

述的研究证明 EB 病毒在 PNC 发生中起着病因的作用。因此,降低 EB 病毒在人群中的感染有可能预防和降低 PNC 的发病率。刘宗潮等^[4]报道,鼻咽清毒剂能抑制 EB 病毒 EA 的表达。刘宗潮等^[5]又报道,茶多酚与亚硒酸钠联合使用能强烈抑制 Raji 细胞 EB 病毒 EA 和 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 的表达。寻找出无毒或低毒的抗 EB 病毒的药物是预防和降低 PNC 发病率的有效途径。

AEVL 是一种纯中药制剂,成分复杂。按中药分类属于扶正祛邪、清热解毒药物,且有抗菌及抗病毒作用。本实验证明 AEVL 在无毒浓度下能抑制 Raji 细胞 EB 病毒 EA 的表达,亦能抑制 B₉₅₋₈ 细胞 EB 病毒 VCA 的表达,表明 AEVL 对 EB 病毒有

杀伤作用,从作用强度来看,优于鼻咽清毒剂。

References:

- [1] Zhang H Q. Methodology and Technology of Experiment on Cell Biology (细胞生物学实验方法及技术) [M]. Beijing: Beijing Normal University Publishing House, 1992.
- [2] Zeng Y. Etiological study on nasopharyngeal carcinoma [J]. Chin J Tumor (中国肿瘤), 1996, 5(5): 8.
- [3] Min H Q, Huang T B. Prospective observation on EB virus and nasopharyngeal carcinoma relationship [J]. Chin J Cancer (癌症), 1991, 10(5): 367.
- [4] Liu Z C, Jian S W, Feng G K, et al. Effect of Biyanqingduji on EB virus antigen expression and its cytotoxic effect [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1999, 30(Suppl): 158-159.
- [5] Liu Z C, Jian S W, Li Z U, et al. Inhibitory effect of teapohyphenol and sodium selenite combination on EBV antigen expression [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2000, 31(2): 110-112.

复方鳖甲片预防肺纤维化大鼠细胞外基质过度形成的实验研究

张东伟, 王继峰^X, 牛建昭, 李 健, 杨美娟, 金 焕, 高宝华

(北京中医药大学 细胞与生化实验室, 北京 100029)

摘要:目的 研究复方鳖甲片预防盐酸博莱霉素致大鼠肺纤维化细胞外基质过度沉积的作用。方法 SD 雄性大鼠气管滴注盐酸博莱霉素造模,第 2 天 ig 复方鳖甲片 1.4, 0.7, 0.35 g/kg, 每周连续给药 6 d, 给药 4 周, 观察第 28 天大鼠肺组织羟脯氨酸和血清中 E 型胶原(E-C)、I 型胶原(I-C)及层黏连蛋白(LN)和透明质酸(HA)的含量,同时取肺组织行 HE、Masson 染色。结果 复方鳖甲片可降低肺纤维化大鼠血清 E-C、I-C、LN 及 HA 的含量,降低肺组织纤维性增生。结论 复方鳖甲片可能是通过降低肺纤维化大鼠细胞外基质含量而发挥治疗作用。

关键词: 复方鳖甲片; 肺纤维化; E 型胶原; I 型胶原; 层黏连蛋白; 透明质酸

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)04-0545-04

Experimental study on protection of Compound Biejia Tablet on exaggerated extracellular matrix accumulation of pulmonary fibrosis rats

ZHANG Dong-wei, WANG Ji-feng, NIU Jian-zhao, LI Jian,

YANG Mei-juan, JIN Huan, GAO Bao-hua

(Laboratory of Cell and Biochemistry, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Key words: Compound Biejia Tablet; pulmonary fibrosis; E-collagen (E-C); I-collagen (I-C); laminin (LN); hyaluronic acid (HA)

肺组织的细胞外基质与肺纤维化关系最为密切^[1]。肺纤维化可由多种疾病引起,致病因素首先造成肺组织损伤,在修复过程中,细胞外基质成分首先填补损伤肺组织,当其过度沉积时,可形成肺间质纤维化。此病理过程导致肺组织重建,肺结构破坏,肺泡膜增厚,换气面积减少,最终发生呼吸衰竭。细胞

