

• 药理与临床 •

虫草复方对博莱霉素致大鼠肺纤维化的作用及其机制

张永胜^{1,3}, 冯一中², 曹志飞³, 顾振纶^{3*}, 杨庆尧⁴, 杨晓彤⁴, 周文轩⁵, 郭次仪⁵

1. 苏州大学附属第二医院 病理科, 江苏 苏州 215004
2. 苏州大学医学部 病理教研室, 江苏 苏州 215123
3. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007
4. 上海杨杨百草研究所, 上海 200233
5. 香港保健协会, 香港

摘要: **目的** 探讨虫草复方对博莱霉素致大鼠肺纤维化的作用及其机制。**方法** Wistar 大鼠随机分为对照组, 模型组, 复方虫草高、低剂量 (150、75 mg/kg) 组和醋酸泼尼松 (3.33 mg/kg) 组, 每组 18 只。除对照外其余各组大鼠采用气管内一次性滴注盐酸博莱霉素造模, 对照组大鼠气管内一次性滴注等体积生理盐水。造模后第 2 天开始给药, 对照组和模型组分别 ig 给予等体积生理盐水。各组动物于 7、14、28 d 随机处死 6 只, 分别观察大鼠肺指数、肺组织羟脯氨酸 (Hyp)、丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及血清中 MDA 的量和 SOD 的活性。同时取固定部位肺组织进行病理组织学检查, 并应用免疫组织化学法检测转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、I 型胶原、III 型胶原在肺组织中的表达; 观察各组大鼠动脉血气的变化。**结果** 虫草复方能明显降低肺纤维化大鼠肺指数和肺组织 Hyp 的量, 并可提高血清和肺组织中 SOD 活性, 降低血清和肺组织中 MDA 和肺组织 TGF- β 1、I 型胶原、III 型胶原的表达; 虫草复方可使肺纤维化大鼠动脉二氧化碳分压 [$p(\text{CO}_2)$] 降低和血氧分压 [$p(\text{O}_2)$] 提高; 虫草复方明显改善实验性大鼠肺纤维化程度。**结论** 虫草复方对大鼠肺纤维化具有一定的干预作用, 其机制可能与抗脂质过氧化、抑制 TGF- β 1 表达、减少肺泡间质胶原沉积及改善肺呼吸功能有关。

关键词: 虫草复方; 肺纤维化; 脂质过氧化; 博莱霉素; 羟脯氨酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1766-07

Effect of *Cordyceps sinensis* and *Panax notoginseng* compound extracts on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats and its mechanisms

ZHANG Yong-sheng^{1,3}, FENG Yi-zhong², CAO Zhi-fei³, GU Zhen-lun³, YANG Qing-yao⁴, YANG Xiao-tong⁴, CHOU Wen-hsien⁵, KWOK Chi-yi⁵

1. Department of Pathology, the Second Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215004, China
2. Department of Pathology, Medical Section of Soochow University, Suzhou 215123, China
3. Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007, China
4. Shanghai Yang's Herb Institute, Shanghai 200233, China
5. The Hong Kong Association for Health Care Ltd., Hong Kong, China

Abstract: Objective To study the effect of *Cordyceps sinensis* and *Panax notoginseng* compound extracts (CSPNE) on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis (PF) in rats and its mechanisms. **Methods** Wistar rats were randomly divided into five groups (18 rats in each group). Rats in model, high- and low-dosage (150 and 75 mg/kg) CSPNE, and Prednisone acetate (3.33 mg/kg) groups were injected with a single dose of Bleomycin hydrochloride through trachea and in control group with the same volume of normal saline. One day after the injection, CSPNE solution of different dosages was respectively ig given to rats daily, while the same volume of normal saline was given to those in the control and model groups. On day 7, 14, and 28 after medication, six rats in per treatment group were randomly killed. Lung samples in every group of rats were measured for lung index, hydroxyproline (Hyp) and malonaldehyde (MDA) contents, and superoxide dismutase (SOD) activities, and serum was analyzed for SOD activities and MDA

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 香港保健协会项目 (20040903, HK)

作者简介: 张永胜 (1970—), 男, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为肿瘤病理及肺纤维化。E-mail: ff1970zys@gmail.com

