

- [6] Zamboni L, Honma HN, Lourenco GJ, et al. A polymorphism in the angiogenesis inhibitor, endostatin, in lung cancer susceptibility [J]. Lung Cancer, 2008, 59(2):276-278.
- [7] Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJ, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis [J]. J Biol Chem, 1999, 274(17):11721-11726.
- [8] Skovseth DK, Veuger MJ, Haraldsen G, et al. Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo [J]. Blood, 2005, 105(3):1044-1051.
- [9] 陈慧彬, 陈超, 窦永超, 等. 扶正散结汤拆方配伍中药对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠血清 IL-2、IL-10、IFN- $\gamma$  影响的研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(3):254-256.
- (收稿日期:2014-05-04)  
(本文编辑:董历华)

## 希望 I 号液对大鼠吸入臭氧肺损伤的保护作用研究

张微 刘甜甜 祖承哲 彭金娥 冯丽莉 王湘 张燕 蔡大勇 王玥琦

**【摘要】 目的** 观察希望 I 号液对大鼠吸入臭氧导致肺损伤的保护作用。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机分为 6 组,即对照组、模型组、维生素 E 组(0.0135 g/kg)、希望 I 号液低、中、高剂量组(0.045、0.090、0.180g/kg),除对照组其余各组暴露臭氧(1.2 $\pm$ 0.2 ppm)10 h/d $\times$ 45 d。维生素 E 组、希望 I 号液低、中、高剂量组在臭氧造模同时给药。检测血清中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化脂质(lipid peroxide, LPO)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)含量,HE、Masson 染色观察肺组织变化,免疫组化方法观察肺组织中肺表面活性蛋白 A 含量。**结果** 与模型组相比,希望 I 号液各组 SOD、CAT、GSH-Px 活性增加, LPO 水平降低;希望 I 号液各给药组炎性细胞渗出胶原纤维含量减少;希望 I 号液各组肺表面活性蛋白 A 含量明显高于模型组。**结论** 希望 I 号液对大鼠吸入臭氧导致损伤具有良好的保护作用。

**【关键词】** 希望 I 号液; 臭氧; 抗氧化; 肺损伤; 肺表面活性蛋白 A

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.007

**The protection effect of Hope I Decoction on ozone inhalation-induced injury in rats** ZHANG Wei, LIU Tian-tian, ZU Cheng-zhe, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: Yue-Qi Wang, E-mail: yueqiwn@ gmail. com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the protection effect of Hope I decoction on ozone inhalation-induced injury in rats. **Methods** 48 male SD rats were randomly divided into 6 groups, i. e., control, model, VE (0.0135g/kg), Hope I decoction at three dosages (0.045, 0.090, 0.180g/kg respectively). Modeling rats were exposed to ozone in an exposure cabinet (10h/d $\times$ 45d), then some of them were intragastrically administrated with vitamin E or Hope I decoction. Then, the level of SOD, LPO, CAT and GSH-Px in rat serum were detected and pathologic change of lung tissue were observed, Immunohistochemistry for surfactant protein A (SP-A) content were observed. **Results** The activity of SOD, CAT and GSH-Px in serum were increased and LPO level were reduced in all Hope I groups. Histopathological slides of these three groups also showed an attenuated extent of alveoli dilatation and collapse induced by ozone exposure, surfactant protein A of these three groups were significantly enhanced. **Conclusion** Hope I decoction has

基金项目:北京中医药大学科研创新团队项目(2011-CXD-04);北京中医药大学自主选题(2014-JYBZZ-XS-036)

作者单位:100029 北京中医药大学基础医学院[张微(硕士研究生)、刘甜甜(硕士研究生)、彭金娥(硕士研究生)、冯丽莉、王湘、张燕、王玥琦];中国医学科学院药用植物研究所(祖承哲、蔡大勇)

作者简介:张微(1989-),女,2012 级在读硕士研究生。研究方向:中药延缓衰老的作用及其机理研究。E-mail:sophiezw@163.com

通讯作者:王玥琦(1958-),女,博士,研究员。研究方向:中药延缓衰老的作用及其机理研究。E-mail:yueqiwn@ gmail. com

great protection effect on ozone inhalation-induced injury in rats.

