

· 实验研究 ·

活血化瘀药物防治放射性肺损伤的实验研究

杨明会 窦永起 刘哲峰

摘要 **目的** 观察活血化瘀药物对小剂量重复照射下不同时相大鼠肺组织病理学改变和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)表达,探讨其防治放射性肺损伤的作用机制。**方法** 130 只 SD 雌性大鼠随机分为单纯照射组(60 只)、中药治疗组(60 只)和空白对照组(10 只)。用直线加速器对单纯照射组和中药治疗组大鼠右肺进行照射,3 Gy/次,2 次/周,累积剂量最高为 30 Gy,分别于照射开始后第 1、3、5、8、12、26 周共 6 个时间点,两组各随机处死 10 只大鼠,取材切片,行 HE 和免疫组化染色,观察大鼠肺组织病理改变和 TNF- α 和 TGF- β 的表达。**结果** 单纯照射组大鼠肺组织于照射第 5 周急性放射性肺炎最重,第 26 周肺纤维化明显;不同时相 TNF- α 和 TGF- β 表达明显增强($P < 0.01$),中药治疗组大鼠肺组织急性放射性肺炎反应轻微,后期纤维化不明显, TNF- α 、TGF- β 的表达较单纯照射组明显降低($P < 0.01$)。**结论** 在小剂量重复照射过程中,活血化瘀药物可抑制致炎因子和致纤维化因子的表达,减轻早期放射性肺炎的炎症反应,延缓放射性肺纤维化的进展,对放射性肺损伤具有防治作用。

关键词 放射性肺炎;肺纤维化;转化生长因子- β ;肿瘤坏死因子- α ;活血化瘀

Experimental Study on the Prevention and Treatment of Radiation Lung Injury by Blood-activating and Stasis-dissipating Drugs YANG Ming-hui, DOU Yong-qi, and LIU Zhe-feng *General Hospital of PLA, Beijing (100853)*

Abstract **Objective** To observe the pathological changes and the expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and transforming growth factor β (TGF- β) in lung tissue of rats with radiation injury for exploring the mechanism of blood-activating and stasis-dissipating drugs in radiation injury prevention and treatment. **Methods** One hundred and thirty SD female rats were randomly allocated into the simple irradiation group ($n = 60$), the TCM herbs treatment group ($n = 60$) and the blank control group ($n = 10$). The right lung of all rats except those in the blank control group were irradiated by linear accelerator, 3 Gy each time, twice weekly, the maximum accumulated dose being 30 Gy. Ten rats in the two groups were randomly sacrificed at each of the 6 time points (1, 3, 5, 8, 12 and 26 weeks after repeated irradiation), their lung was harvested out, sliced and dyed with HE stain. The histological changes, levels of TNF- α and TGF- β expression in the lung tissue were then observed by immunohistochemical technique. **Results** The most serious acute radiation pneumonia was seen in the 5th week and pulmonary fibrosis was remarkable in the 26th week in the simple irradiation group, with the expressions of TNF- α and TGF- β at different time phases enhanced significantly ($P < 0.01$). While in the TCM herbs treatment group, the pneumonia was milder, pulmonary fibrosis in late stage was not so obvious, and the expressions of TNF- α and TGF- β significantly lower than those in the simple irradiation group ($P < 0.01$). **Conclusion** Blood-activating and stasis-dissipating drugs can inhibit expression of inflammation-inducing factors and fibrosis-inducing factors to lessen the inflammatory reaction of early radiation pneumonia, prolong the progression of radiation lung fibrosis, showing preventive and treating action on radiation lung injury.

Key words radiation lung injury; pulmonary fibrosis; transforming growth factor β ; tumor necrosis

factor- α ; blood-activating and stasis-dissipating

放射治疗是胸部恶性肿瘤的主要治疗手段之一,临床上放射性肺损伤发生率较高,严重者可加速患者死亡^[1]。研究表明^[2],放射性肺损伤的发病与多种细胞因子在不同时期的过度表达有关。为早期防治放射性肺损伤,阻断或减轻其进一步发展,我们根据临床放射治疗的过程和防治经验,将活血化瘀药物用于小剂量重复照射的大鼠,观察不同照射时相肺组织病理变化及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)表达的影响,为中医药早期防治该病提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 由于放射性损伤及所选择活血化瘀药物的功效与性别关系不大,为方便饲养和研究,选用健康成年清洁级雌性 SD 大鼠 130 只,体重(200 $\pm$ 20)g,由解放军总医院医学实验动物中心提供,供试前在清洁动物房常规观察饲养 3 天,无异常者入组实验。