外基质与炎症也有密切关系^[2]。因此研究细胞外基质形成对于认识上述疾病的发病机制及对该病诊断、防治均具有重要意义。复方鳖甲片由鳖甲、当归、三七、冬虫夏草、黄芪、板蓝根、连翘等中药组成,本实验室研究表明该方对肝纤维化有较好的疗效。为探讨其对肺纤维化的作用,本实验以博莱霉素 A5

X 收稿日期: 2003-08-03

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30130220); 教育部首批非典科技攻关项目 (15)

作者简介: 张东伟 (1974—), 男, 河南洛阳人, 北京中医药大学 2001 级博士研究生, 研究方向为中药作用的生化机制。

E-mail: zhdw1006@163.com

* 通讯作者 Tel: (010) 64286995 E-mail: wangjifengbeijin@163.com

诱导大鼠肺纤维化模型,研究该方对肺纤维化大鼠细胞外基质的影响,以期为临床应用提供基础。

1 材料

1.1 动物:SD 大鼠,雄性,体重 (206±16) g。实验动物和饲料购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物饲养在洁净级动物房。

1.2 药物:复方鳖甲片原料粉,即复方鳖甲软肝片[国药准字 Z-(1999) Z-102 号]不含赋形剂原料粉,由内蒙古福瑞制药有限公司提供,批号 20020501。醋酸强的松,广东华南制药厂生产,批号 011201。注射用盐酸博莱霉素,日本化药株式会社制造,批号 X12100。

1.3 主要仪器:GC—911 G放射免疫计数器(中国科技大学实业总公司),MD—100 半自动生化分析仪(华士信医疗设备集团公司)。

2 方法

2.1 大鼠肺纤维化模型制备:参考陈佰仪等^[3]方法并加以改进。取 SD 大鼠 70 只,1.5%戊巴比妥钠 ip 麻醉(0.25 mL/100 g)后将大鼠固定,颈部消毒,切开颈部皮肤,逐层剥离,暴露气管,然后向气管内注入 0.3 mL 博莱霉素生理盐水溶液(1 mg/200 g),继续注入 0.3 mL 空气,注后立即将动物直立并旋转,使药液在肺内均匀分布。其中假手术组大鼠注入等体积的生理盐水,正常组大鼠不做任何处理。

2.2 分组与给药:大鼠造模后第 2 天,各组大鼠 ig 给药。正常组、假手术组、模型组大鼠分别 ig 生理盐水 14 mL/kg,阳性药物组 ig 醋酸强的松混悬液 0.56 mg/kg。复方鳖甲片高、中、低剂量组分别 ig 1.4,0.7,0.35 g/kg 复方鳖甲片原料粉混悬液。每周连续给药 6 d,给药 4 周。到第 28 天时,1.5%戊巴比妥钠 ip 麻醉(2.5 mL/kg)大鼠,固定,腹主动脉取血,分离血清。同时取肺脏做相应检测。

2.3 血清学指标测定:将取出的血液以室温 3 000 r/min 离心 15 min,取其上清液即为血清。采用放免法测血清中Ⅲ型胶原(Ⅲ-C)、Ⅰ型胶原(Ⅰ-C)及层黏连蛋白(LN)和透明质酸(HA)的含量。

2.4 肺组织羟脯氨酸测定:取适量肺组织放入冰冷生理盐水中漂洗除去血液,滤纸拭干称其湿质量,适度剪碎后匀浆,按杨陟华等^[4]方法进行测定。

2.5 肺组织病理学检查:将所取肺组织抽真空后用 15%甲醛固定,一周后进行包埋、切片。病理切片按常规方法进行 HE 染色,按文献^[5]方法进行 Masson 染色。按 Szapiec^[6]等方法确定肺肺炎(- ~+++ 级)及肺纤维化(- ~++++ 级)的程度,并参照张东

伟等^[7]提供标准将肺炎和肺纤维化分级。

2.6 数据统计:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 大鼠体重变化情况:实验时分别在第 1,14,28 天称大鼠体重,结果见表 1。结果显示:与正常组及假手术组比较,在第 14 天时,模型组,阳性药物组,复方鳖甲片高、中、低剂量组大鼠体重呈下降趋势,差异显著(P<0.05)。第 28 天时,模型组,阳性药物组,复方鳖甲片高、中、低剂量组大鼠体重明显升高,但同正常组及假手术组相比有一定的差异。

