

· 药理 ·

肺痹汤2号调控AT2细胞内质网应激抵抗凋亡促进肺泡修复 改善小鼠肺纤维化的机制

蔡耀东¹, 贝佳凌², 韦婉³, 徐成岩², 刘艳丽², 王勇⁴, 焦扬^{3*}, 陈云^{2*}

(1. 北京中医药大学第二临床医学院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;
3. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 4. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨中药复方肺痹汤2号在特发性肺纤维化中的干预机制,聚焦其对肺泡Ⅱ型上皮细胞(AT2)内质网应激、凋亡、干性维持及再生修复能力的影响,验证“宗气衰微-肺泡痿痹”理论的现代转化路径。方法:采用博来霉素(BLM)诱导小鼠肺纤维化模型,设空白组,模型组与肺痹汤2号低、高剂量组(9.1、18.2 g·kg⁻¹)及醋酸泼尼松龙组(6.5 mg·kg⁻¹)。通过苏木素-伊红(HE)及马松(Masson)染色评估肺组织结构变化及胶原沉积情况,采用碱水解法测量羟脯氨酸(HYP)含量,测量肺系数及肺功能指标。应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测纤维化相关因子[胶原蛋白Ⅰ型α1链(Col I α1)、α平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、金属蛋白酶组织抑制剂1(Timp1)]mRNA表达水平。使用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)评估细胞凋亡,表面活性蛋白C(SPC)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)双染免疫荧光法进一步评估AT2细胞凋亡,SPC和蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)双染检测AT2细胞内质网应激情况,透射电镜观察AT2细胞内质网及板层小体超微结构变化。通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测内质网应激及凋亡通路关键蛋白PERK、激活转录因子4(Atf4)及Caspase-3表达情况。通过双染免疫荧光标记SPC和Ki-67抗原(Ki-67)分析AT2细胞增殖能力,利用谱系追踪技术(GFP⁺小鼠)联合Krt8标记检测分化中间状态,并观察AT2细胞向肺泡Ⅰ型上皮细胞(AT1)细胞形态的转化。结果:BLM诱导后小鼠出现显著肺组织结构破坏、胶原沉积增加、肺系数升高、肺功能下降和纤维化因子上调($P<0.01$)。高剂量肺痹汤2号干预可显著改善肺组织损伤与功能障碍,显著降低HYP含量($P<0.01$),显著下调Col I α1、α-SMA、Timp1表达($P<0.01$)。凋亡分析显示模型组TUNEL阳性细胞比例上升,AT2细胞Caspase-3阳性率显著增加,而高剂量组显著降低。透射电镜下AT2细胞内质网结构肿胀,给药治疗后趋于正常;PERK蛋白质染色分析发现模型组AT2细胞内质网应激明显,给药组显著缓解。模型组中内质网应激相关蛋白PERK、Atf4及凋亡蛋白Caspase-3的表达升高,给药后可显著降低。透射电镜下模型组板层小体结构紊乱,治疗组趋于恢复。AT2细胞增殖能力方面,治疗组Ki-67⁺SPC⁺细胞比例显著上升($P<0.01$)。谱系追踪显示模型组角蛋白8阳性绿色荧光蛋白阳性(Krt8⁺GFP⁺)细胞占比升高,提示分化阻滞;治疗组该比例显著下降,同时GFP⁺细胞形态向扁平延展转变,提示分化向AT1方向恢复。结论:肺痹汤2号通过缓解AT2细胞内质网应激,减少AT2细胞凋亡、恢复其板层小体结构与功能、增强其增殖活性、缓解分化阻滞促进其向AT1细胞分化,从而修复肺泡有效阻断肺纤维化的进展。其“复宗气、和气血、通肺络”的中医治疗机制与现代AT2干细胞调控路径高度契合,为中药干预IPF提供了新理论与实验依据。

[关键词] 特发性肺纤维化; 再生阻滞; 凋亡; 内质网应激; 干性; 宗气; 肺痹汤2号

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0080-13

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252509

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260108.1053.004>

[网络出版日期] 2026-01-08 13:51:22 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Mechanism of Number 2 Feibi Recipe in Ameliorating Pulmonary Fibrosis in Mice by Modulating Endoplasmic Reticulum Stress in AT2 Cells to Attenuate Apoptosis and Promote Alveolar Repair

CAI Yaodong¹, BEI Jialing², WEI Wan³, XU Chengyan², LIU Yanli²,

[收稿日期] 2025-09-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8220143109);北京市自然科学基金项目(7252239);中央高校基本科研业务费专项(2024-JYB-JBZD-057)

[第一作者] 蔡耀东,在读博士,从事肺系疑难病诊疗研究,E-mail:20230941287@bucm.edu.cn

[通信作者] *焦扬,博士,主任医师,教授,博士生导师,从事肺系疑难病诊疗研究,E-mail:yangjiao2013@sina.cn;

*陈云,博士,副教授,硕士生导师,从事中医药治疗肺相关疾病的机制研究,E-mail:chenyun6@bucm.edu.cn

WANG Yong⁴, JIAO Yang^{3*}, CHEN Yun^{2*}

(1. *The Second Clinical Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China*; 2. *College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*; 3. *Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China*; 4. *Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intervention mechanism of the traditional Chinese medicine Number 2 Feibi recipe (N2FBR) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), focusing on its effects on endoplasmic reticulum (ER) stress, apoptosis, stemness maintenance, and regenerative capacity of alveolar type II epithelial cells (AT2 cells), and to validate the modern translational pathway of the theory of "deficiency of Zong Qi leading to pulmonary atelectasis and atrophy". **Methods:** A mouse model of pulmonary fibrosis was induced by bleomycin (BLM). Mice were randomly divided into blank control, model, low-, and high-dose N2FBR intervention groups (9.1, 18.2 g·kg⁻¹), and prednisolone intervention group (6.5 mg·kg⁻¹). Pulmonary histopathological changes and collagen deposition were evaluated using hematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome staining. Hydroxyproline (HYP) content was measured by the alkaline hydrolysis method. Lung coefficient and pulmonary function parameters were evaluated. The mRNA expression levels of fibrosis-related factors, including collagen type I alpha 1 chain (Col1a1), alpha-smooth muscle actin (α -SMA), and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (Timp1), were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). Cell apoptosis was assessed using the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Apoptosis of AT2 cells was further evaluated by double immunofluorescence staining for surfactant protein C (SPC) and cysteine-aspartic protease-3 (Caspase-3). Endoplasmic reticulum (ER) stress in AT2 cells was examined by double staining for SPC and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). Ultrastructural changes of ER and lamellar bodies in AT2 cells were observed by transmission electron microscopy (TEM). The expression levels of key proteins involved in ER stress and apoptosis pathways, including PERK, activating transcription factor 4 (ATF4), and Caspase-3, were detected by Western blot. Double immunofluorescence staining of SPC and Ki-67 antigen (Ki-67) was performed to evaluate the proliferative capacity of AT2 cells. Lineage tracing technology (labeling AT2 cells with GFP) combined with Krt8 labeling was used to evaluate intermediate differentiation states, and morphological transformation of AT2 cells into alveolar type I epithelial cells (AT1) was observed. **Results:** BLM-induced mice exhibited significant structural disruption of lung tissue, increased collagen deposition, elevated lung coefficient, decreased pulmonary function, and upregulation of fibrosis-related factors ($P < 0.01$). High-dose N2FBR treatment significantly ameliorated lung tissue damage and dysfunction, significantly reduced HYP content ($P < 0.01$), and significantly downregulated Col1a1, α -SMA, and Timp1 expression ($P < 0.01$). Apoptosis analysis showed increased TUNEL-positive and Caspase-3-positive AT2 cells in the model group, which was significantly reduced by high-dose N2FBR treatment. TEM revealed swollen ER structures in AT2 cells of the model group, which tended to return to normal following treatment. PERK protein staining analysis showed evident ER stress in AT2 cells of the model group, which were markedly alleviated in the treatment group. The expression levels of ER stress-related proteins PERK and ATF4, as well as the apoptosis-related protein Caspase-3, were elevated in the model group and significantly reduced after treatment. TEM also revealed disrupted lamellar body structures in the model group, which tended to recover in the treatment group. Regarding the proliferative capacity of AT2 cells, the proportion of Ki-67⁺SPC⁺ AT2 cells significantly increased in the treatment group ($P < 0.01$). Lineage tracing showed that the proportion of keratin 8-positive green fluorescent protein-positive (Krt8⁺GFP⁺) cells increased in the model group, indicating differentiation arrest. This proportion was significantly reduced in the treatment group, and the morphology of GFP⁺ cells exhibited a flattened, extended shape, suggesting restored differentiation toward AT1 cells. **Conclusion:** N2FBR alleviates ER stress in AT2 cells, reduces AT2 cell apoptosis, restores lamellar body structure and function, enhances proliferation activity, and alleviates differentiation arrest to promote differentiation into AT1 cells, thereby repairing the alveolar epithelium and effectively blocking the progression of pulmonary fibrosis. Its traditional Chinese medicine mechanism of "replenishing Zong Qi, harmonizing Qi and blood, and unblocking pulmonary meridians" closely aligns with the modern regulatory pathway of AT2 stem cells, providing a novel theoretical basis and experimental evidence for the intervention of IPF with traditional Chinese medicine.

