

血瘀证实质和活血化瘀 药物作用机理的研究

□ 刘杰文* 齐淑玲

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所 天津 300020)

摘要 本文从炎症/免疫性炎症、微循环障碍、结缔组织代谢异常及纤维化形成、高粘滞血症等方面研究了血瘀证的实质,指出血管内皮细胞变化是病变的中心环节,认为气血关系与血瘀证关系密切,活血化瘀以及益气活血中药调节机体气血平衡关系,其作用主要通过调节神经-内分泌-免疫功能来实现。本文对通脉灵及其有效单体(IH764-3)、虎桃(HT)冲剂抗纤维化及其作用机理进行了系列的研究。结果表明,通脉灵及IH764-3对大鼠肺动脉高压、炎症、肺纤维化有明显作用,IH764-3对丙二醛(MDA)升高有抑制作用,对中性粒细胞(PMN)质膜功能酶自由基损伤有保护作用,药物通过抗炎等作用间接达到抗纤维化的结果。HT冲剂预防和治疗组肺纤维化的病理变化有明显改善,肺组织中的ICAM-1, VCAM-1, LFA-1, MCP-1, GM-CSF和TNF- α 表达水平明显低于模型组;总胶原, I、III型胶原含量及其mRNA水平均明显降低。结果表明,HT冲剂对肺纤维化有明显的预防和治疗效果。

关键词 血瘀证 活血化瘀 通脉灵 IH764-3 虎桃冲剂

中医学把滞血、蓄血、留血、离经之血、旧血、污秽之血、内溢之血等所造成血液停滞、血脉不通、壅塞或瘀结不散而形成的病证称之为血瘀证。按现代医学概念,各种致病因子所造成的全身或局部组织器官的缺血、缺氧、血淤、血循环障碍、血液流变性及粘滞性异常而导致各组织器官水肿、炎症渗出、血栓

*作者简介 刘杰文,男,研究员。中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会顾问,天津市中西医结合学会基础理论专业委员会副主任委员。主研方向:中西医结合活血化瘀基础理论及结缔组织代谢学。承担国家级科研课题多项。

形成、组织变性、结缔组织增生等一系列病理变化,都概括在血瘀证的病理实质之中。

1 血瘀证实质研究

血瘀证病变涉及血液流变学异常,微循环障碍,炎症/免疫性炎症反应以及结缔组织代谢异常等。

1.1 血瘀证与炎症反应 各种病毒、细菌感染,免疫复合物形成放射、激光等物理损伤,以及化学毒品、农药、高低氧等因素,均可诱导机体的炎症反应。慢性炎症反应是组织器官纤维化的前奏。

辐射或博莱霉素所致的肺纤维化,野百合碱所致肺心病、肺动脉高压,动脉粥样硬化,烧伤性角膜瘢痕等模型都是在炎症性反应的基础上发生、发展的。炎症细胞(如中性粒细胞、单核性吞噬细胞)和血管内皮细胞的激活可产生和释放大量的氧自由基、TNF- α 、TGF- β 、PDGF-B、PAF以及IL-1、6、8等,在炎症病理和纤维化发生、发展中起重要作用。

各种细胞因子刺激脏器中的血管内皮细胞、白细胞、血小板,引起其表面粘附分子表达增强,如VLA-4、LFA-1(CD11a/CD18)、mac-1(CD11b/CD18)等,血管内皮细胞表面的血管细胞粘附分子VCAM-1,细胞间粘附分子ICAM-1/CD54,以及血小板内皮细胞粘附分子PECAM-1/CD31和内皮细胞、白细胞粘附分子ELAM-1,颗粒膜蛋白GMP-140等粘附配体表达增强。^[1,2]

细胞因子(如TNF- α 等)作用于内皮细胞引起内皮素(ET-1)的合成与分泌。ET-1是一种很强的缩血管生物活性肽,可引起小血管和毛细血管收缩与闭塞,肺动脉高压与高血压患者均可见肺血管内皮细胞中ET-1mRNA表达水平增高,ET-1不但作用于血管引起缩血管反应,同时还可刺激胶原形成细胞(成纤维细胞,平滑肌细胞等)增殖,引起胶原等细胞外基质的沉积和增加。此外,TNF- α 等细胞因子还可刺激内皮细胞分泌单核细胞炎症蛋白(MIP-1)、单核细胞趋化蛋白(MCP-1),引起炎症反应进一步发生、发展,最终造成组织脏器纤维化形成。

1.2 血瘀证与微循环障碍 炎症与微循环障碍是相伴相随的。各种致病因子均可引起血管活性因子ET-1、NO、t-PA、Pai-1、PGI₂、TXA₂、Ang II等的变化,这些活性因子造成微循环形态和结构的异常变化。放射、博莱霉素、野百合碱、高低氧等所诱致的肺纤维化超微结构变化,可见肺毛细血管内皮细胞早期内陷,周围有大量水肿液,晚期则可见毛细血管管腔狭窄或完全闭塞,毛细血管内还可见血小板聚集或血栓形成、RBC淤滞、白细胞阻塞现象等,这些微循环异常与器官组织炎症性反应是一致的。