*通讯作者 顾振纶 E-mail: zhenlun.2003@163.com

contents. Lungs were incised to make pathological sections which were stained with HE, and the expression of TGF- β 1, Collagen I, and Collagen III in lung tissue was analyzed by means of immunohistochemistry technique. Arterial blood gas detection was observed in every group. **Results** CSPNE could significantly decrease the lung index and Hyp contents in the lung tissue of rats with PF. It could enhance SOD activities and reduce MDA contents both in serum and lung tissues. It also decreased the expression of TGF- β 1, Collagen I, and Collagen III in lung tissues. In the arterial blood gas detection CSPNE was found to make $[p(\text{CO}_2)]$ lowered, while $[p(\text{O}_2)]$ increased in the artery of rats with PF. **Conclusion** CSPNE has obvious effect of inhibiting PE of rats, and the mechanism may be associated with its antilipid peroxidation, inhibiting the expression of TGF- β 1, reducing the alveolar interstitial collagen deposition, and improving respiratory function as well.

Key words: *Cordyceps sinensis* and *Panax notoginseng* compound extracts (CSPNE); pulmonary fibrosis (PF); lipid peroxidation; Bleomycin; hydroxyproline (Hyp)

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是多种原因引起的急慢性间质性肺疾病 (interstitial lung disease, ILD) 的共同结局, 其发病机制不明, 病理特点是肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的过度沉积; 临床主要表现为进行性呼吸困难、干咳、疲乏, 最终发生低氧血症和呼吸衰竭^[1]。特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 约占所有 ILD 的一半, 病情呈进行性发展, 患病率约为 0.007%~0.02%, 并随年龄增长而增加, 5 年生存率为 70%, 确诊后中位生存期为 3 年, 或出现症状后 5 年^[2]。目前治疗肺纤维化的手段只能减轻患者的症状, 并不能使患者的生存率有所改善。由于肺纤维化病因和发病机制不完全清楚, 其形成又涉及细胞、细胞因子、ECM 代谢等多种因素和多个环节的复杂过程, 治疗上有一定难度, 目前尚缺乏满意的治疗方法^[1-2]。

虫草复方由冬虫夏草和三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponin, PNS) 组成。冬虫夏草为麦角菌科冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体, 具有免疫、镇静、降血糖、抗心律失常、抗衰老及预防和治疗肾衰竭、肝纤维化等作用^[3-4]。PNS 具有止血散瘀、活血生肌、消炎镇痛、补虚强壮等功效以及耐缺氧、降低血糖与血脂、改善血液循环、增加机体免疫力等多方面的生理活性^[5-6]。本课题组前期实验观察到冬虫夏草和 PNS 对博莱霉素致肺纤维化动物模型具有很好的干预作用^[7-9]。因此本实验观察虫草复方对肺纤维化大鼠的干预作用并探讨其机制, 从而为虫草复方治疗肺纤维化提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 大鼠, 90 只, 雌雄各半, 体质量 180~220 g, 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 SCYK (苏) 2002-0008, 实验动物使用许可证号 SYXK (苏) 2002-0037。

1.2 药品与试剂

虫草复方由上海杨杨百草研究所提供, HPLC 检测其中含虫草腺苷 0.64 mg/g、虫草酸 23.9% 和三七皂苷 R_1 2.0%。盐酸博莱霉素 (日本化药株式会社), 醋酸泼尼松片 (江苏徐州平光制药有限责任公司); 羟脯氨酸 (Hyp)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (南京建成生物试剂公司)。兔多克隆抗体转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、I 型胶原、III 型胶原, 即用型 SABC 试剂盒, DAB 显色剂, 均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 分组及造模

90 只 Wistar 大鼠, 随机分为对照组, 模型组, 虫草复方高、低剂量 (150、75 mg/kg) 治疗组和醋酸泼尼松 (3.33 mg/kg) 治疗组。大鼠用 4% 水合氯醛 (0.01 mL/g) ip 麻醉后, 仰卧位固定, 常规消毒, 行颈正中切口, 钝性分离气管, 造模组于气管软骨环间隙穿刺缓缓注入博莱霉素 (5 mg/kg), 对照组注入等体积生理盐水。注药后缝合皮肤, 立即将大鼠直立旋转 3~5 min, 使药液均匀分布于两侧肺内。各组造模后次日开始 ig 给药, 对照组与模型组 ig 给予等体积生理盐水, 每天 1 次。