表 1 各组大鼠体重变化 ($\bar{x} \pm s$, n= 10)
Table 1 Change of body weight of rats in different groups ($\bar{x} \pm s$, n= 10)

组 别	剂 量 /(mg·kg ⁻¹)	体 重/g		
		第 1 天	第 14 天	第 28 天
正常	-	207.10±9.04	311.80±27.19	367.40±28.53
假手术	-	201.10±7.53	298.10±30.62	383.00±24.50
模型	-	201.20±9.99	214.70±36.46*△△	308.40±34.41*△△
阳性药物	0.56	206.30±8.74	220.60±35.56*△△	313.60±36.56*△△
复方鳖甲片	1 400	203.30±9.86	226.40±44.38*△△	341.20±31.25▲
	700	203.50±9.69	229.60±26.80*△	334.40±31.59△
	350	205.74±9.74	245.80±34.74**	337.00±32.00△

与正常组比较: * P<0.05 ** P<0.01; 与假手术组比较: △P<0.05 △△P<0.01; 与模型组比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01; 与阳性药物组比较: # P<0.05 ## P<0.01

* P<0.05 ** P<0.01 vs normal group; △P<0.05 △△P<0.01 vs Sham group; ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 vs model group; # P<0.05 ## P<0.01 vs positive medicine group

3.2 大鼠血清中Ⅲ-C,Ⅰ-C,LN 和 HA 的含量测定:结果见表 2。与正常组及假手术组比较,第 28 天时模型组大鼠血清中Ⅲ-C,Ⅰ-C,LN 和 HA 的含量明显升高(P<0.01)。复方鳖甲片高、中、低剂量组均可降低肺纤维化大鼠Ⅲ-C,Ⅰ-C,LN 和 HA 的含量,尤以中剂量组效果显著(P<0.05,0.01)。

3.3 肺组织匀浆羟脯氨酸含量测定:结果见表 3。与正常组及假手术组比较,第 28 天时肺纤维化模型大鼠肺组织羟脯氨酸含量显著升高(P<0.01);与模型组比较,阳性药物组,复方鳖甲片高、中、低剂量组大鼠肺组织羟脯氨酸含量均下降(P<0.01)。正常组与假手术组比较差异不显著。

3.4 病理组织学检查:各组大鼠肺组织病理学检查结果见表 4。解剖后肉眼观察,模型组大鼠肺脏质地坚实,颜色暗红,表面粗糙不平,质地较硬,触之有橡胶感,有囊肿、灰白色纤维素条和瘢痕,仔细观察双肺可发现有板块状病变灶,浅黄褐色病灶大小为 0.3mm×0.3mm,每只大鼠肺部大约有 5~6 处。

表 2 各组大鼠血清中̄E -C, ̄I -C, LN 和 HA 含量 (x̄ ± s, n= 10)

Table 2 Levels of ̄E -C, ̄I -C, LN, and HA in serum of rats in different groups (x̄ ± s, n= 10)

组别	剂 量/(mg · kg ⁻¹)	̄E -C/(ng · mL ⁻¹)	̄I -C/(ng · mL ⁻¹)	LN/(ng · mL ⁻¹)	HA/(ng · mL ⁻¹)
正常	-	126. 65±16. 80	93. 84±11. 76	70. 92± 9. 23	55. 10± 4. 62
假手术	-	128. 88±17. 85	95. 48±12. 74	71. 28±10. 09	55. 90± 4. 90
模型	-	204. 30±26. 00* * △△	149. 53±23. 39* * △△	95. 86±13. 91* * △△	91. 50±12. 39* * △△
阳性药物	0. 56	178. 92±21. 63* * △△	130. 14±22. 42* * △△▲	81. 83±11. 42* * ▲	73. 20± 9. 58* * △△▲▲
复方鳖甲片	1 400	185. 48±25. 12* * △△	142. 43±24. 55* * △△	88. 28±10. 70* * △△	81. 50±11. 70* * △△▲#
	700	173. 89±22. 21* * △△▲▲	117. 03±20. 98* * △△▲▲	82. 96± 9. 41* * △△▲	60. 90± 7. 34▲▲# #
	350	178. 86±22. 51* * △△▲	131. 23±20. 13* * △△▲	87. 20±10. 14* * ▲	73. 70±10. 02* * △△

