

## 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型制备及参七虫草胶囊对肺组织超微结构的影响

张念志<sup>1</sup>, 周宝银<sup>2</sup>, 张一萌<sup>2</sup>, 李泽庚<sup>1</sup>, 季红燕<sup>1</sup>, 李国琳<sup>1</sup>, 陈 炜<sup>1</sup>, 王 胜<sup>1</sup>, 朱慧志<sup>1</sup>, 任 薇<sup>1</sup>, 彭 波<sup>1</sup>

(1. 安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230038)

**【摘要】** 目的: 观察参七虫草胶囊对慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型大鼠肺组织超微结构的影响。方法: 清洁级 Wistar 大鼠 50 只被随机分为正常对照组、COPD 模型组、参七虫草胶囊高剂量组、参七虫草胶囊低剂量组和金水宝胶囊组, 每组 10 只。采用香烟雾熏加脂多糖(LPS)气管滴入方法复制大鼠 COPD 模型。利用光镜和透射电镜方法并结合图像分析技术观察各组大鼠肺组织病理形态学变化, 气管壁及腺体层厚度, 计算线粒体病变率。结果: COPD 模型组大鼠肺组织形态出现明显异常改变, 线粒体肿胀肥大、空泡变、嵴突病变的发生率明显增高。与 COPD 模型组相比, 参七虫草胶囊高、低剂量组肺组织病理损伤明显减轻; 气管壁及腺体层厚度均明显变薄( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ); 线粒体肿胀肥大、空泡变、嵴突病变发生率均显著降低( $P$  均  $< 0.05$ )。金水宝胶囊组肺组织病理损伤较模型组亦有所减轻, 但作用不如参七虫草胶囊组显著; 线粒体病变发生率与 COPD 模型组相当。结论: 参七虫草胶囊可以延缓和改善 COPD 模型形成。

**【关键词】** 肺疾病, 阻塞性, 慢性; 参七虫草胶囊; 超微结构; 动物模型

中图分类号: R256.14; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)06-0323-04

**Effect of Shenqichongcao capsule (参七虫草胶囊) on the ultrastructure of pulmonary tissue in rats with chronic obstructive pulmonary disease** ZHANG Nian-zhi<sup>1</sup>, ZHOU Bao-yin<sup>2</sup>, ZHANG Yi-meng<sup>2</sup>, LI Ze-geng<sup>1</sup>, JI Hong-yan<sup>1</sup>, LI Guo-lin<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>, WANG Sheng<sup>1</sup>, ZHU Hui-zhi<sup>1</sup>, REN Wei<sup>1</sup>, PENG Bo<sup>1</sup>. 1. Department of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, Anhui, China; 2. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui, China

**【Abstract】 Objective:** To observe the effect of Shenqichongcao capsule (参七虫草胶囊) on the histopathology and ultrastructure of pulmonary tissue in rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods:** Fifty Wistar rats were randomly divided into normal control group, COPD model group, Shenqichongcao capsule high dosage group, Shenqichongcao capsule low dosage group and Jinshuibao capsule (金水宝胶囊) group. Each group had 10 rats. The model of COPD was developed by intra-tracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) twice and exposure to cigarette smoke daily. Optical and transmission electron microscopic methods and image analysis were used to observe pulmonary tissue pathomorphological changes, thickness of tracheal wall and glandular layer and the rate of pathological changes of chondriosome in the rats in the above five groups. **Results:** There were obviously abnormal morphological changes in the COPD model group, and the rates of chondriosome enlargement, hypertrophy, vacuole formation and ridge lesion in the pulmonary tissue of the rats in the COPD model group were significantly higher. Compared with the COPD model group, the pulmonary tissue pathological injuries were obviously relieved, the thickness of the tracheal wall and glandular layer was obviously thinner ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ) and the chondriosome rates of enlargement, hypertrophy, vacuole formation and ridge lesion were conspicuously lowered in the Shenqichongcao high and low dosage groups (all  $P < 0.05$ ). Although the pulmonary tissue pathological injuries were also relieved and the rates of pathological changes of chondriosome were comparative in Jinshuibao capsule group as compared with those in the COPD model group, the efficacy of Jinshuibao capsule was not as good as that of Shenqichongcao capsule. **Conclusion:** Shenqichongcao capsule can delay and improve the formation of COPD model.