1.3 血瘀证与结缔组织代谢异常 纤维化形成是炎症反应的结果。血管内皮细胞和炎症细胞的炎症介质的刺激,TNF- α 、IL-1、PDGF-B、TGF- β 等均可引起

病灶内结缔组织细胞增殖,I、III、IV型胶原mRNA及其蛋白表达水平增高,同时Fn、TSP、Lm等基质的合成与分泌功能也明显增高,造成结缔组织代谢的异常变化。^[4,5]

1.4 血瘀证与高粘滞血症 各种诱因可诱致高粘滞血症,造成血液流变学的变化。寒冷、放射、激光等诱致的高粘滞血症不同程度地表现为血沉和红细胞压积增高,红细胞变形能力降低,纤维蛋白原含量增高,血小板粘附性和聚集性、血栓形成能力增高等。高粘滞血症是许多疾病发生、发展过程中的一个重要环节,影响机体血液的正常灌注,是重要的病理生理改变,是机体血瘀的表现。各种内外因均可造成血行不畅,壅滞脉中或血溢脉外而致瘀,并可诱致高粘滞血症。

1.5 血管内皮细胞变化是病变的中心环节 炎症反应、微循环障碍、高粘滞血症以及结缔组织代谢异常变化等,目前已证明这些病变的中心环节在于血管内皮细胞的变化。各种诱因如TNF- α 、Ang II、mmLDL以及切应力的作用均可引起血管内皮细胞激活,从而引起机体微环境中血管内皮细胞的腔面内与血管周围的变化。

血管内皮细胞分泌各种血管活性物质,如血管舒缩性物质NO和ET-1等,它们决定血管的形态与结构的变化;血管腔内纤溶酶原激活物,TM(血栓调节素)、TF(组织因子)、PGI₂(前列环素)、Pai-1等变化,它们的平衡失调影响血液流变学,造成高粘滞血症。^[6]

1.6 血瘀证与气血关系及活血化瘀治则 研究气与血的关系在血瘀证的研究中是极其重要的。活血化瘀以及益气活血中药调节机体气血平衡关系,其调整作用主要通过调节神经-内分泌-免疫功能来实现。

临床疗效与实验研究均可证明,活血化瘀药物可改变血液流变的特性;改善血循环,特别是微循环;减轻炎症/免疫反应以及改善结缔组织代谢异常变化,其主要作用在于保护血管内皮细胞。从各种致病因素的共同病理生理基础中分析,氧自由基损伤可能是始动点。捕捉氧自由基,保护血管内皮细胞可能是活血化瘀药物作用原理的最主要部份。

2 活血化瘀药物作用机理研究

近三十年来,通过多种实验模型,如大鼠琼脂性肉芽肿、家兔角膜瘢痕、博莱霉素(BLM-A₆)和放射所诱致的鼠肺纤维化,缺氧和野百合碱所致大鼠肺动脉高压以及脑缺血再灌注损伤等^[19],通过这些结合点,我们应用现代科学技术,组织超微病理、细胞生物学,生化,免疫组化,免疫电镜和分子生物学等方法,对这些模型动物的血瘀证实质进行了探讨,同时研究了通脉灵及其有效单体 IH764-3 抗纤维化作用和作用机理。大量的实验研究证明这些模型可反映血瘀证的实质,其共同的病理生理基础可概括为微循环障碍,炎症(免疫)反应以及结缔组织增生,而活血化瘀药物的疗效机制主要是改善微循环、抗炎、免疫调节和抑制结缔组织增生。我们的研究资料还证明活血化瘀有效单体 IH764-3 可猝灭各种自由基的过量生成。清除氧自由基可能是抗炎,改善微循环障碍,预防纤维化形成的重要环节。

我们在研究通脉灵及其有效单体 IH764-3 对博莱霉素(BLM)和放射性肺纤维化的防治作用上取得了较好的结果^[7,8,20],证明单体成分与通脉灵水提液具有相同的药理作用。应用电子自旋顺磁共振波谱证明 IH764-3 有直接捕捉超氧自由基和羟基自由基的作用,对体内、外各种体系所产生丙二醛(MDA)升高有抑制作用,以及保护自由基对 PMN 质膜功能酶的损伤作用。因此,这种作用在抗炎和改善循环障碍中可能是重要的环节。在抗炎作用及其机制的研究中,我们建立了鹿角芽诱致的胸膜炎和 BLM 诱致的肺炎模型,并研究了药物对两种炎症模型和两种炎症细胞(吞噬细胞和中性粒细胞)的功能影响;从药物对模型动物的胸水量、总细胞数、白细胞数、蛋白含量、β-葡萄糖醛酸酶(β-g)含量和组织胺含量以及吞噬细胞趋化因子,活性氧释放,conA 受体,Fn 和 FGF 活性和 FMLP, Zymosan, C5ai, X/XO 激活 PMN 的化学发光等均有明显的抑制作用,两个炎症模型及炎症细胞所分泌的炎症介质变化可见药物有明显的抗炎作用;这些模型的炎症反应均可进一步发展为纤维化,对大鼠肺动脉高压,肺炎,肺纤维化有明显作用。因此,药物可通过抗炎而间接达到抗纤维化的结果。BLM 和放

