

# 基于 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路探讨补肾通络方抑制巨噬细胞极化缓解肺纤维化的作用及机制

梁艳霞<sup>1</sup>, 于雪莲<sup>2</sup>, 王雯雯<sup>1</sup>, 李广森<sup>1</sup>, 邢鸿飞<sup>3</sup>, 樊茂蓉<sup>1\*</sup>, 杨斌<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 烟台市牟平区中医医院, 山东烟台 264000;  
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨补肾通络方是否可通过调控 Wnt3a/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路抑制巨噬细胞极化,进而减少上皮细胞-间质细胞转化及细胞外基质过度沉积,以期阐明补肾通络方抗肺纤维化的作用机制,为临床治疗肺纤维化提供新的理论依据。**方法:**将50只雄性SD大鼠随机分为空白组,模型组,吡非尼酮组,补肾通络方高、低剂量组。除空白组外,其余各组采用气管内注入博来霉素构建肺纤维化模型。造模后第28天进行干预,补肾通络方高、低剂量组分别予补肾通络方30.88、15.44 g·kg<sup>-1</sup>灌胃,吡非尼酮组予吡非尼酮胶囊110 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,空白组、模型组予等量生理盐水灌胃,每日1次,共治疗90 d。治疗结束后,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )水平;比较大鼠肺组织形态变化及胶原容积分数;免疫组化法检测肺组织中E-钙黏蛋白(E-cadherin)、细胞角蛋白19(Cytokeratin 19)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、细胞骨架蛋白(Vimentin)、I型胶原(Col I)、III型胶原(Col III)蛋白分布及表达;免疫荧光法检测肺组织中分化簇68/巨噬细胞唾液酸糖蛋白(CD68)、精氨酸酶-1(Arg-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、Wnt3a、 $\beta$ -catenin的蛋白分布及表达;蛋白免疫印迹法检测肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin的蛋白表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin mRNA表达。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠气道壁、肺泡腔、间质组织内出现大量炎性细胞浸润,纤维组织增生明显;BALF中TGF- $\beta_1$ 水平显著升高;肺组织内E-cadherin、Cytokeratin 19蛋白表达下降, $\alpha$ -SMA、Vimentin、Wnt3a、 $\beta$ -catenin、Col I、Col III蛋白表达均升高;大鼠肺组织中CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、 $\beta$ -catenin荧光阳性面积比率升高;大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA表达均显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,各治疗组均不同程度改善气道壁、肺泡腔、间质组织内炎性细胞浸润及纤维组织增生;降低BALF中TGF- $\beta_1$ 水平;升高肺组织中E-cadherin、Cytokeratin 19蛋白表达,降低肺组织中 $\alpha$ -SMA、Vimentin、Col I、Col III蛋白表达;降低肺组织中CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、 $\beta$ -catenin荧光阳性面积比率;降低肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA表达( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。**结论:**补肾通络方能够通过抑制上皮细胞-间质细胞转化、减少细胞外基质过度沉积,从而改善博来霉素所致的大鼠肺纤维化,其机制或与抑制Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路及其介导的巨噬细胞极化有关。

**[关键词]** 补肾通络方; 肺纤维化; 巨噬细胞极化; Wnt3a/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路

**[中图分类号]** R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)11-0112-12

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20252207

**[网络出版地址]** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251022.1446.005>

**[网络出版日期]** 2025-10-22 16:30:16



## Effect and Mechanisms of Bushen Tongluo Prescription on Pulmonary Fibrosis via Inhibiting Macrophage Polarization Through Wnt3a/ $\beta$ -catenin Signaling Pathway

LIANG Yanxia<sup>1</sup>, YU Xuelian<sup>2</sup>, WANG Wenwen<sup>1</sup>, LI Guangsen<sup>1</sup>,  
XING Hongfei<sup>3</sup>, FAN Maorong<sup>1\*</sup>, YANG Bin<sup>1\*</sup>

(1. Xiyuan Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;

**[收稿日期]** 2025-08-10

**[基金项目]** 第五批全国中临床优秀人才项目(020600009);国家自然科学基金项目(81774297);中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A01105);中国中医科学院西苑医院具有知识产权的医疗机构制剂和中药新药的研发与转化专项(XYZX0301-01)

**[第一作者]** 梁艳霞,在读博士,从事中医防治肺病学研究,E-mail:1350890247@qq.com

**[通信作者]** \*樊茂蓉,博士,博士生导师,主任医师,从事中西医结合防治呼吸病学研究,E-mail:fanmr1974@qq.com;

\*杨斌,硕士,副研究员,从事中药药理学研究,E-mail:bean5@126.com

2. Muping District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yantai 264000, China;  
3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study aimed to investigate whether Bushen Tongluo prescription inhibits macrophage polarization by regulating the Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling pathway, thereby reducing epithelial-mesenchymal transition and excessive extracellular matrix deposition, in order to elucidate the anti-pulmonary fibrosis mechanisms of Bushen Tongluo prescription and provide a new theoretical basis for the clinical treatment of pulmonary fibrosis. **Methods:** Fifty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a blank group, model group, pirfenidone group, and high- and low-dose Bushen Tongluo prescription groups. Except for the blank group, the pulmonary fibrosis model was established by intratracheal instillation of bleomycin. Intervention was initiated on day 28 after modeling. The high- and low-dose Bushen Tongluo prescription groups were administered Bushen Tongluo prescription at doses of 30.88, 15.44 g·kg<sup>-1</sup>, respectively, by intragastric gavage. The pirfenidone group was administered pirfenidone capsules at 110 mg·kg<sup>-1</sup> by intragastric gavage. The blank and model groups were given an equal volume of normal saline by gavage, once daily for 90 days. After treatment, the level of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Morphological changes in lung tissue and the collagen volume fraction were compared. The protein distribution and expression of E-cadherin, cytokeratin 19,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), vimentin, collagen type I (Col I), and collagen type III (Col III) in lung tissue were detected by immunohistochemistry. The protein distribution and expression of CD68, arginase-1 (Arg-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), Wnt3a, and  $\beta$ -catenin in lung tissue were detected by immunofluorescence. The protein expression of Wnt3a and  $\beta$ -catenin in lung tissue was detected by Western blot, and the mRNA expression of Wnt3a and  $\beta$ -catenin was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Results:** Compared with the blank group, a large number of inflammatory cells infiltrated the airway walls, alveolar spaces, and interstitial tissue in the model group, with obvious fibrous tissue hyperplasia. The level of TGF- $\beta_1$  in BALF was significantly increased. The protein expression of E-cadherin and cytokeratin 19 in lung tissue was decreased, whereas the protein expression of  $\alpha$ -SMA, Vimentin, Wnt3a,  $\beta$ -catenin, Col I, and Col III was increased. The fluorescence-positive area ratios of CD68, Arg-1, iNOS, Wnt3a, and  $\beta$ -catenin in lung tissue were increased. The protein and mRNA expression levels of Wnt3a and  $\beta$ -catenin in lung tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, all treatment groups showed varying degrees of improvement in inflammatory cell infiltration and fibrous tissue hyperplasia in the airway walls, alveolar spaces, and interstitial tissue, decreased TGF- $\beta_1$  levels in BALF, increased protein expression of E-cadherin and cytokeratin 19 in lung tissue, decreased protein expression of  $\alpha$ -SMA, Vimentin, Col I, and Col III, decreased fluorescence-positive area ratios of CD68, Arg-1, iNOS, Wnt3a, and  $\beta$ -catenin in lung tissue, and decreased protein and mRNA expression levels of Wnt3a and  $\beta$ -catenin in lung tissue ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Bushen Tongluo prescription can improve bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and reducing excessive extracellular matrix deposition. The mechanism may be related to inhibition of the Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling pathway and the macrophage polarization mediated by this pathway.

