

补阳还五汤对特发性肺纤维化大鼠 Keap1/Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路的影响

张喆¹, 赵舒¹, 韩云鹏¹, 靳枫¹, 商佳荣¹, 王杰鹏^{1,2}, 方朝义^{1,2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200;

2. 河北省中西医结合肺病研究重点实验室, 石家庄 050091)

【摘要】 目的:观察补阳还五汤对特发性肺纤维化(IPF)大鼠 Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)抗氧化信号通路的影响,探讨该方干预IPF的作用机制。方法:将40只SPF级雄性SD大鼠按照随机数字表法分为假手术组、模型组、补阳还五汤组、尼达尼布组,每组10只。除假手术组外,其余各组气管内滴注博来霉素(0.005 g·kg⁻¹)制备IPF大鼠模型。补阳还五汤组灌服补阳还五汤煎液(14.84 g·kg⁻¹),尼达尼布组灌服尼达尼布混悬液(0.1 g·kg⁻¹),假手术组、模型组灌服等容积生理盐水,共28 d。肺功能检测后,取血清及肺组织。苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色观察肺组织病理改变并行半定量分析;检测肺组织羟脯氨酸(HYP)含量;测定血清和肺组织丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、免疫组化和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA与蛋白表达情况。结果:与假手术组比较,模型组大鼠呼吸系统阻力和弹力增高,顺应性显著降低($P<0.01$);肺指数和病理评分、HYP含量显著升高($P<0.01$);血清和肺组织MDA含量增加,SOD、GSH-Px、CAT活性显著降低($P<0.01$);肺组织Keap1 mRNA与蛋白表达降低,Nrf2、HO-1 mRNA与蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,补阳还五汤组大鼠呼吸系统阻力和弹力下降,顺应性显著升高($P<0.01$);肺指数、病理评分、肺组织HYP含量显著降低($P<0.01$);血清和肺组织MDA含量下降,SOD、GSH-Px、CAT活性显著升高($P<0.01$);肺组织Keap1表达降低,Nrf2、HO-1表达升高($P<0.05, P<0.01$)。结论:补阳还五汤可启动Keap1/Nrf2/HO-1介导的抗氧化效应,增强机体抗氧化能力,延缓IPF大鼠病理进程。

【关键词】 特发性肺纤维化; 氧化损伤; Kelch样ECH相关蛋白-1(Keap1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路; 补阳还五汤

【中图分类号】 R2-0; R33; R259; R318.13 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2022)17-0009-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20221639

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220628.1953.008.html>

【网络出版日期】 2022-06-29 14:15

Effect of Buyang Huanwutang on Keap1/Nrf2/HO-1 Antioxidant Signaling Pathway in Rats with Idiopathic Pulmonary Fibrosis

ZHANG Zhe¹, ZHAO Shu¹, HAN Yunpeng¹, JIN Feng¹, SHANG Jiarong¹,

WANG Jiepeng^{1,2}, FANG Chaoyi^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Lung Disease Research, Shijiazhuang 050091, China)

【Abstract】 Objective: To study the effect of Buyang Huanwutang on Kelch-like Ech-related protein 1

【收稿日期】 2022-03-19

【基金项目】 中央引导地方科技发展资金项目(206Z7704G);河北省自然科学基金项目(H2019423092);河北中医学院省属高校基本科研业务费项目(JTZ2020002);国家级大学生创新创业训练计划项目(201914432006)