**【Key words】** chronic obstructive pulmonary disease; Shenqichongcao capsule; ultrastructure; animal model

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30472216); 安徽省自然科学基金资助项目(03043005)

作者简介: 张念志(1968-), 男(汉族), 安徽砀山人, 医学博士, 硕士研究生导师, 副教授, 副主任医师(Email: zhang008@mail.hf.ah.cn)。

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种以气流受限为特征的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展,与肺部对有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关<sup>[1]</sup>。参七虫草胶囊按中医“虚瘀”理论组方,在临床应用中获得较好的疗效<sup>[2]</sup>,为进一步探讨其治疗作用的机制,本实验观察了参七虫草胶囊对香烟雾熏加脂多糖(LPS)气管滴入所致 COPD 模型大鼠肺组织病理学和超微结构的影响。

## 1 材料与方方法

**1.1 动物选择与分组:**选用清洁级健康 Wistar 雄性大鼠 50 只,体重(200±20)g,由郑州大学实验动物管理中心提供。按随机数字表法分为正常对照组、COPD 模型组、参七虫草胶囊高、低剂量组和金水宝胶囊组,每组 10 只。各组动物均在 20℃环境中饲养,自由饮水、摄食。

**1.2 主要药物、试剂及设备:**参七虫草胶囊由安徽中医学院第一附属医院制剂中心提供(由西洋参、参三七、冬虫夏草等药物组成,采用水提醇沉法制成胶囊,批号:20050520),其浓缩煎剂含生药量为 2.5 kg/L。金水宝胶囊由江西金水宝制药有限公司生产(批号:050313)。实验时均用蒸馏水配制成所需浓度的混悬液。LPS 购自美国 Sigma 公司。Ts-12G 生物组织自动脱水机,JEOL-1230 型透射电镜,LEICA-RM2025 切片机,QP-B1 切片漂烘温控仪,IKB-IV 型切片机,Metamorph 图像分析软件(美国 Universal Imagin Corporation)。

**1.3 模型制备及给药方法:**各组动物均正常喂食 4 周,参七虫草胶囊(高剂量、低剂量分别为 0.5 和 0.25 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,相当于成人用量的 10 和 5 倍)及金水宝胶囊(0.5 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,相当于成人用量的 10 倍)在正常喂食的同时将药物灌胃。4 周后除正常对照组以外的各组均按照宋一平等<sup>[3]</sup>介绍的方法复制 COPD 模型,即制模开始后 1 d 和 14 d 向气管内滴入 LPS 各 1 g/L,2~13 d 和 15~60 d 每日在 80 cm×50 cm×40 cm 密闭箱内香烟雾熏 0.5 h(烤烟型,焦油量 14 mg,烟气烟碱量 1.1 mg),每次 10 支。用肺功能测定结果[0.3 秒用力呼气容积(FEV<sub>0.3</sub>)、用力肺活量(FVC)]和病理形态学结果(杯状细胞增加,管腔黏液增加,管壁平滑肌增加并最终形成纤维化和闭塞)的改变来判定模型制备是否成功。各药物预防组在制模的同时继续灌胃给予相应药物;COPD 模型组给予等量生理盐水灌胃。

### 1.4 观测指标

**1.4.1 光镜检查:**实验后立即活杀动物,取肺脏,放

入体积分数为 10%的甲醛溶液中固定 72 h,组织脱水、浸蜡,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜观察。

