

【实验研究】

血栓通注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究

王慧颖¹, 李 晗¹, 宋 玲¹, 高云航¹, 陈 明², 严灿梅³, 陈腾飞¹, 吕林艳³, 叶祖光¹, 张广平^{1*}

1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700

2. 广西梧州中恒集团股份有限公司, 广西 梧州 543000

3. 广西梧州制药(集团)股份有限公司, 广西 梧州 530011

摘要: 目的 研究血栓通注射液抗博来霉素诱导肺纤维化模型大鼠的药效学。方法 将180只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、吡非尼酮(阳性药, 50 mg·kg⁻¹)组和血栓通注射液低、中、高剂量(注射液原液1、2、4 mL·kg⁻¹)组, 每组30只, 采用气管内注射博来霉素方法制备肺纤维化大鼠模型, 于造模24 h后各给药组ip给药, 并分别在造模7、14、28 d取材。观察大鼠一般状态、体质量、肺系数; 应用DSI/BUXCO监测系统检测肺功能指标潮气量、气道阻力及肺顺应性变化; 进行HE与Masson染色, 光镜下观察肺组织病理变化; 并采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠肺组织中I型胶原(COL-I)和纤维黏连蛋白(FN)的水平。结果 通过对大鼠的一般情况观察, 发现给予血栓通注射液后, 肺纤维化模型大鼠的活动和精神状态均有改善。与模型组比较, 吡非尼酮组、血栓通注射液组大鼠体质量显著增加($P<0.01$ 、 0.001), 大鼠肺系数显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。肺功能结果显示, 与模型组比较, 造模7 d时血栓通注射液中剂量显著上调动态肺顺应性($P<0.01$); 造模14 d时血栓通注射液高剂量显著降低气道阻力($P<0.05$)和上调动态肺顺应性($P<0.01$); 造模28 d时吡非尼酮和血栓通注射液中剂量均显著上调动态肺顺应性($P<0.01$)。HE及Masson结果显示, 吡非尼酮组、血栓通注射液组的肺纤维化程度明显轻于模型组。ELISA结果显示, 与模型组比较, 造模7 d时吡非尼酮组、血栓通注射液高剂量组大鼠肺组织中的FN显著降低($P<0.01$ 、 0.001), 吡非尼酮组COL-I水平显著降低($P<0.001$); 造模14 d时吡非尼酮组和血栓通注射液中、高剂量组大鼠肺组织中的COL-I水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01), 吡非尼酮组FN显著降低($P<0.05$); 造模28 d时吡非尼酮组和血栓通注射液中、高剂量组大鼠肺组织中的COL-I、FN水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 血栓通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, 降低肺组织中COL-I和FN水平, 对肺纤维化大鼠产生保护作用。

关键词: 肺纤维化; 博来霉素; 血栓通注射液; 肺功能; I型胶原; 纤维黏连蛋白

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)09-1753-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.008

Pharmacodynamic study of Xueshuantong Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats

WANG Huiying¹, LI Han¹, SONG Ling¹, GAO Yunhang¹, CHEN Ming², YAN Canmei³, CHEN Tengfei¹, LÜ Linyan³, YE Zuguang¹, ZHANG Guangping¹

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

2. Guangxi Wuzhou Zhongheng Group Co., Ltd., Wuzhou 543000, China

3. Guangxi Wuzhou Pharmaceutical (Group) Co., Ltd., Wuzhou 530011, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Xueshuantong Injection on bleomycin-induced pulmonary fibrosis model rats and its related mechanism. **Methods** Totally 180 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, pirfenidone group (10 mL·kg⁻¹), and Xueshuantong Injection low, medium, and high dose (injection stock solution 1, 2, and 4 mL·kg⁻¹) groups, with 30 rats in each group. The pulmonary fibrosis rat model was prepared by intratracheal injection of bleomycin. Xueshuantong

收稿日期: 2022-03-28

基金项目: 中国中医科学院中药研究所中药药理创新团队项目(CI2021B015); 中国中医科学院科技创新工程(CI2021A04802); 广西科技基地和人才专项(桂科AD20297068)

第一作者: 王慧颖(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药呼吸药理研究。E-mail: 1006515718@qq.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

Injection was injected ip in each group at 24 h after modeling, and the materials were taken on the 7th, 14th, and 28th days of modeling. The general state, body weight and lung coefficient of rats were observed. The changes of tidal volume, airway resistance and lung compliance were detected by DSI/BUXCO monitoring system. HE and Masson staining were performed to observe the pathological changes of lung tissues under light microscope. The levels of type I collagen (COL-I) and fibronectin (FN) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** By observing the general situation of rats, it was found that after giving Xueshuantong Injection, the activity and mental state of pulmonary fibrosis model rats were improved. Compared with the model group, the body mass of rats in the pirfenidone group and Xueshuantong Injection group was significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and the lung coefficient of rats was lower than that in the model group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of pulmonary function showed that, compared with the model group, Xueshuantong Injection of medium dose significantly upregulated the dynamic lung compliance at seven days after modeling ($P < 0.01$). At 14 days after modeling, Xueshuantong Injection of high dose significantly decreased airway resistance ($P < 0.05$) and upregulated dynamic lung compliance ($P < 0.01$). At 28 days after modeling, Xueshuantong Injection of medium dose and pirfenidone significantly increased lung compliance ($P < 0.01$). The results of HE and Masson showed that the degree of pulmonary fibrosis in the pirfenidone group and Xueshuantong Injection group was significantly lighter than that in the model group. ELISA results showed that compared with the model group, FN in lung tissue of rats in pirfenidone group and Xueshuantong Injection high-dose group was significantly decreased at seven days after modeling ($P < 0.01, 0.001$), and the level of COL-I in pirfenidone group was significantly decreased ($P < 0.001$). At 14 days after modeling, the COL-I level in lung tissue of rats in pirfenidone group and Xueshuantong Injection medium and high dose groups was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and FN in pirfenidone group was significantly decreased ($P < 0.05$). The levels of COL-I and FN in lung tissue of rats in pirfenidone group and Xueshuantong Injection medium and high dose groups were significantly decreased at 28 days after modeling ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** Xueshuantong Injection can improve pulmonary function and pulmonary morphological lesions in pulmonary fibrosis model rats, reduce the levels of Col-I and FN in lung tissue, and have a protective effect on pulmonary fibrosis rats.