[Keywords] idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); regenerative arrest; apoptosis; endoplasmic reticulum (ER) stress; stemness; Zong Qi; Number 2 Feibi recipe

肺纤维化(PF)是一类以肺泡损伤、组织重构与纤维沉积为特征的间质性肺疾病,最终可致肺功能衰竭,严重威胁生命安全。特发性肺纤维化(IPF)作为最常见亚型,其病因未明,发病隐匿,进展迅速,缺乏有效治疗手段^[1-2]。近年来研究发现,肺泡II型

上皮细胞(AT2)作为肺泡干细胞,是肺泡再生修复的关键,其损伤与功能障碍是纤维化持续进展的重要驱动^[3-7]。

肺损伤后,AT2细胞可增殖并分化为肺泡I型上皮细胞(AT1)细胞,以重建气体交换屏障并恢复

肺泡功能^[8-10]。然而在纤维化微环境中,AT2细胞常因氧化应激及代谢紊乱而陷入内质网应激(ERS)状态^[11],激活蛋白激酶R样内质网激酶-真核翻译起始因子2 α -激活转录因子4-C/EBP同源蛋白(PERK-eIF2 α /Atf4-CHOP)信号通路,诱导程序性细胞死亡^[12],导致干性丧失、分化受阻^[13-14],既无法修复肺泡结构,又释放促纤维化信号,加剧病情进展^[15-16]。因此,缓解ERS、维持AT2细胞干性,是当前抗纤维化研究的重要方向。

中医学认为IPF属“本虚标实”之证,核心病机可概括为“宗气衰微,肺泡痿痹”。《灵枢·邪客》云:“宗气积于胸中,出于喉咙,以贯心脉,而行呼吸焉”,可见宗气主司呼吸、助心行血,是维持气体交换、气血运行的关键。而宗气由肺之清气与脾胃运化之精微合化而成,PF患者肺功能进行性降低,肺之清气固少;又肺动脉高压,肺络痹阻,脾胃运化之精微难布,宗气衰微之势已成,又负反馈于其司呼吸、助心行血之功能,必致气血失和,营养供能障碍,使肺泡局部陷入“虚、瘀、毒”的“痿痹”状态。现代视角下,肺泡上皮主司气体交换,而AT2细胞在肺泡损伤后启动修复过程,是维持气血通畅的关键;若AT2细胞凋亡发生、干性丧失,则肺泡修复失败,肺表面张力升高,结构易塌陷,促进纤维结节形成,与“宗气衰微、肺泡痿痹”高度契合。提出“宗气衰微-肺泡痿痹”理论模型,认为宗气虚衰导致气血失和、肺泡再生障碍,是IPF演进中的核心机制,亦为中医与现代病理的联结点。

“肺痹汤2号”源自《辨证录》“肺痹”原方,具有“益气通络、清热解毒、活血化瘀”等功效,临床用于PF治疗^[17-18]。前期研究证实其可改善小鼠肺功能、抑制炎症与纤维化因子表达^[19-21];并激活AT2细胞增殖,改善干性障碍^[22]。但其是否通过调控AT2细胞的ERS与凋亡机制以实现肺泡修复,仍有待系统验证。

本研究从“凋亡-干性-修复”三位一体的角度出发,结合组织学、分子生物学及谱系追踪手段,探讨肺痹汤2号对AT2细胞内质网应激、凋亡、干性维持及肺泡重建的作用机制,旨在进一步揭示“宗气衰微-肺泡痿痹论”理论桥梁在纤维化干预中的科学价值,为中药靶向成体干细胞功能提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 35只SPF级雄性C57BL/6J小鼠,8~10周龄,体质量22~24g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2024-0001。

Sftpc-CreER^{T2}和Rosa26-ZsGreen小鼠购买及饲养繁殖于赛业(固安)生物科技有限公司,合格证号SCXK(冀)2021-003,杂交获得20只*Sftpc*-CreER^{T2};Rosa26-ZsGreen的C57BL/6J小鼠;使用前2周,按75mg·kg⁻¹剂量隔日腹腔注射他莫昔芬,对AT2细胞进行谱系追踪标记。动物饲养于北京中医药大学良乡校区SPF级实验动物中心,许可证号SYXK(京)2023-0011。饲养温度为22~24℃,湿度50%~60%,12h昼夜交替循环,给予动物自由进食和饮水,所有实验小鼠适应性饲养1周后用于实验。

1.2 伦理 本实验研究通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审查,伦理编号BUCM-2024052801-2135,实验操作严格遵循动物伦理学指导原则。

1.3 药物 肺痹汤2号由生黄芪30g、丹参20g、生甘草10g(北京本草方源药业集团有限公司,批号分别为20240128、20240122、20240131),金银花30g、黄芩20g(北京人卫中药饮片公司,批号分别为24062507、24031404),红景天30g(河北橘井药业有限公司,批号355231003)配伍而成。饮片均购自北京中医药大学东方医院中药房,经东方医院中药房何婷副主任药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》标准,饮片加水没过3~5cm,浸泡40min,煎煮1h倒出药液,再加水没过药渣,煎煮1h倒出药液,2次药液合并进行浓缩,煮药与浓缩均是大火煮开后微火慢熬,经煎煮浓缩后制备成含生药量0.91、1.82g·mL⁻¹的药液,按小鼠实际体质量给药灌胃,每10g灌胃0.1mL药液,药液配置好后置于冰箱保存。博来霉素(美国MCE公司,批号HY-17565A)。醋酸泼尼松龙(Prednisolone)注射液(浙江仙琚制药股份有限公司,批号KA2302,规格0.125g/5mL)。

1.4 试剂 他莫昔芬(美国Sigma公司,批号T5648-1G,规格1g/瓶);总RNA提取试剂(TRIZOL)、原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(美国Invitrogen公司,批号分别为10057821、C10617);HiScript III All-in-one RT SuperMix for实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)反转录试剂盒、Taq Pro Universal SYBR Real-time PCR Master Mix试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司,批号分别为7E1672D5、7E0982K4);马松(Masson)三色染色试剂盒、戊二醛固定液(Gluta,电镜专用,2.5%)(北京索莱宝有限公司,批号分别为G1340、P1126);苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、

柠檬酸(pH6.0)抗原修复液、自发荧光淬灭剂、磷酸盐缓冲液(PBS)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)、抗荧光淬灭封片剂、增殖标志物Ki-67抗体(武汉塞维尔科技生物有限公司,批号分别为G1076-500ML、G1202、G1221、G0002、G1012、G1401、GB111499);牛血清白蛋白(BSA,厦门百傲鲨国际贸易有限公司,批号BS114);表面活性蛋白C(SPC)抗体、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为10774-1-AP、24390-1);胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、角蛋白8(Krt8)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab214430、ab55407、ab181602);激活转录因子4(ATF4)抗体(爱必信生物科技有限公司,批号DF6008);放射免疫沉淀法缓冲液(RIPA)蛋白裂解液、5倍浓缩上样缓冲液(5×Loading buffer)、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量试剂盒(美国CST公司,批号分别为#9806、#7722、#7780);苯甲磺酰氟(PMSF,罗氏Roche公司,批号10837091001);一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒(北京雅酶生物科技有限公司,批号039711800);ECL发光液(德国Millipore公司,批号WBKLS0500);蛋白免疫印迹法(Western blot)一抗二抗去除液(碧云天生物技术有限公司,批号P0025);羟脯氨酸酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,货号A0302-2-1)。

1.5 仪器 EMMS Forced Maneuvers型肺功能仪器(成都佳驰电子科技股份有限公司);BSA224S型精密电子天平(德国Sartorius公司);NanoDrop Lite型微量分光光度计(美国Thermo Scientific公司);CFX Duet型PCR热循环仪和Real-time PCR仪、Mini Protean Tetra垂直电泳槽、Mini Trans Blot转印槽、Powerpac Basic型电泳仪(美国Bio-Rad公司);JK-6型组织摊片机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);188105型载玻片、10212432C型盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司);E100型荧光显微镜(日本Nikon公司);JEM-ACE200F型透射电子显微镜(日本Jeol公司);5424R型低温冷冻离心机(德国Eppendorf公司);SN257300型酶标仪(美国BioTek公司);TS-2型水平脱色摇床(其林贝尔仪器制造有限公司);OI-X6 Touch型化学发光仪(广州光仪科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药 采用随机数字表法选

