

· 博士论坛 ·

益气活血散结法对肺纤维化的干预效果及机制研究

孙增涛 封继宏 李小娟 廉富 刘恩顺



作者简介：

孙增涛 (1963-) 男,汉族,医学博士,主任医师,教授,长期从事中西医结合防治呼吸系统疾病的研究工作,擅长中西医结合防治支气管哮喘、慢阻肺、肺间质纤维化等呼吸系统常见病和疑难病,现任天津中医药大学第二附属医院院长,天津市呼吸病研究所副所长,兼任世界中医药联合会呼吸病专业委员会副会长,中华中医药学会内科分会常委,中国中西医结合学会呼吸病专业委员会副主任委员,天津市中医药学会呼吸病专业委员会主任委员,天津市中西医结合学会专业委员会副主任委员,《天津中医药》常务编委,《天津中医药大学学报》编委,《中国中医急症》编委等职,为天津市中医、中西医结合呼吸病学科带头人。

摘要 [目的] 探讨益气活血散结法对肺纤维化的干预效果及机制。[方法] 通过临床与动物实验系统研究益气活血散结法为主要治则的中药复方对肺纤维化的干预效果及机制。[结果] 益气活血散结法不仅能明显改善肺纤维化患者的临床症状,提高生活质量,而且能抑制肺炎炎症,减少肺组织损伤,显著降低转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)的过度表达。[结论] 益气活血散结法能改善肺纤维化患者临床症状,对防治肺纤维化有一定的作用。

关键词 肺纤维化 益气活血散结法 转化生长因子- $\beta 1$

中图分类号 R563 文献标识码 A 文章编号 :1673-9043 (2008)03-0209-04

Interference of tonifying qi, activating blood and dispersing accumulation on pulmonary fibrosis and the mechanism research

SUN Zeng-tao, FENG Ji-hong, LI Xiao-juan, et al

(The Second Hospital Affiliated to the Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China)

Abstract: [Objective] To explore the intervention effect of tonifying Qi, activating blood and dispersing accumulation method on pulmonary fibrosis and analyze its mechanism. [Methods] A systematic clinical observation and animal experimental study on the effect of tonifying Qi, activating blood and dispersing accumulation on pulmonary fibrosis and their mechanism research were carried out. [Results] The method of tonifying Qi, activating blood and dispersing accumulation could not only improve the patients' symptoms obviously, but also inhibit the inflammation in lung alveoli, reduce TGF- $\beta 1$ over-expression. [Conclusion] The method of tonifying Qi, activating blood and dispersing accumulation can improve the patients' symptoms, and play an important role in preventing and curing pulmonary fibrosis.

Key words: pulmonary fibrosis; the method of tonifying Qi, activating blood and dispersing accumulation; TGF- $\beta 1$

间质性肺疾病 (ILD)是具有不同程度肺炎症和纤维化的众多急、慢性肺疾病的总称,肺纤维化是其最终病理结果,因缺乏有效的治疗方法而病死率极

高^[1]。中医药治疗本病虽然处于探索阶段,但已显示出良好的前景。笔者根据传统中医理论,结合本病的临床表现及治疗经验,认为气虚血瘀是该病的基本病机,并提出了益气活血散结这一总的治则,通过临床与动物实验系统研究了益气活血散结法干预肺纤

维化的效果和机制。

1 临床研究

1.1 诊断标准

1.1.1 西医诊断标准 参照中华医学会呼吸病学会2002年拟定的《特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案)》^[2],分主要诊断标准和次要诊断标准。

1.1.2 中医(气虚血瘀痰结证)辨证标准 参照《中药新药临床研究指导原则》^[3]和《中医病证诊断疗效标准》^[4],分主症和次症。

1.2 临床资料 选择2003年6月—2006年6月在天津中医药大学第二附属医院呼吸科就诊的符合诊断标准的ILD、中医辨证属气虚血瘀痰结证患者30例,年龄18~75岁,采用随机数字表法分为两组,治疗组与对照组各15例。治疗组男8例,女7例,平均年龄(59.45±7.88)岁;病情程度:轻度4例,中度6例,重度5例。对照组男9例,女6例,平均年龄(56.88±9.74)岁;病情程度:轻度4例,中度7例,重度4例。中途脱落病例5名,其中治疗组2名因疗效欠佳脱落,对照组3例,1例死亡,另外2例疗效欠佳脱落。

1.3 治疗方法 对照组按照《特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案)》方案:糖皮质激素:泼尼松或其他等效剂量的糖皮质激素,每天0.5 mg/kg(理想体质量,下同)口服4周,然后每天0.25 mg/kg,口服8周,继之减量至每天0.125 mg/kg或0.25 mg/kg隔天1次口服;治疗组在对照组基础上同时口服益气活血散结基本方(黄芪20 g,莪术10 g,丹参20 g,当归15 g,川贝母10 g,黄芩10 g,郁金10 g等),1剂/d,两组疗程均为3个月,所有患者均建立管理档案,定期随访,并进行健康宣传教育活动。