【第一作者】 张喆,在读硕士,从事肺脏病证基础与临床研究,E-mail:2587373202@qq.com

【通信作者】 *方朝义,博士,教授,博士生导师,从事肺脏病证基础与临床研究,E-mail:hbfcy@163.com

(Keap1)/nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) antioxidant signaling pathway in rats with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and explore the mechanism of this prescription in the treatment of IPF. **Method:** Forty SPF-grade male SD rats were assigned into a sham operation group, a model group, a Buyang Huanwutang group, and a nintedanib group according to random number table method, with 10 rats in each group. IPF rat model was established by intratracheal infusion of bleomycin (0.005 g·kg⁻¹) in other groups except the sham operation group. Buyang Huanwutang group was administrated with Buyang Huanwutang (14.84 g·kg⁻¹), intragastric administration of nintedanib suspension (0.1 g·kg⁻¹), sham operation group and model group were given equal volume of normal saline, for 28 days. After lung function test, serum and lung tissue samples were collected. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson trichrome staining were employed to observe the pathological changes of the lung tissue. The content of hydroxyproline (HYP) in lung tissue was detected. The levels of malondialdehyde (MDA) in serum and lung tissue, and the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) were determined. The mRNA and protein levels of Keap1, Nrf2, and HO-1 was determined by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, immunohistochemical staining, and Western blot. **Result:** Compared with the sham operation group, the modeling increased the resistance and elasticity and decreased the compliance of respiratory system ($P<0.01$), elevated the lung index, pathological score, and HYP content in lung tissue ($P<0.01$), and enriched MDA in serum and lung tissue, while it decreased the activities of SOD, GSH-Px, and CAT ($P<0.01$). Furthermore, the modeling down-regulated the mRNA and protein levels of Keap1 and up-regulated those of Nrf2 and HO-1 in lung tissue ($P<0.01$). Compared with the model group, Buyang Huanwutang decreased the resistance and elasticity and increased the compliance of respiratory system ($P<0.01$), lowered the lung index, pathological score, and HYP content in lung tissue ($P<0.01$), and reduced MDA in serum and lung tissue, while it increased the activities of SOD, GSH-Px, and CAT ($P<0.01$). Additionally, Buyang Huanwutang down-regulated the expression of Keap1 and up-regulated that of Nrf2 and HO-1 in lung tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Buyang Huanwutang can activate Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway to enhance the antioxidant capacity and slow down the pathological process of IPF in rats.

[Keywords] idiopathic pulmonary fibrosis; oxidative damage; Kelch-like E₂-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor E₂-associated factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway; Buyang Huanwutang

特发性肺纤维化(IPF)是一种多发于老年群体的进行性、不可逆的致命性肺间质疾病,以肺部蜂窝状改变为典型表征^[1]。研究显示,该病发病率呈逐年升高态势,且愈后极差,患者确诊后的平均生存时间为2~3年^[2-3],目前尚无理想的治疗药物。尼达尼布与吡非尼酮虽为临床一线用药,但其诱发的胃肠道不适、肝损害等不良反应^[4],限制了其临床应用。因此,寻求安全有效的治疗方案成为业界研究的重要方向。

研究显示,IPF患者临床可见进行性呼吸困难、易疲劳及凝血异常的表现^[5],益气活血法对IPF患者具有确当的临床疗效^[6],前期研究也显示益气活血方药可通过抑制炎症损伤、血管新生等对实验性IPF大鼠产生保护作用^[7-8]。以补阳还五汤为代表的益气活血方已被临床和基础研究证实具有显著的

抗肺纤维化作用^[9-10]。深入探讨其内在机制,有助于为临床应用提供充分的实验依据。

虽然IPF的发病机制尚未完全明确,但多项研究均已证实氧化损伤在IPF发病中的重要作用,其中核因子E₂相关因子2(Nrf2)活化后介导的抗纤维化效应成为研究药物干预效应的重要靶点^[11-12]。本研究在建立IPF动物模型的基础上,观察补阳还五汤对Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)/Nrf2/血红素氧合酶-1(HO-1)介导的抗氧化信号通路的干预特点,并以方测证,深入探讨益气活血法影响IPF病理进程的可能机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠40只,体质量180~200 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物合格证号SCXK(京)2016-0006。标准动

