

本文引用:田 珺,匡 骁,赵群菊,刘蓉芳,蒋俊和.清霾饮对细颗粒物 PM_{2.5} 致大鼠肺损伤的干预作用研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(4):402-405.

清霾饮对细颗粒物 PM_{2.5} 致大鼠肺损伤的干预作用研究

田 珺¹,匡 骁¹,赵群菊²,刘蓉芳²,蒋俊和^{2*}

(1.中南大学湘雅医院,湖南 长沙 410008;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 研究清霾饮对大气细颗粒物 PM_{2.5} 所致大鼠肺损伤的干预作用。**方法** 健康成年 SD 大鼠 48 只随机分为 3 组:生理盐水组、染毒组、清霾饮干预组。采集造模染毒所需浓度 37.5 mg/mL 的颗粒物悬液对染毒组和清霾饮干预组进行气管滴注,并在染毒后进行灌胃给药。最后一次染毒 48 h 后,收集腹主动脉血和支气管肺泡灌洗液,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中的碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)活力及(MDA)含量和血清中的丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活力。**结果** (1)PM_{2.5} 染毒后,大鼠 BALF 中 AKP、LDH 活力及 MDA 含量均较生理盐水组升高;清霾饮干预后,大鼠 BALF 中 AKP、LDH 活力及 MDA 含量较 PM_{2.5} 染毒组均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$);(2)PM_{2.5} 染毒后,大鼠血清中 MDA 含量升高,SOD 活力较生理盐水组降低;清霾饮干预后,较 PM_{2.5} 染毒组血清中 MDA 含量明显降低,SOD 活力稍降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 细颗粒物 PM_{2.5} 可以导致大鼠肺部炎症损伤,清霾饮对肺部炎症损伤有拮抗作用。

[关键词] 细颗粒物(PM_{2.5});清霾饮;肺组织;支气管肺泡灌洗液;肺损伤

[中图分类号]R285.5;R256.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.04.009

Intervention Effect of Qingmai Yin on Pulmonary Injury Induced by PM_{2.5} in Rats

TIAN Jun¹, KUANG Xiao¹, ZHAO Qunju², LIU Rongfang², JIANG Junhe^{2*}

(1. Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410008, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the intervention effect of Qingmai Yin on lung injury induced by atmospheric fine particulate matter PM_{2.5} in rats. **Methods** The 48 healthy adult SD rats were randomly divided into three groups: normal saline group, exposure group, and Qingmai Yin intervention group. The concentration of 37.5 mg/mL was collected and the tracheal drip was administered to the exposed group and the Qingmai Yin intervention group. The model rats were given medicine by gavage after the dye dust. After the last exposure for 48 h, the abdominal aorta was given and the alveolar lavage fluid was collected. The activities of AKP, LDH and MDA in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and MDA content and SOD activity in serum were measured. **Results** (1) The AKP, LDH activity and MDA content in BALF of PM_{2.5} poisoning group increased than those in normal saline group. The activity of AKP, LDH and MDA in BALF of rats decreased after the Qingmai Yin intervention, the differences between poisoning group and Qingmai Yin intervention group were statistically significant ($P<0.05$); (2) After

[收稿日期]2017-10-29

[基金项目]湖南省中医药科研计划项目(60010783)。

[作者简介]田 珺,女,在读硕士研究生,护师,研究方向:中医护理。

[通讯作者]* 蒋俊和,男,副教授,E-mail:1013269649@qq.com。

the PM_{2.5} exposure, the content of MDA in the serum was higher and the activity of SOD decreased than those in the normal saline group. After Qingmai Yin intervention, the content of MDA in the serum decreased and the activity of SOD decreased slightly, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** PM_{2.5} can lead to lung inflammatory injury in rats, and Qingmai Yin has an antagonistic effect on lung inflammatory injury.