**1.4.2 形态计量指标:**检测 HE 染色病理切片的支气管壁厚度,在每张病理切片上随机选择气管横切直径 200~300 μm 的气管 5 支,测定气管壁厚度和气管壁腺体层厚度,分别取其平均值作为该只大鼠的气管壁厚度和气管壁腺体层厚度值,进行统计学分析。

**1.4.3 电镜观察:**右下支气管和肺组织 1 mm<sup>3</sup>,经 25 ml/L 戊二醛固定 6 h,后固定于锇酸中 1 h;用体积分数为 30%和 50%的乙醇脱水各 15 min,质量分数为 70%的醋酸铀脱水及包埋前染色 12 h,80%和 95%的乙醇脱水各 15 min,再用无水乙醇脱水 4 min 2 次;环氧丙烷作用 30 min,环氧丙烷:环氧树脂(1:1)作用 2 h,环氧树脂作用 3 h,包埋于环氧树脂内;入 45℃烤箱中 60 h,超薄切片(切片厚 70 nm),铅铀染色;日本电子透射电镜观察并且随机拍摄全貌、局部和细胞器图像,进行线粒体和嵴计数,计算各组每幅图像病变线粒体或嵴所占百分比。

**1.5 数据分析:**用 SAS 统计软件进行数据分析处理,各组数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,*t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肺组织一般形态学:**正常对照组支气管壁正常;气管黏膜纤毛柱状上皮细胞排列整齐,未见杯状细胞,管壁及周围无充血及炎症细胞浸润。COPD 模型组支气管壁有大量淋巴细胞、巨噬细胞浸润,黏膜上皮纤毛粘连、倒伏、脱落;支气管平滑肌组织增生;肺泡隔断裂,肺气肿形成。参七虫草胶囊高剂量组细支气管及肺组织基本正常,未见肺泡隔断裂,肺气肿形成。参七虫草胶囊低剂量组支气管壁基本正常,纤毛轻度粘连;轻度肺气肿。金水宝胶囊组细支气管壁有大量炎症细胞浸润,轻度肺气肿,肺泡隔内少量炎症细胞浸润。

**2.2 形态计量指标(表 1):**COPD 模型组气管壁、腺体层厚度均明显高于正常对照组;参七虫草胶囊高、低剂量组气管壁厚度均较 COPD 模型组明显变薄(*P*均<0.01),腺体层厚度变薄(*P*均<0.05);金水宝胶囊组气管壁厚度较 COPD 模型组明显变薄(*P*<0.01),腺体层厚度有变薄的趋势,但差异无显著性。参七虫草胶囊高剂量组气管壁厚度、腺体层厚度均较金水宝胶囊组变薄(*P*均<0.05)。

**2.3 肺组织超微结构的改变:**正常对照组上皮纤毛

表 1 各组大鼠气管壁、腺体层厚度及肺组织超微结构病变率比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )Table 1 Comparison of thickness of tracheal wall, glandular layer and ultrastructure lesion rate in the lung tissue of rats in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	气管壁厚度 ( $\mu\text{m}$ )	腺体层厚度 ( $\mu\text{m}$ )	线粒体病变率(%)			
			线粒体总数	肿胀肥大	空泡变	嵴突病变
正常对照组	27.62 $\pm$ 3.83	7.72 $\pm$ 1.41	20.10 $\pm$ 1.22	20.58 $\pm$ 1.25	20.48 $\pm$ 1.14	21.20 $\pm$ 1.53
COPD 模型组	64.07 $\pm$ 4.89**	39.32 $\pm$ 6.07**	79.50 $\pm$ 3.42**	81.43 $\pm$ 5.11**	78.61 $\pm$ 1.02**	80.16 $\pm$ 3.72**
参七虫草胶囊高剂量组	52.90 $\pm$ 4.96* $\Delta\Delta$ #34.02 $\pm$ 2.79* $\Delta$ #		42.70 $\pm$ 4.13** $\Delta$ #39.85 $\pm$ 3.12** $\Delta$ #		26.15 $\pm$ 1.67** $\Delta$ #	31.29 $\pm$ 2.72** $\Delta$ #
参七虫草胶囊低剂量组	54.29 $\pm$ 3.44* $\Delta\Delta$ #34.64 $\pm$ 3.39* $\Delta$ #		51.45 $\pm$ 3.95** $\Delta$ #48.26 $\pm$ 1.25** $\Delta$ #		39.16 $\pm$ 2.81** $\Delta$ #	25.19 $\pm$ 1.06** $\Delta$ #
金水宝胶囊组	57.88 $\pm$ 4.54* $\Delta\Delta$ #37.14 $\pm$ 2.26*		79.00 $\pm$ 6.45**	79.65 $\pm$ 4.16**	77.88 $\pm$ 1.94**	79.29 $\pm$ 3.98**