取6只小鼠作为空白(Control)组,将剩余小鼠采用气管内滴注BLM的方式构建小鼠PF模型^[23],先通过腹腔注射0.5%的戊巴比妥钠实施麻醉后,将小鼠仰卧固定于造模板上,用聚光灯垂直照射小鼠胸腔部位,左手持无菌钝镊轻轻夹出小鼠舌头,充分暴露小鼠口腔,喉咙深处可见气管口随呼吸张合,右手持静脉留滞针软管在气管口张开时插进,用移液枪往管中滴注配好的BLM溶液(给药剂量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),将造模板竖起使小鼠直立,静置数分钟,取下小鼠轻轻摇晃,以使BLM更好分散于肺中。

造模成功的判断依据:为了确保PF模型建立成功,本研究在建模第14天及第21天分别取样,判断造模效果,具体依据包括①肺组织形态学改变:HE染色显示肺泡结构明显破坏,炎性细胞浸润,Masson染色提示胶原沉积显著增加。②肺系数变化:模型(Model)组小鼠肺/体质量比值明显高于Control组。③肺功能下降:小鼠的用力肺活量(FVC)和肺总量(TLC)减少。④分子生物学指标:胶原蛋白I型 $\alpha 1$ 链(Col I $\alpha 1$)、 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、金属蛋白酶组织抑制剂1(Timp1)基因表达上调;羟脯氨酸含量上升。

时间点选择依据说明:实验设计中选择第14天与第21天分别作为观察与干预效果评价的关键时间点,基于以下理论与文献依据^[23]。①第7~14天为炎症向纤维化过渡的关键阶段,此阶段AT2细胞凋亡、炎症信号活跃,干预有助于阻断纤维化进展;②第21天纤维化程度稳定,形成纤维结节,胶原沉积明显,更能反映药物对已成纤维组织的缓解能力。

将BLM造模后的C57BL/6J小鼠随机分为Model组、肺痹汤2号低剂量(N2FBR-L)组、肺痹汤2号高剂量(N2FBR-H)组和醋酸泼尼松龙(Prednisolone)组,Control组小鼠气管内滴注生理盐水作为Control组。灌胃给药:N2FBR-L组($9.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),N2FBR-H组($18.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),Control组和模型组灌胃同等体积的纯水。腹腔注射给药:Prednisolone组($6.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续治疗21 d。课题组前期已运用高效液相色谱法分析肺痹汤2号的指纹图谱见增强出版附加材料,符合质量控制标准,肺痹汤2号和醋酸泼尼松龙的给药剂量均根据临床治疗剂量等效换算。

2.2 小鼠一般状态观察 造模前、造模后每隔3 d及取材前,分别称体质量并记录小鼠体质量变化情况;同时观察并记录小鼠呼吸状态,进食状况,精神

及活动情况,皮毛情况(皮毛光泽度,顺滑度,有无脱毛)等。

2.3 肺功能检测 通过腹腔注射0.5%的戊巴比妥钠实施麻醉后,用手术剪在颈部皮肤处剪开一纵向切口,钝性分离见气管后在气管上剪开一横向切口,轻柔插入肺功能仪插管,并对小鼠的FVC、TLC进行检测。

2.4 取材 肺功能检测结束后,固定小鼠打开全胸,用静脉针将生理盐水注射液从右心室灌入冲洗,直至肺组织变白,流出液体无明显血液,取出小鼠肺组织擦干表面水分,称量肺组织质量后,左肺放入4%的多聚甲醛溶液中于4℃固定24 h以上,用于病理形态学检测及免疫荧光染色;右肺后叶放入TRIzol试剂中保存于-20℃,用于Real-time PCR检测;右肺前叶组织取一小部分冰上裁剪成1 mm³见方的组织块,迅速用2.5%戊二醛固定,用于制作透射电镜样本;其余液氮速冻后存-80℃冰箱,用于后期羟脯氨酸含量测定及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测。

2.5 肺系数检测 根据小鼠肺组织质量及体质量,计算小鼠的肺系数,即肺组织质量(g)与小鼠体质量(kg)的比值,间接评价小鼠肺组织炎症水肿及纤维化程度。

2.6 肺组织羟脯氨酸含量测定 按照羟脯氨酸碱水解法测试试剂盒说明书操作测定肺组织羟脯氨酸含量,先剪取适量小鼠右肺组织,准确称量并记录组织湿量,然后进行组织水解,调节pH后,加入反应试剂,上机测定各组吸光度A,计算羟脯氨酸含量。

2.7 HE及Masson染色检测肺组织病理形态学变化 在4%组织细胞固定液中,将肺组织进行充分固定后,进行脱水及浸蜡包埋,切片用以制作病理切片。依据染色步骤,分别用HE染色技术及Masson染色技术,对石蜡切片进行染色,脱水后经二甲苯溶液浸泡透明后封片,显微镜下镜检。

2.8 TUNEL染色检测肺组织凋亡情况 将小鼠肺组织石蜡切片,脱蜡复水后,参照TUNEL染色试剂盒说明书操作,经TUNEL标记后,用3,3'-二氨基联苯胺(DBA)显色,苏木素复染,干燥封片后进行镜检。

2.9 免疫荧光染色 将小鼠肺组织石蜡切片脱蜡至水后修复抗原,滴加牛血清封闭液,室温封闭20 min后滴加相应SPC(1:1 000)、Caspase-3(1:200)、PERK(1:400)、Ki-67(1:500)、Krt8(70:182)、

GAPDH(1:15 000)一抗,于湿盒内4℃孵育过夜;经PBS洗涤后加入二抗避光室温孵育50 min,用DAPI复染细胞核,封片后进行镜检。

2.10 透射电镜观察小鼠肺组织AT2细胞内质网及板层小体的形态变化 将固定好的电镜样本取出后用PBS冲洗后,使用乙醇梯度脱水。将样品嵌入环氧树脂中包埋并热固化过夜,然后切成90 nm厚的片,铀-铅双染各5 min,铜网捞片,透射电镜在LOWMAG定位-低剂量模式下观察并拍摄高分辨图像。

2.11 Real-time PCR检测肺组织相关mRNA的表达 使用TRIzol法提取肺组织总RNA,测定RNA浓度及纯度后,按说明书逆转录为cDNA,逆转录条件:37℃(15 min),85℃(5 s)。以cDNA为模板,使用SYBR Green荧光染料,在Real-time PCR仪上进行扩增反应。反应条件:95℃预变性10 min后循环43次,循环条件为95℃(15 s),60℃(60 s)。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因表达作为内参,采用2^{-ΔΔC_t}的方法计算目的基因的mRNA相对表达水平。引物胶原蛋白I型α1链(Col I α1)、α-SMA和金属蛋白酶组织抑制剂1(Timp1)合成于生工生物工程(上海)股份有限公司,具体引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 AGGTCGGGTGTAACGGATTG	122
	下游 TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
Col I α1	上游 GCTCCTCTTAGGGGCCACT	103
	下游 CCACGTCTCACCATTGGGG	
α-SMA	上游 GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	102
	下游 TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	
Timp1	上游 GCAACTCGGACCTGGTCATAA	226
	下游 CGGCCCGTGATGAGAACT	

2.12 Western blot检测小鼠肺组织相关蛋白表达情况 用组织破碎仪粉碎组织,加入RIPA裂解液,4℃、12 000×g离心20 min后收集总蛋白,BCA定量,一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒制胶,5×Loading Buffer变性后上样,电泳(120 V,1 h),转膜(300 mA,1.5 h)室温封闭1 h,采用Caspase-3(1:2 000)、PERK(1:500)、Atf4(1:1 000)抗体于4℃孵育过夜,二抗(1:10 000),室温孵育2 h,应用ECL发光液于化学发光仪进行曝光,显影得到清晰明显的蛋白质条带,以