Key words: pulmonary fibrosis; bleomycin; Xueshuantong Injection; pulmonary function; type I collagen; fibronectin

特发性肺纤维化(IPF)是一种进行性、破坏性、不可逆性的肺间质组织异质性疾病^[1],是以弥漫性肺泡炎症伴间质性纤维化和成纤维细胞增殖以及大量细胞外基质聚集为主要特征的疾病。IPF患者生存周期短、存活率低、恶化率高、预后差^[2-5]。目前,IPF的临床用药包括糖皮质激素、抗氧化剂、细胞因子及受体抑制剂等^[6],但多以对症治疗为主,且不良反应较多,价格昂贵且患者适应性差。中医理论中没有IPF相关的记载,但医家认为IPF早期病理病机与肺痹相似,晚期病机和症状与肺痿相似,因此普遍认为IPF属于肺痹肺痿的范围内,并且认为IPF的病机是正气亏虚、痰瘀阻络的虚实夹杂^[7]。中医药在治疗肺纤维化中积累了丰富的经验,在减缓病程发展,改善患者临床症状和提高生活质量方面具有较好的疗效。三七性温、味甘、微苦,具有散瘀止血、消肿定痛的功效,现有研究表明三七中共有化学成分285种,其中包含主要成分皂苷类210种^[8],最有代表性的是三七皂苷R₁(notoginsenoside R₁)和人参皂苷Rb₁(ginsenoside Rb₁)、Rg₁(ginsenoside Rg₁)。现代研究认为,三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)具有良好的抗炎效果,同时还具有保护心脑血管、保护神经系

统、抗菌抗肿瘤等药理作用^[8]。血栓通注射液是从五加科植物三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]传统药用部位主根中提取的PNS,其主要成分为三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁、人参皂苷Rb₁等^[9-12]。前期报道显示,血栓通注射液对肝、肾纤维化均有显著疗效,且已有相关研究表明,三七及其提取物对肺纤维化也具有改善作用,但临床上并没有用血栓通注射液治疗肺纤维化的先例^[13-15]。因此本研究采用博来霉素诱导的大鼠肺纤维化动物模型观察血栓通注射液对大鼠体质量、肺系数、肺功能、肺组织病理学和肺组织中特征性纤维化指标I型胶原(Col-I)、纤维黏连蛋白(FN)水平的影响,为临床应用血栓通注射液治疗肺纤维化提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性健康Wistar大鼠180只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2021-0011,体质量180~220 g。动物饲养于中国中医科学院中药研究所SPF级动物房,于温度(23±2)℃和湿度(50±15)%的屏障环境下统一饲养,自由摄食及自主饮水,光照条件12 h昼夜明暗交替。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,实验动物伦理审查编号为2021B038。

1.2 药物及主要试剂

注射用盐酸博来霉素(冻干)(瀚晖制药有限公司,批号410730);血栓通注射液[广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号200901,规格:每支2 mL];BCA试剂盒(美国 Thermo SCIENRIFIC 公司,批号SK258368);大鼠 COL-I酶联免疫试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号K08030393);大鼠 FN酶联免疫试剂盒(武汉华美生物科技有限公司,批号K09030345);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

Spectramax i3x 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);F570-86 超低温冰箱(德国 Eppendorf 公司);MB100-2A 微孔板恒温振荡器(杭州奥盛仪器有限公司);AL104 电子天平(德国 METTLER TOLED 公司);MP Fastprep-24 匀浆仪(美国 MP Biomedicals 公司);DSI/BUXCO 气道阻力和肺顺应性监测系统(美国 DSI 公司);VIP-6 脱水机(日本樱花有限公司);KD-BM 包埋机(科迪仪器设备有限公司);RM2016 病理切片机(德国徕卡有限公司);KD-P 组织摊片机(科迪仪器设备有限公司);KPJ-14 烤片机(天津爱华有限公司);DH3600 恒温箱(天津泰斯特仪器有限公司);188105 载玻片及盖玻片(江苏世泰实验器材厂);NIKON CI-S 显微镜(日本尼康有限公司);DS-FI2 成像系统(日本尼康有限公司)。

2 方法

2.1 剂量设置及药品配制

血栓通注射液每日临床使用最高剂量:每次 5 mL,每天 2 次。成人以 70 kg 为标准体质量计算,大鼠等效剂量约为原液 1 mL·kg⁻¹,设为低剂量组,中、高剂量分别为 2、4 mL·kg⁻¹。分别取血栓通注射液原液 10、20、40 mL,加入生理盐水稀释至 40 mL,配制给药溶液,给药方式为 ip。

吡非尼酮每日临床使用最高剂量:每次 200 mg,每天 3 次。成人以 70 kg 为标准体质量计算,大鼠等效剂量约为 50 mg·kg⁻¹。取吡非尼酮 1 g,加入 200 mL 生理盐水溶解为 5 mg·mL⁻¹,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,给药方式为 ig。

