

疏风清肺化痰汤对慢性支气管炎模型大鼠的保护作用研究

王世强^{1*}, 蒋建云²(1.浙江中医药大学附属第三医院, 杭州 310005; 2.成都中医药大学附属医院, 成都 610072)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1779-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.15

摘要 目的:研究疏风清肺化痰汤对慢性支气管炎模型大鼠的保护作用。方法:实验分为正常对照(0.9%氯化钠溶液, 10 ml/kg)组、模型(0.9%氯化钠溶液, 10 ml/kg)组、红霉素(0.14 g/kg)组与疏风清肺化痰汤高、中、低剂量[4.32、2.16、1.08 g(生药)/kg]组, 后5组以改良烟熏法复制大鼠慢性支气管炎模型。复制模型成功后ig给药, 连续28 d。测定大鼠右肺组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性和丙二醛(MDA)的含量。取大鼠左肺组织进行HE切片, 显微镜下观察病理变化。结果:与正常对照组比较, 模型组大鼠肺组织匀浆中SOD、GSH-Px活性减弱, MDA含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 病理观察呈重度炎症表现。与模型组比较, 疏风清肺化痰汤高、中、低剂量组肺组织匀浆中SOD、GSH-Px活性增强, MDA含量减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 病理观察均见一定程度减轻。各组CAT比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论:疏风清肺化痰汤对慢性支气管炎模型大鼠具有一定的保护作用。

关键词 疏风清肺化痰汤; 慢性支气管炎; 过氧化; 病理损伤; 保护作用; 大鼠

Study on the Protective Effect of Shufeng Qingfei Huatan Decoction on Model Rats with Chronic Bronchitis
WANG Shi-qiang¹, JIANG Jian-yun² (1.The Third Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310005, China; 2.The Affiliated Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of Shufeng qingfei huatan decoction on model rats with chronic bronchitis. METHODS: There were normal control group (0.9% sodium chloride solution, 10 ml/kg), model group (0.9% sodium chloride solution, 10 ml/kg), erythrocin group (0.14 g/kg) and Shufeng qingfei huatan decoction high, medium and low dose groups [4.32, 2.16, 1.08 g (medicinal materials)/kg]. Rat models of chronic bronchitis were established for latter 5 groups by modified smoking method. After successful establishment of models, the rats were given drugs for 28 days, ig. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA) in the homogenate of right lung tissues of rats were determined. The left lung tissues were collected to prepare the sections for HE staining, and the pathological changes were observed under the microscope. RESULTS: Compared with normal control group, the activities of SOD and GSH-Px in model group were decreased and the content of MDA was increased, with significant difference ($P < 0.01$); there was serious inflammation in the pathological observation. Compared with model group, the activities of SOD and GSH-Px in Shufeng qingfei huatan decoction high, medium and low dose groups were increased and MDA was decreased, with significant difference ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); there was less serious inflammation. There were no significant differences in the CAT among all groups ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: Shufeng qingfei huatan decoction has certain protective effect on model rats with chronic bronchitis.

KEYWORDS Shufeng qingfei huatan decoction; Chronic bronchitis; Peroxidation; Pathological injury; Protection effect; Rat

慢性支气管炎是指出现有连续2年以上, 每年持续3个月以上的咳嗽、咳痰或气喘等症状^[1]。病理以气管、支气管黏膜及其周围组织的慢性非特异性炎症为特点^[1]。而体内氧化-抗氧化平衡失调是慢性支气管炎肺损伤的重要致病机制, 通过抗氧化治疗缓解和预防肺组织的慢性炎症性损伤可阻止肺功能障碍的发生发展, 或延缓慢性支气管炎的进一步发展^[2]。目前针对本病现代主要采用控制感染、祛痰镇咳、解痉、平喘等对症药物治疗, 而在国内利用中医药优势治疗本病的相关实验研究仍未见详细报道。疏风清肺化痰汤是成都中医药大学附属医院蒋建云主任中医师近30年来用于治疗慢性支气管炎的经验方, 本方主要由炙麻黄、黄芩、胆南星、苦杏仁、桑白皮、蝉蜕、浙贝母、甘草等药材组成, 共同发挥疏风散邪、清肺化痰