物房饲养(温度20~25℃,湿度40%~60%),自由进食水。本实验已通过河北中医学院医学与实验动物伦理委员会审查(审查批号DWLL2020086)。

1.2 药物 注射用盐酸博来霉素(瀚晖制药有限公司,批号20067411);补阳还五汤方(《医林改错》)组成:生黄芪120g,批号20200801;当归尾6g,批号20200630;赤芍4.5g,批号088200901;地龙3g,批号A190034001;川芎3g,批号098191202;桃仁3g,批号20200912;红花3g,批号20200701,中药饮片由北京同仁堂石家庄桥东大药房有限公司提供,经河北中医学院药学院王鑫国教授鉴定质量合格。乙磺酸尼达尼布软胶囊(勃林格殷格翰,批号900678,进口药品注册证号H20170355);羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号20181211)。

1.3 试剂 羧脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A030-2-1、A003-1、A001-3、A005-1-2、A007-1-1);小鼠来源单克隆抗体Keap1、Nrf2、兔来源单克隆抗体HO-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab119403、ab89443、ab189491、ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔/小鼠免疫球蛋白(Ig)G抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为ZB2301、ZB2305);总RNA提取试剂盒、反转录试剂盒、聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(美国Promega公司,批号分别为LS1040、A5001、A6002);BCA蛋白质定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020、P1200-1/P1200-2);ECL发光液(美国Millipore公司,批号WBKLS0500);免疫组织化学染色试剂盒(美国Vector公司,批号PK4001/2)。

1.4 仪器 EG11508型组织包埋机、RM2255型全自动轮转式切片机、HI1210型摊片机(德国Leica公司);Plus384型酶标仪(美国Molecular Devices公司);Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪、CFX96型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);Odyssey Clx型双色红外激光成像系统(美国Li-Cor公司);Flexivent fv-fx4型动物肺功能分析系统(加拿大Scireq公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 40只SD大鼠适应性喂养1周,随机分为假手术组、模型组、模型+补阳还

五汤组(简称“补阳还五汤组”)、模型+尼达尼布组(简称“尼达尼布组”),每组10只。根据文献[13]方法,气管内滴注博来霉素($0.005\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)制备IPF动物模型。术后24h灌胃治疗。根据文献[14]方法确定灌胃量,假手术组和模型组灌服等容积生理盐水($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),补阳还五汤组灌服补阳还五汤煎液($14.84\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,按成人质量60kg计算),尼达尼布组灌服尼达尼布混悬液($0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)(以0.5%羧甲基纤维素钠充分混匀)^[15]。每日1次,连续28d。造模组大鼠HE染色和Masson染色的结果显示,造模后第28天,可见部分肺泡出现塌陷、融合、间隔增宽,肺间质磨玻璃样改变并伴有炎性细胞浸润,在肺间质区域可见大量平行、交错分布的蓝色胶原纤维束,与文献报道一致^[16],提示造模成功。

2.2 肺功能检测 末次灌胃结束后,每组随机选取3只大鼠,2%戊巴比妥钠($0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射,麻醉后暴露气管,测定大鼠肺功能。主要检测指标:呼吸系统阻力(Rrs)、呼吸系统弹力(Ers)、呼吸系统顺应性(Crs)、主气道阻力(Rn)、组织衰减(G)、组织弹性(H)。

2.3 取材 各组剩余大鼠称取体质量后,以2%戊巴比妥钠($0.04\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔麻醉后经股动脉取血2mL,4℃、3500 $\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min(离心半径10cm),分离血清。剖取全肺,4℃预冷生理盐水洗去表面血液,滤纸吸干水分并称质量。左肺组织修剪成约1.0cm×1.0cm×0.3cm组织块,置于4%多聚甲醛溶液固定;剩余肺组织置于冻存管中,-80℃冻存储备检。