1.2 药物 活血化瘀中药桃仁、川芎、地龙、莪术均购自中国人民解放军总后卫生部药材供应站,经中国中医研究院中药研究所鉴定,符合 2000 年版药典规定;按传统煎药法煎取药液,以恒温水浴锅浓缩成含生药 1.0 g/ml 汤剂。

1.3 试剂及仪器 TGF- β 为兔多克隆抗体 IgG, TNF- α 为山羊多克隆抗体 IgG,均为美国 Santa Cruz 公司产品(北京中山生物技术有限公司分装)。山羊或兔 SP kit 及 DAB 染色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品。XL18 直线加速器由英国 Philips 公司生产。

2 方法

2.1 分组及给药方法 130 只雌性 SD 大鼠随机分成 3 组:单纯照射组(简称照射组)60 只,中药治疗组(简称治疗组)60 只,空白对照组(简称对照组)10 只。治疗组大鼠按 10 g 生药/kg 给药,于照射前 1 周灌胃给药,每日 1 次。每周称体重调整给药量。照射组和对照组大鼠同期每日给予等量生理盐水灌胃。

2.2 照射方法 照射组和治疗组大鼠于照射前使用速眠新注射液 0.08 ml 肌肉注射麻醉,俯卧于照射平台上,用直线加速器产生的 6 MV-X 线照射,铅块遮挡左肺和纵隔,右肺照射野 2 cm $\times$ 2 cm,每次剂量 3 Gy,每周 2 次,照射后等待大鼠自然苏醒。两组大鼠在完成 2、6、10 次照射后以及在照射开始后 8、12 和

26 周末,分别随机抽取 10 只大鼠进行观察和检测。对照组大鼠同时进行相同麻醉,不进行照射。

2.3 取材及切片 两组大鼠分别于不同时段处死、取材,使用 10% 水合氯醛 500mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速切开胸腔取大鼠右肺中叶,置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋,连续 4 μ m 切片,行 HE 染色和免疫组织化学染色。对照组大鼠于实验完成时处死、取材和进行相同的组织处理。

2.4 免疫组织化学 采用过氧化物酶标记的链酶卵白素法(SP 法)。

2.5 观察指标 (1)HE 染色:肺组织形态学改变;(2)免疫组织化学染色:光镜下观察胞质中出现棕黄色颗粒为阳性,计算阳性面积及积分吸光度(OD)。

2.6 图像观察和分析 每只大鼠取切片 3 张,每张切片在 10 $\times$ 40 倍显微镜下取 5 个视野,用 Image Pro Plus 4.5 软件分别测量 TGF- β 、TNF- α 表达阳性面积及 OD 值,取均值。

2.7 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数间比较用 t 检验,使用 CHISS 1.01 统计软件进行分析。

结 果

1 光镜观察 对照组肺组织学结构正常。照射组照射第 1 周(累积剂量 6 Gy)肺组织结构变化不明显,第 3 周(累积剂量 18 Gy)肺组织出现轻度炎症反应,第 5 周(累积剂量 30 Gy)急性炎症最重,肺充血、出血、水肿明显,肺泡腔积液并有红细胞、巨噬细胞、肺泡上皮细胞等聚积;第 12 周(照射结束 7 周后)急性炎症消退,肺泡壁增厚,肺泡腔变小,成纤维细胞及淋巴细胞显著增多;第 26 周(照射结束 21 周后)肺泡壁重度增厚,肺泡腔明显变小乃至消失,纤维细胞明显增多,发生局灶性纤维化。治疗组肺组织急性炎症也始于照射第 3 周,照射第 5 周炎症反应最为明显,但程度明显轻于照射组,炎性细胞少量浸润,未见肺泡腔积液;第 12 周和第 26 周成纤维细胞、纤维细胞及淋巴细胞均少于同时期照射组,局灶性纤维化不明显。见图 1~5。

2 3 组 TNF- α 、TGF- β 表达阳性面积比较 见表 1。照射组 TNF- α 表达于照射第 3 周开始增高,并于第 5 周达到高峰;治疗组也于第 3 周开始升高,但低于照射组($P < 0.01$),且之后的各时段 TNF- α 表达均低于照射组($P < 0.01$)。TGF- β 的表达随照射时

