦参注射液抗肿瘤机制及其临床应用进展 [J]. 天津药学, 2019, 31(1): 71-74.
- Dong J, Yan F, Deng J, et al. Anti-tumor mechanism and clinical application progress of Compound Kushen Injection [J]. Tianjin Pharm, 2019, 31(1): 71-74.
- [22] 江若霞. 复方丹参联合苦参素注射液治疗中度慢性乙型肝炎的临床疗效 [J]. 中国药物经济学, 2016, 11(5): 85-86.
- Jiang R X. Clinical efficacy of compound salvia miltiorrhiza combined with matrine injection in the treatment of moderate chronic hepatitis B [J]. Chin J Pharm Econ, 2016, 11(5): 85-86.
- [23] Liu Y M, Nepali K, Liou J P. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current status, recent progress, and emerging targets [J]. J Med Chem, 2017, 60(2): 527-553.
- [24] You X Y, Xue Q, Fang Y, et al. Preventive effects of Ecliptae Herba extract and its component, ecliptasaponin A, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 175: 172-180.
- [25] 张少波, 孔艳玲, 赵云峰. 姜黄素对肺纤维化小鼠的保护作用及其机制研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(11): 2141-2146.
- Zhang S B, Kong Y L, Zhao Y F. Protective effect of curcumin on pulmonary fibrosis in mice and its mechanism [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(11): 2141-2146.
- [26] Bagis S, Tamer L, Sahin G, et al. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: An oxidative stress disorder? [J]. Rheumatol Int, 2005, 25(3): 188-190.
- [27] Yuhai G U, Zhen Z. Significance of the changes occurring in the levels of interleukins, SOD and MDA in rat pulmonary tissue following exposure to different altitudes and exposure times [J]. Exp Ther Med, 2015, 10(3): 915-920.
- [28] 张明发, 沈雅琴. 苦参碱类生物碱的毒性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(4): 682-691.
- Zhang M F, Shen Y Q. Research progress on toxicity of matrine-type alkaloids [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(4): 682-691.

[责任编辑 刘东博]