【Key words】 Hope I Decoction; Ozone; Antioxidant; Lung injury; Surfactant protein A

臭氧在全球和区域大气环境变化中扮演着重要角色,作为城市污染大气中的重要污染物,引发很强的环境效应<sup>[1]</sup>。而且,臭氧还会跟其他污染物联合作用,臭氧加强 PM 2.5 对人体的危害<sup>[2]</sup>。希望 I 号液由中药枸杞子和大枣组成,二者均有抗氧化增强免疫力的作用<sup>[3-4]</sup>,但未出现其防治臭氧损伤的报道。本研究采用大鼠吸入臭氧模型,灌胃给予希望 I 号液,观察希望 I 号液对臭氧所致肺损伤的保护功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 试药

希望 I 号液由枸杞子 11 g、大枣 6 g 组成(出自《太平圣惠方》枸杞子散)生药饮片均购自北京同仁堂药店,由北京中医药大学基础医学院中医药基础理论与关键技术中心配制;维生素 E (Vitimin E, VE)软胶囊(生产批号:20130104)由青岛双鲸药业有限公司生产。

### 1.2 动物

健康成年 SD 雄性大鼠 48 只,体质量 220~253 g [北京维通利华公司,实验动物使用许可证号:SCXK(京)2012-0001]。

### 1.3 仪器与试剂

臭氧发生器(山东精工好医生仪器有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)(生产批号:20130406)、过氧化脂质(lipid peroxide, LPO)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、测定试剂盒(批号:20140522)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)(生产批号:20130326)均购自南京建成生物工程研究所;肺表面活性蛋白-A(surfactant protein A, SP-A)抗体购自 santacruz 公司;羊抗兔链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex, SABC)免疫组化试剂盒购于武汉博士德公司。

### 1.4 动物分组及模型建立

48 只雄性 SD 大鼠,随机分为 6 组,即对照组、模型组、维生素 E 组、希望 I 号液低、中、高剂量组各 8 只。

除对照组外,其余各组都放入自制臭氧染毒柜中暴露臭氧( $1.2 \pm 0.2$  ppm)。所有老鼠自由饮食饮水。灌胃剂量:维生素 E 组为 0.0135 g/kg,希望 I

号液低、中、高剂量组为 0.045、0.090、0.180 g/kg,臭氧造模同时给药。45 天结束造模,处死各组动物。

### 1.5 血清中 SOD、LPO、CAT、GSH-Px 检测

腹主动脉取血,离心吸取血清, -80℃ 冻存,测定前取出血清解冻,按照试剂盒说明书方法测定血清中 SOD、LPO、CAT 和 GSH-Px。

### 1.6 肺组织病理学观察检测

将麻醉后的大鼠的胸腔打开,取左肺叶,10% 福尔马林固定 48 小时, PBS 清洗,修块,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡包埋,4 μm 切片,脱蜡透明后, HE 染色<sup>[5]</sup>、Masson 染色,光学显微镜下观察。计量胶原纤维面积和总面积,计算胶原纤维面积比。

### 1.7 免疫组化检测肺组织 SP-A 含量

将石蜡切片脱蜡后进行 SABC 法免疫组化染色。石蜡切片脱蜡、水化后,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 避光孵育 1 小时,置于枸橼酸缓冲液中微波抗原修复,BSA 封闭后滴加一抗 4℃ 过夜,洗脱后滴加二抗 37℃ 孵育 30 分钟, SABC 37℃ 孵育 30 分钟后 DAB 显色,苏木素复染核,中性树胶封片,扫描。采用 Image Pro Plus 软件对图像进行处理。随机选取 5 视野计量阳性细胞面积(A)、平均光密度值(D)、积分光密度值(IOD),计量阳性表达量。

$$\text{表达量} = D \times \sqrt{\left(\frac{100}{\frac{D}{A}}\right)^3}$$

### 1.8 统计学分析

所得实验数据实验结果用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 20.0 统计软件分析,各组数据正态性检验后用单因素方差分析数据, LPO, SOD, CAT, GSH 采用 *F* 检验(*F-text*), Masson 染色、SP-A 形态计量用 Welch 检验, LSD 进行组间比较,剂量依赖性用直线相关进行分析。