间的延长逐渐增强,照射组在第5周显著升高,第12

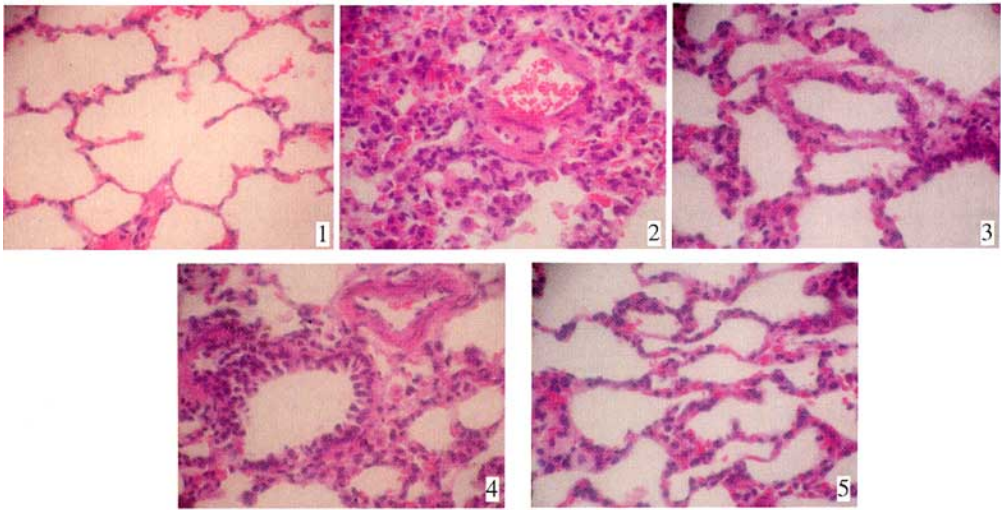


图 1 对照组肺组织 HE 染色(400×); 图 2 照射组 5 周后肺组织 HE 染色(400×); 图 3 照射组 26 周后肺组织 HE 染色(400×); 图 4 治疗组 5 周后肺组织 HE 染色(400×); 图 5 治疗组 26 周后肺组织 HE 染色(400×)

周达到高峰,第 26 周仍维持较高水平;治疗组 TGF-β 表达增势缓慢,在照射开始后的第 8、12、26 周较照射组明显减弱($P<0.01$)。

表 1 3 组 TNF-α、TGF-β 表达阳性面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(周)	n	TNF-α(μm ²)	TGF-β(μm ²)
照射	1	10	100 469 ± 16 454	109 853 ± 15 317
	3	10	264 929 ± 39 432 *	198 435 ± 29 843 *
	5	10	372 484 ± 66 534 *	251 469 ± 46 523 *
	8	10	279 685 ± 45 632 *	363 721 ± 86 421 *
	12	10	244 363 ± 36 984 *	443 626 ± 103 946 *
	26	10	185 394 ± 12 543 *	253 694 ± 20 549 *
治疗	1	10	112 654 ± 14 893	110 842 ± 14 142
	3	10	161 647 ± 16 484 △	175 439 ± 16 391
	5	10	251 023 ± 30 675 △	223 867 ± 26 691
	8	10	203 981 ± 24 873 △	241 204 ± 24 257 △
	12	10	176 419 ± 19 084 △	281 054 ± 67 136 △
	26	10	140 457 ± 13 120 △	184 130 ± 25 410 △
对照	10	10	113 462 ± 20 014	108 656 ± 15 469

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与照射组同期比较,△ $P<0.01$

讨 论

中医学认为放射线属“热毒”^[3],在放疗过程中易伤肺络,以致热邪壅阻,肺络瘀滞,瘀血内停,故文献较多应用活血化瘀法治疗放射性肺损伤^[2]。现代医学认为在放射性肺纤维化形成过程中存在微循环障碍、血小板聚集与血栓形成、血液流变学异常等^[2]。我们在照射结束后观察到大鼠肺脏外观颜色晦暗,有明显散在的紫黑色瘀斑,表面不光滑,有微小凹陷,质硬而弹

万方数据

性差,与中医学血瘀证的表现相吻合。因此,放射性肺损伤尤其是放射性肺纤维化,与中医学血瘀证有着密切的联系,早期应用活血化瘀法防治放射性肺损伤是有依据的。

我们在实验中选用临床上最为常用的活血化瘀之品——川芎、桃仁、莪术、地龙 4 味药物。现代药理研究表明它们具有保护血管内皮细胞、改善血液循环、缓解血管痉挛、抑制血小板聚集和抗血栓形成,并能抑制胶原纤维合成及抗纤维化等作用^[4-6]。通过对第 12 周和第 26 周大鼠肺组织的光镜观察可以看出,早期应用上述活血化瘀中药对急性放射性肺炎有抑制作用,同时也延缓了放射性肺纤维化的进程,减轻了肺纤维化的程度,大鼠的生存状况也得到了明显改善。

通过观察单纯照射组和中药治疗组大鼠肺组织 TNF-α 和 TGF-β 的表达,我们可以看出早期应用活血化瘀中药可抑制致炎因子 TNF-α 和细胞外基质沉积促进剂 TGF-β 的表达。有研究表明^[7,8],抑制 TNF-α 可使中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的功能失活,对急性炎症所致毛细血管通透性亢进产生抑制作用,改善微循环,促进炎症的吸收,抑制急性渗出,从而使肺组织的炎性反应明显减轻;在放射性肺损伤中后期,抑制 TGF-β 的表达可使细胞外基质合成减少,基质降解酶活性增加,降解酶抑制剂活性降低,减少胶原的合成,同时使其对内皮细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞等多种细胞的促分裂增生作用减弱,减少胶原纤维的合成,从

