

川芎嗪对实验性豚鼠肺气肿的防治作用

黑龙江中医学院(哈尔滨 150040) 王 刚 唐启盛 朱跃岚 王大敏

哈尔滨市中医医院 张雅莉

内容提要 本研究从体内和体外两方面探讨了川芎嗪对肺气肿的防治作用。体外试验发现川芎嗪对弹性蛋白酶(简称:弹性酶)有明显的抑制作用,治疗剂量可取代血清防治肺气肿。体内实验是以弹性酶肺气肿动物模型观察血清弹性酶抑制力(SEIC)正常的血清和川芎嗪对弹性酶在肺内的积聚及其活性的影响;在光镜和电镜下对肺组织形态加以测量,用体视学方法分析。结果表明实验防治组未出现模型组的病理变化,与生理盐水对照组相近。用气溶胶法制成豚鼠弹性酶肺气肿模型并用川芎嗪防治有效,为探讨人类肺气肿发生机制和防治提供了实验依据。

关键词 川芎嗪 弹性蛋白酶 肺气肿

实验材料

超薄切片机:奥地利CReichert Jung Dmu A型;JEM-100CX电子显微镜:日本电子公司制造。猪胰弹性蛋白酶粉剂:常州生化制药厂出品,1 mg=50u;刚果红弹性蛋白:常州生化制药厂出品;盐酸川芎嗪注射液:北京第四制药厂出品,每ml含川芎嗪20mg,用时调pH为8.8。

豚鼠:雌雄不拘,体重350~500g,随机分组,由中国农业科学院黑龙江兽医研究所提供。

方法与结果

一、川芎嗪抑制弹性酶活力的测定

根据吴梧桐等⁽¹⁾的方法测定弹性酶活力。在最适条件下分析弹性酶对底物的水解活力,将每20min水解刚果红弹性蛋白1mg所需酶量定为1个弹性酶活性单位。取一定量血清或川芎嗪与一定量弹性酶溶液反应后,测定弹性酶的剩余活性,由此推算出血清或川芎嗪对弹性酶的抑制力。

1. 绘制刚果红弹性蛋白标准曲线

首先将弹性酶用0.02M硼酸缓冲液(pH8.8)溶解,浓度为12.5u/ml,取1ml作用于20mg刚果红弹性蛋白(该底物与弹性酶有高度专一性),再加入4ml硼酸缓冲液,于试管内混匀后于37℃保温20min,加入0.5M磷酸缓冲液(pH6.0)5ml,离心(1000r/min)20min,取上清液4ml置另外试管中,加0.5M磷酸缓冲液和0.02M硼酸缓冲液各1ml,混匀后用721型分光光度计495nm测吸光度(A),以底物为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,该曲线呈直线关系。

2. SEIC与川芎嗪抑制弹性酶活力的比较

试验设5组:酶对照组为弹性酶液1ml(12.5u/ml)加硼酸缓冲液1ml;血清测定组为血清0.03ml加硼酸缓冲液3.97ml加弹性酶液1ml(12.5u/ml);血清对照组为血清0.03ml加硼酸缓冲液4.97ml;川芎嗪测定组为川芎嗪0.125ml加硼酸缓冲液3.875ml加弹性酶液1ml(12.5u/ml);川芎嗪对照组为川芎嗪0.125ml加硼酸缓冲液4.875ml。将各管混匀,37℃保温10min后各管加底物20mg,混匀后37℃保温20min,其余操作同前。血清由健康人(献血员无吸烟、慢阻肺病史,经肺功能测定和X线检查肺部正常,近日无发热和感染者,年龄20~40岁)清晨空腹血液中获得。SEIC的A值=酶对照管A-(血清测定管A-血清对照管A);川芎嗪的A值=酶对照管A-(川芎嗪测定管A-川芎嗪对照管A);所得A值查标准曲线求出对应的u值(剩余弹性酶浓度)。EIC(u/ml)=u·稀释倍数×1000/抑制剂用量。用健康人血清和川芎嗪各测定10次,发现健康人血清对弹性酶的抑制力为138.5±4.3u/ml($\bar{x} \pm S$,下同);川芎嗪的抑制力为228.5±3.4u/ml,可见川芎嗪对弹性酶的抑制力较强($P < 0.01$)。

3. 等量血清及川芎嗪对不同浓度弹性酶的抑制力

取弹性酶液(12.5u/ml)0.5ml、0.75ml、1.0ml各2管,分别加入血清0.03ml、川芎嗪0.125ml,操作方法同实验2。结果血清抑制酶解后剩余弹性酶活性分别是3.25u、6.25u、9.0u;而川芎嗪则是2.25u、4.75u、7.85u(弹性酶不受抑制分解底物是6.25u、9.15u、12.5u)。实验中发现等量血清和等量川芎嗪对各浓度的弹