## 2 结果

### 2.1 希望 I 号液降低臭氧吸入大鼠血清 LPO 含量

血清 LPO 经 *F-text* 分析后结果如表 1 所示( $F = 4.034, P < 0.01$ ), (1)与对照组比较,模型组大鼠血清中的 LPO 含量显著升高( $P < 0.01$ )。 (2)与模型组比较,希望 I 号液各治疗组大鼠血清 LPO 含量显著降低,有差异性( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表 1 希望 I 号液对大鼠血清中 SOD、LPO、CAT、GSH-Px 含量( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	LPO (nmol/L)	SOD (U/mL)	CAT (U/mL)	GSH-Px (μmol/L)
对照组	12.57 ± 1.39 <sup>b</sup>	78.43 ± 7.54 <sup>b</sup>	60.82 ± 6.34 <sup>b</sup>	91.42 ± 3.40 <sup>b</sup>
模型组	17.46 ± 1.42 <sup>a</sup>	55.60 ± 2.27 <sup>a</sup>	28.73 ± 4.28 <sup>a</sup>	76.00 ± 1.22 <sup>a</sup>
维生素 E 组	14.87 ± 1.44	62.24 ± 2.40 <sup>a</sup>	47.88 ± 6.93 <sup>ab</sup>	94.16 ± 3.19 <sup>ab</sup>
希望 I 号液				
低剂量组	14.27 ± 3.54 <sup>b</sup>	56.37 ± 3.33 <sup>a</sup>	36.41 ± 2.65 <sup>a</sup>	89.09 ± 0.91 <sup>b</sup>
中剂量组	13.35 ± 1.37 <sup>b</sup>	75.04 ± 5.79 <sup>b</sup>	50.70 ± 5.89 <sup>b</sup>	89.55 ± 1.50 <sup>b</sup>
高剂量组	12.62 ± 2.35 <sup>b</sup>	69.06 ± 7.02 <sup>ab</sup>	48.84 ± 6.38 <sup>ab</sup>	91.17 ± 2.89 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$  与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

(3)将模型组作为给药零剂量组,直线相关回归显示希望 I 号液的用药剂量与大鼠血清 LPO 含量之间高度负相关( $y = -0.0314x + 0.5317, R^2 = 0.7597, P < 0.05$ );提示希望 I 号液降低臭氧吸入大鼠血清过氧化脂质有剂量依赖特征。

2.2 希望 I 号液回升臭氧吸入大鼠血清 SOD 活性

血清 SOD 经  $F$ -text 分析后结果如表 1 所示( $F = 15.177, P < 0.01$ ), (1)与对照组比较,模型组大鼠血清 SOD 活力含量显著降低( $P < 0.01$ )。 (2)与模型组比较,希望 I 号液中、高剂量治疗组大鼠血清 SOD 活力回升,差异具有显著性( $P < 0.01$ ),低剂量治疗组 SOD 活力略有增高,但无统计学差异。