注:与正常对照组比较:\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 COPD 模型组比较: $\Delta P < 0.05$ , $\Delta\Delta P < 0.01$ ;与金水宝胶囊组比较:# $P < 0.05$

排列整齐、无脱落,支气管纤毛柱状上皮细胞胞浆未见肿胀,大鼠 II 型肺泡上皮细胞未见增生,板层小体未见排空。COPD 模型组肺泡 II 型细胞明显变性,结构不清,线粒体明显肿胀变性,甚至呈空泡状,嵴突破坏甚至消失,板层小体明显减少,核膜有破坏,核染色质边聚(凋亡早期改变)。参七虫草胶囊高剂量组肺泡 II 型细胞胞浆内见较多板层小体,细胞结构完好,线粒体完好。参七虫草胶囊低剂量组肺泡 I 型细胞、II 型细胞结构完整,无破坏,线粒体肿胀不明显,嵴突大部分完好,可见较多板层小体。金水宝胶囊组肺泡 II 型细胞板层小体减少(排空到细胞外),部分线粒体空泡变性。

2.4 各组大鼠肺组织超微结构病变率比较(表 1): COPD 模型组大鼠肺组织线粒体病变率明显高于正常对照组;参七虫草胶囊高、低剂量组线粒体病变率较 COPD 模型组显著降低( $P$  均 $< 0.05$ );金水宝胶囊组线粒体病变率较 COPD 模型组变化不明显( $P$  均 $> 0.05$ ),但较参七虫草胶囊高、低剂量组线粒体病变率显著升高( $P$  均 $< 0.05$ )。

### 3 讨论

我们模拟人类 COPD 的发生、发展过程,采用反复香烟雾熏结合两次气管内注入 LPS 的方法复制大鼠 COPD 模型,结果表明本模型符合 COPD 模型形态学标准和肺功能气流受限的概念,模型制备是成功的。COPD 模型形成机制可能为:LPS 为革兰阴性菌(大肠杆菌)的外层结构,可直接引起气道上皮损伤,又可激活巨噬细胞、淋巴细胞生成前炎症因子,如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-8(IL-8)、粒细胞集落刺激因子(GM-CSF)等,趋化并激活中性粒细胞,释放蛋白酶等细胞毒物质,导致支气管慢性炎症及肺气肿形成。李胜亮等<sup>[4]</sup>研究发现,LPS 刺激后 TNF- $\alpha$  含量逐渐升高,1 h 达峰值;4 h IL-6 含量升至刺激前的 3 倍;4~8 h IL-8 持续升高,6 h 达峰值。Roche<sup>[5]</sup>认为,LPS 引起的中

性粒细胞聚集及蛋白酶释放是黏液细胞化生和 COPD 形成的重要原因。香烟烟雾中的有害物质,如丙烯醛、氢氰酸、甲醛及大量氧自由基等,可使纤毛脱落,细胞坏死,蛋白酶/抗蛋白酶系统失衡,下呼吸道易感性增加,更加重 COPD 相关的支气管肺损害,形成恶性循环,致使病理改变不断进展。

