

· 基础研究 ·

保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病大鼠 肺血管重构的干预作用

何 飞¹ 沈亚青¹ 徐俭朴¹ 王 辉² 贾仰民¹ 喻 婷¹

摘要 **目的** 观察保肺定喘汤对慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)大鼠肺血管重构的干预作用,探讨其作用机制。**方法** 50 只雄性大鼠随机分为正常对照组、模型组、中药组、西药组和中西医结合组,每组 10 只。采用气道滴注脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)联合香烟烟雾暴露的方法制备大鼠 COPD 模型。正常对照组、模型组用生理盐水灌胃,中药组则予保肺定喘汤灌胃[12.4 g/(kg·d)],西药组雾化吸入布地奈德混悬液[50 μg/(kg·d)],中西医结合组同时予相同剂量保肺定喘汤灌胃及布地奈德雾化吸入。观察肺血管病理形态学变化;检测管壁内胶原纤维及 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)表达;检测各组大鼠肺动脉增殖细胞核抗原(PCNA)及血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠肺小动脉管壁增厚、管腔变小,管壁内胶原纤维及 α-SMA 表达增加($P < 0.01$, $P < 0.05$),PCNA、VEGF 表达增加($P < 0.01$)。与模型组比较,各药物组均能使肺小动脉管壁变薄、管腔变大,管壁内胶原纤维及 α-SMA 表达减少($P < 0.01$, $P < 0.05$);PCNA、VEGF 表达下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 保肺定喘汤能有效减轻 COPD 大鼠肺血管重构,其机制可能通过调节肺小动脉 α-SMA、PCNA 及 VEGF 表达有关。

关键词 保肺定喘汤;肺血管重构;增殖细胞核抗原;血管内皮生长因子

Intervention Effect of Baofei Dingchuan Decoction on Pulmonary Vascular Remodeling in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rats HE Fei¹, SHEN Ya-qing¹, XU Jian-pu¹, WANG Hui², JIA Yang-min¹, and YU Ting¹ 1 *Pneumology Department, Affiliated Integrated Chinese and Western Medicine Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310003)*; 2 *Lab and Equipment Administration Department, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou (310053)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Baofei Dingchuan Decoction on remodeling in pulmonary vascular in chronic obstructive pulmonary diseases (COPD) rats, and to explore its possible mechanism. **Methods** Totally 50 male SD rats were randomly divided into the normal control group, the model group, the Chinese medicine group, the Western medicine group, and the integrative medicine group, 10 rats in each group. The rat model of COPD were established by intratracheal instillation of Lipopolysaccharides (LPS) and daily exposure to cigarette-smoking. Rats in the normal control group and model group were administered with sodium chloride by gastrogavage. Rats in the Chinese medicine group were administered with Baofei Dingchuan Decoction at dosage of 12.4 g/(kg·d) by gastrogavage. Rats in the Western medicine group were inhaled with budesonide at dosage of 50 μg/(kg·d). The integrative medicine group were administered with Baofei Dingchuan Decoction and budesonide at same dosage. The pathological features of pulmonary arteries were observed after intervention. The content of the collagen fiber and α-smooth muscle actin(α-SMA) in pulmonary artery were detected, as well as the protein expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected. **Results** Compared with the normal control group, vessel walls of model group

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81403336)

作者单位: 1. 浙江中医药大学附属中西医结合医院呼吸科(杭州 310003); 2. 浙江中医药大学实验室与设备管理处(杭州 310053)

通讯作者: 徐俭朴, Tel: 0571-56109765, E-mail: xujianpu1@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180110. 037

were thickened and the lumen were reduced, and the expression of α -SMA and collagen fibers in microvascular pulmonary arteries increased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). PCNA and VEGF expression level in the model group was higher than that in the normal control group significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the vessel walls were thinned, the lumen were expanded, and the expression of α -SMA and collagen fibers in microvascular pulmonary arteries were inhibited significantly in each therapy group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). PCNA and VEGF expression level in each drug group was lower than that in the model group significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Conclusion Baofei Dingchuan Decoction might reduce the remodeling of pulmonary vascular by adjusting the expression of α -SMA, PCNA and VEGF.