2.3 希望 I 号液回升臭氧吸入大鼠血清 CAT 活性

血清 CAT 经  $F$ -text 分析后结果如表 1 所示( $F = 16.579, P < 0.01$ ), (1)与对照组比较,模型组大鼠血清 CAT 活力含量显著降低( $P < 0.01$ )。 (2)与模型组比较,希望 I 号液中、高剂量给药组大鼠血清 CAT 活力回升,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。低剂量治疗组 CAT 活力略有增高,但无统计学差异。 (3)将模型组作为给药零剂量组,直线相关回归显示希望 I 号液的用药剂量与大鼠血清 CAT 活力之间高度正相关( $y = 0.0062x - 0.176, R^2 = 0.707, P < 0.05$ );提示希望 I 号液回升臭氧吸入大鼠血清 CAT 具有剂量依赖特征。

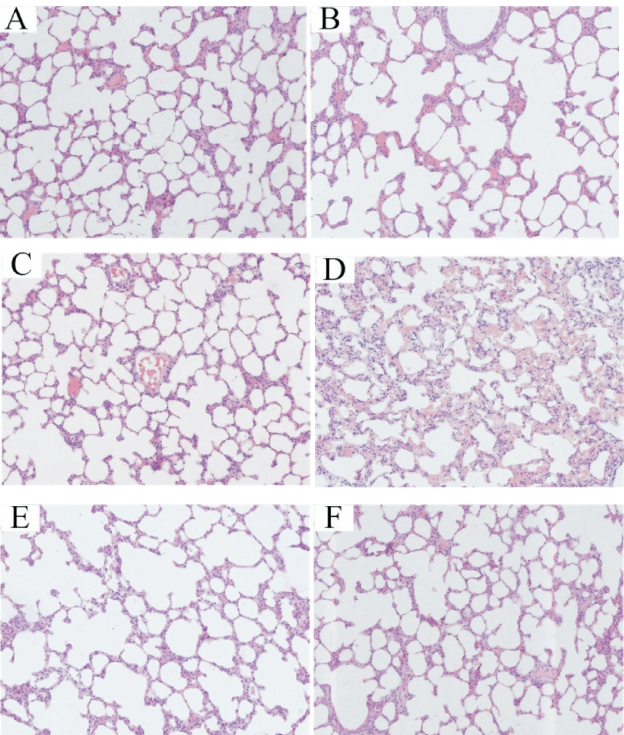
2.4 希望 I 号液回升臭氧吸入大鼠血清 GSH-Px 活性

血清 GSH-Px 经  $F$ -text 分析后结果如表 1 所示( $F = 53.328, P < 0.01$ ), (1)与对照组比较,模型组大鼠血清 GSH-Px 活力含量显著降低( $P < 0.01$ )。 (2)与模型组比较,希望 I 号液各治疗组大鼠血清 GSH-Px 活力回升,差异具有显著性( $P < 0.01$ )。

2.5 希望 I 号液缓解臭氧吸入大鼠肺组织损伤

肺组织 HE 染色结果如图 1 所示,对照组大鼠

的肺组织中肺泡间隔均匀;模型组出现了明显的肺泡扩张并伴有塌陷现象,肺泡大小不一;维生素 E 组肺泡结构完整,未出现肺泡扩张现象;低、中剂量给药组肺泡扩张现象有所缓解,肺泡大小不均匀;高剂量给药组与维生素 E 组相似,肺泡大小比较均匀。



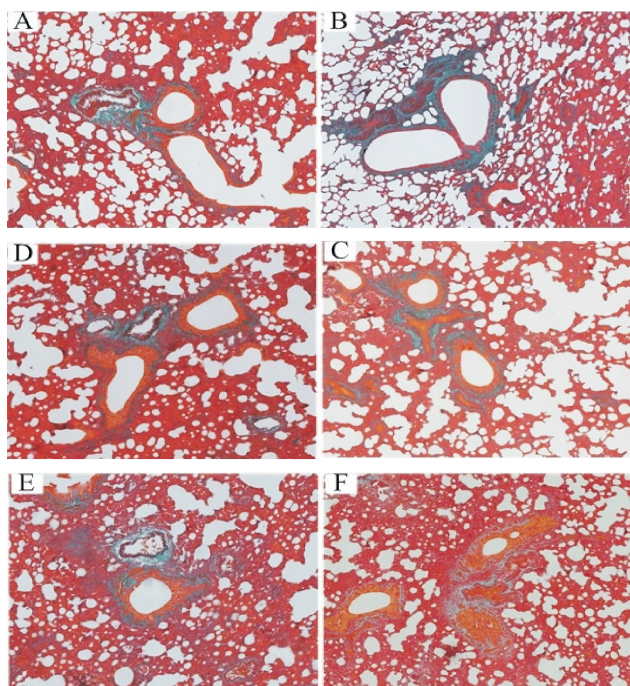
A 对照组 B 模型组 C 维生素 E 组 D 希望 I 号液低剂量组  
E 希望 I 号液中剂量组 F 希望 I 号液高剂量组