1.4 取材方法

在给药第 7、14、28 天后分 3 次取材, 每次各组随机取大鼠 6 只, ip 给予 4% 水合氯醛 (0.01 mL/g) 麻醉后, 眼眶静脉取血, 分离血清。同时取出双肺, 称质量, 计算肺指数 (肺指数 = 肺质量/体质量), 取右肺用 10% 福尔马林固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色。左肺用于 Hyp、SOD、MDA 等生化指标测定。

1.5 Hyp、SOD 和 MDA 测定

肺组织 Hyp、SOD、MDA、总蛋白和血清 SOD、

MDA、总蛋白测定分别按照试剂盒说明书进行。

1.6 免疫组化检测

将 3 μm 厚石蜡切片贴附于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 90 °C 烤片 1 h。切片经二甲苯脱蜡, 酒精梯度脱水; 0.05 mol/L (pH 7.2) PBS 洗 3 次, 每次 2 min。高压锅内加入 pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液 1 500 mL, 加热至沸腾, 将切片放入缓冲液内, 继续加热至沸腾后 2 min, 流水冷却至室温, 取出玻片, 蒸馏水冲洗 10 min, PBS (pH 7.2) 冲洗 4 次, 每次 1 min。滴加适当稀释的一抗, 37 °C 孵育 1 h 左右。PBS (pH 7.2) 洗 4 次, 每次 1 min。滴加生物素化二抗, 37 °C 孵育 30 min。PBS (pH 7.2) 洗 4 次, 每次 1 min。滴加 SABC 试剂 (链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物); 37 °C 孵育 30 min, PBS (pH 7.2) 洗 4 次, 每次 1 min。滴加新鲜配制 DAB 显色剂 (取 3 mL 蒸馏水, 加 A、B、C 试剂各 3 滴, 混匀), 室温显色, 镜下控制反应时间, 充分水洗。苏木素复染 30 s。梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。采用 PAS9000 病理图像分析系统 (Ver 9.2.1), 用积分吸光度来衡量肺组织中 TGF-β1、I 型胶原和 III 型胶原蛋白表达的量。每张切片选取 5 个高倍视野 (×400), 根据免疫组化阳性着色的深浅, 计算每个视野的积分吸光度, 求其平均值。

1.7 动脉血气分析

用肝素化 1 mL 一次性注射器于腹主动脉取血 0.3~0.4 mL, 立即用橡胶塞封闭针头, 并即刻送检。采用全自动血气分析仪 (pHOx plus L 型, 美国 Nova 公司) 分析动脉血二氧化碳分压 [p(CO₂)] 和血氧分压 [p(O₂)] 的变化。

1.8 组织病理学观察

光镜下观察大鼠肺组织病理形态学特征。依据

Szapiel 等^[10]的方法将肺泡炎症和肺纤维化的程度分为 4 级。肺泡炎症: 0 级, 无肺泡炎症; 1 级, 轻度肺泡炎症, 肺泡隔因细胞浸润增宽, 病变范围局限在全肺 20% 以下; 2 级, 中度肺泡炎症, 病变范围占全肺 20%~50%; 3 级, 重度肺泡炎症, 呈弥漫性分布, 病变范围大于 50%。肺纤维化: 0 级, 无肺间质纤维化; 1 级, 轻度肺间质纤维化, 病变范围局限在全肺 20% 以下; 2 级, 中度肺间质纤维化, 病变范围占全肺 20%~50%, 肺泡结构紊乱; 3 级, 重度肺间质纤维化, 病变范围大于 50%, 肺泡融合, 肺实质结构紊乱。

1.9 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件 One-way ANOVA 进行分析, 组间差异采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 对肺纤维化大鼠肺指数和肺组织 Hyp 的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肺指数在各相应时间点均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠肺指数在各相应时间点均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.05)。与对照组相比, 模型组大鼠肺组织 Hyp 在各相应时间点均升高, 且在 14、28 d 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 虫草复方各组肺组织 Hyp 在各相应时间点均降低, 且在 14、28 d 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见表 1。

2.2 对肺纤维化大鼠肺组织和血清 SOD 活性的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肺组织匀浆和血清 SOD 活性在各相应时间点均降低, 且在 7、14 d 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 虫草复方各组肺组织匀浆和血清 SOD 活性在各相应时间点均升高, 且在 7、14 d 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