性酶均有抑制作用。

4. 不同浓度川芎嗪对弹性酶的抑制力

取川芎嗪液 0.125ml、0.25ml、0.5ml、1.0ml、1.5ml、2.0ml，分别与弹性酶液 1.0ml(12.5u/ml) 作用，操作方法同前。结果弹性酶的剩余活性分别是 5.2u、4.75u、4.3u、2.7u、1.4u、0.3u 等。可见川芎嗪在上述剂量内，其量与抑制能力成直线关系。

二、复制弹性酶肺气肿模型及川芎嗪对该模型的影响

1. 方法

(1) 肺组织形态测量：包括全肺体积；肺泡间隔体积密度；肺泡表面积密度；肺间质内弹力纤维体积密度。后 3 项指标的测定均为每只动物取 4 块组织，每块组织切 1 张片，每张片随机测量 8 个视野；得出数据后，换算出按目测微计单位，用体视学方法计算，统计学分析^(2,3)。

(2) 弹性酶肺气肿模型的建立：豚鼠 22 只，随机分成 2 组，每组 11 只。在清醒状态下，用超声波雾化器面罩扣住口鼻，通过气管向肺内喷入雾化液体。对照组喷入 0.85% NaCl 1.0ml，模型组喷入用 0.85% NaCl 稀释为 3 mg/ml 的弹性酶液体 1.0ml，各组均喷入 1 次。在喷药第 21 天于腹腔内麻醉，腹主动脉放血处死，开胸分离出完整肺脏，用 10% 福尔马林灌注，在 1.96 kPa 压力下保持 30min 后结扎气管，先测量全肺体积后放在该固定液中固定 24h 后取出，每例标本于外侧矢状切面取材、酒精脱水、石蜡包埋切片、HE 和 Hari

改良的弹性纤维染色，光镜下观察、测量。

(3) 川芎嗪和血清防治弹性酶肺气肿实验：豚鼠 38 只，随机分成 4 组。1 组喷入前述弹性酶溶液 1.0ml 后立即喷入正常人血清 0.5ml；2 组喷入弹性酶溶液 1.0ml 后立即喷入川芎嗪 3 ml；3 组喷入弹性酶溶液 1.0ml，10min 后喷入川芎嗪 3 ml；4 组喷入川芎嗪 3 ml，10min 后喷入弹性酶溶液 1.0ml。动物处死时间、方式、制片及计算均同实验(2)。

(4) 透射电子显微镜观察：豚鼠 12 只随机分成 6 组：对照组、模型组，另外 4 组的分组方法同实验(3)。各组的实验方法与实验(2)、(3)中的相对应分组实验方法相同。分别于第 21 天处死，取出完整肺脏用 3% 戊二醛磷酸缓冲液灌注；保持 1.96KPa 压力 30min，结扎气管放入上述灌注液体里固定 24h 后，切成 1mm³ 的小块，每份标本切出 2 块，电镜常规包埋、半薄切片、超薄切片、常规染色、鞣酸弹性蛋白特殊电子染色，电镜下观察。

2. 结果

大体所见模型组肺脏体积明显大于对照组，边缘钝圆，指压后留有压痕；实验各组与对照组相同。光镜下可见模型组肺泡膨胀，间隔变窄、断裂，肺泡融合成较大泡腔，呼吸单位破坏、扩张，弹力纤维发生破坏性变化，数量减少、断裂，呈现出与人类全小叶性肺气肿相似的病理变化；实验各组可见轻度炎症反应，但未发生肺气肿病变，各项形态学测量指标见附表。

透射电镜下可见对照组的肺内弹性蛋白结构正

附表 肺组织形态测量指标 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	全肺体积 (ml)	肺泡间隔 体积密度 (μm^{-2})	肺泡表面 积密度 (μm^{-2})	肺间质内弹力 纤维体积密度 (μm^{-2})
对照	11	5.06 $\pm$ 0.27	0.41 $\pm$ 0.01	4.33 $\pm$ 0.34	0.13 $\pm$ 0.03
模型	11	8.84 $\pm$ 0.87 Δ	0.17 $\pm$ 0.02 Δ	2.33 $\pm$ 0.08 Δ	0.04 $\pm$ 0.02 Δ
酶+血清	9	5.60 $\pm$ 0.92*	0.40 $\pm$ 0.02*	4.20 $\pm$ 0.19*	0.13 $\pm$ 0.03*
酶+川芎嗪	10	5.10 $\pm$ 0.40*	0.39 $\pm$ 0.02*	4.22 $\pm$ 0.40*	0.13 $\pm$ 0.01*
酶+川芎嗪(10min 后)	10	5.00 $\pm$ 0.67*	0.40 $\pm$ 0.02*	4.21 $\pm$ 0.44*	0.13 $\pm$ 0.03*
川芎嗪+酶(10min 后)	9	5.40 $\pm$ 0.70*	0.40 $\pm$ 0.02*	4.21 $\pm$ 0.27*	0.13 $\pm$ 0.01*