GAPDH蛋白作为内参对照, Image J分析条带灰度值, 计算目的蛋白质的相对表达量。

2.13 统计学方法 运用IBM SPSS Statistics 20软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据经Shapiro-Wilk检验证实服从正态分布, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐性通过Levene's检验进行评估。若方差齐, 则采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较, 事后两两比较采用Tukey检验; 若方差不齐, 则采用Welch方差分析, 事后两两比较采用Games-Howell检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺痹汤2号对PF小鼠表观一般状况的影响 Control组小鼠整体精神状态良好, 活动度高, 进食饮水正常, 毛色光亮润泽, 体质量呈持续上升趋势, 表现出健康状态。Model组小鼠在造模后迅速出现明显异常, 表现为精神萎靡, 活动减少, 常蜷缩静卧, 喜成团聚集, 进食与饮水量明显下降, 体质量持续减轻, 部分小鼠可见胯骨突出, 毛发粗乱、色泽黯淡, 呼吸频率明显加快, 个别小鼠可听及痰鸣音, 提示肺部功能明显受损。N2FBR-H组及Prednisolone组小鼠在造模前期亦出现精神状态减退, 活动减少, 喜静少动等症状, 个别小鼠表现出蜷缩于角落, 不愿活动, 伴随进食与饮水量减少、体质量

下降, 毛发光泽度降低。至造模后第14天, 两组小鼠整体状态趋于稳定, 体质量下降幅度减缓, 部分个体体质量出现回升, 且未观察到明显呼吸急促或喘鸣等症状, 提示病理状态较Model组有所缓解。N2FBR-L组小鼠精神状态尚可, 对外界刺激反应敏捷, 但体质量下降趋势较N2FBR-H组更为显著。部分小鼠状态接近Model组, 可见呼吸频率加快, 提示不同剂量干预下改善效果存在差异。

3.2 肺痹汤2号对PF小鼠肺功能的影响 造模后第21天, 检测各组小鼠的肺功能指标。与Control组比较, Model组小鼠的FVC、TLC显著降低($P < 0.01$), 提示其肺功能显著受损; 与Model组比较, N2FBR-L组小鼠的FVC明显升高($P < 0.05$), 肺功能有所改善; N2FBR-H组及Prednisolone组小鼠的FVC、TLC显著升高($P < 0.01$), 说明其肺功能得到有效改善。见表2。

3.3 肺痹汤2号对PF小鼠肺系数的影响 造模后第21天, 检测各组小鼠的肺系数。与Control组比较, Model组小鼠的肺系数显著升高($P < 0.01$), 提示肺组织存在明显炎症与病理性增重; 与Model组比较, N2FBR-L组小鼠的肺系数无明显变化; N2FBR-H组及Prednisolone组小鼠的肺系数显著降低($P < 0.01$), 说明给药后可有效减轻肺组织病理性增重和炎症反应。见表2。

表2 肺痹汤2号对PF小鼠肺功能及肺系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Number 2 Feibi recipe (N2FBR) on lung function and lung coefficient of PF mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	FVC/mL	TLC/mL	肺系数/g·kg ⁻¹
Control组		0.77±0.02	1.08±0.03	5.67±0.18
Model组		0.41±0.05 ¹⁾	0.41±0.05 ¹⁾	11.31±0.53 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	0.49±0.01 ²⁾	0.47±0.04	10.56±0.97
N2FBR-H组	18.2	0.71±0.06 ³⁾	1.08±0.02 ³⁾	6.31±0.23 ³⁾
Prednisolone组	0.006 5	0.61±0.06 ³⁾	0.97±0.13 ³⁾	6.91±0.43 ³⁾

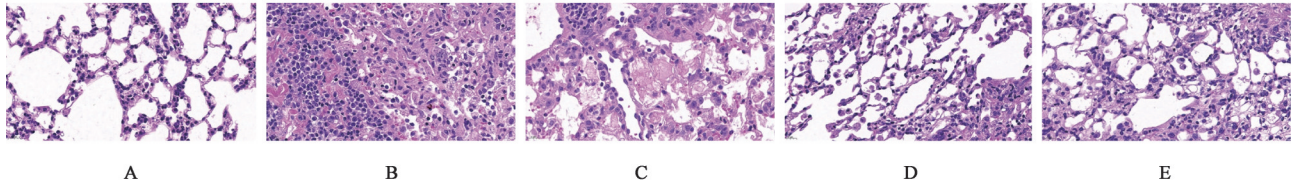
注: 与Control组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与Model组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表3-表9同)

3.4 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织病理的影响 HE染色结果显示, Control组小鼠肺泡结构清晰完整, 肺泡间隔薄, 未见明显炎症细胞浸润或纤维组织增生; 与Control组比较, Model组肺泡结构破坏严重, 肺泡坍塌或融合, 间质显著增厚, 炎症细胞广泛浸润, 并可见明显胶原纤维沉积; 与Model组比较, N2FBR-L组的肺组织损伤仍较严重, N2FBR-H组和Prednisolone组肺组织病变程度明显减轻, 肺泡结构基本恢复完整, 间质增厚和炎症细胞浸润明显减少。见图1。

Masson染色结果显示, Control组小鼠肺组织间质中胶原纤维极少; 与Control组比较, Model组小鼠肺组织中可见大量蓝色胶原纤维沉积, 提示肺组织纤维化严重; 与Model组比较, N2FBR-L组的胶原沉积略有减少, 肺泡结构有所改善, N2FBR-H组和Prednisolone组的胶原沉积明显减少。见图2。

3.5 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织纤维化的影响

3.5.1 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织纤维化相关因子mRNA表达的影响 造模后第21天, 与Control组比较, Model组小鼠肺组织中Col I a1、 α -SMA和



注:A.Control组;B.Model组;C.N2FBR-L组;D.N2FBR-H组;E.Prednisolone组(图2-图11同)

图1 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织病理形态的影响(HE,×50)

Fig. 1 Effect of N2FBR on histopathological changes in lung tissues of PF mice (HE, ×50)

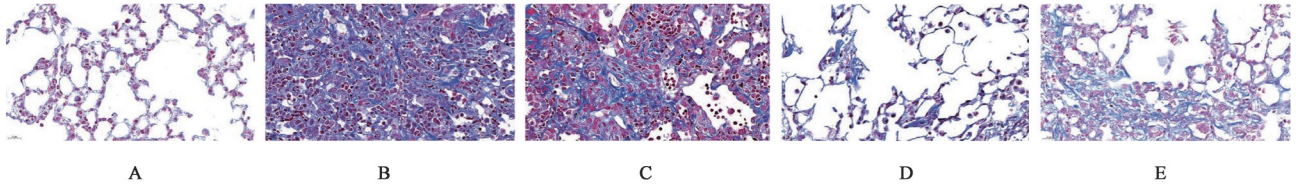


图2 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织病理形态的影响(Masson,×50)

Fig. 2 Effect of N2FBR on histopathological changes in lung tissues of PF mice (Masson, ×50)

Timpl 表达显著升高($P<0.01$);与 Model 组比较, N2FBR-L、N2FBR-H 及 Prednisolone 处理均能显著下调 Col I a1、 α -SMA 和 Timpl 表达($P<0.01$)。见表3。

3.5.2 肺痹汤2号对各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量的影响 造模后第21天,检测各组小鼠肺组织的羟

脯氨酸。与 Control 组比较, Model 组小鼠肺组织羟脯氨酸含量显著升高($P<0.01$),提示肺组织胶原蛋白沉积明显增多;与 Model 组比较, N2FBR-L、N2FBR-H 组及 Prednisolone 组小鼠肺组织羟脯氨酸含量均显著降低($P<0.01$),提示药物干预可有效缓解肺组织胶原蛋白沉积。见表3。

表3 肺痹汤2号对PF小鼠纤维化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 3 Effect of N2FBR on fibrosis indicators of PF mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Col I a1 mRNA	α -SMA mRNA	Timpl mRNA	羟脯氨酸/mg·g ⁻¹
Control组		1.00±0.04	1.00±0.18	1.00±0.20	0.24±0.02
Model组		7.58±1.21 ¹⁾	2.68±0.31 ¹⁾	20.42±2.29 ¹⁾	1.02±0.09 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	4.03±1.22 ³⁾	1.80±0.09 ³⁾	14.36±1.56 ³⁾	0.86±0.03 ³⁾
N2FBR-H组	18.2	1.82±0.49 ³⁾	1.18±0.16 ³⁾	4.33±1.23 ³⁾	0.58±0.01 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	2.78±0.43 ³⁾	1.56±0.23 ³⁾	8.15±0.54 ³⁾	0.69±0.03 ³⁾

3.6 肺痹汤2号对各组小鼠肺组织AT2细胞凋亡的影响

3.6.1 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织TUNEL染色的影响 造模后第14天,对小鼠肺组织进行TUNEL染色以评估细胞凋亡情况。结果显示,Control组小鼠肺组织中几乎未见TUNEL染色阳性细胞;与Control组比较,Model组TUNEL染色阳性细胞数显著增加,表明BLM显著诱导细胞凋亡($P<0.01$);与Model组比较, N2FBR-L、N2FBR-H组及 Prednisolone 组可明显降低凋亡细胞比例($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表4。