* 主治中医师, 硕士。研究方向: 慢性呼吸性疾病的治理。E-mail: wangshiqiang65@126.com

止咳之功效。本研究拟通过观察疏风清肺化痰汤对慢性支气管炎模型大鼠肺组织的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量的影响, 以及对支气管病理的改善状况, 以探索本经验方对慢性支气管炎模型大鼠的保护作用机制。

1 材料

1.1 仪器

CK21型生物显微镜(日本Olympus公司); 03-029型组织匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司); 210型离心机(上海手术器械厂)。

1.2 药品与试剂

疏风清肺化痰汤[浙江中医药大学附属第三医院中药制剂室, 批号: 20131107, 含量: 1 g(生药)/ml]; 红霉素片(陕西君寿堂制药有限公司, 批号: 20110201, 规格: 0.125 g/片); SOD、

GSH-Px、CAT、MDA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；其余试剂为分析纯。

1.3 动物

健康 SPF 级 SD 大鼠 66 只，♂，体质量(200 ± 20) g，由成都中医药大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号：SCXK(川)2009-11]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

参考文献[3]进行模型复制。正常对照大鼠($n=10$)外置于安静、正常无烟动物房饲养，而剩余 56 只大鼠放置于特制的烟室中。烟室大小约 150 cm×150 cm×45 cm，用烟叶 12 g 点燃熏烟，每天 2 次，每次 40 min，持续 30 d 以复制大鼠慢性支气管炎模型。第 25 天时选取 6 只大鼠处死取肺组织制作病理切片以证实模型复制成功。50 只模型大鼠随机分为 5 组，即模型(0.9%氯化钠溶液 10 ml/kg)组、红霉素(0.14 g/kg)组与疏风清肺化痰汤高、中、低剂量[28、14、7 g(生药)/kg]组；另设正常对照(0.9%氯化钠溶液 10 ml/kg)组。复制模型成功后第 2 天 ig 给药，每天 1 次，连续 28 d。按体表面积计算法和不同给药途径的剂量换算，选择临床 14、7、3.5 倍成人剂量为大鼠疏风清肺化痰汤 ig 给药剂量，选择 7 倍成人剂量为大鼠红霉素 ig 给药剂量^[4]。

2.2 各组大鼠肺组织抗氧化指标的测定

末次给药 24 h 后处死大鼠，取其右肺组织匀浆，采用 SOD、CAT、GSH-Px 与 MDA 试剂盒测定 SOD、CAT、GSH-Px 活性与 MDA 含量。

2.3 各组大鼠肺组织病理切片观察

末次给药 24 h 后，处死大鼠取其左支气管、肺组织，固定于 10% 甲醛溶液中，经脱水、浸蜡、包埋等工序后进行组织切片、HE 染色，制作病理切片，显微镜观察其病理形态。肺组织形态学、气管观察参考文献[5]方法，按表 1 标准进行气道病理改变评估。

表 1 气道病理改变评估标准

评估指标(10项)	病变程度			
	0级	1级	2级	3级
气道纤毛倒伏粘连缺失	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径
上皮细胞变性坏死糜烂脱落	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径
气道上皮杯状细胞增生	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径
气道鳞状上皮化生	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径
气道管壁黏膜充血水肿	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径
气道管壁淋巴细胞浸润	无	未形成滤泡	有滤泡	滤泡明显
气道管壁单核巨噬细胞浸润	无	<10个/视野	10~20个/视野	>20个/视野
气道管壁中性粒细胞浸润	无	<10个/视野	10~20个/视野	>20个/视野
气道管壁嗜酸细胞浸润	无	<10个/视野	10~20个/视野	>20个/视野
气道平滑肌细胞断裂/增生	无	<1/4周径	1/4~1/2周径	>1/2周径