**[Keywords]** Bushen Tongluo prescription; pulmonary fibrosis; macrophage polarization; Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling pathway

特发性肺纤维化(IPF)是一种病因不明、慢性进展性的致死性肺疾病,病变局限于肺,以不可逆的肺纤维化为主要特征,是特发性间质性肺炎中最常见的类型,本病预后极差,确诊后的中位生存期仅为3~5年<sup>[1]</sup>。几十年来,IPF的发病机制一直是研究的热点与重点,近年来随着研究不断深入,肺泡上皮细胞反复受损产生的代谢功能障碍、衰老、异常激活及修复失调被认为是IPF的核心病理环节<sup>[2-3]</sup>。损伤后的肺泡上皮细胞在修复过程中过度发生上皮细胞-间质细胞转化(EMT)及细胞外基质(ECM)过度沉积,最终导致肺纤维化形成及进展<sup>[3]</sup>。研究表明,巨噬细胞通过M1/M2极化表型的动态平衡参与ECM的过度沉积,进而参与IPF的发生、发展过程<sup>[4-7]</sup>。Wnt3a/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)信号通路是肺纤维化形成中的经典信号通路<sup>[8]</sup>,其通过促进间质

成纤维细胞增殖和肺组织重塑来推动纤维化进程<sup>[9]</sup>,研究显示,Wnt/ $\beta$ -catenin作为巨噬细胞极化的上游调控因子,参与诱导肾脏纤维化<sup>[10]</sup>。当前,IPF的治疗主要依赖吡非尼酮和尼达尼布等抗纤维化药物<sup>[11]</sup>,二药可在一定程度上延缓患者肺功能下降<sup>[12]</sup>,但在能否延长患者生存期方面尚存争议,且约20%~30%的患者因胃肠道反应等不良反应难以长期耐受<sup>[1]</sup>。因此,进一步深入探讨IPF的发病机制,寻找不良反应小的新靶点治疗药物是目前研究的热点及难点。本课题组认为“肺肾亏虚、肺络痹阻”是IPF核心病机,并以“补肾通络”立法,拟补肾通络方治疗本病,临床观察发现补肾通络方能够改善IPF患者呼吸困难、干咳等症状,提高6 min活动耐力,从而改善患者生活质量,并在一定程度上延缓肺功能的下降<sup>[13]</sup>,但其治疗IPF的机制尚不明确。

基于此,本研究拟建立肺纤维化大鼠模型,观察补肾通络方对肺纤维化大鼠的影响,从而进一步探究补肾通络方抗肺纤维化的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 50只健康雄性SD大鼠,体质量(200±10)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2019-0010,常规食水,12h光照,湿度(55±5)%,温度(22±2)℃,饲养于中国中医科学院西苑医院动物房,动物饲养许可证号SYXK(京)2018-0018。

**1.2 伦理** 本实验已经通过中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批,伦理号2018XLC011-1。

**1.3 药材及其制备** 补肾通络方:仙茅10g、淫羊藿10g、生黄芪30g、地龙12g、威灵仙15g、络石藤15g、海风藤15g、莪术10g、虎杖12g、浙贝母20g、麦冬30g、生甘草6g,以上饮片均由中国中医科学院西苑医院樊茂蓉主任医师鉴定为正品。药物来源为河北神农北京药业有限公司,由中国中医科学院西苑医院制剂室将以上药物提取制备成浓缩液。

补肾通络方制备工艺:以上药味,共煎煮2次,第1次加入8倍量水煎煮1.5h,过滤后,加6倍量水再次煎煮1h,滤过,合并滤液,将补肾通络方浓缩成浓缩液,每1g浓缩液中含生药2.94g,分装,放置于-20℃备用。

**1.4 药品及试剂** 吡非尼酮胶囊(北京康蒂尼药业有限公司,国药准字H20133376);博来霉素(美国Invitrogen公司,货号r25001-8);转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司,货号ERC107b);苏木素-伊红(HE)染色试剂(北京科创百奥生物科技有限公司配制,批号202101);马松(Masson)染色液(广州维格斯生物科技有限公司,货号77148);E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、细胞骨架蛋白(Vimentin)、I型胶原(Col I)、III型胶原(Col III)、Wnt3a、 $\beta$ -catenin抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab231303、ab7817、ab92547、ab254113、ab7778、ab219412、ab16051);细胞角蛋白19(Cytokeratin 19)抗体(美国Proteintech公司,货号10712-1-AP);精氨酸酶-1(Arg-1)、分化簇68/巨噬细胞唾液酸糖蛋白(CD68)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB115724、GB113109、GB11119);辣根过氧化物酶(HRP)标山羊抗小鼠/兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国JIR公司,货号111-035-003);反转录试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司,货号

CW2569);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(美国KAPA Biosystems公司,货号KK4601); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号TA-09)。

**1.5 仪器** JB-P7型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2235型病理切片仪(德国徕卡公司);Mlchrome 5 Pro型成像系统CCD(福州鑫图光电有限公司);JY300C型电泳仪、JY300C型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);MULTISKAN MK3型全自动多功能酶标仪(美国Thermo公司);Nikon Ci-SJY300C型倒置显微镜(日本尼康公司);KF-PRO-020型电镜扫描仪(宁波江丰生物信息技术有限公司);D3024R型离心机高速冷冻离心机(美国Scilogex公司);ChampGel型5000凝胶成像仪(北京赛智创业科技有限公司);StepOne Plus型Real-time PCR仪(美国ABI公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及造模、给药** 50只SD大鼠适应性喂养1周后开始实验,采用随机数字表法将大鼠分为空白组,模型组,补肾通络方高、低剂量组,吡非尼酮组,每组10只,其中,模型组,补肾通络方高、低剂量组、吡非尼酮组参考文献[14]及课题组前期预实验复制肺纤维大鼠模型:以3%戊巴比妥钠溶液(3 mL·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射(ip)麻醉大鼠,约5 min后造模,将大鼠仰卧固定,气管呈倒T型切开,并于气管内一次性注入博来霉素(5 mg·kg<sup>-1</sup>)水溶液,注射完毕后将大鼠直立旋转,使药液在肺内均匀分布,然后缝合。第28天各组取2只大鼠,以3%戊巴比妥钠溶液麻醉后取左肺组织,进行HE染色、Masson染色,于光学显微镜下观察肺组织是否出现胶原纤维沉积、纤维化改变,以评价肺纤维化模型是否成功。造模成功后,补肾通络方高、低剂量组分别予30.88、15.44 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,吡非尼酮组予0.11 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,模型组、空白组予等量生理盐水灌胃,连续给药90 d<sup>[15]</sup>。各组大鼠给药剂量按照人与大鼠体表面积转换系数0.018及成人常规服用剂量换算<sup>[16]</sup>,给药体积为10 mL·kg<sup>-1</sup>。

**2.2 取材** 以3%戊巴比妥钠溶液(2 mL·kg<sup>-1</sup>)ip麻醉大鼠,采用腹主动脉取血后处死大鼠,剪开胸腔,夹闭右主支气管,左肺用生理盐水行支气管肺泡灌洗5 mL×6次,回收率80%以上,回收液集中于无菌离心管中4℃,1 200 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(离心半径13 cm),收集上清液置-80℃冰箱中保存备用。取右肺中叶于10%中性甲醛溶液中固定,每组选取

3只右肺下叶切割成1 mm×1 mm×1 mm大小,放置于2.5%戊二醇中,4℃保存,其余右肺下叶分装于2 mL冻存管中,置于-80℃冰箱储存。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 ELISA检测大鼠肺泡灌洗液(BALF)中TGF- $\beta_1$ 水平** 取2.2项中大鼠BALF,采用ELISA试剂盒检测样本中TGF- $\beta_1$ 水平。操作步骤按照试剂盒说明书进行,并使用酶标仪,于450 nm处测量吸光度A,绘制标准曲线,计算样本浓度。

**2.3.2 HE及Masson染色法观察大鼠肺组织形态变化** 取2.2项中10%中性甲醛溶液固定的肺组织,采取常规石蜡包埋、石蜡切片,厚度为4  $\mu\text{m}$ ,切片后进行HE、Masson染色,于光学显微镜下观察肺组织结构的改变、胶原纤维的分布情况,使用Images Pro Plus计算Masson染色胶原纤维面积百分比。

**2.3.3 透射电镜(TEM)观察大鼠肺组织超微结构** 取2.2放置于2.5%戊二醇中的右肺中叶,用0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,每次10 min,将组织放置于1%醋酸铀中,4℃避光固定2 h,经乙醇脱水,环氧丙烷过渡20 min,环氧树脂浸透处理(37℃,4 h);浸透后将组织用环氧树脂812(Epon812)包埋,切片后,使用醋酸铀、柠檬酸铅染色,于透射电镜观察肺组织超微形态。