KEYWORDS Baofei Dingchuan Decoction; pulmonary vascular remodeling; proliferating cell nuclear antigen; vascular endothelial growth factor

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary diseases, COPD) 是呼吸系统常见病,多发病,其病情不断进展最终可引起呼吸衰竭和肺源性心脏病。而肺血管重构是 COPD 肺动脉高压持续进展及最终形成肺心病的重要原因^[1],因此寻找能有效干预肺血管重构药物是治疗 COPD、减少其并发症的关键所在。中医药在治疗 COPD 并发肺动脉高压、肺心病方面具有一定优势^[2]。保肺定喘汤是国家级名老中医王会仍主任医师的经验方,已广泛应用于临床,并取得了较好效果^[3]。本研究通过建立 COPD 大鼠模型,探讨保肺定喘汤对 COPD 大鼠肺血管重构的干预作用,为治疗 COPD 及其并发症提供新思路。

材料与方法

1 动物 50 清洁级健康雄性 SD 大鼠,体重 (150 ± 20)g,由浙江中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号:SYXK(浙)2013—0184,所有动物均饲养于 SPF 级动物房,实验动物的处置严格按照浙江中医药大学动物实验中心的伦理相关规定进行。

2 药物 保肺定喘汤由党参 15 g 黄芪 15 g 丹参 15 g 当归 10 g 熟地 15 g 麦冬 9 g 广地龙 15 g 仙灵脾 10 g 桔梗 9 g 甘草 6 g 组成,上述药物由浙江中医药大学附属中西医结合医院中药制剂室制成流浸膏,生药含量 3.1 g/mL,4℃ 储备;布地奈德混悬液:1 mg/支,阿斯利康制药有限公司生产,批号:317538。

3 主要试剂和仪器 脂多糖 (Lipopolysaccharides, LPS) 试剂盒 (美国 Sigma 公司,批号:L2880);香烟 (大前门牌,上海卷烟厂,每支含烟碱量为 13 mg,尼古丁为 1.0 mg);PCNA 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:13110S);VEGF Receptor 2 (D5B1) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:9698)。低温高速离心机 (德

国 Eppendorf 公司,型号:5804R),光学显微镜 (Olympus 公司,BX43 型),全自动生物组织染色机 (Tissue-Tek 公司,型号:Prisma)。

4 COPD 大鼠模型的制备 采用气道滴注 LPS 联合烟熏方法建立 COPD 模型,参照相关文献[4],大鼠在自制吸烟染毒箱内被动吸烟 20 支,每天 2 次,每次 30 min,间隔 8 h,共 70 天;造模第 1、28 天每只大鼠气道内滴入 LPS 0.2 mL (200 μ g),该日内不予以吸烟。正常对照组每天在自制吸烟染毒箱内以相同时间呼吸正常空气并于造模第 1、28 天每只大鼠气道内滴入 0.2 mL 生理盐水。制备过程中无死亡。

5 动物分组及干预方法 50 只雄性 SD 大鼠随机分成 5 组:正常对照组、模型组、中药组、西药组及中西医结合组,每组 10 只。所有大鼠用药量都按照体重 60 公斤的成年人每日常规服用药量换算,通用公式: (动物体重/人的体重) $\times$ 人用药量 $\times$ 6.25 计算而来^[5]。造模后第 29 ~ 70 天给药,正常对照组和模型组予生理盐水灌胃,中药组予保肺定喘汤灌胃 [12.4 g/(kg $\cdot$ d)],西药组雾化吸入布地奈德混悬液 [50 μ g/(kg $\cdot$ d)],中西医结合组同时予保肺定喘汤灌胃及雾化吸入布地奈德。