图 1 各组大鼠肺组织 HE 染色切片(×200)

2.6 希望 I 号液回降大鼠肺组织胶原纤维沉积

如图 2 所示肺组织胶原纤维经 Masson 染色显示为墨绿色。数据经 Welch 方差分析后如表 2 所示( $F' = 30.504, P < 0.01$ ),对照组大鼠的肺组织中气





A 对照组 B 模型组 C 维生素 E 组 D 希望 I 号液低剂量组  
E 希望 I 号液中剂量组 F 希望 I 号液高剂量组

图 2 各组大鼠肺组织 Masson 染色切片 ( $\times 200$ )

管周围胶原纤维较薄。(1)与对照组比较,模型组大鼠肺组织胶原纤维含量上升,差别有显著性( $P < 0.01$ )。(2)与模型组比较,各治疗组大鼠肺组织胶

表 2 希望 I 号液缓解大鼠肺损伤( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

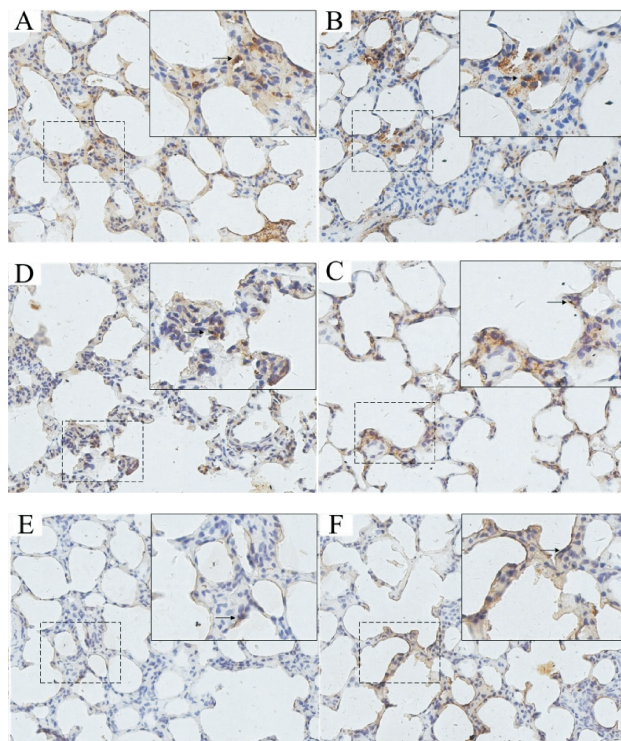
组别	胶原纤维面积比	SP-A 表达量
对照组	4.10% $\pm$ 1.08% <sup>b</sup>	88.11 $\pm$ 7.77 <sup>b</sup>
模型组	12.52% $\pm$ 3.57% <sup>a</sup>	66.20 $\pm$ 7.89 <sup>a</sup>
维生素 E 组	4.34% $\pm$ 1.68% <sup>b</sup>	88.03 $\pm$ 9.99 <sup>b</sup>
希望 I 号液		
低剂量组	6.33% $\pm$ 1.37% <sup>b</sup>	78.28 $\pm$ 8.43 <sup>ab</sup>
中剂量组	4.23% $\pm$ 0.30% <sup>b</sup>	88.69 $\pm$ 7.80 <sup>b</sup>
高剂量组	4.03% $\pm$ 0.56% <sup>b</sup>	88.37 $\pm$ 8.44 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