**2.3.4 免疫组化法(IHC)检测肺组织E-cadherin、Cytokeratin 19、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、Col I、Col III蛋白分布及表达** 取石蜡包埋后的肺组织进行组织芯片制作,制作方法如下:常规取材3 mm厚,把组织放入包埋模中,行组织梯度脱水,透明,浸蜡;包埋,切片成4  $\mu\text{m}$ 厚,烤片后分别滴加E-cadherin、Cytokeratin 19、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、Col I、Col III抗体(浓度分别为1:100、1:500、1:300、1:200、1:100、1:100),4℃过夜孵育,PBS冲洗3次,滴加二抗,37℃孵育30 min;PBS冲洗3次,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色3 min,光镜下观察至棕色,苏木素染色5 min,盐酸乙醇分化1 s,氨水返蓝10 s,脱水透明,中性树胶封片。高倍镜下拍摄3个视野,阳性为肺组织内出现淡黄至棕黄色颗粒,使用Gel Image ststem ver. 4.00软件,计算E-cadherin、Cytokeratin 19、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、Col I、Col III阳性信号的平均积分吸光度AA值。

**2.3.5 免疫荧光法(IF)检测大鼠肺组织CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白分布及表达** 依次将切片放入环保型脱蜡液、无水乙醇、蒸馏水中脱蜡。随后将玻片置于PBS中晃动洗涤3次,每次

5 min进行抗原修复。切片稍晾干后用组化笔在组织周围画圈,滴加牛血清白蛋白(BSA),封闭30 min。加CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、 $\beta$ -catenin抗体(1:100、1:500、1:100、1:100、1:500),4℃孵育过夜。加二抗,避光室温孵育50 min。加4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液,避光室温孵育10 min,复染细胞核。最后加入荧光剂,封片,置于显微镜下观察,使用Aipathwell图像分析软件,计算CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、 $\beta$ -catenin荧光阳性面积比率。

**2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白表达** 取分装于2 mL冻存管中的右肺下叶,进行Western blot检测。取冻存肺组织40 mg裂解,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,上清液进行蛋白抽取、蛋白定量;制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,浓缩胶浓度为3%,取待测样品进行电泳,采用湿转法进行转膜,转膜时间90 min,转膜、封闭后滴加Wnt3a、 $\beta$ -catenin抗体(1:1 000、1:4 000),4℃水平摇床孵育过夜;一抗孵育完毕,分别以1:10 000稀释HRP山羊抗兔/鼠二抗,室温孵育45 min;TBST缓冲液洗膜3次,每次10 min;洗膜后采用化学发光显色,放入凝胶成像仪中显影、定影;应用Quantity One软件分析Wnt3a、 $\beta$ -catenin及 $\beta$ -actin条带灰度值,计算Wnt3a、 $\beta$ -catenin与 $\beta$ -actin灰度值的比值作为其各自的相对表达量。

**2.3.7 Real-time PCR检测大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin mRNA表达** 取冻存肺组织50 mg提取总RNA,并将其溶解于无核酸酶高纯水中;取总RNA 2  $\mu\text{g}$ 在20  $\mu\text{L}$ 反应体系中逆转录(42℃孵育50 min,85℃加热5 min终止反应)合成cDNA;取cDNA 10倍稀释液2  $\mu\text{L}$ 在20  $\mu\text{L}$ 反应体系中进行Real-time PCR反应(95℃预变性10 min,95℃变性5 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环);Wnt3a、 $\beta$ -catenin mRNA及内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物使用Primer5.0软件设计,武汉赛维尔生物科技有限公司合成;以2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 处理实验数据,作为mRNA相对表达水平,引物序列见表1。

**2.4 统计学方法** 采用SPSS 25.0统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,首先进行正态分布检验及方差齐性检验,若服从正态分布,则采用单因素方差分析;若不符合正态分布,采用非参数检验(Wilcoxon秩和检验), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 补肾通络方对肺纤维化大鼠BALF中TGF- $\beta_1$ 水平的影响** 与空白组比较,模型组大鼠BALF中

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Wnt3a	上游 CATACTTCAAGGTGCCACAGAG	198
	下游 ATTCTCCCTCCGTCGCTCA	
β-catenin	上游 TGAGGACAAGCCACAGGACTAC	110
	下游 TGTCCAGTCCGAGATCAGCAGT	
GAPDH	上游 CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	下游 GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT	

TGF-β<sub>1</sub>水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高、低剂量组大鼠BALF中TGF-β<sub>1</sub>水平显著降低( $P<0.01$ )。见表2。

**3.2 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织形态的影响** HE及Masson染色显示,空白组大鼠支气管黏膜上皮、黏膜皱襞形态如常,无扩张,管壁平滑肌层未见增厚,肺泡间质、肺泡腔内未见明显炎细胞浸润。模型组大鼠支气管腔内存在分泌物残留,支气管管壁平滑肌层增厚,黏膜皱襞变平,黏膜上皮层纤毛柱状上皮细胞变性、脱落,气道壁、肺泡腔、间质组织内可见大量炎性细胞浸润,纤维组织增生明显。补肾

表2 补肾通络方对肺纤维化大鼠BALF中TGF-β<sub>1</sub>水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

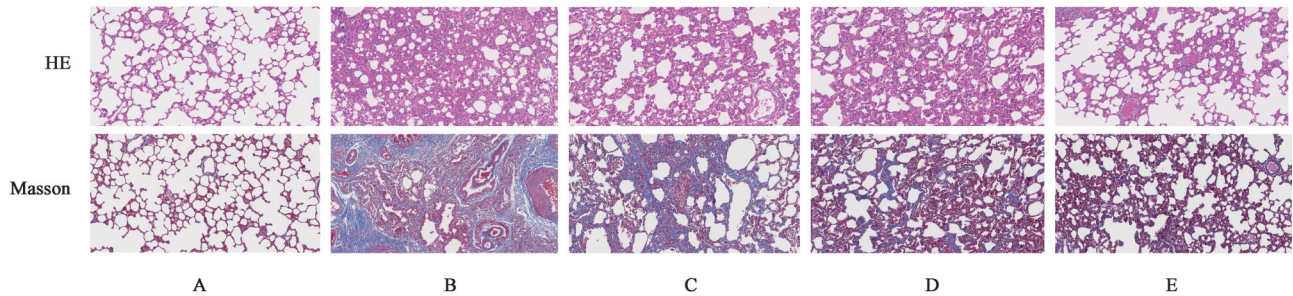
Table 2 Effect of Bushen Tongluo prescription on serum BALF levels of TGF-β<sub>1</sub> in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TGF-β <sub>1</sub> /ng·L <sup>-1</sup>
空白组		12.71±2.89
模型组		21.48±3.48 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	15.83±3.12 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	14.30±1.74 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	13.82±1.44 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ,与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表3-表10同)

通络方高、低剂量组及吡非尼酮组有模型组的病理形态学表现,但较模型组均有明显的减轻,其中补肾通络方低剂量组对气道壁、肺泡腔及间质组织内炎细胞浸润及纤维组织增生的抑制作用最佳。见图1。

大鼠纤维化程度(Masson染色),与空白组比较,模型组大鼠胶原容积分数显著升高( $P<0.01$ );与模型组比,吡非尼酮组及补肾通络方高剂量组大鼠胶原容积分数显著下降( $P<0.01$ ),补肾通络方低剂量组大鼠胶原容积分数明显下降( $P<0.05$ )。见表3。



注:A.空白组;B.模型组;C.吡非尼酮组;D.补肾通络方高剂量组;E.补肾通络方低剂量组(图2-图10同)

图1 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织病理变化的影响(×100)

Fig. 1 Effect of Bushen Tongluo prescription on pathological changes of lung tissue in rats with pulmonary fibrosis (×100)

表3 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织纤维化面积的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of Bushen Tongluo prescription on fibrotic area of lung tissue in rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	纤维化面积/%
空白组		7.13±1.47
模型组		17.87±1.75 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	13.55±3.32 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	13.53±2.24 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	14.44±2.99 <sup>2)</sup>

**3.3 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织超微结构的影响** 空白组结构较完整,肺泡上皮细胞边缘清晰,细胞无肿胀,无炎性浸润,无基底膜增厚;模型

组大鼠肺组织可见大量胶原纤维沉积,基底膜明显增厚,细胞结构不完整;吡非尼酮组细胞结构欠完整,可见胶原纤维沉积,较模型组减少;补肾通络方高、低剂量组胶原纤维沉积较模型组明显减少,细胞结构较完整,基底膜增厚明显减轻。见图2。