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布，后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠肺组织抗氧化指标的测定结果

与正常对照组比较，模型组大鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性减弱，MDA 含量增加，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模

型组比较，红霉素组与疏风清肺化痰汤高、中、低剂量组大鼠肺组织 SOD、GSH-Px 活性增强，MDA 含量减少，差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。各组大鼠肺组织 CAT 活性差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肺组织抗氧化指标的测定结果见表 2。

表 2 各组大鼠肺组织抗氧化指标的测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)
Tab 2 Results of index of antioxidant in lung tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD,U/mg	GSH-Px,U/ml	CAT,U/ml	MDA,mmol/mg
正常对照组	39.71 ± 7.59	461.82 ± 187.25	24.74 ± 2.91	1.62 ± 0.49
模型组	18.52 ± 4.18*	209.63 ± 168.91*	21.07 ± 3.04	6.27 ± 1.93*
疏风清肺化痰汤高剂量组	35.16 ± 3.79**	429.52 ± 207.32**	23.81 ± 3.45	2.72 ± 1.68**
疏风清肺化痰汤中剂量组	30.24 ± 5.47**	398.17 ± 182.47**	22.65 ± 2.96	3.87 ± 1.99**
疏风清肺化痰汤低剂量组	25.31 ± 5.92*	348.61 ± 181.06**	21.48 ± 3.08	4.95 ± 2.21*
红霉素组	33.91 ± 5.48**	419.27 ± 191.45**	23.79 ± 2.67	2.85 ± 1.84**

注：与正常对照组比较，* $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.05$ ，*** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠肺组织病理切片观察结果

正常对照组大鼠中、小支气管可见排列整齐的黏膜上皮细胞，偶见脱落的变性坏死细胞、管壁上浸润的单核巨噬细胞，偶见中性粒细胞和淋巴细胞，无嗜酸细胞；纤毛、肺泡结构、肺泡壁、肺泡间隔、肺泡腔未见损伤、破坏、充血水肿或扩大。模型组大鼠气道上皮呈锯齿状增生肥厚，部分出现 2~3 级上皮变性糜烂坏死脱落、2~3 级杯状细胞增多；管壁 2~3 级充血水肿，明显增厚，1~3 级管壁大量淋巴细胞、中性粒细胞及巨噬细胞浸润，管壁周围有 2~3 级淋巴滤泡形成；平滑肌有断裂表现，呈重度炎症表现，表明气道炎症形成、复制模型成功。疏风清肺化痰汤高剂量组大鼠支气管中可见 1~2 级倒伏、粘连、缺失的气道纤毛；出现 0~1 级的变性、坏死、糜烂脱落上皮细胞、增生的上皮杯状细胞、浸润气管壁的淋巴细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸细胞；气道未见管壁黏膜充血水肿、鳞状上皮化生和平滑肌细胞断裂增生；肺泡腔扩大形成肺泡气肿，肺组织表现为轻度炎症。疏风清肺化痰汤中剂量组大鼠支气管中可见 2 级倒伏、粘连、缺失的气道纤毛；气道管壁可见 1 级坏死糜烂和脱落的上皮细胞、增生的上皮杯状细胞、黏膜充血水肿、单核巨噬细胞和嗜酸细胞的浸润；未见管壁鳞状上皮化生；1~2 级气道管壁淋巴细胞、中性粒细胞和断裂/增生的气道平滑肌细胞的浸润；肺泡腔扩大形成肺泡气肿，肺组织呈轻度、中度炎症。疏风清肺化痰汤低剂量组大鼠支气管中可见 2~3 级倒伏、粘连、缺失的气道纤毛；2~3 级的变性、坏死、糜烂脱落上皮细胞、浸润气管壁的淋巴细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸细胞；1~2 级增生的上皮杯状细胞、2~3 级管壁黏膜充血水肿、1 级鳞状上皮化生和 1~2 级平滑肌细胞断裂增生；肺泡腔扩大形成肺泡气肿，肺组织表现为中、重度炎症。红霉素组大鼠支气管可见 1~2 级倒伏、粘连、缺失的气道纤毛；0~1 级的变性、坏死、糜烂脱落上皮细胞、增生的上皮杯状细胞、浸润气管壁的淋巴细胞、单核巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸细胞；气道未见管壁黏膜充血水肿、鳞状上皮化生和平滑肌细胞断裂增生；肺泡腔扩大形成肺泡气肿，肺组织表现为轻度炎症。各组大鼠肺组织病理切片观察结果见图 1。