2.4 指标检测

2.4.1 肺指数 根据大鼠肺质量与体质量,计算肺指数,肺指数=肺湿质量(mg)/体质量(g)。

2.4.2 肺组织病理形态学观察 肺组织以4%多聚甲醛固定24h,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,石蜡包埋,制成4 μm 切片,行HE和Masson染色。根据文献[17-18],分别采用Szapiel评分体系和Ashcroft评分体系评价肺泡炎症和胶原沉积情况。其中,肺组织纤维化分为0~8级,纤维化程度为相应奇数级,若判断两相邻奇数纤维化程度有困难,则选择之间的偶数级。见表1和表2。

2.4.3 肺组织HYP含量测定 取冻存肺组织,根据试剂盒操作说明,采用样本碱水解法测定HYP含量。

2.4.4 氧化损伤情况评测 取血清及肺组织,根据试剂盒操作说明,采用TBA法测定MDA含量,

表1 Szapiel评分系统

Table 1 Szapiel score system

肺炎程度	组织病理学特征
0级	肺组织正常
1级	轻度肺炎(+),肺泡间隔炎细胞浸润变宽,受累面积<20%肺叶
2级	中度肺炎(++),受累面积20%~50%肺叶
3级	重度肺炎(+++),受累面积>50%肺叶

表2 Ashcroft评分系统

Table 2 Ashcroft score system

肺纤维化程度	组织病理学特征
0级	肺组织正常
1级	细支气管和肺泡壁轻度纤维化
3级	细支气管和肺泡壁中度纤维化,但无明显肺组织结构破坏
5级	明显纤维化伴有肺组织结构破坏和纤维条带或纤维小结节形成
7级	严重肺组织结构变形或出现大面积纤维灶
8级	整个视野全部出现纤维化病灶

WST-1法测定SOD活性,比色法测定GSH-Px活性,钼酸铵法测定CAT活性。

2.4.5 免疫组化观察肺组织Keap1、Nrf2和HO-1表达 取肺组织切片,脱蜡及水化后,滴加3% H₂O₂去除内源性过氧化物酶。抗原修复(柠檬酸钠缓冲液)后以1.5%山羊血清封闭10 min。滴加一抗(Keap1 1:80, Nrf2 1:100, HO-1 1:200),4℃过夜。洗去一抗后加入生物素标记的抗小鼠/兔IgG抗体(稀释比例为1:150),加AB反应液。DAB显色后苏木素复染,后经盐酸乙醇分化、脱水、二甲苯透明后,封片、拍照。以Image-Pro Plus软件测定积分光密度和阳性表达面积,计算平均积分吸光度AA。AA=积分吸光度/阳性表达面积。

2.4.6 Real-time PCR测定大鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA表达 称取冻存肺组织30 mg,液氮环境下研磨,转至1.5 mL离心管,加入RNA裂解液0.5 mL,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径7 cm,下同),吸附柱提取上清液。DNA酶消化后,加入无核酸酶水60 μL,离心提取总RNA。根据逆转录试剂盒说明书进行逆转录合成cDNA,并以cDNA为模板,进行聚合酶链式反应。反应条件为95℃预变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火1 min,44个循环。采用2^{-ΔΔC_t}法计算得到mRNA相对表达量。选取GAPDH作为内参基因。引物由生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列

见表3。

表3 引物序列

Table 3 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Keap1	上游 ATCTAGGGCATCCTGCTCCC	82
	下游 ACAGAAGTTGGGTCATTGGCT	
Nrf2	上游 GCCAAGCAGGAGGAGTTCTT	131
	下游 GGGCAGTCGTATTTGACCCA	
HO-1	上游 CGAGGAAAATCCAGATCAGCAC	103
	下游 CATAAATCCCCTGCCACGGTC	
GAPDH	上游 AGGAAATGATGACCTCCTGAACT	79
	下游 TGTTTTTGTAAGTATCTTGGTGCT	