**3.4 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中Col I、Col III、E-cadherin、Cytokeratin 19、α-SMA、Vimentin蛋白分布及表达的影响** Col I显色为棕黄色,显色区域主要集中于支气管壁周围及肺泡间质;与空白组比较,模型组Col I水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组及补肾通络方高、低剂量组Col I水平显著下降( $P<0.01$ ),Col III染色呈棕黄色,主要集

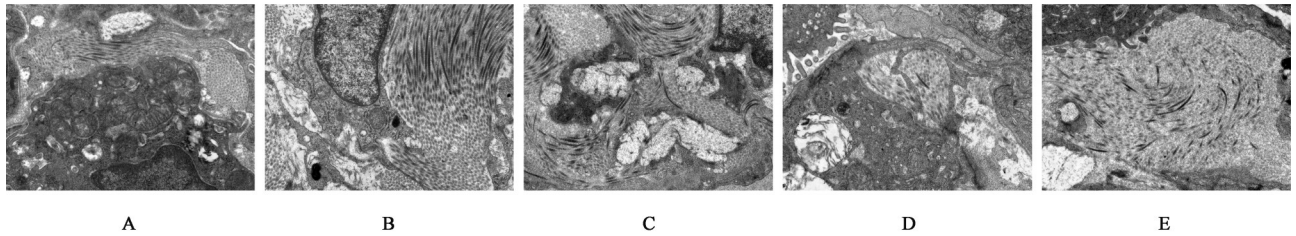


图2 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织超微结构的影响(TEM, ×8 000)

Fig. 2 Effect of Bushen Tongluo prescription on ultrastructural changes of lung tissue in rats with pulmonary fibrosis (TEM, ×8 000)

中在支气管壁周围及肺泡间质;与空白组比较,模型组 Col III 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡

非尼酮组补肾通络方高、低剂量组 Col III 水平明显下降( $P < 0.05$ )。见图3、表4。

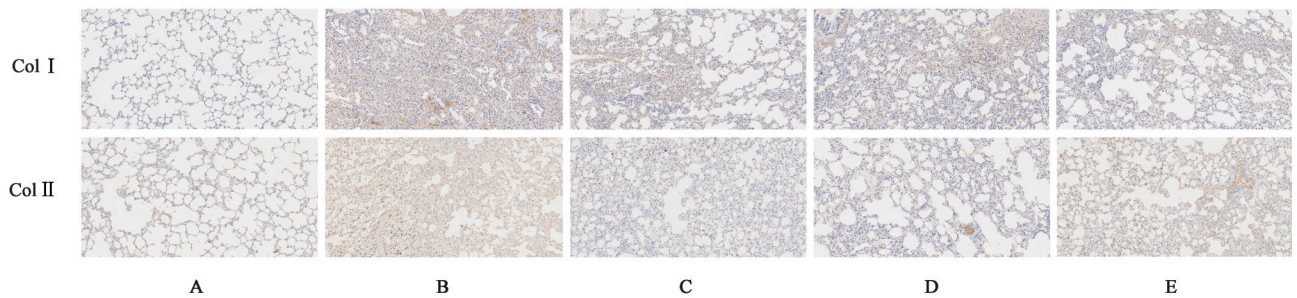


图3 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 Col I、Col III 蛋白分布及表达的影响(IHC, ×100)

Fig. 3 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of Col I and Col III proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IHC ×100)

表4 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 Col I、Col III 表达 AA 值的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 4 Effect of Bushen Tongluo prescription on AA values of Col I and Col III expressions in lung tissues of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Col I	Col III
空白组		342.84±53.40	232.17±36.09
模型组		679.33±103.89 <sup>1)</sup>	404.67±62.12 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	548.00±61.66 <sup>3)</sup>	322.00±65.29 <sup>2)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	553.67±64.32 <sup>3)</sup>	327.50±55.60 <sup>2)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	525.50±61.42 <sup>3)</sup>	330.17±40.41 <sup>2)</sup>

E-cadherin 染色呈棕黄色,主要集中于支气管黏膜上皮胞浆;与空白组比较,模型组 E-cadherin 水平显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组 E-cadherin 水平明显升高( $P < 0.05$ ),补肾通络方高、低剂量组 E-cadherin 水平显著升高( $P < 0.01$ )。Cytokeratin 19 染色呈棕黄色,主要集中在支气管黏膜上皮胞浆;与空白组比较,模型组 Cytokeratin 19 水平显著下降( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组和补肾通络方高、低剂量组 Cytokeratin 19 水平明显上升( $P < 0.05$ )。α-SMA 显示为棕黄色,显色区域集中于间质纤维组织,上皮细胞中偶见表达,与空白组比较,模型组 α-SMA 水平显著升高,差异有统

计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组及补肾通络方高、低剂量组 α-SMA 显著下降( $P < 0.01$ )。Vimentin 染色呈棕黄色,显色区域集中在间质纤维组织,上皮细胞中偶见表达;与空白组比较,模型组 Vimentin 水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组和补肾通络方低剂量组 Vimentin 水平显著下降( $P < 0.01$ ),补肾通络方高剂量组 Vimentin 水平明显下降( $P < 0.05$ )。见图4、表5。

**3.5 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 CD68、Arg-1、iNOS、Wnt3a、β-catenin 蛋白分布及表达的影响** CD68、Arg-1、iNOS 主要表达在肺泡腔、肺泡间隔及纤维索条区;与空白组比较,模型组大鼠肺组织中 CD68、Arg-1、iNOS 表达面积增宽,荧光阳性面积比率显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高剂量组、补肾通络方低剂量组肺组织中 CD68、Arg-1、iNOS 表达范围及荧光强度均有不同程度的减轻,荧光阳性面积比率显著降低( $P < 0.01$ ),见表6、图5-图7;与空白组比较,模型组大鼠肺组织中 iNOS 与 Arg-1 荧光阳性面积比率的比值显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高剂量组、补肾通络方低剂量组大鼠肺组织中 iNOS 与 Arg-1 荧光阳性面积比率的比值显著升高( $P < 0.01$ )。见表7。

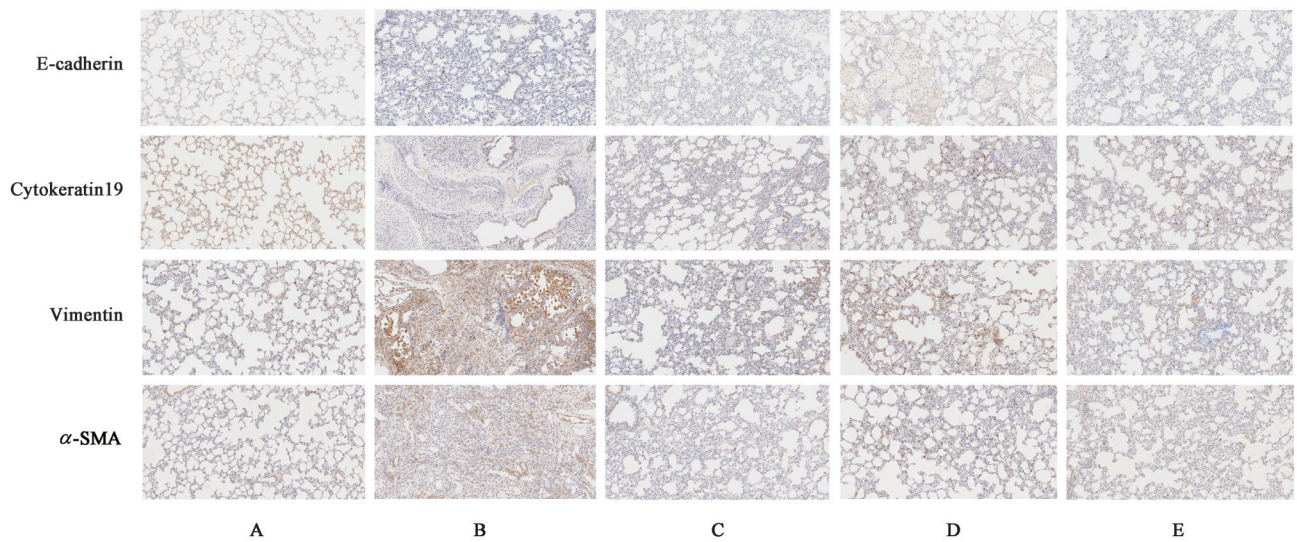


图 4 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 E-cadherin、Cytokeratin 19、 $\alpha$ -SMA、Vimentin 蛋白分布及表达的影响 (IHC,  $\times 100$ )