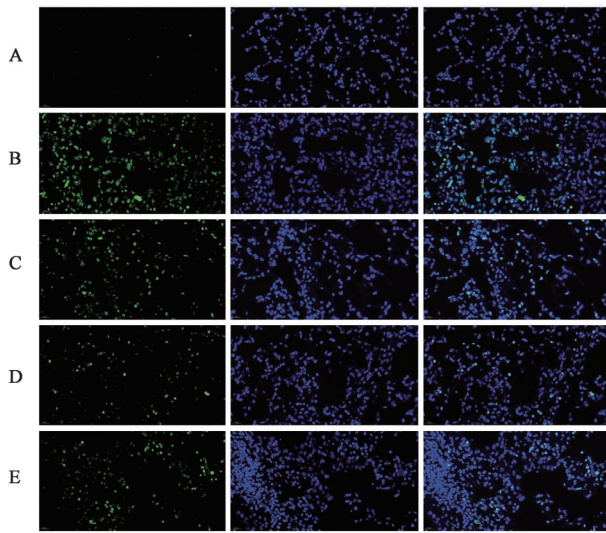
3.6.2 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞凋亡的影响

造模后第14天,通过SPC(AT2细胞特异性标志物)和Caspase-3(凋亡标志物)双重染色评估AT2细胞凋亡情况。结果显示,与Control组比较,Model组中发生凋亡的AT2细胞比例显著升高($P<0.01$);

与 Model 组比较, N2FBR-L、N2FBR-H 组及 Prednisolone 组显著减少 Caspase-3 阳性 AT2 细胞数量,提示其可有效减轻 AT2 细胞凋亡,缓解肺泡上皮细胞损伤($P<0.01$)。见表5、图4。

3.7 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织AT2细胞内质网应激的影响

3.7.1 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞内质网形态的影响 造模后第14天,通过透射电镜对AT2细胞的超微结构进行分析,观察发现,Control组AT2细胞胞质中内质网结构清晰,排列规则,呈扁平囊泡状,管腔较小,膜结构完整,未见明显扩张;Model组显示内质网结构紊乱,部分区域呈明显扩张、管腔增宽,膜结构模糊,提示内质网应激状态;N2FBR-L、N2FBR-H组及 Prednisolone 组的AT2细胞内质网形态较Model组明显改善,膜结构趋于完整,扩张程度



注:绿色为TUNEL染色阳性,蓝色为DAPI染核

图3 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织细胞凋亡情况的影响(TUNEL, ×50)

Fig. 3 Effect of N2FBR on apoptosis of lung cells of PF mice (TUNEL, ×50)

减轻。见图5。

3.7.2 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞PERK蛋白表达的影响 造模后第14天,通过SPC(AT2细胞特异性标志物)和PERK(内质网应激关键通路分子)双重染色评估AT2细胞内质网应激情况。结果显示,Control组的AT2细胞中几乎未见PERK表达,提示正常生理状态下内质网应激活性较低;与Control组比较,Model组AT2细胞中出现显著的PERK表达增强,差异具有统计学意义($P<0.01$),表

表4 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织细胞凋亡情况($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of N2FBR on apoptosis of lung cells of PF mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

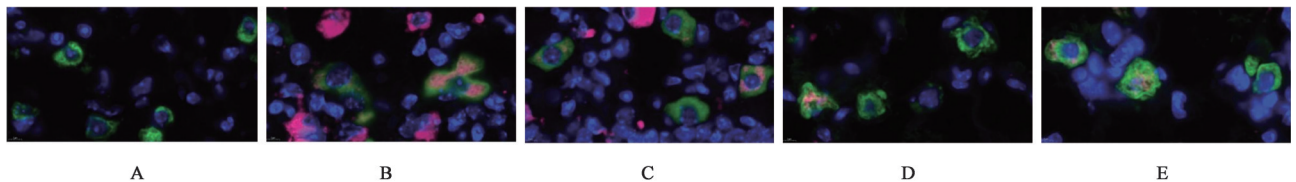
组别	剂量/g·kg ⁻¹	TUNEL+/%
Control组		8.46±0.29
Model组		84.60±4.13 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	65.58±0.97 ²⁾
N2FBR-H组	18.2	39.54±2.72 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	53.77±1.77 ³⁾

表5 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞凋亡情况的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of N2FBR on apoptosis of AT2 cells of PF mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3+SPC+/SPC+/%
Control组		7.25±1.38
Model组		87.41±3.57 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	74.52±2.16 ³⁾
N2FBR-H组	18.2	33.48±1.74 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	61.57±1.58 ³⁾

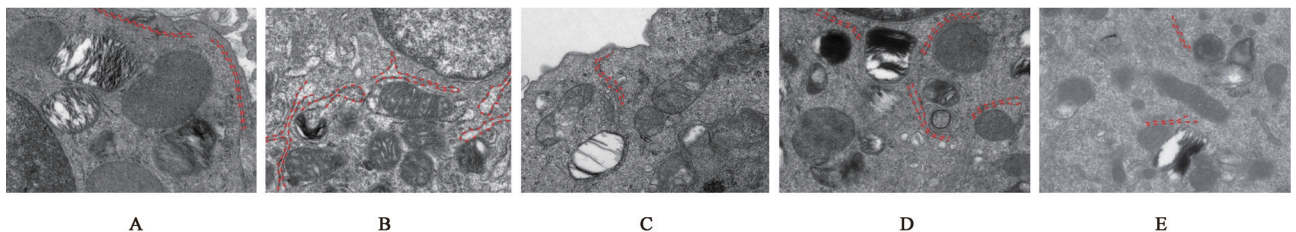
明BLM诱导损伤引发了明显的内质网应激反应;与Model组比较,N2FBR-L组及Prednisolone组可降低AT2细胞中PERK阳性信号水平;高剂量肺痹汤2号干预后,AT2细胞中PERK阳性信号显著减少,差异具有统计学意义($P<0.01$),表明中药干预可有效缓解内质网应激水平,可能有助于恢复AT2细胞稳态。见图6、表6。



注:绿色为SPC;红色为Caspase-3;蓝色为DAPI染核

图4 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞凋亡情况的影响(免疫荧光, ×200)

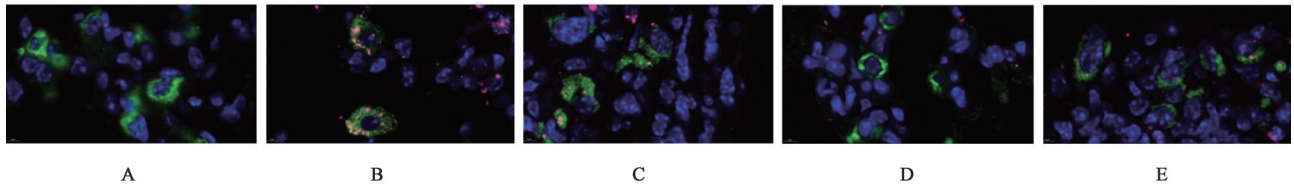
Fig. 4 Effect of N2FBR on apoptosis of AT2 cells of PF mice (IF, ×200)



注:红色虚线指示AT2细胞内质网轮廓

图5 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞内质网形态的影响(透射电镜, ×20 000)

Fig. 5 Effect of N2FBR on ultrastructural morphology of endoplasmic reticulum in AT2 cells of PF mice (TEM, ×20 000)



注:绿色为SPC;红色为PERK;蓝色为DAPI染核

图6 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞内质网应激情况的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 6 Effect of N2FBR on endoplasmic reticulum stress in AT2 cells of PF mice (IF, ×200)

表6 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞内质网应激情况的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of N2FBR on endoplasmic reticulum stress in AT2 cells of PF mice ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PERK+SPC+/SPC+/%
Control组		18.75±2.08
Model组		85.24±1.72 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	70.71±2.28 ³⁾
N2FBR-H组	18.2	31.53±1.68 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	55.03±1.20 ³⁾

3.7.3 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织内质网应激及凋亡通路关键蛋白质表达的影响 为进一步验证肺痹汤2号在组织水平上对内质网应激及凋亡的调控作用,本研究检测了关键应激通路蛋白PERK、Atf4及凋亡蛋白Caspase-3的表达变化。结果显示,与正常组比较,Model组中Caspase-3、PERK与Atf4蛋白水平显著升高($P<0.01$),提示内质网应激与凋亡明显激活。给予N2FBR-L与N2FBR-H干预后,上述蛋白质表达水平均明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),且N2FBR-H组作用更为显著($P<0.01$),表明肺痹汤2号可有效抑制AT2细胞的内质网应激激活与程序性细胞死亡。见图7、表7。