原纤维含量回降,差别有显著性( $P < 0.01$ )。(3)将模型组作为给药零剂量组,直线相关回归显示希望 I 号液的用药剂量与大鼠肺组织原位 SP-A 含量之间高度正相关( $y = -1.5757x + 0.1855, R^2 = 0.6616, P < 0.05$ ),提示希望 I 号液保护臭氧诱导肺损伤具有剂量依赖特征。

## 2.7 希望 I 号液回升大鼠肺损伤原位表面活性物质

如图 4 所示 SP-A 表达阳性为黄褐色。对照组 SP-A 表达量较多,主要分布于肺泡 II 型细胞,少量位于巨噬细胞和支气管上皮细胞中。SP-A 形态剂量经 Welch 统计后结果显示(表 2)( $F' = 24.022$ ,



A 对照组 B 模型组 C 维生素 E 组 D 希望 I 号液低剂量组  
E 希望 I 号液中剂量组 F 希望 I 号液高剂量组

图 4 各组大鼠肺组织 SP-A 免疫组化染色结果  
( $\times 400, \times 800$ )

$P < 0.01$ ), 希望 I 号液显著回升大鼠肺损伤原位表面活性物质。(1)与对照组比较,模型组大鼠肺组织原位 SP-A 显著下降,差别有显著性( $P < 0.01$ )。(2)与模型组比较,各治疗组大鼠肺组织原位 SP-A 显著回升,差别有显著性( $P < 0.01$ )。(3)将模型组看做给药零剂量组,直线相关回归显示希望 I 号液的用药剂量与大鼠肺组织原位 SP-A 含量之间高度正相关( $y = 0.0062x - 0.4186, R^2 = 0.7808, P < 0.05$ );提示希望 I 号液保护臭氧诱导肺损伤具有剂量依赖特征。

## 3 讨论

随着社会发展,环境污染问题越来越受到人们的普遍重视。臭氧作为夏季的首要污染物<sup>[6]</sup>,

其危害作用也受到人民的广泛关注。臭氧可造成肺组织损伤,引发哮喘、支气管肺炎等肺部疾病<sup>[7-8]</sup>。有少量清热解毒、益气活血类<sup>[9-10]</sup>中药缓解肺损伤报道,但中药缓解臭氧所致肺损伤的文献甚少。希望 I 号液中枸杞子可滋补肝肾、益精明目,大枣具有补中益气、养血安神功能。本品从中医脾肾论治保护肺功能,符合中医临床培土生金、金水相生治则,达到增强机体抵御外界伤害能力,从而为临床防治肺损伤提供实验依据。

SOD、CAT、GSH-Px 是抗氧化酶系统中重要组成部分。SOD、GSH-Px 水平反映机体氧化-抗氧化平衡,机体受到臭氧染毒后,这种平衡被打破,出现 SOD、GSH-Px 活力降低的现象,SOD、GSH-Px 在臭氧导致氧化应激反应中起防御作用<sup>[11-12]</sup>。SOD、CAT、GSH-Px 活力下降,可能是由于臭氧造成 DNA 损伤有关<sup>[2]</sup>。同时,根据 LPO 结果显示,经过臭氧染毒的模型组含量明显增高,与文献报道相一致<sup>[13]</sup>。臭氧导致肺纤维化和抗氧化酶活性降低,肺损伤模型成功。

希望 I 号液各给药组 LPO 水平均低于模型组,并回升抗氧化酶活性,希望 I 号液可能通过加速过氧化物的代谢从而减轻过氧化反应对机体的损伤。

肺组织形态学观察表明:模型组巨噬细胞数量增多出现肺纤维化病灶,胶原纤维沉积,说明臭氧导致了大鼠肺部组织损伤。应用希望 I 号液后,肺组织炎性细胞减少,纤维化现象减轻,从而有效地保护大鼠肺组织。