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 mg·mL⁻¹。

2.2 动物造模及给药

将适应性饲养 5 d 后的大鼠,按照体质量随机分为假手术组、模型组、吡非尼酮(50 mg·kg⁻¹)组和

血栓通注射液低、中和高剂量(1、2、4 mL·kg⁻¹,以 PNS 计分别为 27、54、81 mg·kg⁻¹)组,每组 30 只。除假手术组外,其余 5 组大鼠进行气管内注射博来霉素^[6],具体操作如下,用 10%的水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ 麻醉大鼠,碘伏消毒大鼠喉部皮肤,手术剪剪开喉部,眼科镊撕开肌肉,钝性暴露剥离气管;使用 1 mL 注射器吸取适量博来霉素,继续抽取空气至 0.5 mL,按 5 mg·kg⁻¹ 注射博来霉素后直立大鼠,并将其旋转 3~4 周使博来霉素在肺部分布均匀,缝合肌肉与皮肤。假手术组注射等量的生理盐水,其余操作相同。于造模第 2 天开始每日给予对应剂量的药物,假手术组和模型组给予对应剂量的生理盐水。于造模第 7、14、28 天处死大鼠,每组每次处死 10 只。

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情况、活动频率、精神状态、皮毛色泽等,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

在造模第 1、7、14、21、28 天,DSI/BUXCO 监测系统仪器校准并达到稳定状态后,用 10%的水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ 麻醉大鼠,剪开颈正中部位皮肤,剥离组织与肌肉后暴露气管,在气管上剪口并插入软管,使用缝合线固定,将大鼠放置在密闭容器内,测定大鼠潮气量、气道阻力及肺顺应性变化。

2.5 大鼠肺系数测定

肺功能测定结束后,解剖大鼠并进行腹主动脉取血,随后剥离肺组织,生理盐水冲洗数次,将肺组织在滤纸上蘸去表面水分后称肺湿质量,并计算肺系数。

肺系数=肺湿质量(mg)/体质量(g)

2.6 大鼠肺组织病理学观察

将左肺用 10% 甲醛固定供组织学检查,常规石蜡包埋、切片(厚度 5 μm),随后对组织切片分别进行 HE 与 Masson 染色,光镜下观察肺组织病理变化。HE 染色用于判断炎症程度,据 Szapiel 评分标准^[17]进行肺泡炎程度评分。Masson 染色用于判断胶原蛋白增加程度。

2.7 ELISA 法检测肺组织中 COL-I 和 FN 水平

将右肺剪成 1 cm³ 左右小块放入冻存管中,于 -80 °C 冰箱中保存。测定时从 -80 °C 冰箱中取出 50~100 mg 肺组织,用 1×PBS 洗去血污,剪成小块放入组织研磨器中,加入适量 1×PBS,制成匀浆,反复冻融破坏细胞膜,将组织匀浆于 4 °C、12 000 rmin⁻¹ 离心 5 min 取上清,随后按照 COL-I 和 FN 酶联免疫检测试剂盒说明书进行检测。

2.8 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,采用 SPSS Statistics 22 统计软件对各组数据进行统计分析,计量资料采用单因素方差分析(One-Way-Anova)进行组间比较分析,等级资料采用秩和检验进行组间分析。

3 结果

3.1 一般状态观察

观察各组大鼠发现,假手术组大鼠精神状态良好,好动活跃,毛色有光泽,饮水、进食及二便均正常,体质量持续正常增长。模型组大鼠精神萎靡,毛色暗淡,口唇、爪甲及尾尖发紫。血栓通注射液低、中和高剂量组的大鼠部分出现口唇、爪甲及尾尖轻微发紫,整体生存状态优于模型组。比较各组体质量发现,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($P < 0.001$),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 7、14、21 和 28 d 的结果中,吡非尼酮组和血栓通注射液低、中、高剂量组的大鼠体质量均显著高于模型组($P < 0.01, 0.001$)。结果见表 1。

3.2 血栓通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 7、14、28 d 时,与模型组比较,吡非尼酮组和血栓通注射液低、中、高剂量组大鼠肺

系数显著下降($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。结果见表 2。

3.3 血栓通注射液对肺纤维化模型大鼠肺功能的影响

造模 7 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,主要表现为气道阻力显著升高($P < 0.05$),动态肺顺应性显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,吡非尼酮和血栓通注射液中和高剂量均能上调潮气量,降低气道阻力,上调动态肺顺应性,其中血栓通注射液中剂量显著上调动态肺顺应性($P < 0.01$)。

造模 14 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠的潮气量显著下降($P < 0.001$),气道阻力显著升高($P < 0.05$),动态肺顺应性显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,血栓通注射液高剂量组气道阻力显著降低($P < 0.05$)和动态肺顺应性显著上调($P < 0.01$),吡非尼酮组气道阻力显著降低($P < 0.05$)。

造模 28 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠潮气量显著降低($P < 0.01$),气道阻力升高,动态肺顺应性显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,吡非尼酮组和血栓通注射液中剂量均能显著上调动态肺顺应性($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.4 血栓通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

HE 染色结果(图 1)表明,

表 1 血栓通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 Xueshuantong Injection on body weight of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g			
		7 d	14 d	21 d	28 d
假手术	—	273.0±12.7	317.9±24.4	395.4±12.3	439.8±11.1
模型	—	233.3±9.8***	256.5±19.5***	307.0±9.4**	338.2±11.3***
吡非尼酮	50	253.9±9.9***	288.4±19.8***	354.7±9.8***	354.5±9.9***
血栓通注射液	27	250.6±10.5***	275.2±17.9**	327.7±9.6***	374.5±9.6***
	54	259.0±9.56***	294.4±16.9***	357.1±12.5***	399.7±13.6***
	81	258.6±9.7***	284.9±19.3***	354.5±6.9***	400.8±7.6***

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-operation group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

表 2 血栓通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 Xueshuantong Injection on lung coefficient in rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肺系数/%		
		7 d	14 d	28 d
假手术	—	0.475±0.031	0.422±0.018	0.402±0.017
模型	—	0.975±0.076***	1.022±0.081***	0.938±0.098***
吡非尼酮	50	0.700±0.049***	0.787±0.075***	0.697±0.058***
血栓通注射液	27	0.831±0.109***	0.883±0.053**	0.782±0.051#
	54	0.746±0.064***	0.785±0.063***	0.656±0.045***
	81	0.739±0.055***	0.780±0.052***	0.648±0.054***