1.4 观测指标 中医证候积分、综合疗效积分、圣乔治医院呼吸问题调查问卷积分及转化生长因子-β1(TGF-β1)水平。综合疗效积分参考《特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案)》^[2]和《呼吸疾病诊断治疗指南》^[5],进行判断。

1.5 结果

1.5.1 两组疗效比较 治疗组改善稳定率为86.66%。对照组改善稳定率为66.66%。

1.5.2 生活质量改善情况 两组患者治疗前后分别进行圣乔治医院呼吸问题调查问卷(SGRQ)调查,治疗组生活质量改善明显,详见表1。

表1 治疗前、后SGRQ评分结果(±s) 分

组别	n	呼吸症状	活动受限	疾病影响	总分	
治疗组	治疗前	13	64±11	44±13	44±12	54±11
	治疗后		35±10*	31±12*	31±11*	31±12*
对照组	治疗前	12	63±13	55±15	45±12	54±13
	治疗后		43±12 [△]	36±14 [△]	38±10 [△]	36±13 [△]

注:与治疗前比较,*P<0.01,两组治疗后比较,[△]P<0.01。

1.5.3 两组患者血清TGF-β1水平的比较 见表2。

2 实验研究

2.1 材料 实验于2002年10月—2003年2月在天津中医药大学医学实验动物中心完成。

2.1.1 动物 取45~50 d的健康清洁级SD大白鼠60只,雌雄各半,体质量(180±20)g,由军事科学院第四研究提供。

2.1.2 药物 芪术合剂由天津中医药大学第二附属医院门诊药房提供,药物组成:黄芪30 g,莪术15 g。水煎,浓缩取汁,浓度为4.05×10⁻² g/L。泼尼松由天津力生制药股份有限公司生产,津卫准字(1981)第00132号,批号J02090260,用生理盐水配制成混悬液,浓度为0.63 g/L。博莱霉素由日本化药株式会社生产,进口许可证号X20000349。

2.2 方法

2.2.1 造模 按照经典博莱霉素法造模^[6]。

2.2.2 分组 健康SD大白鼠60只,正常饲养1周后,选择54只大鼠造模成功后,随机分为模型组(B组)、芪术合剂组(C组)、泼尼松组(D组),每组18只。余6只为正常对照组(A组)。

2.2.3 给药 芪术合剂组给予4.05×10⁻² g/L芪术合剂,泼尼松组给予0.63 g/L泼尼松盐水溶液,灌胃,1.5 mL/次,1次/d。正常对照组、模型组给予等量生理盐水。模型组、芪术合剂组、泼尼松组分别于造模第3、7、21 d每组6只取材后处死,正常对照组于第3 d 1次性取材后处死。

表2 治疗前后患者血清TGF-β1水平的组间比较(±s)

组别	n	治疗前	治疗后	t	P
治疗组	13	4.205 9±3.001 2	1.088 6±1.596 2	t _前 =0.780 t _后 =1.792	P _前 =0.132 P _后 =0.001*
对照组	12	2.235 6±3.357 3	0.273 1±0.255 8	t _前 =1.265 t _后 =2.049	P _前 =0.28 P _后 =0.043*

注:治疗前两组患者血清TGF-β1水平的组间比较,经t检验,无统计学差异,P>0.05,两组具有可比性;治疗后患者血清TGF-β1的下降程度,治疗组好于对照组,且有统计学差异,*P<0.05,且与治疗前比较,具有显著的统计学差异,*P<0.01。

2.2.4 采集肺泡灌洗液 (BALF) 用于检测白介素-8 (IL-8)和透明质酸 (HA)含量。

2.2.5 病理切片 参照 Szapiel 等^[7]的方法根据肺炎和肺纤维化的程度分级。

2.2.6 指标检测 IL-8 采用双抗体放射免疫法检测, TGF-β1 采用免疫组化法检测, TGF-β1mRNA 采用原位杂交法检测。

2.2.7 统计学分析 统计分析采用 SAS8.1 统计软件, 计量资料数据用均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析和 q 检验。

2.3 结果

2.3.1 实验动物数量分析 参加实验动物 60 只, 进入结果分析数量动物 55 只, 中途脱落 5 只。

2.3.2 病理学改变 模型组病理切片早期炎细胞浸润与纤维聚集并存, 随着病情进展炎细胞浸润明显减少, 而纤维聚集加强。芪术合剂组和泼尼松组经治疗后肺泡炎和肺纤维化情况有所减轻, 尤以芪术合剂组明显, 结果见表 3。