射性肺纤维化和低氧或野百合碱诱致的肺动脉高压以及大脑缺血再灌注模型中可见 IH764-3 有明显改善微循环的作用,其机制可能与拮抗氧自由基对血管内皮细胞损伤作用有关。活血化瘀药物保护血管内皮细胞,对抗炎,血液流变性以及实质细胞的结构与功能的完整性可能起重要的作用,药物对培养成纤维细胞的增殖和功能有明显的影[9],从成纤维细胞的生长曲线,³H-TdR 参入,胞内钙调素水平,细胞周期,³H-脯氨酸参入,脯氨酰羟化,Fn 和 TSP 含量以及超微结构变化可见明显效果。通过这些理论结合点的研究,我们不但证明活血化瘀药物对纤维化形成有明显的防治作用,而且也证明药物抗纤维化的作用可能是通过捕捉氧自由基,清除活性氧,改善微循环障碍,抗炎以及直接抑制结缔组织细胞增生和亢进的胶原合成功能。

2.1 通脉灵及其有效单体 (IH764-3) 抗纤维化作用机理研究 研究表明,通脉灵及其有效单体 (IH764-3) 对大鼠肺动脉高压、肺炎、肺纤维化有明显作用;IH764-3 对体内、外各种体系所产生丙二醛(MDA)升高有抑制作用,有保护自由基对中性粒细胞(PMN)质膜功能酶的损伤作用^[10](见表1~4,图1~5)。

表1 IH764-3 对 MDA 生成的抑制作用 (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$)

	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	n	MDA	
			XO/X	XO/X + ADP + Fe ⁺⁺
IH764-3	0	3	27.47 ± 0.37	48.59 ± 0.81
IH764-3	0.156	3	25.44 ± 0.10	49.52 ± 1.01
IH764-3	1.250	3	18.13 ± 0.92	42.59 ± 0.86
IH764-3	2.500	3	14.43 ± 0.33	39.23 ± 1.31
IH764-3	5.000	3	12.48 ± 0.89	29.50 ± 1.21
IH764-3	10.000	3	10.27 ± 0.12	27.84 ± 0.75
IH764-3	20.000	3	10.84 ± 0.55	26.51 ± 0.24

表2 IH764-3 对博莱霉素致 MDA 增加的抑制作用 (nmol/ml, $\bar{x} \pm s$)

	n	MDA
CONTROL	5	4.02 ± 0.18
BLM-A ₆	7	7.32 ± 0.25 *
IH764-3	7	5.35 ± 0.21 **

注:与 CONTROL 组比较, * $P < 0.01$; 与博莱霉素组比较, ** $P < 0.01$ 。

表3 IH764-3对5'-核苷酸酶活性的作用(%)

	n	5'-NT ACTIVITY
CONTROL	3	100
PMA	3	63
IH764-3(25μg/ml)	3	98
PMA + IH764-3(25μg/ml)	3	86
IH764-3(50μg/ml)	3	95
PMA + IH764-3(50μg/ml)	3	93

表4 IH764-3和其它几种保护剂对中性粒细胞质膜功能酶自由基损伤的保护作用的比较(%)

	n	ACP	ALP
CONTROL	3	100	100
PMA	3	38	36
PMA + SOD	3	71	62
PMA + V. C.	3	77	49
PMA + NaN ₃	3	49	62
PMA + SOD + NaN ₃	3	53	77
PMA + IH764-3	3	90	80

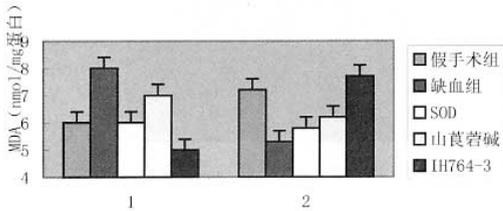


图1 IH764-3抗氧化作用及对脑缺血大鼠的保护作用

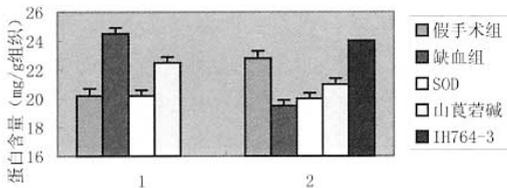


图2 IH764-3对脑缺血大鼠的保护作用

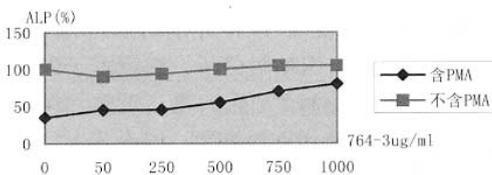


图3 IH764-3对中性粒细胞质膜功能酶自由基损伤的保护作用(ALP活性)