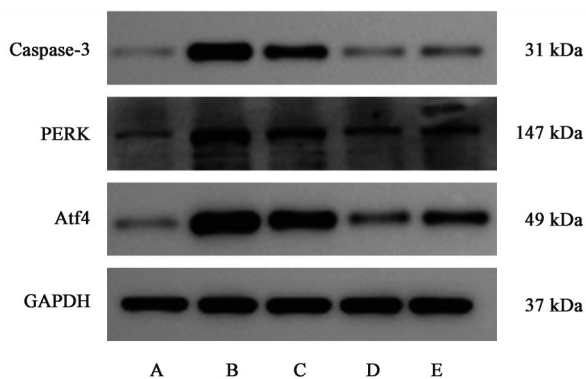


图7 各组小鼠肺组织内质网应激及凋亡通路关键蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of expression of key proteins in endoplasmic reticulum stress and apoptosis pathways in lung tissues of each group of mice

表7 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织内质网应激及凋亡通路关键蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 7 Effect of N2FBR on key ER stress and apoptosis-related protein expression in PF mice lung ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	Caspase-3 /GAPDH	PERK /GAPDH	Atf4 /GAPDH
Control组		0.18±0.04	0.37±0.02	0.40±0.01
Model组		1.05±0.02 ¹⁾	0.81±0.05 ¹⁾	1.44±0.02 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	0.73±0.02 ²⁾	0.65±0.03 ²⁾	1.32±0.00 ²⁾
N2FBR-H组	18.2	0.26±0.01 ³⁾	0.43±0.02 ³⁾	0.65±0.02 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	0.33±0.01 ³⁾	0.60±0.04 ³⁾	0.97±0.01 ³⁾

3.8 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织AT2细胞功能的影响

3.8.1 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织AT2细胞板层小体的影响 造模后第14天,通过透射电镜对AT2细胞的超微结构进行分析,观察发现,Control组AT2细胞的板层小体形态典型,呈致密、规则的同心圆样结构,电子密度均一,提示其具备良好的肺表面活性物质合成和分泌功能;Model组AT2细胞的板层小体形态出现结构松散、边界模糊,部分呈溶解或空泡样改变,缺乏典型的层状结构,提示AT2细胞发生明显损伤,肺表面活性物质合成功能受损,相关的细胞器结构亦受到影响;N2FBR-L组较Model组有所改善,但依然可见其板层小体结构紊乱及空泡样改变;N2FBR-H组及Prednisolone组AT2细胞板层小体结构较Model组明显改善,可见部分具有较为清晰的同心层片状结构,排列趋于规则,电子密度增强。见图8。

3.8.2 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞增殖的影响 造模后第14天,检测SPC阳性AT2细胞的增殖(Ki-67染色阳性)。结果显示,与Control组比较,Model组Ki-67阳性AT2细胞比例显著增加($P<0.01$);与Model组比较,N2FBR-L干预可提高Ki-67阳性AT2细胞比例;高剂量肺痹汤2号及Prednisolone干预后,该比例显著上升($P<0.01$)。见图9、表8。

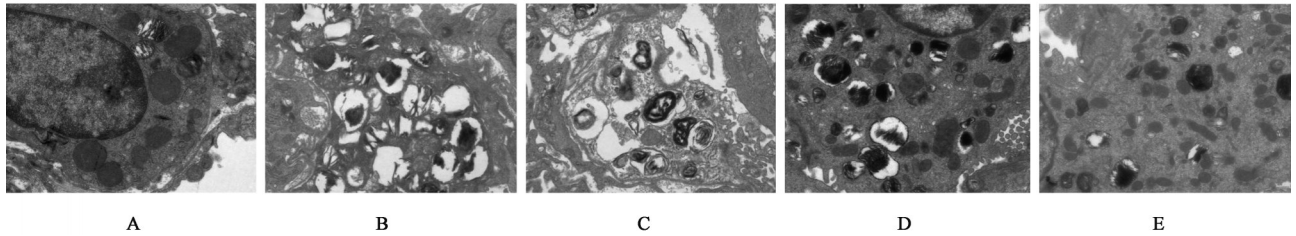
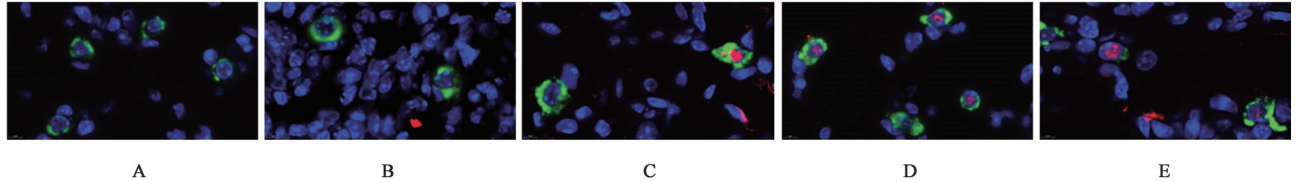


图8 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞板层小体形态的影响(透射电镜, ×8 000)

Fig. 8 Effect of N2FBR on ultrastructural morphology of lamellar bodies in AT2 cells of PF mice (TEM, ×8 000)



注:绿色为SPC;红色为Ki-67;蓝色为DAPI染核

图9 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞增殖情况的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 9 Effect of N2FBR on proliferation of AT2 cells of PF mice (IF, ×200)

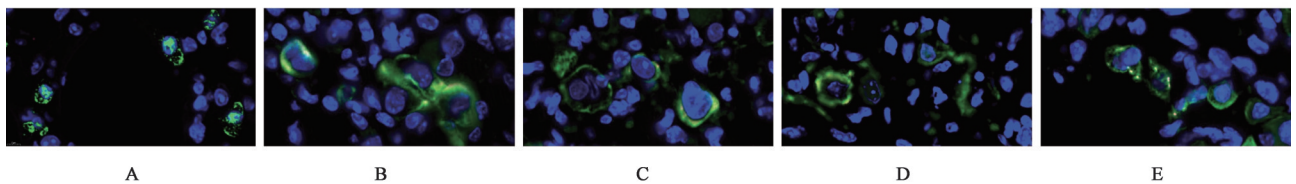
表8 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞增殖情况的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of N2FBR on proliferation of AT2 cells of PF mice

($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ki-67 ⁺ SPC ⁺ /SPC ⁺ /%
Control组		2.48±0.09
Model组		10.96±0.89 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	15.58±1.20 ³⁾
N2FBR-H组	18.2	27.60±0.81 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	19.86±1.05 ³⁾

3.8.3 肺痹汤2号对PF小鼠AT2细胞分化的影响 造模后第21天,对谱系追踪小鼠的AT2细胞(GFP标记)进行分化能力评估。结果显示,与Control组比较,Model组中处于分化中间状态的AT2细胞(Krt8染色阳性)比例显著升高($P<0.01$),提示BLM导致分化阻滞;与Model组比较,N2FBR-L组及Prednisolone组可降低Krt8阳性AT2细胞比例;N2FBR-H组可显著降低此比例($P<0.01$)。见图10、表9。



注:绿色为GFP标记的谱系追踪AT2细胞;红色为Krt8;蓝色为DAPI染核

图10 肺痹汤2号对PF小鼠谱系追踪AT2细胞Krt8表达情况的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 10 Effect of N2FBR on Krt8 expression in GFP-labeled AT2 cells of PF mice (IF, ×200)

表9 肺痹汤2号对PF小鼠谱系追踪AT2细胞Krt8表达情况的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of N2FBR on Krt8 expression in GFP-labeled AT2 cells of PF mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

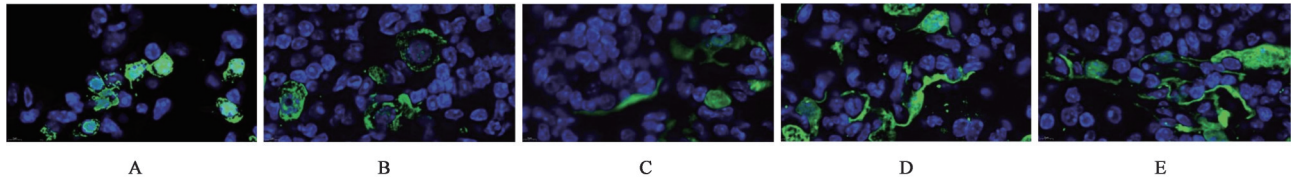
组别	剂量/g·kg ⁻¹	Krt8 ⁺ GFP ⁺ /GFP ⁺ /%
Control组		2.31±0.12
Model组		41.81±1.68 ¹⁾
N2FBR-L组	9.1	35.89±2.24 ³⁾
N2FBR-H组	18.2	23.47±1.64 ³⁾
Prednisone组	0.006 5	31.21±0.86 ³⁾