表 3 各组实验动物肺泡组织病理学分级 只

组别	时间 (d)	0 级	1 级	2 级	3 级
A 组	-	6	0	0	0
B 组	3, 7, 21	0, 0, 0	3, 2, 0	3, 2, 0	0, 2, 4
C 组	3, 7, 21	0, 0, 0	4, 3, 1	1, 3, 4	1, 0, 0
D 组	3, 7, 21	0, 0, 0	4, 1, 0	0, 5, 3	0, 2, 1

2.3.3 BALF 中细胞变化情况 模型组 BALF 液中中性粒细胞明显增高, 尤其在早期表现明显, 提示炎细胞浸润是肺纤维化早期免疫和炎性反应的主要表现, 随着时间的延长, 炎症反应不再明显, 炎细胞浸润自然减轻, 经中药治疗后, 在早期炎细胞浸润即得到遏制, 且在 7 d 组好于对照泼尼松组, 有统计学差异, 结果详见表 4。

表 4 BALF 中性粒细胞数 ($\bar{x} \pm s$) $\times 10^7/L$

组别	3 d	7 d	21 d
A 组	2.540 0±0.863 8		
B 组	15.750 0±4.625 7	16.786 7±3.595 3	7.857 0±1.030 8
C 组	12.202 5±2.208 4	9.590 0±1.015 3	3.975 0±0.723 0
D 组	10.150 0±2.100 0	11.240 0±2.756 6	2.977 5±0.633 8
F 组	42.004**	15.047**	51.391**
q A:B	15.337**	17.953**	4.693**
B:C	4.118*	9.069**	1.005
B:D	6.501**	6.990*	1.356
C:D	2.383	1.260	0.282

注: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

2.3.4 IL-8 检测 模型组 IL-8 水平校正正常组增高, 且随着时间的延长而表现明显, 经中药治疗后其水平有所下降, 结果详见表 5。

表 5 IL-8 检测结果 ($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	3 d	7 d	21 d
A 组	0.037 5±0.010 84		
B 组	0.071 7±0.016 63	0.097 5±0.021 85	0.240 0±0.341 15
C 组	0.045 8±0.011 58	0.087 5±0.016 36	0.070 0±0.017 67
D 组	0.048 3±0.017 22	0.088 3±0.012 91	0.077 5±0.010 41
F 组	6.236 0**	17.235 0**	1.455 0
q A:B	0.706 6**	1.119 0**	0.991 2
B:C	0.530 0**	0.176 4	0.773 4
B:D	0.440 7*	0.168 2	0.674 6
C:D	0.050 5	0.016 1	0.129 1

注: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

2.3.5 TGF-β1 和 TGF-β1 mRNA 的检测 模型组 TGF-β1 及 TGF-β1 mRNA 表达明显增多, 而且随着时间的延长而愈加明显, 经中药治疗后这种趋势受到抑制, 对照药泼尼松组表现同样的结果, 但与中药组存在差距, 在 21 d 组更加明显, 并有显著性差异, 结果详见表 6、表 7。

表 6 TGF-β1 表达量面积百分比 ($\bar{x} \pm s$) %

组别	3 d	7 d	21 d
A 组	0.281 4±0.056 0		
B 组	2.523 8±0.914 7	3.198 2±1.444 7	7.429 5±2.270 2
C 组	1.071 3±0.302 6	1.199 0±0.285 8	2.719 2±0.714 3
D 组	0.525 0±0.128 8	2.526 3±1.357 7	4.935 0±0.325 3
F 组	38.898**	12.204**	38.863**
q A:B	13.907**	7.777**	14.172**
B:C	9.008**	5.330**	8.986**
B:D	12.396**	1.792	4.515*
C:D	3.380*	3.538*	4.227*

注: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

表 7 TGF-β1 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	21 d
A 组	0.177 2±0.035 06		
B 组	0.948 8±0.483 08	1.506 3±0.461 6	4.408 8±1.304 7
C 组	0.511 0±0.162 13	0.616 7±0.412 4	1.190 6±0.388 0
D 组	0.356 5±0.127 79	0.528 9±0.215 9	2.195 3±0.351 0
F 组	9.419 0**	12.880 0**	35.713 0**
q A:B	3.743 8**	5.689 6**	10.594 9**
B:C	2.032 5**	3.293 6**	7.349 2**
B:D	2.796 5**	3.398 5	4.637 5**
C:D	0.990 5	0.312 3*	3.524 0*

注: * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺纤维化的发病机制目前尚未完全阐明,传统强调抗炎治疗,临床疗效不理想^[8]。最新观点认为肺纤维化发病初就有成纤维细胞灶的形成,伴或不伴有肺泡炎症^[9],各种致纤维化细胞因子,如转化生长因子-β1、肿瘤坏死因子-α等,作用于靶细胞,使胶原合成增加,细胞外基质降解抑制,从而进入纤维化过程,最终导致肺泡与肺间质一体化的肺纤维化^[10],所以更强调早期抗纤维化治疗。