表 1 虫草复方对肺纤维化大鼠肺指数和肺组织 Hyp 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of CSPNE on lung index and Hyp contents in lung tissues of rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺指数/(mg·g ⁻¹)			Hyp/(μg·mg ⁻¹)		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	5.37±0.19	4.82±0.47	5.13±1.01	0.41±0.09	0.41±0.13	0.44±0.15
模型	—	15.36±2.72 ^{###}	11.66±5.21 ^{###}	15.13±3.86 ^{###}	0.45±0.05	0.72±0.08 ^{###}	0.77±0.14 ^{###}
虫草复方	150	8.14±2.42 ^{**}	6.83±2.73 [*]	6.16±0.40 ^{**}	0.37±0.08	0.58±0.05 [*]	0.57±0.23 ^{**}
	75	7.40±3.30 ^{**}	5.84±0.94 ^{**}	7.76±1.75 ^{**}	0.42±0.03	0.44±0.07 ^{**}	0.50±0.12 ^{**}
醋酸泼尼松	3.33	8.65±3.92 ^{**}	5.64±0.81 ^{**}	8.43±3.14 ^{**}	0.48±0.07	0.67±0.13	0.60±0.07 [*]

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{###} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as followings

表 2 虫草复方对肺纤维化大鼠肺组织匀浆和血清 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of CSPNE on activity of SOD in lung tissue and serum of rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肺组织匀浆 SOD/(U·mg ⁻¹)			血清 SOD/(U·mL ⁻¹)		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	63.77 ± 13.14	73.48 ± 6.38	63.36 ± 7.61	258.1 ± 7.4	268.8 ± 19.4	237.3 ± 37.3
模型	—	25.45 ± 6.51 ^{###}	54.71 ± 8.06 ^{###}	53.54 ± 6.62	182.3 ± 11.2 ^{###}	203.7 ± 23.5 ^{###}	194.4 ± 20.6
虫草复方	150	42.25 ± 6.87 ^{**}	62.86 ± 6.58 [*]	59.76 ± 3.51	227.5 ± 21.7 ^{**}	251.7 ± 44.2 [*]	206.9 ± 25.2
	75	49.52 ± 5.73 ^{**}	67.59 ± 7.10 ^{**}	73.09 ± 7.78	219.3 ± 22.6 ^{**}	259.6 ± 65.5 [*]	209.4 ± 50.3
醋酸泼尼松	3.33	46.72 ± 8.83 ^{**}	64.70 ± 4.55 [*]	48.76 ± 7.53	210.6 ± 21.3 ^{**}	268.1 ± 27.3 ^{**}	251.4 ± 29.8

2.3 对肺纤维化大鼠肺组织和血清 MDA 的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肺组织匀浆和血清 MDA 在各相应时间点均升高, 且在 7、14 d 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, 虫草复方各组肺组织匀浆和血清 MDA 在各相应时间点均降低, 且在 7、14 d 时显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 3。

2.4 对肺纤维化大鼠肺组织病理形态的影响

对照组大鼠肺组织结构清晰, 肺泡腔透亮, 肺泡壁未见增厚, 上皮细胞结构完整, 间质未见胶原沉积。模型组大鼠 7 d 时肺泡炎症明显, 肺泡腔见大量肺泡巨噬细胞、中性粒细胞渗出, 肺泡间隔略增宽, 肺间质少量胶原沉积, 血管充血; 14 d 时肺泡炎症稍减轻, 肺泡间隔见成纤维细胞增生及大量

胶原沉积并增宽; 28 d 时肺泡炎症减轻, 少量肺泡巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润, 肺泡间隔显著增宽, 可见大量成纤维细胞增生及大量胶原沉积。与模型组相比, 虫草复方各组大鼠肺泡炎症在各相应时间点显著减轻 ($P < 0.05$ 、 0.01); 虫草复方各组大鼠肺纤维化程度在各相应时间点均减轻, 在 14、28 d 时显著减轻 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 1、表 4。

2.5 对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β1 蛋白表达的影响

TGF-β1 定位于胞浆, 对照组大鼠的少数细支气管黏膜上皮细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞的胞浆有少量阳性表达; 模型组大鼠细支气管黏膜上皮细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞 TGF-β1 表达更明显, 且范围更广; 其余各给药组大鼠细支