2.4.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织Keap1、Nrf2、HO-1蛋白表达 取肺组织100 mg,加入RIPA裂解液,剪碎后匀浆。4℃、12 000 r·min⁻¹离心10 min,提取上清。BCA法进行蛋白浓度测定,后以100℃加热5 min。根据SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒配置凝胶并进行电泳,后将蛋白转印至PVDF膜。5%脱脂奶粉溶液封闭1 h后,加入一抗(Keap1 1:400, Nrf2 1:600, HO-1 1:800, GAPDH 1:5 000),4℃孵育,过夜。继以辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔/小鼠IgG(1:5 000),ECL显影液显色后双色红外激光成像系统成像。以Image-Pro Plus 6.0软件测定条带灰度值,计算目的蛋白相对含量(目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值)。

2.5 统计学方法 数据采用SPSS 23.0软件进行统计,计量资料数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。若数据符合正态分布、方差齐时,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用最小显著性差异法(LSD);方差不齐时用Dunnett's T3法,等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对IPF大鼠肺功能的影响 与假手术组比较,模型组大鼠Rrs、Ers、H、Rn水平显著升高($P < 0.01$),G、Crs水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,两用药组大鼠Rrs、Ers、H、Rn水平显著降低($P < 0.01$),G、Crs水平均升高,差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。见表4和表5。

3.2 对IPF大鼠肺组织病理形态的影响 假手术组大鼠肺泡组织结构完整,肺间质偶见胶原沉积。与假手术组比较,模型组大鼠肺泡结构紊乱,肺泡间隔增宽,呈磨玻璃样改变,肺间质可见大量炎性细胞渗出,Szapiel评分和Ashcroft评分显著升高($P <$

表4 补阳还五汤对IPF大鼠肺功能Rrs、Ers、Crs的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang on Rrs, Ers and Crs of lung function in IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Rrs /cmH ₂ O·s·mL ⁻¹	Ers /cmH ₂ O·mL ⁻¹	Crs /mL·cmH ₂ O ⁻¹
假手术组		0.09±0.01	1.92±0.20	0.39±0.02
模型组		0.23±0.02 ²⁾	7.85±0.64 ²⁾	0.07±0.01 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	0.13±0.00 ⁴⁾	4.57±0.11 ⁴⁾	0.17±0.02 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	0.14±0.02 ⁴⁾	4.69±0.60 ⁴⁾	0.16±0.01 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表5-表11同)

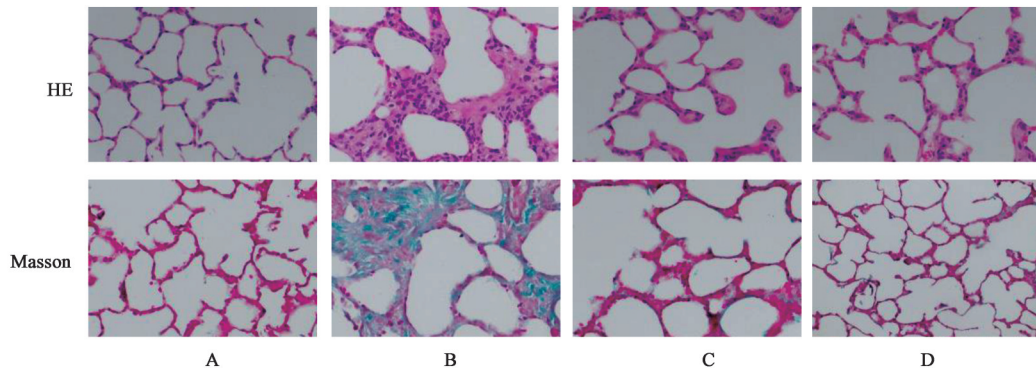
0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和尼达尼布组

表5 补阳还五汤对IPF大鼠肺功能Rn、G、H的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang on lung function Rn, G and H in IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Rn /cmH ₂ O·s·mL ⁻¹	G /cmH ₂ O·mL ⁻¹	H /cmH ₂ O·mL ⁻¹
假手术组		0.02±0.00	0.88±0.05	1.98±0.12
模型组		0.21±0.02 ²⁾	0.49±0.01 ²⁾	7.01±0.09 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	0.12±0.01 ⁴⁾	0.74±0.04 ⁴⁾	4.15±0.37 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	0.14±0.01 ⁴⁾	0.75±0.06 ⁴⁾	3.93±0.51 ⁴⁾