表注同表 1

Notes are same to Table 1

表 3 各组大鼠肺组织匀浆羟脯氨酸含量 (x̄ ± s, n= 10)

Table 3 Content of hydroxyproline in lung homogenates of rats in different groups (x̄ ± s, n= 10)

组 别	剂 量/(mg · kg ⁻¹)	羟脯氨酸/(mg · g ⁻¹)
正常	-	1. 09±0. 09
假手术	-	1. 11±0. 09
模型	-	3. 05±0. 27* * △△
阳性药物	0. 56	1. 89±0. 17* * △△▲▲
复方鳖甲片	1 400	2. 75±0. 27* * △△▲▲# #
	700	1. 92±0. 16* * △△▲▲
	350	2. 35±0. 21* * △△▲▲# #

表注同表 1

Notes are same to Table 1

表 4 各组大鼠肺炎和肺间质纤维化病理学分级结果 (n= 10)

Table 4 Pathological grading/scoring of alveolitis and interstitial fibrosis in different groups (n= 10)

组 别	剂 量 /(mg · kg ⁻¹)	肺 泡 炎				肺 间 质 纤 维 化			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
正常	-	10	0	0	0	10	0	0	0
假手术	-	9	1	0	0	10	0	0	0
模型	-	0	1	5	4	0	1	6	3
阳性药物	0. 56	1	7	2	0	2	4	4	0
复方鳖甲片	1 400	1	4	3	2	1	4	4	1
	700	2	6	2	0	2	7	1	0
	350	1	4	4	1	1	5	4	0

Ē、Ê 型肺泡细胞数量和结构正常。第 28 天时模型组大鼠仍有一定数量的炎性细胞浸润(如巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸粒细胞等),肺泡结构破坏,肺泡间隔显著增厚,部分肺泡腔扩张呈囊状,肺泡壁断裂,部分肺泡腔萎陷,腔内可见渗出物淤积,沿终末性细支气管、细支气管周边可见局灶性炎性病灶,大量纤维增生;Masson 染色下胶原纤维增多,有明显的间质纤维化。阳性药物组及复方鳖甲片各剂量组炎症及纤维化均较轻,其中阳性药物组、复方鳖甲片中、低剂量组病变程度接近于正常组,假手术组和正常组无明显差异。表明复方鳖甲片有明显减弱纤维积聚,抗纤维化作用。

4 讨论

肺纤维化 (IPF) 是多种肺疾病发展到晚期的共同病理变化,目前临床尚无理想治疗方法。中医学

将本病归入“肺痿”、“喘证”等范畴,虚、痰、瘀、喘为其主要病机特点,其中肺阴不足、痰阻肺络、瘀血阻滞、内闭喘脱又为临床多见的病变类型。鳖甲能软坚散结、滋阴潜阳,黄芪能补肺气虚固表,冬虫夏草能补肺益阴化痰,当归、三七活血化痰定喘,板蓝根、连翘清热解毒,诸药合用,具有补肺益阴、软坚散结、活血通络、清热解毒等功效。该方扶正祛邪,标本兼顾体现了补益气阴、养肺活血定喘的指导思想。

肺内的细胞外基质成分主要有 4 种:胶原蛋白、弹性蛋白、蛋白多糖及糖黏连蛋白。这些成分相互混合交织,使组织成为一个整体并具有一定的硬度和韧性,藉以完成相应的生理功能^[1]。基底膜主要由Ī -C、LN、纤黏连蛋白、肝素硫酸软骨素蛋白多糖等构成。基底膜成分的聚积可刺激炎症细胞的吸附和活化^[8]。基底膜的裂解在肺纤维化的病理中也尤为

