

细胞的量^[6],这些均可促进创面的愈合。消化性溃疡是因疮疡在体内不易干燥结痂愈合而形成的^[7],使用微粉化的白芨,比表面积增大,使疮疡与药物得到更大的接触,而提高其治疗效果。

本实验将白芨超微粉与普通粉的抗溃疡效果进行比较,结果显示,白芨超微粉的抗溃疡效果显著。说明白芨在微粉化后溶出度增加,生物利用度增加,从而提高药理活性和减小用药剂量。中药不论直接粉碎或其提取物,往往体积大很难制备现代剂型。微粉化后,可以减小用药剂量,缩小药物体积,对中药剂型现代化有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 唐志鹏,许鑫梅.健中愈疡片对乙酸诱发大鼠胃溃疡愈合质量的影响[J].中国中医药信息杂志,2001,8(2):30.
- [2] 韩坚,林煌权.木香超临界提取物抗实验性胃溃疡的研究[J].中药材,2005,28(11):1017-1019.
- [3] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2001.
- [4] 吴建明.超微粉碎机组的特点及在中药生产中的应用[J].机电信息,2005(18):34-37.
- [5] 张兰英,王法平.原生药材微粉化制剂对药效作用的影响[J].中国粉碎技术,2001,7(1):38-41.
- [6] 孙仁山,陈晓红,程天民,等.白芨对大鼠创面愈合几个要素的影响[J].中国临床康复,2003,7(29):3927-3929.
- [7] 吴宗德,刘汉军,孙颖媛.白芨粉治疗消化性溃疡60例疗效观察[J].遵义医学院学报,2004,27(3):255-256.

丹参总酚酸对博莱霉素致肺纤维化小鼠的治疗作用

林军^{2,3},冯一中²,顾振纶^{1,3*},武慧^{2,3},周文轩^{3,4},郭次仪^{3,4}

(1. 苏州大学医学院 药理教研室,江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学医学院 病理教研室,江苏 苏州 215123; 3. 苏州中药研究所,江苏 苏州 215007; 4. 香港保健协会,香港)

摘要:目的 观察丹参总酚酸对博莱霉素致肺纤维化小鼠的治疗作用。方法 通过气管内注射博莱霉素复制小鼠肺纤维化模型,给予丹参总酚酸_{ig}治疗后,以肺指数、肺组织病理形态及羟脯氨酸(Hyp)水平的测定,观察丹参总酚酸对小鼠肺纤维化形成的影响。结果 丹参总酚酸治疗后肺炎和肺纤维化明显减轻,Hyp水平比模型组明显降低($P < 0.05, 0.01$)。结论 丹参总酚酸能减轻博莱霉素致小鼠肺纤维化程度,有一定的治疗作用。

关键词:肺纤维化;丹参总酚酸;羟脯氨酸

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)03-0400-04

Therapeutic effect of total salvianolic acid on mice with pulmonary fibrosis induced by Bleomycin

LIN Jun^{2,3}, FENG Yi-zhong², GU Zhen-lun^{1,3}, WU Hui^{2,3}, CHOY Wen-hsien^{3,4}, Kwok Chi-yi^{3,4}

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Department of Pathology, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, China; 3. Soochow Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007, China; 4. The Hong Kong Association for Health Care LTD, Hong Kong, China)

Abstract: Objective To study the therapeutic effects of total salvianolic acid on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** The pulmonary fibrosis model was established by intratracheal injection of Bleomycin. The lung index, pathomorphology, and level of hydroxyproline (Hyp) in lung tissue were measured to observe the effect of total salvianolic acid on pulmonary fibrosis of mice. **Results** Total salvianolic acid could obviously reduced alveolitis and fibrosis. The lung index was significantly decreased in total salvianolic acid group compared with that in model group, and the level of Hyp was significantly lower than that in model group ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion** Total salvianolic acid could have therapeutic effects on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

Key words: pulmonary fibrosis; total salvianolic acid; hydroxyproline (Hyp)

* 收稿日期:2007-05-21

基金项目:香港保健协会基金资助项目(20050916-2HK)