表 3 虫草复方对肺组织纤维化大鼠肺组织匀浆和血清 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of CSPNE on contents of MDA from both lung and serum in rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肺组织匀浆 MDA/(nmol·mg ⁻¹)			血清 MDA/(nmol·mL ⁻¹)		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	2.52 ± 1.16	3.42 ± 0.83	4.51 ± 1.70	1.63 ± 0.66	1.45 ± 1.27	3.19 ± 1.73
模型	—	6.53 ± 0.64 ^{###}	4.85 ± 0.66 ^{###}	6.15 ± 1.27	3.06 ± 1.02 ^{###}	4.19 ± 2.34 ^{###}	6.24 ± 1.80 ^{###}
虫草复方	150	4.14 ± 0.56 ^{**}	2.92 ± 0.58 ^{**}	5.35 ± 0.79	1.43 ± 0.50 ^{**}	2.42 ± 0.97 [*]	3.57 ± 1.29 ^{**}
	75	3.93 ± 0.50 ^{**}	3.76 ± 0.62 ^{**}	4.53 ± 0.77	1.90 ± 0.68 [*]	1.77 ± 1.13 ^{**}	5.57 ± 0.80
醋酸泼尼松	3.33	4.31 ± 1.00 [*]	3.24 ± 0.50 ^{**}	5.16 ± 0.86	1.71 ± 0.96 ^{**}	2.58 ± 0.82 [*]	6.38 ± 2.10

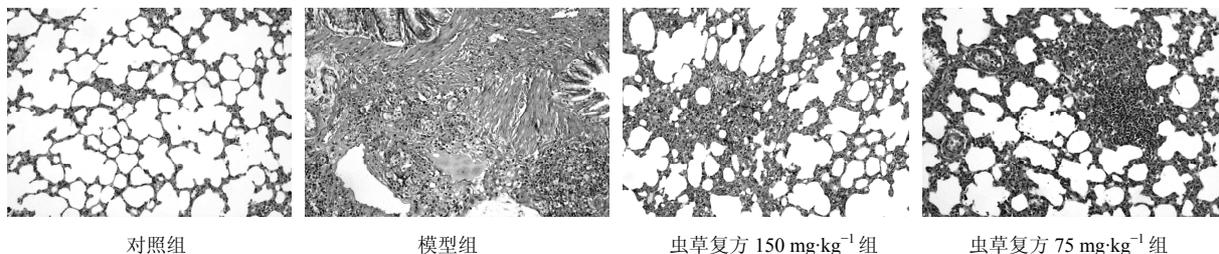


图 1 虫草复方对肺纤维化大鼠肺组织病理形态学的影响

Fig. 1 Effects of CSPNE on lung pathomorphology of rats with PF

表 4 虫草复方对肺纤维化大鼠肺泡炎症和肺纤维化评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 4 Effects of CSPNE on score of lung alveolitis and PF in rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肺泡炎症评分			肺纤维化评分		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	0.83±0.75	0.50±0.55	0.33±0.52	0.17±0.41	0.17±0.41	0.33±0.52
模型	—	2.33±0.82 ^{###}	2.00±0.63 ^{###}	1.67±0.52 ^{###}	0.50±0.55	2.17±0.75 ^{###}	2.00±0.89 ^{###}
虫草复方	150	1.17±0.41 ^{**}	0.83±0.41 ^{**}	0.83±0.41 [*]	0.33±0.52	1.17±0.41 [*]	1.17±0.41 [*]
	75	1.33±0.52 ^{**}	1.00±0.00 ^{**}	0.67±0.52 ^{**}	0.33±0.52	1.00±0.00 ^{**}	0.83±0.75 ^{**}
醋酸泼尼松	3.33	1.17±0.41 ^{**}	0.67±0.52 ^{**}	1.00±0.63	0.50±0.55	1.50±0.84	1.50±0.55

气管黏膜上皮细胞、肺泡上皮细胞、血管内皮细胞 TGF-β1 表达有不同程度减少。与对照组相比,模型组肺组织 TGF-β1 在各时间点均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比,虫草复方各组肺组织 TGF-β1 在各相应时间点均降低,在 7、14 d 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 结果见表 5。