重要^[9]。Ⅲ-C 分布于肺间质,Ⅰ-C 分布于基底膜和肺间质。而胶原蛋白是由 3 条不同或相同的肽链构成的三螺旋结构,富含脯氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸,因此测定肺组织羟脯氨酸含量可以反映肺组织胶原蛋白及细胞外基质的含量^[10]。HA 是间质中的一种主要的糖胺聚糖,也是细胞外基质的一种主要成分。肺泡间质中 HA 积累提示 HA 很可能在肺纤维化早期肺泡炎阶段的肺间质水肿中起重要作用。也有人认为早期的 HA 积聚是增生的炎性细胞和成纤维细胞必需的基质,因而有助于纤维组织的形成^[11]。实验研究表明在应用博来霉素后肺内间质性胶原的含量是增高的,肺纤维化大鼠血清中Ⅲ-C、Ⅰ-C、LN、HA 明显升高,说明肺内细胞外基质的合成明显增加,而且还有炎症存在。肺纤维化大鼠给予复方鳖甲片后细胞外基质各成分的含量可明显降低,中、低剂量效果较为明显,这可能是因为高剂量的药物 ig 时吸收度不好而不能发挥较好的疗效。本研究提示复方鳖甲片通过影响细胞外基质的合成起到治疗肺纤维化的作用。

References:

[1] Donald N C, David M B. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 27

(2): 122-124.
[2] Piguet P F. Inflammation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(7): 1037.
[3] Chen B Y, Jiang L, Hou X M. Lipid peroxidation precedes TNF and PDGF release in alveolar macrophage of the experimental pulmonary fibrosis rats [J]. Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志), 2000, 16(11): 1228-1230.
[4] Yang Z H, Zhu M X, Gong Y F, et al. Study on the application of the method of determination of hydroxyproline in rat lung [J]. Bull Acad Mil Med Sci (军事医学科学院院刊), 1995, 19(1): 27-29.
[5] Wang B Y, Li Y S, Huang G S, et al. The Technology of Pathology (病理学技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
[6] Szapitel 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.
[7] Zhang D W, Wang J F, Niu J Z, et al. Experimental study on effects of compound Biejia formula on HRCT images in the rat model of pulmonary fibrosis [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2003, 26(5): 26-30.
[8] Pardo A, Barrios R, Maldonado V, et al. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications [J]. Am J Pathol, 1998, 153(3): 833-844.
[9] Michael P K, John A B, Douglas A, et al. IFN-γ-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis [J]. J Immunol, 1999, 163(10): 5686-5692.
[10] Milman N, Kristensen M S, Bentsen K. Hyaluronan and procollagen type Ⅲ aminoterminal peptide in serum and broncho-alveolar lavage fluid from patients with pulmonary fibrosis [J]. AP M S, 1995, 103(10): 749-754.
[11] Bjardahlen A, Onnervik P O, Westergren G, et al. Myofibroblast accumulation correlates with the formation of fibrotic tissue in a rat air pouch model [J]. J Rheumatol, 2002, 29(8): 1698-1707.

御风胶囊对脑缺血-再灌注损伤大鼠的预防性神经保护作用

赵 瑛,张 季,金 成^X

(哈尔滨商业大学,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨御风胶囊对脑缺血-再灌注损伤的神经保护作用及其机制。方法 实验分为模型组、假手术组、御风胶囊高、低剂量组和阳性药对照组。线栓法制备大鼠脑缺血-再灌注模型,分别观察脑缺血 2 h 再灌注 1 h 及 24 h 神经细胞凋亡、凋亡相关基因 p53、bcl-2、C-fos 表达及脑组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性变化。结果 御风胶囊能显著抑制脑缺血-再灌注所致的神经细胞凋亡、抑制脑缺血-再灌注后 p53 的表达并诱导 bcl-2 表达,与模型组比较差异显著(P<0.05);显著抑制脑缺血-再灌注后 MDA 的产生,提高 SOD 活性(P<0.05);并对 CAT 活性呈现一定的保护作用。结论 御风胶囊对缺血-再灌注脑组织具有一定的神经保护作用,其机制与其抑制脑缺血-再灌注后神经细胞凋亡,调节凋亡相关基因表达及抗脂质过氧化有关。

关键词:御风胶囊;缺血-再灌注;脑;凋亡;凋亡相关基因;脂质过氧化

中图分类号:R 286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2004)05-0548-04

Neural protection of Yufeng Capsule on cerebral ischemia-reperfusion damage in rats

ZHAO Ying, ZHANG Ji, JIN Cheng

(Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Key words: Yufeng Capsule; ischemia-reperfusion; cerebrum; apoptosis; related gene of apoptosis; lipid peroxidation

收稿日期:2003-09-05

作者简介:赵 瑛(1960—),女,吉林怀德人,现为哈尔滨商业大学药学院教授,医学博士,主要研究方向为中医药防治心脑血管疾病。

Tel: (0451) 82195000