中医学中无肺纤维化的病名,肺纤维化可与“肺痿”、“肺痹”、“喘证”相对应。笔者认为肺纤维化的病机特点是因虚致病、因虚致瘀,本虚标实,虚实夹杂。其中以气虚血瘀为基本病机表现,并贯穿疾病始终,从而制定了益气活血散结的治法,结合病机演变和疾病分期,进行辨证施治。本临床研究结果表明,益气活血散结中药复方可以缓解肺纤维化患者临床症状,改善肺功能,减少药物不良反应,提高患者的生活质量,与单用西药的对照组比较差异有显著性。

TGF-β是迄今发现的最强的细胞外基质沉积促进剂,在减少基质降解酶及增加降解抑制剂合成的同时,还是一个强大的细胞增殖调节剂,促进肺成纤维细胞增殖,在肺纤维化发展中起关键作用^[11]。本课题临床研究发益气活血散结中药可明显降低特发性肺纤维化患者血清中TGF-β1水平,并优于对照组。表明益气活血散结中药具有拮抗细胞损伤因子的作用,通过对肺纤维化关键因子TGF-β1过度表达的抑制,可减少成纤维细胞的分裂和增殖,而减缓肺纤维化的进展。动物实验结果发现:1)模型组早期炎细胞浸润与纤维聚集并存,随着病情进展炎细胞浸润明显减少,而纤维聚集加强。2)干预治疗3d组,泼尼松组较芪术合剂组下降明显,而7d组芪术合剂优于泼尼松组。TGF-β1及TGF-β1mMRA表达治疗组明显减少,与模型组比较有统计学意义,而芪术合剂组较泼尼松组更明显, $P < 0.05$ 。模型组第3、7、21天时,大鼠肺组织的TGF-β1及TGF-β1mMRA的表达水平明显高于正常组,各治疗均低于模型组,表明它可能在肺纤维化整个过程中均发挥作用。泼尼松3d组大鼠肺组织的TGF-β1及TGF-β1mMRA的表达水平明显低于同期芪术合剂组,而21d组则相反,芪术合剂组低于同期泼尼松组。可能原因是中药组急性期抗炎作用较弱、炎症较重,但中药芪术合剂有明显的抑制细胞外基质沉积的作用,总的肺纤维化

面积较模型组和泼尼松组明显减少。泼尼松急性期抗炎作用较强,但整体抗纤维化作用较弱,早期单纯抗炎治疗无法抑制肺纤维化的进展。

综上所述,肺纤维化早期肺泡炎与肺纤维化并存,因此早期抗纤维化治疗很关键。综合相关临床与实验研究,益气活血散结法有一定的防治肺纤维化作用,推测其机制可通过对炎症和免疫反应,损伤、修复和纤维化等多环节、多靶点发挥作用,在对纤维化的关键因子TGF-β1的作用上尤为明显^[12],进一步深入研究将具有重要的理论和现实意义。

参考文献:

- [1] 候显明,于润江. 间质性肺病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:224-225.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会.特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(7):387-389.
- [3] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2002:163-164.
- [4] 中华人民共和国中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京:南京大学出版,1994:151-153.
- [5] 何权瀛. 呼吸疾病诊断治疗指南[S]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:125-126.
- [6] 褚宏伟. 博来霉素A-5诱发大鼠肺间质纤维化的实验病理研究[J]. 临床与实验病理学杂志,1992,8(3):221-223.
- [7] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin induced idiopathic pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir, 1979, 12(4):893-899.
- [8] American Thoracic Society (ATS). Idiopathic Pulmonary Fibrosis:Diagnosis and Treatment [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161:646-664.
- [9] Grijm K, Verberne HJ, Krouwels FH, et al. Semiquantitative 67Ga scintigraphy as an indicator of response to and prognosis after corticosteroid treatment in idiopathic interstitial pneumonia [J]. J Nucl Med, 2005, 46(9):1421-1426.
- [10] Selman M, Thanickal VJ, Pardo A, et al. Idiopathic Pulmonary Fibrosis pathogenesis and therapeutic approaches[J]. Drugs, 2004, 64:405-430.
- [11] Ulrike Bartram, Christian P. The Role Of Transforming Growth Factor β in Lung Development and Disease[J]. Chest, 2004, 125:754-765.
- [12] 孙增涛,廉富,李月川,等. 芪术合剂对肺纤维化鼠转化生长因子-β1的影响[J]. 天津医药,2006,34(4):262-264.

(收稿日期 2008-03-01)