ACP(%)

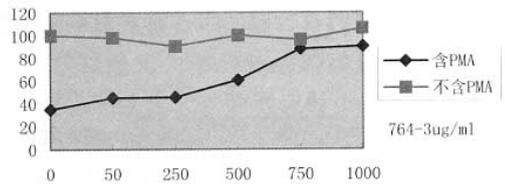


图4 IH764-3对中性粒细胞质膜功能酶自由基损伤的保护作用(ACP活性)

n mol MDA/gHb

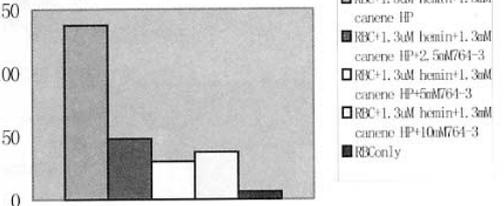


图5 IH764-3对红细胞MDA抗氧化作用
Du 65 spectrophotometer(532nm)

两个炎症模型及两个炎症细胞所分泌的炎症介质变化可见药物有明显的抗炎作用；这些模型的炎症反应均可进一步发展为纤维化。因此，药物可通过抗炎而间接达到抗纤维化的结果。结果见表5~6，图6~7。^[16-18]

表5 IH764-3对鹿角菜所致的大鼠脑膜炎的保护作用($\bar{x} \pm s$)

	n	SEEPAGE(ml)	PMN IN SEEPAGE ($\times 10^7$ /ml)
CONTROL	9	4.10 \pm 0.36	3.71 \pm 0.35
IH764-3	9	1.58 \pm 0.73 *	1.66 \pm 0.71 **

注：与CONTROL组比较，* $P < 0.01$ ，** $P < 0.02$ 。

表6 IH764-3对博莱霉素诱导的肺炎的保护作用($\bar{x} \pm s$)

	CONTROL(n=6)	IH764-3(n=6)	P
LUNG COE.	1.04 \pm 0.05	0.80 \pm 0.13	
TC IN BALF ($\times 10^4$ /ml)	619.00 \pm 225.00	103.00 \pm 54.00	<0.05
PMN ($\times 10^4$ /ml)	353.00 \pm 107.00	48.00 \pm 27.00	<0.05
β -G (μ g/ml)	40.98 \pm 4.59	21.60 \pm 6.00	<0.05
HT IN BALF (μ g/ml)	112.95 \pm 22.20	4.50 \pm 1.44	<0.01
HT IN LUNG (μ g/ml)	11.32 \pm 1.55	1.45 \pm 0.37	<0.01

注：LUNG COE.：Lung Coefficient，PMN：Neutrophil， β -G： β -Glucuronidase HT：Histamine，TC IN BALF：Total Cells in Bronchial Alveolar Lavage Fluid（肺泡灌流液的总细胞数）

通脉灵及其有效单体(764-3)对放射性和BLM肺纤维化和低氧或野百合碱诱致的肺动脉高压有明显作用。见图8~9。^[11,15]

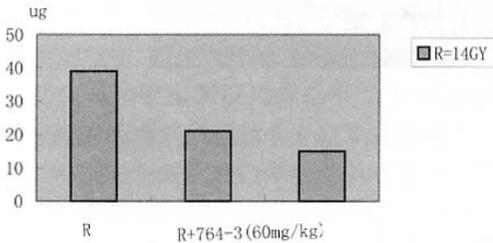


图6 IH764-3对小鼠肺表面活性物质含量的影响

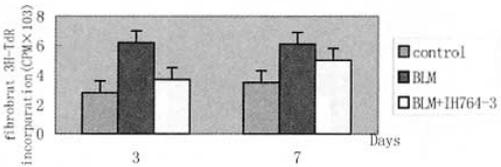


图7 IH764-3对博莱霉素灌注大鼠的肺泡灌流液中FGF活性的影响

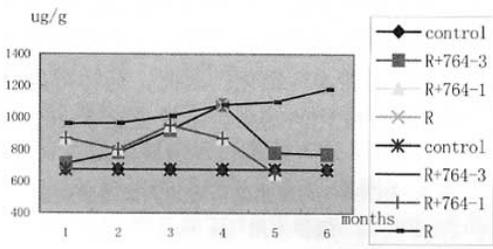


图8 IH764-3对放射诱致6个月后小鼠肺羟脯氨酸含量的影响

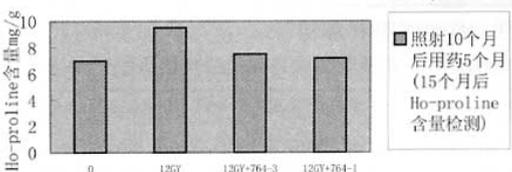


图9 IH764-1, IH764-3对X线照射诱致小鼠肺纤维化的影响(Ho-proline含量)