进一步观察AT2细胞的形态变化,Control组中GFP阳性细胞呈典型圆形;Model组中部分GFP阳

性细胞出现拉伸、展平形态,提示AT2细胞正在向AT1细胞表型分化,但形态异常,反映其功能障碍;N2FBR-L组可见少量形态延展拉长的GFP阳性细胞;N2FBR-H组及Prednisolone组中观察到更多细胞形态延展并贴近肺泡壁,呈现典型AT1细胞形态,说明中药治疗可促进AT2细胞的正常分化并恢复形态成熟。见图11。

4 讨论

IPF是一类进展性、不可逆的间质性肺病,其核心病理特征为反复的肺泡上皮损伤及异常修复、伴随成纤维细胞过度活化,最终形成细胞外基质沉积



注:绿色为GFP标记的谱系追踪AT2细胞

图11 肺痹汤2号对PF小鼠肺组织中谱系追踪AT2细胞分化期间的形态变化的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 11 Effect of N2FBR on morphological changes of GFP-labeled AT2 cells during differentiation into AT1 cells in PF mice (IF, ×200)

及肺泡结构坍塌和功能衰竭^[10,24]。中医学对PF的认识并非孤立地理解“纤维化”这一现代病名,其本质与《黄帝内经》所载“肺痹”“肺痿”等范畴密切相关,其病性属“本虚标实”,“虚”在宗气亏损,“实”在痰瘀毒阻,而宗气失调是其核心环节。《灵枢·邪客》言:“宗气积于胸中,出于喉咙,以贯心脉,而行呼吸焉”;米烈汉教授认为“素体虚弱、宗气不足、外邪侵袭”是PF发生发展的根本原因^[25];首都名医周平安教授总结临床经验,将PF的病机归纳为“肺气亏虚为本,痰热瘀毒痹阻肺络为标”^[26]。本团队总结前人理论与临床实践,提出“宗气衰微-肺泡痿痹”理论,认为宗气衰微引发气血失和,是肺泡再生功能障碍的核心病理。

现代研究亦表明,与其他类型的PF比较,IPF表现出更显著的组织微损伤特性^[27]。其病程常伴随慢性低氧^[28]、能量代谢障碍^[29]、微循环瘀阻^[30],与中医学“宗气”理论之间形成了高度契合的映射关系。肺泡是肺组织的终末功能单元,其上皮与血管形成气血交换屏障,维持肺部氧合和气血运行的稳定。AT1细胞与血管内皮贴合^[31],主司气体交换,将静脉血换为动脉血,体现了宗气“行呼吸、贯心脉”的功能。肺泡受损时,AT1细胞首当其冲,导致气血失和;而AT2细胞作为肺泡干细胞,在此过程中扮演修复关键角色。一方面,他们可激活增殖、分化为新的AT1细胞以恢复肺泡结构与功能^[32];另一方面,他们合成分泌表面活性物质维持肺泡稳定,避免激发损伤。已有研究表明,AT2细胞的生存与干性状态对疾病进程至关重要^[3-5]。肺泡损伤后若AT2细胞无法有效修复肺泡结构,便会导致PF的发生^[8-10]。其中,内质网应激与细胞凋亡是AT2细胞功能衰竭的重要机制^[33-34]。持续的内质网应激激活UPR通路,启动Caspase介导的程序性死亡,导致肺泡干细胞库枯竭、上皮修复失败^[35],加剧肺泡结构破坏^[36]。

本文以AT2细胞的内质网应激为突破口,尝试阐述“宗气衰微-肺泡痿痹”与“凋亡-干性-修复”三位一体机制之间的统一逻辑连接。在现代PF研究

中,AT2细胞的“再生失败”是纤维化不可逆的关键,尤以内质网应激所诱导的细胞凋亡为重要驱动因素。一旦AT2细胞失去稳态,不仅会导致其数量减少,还将引发其干性潜能的丧失,进而无法顺利向AT1细胞分化,导致肺泡屏障重建失败,修复中断、结构崩解。此“凋亡-干性-修复失败”的级联过程,正是纤维化逐步恶化的关键病理环节。综合中医学角度,AT2细胞分化为AT1细胞既需“清气”之能量支持,又需“营气”之营养及再生信号传递,即宗气的化生和主持与AT2细胞的干性及功能有着相互映射的关系,宗气衰微,则气体交换之稳态破坏,清气摄纳不足,浊气难以排出,肺络失养痉挛,必致气血失和,瘀毒内生,营养供能障碍,使肺泡局部陷入“虚、瘀、毒”的“痿痹”状态。这种状态极易引发AT2细胞的代谢负荷失衡和蛋白折叠障碍,诱发内质网应激,从而激活凋亡信号通路。因此,AT2细胞“内质网应激-凋亡-干性丧失-修复失败”这一单一病理通路,既可视作为现代PF的关键病程机制,也可作为“宗气衰微-气血失和-肺泡痿痹”理论的微观解释。

本团队师承周平安教授,进一步针对“宗气衰微、气血失和”,在经验方“肺痹汤”基础上制定出“肺痹汤2号”,加强其复振宗气、清热解毒之功。肺痹汤2号组方严谨,以生黄芪为君药,大补宗气,助肺摄纳、升提清阳,补而不膩;辅以“高原人参”红景天为臣,健脾益气以补宗气之源,活血通脉以畅宗气之行,止咳平喘实为强氧载运以固宗气之根,君臣相合贯通“宗气复振-气血和合-再生启动”的因果链;再臣之以丹参,破瘀通络,清除瘀阻,助气血畅达,兼具化痰除毒之功;佐之以金银花、黄芩清热解毒,协同抗炎抑纤,正对应现代药理中炎症因子[如转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等]被调控的结果;生甘草调和诸药,增强复方协同性。其君臣佐使合用,共奏“复宗气之枢,清兼症之标,通再生之道”,最终实现“阴阳自和者必自愈”,使AT2细胞脱离“虚、瘀、毒”困境,缓解内质网应激、抑制凋亡、恢复干性、再启动分化程序,

向 AT1 细胞成功转化,达成肺泡修复与纤维化缓解。

本研究从“凋亡-干性-修复”三位一体的视角出发,系统评估了中药复方肺痹汤2号在博来霉素诱导的PF模型中对AT2细胞的保护与修复作用。研究结果显示,N2FBR-H干预能够显著改善BLM诱导的小鼠肺组织病理损伤与肺功能下降,降低肺系数及肺组织中HYP含量,抑制纤维化因子如Col I α 1、 α -SMA、Timp1的表达水平,表明其具备良好的抗纤维化作用。进一步机制研究发现,肺痹汤2号可显著减少肺组织中细胞凋亡,特别是对AT2细胞的凋亡具有明显抑制作用。Caspase-3阳性AT2细胞比例的下降、TUNEL阳性信号的减少及透射电镜下板层小体结构的恢复,均表明中药干预不仅保护了AT2细胞的生存状态,还维持了其表面活性物质合成与分泌功能,从而稳定了肺泡微环境,为后续修复重建奠定基础。值得注意的是,内质网应激作为AT2细胞损伤和凋亡的重要诱因,在给药后亦被显著缓解。透射电镜观察显示Model组AT2细胞内质网肿胀、结构紊乱,而肺痹汤2号处理后内质网结构恢复正常,PERK蛋白染色信号亦明显减弱;进一步通过Western blot实验发现,Model组中内质网应激关键蛋白PERK、Atf4及凋亡蛋白Caspase-3表达水平均明显升高,提示肺泡细胞正处于强烈的应激与死亡状态;而肺痹汤2号处理可显著下调上述蛋白表达水平,提示该中药复方可通过降低内质网应激,阻断未折叠蛋白反应过度激活所引发的凋亡通路,进一步保障AT2细胞功能稳定。此外,N2FBR-H显著提升了AT2细胞的增殖能力(Ki-67⁺SPC⁺细胞显著增多),并通过谱系追踪实验发现,其能够减少AT2细胞在分化过程中的中间状态阻滞(Krt8⁺GFP⁺细胞显著减少),同时促进AT2细胞向AT1细胞的形态与功能性转化(观察到更多拉伸贴壁的GFP⁺细胞),提示中药干预可有效恢复AT2细胞干性与再生能力。这一疗效正是中医理论“复宗气、和气血、畅肺络”的体现。