[**Keywords**] fine particles (PM_{2.5}); Qingmai Yin; lung tissue; bronchoalveolar lavage fluid; lung injury

雾霾天气不单给气候、环境、经济等方面造成明显的负面影响^[1],还严重影响人们身心健康。其罪魁祸首为大气细颗粒物 PM_{2.5}(particulate matter_{2.5})^[2]。研究显示 PM_{2.5} 不仅损害呼吸、心血管、免疫、神经等系统,而且导致肿瘤和出生缺陷^[3]。2012 年《柳叶刀》杂志上发表的《全球疾病负担 2010 年报告》中称大气细颗粒物 PM_{2.5} 是导致中国人口死亡仅次于饮食风险、高血压和吸烟的第四大危害要素,并揭示 2010 年中国的室外空气污染导致 120 万人过早死亡,死亡人数几乎占全世界死亡总数的 40%^[4]。PM_{2.5} 对呼吸系统作用机制为颗粒物侵入肺组织,产生局部氧化应激和炎症反应,氧化应激可侵害生物膜脂质、蛋白质和 DNA,与炎症因子协同作用损伤呼吸道,造成肺功能下降及呼吸系统疾病发病率升高^[5]。

有效干预 PM_{2.5} 构成的健康风险已成为我国医药研究范畴亟需解决的重大科学问题^[6]。依据中医传统“药食同源”的理论,选用药食两用的红景天、桔梗、野菊花、山银花、鱼腥草、荷叶、甘草,研制出益肺、利咽解毒的清霾饮并探究其对 PM_{2.5} 致大鼠肺损伤的拮抗作用。本实验采集长沙市 PM_{2.5},制备 PM_{2.5} 悬液,以大气 PM_{2.5} 气管滴注大鼠染毒构成肺损伤为模型,给予最高剂量清霾饮进行干预,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)及血清中生化指标变化,探讨清霾饮对大气 PM_{2.5} 致肺损伤的干预作用及可能机制。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

自拟方清霾饮药材(红景天 9 g,桔梗 6 g,野菊花 6 g,山银花 6 g,鱼腥草 10 g,荷叶 10 g,甘草 3 g)购自老百姓大药房连锁股份有限公司,按中药常规煎法进行煎煮,将以上饮片以 500 mL 水浸泡 30 min,加热至沸腾,后保持微沸 30 min,滤过;残渣加 300 mL 水,进行二次煎煮,保持微沸 30 min,过滤,合并两次的过滤药液,将药液浓缩至生药量 0.0625 g/mL; AKP 试剂盒(批号:20170308),LDH 试剂盒(批号:20170310),MDA 试剂盒(批号:20170310),SOD 试剂盒(批号:20170306),均为南京建成生物

公司; 崂应 2020 型空气采样器、玻璃纤维滤膜(青岛崂山应用技术研究所); MK3 酶标仪(Thermo 公司); H1850 型台式高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司)。

1.2 PM_{2.5} 悬液配制

PM_{2.5} 由湖南农业大学于 2016 年 11 月-2016 年 12 月在湖南农业大学的八教前坪和长沙县规模化养殖场几个污染程度不同的采样点连续采样,用崂应 2020 型空气采样器(电子流量计)收集,记录气温、气压。把滤膜剪成小块,折半后投入超纯水,超声低温震动 30 min,纱布过滤洗脱液后,滤液用 4 ℃、10 000 r/min、15 min 离心 3 次,弃上清液,称量后-20 ℃冰箱保存,用生理盐水配成造模染毒所需浓度 37.5 mg/mL 的颗粒物悬液,超声震荡 15 min 后混匀,4 ℃冰箱存好备用^[7]。

1.3 实验动物分组及给药方法

48 只雌雄参半 SD 大鼠(湖南中医药大学实验动物中心供应),体质量 180~220 g,许可证号:SCXK(湘)2013-0004,SPF 实验室适应性喂养 1 月半。采用随机数字表法分为 3 组,分别为生理盐水组、PM_{2.5} 染毒组、清霾饮干预组,每组 16 只。生理盐水组大鼠用气管滴注 0.9%氯化钠溶液(1.5 mg/kg),染毒组用设定浓度的 PM_{2.5} 生理盐水混悬液(1.5 mL/kg)进行气管滴注,清霾饮干预组首次染毒后即给以清霾饮(37.5 mg/kg)进行干预。染毒每周 1 次,共 4 次。