而阻止了肺纤维化进程。活血化瘀中药还可通过改善微循环和抑制血小板聚集及血栓形成,从而抑制纤维化的形成。因此,早期应用活血化瘀药物可干预肺组织细胞因子 TNF- α 和 TGF- β 的表达,这可能与其减轻放射性肺炎,延缓甚至阻止发生放射性肺纤维化的作用有关。

参 考 文 献

- 1 刘泰福主编. 现代放射肿瘤学. 上海: 复旦大学出版社, 上海医科大学出版社, 2001: 345—346.
Liu TF, editor. Modern radiation oncology. Shanghai: Fudan University Press, Shanghai Medical University Press, 2001: 345—346.
- 2 刘艳娥, 王若雨, 李曼. 中西医防止放射性肺损伤的研究. 医师进修杂志 2001; 24(7): 56—58.
Liu YE, Wang RY, Li M. Research of preventing radiation-induced lung injury with traditional Chinese and western medicine. J Postgraduates Med 2001; 24(7): 56—58.
- 3 郭春华, 薛涛. 中医药在食管癌治疗中的应用概况. 江苏中医药 2005; 26(2): 59—61.
Guo CH, Xue T. Application of traditional Chinese medicine in treatment for cancer of oesophagus. Jiangsu J Tradit Chin Med 2005; 26(2): 59—61.
- 4 洪长福, 娄金萍, 周华仕, 等. 桃仁提取物对大鼠实验性矽肺纤维化的影响. 劳动医学 2000; 17(4): 218—219.
Hong CF, Lou JP, Zhou HS, et al. The study of effects of Semen Persical extract on silicotic fibrosis in rats. J Labour Med 2000; 17(4): 218—219.
- 5 殷书梅, 储益平, 吴鹏. 地龙活性提取物的主要药效学试验. 中草药 2002; 33(10): 926—928.
Yin SM, Chu YP, Wu P. Pharmacodynamic test of active extract of lumbricus. Chin Tradit Herbal Drugs 2002; 33(10): 926—928.
- 6 毛春芹, 谢辉, 陆免林. 莪术炮制品的抗血小板聚集及抗凝血作用. 中药材 2003; 23(7): 212—213.
Mao CQ, Xie H, Lu ML. Studies on antiplatelet aggregation and analgesic action of Curcuma phaeocaulis. J Chin Med Materials 2003; 23(7): 212—213.
- 7 邱海波, 潘家琦, 杜斌, 等. 地塞米松、布洛芬和川芎嗪对脂多糖诱导肿瘤坏死因子 α 产生的影响. 中国药理学报 1997; 18(1): 67—70.
Qiu HB, Pan JY, Du B, et al. Effects of dexamethasone, ibuprofen and ligustrazine in lipopolysaccharides-induced tumor necrosis factor- α production. Acta Pharmacol Sinica 1997; 18(1): 67—70.
- 8 杜兰屏, 胡仲仪, 邓跃毅, 等. 莪术对肾脏细胞外基质影响的实验研究. 上海中医药杂志 2002; 6(1): 38—40.
Du LP, Hu ZY, Deng YY, et al. Experimental study on the influence of Curcumac on extracellular matrix of kidney. Shanghai Tradit Chin Med 2002; 6(1): 38—40.

(收稿: 2005-06-29 修回: 2005-08-12)

2004 年《中国中西医结合杂志》优秀论文评选揭晓

本刊 2004 年度“优秀论文”评选活动[详见本刊 1992; 12(6): 321]现已结束, 经全国数十位专家对本刊 2004 年度所载论文认真审阅与评比, 评选出一、二、三等奖论文各 1 篇, 现公布如下:

一等奖: 286 例 IgA 肾病中医辨证与肾脏病理关系的多中心前瞻性研究, 2004; 24(2): 101, 解放军总医院肾科解放军肾病中心暨重点实验室, 陈香美等。

二等奖: 六味地黄汤对快速老化模型小鼠下丘脑-垂体-卵巢轴的调节作用及机理研究, 2004; 24(4): 325, 军事医学科学院毒物药物研究所, 马渊等。

三等奖: 淫羊藿总黄酮保护衰老细胞端粒长度缩短的实验研究, 复旦大学华山医院中西医结合研究所, 2004; 24(12): 1094, 胡作为等。

对以上获奖论文, 本社将颁发获奖证书及奖金(分别为 3000、2000、1000 元), 以资鼓励。

(本刊讯)