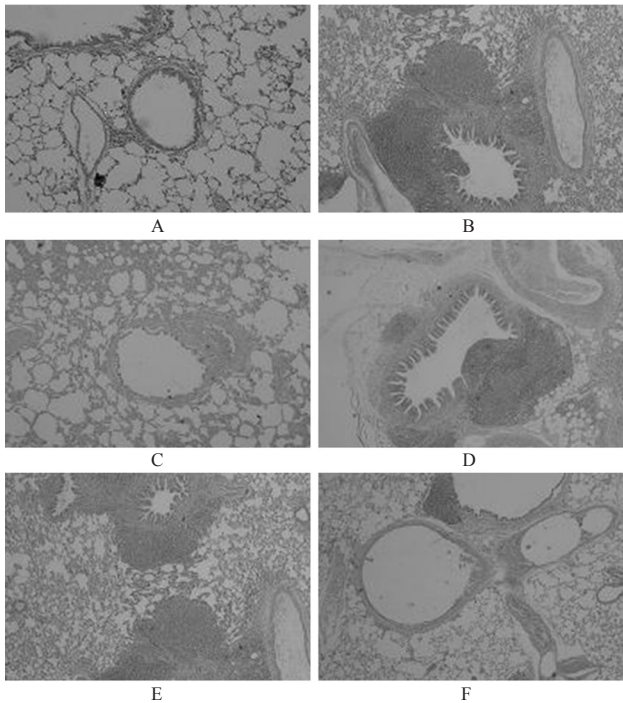


图1 各组大鼠肺组织病理切片图(HE,×10)

A.正常对照组;B.模型组;C.疏风清肺化痰汤高剂量组;D.疏风清肺化痰汤中剂量组;E.疏风清肺化痰汤低剂量组;F.红霉素组

Fig 1 Pathological of lung tissues of rats in each group (HE,×10)

A. normal control group; B. model group; C. Shufeng qingfei huatan decoction high dose group; D. Shufeng qingfei huatan decoction medium dose group; E. Shufeng qingfei huatan decoction low dose group; F. erythromycin group

4 讨论

慢性支气管炎的发病机制不清楚,普遍认为气道炎症是导致本病急性发作的主要因素^[6]。其中,氧化和抗氧化系统的失衡是重要的病理特征,尤其是在因烟雾吸入导致的吸入性损伤中。烟雾中的氧化物和氧自由基进入呼吸道后,导致组织细胞产生氧化性损伤;此外,肺组织在多种细胞因子的作用下,诱导激活的中性粒细胞释放大量氧化剂,最终导致肺组织损伤^[7]。其病理变化特点主要为淋巴细胞及巨噬细胞等炎症细胞浸润、黏膜分泌旺盛,可见纤毛粘连、倒伏以至脱落、纤毛摆动减弱^[8]。多年临床观察发现,疏风清肺化痰汤在治疗慢性支气管炎有较好的效果^[9]。故本研究以临床研究报告为背景进行探索性实验研究。

在氧化与抗氧化系统中,其中SOD、GSH-Px、CAT的活性对机体具有抗氧化的保护作用,而MDA具有促进机体炎症反应的作用。通过本研究表明,疏风清肺化痰汤对因烟雾吸入导致氧化和抗氧化系统的失衡,具有一定的调节保护作用,表现在对SOD、GSH-Px、CAT活性和MDA含量调控上。研究结果表明,模型组大鼠肺组织SOD和GSH-Px的活性较正常对照组明显减弱($P<0.01$),而MDA含量明显增加($P<0.01$),而CAT在各组大鼠肺组织中活性差异无统计学意义($P>0.05$)。这一结果提示烟熏可以造成大鼠肺组织的氧化-抗氧化系统出现障碍,机体出现脂质过氧化等反应,进而损害肺组织的抗氧化能力。而疏风清肺化痰汤ig给药28d后,可以较好地改善