1.4 标本采集

在最后一次染毒 48 h 后,对大鼠用 10%水合氯醛进行腹腔注射麻醉。先取腹主动脉血 5 mL,3 000 r/min 分离血清 15 min(离心半径 8 cm)。然后在大鼠主支气管处剪成小“V”形状,插入 16 号的灌胃针头,结扎固定,用 PBS 缓冲液 3.5 mL 反复灌洗 2 次肺部,共收集支气管肺泡灌洗液(BALF)10 mL,1 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8 cm),收取上清液放于-80 ℃冰箱保存。

1.5 指标检测

支气管肺泡灌洗液和血清中生化指标的测定:测定支气管肺泡灌洗液中的碱性磷酸酶(AKP)、乳酸脱氢酶(LDH)的活力及丙二醛(MDA)的含量,测

定血清中的超氧化物歧化酶 (SOD) 活力及丙二醛 (MDA) 的含量测定,采用南京建成生物制品研究所提供的测定试剂盒。按试剂盒说明书要求严格操作。

1.6 统计学分析

全部数据均采用 SPSS 21.0 软件包进行统计分析。实验结果所有数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间均数比较用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett' T3 检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 AKP、LDH、MDA 的变化

各组大鼠支气管肺泡灌洗液中 AKP、LDH 活力及 MDA 含量与生理盐水组 BALF 比较,PM2.5 染毒组大鼠 AKP、LDH 活力及 MDA 含量均升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与染毒组比较,给予清霾饮灌药后,干预组大鼠 BALF 中 AKP、LDH 活力及 MDA 含量均降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结果如表 1 所示。

表 1 肺灌洗液中生化指标测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=16$)

组别	AKP/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
生理盐水组	0.25±0.14	85.55±13.32	4.17±0.67
PM2.5 染毒组	0.60±0.10*	167.16±17.94*	8.89±1.23*
清霾饮干预组	0.43±0.11**	117.99±21.68**	5.45±1.75#
F	17.748	37.092	25.460
P	0.000	0.000	0.000

注:与生理盐水组比较,* $P<0.01$;与染毒组比较,# $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠血清中 MDA、SOD 的变化

与生理盐水组血清比较,PM2.5 染毒组大鼠血清中 MDA 含量明显升高($P<0.01$),与染毒组相比,其干预组大鼠血清中 MDA 含量明显降低($P<0.01$)。与生理盐水组相比,染毒组中 SOD 活力低于生理盐水组($P<0.01$),与染毒组相比,干预组大鼠血清中 SOD 活力稍降低,差异均有统计学意义($P<0.01$)。结果如表 2 所示。

表 2 血清中生化指标测定结果 ($\bar{x}\pm s, n=16$)

组别	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·L ⁻¹
生理盐水组	22.26±8.48	81.57±6.60
PM2.5 染毒组	49.64±10.3*	53.14±11.76*
清霾饮干预组	18.59±5.98#	41.90±4.58**
F	37.396	40.693
P	0.000	0.000