活血化癥药物对纤维化形成有明显的防治作用,其抗纤维化作用可能是通过捕捉氧自由基,清除活性氧,改善微循环障碍,抗炎以及直接抑制结缔组织细胞增生和亢进的胶原合成功能。结果见图10~13。

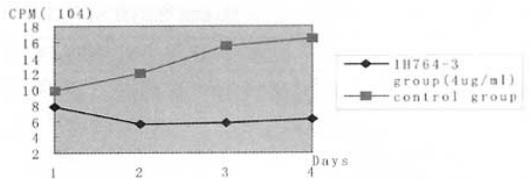


图10 IH764-3对成纤维细胞生长的影响(3H-TaR掺入法)

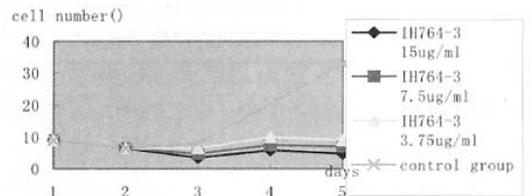


图11 IH764-3对成纤维细胞生长的影响(细胞计数法)

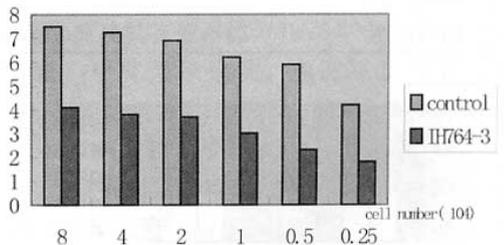


图12 IH764-3对培养成纤维细胞钙调素水平的影响

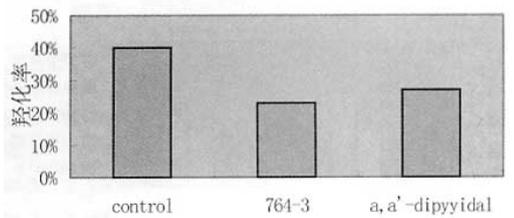


图13 IH764-3对纤维细胞脯氨酸羟化率的影响

2.2 虎桃冲剂抗肺纤维化及其作用机理的研究 我们进一步研究了虎桃(HT)冲剂对肺纤维化发生、发展过程中大鼠肺组织粘附分子,细胞因子以及胶原代谢的影响。虎桃冲剂主要由丹参、黄芪、桃仁和虎耳草等六味中药组成,具有益气、活血化癥功能。本实验以牛血清白蛋白皮下多点注射和四氯化碳腹腔内注射Wistar大鼠,建立免疫复合物损伤性肺纤维化模型。应用免疫组化、透射电镜、酶联免疫吸附实验、

羟脯氨酸含量测定及 mRNA-DNA 斑点杂交, 观察该药对大鼠肺纤维化发生发展过程中, 对肺组织上皮细胞, 血管毛细血管内皮细胞的粘附分子 (LFA-1、ICAM-1、VCAM-1), 细胞因子 TNF- α , GM-CSF, PDGF, ET-1, 总胶原, I、III 型胶原及其 mRNA 以及胶原酶 mRNA 表达水平的影响。表 7~17 及透射电镜观察结果显示: (1) 病理模型组, II 型上皮细胞明显增多, 且处于活化状态, 胞浆内含有大量的板层小体, 并释放到肺泡腔内; 大部分肺泡膈增宽, 吞噬细胞、中性粒细胞、浆细胞、淋巴细胞、肥大细胞等炎症细胞渗出增加; 肺泡毛细血管腔收缩狭窄。(2) 在肺纤维化早期, 肺组织的粘附分子 (ICAM-1, VCAM-1) 和细胞因子 (TNF- α) 均明显升高, 肺泡膈内和毛细血管周围胶原沉积逐渐增加。(3) 肺组织中总胶原和 I、III 型胶原含量及其 mRNA 表达水平明显升高。(4) HT 治疗组上述的病理变化均有明显改善, 病理和超微结构观察证明: I 型肺泡上皮细胞, 肺泡毛细血管形态趋于正常, 毛细血管内皮细胞 ICAM-1, VCAM-1 和 TNF- α 表达水平明显低于模型组, 肺组织的总胶原, I、III 型胶原含量及其 mRNA 水平均明显降低, 治疗 36 天时, 其抑制率约为 50%, pro α 1 (I)、pro α 1 (III) mRNA 均降低 42.7% 和 59.7%, 而胶原酶基因的 mRNA 水平在 26 天和 36 天后则有增加的倾向, 45 天后明显升高 ($P < 0.01$)。用 MTT 法检测 HT 冲剂的载药血清对培养的成纤维细胞增殖也有非常明显的抑制作用。^[12-14]