作者简介:林军(1976—),男,安徽黄山人,硕士,主要研究方向肺纤维化,现工作单位上海市第一人民医院病理科。

E-mail: forestsoldier@sohu.com

* 通讯作者 顾振纶

肺纤维化是一种原因不明,以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱,最终导致肺泡、肺间质纤维化,可引发呼吸衰竭。丹参总酚酸是从丹参中分离得到的水溶性部位,是一类多酚羟基化合物,含有丹参酚酸A、丹参酚酸B和迷迭香酸等成分^[1]。丹参总酚酸具有活血化瘀、抗氧化、调血脂及抗肝纤维化形成等多种作用。本实验通过复制小鼠肺纤维化模型,观察丹参总酚酸对小鼠肺纤维化的治疗作用。

1 材料

1.1 动物:昆明种小鼠,180只,雌雄各半,体重18~22g,清洁级,由苏州大学医学院实验动物中心提供;实验动物生产许可证号:XCYK(苏)2002-0008;实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2002-0037。

1.2 药品与试剂:博莱霉素A5,日本化药株式会社,批号640110,药品进口注册证号:H20040205;丹参总酚酸(质量分数68%),苏州中药研究所植化室提供;醋酸泼尼松片,江苏徐州平光制药有限公司,批号:32022681;羟脯氨酸(Hyp)测定试剂,南京建成生物制剂公司。

1.3 仪器: CX31 光学显微镜, OLYMPUS; 722 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组、造模及给药^[2]:昆明种小鼠,180只,随机分为:对照组,模型组,醋酸泼尼松组(6.67mg/kg),丹参总酚酸大、中、小剂量组(160、80、40mg/kg),每组30只。实验小鼠用4%水合氯醛(0.01mL/g)ip麻醉后,取仰卧固定位,常规消毒,行颈正中切口,钝性分离暴露气管,除对照外,各组小鼠气管软骨环间隙穿刺缓缓注入博莱霉素(5mg/kg),对照组注入等体积生理盐水。注药后缝合皮肤,立即将小鼠直立旋转3~5min,使药液均匀分布于两侧肺内,手术前1天及手术后3d连续im青霉素(8000U/只)4d。各治疗组造模后次日开始ig给药,对照组与模型组ig蒸馏水。

2.2 肺指数测定:各组动物分别于实验第7、14、28天经颈椎离断法处死10只,分离出双肺,称质量,计算肺指数[肺指数=肺质量(mg)/体重(g)]。

2.3 组织病理学观察:取右肺,按常规病理学方法进行固定、包埋、切片。将病理切片进行HE染色,然后根据Szaopiel等^[3]方法将肺泡炎和肺纤维化的程度分为4级:0级,无明显改变;1级,轻度改变,病变范围小于全肺的20%;2级,中度改变,病变范围占全肺的20%~50%;3级,重度改变,病变范围占全

肺的50%以上。

2.4 Hyp测定:称取小块肺组织测定试剂盒说明书进行Hyp测定。

2.5 统计方法:将等级资料转化为计量资料,采用SPSS 11.0软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较组间差异性,进行t检验。

3 结果

3.1 丹参总酚酸对肺指数的影响:造模后各时间点模型组小鼠肺指数均高于对照组($P < 0.01$),第28天实测数值增高最显著;丹参总酚酸及醋酸泼尼松组小鼠肺指数均比同期模型组显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。见表1。提示丹参总酚酸及醋酸泼尼松可明显降低博莱霉素所致肺纤维化小鼠的肺指数。

表1 丹参总酚酸对博莱霉素致肺纤维化小鼠肺指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	肺指数/(mg · g ⁻¹)		
		第7天	第14天	第28天
对照	-	7.318 ± 0.412	6.481 ± 0.562	5.775 ± 0.473
模型	-	10.266 ± 1.552	10.030 ± 1.751	10.655 ± 5.213
醋酸泼尼松	6.67	7.705 ± 1.278 [*]	8.109 ± 1.279 [*]	6.391 ± 0.926 [*]
丹参总酚酸	160	7.635 ± 1.157 ^{**}	7.187 ± 1.434 ^{**}	6.351 ± 1.037 [*]
	80	7.328 ± 1.288 ^{**}	7.630 ± 1.068 ^{**}	6.661 ± 1.412 [*]
	40	8.028 ± 1.165 ^{**}	8.464 ± 1.425 [*]	6.343 ± 1.148 [*]