COPD 特征性的病理学改变存在于中央气道、外周气道、肺实质和肺血管系统。在中央气道(即气管、支气管以及内径大于 2~4 mm 的细支气管)炎症细胞浸润表层上皮,黏液分泌腺增大和杯状细胞增多与黏液过度分泌有关。在外周气道(即内径小于 2 mm 的小支气管与细支气管),慢性炎症导致气道壁的反反复复损伤和修复,修复过程中气道壁结构重塑,伴有胶原蛋白含量增加以及瘢痕组织形成,致使管腔狭窄,引起固定性气道阻塞<sup>[1]</sup>。COPD 患者肺实质破坏的典型表现为小叶中央型肺气肿,由遗传因素或炎症细胞和介质的作用引起的内源性蛋白酶/抗蛋白酶失衡、氧化/抗氧化失衡、细胞因子网络紊乱被认为是肺气肿性肺结构破坏的主要机制。单兆运等<sup>[6]</sup>对 30 例 COPD 患者的光镜、电镜及免疫病理研究提示,肺间质纤维化倾向是 COPD 发展的必然趋势和病理结局,由于本实验研究未进一步观察,对此观点尚待确定。

我们经过多年临床观察并结合证候学调查认为,COPD 的病机是“本虚标实”。本虚表现在“肺肾两虚”,标实表现在“血瘀”,所以“虚瘀”为 COPD 的病理基础,贯穿于 COPD 的始终。参七虫草胶囊就是据此理论而组方,选用西洋参、参三七、冬虫夏草等药,具有益气养阴、活血化瘀、益肺固肾之功效,与 COPD 肺肾亏虚、血瘀内存的“虚瘀”机制相符合<sup>[7]</sup>。在我们以往完成的临床观察中发现,该药能显著减少 COPD 患者下呼吸道感染次数、发病持续时间及抗生素应用时间,同时亦可提高患者的免疫功能<sup>[2]</sup>。已完成的实验研究表明,参七虫草胶囊可调节

TNF- $\alpha$ 、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、IL-4、IL-10 等炎症因子<sup>[7,8]</sup>,从而抑制气道慢性炎症及气道壁结构重塑,延缓不可逆气流受限的进程,达到改善肺功能的作用。本实验采用香烟雾熏结合 LPS 气管内滴入的方法复制大鼠 COPD 模型,从病理学角度看是成功的。无论是肺组织一般形态,还是超微结构,均表现出 COPD 的病理特征。早期给予参七虫草胶囊干预对 COPD 模型大鼠病理改变有明显的预防和治疗作用,可延缓和改善 COPD 的病理过程,作用可能优于金水宝胶囊。

#### 参考文献:

- [1]中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25:453-460.  
[2]张念志,程旭初,季红燕,等.参七虫草胶囊治疗慢性阻塞性肺病

- 的临床研究[J].中国中医药信息杂志,2002,9(3):22-23.  
[3]宋一平,崔德健,茅培英,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J].中华内科杂志,2000,39:556.  
[4]李胜亮,张淑琴,秦翠平,等.脂多糖致肺血管内巨噬细胞释放炎症因子变化的研究[J].中国危重病急救医学,2006,18:136-138.  
[5]Roche W R. Inflammatory and structural changes in the small airways in bronchial asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998,157(5Pt2):S191-194.  
[6]单兆运,陈治安,马文富,等.慢性阻塞性肺疾病的光镜、电镜及免疫病理研究[J].中华结核和呼吸杂志,1990,13:311-313.  
[7]季红燕,张念志,陈炜,等.参七虫草胶囊对慢性阻塞性肺病大鼠模型细胞因子的影响[J].安徽医科大学学报,2003,38:272-274.  
[8]张念志,赵丽萍,卓秀珍,等.参七虫草胶囊对慢性阻塞性肺病大鼠模型肿瘤坏死因子- $\alpha$  mRNA 表达的影响[J].中国中医急症,2004,13:107-108.