2.2.1 HT 冲剂对大鼠免疫复合物性肺纤维化模型肺系数的影响 (见表 7)

表 7 HT 冲剂对大鼠肺组织肺系数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

	n	肺系数 ($\times 10^{-3}$)
正常组	10	5.53 \pm 0.4
模型组	12	6.71 \pm 1.5 Δ
HT 组	9	5.43 \pm 0.7 *
HT + 763 - 3 组	8	5.09 \pm 0.5 *

注: 与正常组比, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比, * $P < 0.01$ 。

2.2.2 形态观察 网织纤维染色显示, 预防组和治疗组肺组织炎性和网织纤维增生较轻于模型组。

透射电镜观察显示, 模型组见肺组织中小血管内皮细胞 (Ec) 收缩, 并与基底膜分离, 毛细血管闭塞

或管腔狭窄, 肺泡壁中细胞周围有大量束状胶原纤维 (Col) 积聚 (见图 14)。

HT 预防组见大部分肺组织接近正常肺泡结构, 毛细血管无明显变化, 肺泡成纤维细胞增殖不活跃, 肺泡腔基本正常 (见图 15)。

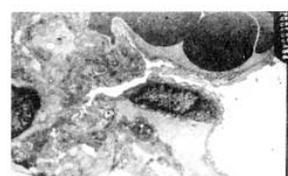
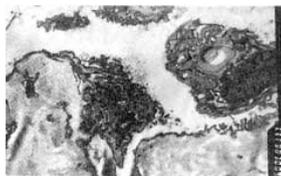


图 14 Wistar 大鼠肺组织纤维化 (电镜, $\times 6000$) 图 15 HT 预防组大鼠肺组织病理切片图 (电镜, $\times 6000$)

2.2.3 大鼠肺组织羟脯氨酸含量测定结果 (见表 8~10)

表 8 预防组大鼠不同时间羟脯氨酸含量变化比较 ($\mu\text{g}/\text{mg}$, $\bar{x} \pm s$)

	n	16 日	23 日	36 日
正常对照组	5	22.135 \pm 0.707	21.100 \pm 0.530	18.608 \pm 0.805
肺纤维化模型组	5	29.023 \pm 1.002 Δ	8.253 \pm 0.945 Δ	31.412 \pm 3.042 Δ
HT 治疗组	5	24.281 \pm 0.905 *	26.905 \pm 0.354 *	27.469 \pm 0.373 *

注: 与正常组比较 $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较 * $P < 0.01$ 。

表 9 预防组用药 30 天后大鼠肺组织羟脯氨酸含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

	n	羟脯氨酸含量 (mg/g 干组织)	抑制率 (%)
正常对照组	10	0.768 \pm 0.027	
肺纤维化模型组	10	1.583 \pm 0.063 Δ	
HT 治疗组	10	0.792 \pm 0.044 *	50.0

注: #与正常组相比, $\Delta P < 0.01$; 与模型组相比, * $P < 0.01$ 。

表 10 治疗组用药 45 天后大鼠肺组织羟脯氨酸含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

	n	羟脯氨酸含量 (mg/g 干组织)	抑制率 (%)
正常对照组	8	1.395 \pm 0.455	
肺纤维化模型组	7	3.503 \pm 0.652 Δ	
HT 组	7	1.554 \pm 0.445 *	56
HT + 764 - 3 组	8	1.292 \pm 0.372 **	66

注: 与正常组相比, $\Delta P < 0.05$; 与模型组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2.4 大鼠不同时间 I、III型胶原 ELISA 测定结果比较 (见表 11~12)

表 11 三组大鼠不同时间 I、III型胶原 ELISA 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

	天数	n	I型胶原	III型胶原
正常对	16	5	0.715 ± 0.016	1.173 ± 0.057
照组	23	5	0.554 ± 0.051	1.415 ± 0.071
	36	5	0.574 ± 0.023	1.511 ± 0.062
造模组	16	5	0.989 ± 0.005 Δ	1.636 ± 0.120 Δ
	23	5	0.822 ± 0.061 Δ	2.210 ± 0.266 Δ
	36	5	1.629 ± 0.052 Δ	2.581 ± 0.211 Δ
HT组	16	5	0.611 ± 0.037 *	1.378 ± 0.111 *
	23	5	0.789 ± 0.005 *	1.842 ± 0.015 *
	36	5	0.807 ± 0.026 *	1.923 ± 0.031 *

注:与正常组比较, Δ P < 0.01; 与造模组比较, * P < 0.01。

表 12 四组大鼠 45 天后 I、III型胶原 ELISA 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

	天数	n	I型胶原	III型胶原
正常对照组	45	5	1644 ± 134	926 ± 282
造模组	45	12	2283 ± 124 Δ	2705 ± 557 Δ
HT组	45	8	1782 ± 166 *	1503 ± 952 *
HT + 764 - 3 组	45	8	1444 ± 266 **	1343 ± 708 **