与对照组比较: $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.2 丹参总酚酸对肺病理形态的影响:大体观察表明,对照组双肺呈粉红色,表面光滑,弹性较好。模型组小鼠第7天双肺呈暗红色,体积较大,弹性差;第14、28天时双肺苍白,体积缩小,硬度增加。其余各治疗组均轻于模型组。光镜观察所见,对照组肺组织结构清晰,肺泡壁未见增厚,肺泡上皮细胞结构完整。模型组第7天时肺泡炎明显,肺泡腔见大量巨噬细胞、中性粒细胞、浆细胞渗出,肺泡间隔增宽,可见少量成纤维细胞及其基质增生;第14天时肺泡炎减轻,肺泡间隔见成纤维细胞及基质大量增多;第28天时肺泡炎轻微,肺泡间隔显著增宽,可见大量成纤维细胞及胶原纤维增生,少量巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润。丹参总酚酸及醋酸泼尼松治疗组小鼠肺泡间隔增宽较各时间点模型组明显减轻,巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润较轻,肺泡结构基本正常,与模型组相比纤维化程度均有不同程度减轻。第28天时肺组织改变见图1。评分结果见表2。提示丹

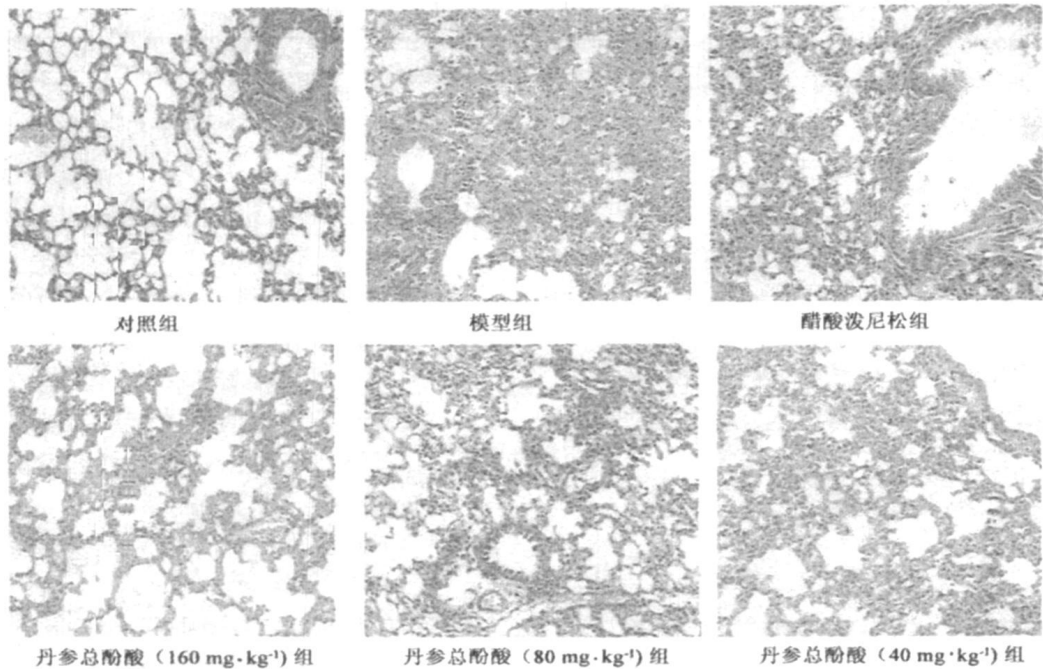


图1 第28天时小鼠肺组织的病理形态变化

Fig. 1 Pathomorphological changes of lung tissue in mice at day 28

表2 丹参总酚酸对肺纤维化小鼠肺泡炎和肺纤维化程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of salvianolic acid on degree of alveolitis and pulmonary fibrosis in mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	肺泡炎和肺纤维化程度/级		
		第7天	第14天	第28天
对照	-	0.10 ± 0.32	0.10 ± 0.32	0.20 ± 0.42
模型	-	2.30 ± 0.68	2.10 ± 0.74	2.70 ± 0.48
醋酸泼尼松	6.67	1.00 ± 0.94* *	1.20 ± 0.63* *	1.20 ± 0.42* *
丹参总酚酸	160	1.50 ± 0.71*	0.90 ± 0.74* *	1.70 ± 0.68* *
	80	1.40 ± 0.70* *	1.40 ± 0.52*	2.00 ± 0.82*
	40	1.50 ± 0.71*	1.20 ± 0.63* *	2.00 ± 0.82*

与对照组比较: $P < 0.01$;

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

参总酚酸及醋酸泼尼松早期可减轻博莱霉素致小鼠肺泡炎,晚期可减轻肺纤维化程度。