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

*** $P < 0.001$ vs sham-operation group; # $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

表3 血栓通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 Xueshuantong Injection on pulmonary function in rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x}\pm s, n=10$)

剂量/ 组别 (mg kg ⁻¹)	7 d			14 d			28 d		
	潮气量/ mL	气道阻力/ (cm H ₂ O·s ⁻¹ · mL ⁻¹)	动态肺顺应性/ mL·(cm H ₂ O) ⁻¹	潮气量/ mL	气道阻力/ (cm H ₂ O·s ⁻¹ · mL ⁻¹)	动态肺顺应性/ mL·(cm H ₂ O) ⁻¹	潮气量/ mL	气道阻力/ (cm H ₂ O·s ⁻¹ · mL ⁻¹)	动态肺顺应性/ mL·(cm H ₂ O) ⁻¹
假手术	3.356±0.066	0.244±0.025	0.553±0.071	2.986±0.040	0.269±0.025	0.514±0.043	2.951±0.045	0.278±0.012	0.509±0.055
模型	2.932±0.367	0.358±0.079*	0.247±0.108***	2.841±0.062***	0.353±0.055*	0.343±0.066***	2.628±0.379*	0.383±0.095	0.247±0.109***
吡非尼酮	3.183±0.348	0.288±0.082	0.408±0.157	2.909±0.033	0.265±0.015*	0.468±0.091	2.857±0.029	0.275±0.010	0.431±0.021**
血栓通注射液	27 2.901±0.396	0.362±0.086	0.227±0.104	2.880±0.021	0.327±0.054	0.389±0.021	2.814±0.022	0.310±0.018	0.364±0.073
	54 3.319±0.094	0.277±0.041	0.493±0.134**	2.893±0.036	0.292±0.016	0.397±0.059	2.853±0.022	0.306±0.040	0.446±0.077**
	81 3.297±0.090	0.318±0.083	0.442±0.143	2.906±0.036	0.270±0.015*	0.471±0.059**	2.816±0.031	0.301±0.018	0.325±0.044

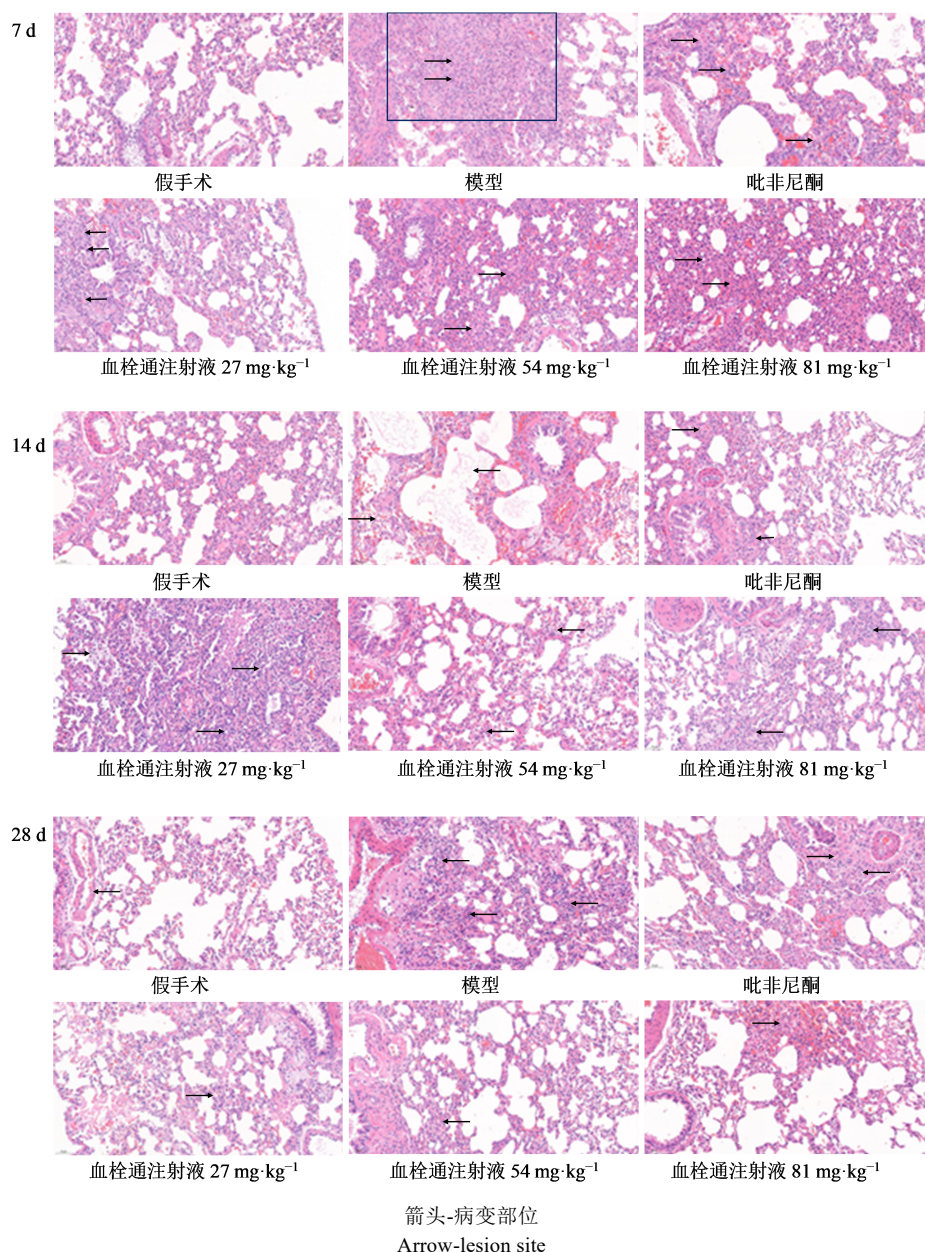
与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs sham-operation group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs model group

图1 造模7、14、28 d各组大鼠肺组织HE染色(×200)