注：与对照组比较， $\Delta P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.01$ ；与对照组比较，* $P > 0.05$

常，呈条索状或片状，常与胶原纤维伴随，肺内其他结构正常；模型组的半薄切片可见肺气肿病变，电镜下弹性蛋白碎裂，排列紊乱，失去连续性；实验各组所见同对照组。

讨 论

本实验在中药筛选过程中，进行了体外健康人血

清和川芎嗪对弹性酶活性抑制能力的比较，并在不同条件下对川芎嗪的作用加以测试。结果证明川芎嗪比健康人血清对弹性酶的抑制效应明显，提示在治疗剂量时可代替血清防治肺气肿。

弹性蛋白是弹力纤维的主要成份，而弹力纤维是保持肺脏回缩性的基本物质。当弹性蛋白遭到破坏时，则产生肺气肿。自从 Eriksson 等发现 α_1 -AT 缺乏者易

患肺气肿疾病后,有许多学者⁽⁴⁾用不同来源的蛋白酶复制动物肺气肿模型。本实验用气溶胶法向肺脏内吸入弹性酶溶液造成豚鼠类似人类全小叶性肺气肿病变,其结果与国外研究一致。

用胰蛋白酶复制肺气肿模型时,可出现炎症反应,但弹力纤维和肺泡结构正常,未出现肺气肿征象。而我们用弹性酶复制肺气肿模型,结果亦出现轻度炎症反应,但弹力纤维数量、肺泡间隔体积密度和肺泡表面积体积密度减少的肺气肿征象,这与国外学者观点一致:弹力纤维遭到破坏,弹性回缩力丧失是肺气肿发生的真正原因。

在实验中以生理盐水组和模型组作对照,观察了川芎嗪的疗效情况,结果表明4个实验组与生理盐水组相比在光镜下统计学无显著性差异,电镜下形态亦相同,提示有可能将川芎嗪用于临床防治肺气肿疾病。根据“弹性酶及其抑制因子平衡”学说研究中草药防治肺气肿,具有理论意义和经济及社会效益。

由此可见:(1)用体外试验筛选出对弹性酶有很强作用的川芎嗪。(2)用弹性酶复制成肺气肿模型,可用川芎嗪预防其发生,证明可用该模型探讨人类肺气肿发生机制和进行实验治疗学的研究。(3)用气溶胶法吸入川芎嗪抑制弹性酶在肺内的活性,为防治人类肺气肿疾病提供了实验依据。

参 考 文 献

1. 吴梧桐,等.以自制刚果红弹性蛋白为底物测定药用弹性蛋白酶活力.南京药学院学报 1983; 9(2):13.
2. Snider GL, et al. Internal surface area and number of respiratory air spaces in elastase-induced emphysema in hamsters. Am Rev Respir Dis 1978; 117: 685.
3. 李树祥,等.立体计算学在生物医学研究中的应用.国外医学(生物工程分册) 1983; 1:5.
4. Karlinsky JB, et al. Animal models of emphysema. Am Rev Respir Dis 1978; 117: 1109.

口服生蒜瓣治愈念珠菌性肺炎 2 例

解放军第118医院(浙江 325000) 王开鉴 朱 江

例1,男,45岁,住院号43092。因患重型慢性活动型肝炎,于1988年4月2日入院。体检:体温正常,肝肋下2cm,质地中等,有压痛,脾肋下1cm,腹部移动性浊音(-)。肝功能:II28u, VDB直速反应, TTT18u, ZnT16u, SGPT>200u, 血清白蛋白37g/L, 球蛋白35g/L, HBsAg(+). 住院后给予一般护肝治疗,1个月后II上升到190u, 血清白蛋白28g/L, 球蛋白32g/L, SGPT降至134u; 病人出现畏寒,发热, T39~40°C, 口腔出现鹅口疮,咳嗽,咯白色粘痰,带有血丝,两下肺可闻及湿性啰音,肺部摄片提示两侧中下肺野可见散在小片状阴影, WBC $15\sim 16\times 10^9/L$, N74~85%,按“肺炎”给予氨基苄青霉素、卡那霉素治疗4天,病情反而加重。痰涂片找到大量霉菌孢子和菌丝,痰培养为白色念珠菌生长。诊断念珠菌性肺炎,停用氨基苄青霉素、卡那霉素,给予生蒜瓣每次6g,切碎饭后服用,温开水送服,1日3次,并给少量多次新鲜血浆输注支持治疗。5天后体温降至正常,咳嗽,咯痰症状明显减轻,2周后复查胸片、末梢血像均正常,停服生蒜瓣。肝功能II降至30u, SGPT恢复正常。以后住院的3个月内,肺部无异常。