注:与正常组比较, Δ P < 0.01; 与造模组比较, * P < 0.01, ** P < 0.001。

2.2.5 大鼠肺组织 mRNA 斑点杂交结果比较 (表 13~14)

2.2.6 HT 治疗后大鼠肺组织胶原酶基因表达 (见表 15)

表 15 HT 治疗后大鼠肺组织胶原酶基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

	n	胶原酶基因表达值
模型组	3	569 ± 42
正常组	3	493 ± 168
HT组	3	1130 ± 103 *
HT + 764 - 3 组	3	866 ± 28 Δ

注:与正常组相比, Δ P < 0.05, * P < 0.01。

2.2.7 大鼠肺组织 ICAM-1, VCAM-1, TNF-α ELISA 测定 (结果见表 16)

2.2.8 大鼠肺组织 TNF-α, GM-CSF, LFA-1, MCP-1 的 ELISA 测定 (结果见表 17)

2.2.9 讨论与结论 HT 冲剂预防和治疗组肺纤维化的病理变化有明显改善, 肺组织中的 ICAM-1,

VCAM-1, LFA-1, MCP-1, GM-CSF 和 TNF-α 表达水平明显低于模型组; 总胶原, I、III型胶原含量及其 mRNA 水平均明显降低。

HT 冲剂在早、中期可以保护血管内皮细胞和肺泡上皮细胞, 抑制粘附分子和细胞因子过度表达, 从而抑制炎症细胞在肺组织中积聚。HT 冲剂对肺组织的胶原合成具有明显的抑制作用, 可下调 proα1 (I)、proα1 (III) mRNA 表达水平, 对胶原酶有上调作用, 可能对胶原的分解代谢有促进作用。我们的实验结果证明 HT 冲剂对肺纤维化具有明显的预防和治疗效果。

参考文献

[1] Barquin N, Chou P, Ramos C. Increased expression of intercellular adhesion molecule-1, CD11/CD18 cell surface adhesion glycoproteins and alpha4 betel integrin in a rat model of chronic interstitial lung fibrosis. *Pathobiology*, 1996, 64 (4): 187 - 192.

[2] Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NC, et al. Vascular cell adhesion molecule-mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated Cultured human endothelial cells. *Blood*, 1990, 76: 965 - 970.

[3] Nakao A, Hasegawa Y. Expression of cell adhesion molecules in the lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*, 1995, 108 (11): 233 - 239.

[4] Ortiz La, Lasky J, Hamilton RF, et al. Expression of TNF and necessity of TNF-receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Exp Lung Res*, 1998, 24 (6): 721 - 743.

[5] Dubaybo, BA. Role of Tumor necrosis factor-in regulating fibrotic lung replair Res. *Commun. Mol. Pathol. Pharmacol*, 1998, 10 (1): 69.

[6] Park SH1. Increased endothelin-1 in Bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelial receptor antagonist. *Am J respir cri care ed*, 1997, 156 (2): 600.

[7] Liu Jie-wen, Hua GuoXun, Wang He-bi, et al. Experimental study of the effect of IH764-3 on pulmonary fibrosis. *Chin Med Sci J March*, 1993, 8 (1): 9 - 14.

[8] 刘杰文, 华国勋, 王荷碧, 等. 活血化痰药物通脉灵及其有效单体 IH764-3 抗纤维化作用的实验研究. *中国医学科学院学报*, 1992, 14 (4): 250 - 256.

[9] 刘杰文, 华国勋, 刘为民, 等. 通脉灵有效单体 IH764-3 对成纤维细胞增殖和功能的影响. *中国医学科学院学报*, 1993, 8 (1): 9 - 14.

[10] 贾莉, 法祥光, 刘杰文, 等. IH764-3 对中性粒细胞膜结合酶氧自由基损伤的保护作用. *中华血液学杂志*, 1994, 15 (5): 242.

[11] 刘杰文, 崔衍贞, 刘为民, 等. 活血化痰药物单体 IH764-3 对实验性肺动脉高压影响的研究. *亚洲医药杂志*, 1997, 12: 1.

表 13 预防组不同时间大鼠肺组织 mRNA 斑点杂交结果 ($\bar{x} \pm s$)

天数	n	mRNA 斑点杂交灰度扫描积分($\times 10^4$)			
		I 型胶原	III 型胶原	胶原酶	
正常组	14	10	2.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	2.8 ± 0.2
	26	10	3.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.9 ± 0.3
	36	10	3.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.5 ± 0.1
模型组	14	8	5.1 ± 0.2 *	4.8 ± 0.1 *	3.8 ± 0.1 *
	26	9	7.6 ± 0.2 *	5.2 ± 0.1 *	3.7 ± 0.1 *
	36	10	8.4 ± 0.3 *	3.5 ± 0.2 *	2.8 ± 0.3 *
预防组	14	9	3.8 ± 0.1 **	2.0 ± 0.1 **	3.4 ± 0.1
	26	10	3.5 ± 0.1 **	1.6 ± 0.1 **	4.1 ± 0.2
	36	10	4.3 ± 0.2 **	1.6 ± 0.2 **	4.4 ± 0.3 *