Fig. 1 HE staining of lung tissue of rats in each group 7, 14, 28 d after modeling (×200)

造模7 d时,假手术组肺完整,支气管结构清楚,分布均匀,肺泡形态正常。模型组肺间质增厚伴炎症细胞浸润,肺泡壁增宽,纤维组织不同程度增生,肺泡形态变化。给药后,血栓通注射液能不同程度的减轻模型大鼠的炎症细胞浸润。观察组织病变,据Szapiel评分标准进行肺肺炎程度评分,结果如表4所示,与假手术组比较,模型组Szapiel评分显著增加($P<0.001$);与模型组比较,血栓通注射液中、高剂量组Szapiel评分呈降低趋势。

造模14 d时,假手术组肺泡结构完整,支气管上皮完整。模型组支气管黏膜破坏,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。给药后,血栓通注射液及吡非尼酮能不同程度减轻炎症细胞浸润情况。与假手术组比较,模型组Szapiel评分显著增加($P<0.001$);与模型组比较,血栓通注射液中剂量组及吡非尼酮组Szapiel评分显著降低($P<0.05, 0.001$)。

造模28 d时,假手术组大鼠肺泡结构完整,未见明显的炎症细胞浸润。模型组肺泡代偿性扩张,纤维组织增生,肺组织局部结构部分破坏,肺功能受到影响。据Szapiel评分标准进行肺肺炎程度评分,与假手术组比较,模型组Szapiel评分显著增加($P<0.001$);与模型组比较,血栓通注射液中、高剂量组及吡非尼酮组Szapiel评分呈降低趋势。

表4 7、14、28 d各组大鼠Szapiel评分比较($n=6$)

Table 4 Comparison of szapiel scores of rats in each group 7, 14, and 28 d after modeling ($n=6$)

组别	剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	7 d						14 d						28 d					
		0级	1级	2级	3级	4级	Szapiel评分	0级	1级	2级	3级	4级	Szapiel评分	0级	1级	2级	3级	4级	Szapiel评分
假手术	—	10	0	0	0	0	7.00	10	0	0	0	0	6.00	10	0	0	0	0	8.50
模型	—	1	4	1	3	1	30.80***	0	0	2	7	1	47.55***	0	3	4	2	1	39.85***
吡非尼酮	50	0	0	3	2	5	46.60#	0	5	5	0	0	23.50###	2	3	5	0	0	28.90
血栓通	27	0	0	2	6	2	44.60#	0	0	6	4	0	38.80	2	3	3	2	0	31.60
注射液	54	0	4	3	2	1	30.00	1	4	2	3	0	28.35#	1	4	4	1	0	31.80
	81	2	4	4	0	0	22.00	0	0	6	4	0	38.80	1	2	1	5	1	42.35

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

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs sham-operation group; # $P<0.05$ ### $P<0.001$ vs model group

3.4.2 肺组织Masson染色 如图2所示,造模7 d时,假手术组未见明显纤维结缔组织增生;模型组8/10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3/10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;吡非尼酮组发生率10/10,其中中度以上改变5/10;血栓通注射液低、中和高剂量组亦可见部分动物纤维组织增生,发生率为10/10、10/10、7/10,以轻度和中度为主,其中中度纤维组织增生各有5/10、3/10、0/10只。

造模14 d时,假手术组未见明显纤维结缔组织增生;模型组10/10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8/10只;吡非尼酮组发生率10/10,其中中度以上改变0/10;血栓通注射液低、中和高剂量组亦可见部分动物纤维组织增生,发生率为10/10、9/10、10/10,以轻度和中度为主,其中中度纤维组织增生各有0/10、2/10、1/10只,均明显少于模型组。

造模28 d时,假手术组未见明显纤维结缔组织

增生;模型组3/10只大鼠可见中度纤维组织明显增生;吡非尼酮组发生率8/10,其中中度以上改变0/10;血栓通注射液低、中和高剂量组亦分别可见0/10、0/10、4/10只大鼠出现中度纤维化。

3.5 血栓通注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织中COL-I和FN水平的影响

造模7、14、28 d后,与假手术组比较,模型组大鼠肺组织中COL-I和FN水平显著升高($P<0.001$)。造模7 d后,与模型组比较,吡非尼酮组、血栓通注射液高剂量组大鼠肺组织中的FN显著降低($P<0.01, 0.001$),吡非尼酮组COL-I水平显著降低($P<0.001$);造模14 d时,与模型组比较,吡非尼酮组和血栓通注射液中、高剂量组大鼠肺组织中的COL-I水平显著降低($P<0.05, 0.01$),吡非尼酮组FN显著降低($P<0.05$);造模28 d时,与模型组比较,吡非尼酮组和血栓通注射液中、高剂量组大鼠肺组织中的COL-I、FN水平显著降低($P<0.05, 0.01, 0.001$)。结果见表5、6。