注:与生理盐水组比较,* $P<0.01$;与染毒组比较,# $P<0.01$ 。

3 讨论

近年来,人们日益重视大气 PM2.5 对健康的危害,许多科学家都专研大气颗粒物对机体的毒害机制,但是迄今为止仍不清楚确切的损伤机制。大气颗粒物对肺组织的损伤机制主要包括氧化损伤和炎性损伤这两大类。大气 PM2.5 进入机体后直接作用于呼吸道,损坏肺泡腔毛细血管膜、血管基底膜,变换或破损肺泡 I 型、II 型细胞形态,改变细胞通透性,致使细胞内容物如各种蛋白、AKP、LDH 等漏出^[8]。AKP 是反映肺泡 I 型和 II 型细胞受损程度的特异标志物^[9]。LDH 归属胞浆酶,来源于血液或肺损伤后组织渗漏,是细胞膜损伤的早期敏感指标,为细胞毒性标志物^[10]。SOD 能够抵制机体内的超氧阴离子损伤,MDA 是细胞发生脂质过氧化反应的代表性产物^[11],机体的抗氧化应激水平增加后,会增加体内的氧自由基,脂质过氧化产物 MDA 的含量也会增加,而超氧化物歧化酶 SOD 属于体内防止氧化自由基重要酶类,能制止脂质过氧化从而保护机体和组织,脂质过氧化物能够不可逆地损害细胞膜结构和功能,体内 MDA 的含量能反映机体的氧化应激水平,SOD 反映机体抗氧化水平^[12]。本研究显示,染毒组大鼠 BALF 中的 AKP、LDH 活力及 MDA 含量均高于生理盐水组,阐明 PM2.5 经过气管滴注的染毒形式能加大细胞通透性而使细胞酶渗出增多,并对肺泡上皮-毛细血管发生毒性作用,导致肺损伤,与刘平安等^[7]研究结果一致。干预组大鼠 BALF 中的 AKP、LDH 活力及 MDA 含量比染毒组明显下降,干预组大鼠血清中 MDA 含量明显降低($P<0.05$),揭示清霾饮干预对 PM2.5 引起的肺应激损伤有减轻作用。清霾饮干预组大鼠血清中 SOD 活力稍降低,考虑清霾饮只能轻度提高机体的抗过氧化水平($P<0.05$)。这些结果都提示清霾饮干预对 PM2.5 引起的肺损伤有一定减轻作用。

如何利用中医药特有的优势有效防控 PM2.5 对大众健康的潜在影响已开始成为国民基本的民生需求之一。黄耀生^[13]称雾霾的病性可解释为湿、浊,通常与风、寒、热之邪联合随口鼻侵犯身体。肺处上焦,为华盖,雾霾湿浊之邪侵入,首先侵袭肺系,肺失宣降发为咳嗽。中医认为雾霾伤肺的防治除了“避之有时”,做好防御措施外,更应提高机体抵抗能力,使“正气存内,邪不可干”。程丑夫^[14]认为雾霾病机是寒热转化和损伤正气。清霾饮主要药理作用体现了“未病先防”和“已病防变”的思想,具有益肺、解毒利咽、抗炎、抑制肺损伤、调节免疫作用,对雾霾所致的肺系病有着防治和改善作用。清霾饮主要成分为红景

天、桔梗、甘草、野菊花、山银花、鱼腥草、荷叶,本方由张仲景《伤寒论》“桔梗汤”加味而来。桔梗汤最早源于张仲景《伤寒论》311条:“少阴病,二三日,咽痛者,可用甘草汤。不瘥者,给桔梗汤”,后世又称“甘桔汤”(《小儿药证直诀》卷下)。桔梗辛苦且平,辛则散,苦则降,直入肺脏,宣肺止咳、祛痰排脓,故为君药;甘草甘平,泻火解毒、润肺化痰。二药合用,标本兼顾,能加强宣肺止咳、利咽解毒、祛痰排脓之功^[14]。鱼腥草味辛而寒,专入肺经,具有清热解毒、消痈排脓、利尿通淋的功能,主要用于肺痈吐脓、痰热喘咳^[15],以助君力,故为臣药。红景天,其“味甘性寒、归脾肺经,有润肺、清肺止咳、健脾益气之效”,拮抗长期活动引起的LDH活性升高,还可提高小鼠血浆中SOD活性和显著降低小鼠血浆中MDA含量,红景天有抑制肺组织中炎症因子表达,抗肺损伤作用,具有祛邪扶正之功^[16-17],故为佐助药。野菊花和山银花属花类,且苦辛性寒,具有凉散风热、清热解毒功效,其黄酮类成分是目前国内外公认的具有抗氧化活性的成分之一,具有抗炎症、抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、增强免疫及对内皮细胞和心肌细胞的抗氧化保护作用,减少氧化应激等多种药理活性^[18-21],故为佐助药。荷叶苦涩性平,归肝、脾、胃经,具有清暑利湿、凉血止血等功效,用于暑热烦渴,脾虚泄泻,主要活性成分为黄酮类,具有抗氧化活性和抗炎性、抗衰老、抑菌等药理活性^[22-23],有“善治痰者治其生痰之源”之意,亦为佐助药。生甘草其性甘寒,既可清热解毒、利咽祛痰以助君力而寓“甘桔汤”之意,又可调和诸药,故为佐使药。诸药合用,切合病机,随证加减,疗效显著^[24]。