6 检测指标及方法

6.1 肺小动脉病理形态学观察 取右下叶肺组织,右肺门横断取材,常规石蜡制片,HE 染色,光学显微镜下观察肺小动脉形态学改变,利用病理图文分析系统采集图像。对 HE 染色切片片厚 3 μ m 测量与终末细支气管伴行的肺小动脉管壁厚度 (wall thickness, WT)、血管直径 (vessel diameter, VD)、管腔面积 (luminal area, LA)、血管总面积 (total area, TA)、管壁面积 (wall area, WA),然后计算管壁厚度占血管外径百分比 (WT%)、管壁面积占血管总面积百分比 (WA%),管腔面积占血管总面积百分比 (LA%),以此作为大鼠的肺血管形态计量学指标进行

统计学分析。

6.2 肺小动脉胶原纤维及 α -SMA 的检测 在 HE 染色基础上行 Masson 染色切片(片厚 3 μm)定量分析测量肺小动脉管壁内胶原纤维(呈蓝色)阳性占血管总面积百分比;免疫组化切片测量 α -SMA 阳性表达强度(平均光密度),以上定量分析每张切片均选取 3~5 个小动脉进行测量,并算取其平均值进行统计学分析。

6.3 肺小动脉 PCNA 和 VEGF 的检测 使用免疫组化染色的方法检测大鼠肺小动脉 PCNA 和 VEGF 含量。采用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像分析,在 200 倍光镜下观察 PCNA 和 VEGF 免疫组化染色切片,以固定颜色模式界定色调、饱和度、颜色强度等条件下测量大鼠肺小动脉壁内 PCNA 和 VEGF 平均吸光度值作为其相对含量,定量分析每张切片均选取 3~5 个小动脉进行测量,并取其平均值进行统计学分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 统计软件包进行处理,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数比较采用单因素方差分析,方差齐性两两比较采用 SNK 法检验,方差不齐性则两两比较采用 Tamhane's T^2 法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

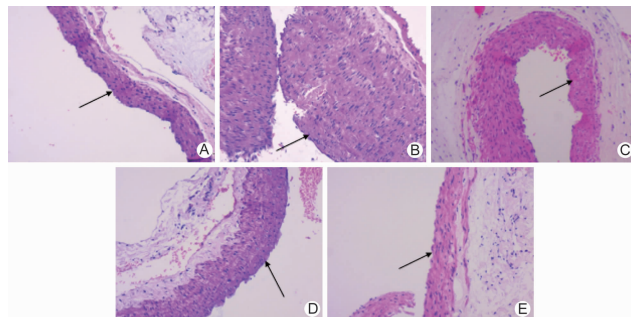
结 果

1 各组大鼠肺小动脉病理形态学观察(表 1, 图 1) 正常对照组大鼠肺小动脉管壁薄,内皮细胞扁平连续,厚薄较一致;模型组大鼠小动脉管腔变小、不规则,内皮细胞变性肿胀,平滑肌细胞增生肥厚明显;各药物组大鼠肺小动脉血管壁不同程度增厚、管腔略有变窄,较模型组均有不同程度减轻。与正常对照组比较,模型组肺小动脉管壁增厚、管腔狭窄明显,WT%、WA%增大,LA%减小(均 $P < 0.01$);与模型组比较,各药物治疗组均能在一定程度上减轻肺血管重构,肺小动脉 WT%、WA%均降低,LA%增大($P < 0.01$, $P < 0.05$)。各药物治疗组之间比较,WT%、WA%、LA%差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺小动脉 WT%、WA%、LA%结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	WT%	WA%	LA%
正常对照	10	24.08 $\pm$ 2.88	61.59 $\pm$ 10.62	38.41 $\pm$ 10.62
模型	10	52.78 $\pm$ 8.59*	87.72 $\pm$ 7.44*	12.28 $\pm$ 7.44*
中药	10	37.61 $\pm$ 6.66 ^{ΔΔ}	78.84 $\pm$ 7.67 ^Δ	21.16 $\pm$ 7.67 ^Δ
西药	10	36.93 $\pm$ 6.96 ^{ΔΔ}	77.20 $\pm$ 8.90 ^Δ	22.80 $\pm$ 8.90 ^Δ
中西医结合	10	34.27 $\pm$ 6.99 ^{ΔΔ}	72.85 $\pm$ 10.53 ^{ΔΔ}	27.15 $\pm$ 10.53 ^{ΔΔ}