氧化-抗氧化系统的失衡状态,从而对慢性支气管炎模型大鼠发挥保护作用。

本研究采用改良烟熏法复制慢性支气管炎动物模型,可直接损伤大鼠肺组织,如损伤肺组织血管内皮细胞,增加肺部毛细血管的通透性,导致肺间质、肺泡中出现大量纤维蛋白和其他蛋白质的浸润。有研究表明,长期吸入含烟草类的烟雾,可以造成肺大泡、肺泡融合、肺泡破裂及肺组织实变^[7,10],病理上常可出现气道上皮杯状细胞增生、气道鳞状上皮化生、气道纤毛倒伏粘连缺失、上皮细胞变性坏死糜烂脱落、气管壁黏膜充血水肿和支气管上皮紧密连接等异常发生,最终导致肺泡壁破坏、气道变形、出现肺气肿^[11]。

笔者发现,给予疏风清肺化痰汤后,特别是高剂量组大鼠肺组织的淋巴细胞、中性粒细胞、嗜酸粒细胞以及巨噬细胞出现较好的改善,炎症细胞的浸润程度明显低于模型组;同时,大鼠的肺组织病理状态较模型组有了明显的改善作用,减少了气道平滑肌细胞断裂,表明本经验方对大鼠肺支气管上皮紧密连接的修复具有促进作用。

综上所述,疏风清肺化痰汤用于长期烟熏所致的慢性支气管炎大鼠可能是通过调整氧化-抗氧化体系的紊乱、减少肺组织炎症细胞的浸润、气管上皮紧密连接和缓解气管壁黏膜充血水肿而发挥其对慢性支气管炎的治疗作用。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.咳嗽的诊断与治疗指南:2009[J].中华结核和呼吸杂志,2009,32(6):738.
- [2] 刘立立,陈路佳,占美,等.标准桃金娘油治疗慢性支气管炎和COPD的系统评价[J].中国药房,2012,23(4):1498.
- [3] 李庆云,黄绍光,吴华成,等.大鼠吸烟致慢性支气管炎模型气道炎症研究[J].上海第二医科大学学报,2004,24(1):31.
- [4] 梁毅,钟小宁,何志义,等.CD8+T淋巴细胞在慢性支气管炎与肺气肿大鼠肺血管炎症中作用的实验研究[J].细胞与分子免疫学杂志,2008,24(7):734.
- [5] Barbera JA, Peinado VI, Santos S, et al. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(4):709.
- [6] Rohde G, Schlosser B, Afanir U, et al. The role of respiratory infections in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med Klin: Munich*, 2007, 102(11):893.
- [7] 孙磊,李代波,曹佳.急性烟雾吸入性肺损伤药物治疗的研究进展[J].中华哮喘杂志,2011,5(4):292.
- [8] 黄红坤,黄小琼,孙侠,等.对慢性支气管炎大鼠模型治疗实验阳性对照药物作用的研究[J].中国医药指南,2012,36(10):68.
- [9] 罗瑞雪,黄渝瀚,刘习书,等.蒋建云主任医师治疗痰热咳嗽经验[J].四川中医,2009,27(6):1.
- [10] 薄其付,李若葆,王金平,等.被动吸烟对大鼠肺泡上皮细胞结构及K-ras表达的影响[J].潍坊医学院学报,2007,29(2):101.
- [11] 李若葆,王金平,鞠学红,等.长期吸烟对大鼠肺组织结构的影响[J].潍坊医学院学报,2007,29(2):97.

(收稿日期:2014-06-30 修回日期:2014-07-20)

(编辑:张静)