2.6 对肺纤维化大鼠肺组织 I 型胶原和 III 型胶原蛋白表达的影响

I 型胶原和 III 型胶原经免疫组化染色后呈现棕

色、棕黄色或褐色。对照组大鼠肺组织中血管壁、支气管、细支气管壁有 I 型胶原和 III 型胶原的表达,肺间质内有散在性的表达; 模型组大鼠肺间质内可见 I 型胶原和 III 型胶原呈局灶性、斑片状、条索状分布。与对照组相比,模型组肺组织 I 型胶原和 III 型胶原吸光度在各相应时间点均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比,虫草复方各组肺组织 I 型胶原吸光度在各和 III 型胶原在各相应时间点均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 6。

表 5 虫草复方对肺纤维化大鼠 TGF-β1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 5 Effects of CSPNE on expression of TGF-β1 in rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TGF-β1		
		7 d	14 d	28 d
对照	—	181.2±15.3	187.2±15.8	184.2±15.6
模型	—	294.3±16.0 ^{###}	290.3±12.1 ^{###}	270.4±29.1 ^{###}
虫草复方	150	214.1±37.1 ^{**}	221.3±38.4 ^{**}	217.7±37.7
	75	202.1±46.6 ^{**}	224.4±40.0 ^{**}	220.8±39.4
醋酸泼尼松	3.33	234.6±40.6 ^{**}	237.2±36.3 ^{**}	233.4±35.7

表 6 虫草复方对肺纤维化大鼠 I 型胶原和 III 型胶原表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 6 Effects of CSPNE on expression of collagen I and collagen III in rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	I 型胶原			III 型胶原		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	207.4±11.9	210.6±12.1	213.9±12.2	188.0±10.8	193.1±11.0	194.8±11.1
模型	—	299.7±28.0 ^{###}	304.4±28.4 ^{###}	309.0±12.9 ^{###}	271.6±11.3 ^{###}	279.1±11.6 ^{###}	281.4±11.7 ^{###}
虫草复方	150	244.4±26.4 [*]	237.4±15.3 ^{**}	257.5±12.0 ^{**}	230.2±10.7 ^{**}	232.6±10.9 ^{**}	234.5±10.9 ^{**}
	75	239.1±35.0 ^{**}	242.8±35.6 ^{**}	279.2±17.0 ^{**}	249.6±15.2 ^{**}	252.1±15.3 ^{**}	264.2±15.4 [*]
醋酸泼尼松	3.33	239.5±31.9 [*]	254.1±25.3 [*]	291.9±11.8	261.0±10.5	263.6±10.6	269.4± 9.7

2.7 对肺纤维化大鼠肺组织动脉血气分析的影响

与对照组相比,模型组大鼠动脉血 $p(\text{CO}_2)$ 在各时间点均升高,在 7、14 d 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比,虫草复方各给药组动脉血 $p(\text{CO}_2)$ 在各相应时间点均降低,小剂量组在 7、14 d 时及大

剂量组在 14 d 时显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 7。与对照组相比,模型组大鼠动脉血 $p(\text{O}_2)$ 在各时间点均有不同程度降低,在 7、28 d 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比,虫草复方各组动脉血 $p(\text{O}_2)$ 均有不同程度的升高,大剂量组在各相

表 7 虫草复方对肺纤维化大鼠肺组织动脉血气的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 7 Effects of CSPNE on arterial blood gas in rats with PF ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	p(CO ₂) / mmHg			p(O ₂) / mmHg		
		7 d	14 d	28 d	7 d	14 d	28 d
对照	—	40.23 ± 7.01	39.05 ± 4.73	24.70 ± 6.65	131.07 ± 9.43	105.47 ± 14.96	125.28 ± 5.91
模型	—	49.28 ± 3.35 ^{###}	50.73 ± 9.65 ^{###}	27.80 ± 4.91	94.98 ± 20.57 ^{###}	88.43 ± 20.46	96.07 ± 18.39 ^{###}
虫草复方	150	44.27 ± 6.29	40.33 ± 4.61 ^{**}	26.37 ± 5.23	118.93 ± 17.55 [*]	110.07 ± 12.37 [*]	114.23 ± 11.44 [*]
	75	40.90 ± 5.02 ^{**}	39.22 ± 5.44 ^{**}	26.38 ± 2.90	118.73 ± 19.39 [*]	92.48 ± 27.16	111.92 ± 13.89 [*]
醋酸泼尼松	3.33	38.10 ± 4.52 ^{**}	40.87 ± 3.17 ^{**}	33.18 ± 3.54	115.67 ± 16.02 [*]	109.25 ± 15.68	101.38 ± 6.55