Fig. 4 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of E-cadherin, Cytokeratin 19,  $\alpha$ -SMA, Vimentin proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IHC,  $\times 100$ )

表 5 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 E-cadherin、Cytokeratin 19、 $\alpha$ -SMA、Vimentin 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of Bushen Tongluo prescription on E-cadherin, Cytokeratin 19,  $\alpha$ -SMA, Vimentin expressions in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	E-cadherin	Cytokeratin 19	$\alpha$ -SMA	Vimentin
空白组		730.67 $\pm$ 57.99	820.67 $\pm$ 85.26	676.83 $\pm$ 66.49	738.83 $\pm$ 52.56
模型组		507.50 $\pm$ 85.19 <sup>1)</sup>	587.33 $\pm$ 63.80 <sup>1)</sup>	941.17 $\pm$ 101.79 <sup>1)</sup>	1 043.17 $\pm$ 152.77 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	614.50 $\pm$ 79.19 <sup>2)</sup>	689.67 $\pm$ 86.33 <sup>2)</sup>	757.17 $\pm$ 115.15 <sup>3)</sup>	827.17 $\pm$ 127.30 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	623.33 $\pm$ 65.64 <sup>3)</sup>	691.33 $\pm$ 92.55 <sup>2)</sup>	766.83 $\pm$ 128.28 <sup>3)</sup>	855.67 $\pm$ 110.16 <sup>2)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	615.00 $\pm$ 56.97 <sup>2)</sup>	691.17 $\pm$ 83.85 <sup>2)</sup>	761.33 $\pm$ 100.00 <sup>3)</sup>	843.50 $\pm$ 127.42 <sup>3)</sup>

表 6 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 CD68、Arg-1、iNOS 荧光阳性面积比率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of Bushen Tongluo prescription on ratio of fluorescent positive area for CD68, Arg-1, and iNOS in the lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CD68	Arg-1	iNOS
空白组		0.11 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.02	13.11 $\pm$ 0.12
模型组		3.41 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	3.57 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	30.36 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	1.13 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>	20.04 $\pm$ 0.13 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	0.68 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	14.05 $\pm$ 0.21 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>3)</sup>	1.22 $\pm$ 0.04 <sup>3)</sup>	14.10 $\pm$ 0.10 <sup>3)</sup>

Wnt3a、 $\beta$ -catenin 主要表达在肺泡腔、支气管周围;与空白组比较,模型组大鼠肺组织中 Wnt3a、 $\beta$ -catenin 表达面积增宽,荧光阳性面积比率显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高剂量组、补肾通络方低剂量组肺组织中 Wnt3a 表达范围及荧光强度均有不同程度的减轻,荧光阳性面积比率显著降低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高剂量组、补肾通络方低剂量组肺组织中  $\beta$ -catenin 表达范围及荧光强度均有不同程度的减轻,荧光阳性面

积比率明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 8、图 8、图 9。

**3.6 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中的 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路蛋白表达的影响** 与空白组比较,模型组 Wnt3a 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,补肾通络方低剂量组 Wnt3a 水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。与空白组比较,模型组  $\beta$ -catenin 水平显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高、低剂量组  $\beta$ -catenin 水平显著下降 ( $P < 0.01$ )。见图 10、表 9。

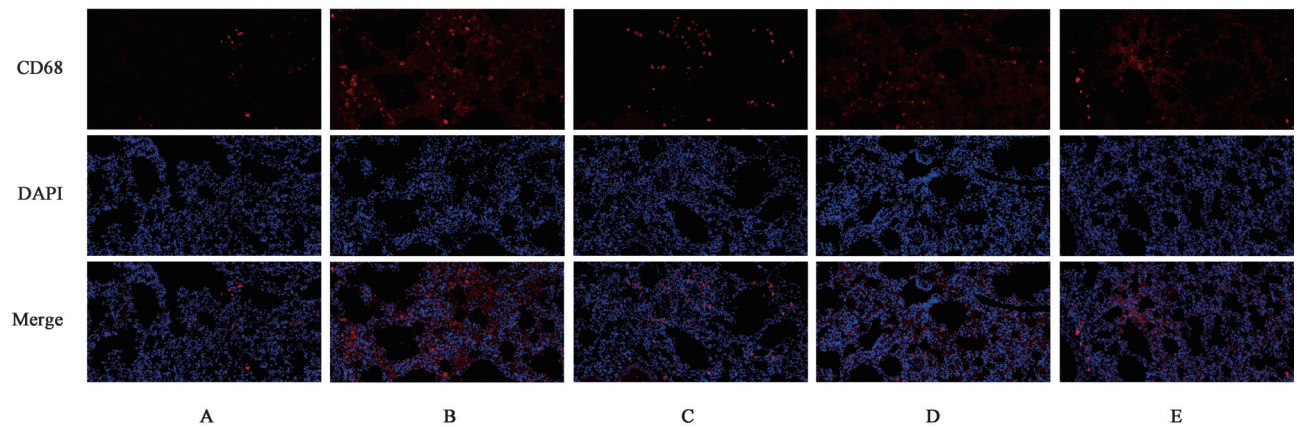


图 5 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 CD68 蛋白分布及表达的影响 (IF, ×200)

Fig. 5 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of CD68 proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IF, ×200)

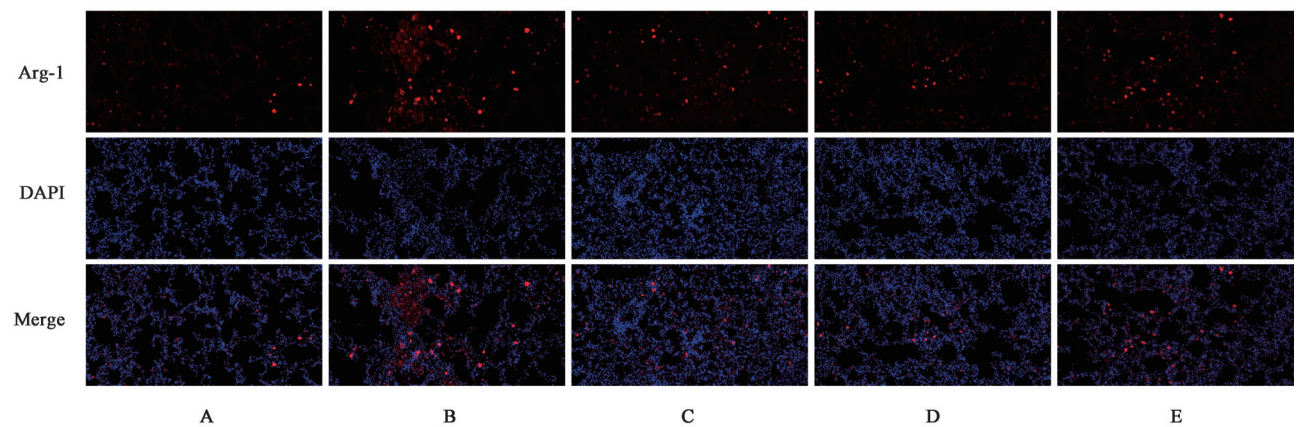


图 6 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 Arg-1 蛋白分布及表达的影响 (IF, ×200)

Fig. 6 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of Arg-1 proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IF, ×200)