3.3 丹参总酚酸对肺 Hyp 水平的影响: 模型组小鼠肺 Hyp 水平和对照组相比于第14天开始升高,第28天最显著;丹参总酚酸大剂量治疗后各时间点 Hyp 水平均比模型组明显降低 ($P < 0.05, 0.01$);丹参总酚酸中、小剂量治疗小鼠后第7、28天肺 Hyp 水平显著降低 ($P < 0.01$)。给药第14天时小鼠肺 Hyp 有下降趋势;醋酸泼尼松治疗后虽可见 Hyp 水平比模型组降低,但无显著差异。见表3。提

表3 丹参总酚酸对肺纤维化小鼠肺组织 Hyp 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of salvianolic acid on Hyp level in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	Hyp/($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)		
		第7天	第14天	第28天
对照	-	0.40 ± 0.06	0.43 ± 0.19	0.44 ± 0.09
模型	-	0.37 ± 0.05	0.61 ± 0.14	0.66 ± 0.07
醋酸泼尼松	6.67	0.34 ± 0.04	0.56 ± 0.10	0.60 ± 0.14
丹参总酚酸	160	0.30 ± 0.04* *	0.46 ± 0.07*	0.52 ± 0.14*
	80	0.29 ± 0.04* *	0.57 ± 0.10	0.52 ± 0.10* *
	40	0.25 ± 0.04* *	0.56 ± 0.16	0.45 ± 0.09* *

与对照组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$;

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ $P < 0.01$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

示丹参总酚酸可降低博莱霉素所致肺纤维化小鼠的肺 Hyp 水平。

4 讨论

经气管注入博莱霉素造成动物肺纤维化,其病理过程与人类特发性肺间质纤维化相似,作为肺纤维化的经典动物模型而被广泛应用^[4]。博莱霉素致肺纤维化机制尚未阐明,但自由基损伤是目前已知的重要机制^[5]。Murrel 等^[6]报道氧自由基可刺激成纤维细胞增生。成纤维细胞是分泌胶原蛋白的主要细胞,其合成与分泌胶原能力的增强或成纤维细胞

的大量增殖, 都可能导致胶原总量的增加。因此博来霉素致肺纤维化病理过程分两个阶段: 早期为肺泡炎, 晚期为肺纤维化。肺泡炎阶段, 博来霉素刺激大量炎性细胞产生氧自由基、细胞因子和酶参与了肺损伤, 随后氧自由基刺激成纤维细胞分泌胶原蛋白形成肺纤维化^[7]。Hyp 是机体胶原蛋白的主要成分之一, 约占其氨基酸总量的 13%, 其他除弹性蛋白含有少量 Hyp (约 1%) 外, 均不含 Hyp。因此组织中 Hyp 水平可作为其胶原组织代谢的重要指标^[8]。

本实验应用博来霉素复制小鼠肺纤维化模型, 观察发现模型组第 7 天肺泡炎明显, 第 14、28 天形成纤维化, 且第 14、28 天 Hyp 水平显著高于对照组 ($P < 0.05, 0.01$), 主要病变与指标都与文献报道一致^[9], 说明动物模型复制成功。