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



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为中药组;D 为西药组;E 为中西医结合组;箭头所示为肺动脉管壁

图 1 各组大鼠肺小动脉病理形态 (HE, $\times 200$)

2 各组大鼠肺小动脉胶原纤维百分比及 α -SMA 比较(表 2) 与正常对照组比较,模型组血管壁内胶原纤维百分比及 α -SMA 平均光密度均增加($P < 0.01$);与模型组比较,各药物治疗组血管壁内胶原纤维百分比及 α -SMA 平均光密度均有不同程度降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);各药物治疗组之间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺小动脉胶原纤维及 α -SMA 比较 ($\bar{x} \pm s$)

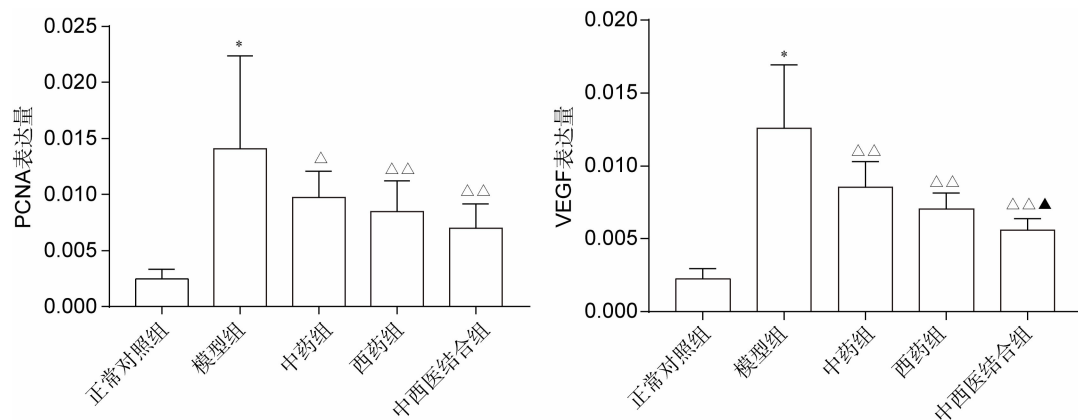
组别	<i>n</i>	胶原纤维百分比(%)	α -SMA 平均光密度
正常对照	10	4.73 $\pm$ 0.84	28.64 $\pm$ 4.79
模型	10	9.42 $\pm$ 1.62*	49.72 $\pm$ 10.52*
中药	10	7.34 $\pm$ 1.19 ^{ΔΔ}	40.33 $\pm$ 10.04 ^Δ
西药	10	7.21 $\pm$ 1.17 ^{ΔΔ}	38.61 $\pm$ 8.44 ^{ΔΔ}
中西医结合	10	6.90 $\pm$ 1.03 ^{ΔΔ}	37.36 $\pm$ 8.38 ^{ΔΔ}

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

3 各组大鼠肺小动脉 PCNA 和 VEGF 表达比较(图 2、3) 各组大鼠肺小动脉 PCNA 和 VEGF 表达组间比较有显著差异($F = 10.19$, $P < 0.01$; $F = 30.92$, $P < 0.01$)。与正常对照组比较,模型组 PCNA 和 VEGF 表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,各药物治疗组 PCNA 和 VEGF 表达降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);各药物治疗组之间 PCNA 比较,差异无统计学意义(P 均 > 0.05);中西医结合组 VEGF 表达较中药组下降($P < 0.01$)。