应时间点和小组量组在 7、28 d 时显著升高 ($P < 0.05、0.01$), 见表 7。

3 讨论

博莱霉素是碱性水溶性糖肽类抗肿瘤抗生素, 具有广谱抗癌作用。肺组织对博莱霉素特别敏感, 肺纤维化是博莱霉素最严重的不良反应。应用博莱霉素建立肺纤维化动物模型是目前应用最广泛、最常用的方法^[11]。本实验通过气管内注入博莱霉素的方法复制肺纤维化大鼠模型。病理组织学观察发现早期 (7 d) 模型组肺组织肺泡炎症比较明显, 以肺泡巨噬细胞、中性粒细胞为主; 晚期 (14、28 d) 模型组肺组织间质及肺泡腔可见大量胶原沉积, 纤维化形成, 主要病变与文献报道一致^[11]。肺组织超微结构观察显示大鼠肺组织不仅有间质胶原沉积病变, 还有明显的肺实质包括肺泡上皮细胞 (I 型、II 型)、血管内皮细胞及基膜的损伤。肺指数及肺组织中 Hyp 的测定均表明, 本实验成功复制了肺纤维化大鼠模型。

同时测定 SOD 与 MDA 常用来评价机体抗氧化自由基的能力。本实验采用黄嘌呤氧化酶法和硫代巴比妥酸法分别测定肺组织、血清中的 SOD 活性和 MDA。结果显示, 虫草复方各组早期肺组织、血清中 SOD 活性明显高于模型组; 而早期肺组织、血清中 MDA 量却明显低于模型组。说明在肺纤维化早期, 虫草复方有很好的抗氧化自由基的作用。

在促进肺纤维化形成的众多细胞因子中, TGF-β1 是研究最深入、作用最重要的细胞因子^[12]。TGF-β1 基因多态性均显示其能促进 IPF 的发展。在实验性肺纤维化病变中有高水平的 TGF-β1 表达^[7-8]; 在 IPF 患者的肺泡灌洗液中 TGF-β1 高表达。本实验结果表明, 模型组大鼠肺组织 TGF-β1 明显高于对照组, 提示博莱霉素的刺激可引起肺组织中 TGF-β1 的产生, 从而引起各种 ECM 的合成和沉积, 促进

肺纤维化的形成。虫草复方各组大鼠早期肺组织 TGF-β1 明显低于模型组, 提示肺纤维化早期, 虫草复方可以抑制肺组织中 TGF-β1 分泌, 降低其在肺组织的表达。

由于 Hyp 主要存在于胶原, Hyp 的测定可以间接反映胶原量, 因此, 测定肺组织中的 Hyp, 常被用于肺纤维化的研究^[7-9]。本实验肺组织 Hyp 测定表明, 与对照组相比, 肺纤维化模型大鼠在 14、28 d 时肺组织 Hyp 水平明显升高; 与模型组相比, 虫草复方各组大鼠在 14、28 d 时肺组织 Hyp 水平显著下降。肺纤维化的主要病理改变为肺组织内 ECM 的异常增多和过度沉积, 其中主要是 I 型胶原和 III 型胶原代谢失衡。大量的肺纤维化动物模型证实, 肺纤维化组织中 I 型胶原和 III 型胶原表达增高^[13]。本实验免疫组织化学结果显示, 模型组大鼠肺组织中 I 型胶原和 III 型胶原均在 7 d 开始增加, 直至 28 d 仍呈不断增加趋势, 此时肺泡结构已破坏, 纤维组织呈条索样、斑片状分布, 纤维化明确可见。与模型组相比, 虫草复方各组大鼠肺组织中 I 型胶原和 III 型胶原在各相应时间点均有不同程度降低。提示虫草复方能抑制 I 型胶原和 III 型胶原在肺间质的沉积。说明在肺纤维化晚期, 虫草复方可以调节肺组织中胶原的代谢, 减轻胶原在肺间质的沉积, 起到减轻肺纤维化的作用。同时也表明, 模型组肺组织 Hyp 水平在第 7 天时与对照组相比无显著差异, 这可能说明肺纤维化早期病理改变主要为肺泡及间质, 炎细胞浸润为主, ECM 的损伤及修复程度较轻, 并没有大量胶原纤维形成。