例2,男,49岁,住院号51078。因患肝硬化伴

腹水,于1989年3月11日入院。体检:体温正常,慢性肝病容,巩膜未见黄染,心肺正常,肝肋下未触及,脾肋下3cm,腹部移动性浊音(+); 肝功能:II正常, TTT12u, ZnT14u, SGPT正常, 血清白蛋白24g/L, 球蛋白33g/L, HBsAg(+), 腹部B超检查提示肝硬化腹水。入院后给予护肝,利尿治疗。病人住院后106天,出现畏寒、发热, T38.5~39°C,咳嗽,咯白色胶冻样痰,口腔发现鹅口疮,左下肺闻及湿性啰音,胸片提示左下肺见弥漫性小片状阴影。WBC $14\sim 16\times 10^9/L$, N80~90%,痰涂片找到霉菌孢子和菌丝,痰培养为白色念珠菌生长。诊断为念珠菌性肺炎,给予生蒜瓣每次6g,切碎饭后服,温开水送服1日3次;并辅以血浆、白蛋白支持治疗。1周后体温恢复正常,咳嗽、咯痰症状减轻,20天后复查胸片及末梢血像结果均正常,停服生蒜瓣,随访一个月,病情无复发。

体 会 生蒜瓣抗菌作用的成分为大蒜素,对多种球菌、杆菌、病毒、真菌等均有抑制杀灭作用。对有严重肝功能损害者并发念珠菌性肺炎,不宜使用其它抗真菌药物时,可口服生蒜瓣治疗。蒜瓣切碎饭后温开水送服,可减轻胃部烧灼不适感,疗效可靠。

(Original article on page 222)

Prevention and Treatment of Emphysema Model of Guinea Pig with Ligustrazine

Wang Gang (王 刚), Tang Qisheng(唐启盛), Zhu Yuelan(朱跃岚), et al
Heilongjiang College of TCM, Harbin (150040)

This study demonstrated that ligustrazine possesses inhibitory effect obviously on elastic enzyme in vitro, and it can be used to prevent and treat emphysema instead of serum. Using light microscope and electron microscope, the authors observed morphological indexes and analyzed the indexes with stereology and statistics in lung tissues of guinea pigs. The results showed that there was no obvious difference between the ligustrazine administration group and the saline control group as pathological changes were not found in the ligustrazine administration group under microscope. The shapes of elastic proteins were the same under electron microscope observation. Aerosol inhalational method induced emphysema model of elastic enzyme in guinea pig could be improved with ligustrazine treatment.

(Original article on page 227)

Study on Prevention of Radiation on Lung Injury by *Salvia miltiorrhiza* in Mice

Du Hongwen(杜红文), Qian Zhizhong(钱致中), Wang Zhengming(王争鸣)
Dept. of Radiology, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an (710061)

The lungs and thymus of mice received X-ray irradiation on the right thorax were observed. It was found that lung injury was lighter and got recovered more rapidly in mice given *Salvia miltiorrhiza* than that in the control group. Microscopic thymus changes showed no difference in the two groups. The results indicated that *Salvia miltiorrhiza* could prevent radiation-induced pulmonary injury, but could not prevent thymus injury.

(Original article on page 230)

Study on Factors Influencing in Vitro Lymphocyte Transformation for Screening Immunomodulation Drugs among Crude Herbal Extracts

Wang Xiuming(汪秀明), et al
*Dept. of Immunology of Clinical Research Institute,
China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100013)*

When in vitro lymphocyte transformation test was used to investigate the immunologic effects of crude herbal extracts, false negative results of ^3H -TdR uptake usually were obtained due to the high content of impurities, higher concentration of drugs or incomplete harvest of cells. Microscopic examination of cell growth to be additional index proved very useful because of being less interfered by factor mentioned above. Cell growth examination has high reliability, reproducibility, wider range of suitable drug concentration detectable (20~40 μg crude extract/well) and high objectivity of being capably examined by several observers for comparison. Therefore both ^3H -TdR uptake and cell growth examination should be adopted for indications of this test to obtain accurate objective results. In case of increasing adhesion of cells with surfaces of plate wells by crude herbal extract it is necessary to elevate negative pressure (700 mmHg) and prolong the time of wash-suction (1.5~2 min) during cell harvesting.

(Original article on page 236)