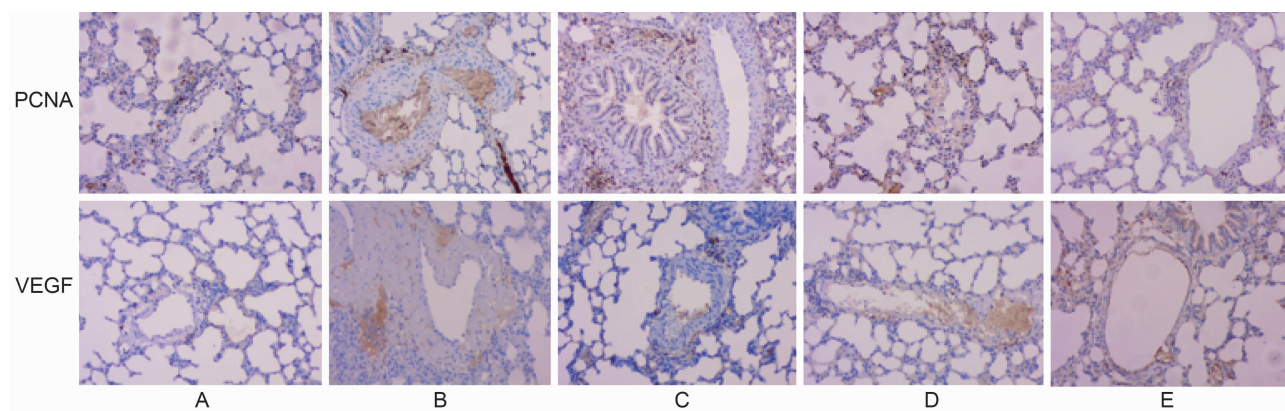
讨 论

COPD 病理改变之一是肺血管重构,这种变化以血管壁增厚为特点,并始于疾病的早期甚至是肺功能正常的吸烟患者,后期往往出现肺动脉高压而导致慢性肺源性心脏病发生^[6]。因此深入研究 COPD 肺血管重构的发病机制,同时阐明中医临床治法对 COPD 肺血管重构干预作用的相关作用机制,是防治 COPD



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

图2 各组大鼠肺小动脉 PCNA、VEGF 含量比较



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为中药组;D 为西药组;E 为中西医结合组

图3 各组大鼠肺小动脉 PCNA、VEGF 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

的重点所在。对于 COPD 肺血管重构,属中医学肺络病范畴^[7],认为肺脏久病,病邪由气入血而病络,络气亏虚,气虚无力推动血及津液的正常运行而致血停成瘀,津聚为痰,痰浊、瘀血有形之邪阻塞肺络,致肺络改变,其发病中心环节均具有“气虚”和“痰瘀”,所以益气活血通络法在各分型治疗中,都应适当运用。国内各家临床研究发现采用益气活血通络中医学理论指导治疗 COPD 均取得了良好的临床效果^[8,9]。但这些研究均未进一步深入研究益气活血通络法干预 COPD 肺血管重构的内在机制。

胶原纤维是细胞外基质重要组成部分,在 COPD 肺血管重构过程中起到重要作用^[10,11]。肺动脉平滑肌细胞是肺动脉血管重构的主要靶细胞^[12], α -SMA 在肺内主要表达于所有平滑肌细胞及肌成纤维细胞,它可间接反映平滑肌细胞增殖情况^[13],促进肺血管重构发展。另一方面,平滑肌细胞增殖在肺血管重构中起到重要作用,PCNA 是反映细胞增殖状态的良好指