在肺纤维化的治疗上, 目前公认疗效确切的糖皮质激素, 早期应用效果好, 中晚期则疗效不佳, 且长期应用有不良反应, 严重影响机体免疫功能, 增加继发感染和呼吸衰竭的可能性。临床资料显示仅少于 30% 的患者激素治疗有效^[10]。现代实验研究及临床应用均表明, 丹参在抗肺纤维化中作用确切、效果显著^[11], 其防治肺纤维化的作用机制与氧自由基清除有关^[12]。作为丹参的有效成分丹参总酚酸, 同样具有很强的抗氧化活性^[1], 是否也具有抗肺纤维化的作用尚不清楚。本研究用丹参总酚酸治疗小鼠肺纤维化, 观察发现与模型组相比肺指数明显降低; 病理形态学上早期肺泡炎减轻, 晚期纤维化程度减轻; 肺组织 Hyp 水平显著低于模型组。表明丹参总酚酸对博来霉素所致小鼠肺纤维化的发生发展有一定的抑制作用, 其作用机制可能与其抗氧化活性及

抑制成纤维细胞分泌胶原蛋白有关。提示丹参总酚酸对小鼠肺泡炎及肺纤维化有一定的抑制作用, 为丹参总酚酸预防和治疗肺纤维化提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 李玉娟, 杜冠华. 总丹酚酸和银杏叶提取物对血管平滑肌细胞保护作用的比较 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(11): 844-847.
- [2] 董 静, 苗维纳, 罗桂林, 等. 丹参对实验性肺纤维化小鼠病理变化和核因子- β 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(12): 1428-1431.
- [3] 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: 893-899.
- [4] Thrall R S. Differential cellular analysis of bronchoalveolar lavage fluid obtained at various stages during the development of bleomycin-induced pulmonary in the rat [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1982, 126: 488-492.
- [5] Russell P B, Mike N, Karrie W, et al. Role of extracellular superoxide dismutase in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282: 719-726.
- [6] Murrell G A C, Francis M J O, Bromley L, et al. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals [J]. *Biochem J*, 1990, 265: 659-661.
- [7] Hagiwara S I, Ishii Y, Kitamura S. Aerosolized administration of *N*-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 225-231.
- [8] Russell P B, James D C. Oxidative stress in airways: Is there a role for extracellular superoxide dismutase [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166(12): 38-43.
- [9] Chandler D B. Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis [J]. *Clin Chest Med*, 1990, 11(1): 21-23.
- [10] Marinelli M A. Idiopathic pulmonary fibrosis progress and challenge [J]. *Chest*, 1995, 108: 297-298.
- [11] 阴 健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [12] 王昌明, 何庆忠, 张瑞祥. 丹参对鼠肺纤维化过程中组织变化的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(5): 308-310.

羟基红花黄色素 A 促内皮细胞增殖的机制研究

张 岭¹, 宋 艳², 李长龄², 朱美才³, 王 卉⁴, 刘 珂⁵, 朱海波^{1*}

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050; 2. 北京大学药学院 分子与细胞药理系, 北京 100083; 3. 中国人民解放军空军总医院 分子生物学中心, 北京 100036; 4. 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071; 5. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘 要: 目的 探讨羟基红花黄色素 A (HSYA) 对低氧条件下犬血管内皮细胞 (VEC) 血管内皮生长因子 (VEGF) 相关信号传导通路的影响。方法 在低氧条件下以 ELISA 法观察 VEGF 抗体及其两种酪氨酸受体 (Flt-1 和 KDR) 的抗体对 HSYA 促 VEC 增殖作用及分泌 VEGF 水平的影响; 生物分子相互作用分析法检测 HSYA 与 VEGF、Flt-1 和 KDR 的相互作用; 硝酸还原酶法测定 VEC 培养液中 NO、NOS 的量。结果 10 μ g/mL VEGF、

* 收稿日期: 2007-06-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370720); 国家“863”计划 (2004AA2Z3815)

* 通讯作者 朱海波 Tel: (010) 63188106 Fax: (010) 63017757 E-mail: zhuhaiibo@imm.ac.cn