大鼠炎性渗出和胶原沉积减少,肺泡间隔较模型组变窄,Szapiel评分和Ashcroft评分显著降低(P<0.01)。见图1、表6。



注:A.假手术组;B.模型组;C.补阳还五汤组;D.尼达尼布组(图2和图3同)

图1 补阳还五汤对IPF大鼠肺组织病理形态学改变(×400)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang on pathological morphology of IPF rats (×400)

表6 补阳还五汤对IPF大鼠肺组织Szapiel评分和Ashcroft评分影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Buyang Huanwutang on Szapiel score and Ashcroft score of lung tissue in IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Szapiel评分	Ashcroft评分
假手术组		0.60±0.52	0.80±0.42
模型组		2.70±0.48 ²⁾	6.80±0.63 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	1.80±0.42 ⁴⁾	4.10±0.74 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	1.70±0.48 ⁴⁾	4.20±0.63 ⁴⁾

3.3 对IPF大鼠肺指数及HYP含量影响 与假手术组比较,模型组肺指数及HYP含量显著增高(P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和尼达尼布组肺指数及HYP含量显著下降(P<0.01)。见表7。

3.4 对IPF大鼠血清和肺组织MDA含量及SOD、GSH-Px、CAT活性的影响 与假手术组比较,模型组血清和肺组织MDA含量升高(P<0.01),SOD、GSH-Px、CAT活性降低(P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和尼达尼布组血清和肺组织MDA含量

表7 补阳还五汤对IPF大鼠肺指数及HYP含量影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 7 Effect of Buyang Huanwutang on lung index and HYP content in IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肺指数/mg·g ⁻¹	HYP/μg·g ⁻¹
假手术组		4.10±0.38	1.86±0.34
模型组		9.84±0.74 ²⁾	6.87±0.27 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	6.87±0.77 ⁴⁾	4.87±0.47 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	6.49±0.89 ⁴⁾	4.64±0.21 ⁴⁾

降低(P<0.01),SOD、GSH-Px、CAT活性升高(P<0.01)。见表8和表9。

3.5 对IPF大鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1表达的影响 与假手术组比较,模型组肺组织Keap1表达显著下降(P<0.01),Nrf2、HO-1表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,补阳还五汤组和尼达尼布组肺组织Keap1表达明显降低(P<0.05),Nrf2、HO-1表达显著升高(P<0.01)。见图2、表10。

3.6 对IPF大鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA及蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组肺组

表8 补阳还五汤对IPF大鼠血清MDA含量和SOD、GSH-Px、CAT活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Effect of Buyang Huanwutang on MDA content and activities of SOD, GSH-Px and CAT in serum of IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U	CAT/U·mL ⁻¹
假手术组		6.81±0.68	182.77±3.79	337.56±9.30	2.09±0.17
模型组		9.60±0.89 ²⁾	140.25±1.56 ²⁾	260.67±5.54 ²⁾	1.35±0.12 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	8.59±0.48 ⁴⁾	148.07±2.14 ⁴⁾	293.93±11.62 ⁴⁾	1.81±0.07 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	8.68±0.38 ⁴⁾	149.56±2.68 ⁴⁾	292.39±7.70 ⁴⁾	1.82±0.10 ⁴⁾

表9 补阳还五汤对IPF大鼠肺组织MDA含量和SOD、GSH-Px、CAT活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 9 Effect of Buyang Huanwutang on MDA content and activities of SOD, GSH-Px and CAT in lung of IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹
假手术组		1.24±0.07	40.29±1.40	107.32±2.14	5.70±0.18
模型组		1.98±0.11 ²⁾	26.72±0.82 ²⁾	69.30±3.79 ²⁾	3.22±0.12 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	1.67±0.08 ⁴⁾	34.47±1.37 ⁴⁾	87.82±2.10 ⁴⁾	4.58±0.10 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	1.62±0.07 ⁴⁾	34.79±1.17 ⁴⁾	87.81±3.47 ⁴⁾	4.52±0.10 ⁴⁾