4 讨论

IPF是一种以炎症损伤为主要特征的慢性肺疾

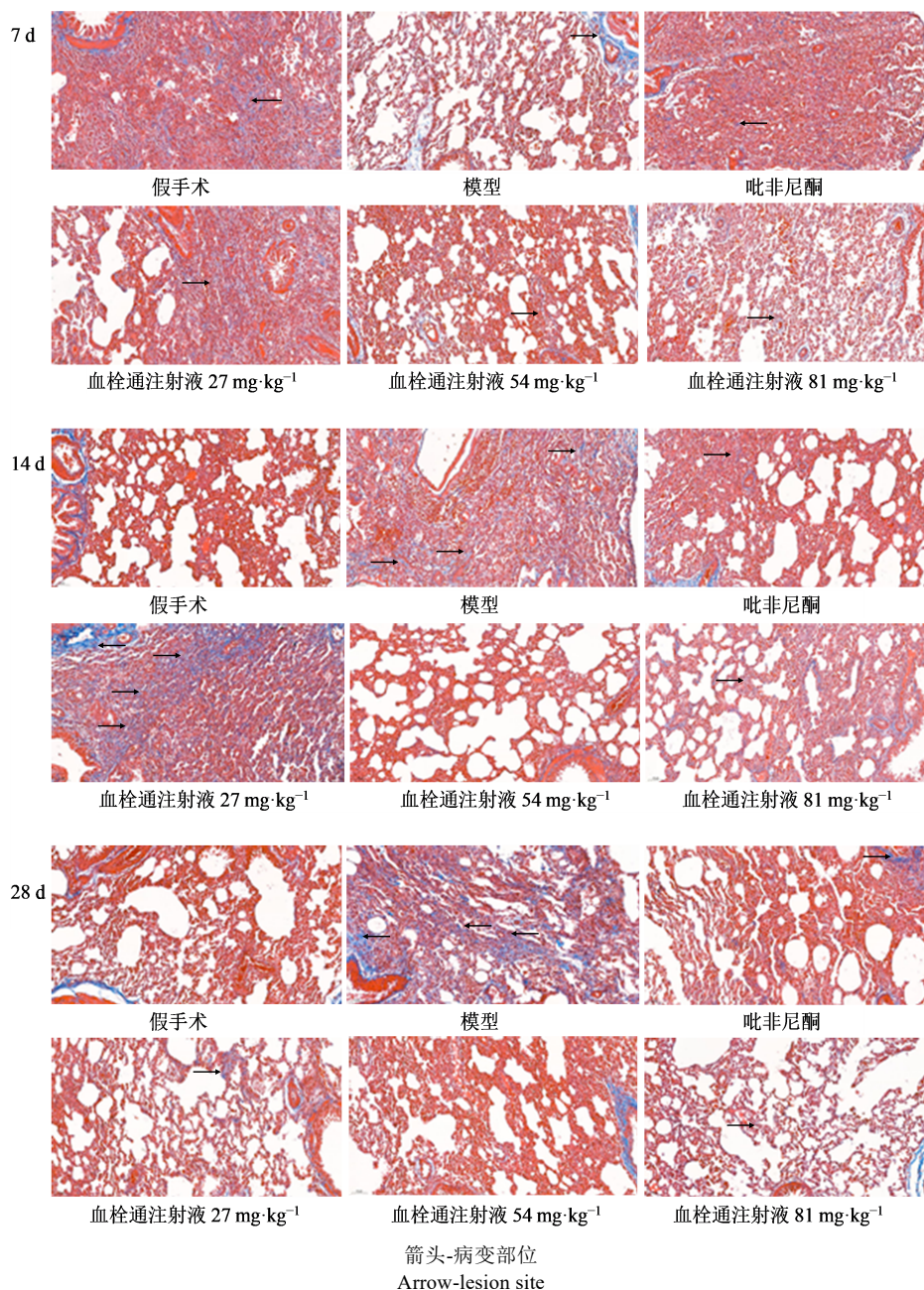


图2 造模7、14、28 d各组大鼠肺组织Masson染色(×200)

Fig. 2 Masson staining of lung tissue of rats in each group 7, 14 and 28 d after modeling(×200)

表5 血栓通注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织COL-I水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 5 Effect of Xueshuantong Injection on levels of COL-I in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	COL-I/(μg·mg ⁻¹)		
		7 d	14 d	28 d
假手术	—	2.278±0.524	2.077±0.443	2.586±0.847
模型	—	3.483±0.794***	3.830±1.821***	7.255±2.251***
吡非尼酮	—	2.244±0.273###	2.393±0.751##	3.835±1.631###
血栓通注射液	27	3.256±0.872	3.955±1.083	6.640±2.871
	54	3.037±0.711	2.537±1.331 [#]	4.574±1.621##
	81	2.990±0.887	2.618±0.511 [#]	3.856±0.745###

与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs sham-operation group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

表6 血栓通注射液对肺纤维化模型大鼠肺组织FN水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 6 Effect of Xueshuantong Injection on levels of FN in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	FN/(μg·mg ⁻¹)		
		7 d	14 d	28 d
假手术	—	3.327±1.456	4.639±1.003	7.082±3.394
模型	—	9.019±2.586 ^{***}	8.504±2.358 ^{***}	15.596±4.741 ^{***}
吡非尼酮	—	4.617±1.577 ^{###}	6.462±2.448 [#]	9.051±3.488 ^{##}
血栓通注射液	27	7.225±2.532	8.905±1.455	13.286±4.996
	54	7.655±2.524	8.145±3.433	11.167±4.304 [#]
	81	6.186±2.731 ^{##}	7.714±2.380	9.415±2.340 ^{##}

与假手术组比较:*** $P < 0.001$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ *** $P < 0.001$ vs sham-operation group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group

病,属于间质性肺疾病范畴。现代医家多以肺痹、肺痿来描述肺纤维化。目前中医界已经对肺纤维化病机有了一个基本的共识,即本病病机是正气亏虚、痰瘀阻络的虚实夹杂。血栓通注射液为三七主根提取的PNS,具有广泛的药理作用,能降低炎症因子水平释放,减轻机体炎症反应、阻止细胞内钙超载、清除自由基及抗氧化应激、调控细胞凋亡信号通路等^[18]。临床也有PNS用于治疗纤维化疾病的报道,PNS主要包括三七皂苷R₁、人参皂苷Rg₁等^[19],目前研究证实,PNS具有显著的抗炎、抗氧化、抗纤维化^[20]等作用。PNS作为一种外源性调节因子,可以抑制成纤维细胞增殖与转化,抑制胶原蛋白合成,减少胶原分泌,从而减轻炎症反应达到抗纤维化的作用^[15]。现有研究发现,三七的有效成分治疗肝、肺、肾、心肌等器官纤维化均有一定的疗效^[21]。PNS可以显著降低肝细胞的 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达和胶原蛋白的总量,人参皂苷Rg₁可以显著抑制肝细胞的增殖与活化^[22-24]。PNS还能抑制肺成纤维细胞的增殖及转化,从而抑制COL-I的合成^[25]。还有研究发现,PNS可以通过上调一些炎症信号分子基因的表达,减轻巨噬细胞在损伤部位的浸润,缓解巨噬细胞介导的炎症反应,从而延缓肾纤维化的进程^[26-27]。因此本实验基于现有实验研究,选取以PNS为主要成分的血栓通注射液进行实验。