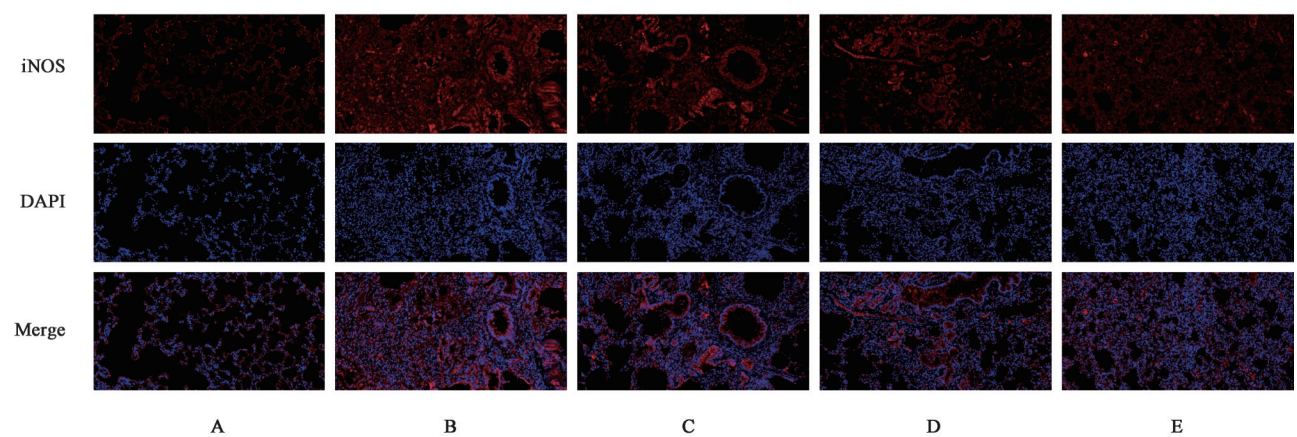


图 7 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 iNOS 蛋白分布及表达的影响 (IF, ×200)

Fig. 7 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of iNOS proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IF, ×200)

3.7 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中的 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路 mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组 Wnt3a mRNA 水平显著升高( $P<0.01$ );与模

型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高剂量组、补肾通络方低剂量组 Wnt3a mRNA 水平显著下降( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组  $\beta$ -catenin 水平显著升高( $P<$

表7 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中iNOS与Arg-1荧光阳性面积比率的比值的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of Bushen Tongluo prescription on ratio of iNOS to Arg-1 fluorescent positive area in lung tissues of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	iNOS/Arg-1
空白组		23.15±0.63 <sup>1)</sup>
模型组		8.50±0.13
吡非尼酮组	0.11	17.80±0.54 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	20.67±0.50 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	11.57±0.34 <sup>3)</sup>

0.01);与模型组比较,吡非尼酮组、补肾通络方高、低剂量组 $\beta$ -catenin水平显著下降( $P<0.01$ )。见表10。

#### 4 讨论

目前,中医医家多将IPF归为“肺癆”“肺痿”范畴,病机涉及虚、痰、瘀等方面,与肺肾相关。导师樊茂蓉教授发现IPF具有一定的家族遗传性,患者表现为活动后呼吸困难、呼多吸少、腰膝酸软、舌淡

表8 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin荧光阳性面积比率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 8 Effect of Bushen Tongluo prescription on ratio of fluorescent positive area for Wnt3a,  $\beta$ -catenin in the lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x}\pm s, n=3$ ) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Wnt3a	$\beta$ -catenin
空白组		3.06±0.15	2.86±0.71
模型组		28.68±1.06 <sup>1)</sup>	6.37±1.04 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	25.70±1.34 <sup>3)</sup>	4.44±0.40 <sup>2)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	14.40±0.62 <sup>3)</sup>	3.32±0.50 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	9.36±0.51 <sup>3)</sup>	3.98±0.92 <sup>3)</sup>

胖、尺脉弱等,考虑IPF患者具有先天肾气不足的因素,金水不生,致肺肾两虚;并且,部分IPF患者除有喘息、气短、咳嗽外,还存在口唇紫绀、爪甲青紫、舌下脉络迂曲、脉涩等表现,考虑患者肺络痹阻,基于此,樊茂蓉教授提出IPF“肺肾亏虚、肺络痹阻”的病机特点,拟补肾通络方治疗本病。补肾通络方由仙茅、淫羊藿、生黄芪、地龙、虎杖、莪术、海风藤、络石

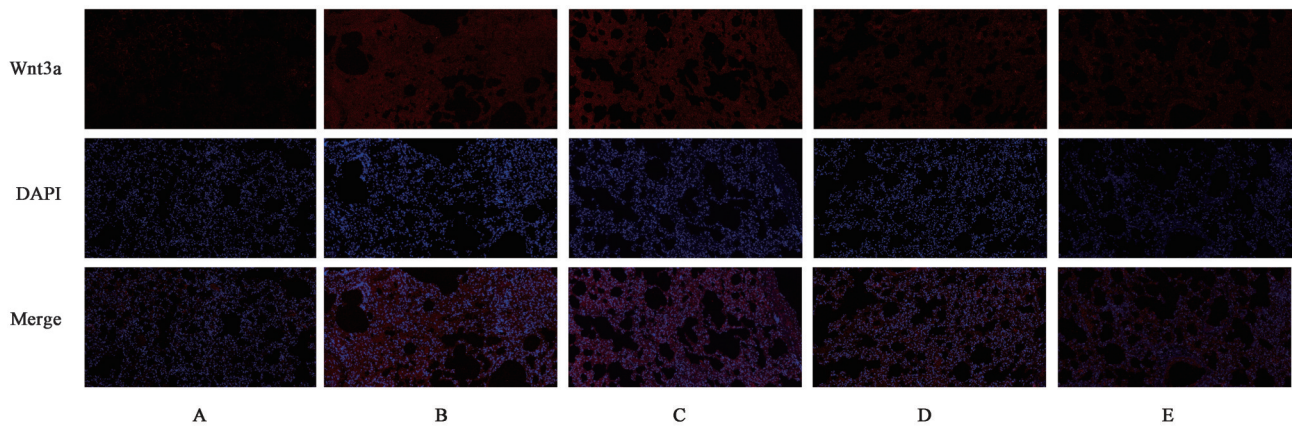


图8 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中Wnt3a蛋白分布及表达的影响(IF,  $\times 200$ )

Fig. 8 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of Wnt3a proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IF,  $\times 200$ )

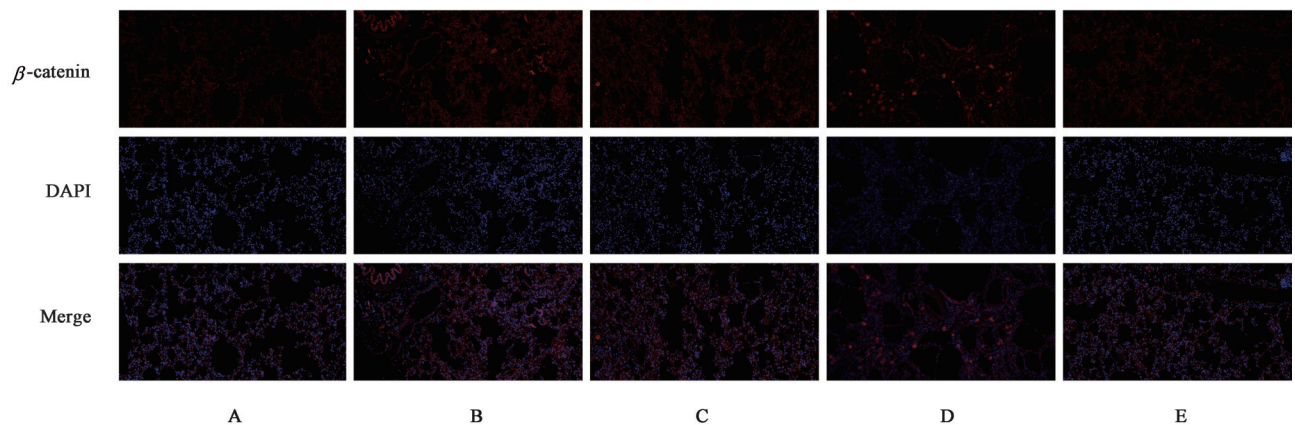


图9 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中 $\beta$ -catenin蛋白分布及表达的影响(IF,  $\times 200$ )

Fig. 9 Effect of Bushen Tongluo prescription on distribution and expression of  $\beta$ -catenin proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis (IF,  $\times 200$ )

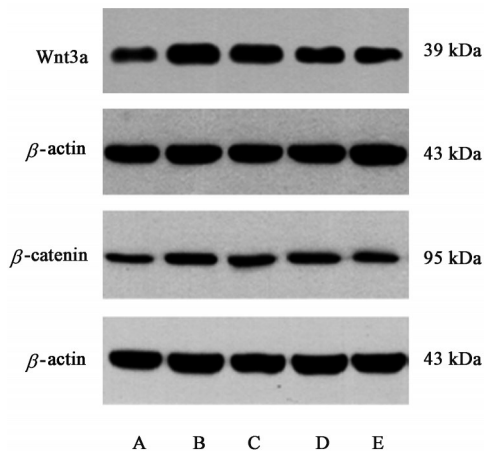


图10 肺纤维化大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白表达电泳

Fig. 10 Electrophoresis of Wnt3a and  $\beta$ -catenin protein expressions in lung tissues of rats with pulmonary fibrosis