研究显示 SP-A 由肺泡 II 型细胞分泌,其主要作用维持肺泡结构,在肺损伤时参与抗氧化反应,具有一定的防御功能与免疫调节作用<sup>[14]</sup>。臭氧破坏机体的氧化平衡,可见模型组 SP-A 免疫组化阳性表达减少。希望 I 号液中、高剂量组和维生素 E 组的 SP-A 表达量,与对照组相比无统计学差异,说明希望 I 号液中、高剂量组和维生素 E 组有很好的保护肺泡的能力。

综上所述,希望 I 号液对于吸入臭氧导致的肺损伤具有保护作用,升高抗氧化酶活性,减轻肺纤维化。而希望 I 号液保护臭氧所致大鼠肺损伤的机制,可能是通过诱导抗氧化酶激活,保护肺泡 II 型细胞从而发挥保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] Piikki K, De Temmerman L, Ojanperä K, et al. The grain quality of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) in relation to elevated ozone uptake and carbon dioxide exposure[J]. *European Journal of Agronomy*, 2008, 28(3): 245-254.
- [2] Wang G, Zhao J, Jiang R, et al. Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) exposures[J]. *Environmental toxicology*, 2013, 30(3): 343-356.
- [3] 武晓群, 张鹏, 董菊. 枸杞子对 D-半乳糖致衰小鼠的免疫调节作用机制研究[J]. *江苏中医药*, 2007, 39(11): 83-84.
- [4] 张娟, 卿德刚, 孙宇, 等. 复方大枣片增强免疫功能的实验研究[J]. *西部中医药*, 2014, 27(3): 28-31.
- [5] 吴春艳, 张智, 谷玮玮, 等. 葛根素对急性肺损伤大鼠肺组织 MPO 活性及 ICAM-1 表达的影响[J]. *中国药师*, 2013(11): 1653-1655.
- [6] 危炜. 臭氧跃升多地首要污染物专家呼吁纳入大气规划[N]. *21 世纪经济报道*, 2013-09-03 (022)
- [7] 王广鹤, 甄玲燕, 吕鹏, 等. 臭氧和细颗粒物暴露对大鼠心脏自主神经系统和系统炎症的影响[J]. *卫生研究*, 2013, 42(4): 554-560.
- [8] Wang G, Jiang R, Zhao Z, et al. Effects of ozone and fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) on rat system inflammation and cardiac function[J]. *Toxicology letters*, 2013, 217(1): 23-33.
- [9] 张杰, 薛玉凤, 赵聚宾. 中药清毒液对急性肺损伤兔肺组织和血浆一氧化氮和内皮素水平的影响[J]. *时珍国医国药*, 2005, 16(7): 607-608.
- [10] 张晓敏, 王炳胜, 葛艳丽, 等. 益气活血中药治疗放射性肺损伤的效果观察[J]. *解放军医药杂志*, 2011, 23(3): 45-46.
- [11] Pereyra-Muñoz N, Rugerio-Vargas C, Angoa-Pérez M, et al. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone[J]. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2006, 31(2): 114-123.
- [12] Boehme D S, Hotchkiss J A, Henderson R F. Glutathione and GSH-dependent enzymes in bronchoalveolar lavage fluid cells in response to ozone[J]. *Experimental and molecular pathology*, 1992, 56(1): 37-48.
- [13] Zhou J F, Cai D, Tong G Z. Oxidative stress and potential free radical damage associated with photocopying. A role for ozone?[J]. *Free radical research*, 2003, 37(2): 137-143.
- [14] Santiago-López D, Bautista-Martínez J A, Reyes-Hernández C I, et al. Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone[J]. *Toxicology letters*, 2010, 197(3): 193-200.

(收稿日期:2014-09-24)

(本文编辑:蒲晓田)