综上所述,本实验证明,清霾饮可拮抗细颗粒物PM_{2.5}造成的呼吸道损伤,其保护性机制与其抗氧化性和抗炎性有关联,为清霾系列药膳产品的开发提供了新思路,可产生一定的社会和经济效益,对促进中医药膳事业发展有着重要意义,也是中医药现代化与标准化发展的需要。

参考文献:

[1] 程丑夫.雾霾的中医认识与防治思路[J].湖南中医药大学学报,2014,34(5):1-5.
 [2] KODAVANTI U P, COATA D I, BROMBERG P. Rodent models of car-diopulmonary Disease, their potential applicability in studies of air pollutant Susceptibility[J]. Environ Health Persp, 1998,106(1):111-130.
 [3] DE KOK T M, DRIECE H A, HOGERVORST J G, et al. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter

A review of recent studies[J]. Mutat Res, 2006,613(2-3):103-122.
 [4] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the global burden of disease study 2010[J]. Lancet, 2012,380(9859):2095,2128.
 [5] KLEIN S G, HEMEN J, SERCHI T, et al. Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung[J]. Toxicol in Vitro,2011,25(8):1516-1534.
 [6] 李玉洁,陈颖,王娅杰,等.PM_{2.5}暴露诱发动脉粥样硬化斑块不稳定发病机制及应对策略思考[J].中国中药杂志,2014,38(15):2978-2982.
 [7] 刘平安,莫阳,张国民,等.红景天对细颗粒物PM_{2.5}所致急性肺损伤大鼠干预作用的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(7):5-7.
 [8] FARINA F, SANCINI G, MANTECCA P, et al. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection[J]. Toxicol Lett, 2011,202(3):209-217.
 [9] FEHRENBACH H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited[J]. Respir Res, 2001,2(1):33-46.
 [10] SHVEDOVA A A, KISIN E, MURRAY A R, et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008,295(4):552-565.
 [11] 张文丽,崔九思,戚其平.空气颗粒物(PM_{2.5})生物效应指标研究进展[J].卫生研究,2001,30(6):379-382.
 [12] 舒琴.魔芋精粉对高脂血症大鼠血清及肝脏内MDA、SOD的影响[J].河南中医,2013,33(9):1433-1434.
 [13] 黄耀生.加味止咳散治疗“雾霾咳嗽”疗效观察(附145例对比报告)[J].浙江中医药大学学报,2014,38(6):730-732.
 [14] 单进军,邹霞霜,徐建亚,等.桔梗汤的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):304-306.
 [15] 陈婧,方建国,吴方建,等.鱼腥草抗炎药理作用机制的研究进展[J].中草药,2014,45(2):284-289.
 [16] 李凤林.红景天苷药理作用的研究现状[J].现代食品科技,2013,29(4):916-921.
 [17] 韩雪娇,郭娜,朱美宣,等.红景天苷药理作用及其作用机理研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1):171-175.
 [18] 毕跃峰,符玲,王蒲菊,等.不同市售野菊花药材的RP-HPLC指纹图谱[J].郑州大学学报(理学版),2010,42(4):92-94.
 [19] 刘远俊,王双平,温娜,等.野菊花提取物活性及机理研究进展[J].广西中医药,2015,38(6):11-13.
 [20] 李国栋,陈园园,王盼,等.野菊花中萜类和黄酮类化合物保肝作用研究[J].中草药,2013,44(24):3510-3514.
 [21] 徐望龙,李云贵,孙林军,等.山银花黄酮粗提物抗氧化活性的体外观察[J].中成药,2014,36(6):1292-1294.
 [22] 周健鹏.荷叶化学成分和药理作用研究进展[J].天津药学,2014,26(2):65-68.
 [23] 陈曦,戚进.荷叶中黄酮和生物碱的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(18):211-214.
 [24] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010:188-189.

(本文编辑 李杰)