表9 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 9 Effect of Bushen Tongluo prescription on relative expression levels of Wnt3a and  $\beta$ -catenin proteins in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Wnt3a/ $\beta$ -actin	$\beta$ -catenin/ $\beta$ -actin
空白组		0.34±0.15	0.43±0.01
模型组		0.62±0.06 <sup>1)</sup>	0.59±0.03 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	0.53±0.11	0.45±0.03 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	0.46±0.19	0.53±0.03 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	0.36±0.16 <sup>3)</sup>	0.52±0.03 <sup>3)</sup>

表10 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 10 Effect of Bushen Tongluo prescription on expression levels of Wnt3a and  $\beta$ -catenin mRNA in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Wnt3a	$\beta$ -catenin
空白组		1.19±0.18	1.52±0.49
模型组		6.22±1.08 <sup>1)</sup>	4.39±2.98 <sup>1)</sup>
吡非尼酮组	0.11	2.27±0.85 <sup>3)</sup>	1.83±0.84 <sup>3)</sup>
补肾通络方高剂量组	30.88	1.97±1.42 <sup>3)</sup>	1.64±0.99 <sup>3)</sup>
补肾通络方低剂量组	15.44	2.83±0.79 <sup>3)</sup>	1.56±0.44 <sup>3)</sup>

藤、威灵仙、浙贝母、麦冬、生甘草组成。方中淫羊藿、仙茅、黄芪共为君药,共同起到补益肺肾的作用;威灵仙、海风藤、络石藤通络除痹,配伍莪术破血消癥;麦冬益气养阴,助君药培补肾气,起到金水相生之功,与威灵仙、海风藤、络石藤、莪术相辅相成,共为臣药;地龙祛风解痉;虎杖、浙贝母清热化痰、散结通络,三药共为佐药;生甘草调和诸药,并能止咳化痰。诸药合用,共奏补肺益肾、除痹通络

之功。课题组前期临床观察发现补肾通络方在改善IPF患者呼吸困难、干咳等方面有较好疗效,且能够提高患者6 min步行距离,改善患者生活质量<sup>[13]</sup>。本实验在既往临床观察的基础上,进一步探究补肾通络方治疗IPF的作用机制。

实验中采用博来霉素诱导肺纤维化大鼠,通过HE及Masson染色观察发现,模型组大鼠气道壁、肺泡间质组织内大量炎性细胞浸润,纤维组织增生明显,符合肺纤维化特点,表明造模成功。肺纤维化是肺脏纤维结缔组织的广泛沉积,ECM成分的积聚是其主要特征之一<sup>[17-19]</sup>,Col I、Col III是ECM的主要成分<sup>[20]</sup>,当机体受到感染、炎症等刺激时,肺泡上皮细胞在TGF- $\beta_1$ 的作用下损伤、凋亡,向肌成纤维细胞转化,并进入肺间质,异常合成ECM,导致肺纤维化的发生<sup>[21-26]</sup>。 $\alpha$ -SMA、Vimentin是肌成纤维细胞表达的代表性蛋白,在纤维化组织中表达升高<sup>[27]</sup>,E-cadherin、Cytokeratin 19是一种能够维持上皮细胞稳定性的钙黏蛋白,在组织分化中能够形成稳定的粘附带维持细胞形态,若其表达不充分,则肺泡上皮细胞结构发生紊乱,并发生细胞表型变化<sup>[27]</sup>。故 $\alpha$ -SMA、Vimentin、E-cadherin、Cytokeratin 19可以作为标志性蛋白来反映肺泡上皮细胞EMT。在本实验中,模型组大鼠胶原纤维沉积增多,纤维组织明显增生,肺组织中Col I、Col III水平均升高,表明大鼠肺组织出现了ECM异常沉积;肺组织中肺泡上皮标志物E-cadherin、Cytokeratin 19水平降低,间质细胞表型 $\alpha$ -SMA、Vimentin水平升高,表明模型组大鼠肺泡上皮细胞发生了EMT。经补肾通络方治疗后,我们发现,大鼠肺组织中炎性细胞浸润、纤维组织增生较模型组有所减轻,大鼠肺组织中Col I与Col III水平均降低,血清中E-cadherin、Cytokeratin 19水平升高, $\alpha$ -SMA、Vimentin水平降低,这表明补肾通络方能够抑制ECM过度沉积及大鼠肺泡上皮细胞的EMT过程,最终抑制肺纤维化的形成。

作为免疫稳态的调控者,巨噬细胞通过M1/M2极化表型的动态平衡参与IPF的发生、发展过程<sup>[4-7]</sup>。M1巨噬细胞具有促炎特性,负责清除病原体或坏死组织,但M1过度极化造成的炎症环境会导致长期反复的组织器官损伤,研究显示IPF患者肺实质中的巨噬细胞M1亚群扩增明显,并参与促进肺肌成纤维细胞活化及肺纤维化进展<sup>[28]</sup>,iNOS作为M1型巨噬细胞极化的标志物,能够表达M1型巨噬细胞极化的程度<sup>[29]</sup>;另一方面,M2巨噬细胞可通过促

进组织修复维持稳态,但其过度极化可能诱发病理性纤维化,例如通过分泌TGF- $\beta_1$ 等细胞因子刺激成纤维细胞生成ECM蛋白及诱导EMT过程<sup>[30-31]</sup>,Arg-1作为M2型巨噬细胞极化的标志物,能够反应M2型巨噬细胞极化的程度<sup>[29]</sup>。而CD68作为巨噬细胞的通用标记物,能够直观反映肺组织巨噬细胞极化情况<sup>[32]</sup>。本研究发现,模型组大鼠肺组织中CD68、Arg-1、iNOS表达面积增宽,荧光强度升高,经补肾通络方治疗后,各给药组肺组织中CD68、Arg-1、iNOS表达范围及荧光强度均有不同程度的减轻,这表明补肾通络方可能通过影响CD68、Arg-1、iNOS的表达,进而影响EMT及ECM过程,最终抑制肺纤维化的形成。

Wnt是一种广泛分泌的糖蛋白,目前已知有19种Wnt蛋白,其中,Wnt3a可诱导肺泡上皮细胞增殖、成纤维细胞活化和胶原合成,调控细胞增殖、分化、凋亡、癌变及机体免疫,与肺纤维化密切相关<sup>[33]</sup>。在一般情况下,肺泡上皮细胞分泌很少的Wnt3a蛋白,胞质中 $\beta$ -catenin经过破坏复合体磷酸化、蛋白酶泛素化,含量极低。当上皮损伤后,Wnt3a蛋白分泌增多,与其受体结合,诱导破坏复合体解体,导致胞质内 $\beta$ -catenin大量聚集,诱导下游靶基因如金属基质蛋白酶-7、金属基质蛋白酶-9等基质蛋白的表达,进而诱导EMT转换<sup>[34-35]</sup>,参与肺纤维化过程。有研究发现,Wnt/ $\beta$ -catenin作为巨噬细胞极化的上游通路,能够诱导肾脏纤维化,然而,Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路是否能够通过巨噬细胞极化过程参与肺纤维化过程,目前尚不明确。在本研究中,模型组大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin蛋白及mRNA表达均高于空白组,这表明Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路在大鼠肺纤维化过程出现了异常激活;同时,模型组巨噬细胞极化标志物CD68、Arg-1、iNOS荧光强度亦较空白组升高,表明Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路可能通过巨噬细胞极化过程参与肺纤维化。而补肾通络方能够降低大鼠肺组织中Wnt3a、 $\beta$ -catenin的蛋白及mRNA表达水平,同时降低CD68、Arg-1、iNOS荧光强度,这表明补肾通络方可能减少肺泡上皮细胞分泌Wnt3a蛋白,抑制破坏复合体解体,减少胞质内 $\beta$ -catenin的聚集,进而抑制巨噬细胞极化过程,从而改善肺纤维化程度。