肺纤维化常见的造模方法的诱导剂包括博来霉素、百草枯、硅、石棉等,其中博来霉素造模法在肺纤维化的研究中是经典且公认的模型^[28]。博来霉素可通过多种方式给药,最常用的是气管插管单次给药法,单次给药后,急性炎症反应会持续1周左右,随后会向肺纤维化转换。博来霉素模型操作简单,可重复性强,在与肺纤维化的研究中具有重要

作用^[29]。百草枯是一种常用的速效除草剂,其中毒会使肺发生继发性损伤,产生肺纤维化。二氧化硅也可以在肺中沉积,形成炎症反应,形成纤维化结节,但该模型建模时间长,并且缺乏特征,无纤维细胞灶,时间异质性不明显,无上皮细胞增生。气管滴注石棉肺模型会使石棉纤维在两肺叶间分布不均,纤维化常出现在肺中央而不是在胸膜下。综上所述,博来霉素和百草枯均可作为造模药物,相比之下,博来霉素被应用于肺纤维化造模则更成熟^[30]。

IPF的主要病理特征是成纤维细胞增殖分化、细胞外基质异常沉积、炎症细胞浸润和肺泡结构破坏。IPF早期,致病因子引起肺泡上皮细胞损伤,导致炎症细胞的浸润,刺激大量介导纤维增生的促炎细胞因子的产生,因免疫介导的肺部炎症持续存在,形成级联放大反应;促进大量肺成纤维细胞聚集且过度分裂增殖,胶原和细胞外基质在肺间质异常沉积,最终导致肺纤维化^[1]。IPF的发病机制主要有促炎因子的级联放大反应、肺泡损伤后的异常修复、肺泡上皮细胞的上皮间质转化。随着肺纤维化的发展,细胞外基质沉积,肺质量也随之增加,肺系数是反应肺部组织水肿严重程度的指标,可以判断肺纤维化的严重程度。肺功能是呼吸系统疾病检测的必要检查,检测指标包括潮气量、气道阻力与动态肺顺应性等^[16]。其中,潮气量和气道阻力指标的异常主要用于反映气道阻塞的情况,动态肺顺应性主要反应肺容积的变化。通过肺组织病理切片,HE染色可以判断肺组织内炎症的程度,Masson染色可以判断肺组织内纤维增生的程度。IPF进程中,FN是成纤维细胞主要的趋化因子与活化因子,当其表达量异常时,会使细胞迁移并聚集。COL-I表达增加导致细胞外基质沉积,肺组织内胶原蛋白

水平逐渐升高,因此COL-I对维系肺的扩张性程度起关键作用,COL-I和FN可以反映出大鼠肺组织中的胶原水平是否异常^[31],因此,体质量、肺系数、肺功能、COL-I、FN是判断IPF的关键指标。

本实验结果显示,血栓通注射液可以改善IPF大鼠生存状态,降低肺系数,减轻大鼠肺水肿的情况;可以改善肺功能,降低气道阻力和上调动态肺顺应性;可以减轻炎细胞浸润、肺间质增厚和纤维组织增生的严重程度;可降低COL-I和FN水平。结果表明,血栓通注射液可以一定程度的改善博来霉素诱导大鼠的肺纤维化,由于肺纤维化发病机制复杂,对于血栓通注射液抗肺纤维化的作用机制仍需进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 郭敬文,张振玲,邵华.肺纤维化药物治疗机制研究进展[J].中国职业医学,2017,44(5):633-637.
Guo J W, Zhang Z L, Shao H. Research advances in the mechanism of action of pulmonary fibrosis drugs [J]. China Occup Med, 2017, 44(5): 633-637.
- [2] Olson A L, Swigris J J, Brown K K. Clinical trials and tribulations: Lessons from pulmonary fibrosis [J]. QJM: INT J MED, 2012, 105(11): 1043-1047.
- [3] Gogali A, Wells A U. New pharmacological strategies for the treatment of pulmonary fibrosis [J]. Ther Adv Respir Dis, 2010, 4(6): 353-366.
- [4] du Bois R, King T E. Challenges in pulmonary fibrosis x 5: The NSIP/UIP debate [J]. Thorax, 2007, 62(11): 1008-1012.
- [5] du Bois R M, Nathan S D, Richeldi L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Lung function is a clinically meaningful endpoint for phase III trials [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(8): 712-715.
- [6] 谢强敏.特发性肺纤维化的药物治疗[J].世界临床药物,2013,34(1):1-6.
Xie Q M. Drug therapy of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. World Clin Drugs, 2013, 34(1): 1-6.
- [7] 公腾,闫丹丹,窦迎春,等.肺纤维化中医研究进展[J].山东中医药大学学报,2016,40(6):579-582.
Gong T, Yan D D, Dou Y C, et al. Research progress of traditional Chinese medicine on pulmonary fibrosis [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med, 2016, 40(6): 579-582.
- [8] 赵莹,郝红芬,袁梅,等.复方血栓通胶囊联合阿替普酶治疗急性脑梗死的临床研究[J].现代药物与临床,2021,36(5):911-915.
Zhao Y, Hao H F, Yuan M et al. Clinical study on Compound Xueshuantong Capsules combined with alteplase in treatment of acute cerebral infarction [J]. Drugs & Clin, 2021, 36(5): 911-915.
- [9] 康建,周霖,李卓伦,等.基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的复方血栓通胶囊化学成分研究[J].药物分析杂志,2019,39(5):791-804.
Kang J, Zhou L, Li Z L, et al. Chemical constituents study of compound Xueshuantong capsules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(5): 791-804.
- [10] 李宁. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合主成分分析的复方血栓通胶囊质量评价研究[J].中草药,2018,49(19):4552-4560.
Li N. Quality assessment study of Compound Xueshuantong Capsules based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with principal component analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(19): 4552-4560.
- [11] 赵一懿,郭洪祝,陈有根,等. UPLC-Q-TOF/MS 法快速分析血塞通、血栓通注射液化学成分[J].中成药,2017,39(6):1217-1222.
Zhao Y Y, Guo H Z, Chen Y G, et al. Rapid analysis of chemical constituents in Xuesaitong Injection and Xueshuantong Injection by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(6): 1217-1222.
- [12] 李学林,李宇辉,唐进法,等.注射用血栓通(冻干)UPLC指纹图谱研究[J].中国新药杂志,2016,25(14):1641-1646.
Li X L, Li Y H, Tang J F, et al. UPLC fingerprints of freeze-dried Xueshuantong for injection [J]. Chin J New Drugs, 2016, 25(14): 1641-1646.
- [13] 项波,胡永珍,白明辉.血栓通注射液对晚期血吸虫病肝纤维化患者的疗效及患者肝纤维化指标的影响[J].中国地方病防治杂志,2016,31(4):447-449.
Xiang B, Hu Y Z, Bai M H. Effect of Xueshuantong Injection on liver fibrosis in patients with advanced schistosomiasis and its influence on liver fibrosis index [J]. Chin J Control Endem Dis, 2016, 31(4): 447-449.
- [14] 伍红英,金建生,刘静,等.三七总皂苷对腺嘌呤致肾间质纤维化的影响[J].中国新药与临床杂志,2008,27(11):823-828.
Wu H Y, Jin J S, Liu J, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins on adenine caused renal interstitial fibrosis in rats [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2008, 27(11): 823-828.
- [15] 胡雅楠,范秋阳,乔波,等.三七及其有效成分抗纤维化作用的实验研究进展[J].医学食疗与健康,2021,19(7):182-183.
Hu Y N, Fan Q Y, Qiao B, et al. Progress in experimental studies on antifibrotic effects of *Panax notoginseng* and its active components [J]. Med Diet Heal, 2021, 19(7):