注:与正常组同期间比较,* $P < 0.01$;与模型组同期间比较,** $P < 0.01$ 。

表 14 四组大鼠肺组织 mRNA 斑点杂交结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

天数	n	mRNA 斑点杂交灰度扫描积分($\times 10^4$)			
		I 型胶原	III 型胶原	胶原酶	
正常组	45	3	1644 ± 134	2299 ± 1704	493 ± 168
模型组	45	3	2283 ± 124 Δ	3341 ± 1757 Δ	569 ± 420
HT 组	45	3	1782 ± 166 *	1443 ± 579 *	1130 ± 103 *
HT + 764 - 3 组	45	3	1444 ± 266 **	2089 ± 285 **	866 ± 280

注:与正常组比较, $\Delta P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 16 不同时间三组大鼠肺组织 ICAM-1, VCAM-1, TNF- α ELISA 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

天数	n	ICAM-1	VCAM-1	TNF- α	
正常组	16	5	0.498 ± 0.052	0.398 ± 0.052	0.359 ± 0.019
	23	5	0.560 ± 0.025	0.370 ± 0.023	0.327 ± 0.012
	36	5	0.568 ± 0.230	0.375 ± 0.008	0.333 ± 0.014
造模组	16	5	0.804 ± 0.067 *	0.521 ± 0.039 *	0.447 ± 0.040 *
	23	5	0.775 ± 0.057 *	0.414 ± 0.050 *	0.413 ± 0.054 *
	36	5	0.591 ± 0.087	0.389 ± 0.030	0.396 ± 0.010 *
HT 预防组	16	5	0.440 ± 0.047 Δ	0.434 ± 0.014 Δ	0.373 ± 0.035 Δ
	23	5	0.656 ± 0.016 *	0.432 ± 0.023	0.417 ± 0.026
	36	5	0.610 ± 0.041	0.363 ± 0.010	0.426 ± 0.066

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与造模组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

表 17 三组大鼠肺组织 TNF- α , GM-CSF, LFA-1, MCP-1 的 ELISA 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

n	TNF- α	GM-CSF	LFA-1	MCP-1	
正常组	5	349.2 ± 36.6	0.777 ± 0.21	575.8 ± 112	1.065 ± 0.32
模型组	5	732.1 ± 14.5 #	2.096 ± 0.67 #	1755.4 ± 160 #	3.416 ± 0.46 #
HT 组	5	596.6 ± 10.8 *	1.098 ± 0.42 *	1690.9 ± 248 *	1.065 ± 0.23 *
HT + 764 - 3 组	5	343.4 ± 24.1 *	1.169 ± 0.29 *	628.3 ± 54.2 *	1.187 ± 0.26 *

注:与正常组比较,# $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

[12] 刘杰文, 华国勋, 王荷碧, 等. 活化解药对结缔组织代谢影响的研究. 亚洲医药·海峡医药化学学报, 1999, 3; 2 (1): 30.

[13] 刘杰文. 血瘀证与炎症、结缔组织代谢. 见: 陈可骥, 史载祥主编. 实用血瘀证学. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 58 - 69.

[14] 刘杰文, 茹永新, 李卓, 等. 中药复方虎桃冲剂抗纤维化作用及作用机制的研究. 见: 顾瑜琪主编. 中国现代医学与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2000: 271 - 281.

[15] Sun Renyu, Yan Yizhao, Chen Xiangyin, et al. Role of collagen metabolism changes in the pathogenesis of pulmonary hypertension in rats and its reversibility. Chin Med Sci J, 1994, 9 (3): 183 - 186.

[16] 西吕香, 陈祥银, 李严城, 等. 丹参提取物对氧自由基引起的化学发光的抑制作用. 基础医学与临床, 1994, 14 (6): 55 - 57.

[17] 陈祥银, 刘其光, 西吕香, 等. 764-3 对实验性炎症的保护作用. 中国医学科学院学报, 1992; 14 (2): 95 - 100.

[18] 刘其光, 严仪昭, 西吕香, 等. 764-3 对炎症时肺组织胶原含量及成纤维细胞生长的影响. 中国医学科学院学报, 1992, 14 (1): 70 - 74.

[19] 张严龙, 严微瑾. 山莨菪碱与 764-3 的抗氧化力及对脑缺血大鼠的保护作用. 中华神经外科杂志, 1990, 6 (增刊): 30 - 33.

[20] 杨伟志, 沈瑜, 马育红, 等. 764-3 对小鼠晚期放射性肺损伤的作用. 中华放射肿瘤学杂志, 1992, 1 (1): 41 - 42.