肺泡炎症和肺纤维化导致肺顺应性降低, 肺容量缩小, 弥散功能障碍, 通气/血流比例失衡, 不伴有气流阻塞的小气道功能异常、低氧血症而不伴 CO₂ 潴留的气体交换障碍, 晚期表现为肺动脉高压, 肺心病和呼吸衰竭。进行动脉血气分析可以判断呼

吸衰竭的类型和程度, 指导临床治疗, 评估病人的预后, 评价治疗效果。目前对肺纤维化动物模型的研究多从病理组织学改变探讨药物对肺纤维化的干预作用。本实验通过动脉血气分析进一步从病理生理角度, 反映肺纤维化的发展和虫草复方对肺纤维化大鼠的干预作用。动脉血气分析结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠动脉血 $p(\text{CO}_2)$ 在各时间点均有不同程度升高, 动脉血 $p(\text{O}_2)$ 在各时间点均有不同程度降低; 与模型组相比, 虫草复方各组动脉血 $p(\text{CO}_2)$ 均不同程度降低, 动脉血 $p(\text{O}_2)$ 均有不同程度的升高。本实验结果与人的肺纤维化不伴 CO_2 潴留的血气改变略有不同, 这可能与博莱霉素气管内注入引起的药物性支气管炎有关。实验动物动脉血气分析的结果说明, 虫草复方能改善肺呼吸功能。

综上所述, 虫草复方能明显降低肺纤维化大鼠肺指数和肺组织 Hyp 水平, 并可提高血清和肺组织中 SOD 的活性, 降低血清和肺组织中 MDA 的水平和肺组织 TGF- β 1、I 型胶原和 III 型胶原的表达; 明显改善实验性大鼠肺纤维化; 可使肺纤维化大鼠动脉 $p(\text{CO}_2)$ 降低和血 $p(\text{O}_2)$ 提高。本研究结果提示, 虫草复方对大鼠肺纤维化具有一定的干预作用, 其机制可能与抗脂质过氧化、抑制 TGF- β 1 表达、减少肺泡间质胶原沉积及改善肺呼吸功能有关。

参考文献

- [1] Bois R M. Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(2): 129-140.
- [2] Subodh V, Arthur S. Idiopathic pulmonary fibrosis-new insights [J]. *New Engl J Med*, 2007, 13: 1370-1372.
- [3] Buenz E J, Bauer B A, Osmundson T W, *et al.* The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96: 19-29.
- [4] 王 赫, 单宏丽, 孙宏丽, 等. 冬虫夏草对豚鼠心室肌细胞胞浆钙离子浓度及 L-型钙电流的影响 [J]. *中草药*, 2004, 35(18): 895-898.
- [5] Ng T B. Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*) [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006, 58(8): 1007-1019.
- [6] 王 楠, 万建波, 李铭源, 等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *中草药*, 2008, 39(5): 787-790.
- [7] Feng Y Z, Zhang Y S, Cao Z F, *et al.* Prevention of combination of *Hirsutiella sinensis* and *Panax notoginseng* extracts on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 118-124.
- [8] 武 慧, 冯一中, 顾振纶, 等. 三七总皂苷对博莱霉素所致小鼠肺纤维化的干预作用 [J]. *中国野生植物资源*, 2007, 26(1): 29-32.
- [9] 曹志飞, 蒋小岗, 彭 蕾, 等. 虫草提取物对肺纤维化小鼠的抗氧化作用研究 [J]. *中国野生植物资源*, 2009, 28(3): 52-57.
- [10] 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: 893-899.
- [11] Yang J, Cui Y, Kolb M. How useful is traditional herbal medicine for pulmonary fibrosis? [J]. *Respirology*, 2009, 14(8): 1082-1091.
- [12] Lee S H, Jang A S, Kim Y E, *et al.* Modulation of cytokine and nitric oxide by mesenchymal stem cell transfer in lung injury/fibrosis [J]. *Respir Res*, 2010, 8(11): 16.
- [13] Xia H, Khalil W, Kahm J, *et al.* Pathologic caveolin-1 regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(6): 2626-2637.