- 182-183.
- [16] 李 晗, 高云航, 宋 玲, 等. 复方苦参注射液抗博来霉素致大鼠肺纤维化药效学研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 241-250.
Li H, Gao Y H, Song L, et al. Pharmacodynamic study of Compound Kushen Injection on bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Drug Eval Res, 2022, 45 (2): 241-250.
- [17] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.
- [18] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733-2745.
Liu Y C, Zhang T J, Guo H B, et al. Research progress on *Notoginseng Radix et Rhizoma* and predictive analysis on its Q-Marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [19] Li B Q, Chen J, Wu T X, et al. Fast determination of four active compounds in Sanqi *Panax notoginseng* Injection samples by high-performance liquid chromatography with a chemometric method [J]. J Sep Sci, 2015, 38(9): 1449-1457.
- [20] Zhao Y N, Sun X H, Yu X L, et al. Saponins from *Panax notoginseng* leaves improve the symptoms of aplastic Anemia and aberrant immunity in mice [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 102: 959-965.
- [21] 李 娜, 江开春, 王婷婷, 等. 中药三七及其复方防治器官纤维化的研究进展 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2442-2447.
Li N, Jiang K C, Wang T T, et al. Research progress on prevention and treatment of organ fibrosis of *Panax notoginseng* and its compound [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(9): 2442-2447.
- [22] Geng J W, Peng W, Huang Y G, et al. Ginsenoside-Rg1 from *Panax notoginseng* prevents hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 634(1/2/3): 162-169.
- [23] Zhang C Y, Yuan W G, He P, et al. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(48): 10512-10522.
- [24] Hui J, Gao J R, Wang Y Z, et al. *Panax notoginseng* saponins ameliorates experimental hepatic fibrosis and hepatic stellate cell proliferation by inhibiting the Jak2/Stat3 pathways [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 36(2): 217-224.
- [25] 耿德海, 郭文龙, 王 强, 等. 三七总皂苷对转化生长因子- β 诱导人胚肺成纤维细胞增殖分化及胶原蛋白合成的影响 [J]. 中国药业, 2019, 28(2): 14-17.
Geng D H, Guo W L, Wang Q, et al. Effect of *Panax notoginseng* saponins on proliferation, differentiation and collagen synthesis of transforming growth factor- β -induced human embryonic lung fibroblasts [J]. China Pharm, 2019, 28(2): 14-17.
- [26] Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson D J, et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: Correlation with diabetic state and progressive renal injury [J]. Kidney Int, 2004, 65(1): 116-128.
- [27] Lv W S, Booz G W, Wang Y G, et al. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820: 65-76.
- [28] 李燕飞, 胡长平, 李 峰. 肺纤维化动物模型研究进展 [J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(2): 211-215.
Li Y F, Hu C P, Li F. Advances in animal models of pulmonary fibrosis [J]. Med Sci J Central South China, 2016, 44(2): 211-215.
- [29] 陈孟毅, 孟爱民. 肺纤维化动物模型及研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 88-93.
Chen M Y, Meng A M. Introduction and research progress of animal models of pulmonary fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(6): 88-93.
- [30] 肖 洋, 张俊威, 王伟明. 特发性肺间质纤维化动物模型制作探讨 [J]. 吉林医学, 2016, 37(4): 941-943.
Xiao Y, Zhang J W, Wang W M. Study on animal model of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis [J]. Jilin Med J, 2016, 37(4): 941-943.
- [31] Rout-Pitt N, Farrow N, Parsons D, et al. Epithelial mesenchymal transition (EMT): A universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology [J]. Respir Res, 2018, 19(1): 136.

【责任编辑 兰新新】