标^[14],而 VEGF 是内皮细胞特异性促有丝分裂原,在肺内由内皮细胞和平滑肌细胞合成与分泌,在缺氧、炎症以及血管内皮损伤等刺激后其表达则明显增加,促进肺血管重构^[15]。根据中医学益气活血通络原则,本研究采用党参、黄芪、丹参、当归、熟地、麦冬、广地龙、仙灵脾、桔梗、甘草等组成的保肺定喘汤来干预 COPD 肺血管重构,方中黄芪、党参益肺健脾,当归、丹参活血化瘀,四药同为君药共奏益气活血之功;熟地、麦冬滋阴养肺,使气足则血行,阴滋则血运;广地龙清热化痰平喘,仙灵脾温肾平喘之功,两者一阴一阳,燮理阴阳;桔梗开宣肺气、宣通气血、祛痰排脓,甘草润肺止咳,补益肺脾,而为佐使。诸药相伍,行益气活血、行滞通络之功效,使气行血行,痰瘀同化,肺络得畅,这正好针对肺动脉高压肺血管重构从气虚到血瘀、痰阻再致局部肺络不通的发生发展过程,起到了良好的扶正固本祛邪作用。本实验研究显示:模型组大鼠肺小动脉管壁显著增厚,管腔变小,肺小动脉管壁内胶原纤维、 α -

SMA 阳性细胞表达增加,同时肺小动脉 PCNA 及 VEGF 表达增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。采用保肺定喘汤干预后肺小动脉管壁变薄,管腔增大,同时胶原纤维、 α -SMA、PCNA 及 VEGF 表达均减少($P < 0.01$, $P < 0.05$),说明保肺定喘汤可以减轻 COPD 肺血管重构,其机制可能通过调节肺小动脉 α -SMA、PCNA 及 VEGF 表达有关,为中医益气活血通络治法防治 COPD 肺血管重构提供了一定实验依据。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations[J]. Eur Respir Rev, 2014, 23(133): 350–355.
- [2] 何飞,蔡宛如.蔡宛如教授辨治稳定期慢性阻塞性肺疾病经验[J].浙江中医药大学学报,2015,39(10): 734–735.
- [3] 何飞,汝触会,陈爱凤,等.益气活血通络法治疗慢性阻塞性肺疾病 D 组稳定期的临床观察[J].中华中医药学刊,2017,35(6): 1466–1468.
- [4] 方苏榕,谷伟,谭焰,等.烟熏联合内毒素构建 COPD 大鼠模型[J].南京医科大学学报(自然科学版),2013,33(9): 1226–1230.
- [5] 章元沛主编.药理实验方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版,1996: 238.
- [6] Wrobel JP, Thompson BR, Williams TJ. Mechanisms of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: a pathophysiologic review[J]. J Heart Lung Transplant, 2012, 31(6): 557–564.
- [7] 何飞.运用肺络理论治疗肺系疾病刍议[J].浙江中医

杂志,2011,46(8): 549–550.

- [8] 郭红霞.益气活血通络法治疗老年性慢性阻塞性肺疾病 33 例[J].中国社区医师(医学专业),2012,14(34): 220.
- [9] 王胜,陈悦,任薇,等.益气活血法对慢性阻塞性肺疾病急性加重患者血浆纤维蛋白原及 D-二聚体的影响[J].中国中西医结合杂志,2015,35(5): 537–540.
- [10] Barberà JA. Mechanisms of development of chronic obstructive pulmonary disease-associated pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ, 2013, 3(1): 160–164.
- [11] Hansen NU, Willumsen N, Sand JM, et al. Type VIII collagen is elevated in diseases associated with angiogenesis and vascular remodeling[J]. Clin Biochem, 2016, 49(12): 903–908.
- [12] Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, et al. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2014, 29(2): 144–155.
- [13] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, et al. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(1): L1–8.
- [14] Lu Z, Li S, Zhao S, et al. Upregulated miR-17 regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis by targeting mitofusin 2[J]. Med Sci Monit, 2016, 22(9): 3301–3308.
- [15] 吕倩,王昌明,蒋明,等. HIF-1 α 和 VEGF 在大鼠 COPD 中的表达及与肺血管重构的关系研究[J].中国药理学通报,2012,28(6): 772–777.

(收稿:2017-03-10 在线:2018-01-31)

责任编辑:白霞