综合本次研究结果,可初步表明补肾通络方可能通过抑制上皮细胞-间质细胞转化、减少细胞外基质过度沉积,从而改善博来霉素所致的大鼠肺纤维化,其机制可能与抑制Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路及其介

导的巨噬细胞极化有关。但是由于本实验未设置Wnt3a/ $\beta$ -catenin信号通路抑制剂或基因敲除实验,其具体分子机制及何种方式介导仍需进一步实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] PODPLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY-JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: State of the art for 2023[J]. Eur Respir J, 2023, 61(4): 2200957.
- [2] RAJESH R, ATALLAH R, BARNTHALER T. Dysregulation of metabolic pathways in pulmonary fibrosis[J]. Pharmacol Ther, 2023, 246: 108436.
- [3] JIANG M, BU W, WANG X, et al. Pulmonary fibrosis: from mechanisms to therapies[J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 515.
- [4] CHEN S, SAEED A F U H, LIU Q, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 207.
- [5] GE Z, CHEN Y, MA L, et al. Macrophage polarization and its impact on idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1444964.
- [6] PERROT C Y, KARAMPITSAKOS T, HERAZO-MAYA J D. Monocytes and macrophages: Emerging mechanisms and novel therapeutic targets in pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2023, 325(4): C1046-C1057.
- [7] LEE J, CHUN W, LEE H J, et al. The role of macrophages in the development of acute and chronic inflammatory lung diseases[J]. Cells, 2021, 10(4): 897.
- [8] CHANDA D, OTOUPALOVA E, SMITH S R, et al. Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis[J]. Mol Aspects Med, 2019, 65: 56-69.
- [9] KANCHANAWONG P, CALDERWOOD D A. Organization, dynamics and mechanoregulation of integrin-mediated cell-ECM adhesions[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(2): 142-161.
- [10] TIAN Y, CHEN J, HUANG W, et al. Myeloid-derived Wnts play an indispensable role in macrophage and fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(6): 2310-2322.
- [11] BONELLA F, SPAGNOLO P, RYERSON C. Current and future treatment landscape for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Drugs, 2023, 83(17): 1581-1593.
- [12] INOUE Y, OGURA T, AZUMA A, et al. Real-world safety, tolerability and effectiveness of nintedanib in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: Final report of post-marketing surveillance in Japan[J]. Adv Ther, 2025, 42(2): 1075-1093.
- [13] 苗青, 丛晓东, 樊茂蓉, 等. 补肾通络汤治疗特发性肺纤维化28例疗效观察[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(2): 395-397.
- [14] MIAO Q, CONG X D, FAN M R, et al. Efficacy observation of Bushen Tongluo decoction in treating 28 cases of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(2): 395-397.
- [14] 吕晓东, 庞立健. 气管内注入博来霉素致大鼠肺纤维化动物模型方法优化分析[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(2): 3-4.

- LV X D, PANG L J. Optimization and analysis of the method for establishing a rat model of pulmonary fibrosis via intratracheal bleomycin injection[J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2007, 21(2):3-4.
- [15] 任培中, 苗青, 杨斌, 等. 通肺络补宗气方对肺纤维化大鼠肺功能、MMP9/TIMP1平衡及FN、Col IV表达的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(2):181-184, 202.
- REN P Z, MIAO Q, YANG B, et al. Effects of Tongfeiluo Buzongqi prescription on pulmonary function, MMP9/TIMP1 balance and expression of FN and Col IV in rats with pulmonary fibrosis[J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2020, 26(2):181-184, 202.
- [16] 李仪奎. *中药药理实验方法学*[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1991.
- LI Y K. Methodology of pharmacological experiments in traditional Chinese medicine[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1991.
- [17] SINGH D, RAI V, AGRAWAL D K. Regulation of collagen I and collagen III in tissue injury and regeneration [J]. *Cardiol Cardiovasc Med*, 2023, 7(1):5-16.
- [18] SHI H, DENG L, ZHOU Y, et al. Network pharmacology and experiments in vivo and in vitro reveal that the Jia-Wei-Bu-Shen-Yi-Qi formula (JWBSYQF) and its active ingredient baicalein ameliorate BLM-induced lung fibrosis in mice via PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315:116691.
- [19] MOSS B J, RYTER S W, ROSAS I O. Pathogenic mechanisms underlying idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2022, 17:515-546.
- [20] PHAN T, PALIOGIANNIS P, NASRALLAH G K, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(5):2031-2057.
- [21] JOLLY M K, WARD C, EAPEN M S, et al. Epithelial-mesenchymal transition, a spectrum of states: Role in lung development, homeostasis, and disease[J]. *Dev Dyn*, 2018, 247(3):346-358.
- [22] PENG L, WEN L, SHI Q, et al. Scutellarin ameliorates pulmonary fibrosis through inhibiting NF-kappaB/NLRP3-mediated epithelial-mesenchymal transition and inflammation [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):978.
- [23] YUAN Q, TAN R J, LIU Y. Myofibroblast in kidney fibrosis: Origin, activation, and regulation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165:253-283.
- [24] 吴东升, 李嫣红, 阳玉婷, 等. 芍药汤通过PPAR $\gamma$ /TGF- $\beta_1$ /Smads信号通路对溃疡性结肠炎肠纤维化上皮间质转化的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(11):94-99.
- WU D S, LI Y H, YANG Y T, et al. Effects of Shaoyao decoction on epithelial-mesenchymal transition in intestinal fibrosis in ulcerative colitis with damp-heat syndrome through PPAR $\gamma$ /TGF- $\beta_1$ /Smads signaling pathway[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 30(11):94-99.
- [25] SUN Y, YU X, LI M, et al. P44/42 MAPK signal pathway-mediated hyperphosphorylation of paxillin and redistribution of E-cadherin was involved in microcystin-LR-reduced cellular adhesion in a human liver cell line[J]. *Chemosphere*, 2018, 200:594-602.
- [26] 张文富, 吴姗姗, 戴铭, 等. 壮方柔肝化纤颗粒对CCl $_4$ 复合因素诱导肝纤维化大鼠模型的干预效应及其对 $\alpha$ -SMA、E-Cadherin表达的影响[J]. *海南医学院学报*, 2023, 29(5):321-330.
- ZHANG W F, WU S S, DAI M, et al. Intervention effect of Zhuangfang Rougan Huaxian granules on CCl $_4$  compound Factor-induced liver fibrosis rat model and its effect on the expression of  $\alpha$ -SMA and E-cadherin[J]. *J Hainan Med Univ*, 2023, 29(5):321-330.
- [27] LI Y, QIN W, LIANG Q, et al. Bufeihuo capsule alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via TGF-beta1/Smad2/3 signaling[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 316:116733.
- [28] CHANG X, XING L, WANG Y, et al. Nanoengineered immunosuppressive therapeutics modulating M1/M2 macrophages into the balanced status for enhanced idiopathic pulmonary fibrosis therapy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(16):8664-8678.
- [29] DU X, LIU H, SHI J, et al. The PD-1/PD-L1 signaling pathway regulates decidual macrophage polarization and may participate in preeclampsia[J]. *J Reprod Immunol*, 2024, 164:104258.
- [30] ZHANG Y, FU J, HAN Y, et al. Two-pore-domain potassium channel TREK-1 mediates pulmonary fibrosis through macrophage M2 polarization and by direct promotion of fibroblast differentiation[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(5):1279.
- [31] XIAO J, YANG Z, WANG S, et al. CD248-expressing cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via inducing M2-polarized macrophages[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):14343.
- [32] ZHANG J, LIU X, WAN C, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1beta production in inflammatory root resorption[J]. *J Clin Periodontol*, 2020, 47(4):451-460.
- [33] KADOTA T, FUJITA Y, ARAYA J, et al. Human bronchial epithelial cell-derived extracellular vesicle therapy for pulmonary fibrosis via inhibition of TGF-beta-Wnt crosstalk[J]. *J Extracell Vesicles*, 2021, 10(10):e12124.
- [34] WANG J, CAI H, LIU Q, et al. Cinobufacini inhibits colon cancer invasion and metastasis via suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway and EMT[J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(3):703-718.
- [35] YANG F, HOU Z, ZHU H, et al. Catalpol protects against pulmonary fibrosis through inhibiting TGF-beta1/Smad3 and Wnt/beta-catenin signaling pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:594139.

[责任编辑 周冰冰]