(收稿日期:2006-08-22 修回日期:2006-10-24)

(本文编辑:李银平)

#### • 经验交流 •

## 金钱排石汤对体外冲击波碎石术排石效果的影响

王佐超,宋向荣

(天津市人民医院泌尿外科,天津 300121)

【关键词】泌尿系结石;体外冲击波碎石术;金钱排石汤;疗效

中图分类号:R285.6;R256.52 文献标识码:B 文章编号:1008-9691(2006)06-0326-01

我院于 2004 年 8 月—2006 年 10 月采用体外冲击波碎石术(ESWL)联合金钱排石汤治疗泌尿系结石,效果显著,现报告如下。

#### 1 临床资料

1.1 病例:100 例患者均无 ESWL 禁忌证,按随机原则将患者分为试验组和对照组,两组患者一般情况见表 1。其中试验组中有 1 例因服用金钱排石汤后出现恶心、呕吐症状不能耐受而停用;对照组中有 2 例自行服用其他中药排石制剂而被去除。

表 1 两组一般资料比较

组别	例数		性别(例)		年龄 ( $\bar{x}\pm s$ ,岁)	结石大小 ( $\bar{x}\pm s$ ,cm)
	男	女	男	女		
试验组	49	37	12		38.5 $\pm$ 8.2	1.5 $\pm$ 0.5
对照组	48	34	14		37.7 $\pm$ 9.1	1.5 $\pm$ 0.6

1.2 治疗方法:两组患者基础治疗相同,均在 X 线定位下进行碎石机碎石。每次冲击 1 500 次,治疗 45 min,碎石电

作者简介:王佐超(1963-),男(汉族),天津人,副主任医师。

压为 3.5~6.5 kV,2 周后复查,如果结石未排出,仍重复此方法,最多 3 次。试验组每次行 ESWL 术后均加用金钱排石汤,每日 1 剂,分 2 次服用。基本方:(金钱草 30 g,海金沙 15 g,冬葵子 15 g,扁蓄 15 g,瞿麦 15 g,石苇 15 g,牛膝 12 g,木香 5 g,泽泻 9 g,茯苓 10 g,川芎 12 g,炙甘草 10 g)。

1.3 疗效判定:术后 2 周复查,经 B 超、透视或静脉肾盂造影术(IVP)证实结石完全排出者为治愈;未排出或未排尽者均为未治愈。

1.4 治疗结果:试验组平均排石时间为(16.29 $\pm$ 13.05)d,对照组为(22.48 $\pm$ 15.8)d,试验组较对照组显著缩短,说明 ESWL 术后加用金钱排石汤治疗泌尿系结石疗效显著。

#### 3 讨论

ESWL 是目前治疗泌尿系结石的首选方法,排石过程中易受到其他因素的影响,如碎石的大小和形状,尿量所致的冲刷力,输尿管蠕动引起的推动力等<sup>[1]</sup>。

所以在治疗过程中减少排石的阻力因素、增加排石因素就能提高排石效果。

泌尿系结石属于中医学“石淋证”范畴。其病理机制多为湿热下注,气血凝滞致病。手术为西医常用治疗方法<sup>[2]</sup>。方中金钱草通淋利尿增加尿量;川芎、牛膝增加输尿管蠕动<sup>[1]</sup>;泽泻对草酸钙形成结晶有抑制作用<sup>[3]</sup>。诸药合用,共奏清热利尿,通淋排石,行气散结,活血化痰之功效,从而减轻局部水肿、淤血。

#### 参考文献:

- [1]刘志亮,李占清,李日清,等.中西医结合治疗上尿路结石 983 例[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10:248.  
[2]杨嗣星,詹炳炎,王玲瓏,等.尿路结石致急性肾功能衰竭的急诊手术治疗[J].中国危重病急救医学,1996,8:467-469.  
[3]曹正国,刘继红,胡少群,等.中药泽泻不同部位提取物对草酸钙结晶形成影响的体外实验研究[J].临床泌尿外科杂志,2003,18:40-42.

(收稿日期:2006-09-07)

(本文编辑:李银平)