因此,肺痹汤2号在调理“宗气”以固本、清热解毒以治标、通络活血以重塑方面构建了一条“中医气血理论”与“AT2细胞生物学功能”高度契合的治疗路径,是中医复方精准调控肺泡再生机制的典范。

本研究存在一定局限性。一方面,肺痹汤2号的具体药效成分尚未进一步分离与鉴定,难以明确各组分在调控AT2细胞功能中的权重;另一方面,AT2细胞功能恢复对免疫炎症微环境的响应机制未

作深入探索,后续可结合单细胞转录组或空间转录组技术进行进一步研究。

综上所述,肺痹汤2号通过缓解AT2细胞内质网应激、减少AT2细胞凋亡、维持其功能、恢复其干性并促进其正常分化,可有效改善肺组织结构损伤,抑制PF进展。该研究为中药复方通过干预肺泡上皮干细胞功能治疗PF提供了新的思路与实验依据,同时也为“宗气衰微-肺泡痿痹”理论的现代转化奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GLASS D S, GROSSFELD D, RENNA H A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment[J]. Clin Respir J, 2022, 16(2): 84-96.
- [2] DEMPSEY T M, SANGARALINGHAM L R, YAO X, et al. Clinical effectiveness of antifibrotic medications for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(2): 168-174.
- [3] GUILLOT L, NATHAN N, TABARY O, et al. Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(11): 2568-2573.
- [4] WANG Y, WANG L, MA S, et al. Repair and regeneration of the alveolar epithelium in lung injury[J]. FASEB J, 2024, 38(8): e23612.
- [5] PARIMON T, YAO C, STRIPP B R, et al. Alveolar epithelial type II cells as drivers of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2269.
- [6] BARKAUSKAS C E, CRONCE M J, RACKLEY C R, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung[J]. J Clin Invest, 2013, 123(7): 3025-3036.
- [7] LIU K, MENG X, LIU Z, et al. Tracing the origin of alveolar stem cells in lung repair and regeneration[J]. Cell, 2024, 187(10): 2428-2445 e20.
- [8] LIU S, XI Q, LI X, et al. Mitochondrial dysfunction and alveolar type II epithelial cell senescence: The destroyer and rescuer of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1535601.
- [9] WANG Z, WEI D D, BIN E N, et al. Enhanced glycolysis-mediated energy production in alveolar stem cells is required for alveolar regeneration[J]. Cell Stem Cell, 2023, 30(8): 1028-1042. e7.
- [10] WU H J, YU Y Y, HUANG H W, et al. Progressive pulmonary fibrosis is caused by elevated mechanical tension on alveolar stem cells (vol 180, pg 107, 2020)[J]. Cell, 2021, 184(3): 845-846.
- [11] SUN Z, HE W, MENG H, et al. Lactate activates ER stress to promote alveolar epithelial cells apoptosis in pulmonary fibrosis [J]. Respir Res, 2024, 25(1): 401.
- [12] KLYMENKO O, HUEHN M, WILHELM J, et al. Regulation and

- role of the ER stress transcription factor CHOP in alveolar epithelial type- II cells[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(7): 973-990.
- [13] SHIN S Y, CHEN J, MILMAN KRENTSIS I, et al. From epithelium to therapy: Transitional cells in lung fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2025, 72(5): 472-483.
- [14] KOBAYASHI Y, TATA A, KONKIMALLA A, et al. Persistence of a regeneration-associated, transitional alveolar epithelial cell state in pulmonary fibrosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(8): 934-946.
- [15] ZHAO R, WANG Z, WANG G, et al. Sustained amphiregulin expression in intermediate alveolar stem cells drives progressive fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*, 2024, 31(9): 1344-1358.
- [16] ENOMOTO Y, KATSURA H, FUJIMURA T, et al. Autocrine TGF-beta-positive feedback in profibrotic AT2-lineage cells plays a crucial role in non-inflammatory lung fibrogenesis[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4956.
- [17] 付小芳, 吴志松, 曹芳, 等. 肺痹汤治疗特发性肺间质纤维化30例临床观察[J]. *现代中医临床*, 2015, 22(4): 26-28.
FU X F, WU Z S, CAO F, et al. Clinical observation of Feibi Tang in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis in 30 cases [J]. *J Mod Clin Med*, 2015, 22(4): 26-28.
- [18] LIU Z H, LI G D, HAO Q X, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis treated using the Feibi recipe: Two case reports[J]. *World J Clin Cases*, 2023, 11(24): 5742-5748.
- [19] LIU H G, PANG Q L, CAO F, et al. Number 2 Feibi recipe ameliorates pulmonary fibrosis by inducing autophagy through the GSK-3 β /mTOR pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 921209.
- [20] GU X F, LONG Q, WEI W, et al. Number 2 Feibi recipe inhibits HO-mediated oxidative stress damage of alveolar epithelial cells by regulating the balance of mitophagy/apoptosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 830554.
- [21] 庞庆禄, 李国栋, 曹芳, 等. 肺痹汤2号对肺纤维化模型小鼠肺组织ROS/Hippo/YAP信号通路的影响[J]. *中医杂志*, 2022, 63(21): 2081-2087.
PANG Q L, LI G D, CAO F, et al. Effect of Feibi decoction II on ROS/Hippo/YAP signaling pathway in lung tissue of pulmonary fibrosis model mice[J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(21): 2081-2087.
- [22] 徐成岩, 梁笑研, 刘艳丽, 等. 肺痹汤2号改善放射性肺纤维化的网络药理学分析[J]. *生命的化学*, 2025, 45(8): 14.
XU C Y, LIANG X Y, LIU Y L, et al. Network pharmacology-based analysis of number 2 feibi recipe for the treatment of radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Chem Life*, 2025, 45(8): 14.
- [23] MOELLER A, ASK K, WARBURTON D, et al. The bleomycin animal model: A useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis?[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(3): 362-382.
- [24] RAGHU G, REMY-JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(9): e18-e47.
- [25] 杭程, 肖洋, 王高雷, 等. 米烈汉教授基于宗气为本防治肺纤维化经验浅析[J]. *陕西中医*, 2021, 42(9): 1282-1284.
HANG C, XIAO Y, WANG G L, et al. A Brief analysis of professor MI Lihan's experience in preventing and treating pulmonary fibrosis based on Zongqi as the foundation [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med*, 2021, 42(9): 1282-1284.
- [26] 杨效华, 张春艳, 孙海燕, 等. 周平安教授治疗特发性肺间质纤维化经验[J]. *中国临床医生*, 2012, 40(4): 60-62.
YANG X H, ZHANG C Y, SUN H Y, et al. Professor ZHOU Ping'an's experience in treating idiopathic pulmonary interstitial fibrosis[J]. *Chin J Clin*, 2012, 40(4): 60-62.
- [27] LU W, TEOH A, WATERS M, et al. Pathology of idiopathic pulmonary fibrosis with particular focus on vascular endothelium and epithelial injury and their therapeutic potential[J]. *Pharmacol Ther*, 2025, 265: 108757.
- [28] BUENO M, CALYECA J, ROJAS M, et al. Mitochondria dysfunction and metabolic reprogramming as drivers of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Redox Biol*, 2020, 33: 101509.
- [29] LI J, ZHAI X, SUN X, et al. Metabolic reprogramming of pulmonary fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1031890.
- [30] ZHENG H, ZHANG L, WANG C, et al. Metabolic dysregulation in pulmonary fibrosis: Insights into amino acid contributions and therapeutic potential[J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 411.
- [31] NIETHAMER T K, STABLER C T, LEACH J P, et al. Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury[J]. *Elife*, 2020, 9: e53072.
- [32] DESAI T J, BROWNFIELD D G, KRASNOW M A. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer[J]. *Nature*, 2014, 507(7491): 190-194.
- [33] WANG J Y, MICHKI S N, SITARAMAN S, et al. Dysregulated alveolar epithelial cell progenitor function and identity in Hermansky-Pudlak syndrome [J]. *JCI Insight*, 2024, 10(3): e183483.
- [34] SU W, GUO Y, WANG Q, et al. YAP1 inhibits the senescence of alveolar epithelial cells by targeting Prdx3 to alleviate pulmonary fibrosis[J]. *Exp Mol Med*, 2024, 56(7): 1643-1654.
- [35] LIANG J, HUANG G, LIU X, et al. The ZIP8/SIRT1 axis regulates alveolar progenitor cell renewal in aging and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(11): e157338.
- [36] BURMAN A, KROPSKI J A, CALVI C L, et al. Localized hypoxia links ER stress to lung fibrosis through induction of C/EBP homologous protein[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(16): e99543.

[责任编辑 周冰冰]