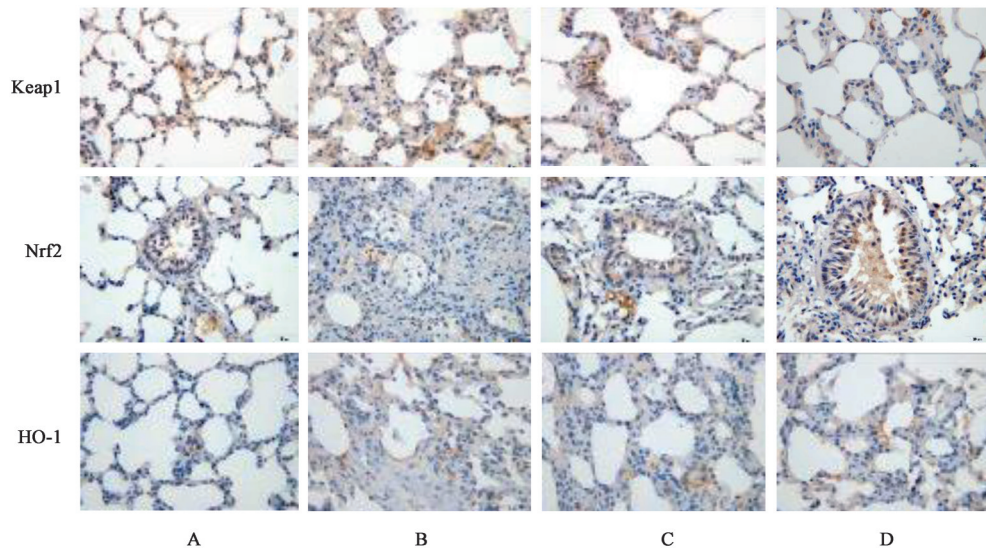


图2 补阳还五汤对IPF大鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1免疫组织化学染色的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Buyang Huanwutang on immunohistochemical staining of Keap1, Nrf2 and HO-1 in lung tissues of IPF rats (IHC, ×400)

表10 补阳还五汤对IPF大鼠肺组织Keap1、Nrf2、HO-1表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 10 Effect of Buyang Huanwutang on Keap1, Nrf2 and HO-1 in IPF rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1	Nrf2	HO-1
假手术组		0.34±0.02	0.16±0.01	0.29±0.02
模型组		0.26±0.02 ²⁾	0.39±0.04 ²⁾	0.43±0.01 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	0.24±0.02 ³⁾	0.54±0.04 ⁴⁾	0.46±0.03 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	0.24±0.02 ³⁾	0.52±0.03 ⁴⁾	0.46±0.02 ⁴⁾

织Keap1 mRNA及蛋白表达显著降低($P<0.01$), Nrf2、HO-1 mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,补阳还五汤组和尼达尼布组肺组织Keap1 mRNA及蛋白表达明显降低($P<0.05$), Nrf2、

HO-1 mRNA及蛋白表达显著升高($P<0.01$)。见表11、图3。

4 讨论

中医学无IPF病称,一般据其临床特征归属“肺痹”“肺痿”等病证范畴。《金匱要略·脏腑经络先后病脉证》载:“息张口短气者,肺痿唾沫”,《医门法律·卷六·肺痈肺痿门》云:“肺痿者,肺气萎而不振也”;《症因脉治》云肺痹之成“或形寒饮冷,或形热饮热,肺为华盖,恶热恶寒,或悲哀动中,肺气受损,而肺痹之症作矣。”肺主气司呼吸、朝百脉主治节,肺气受损不能助心行血,血行涩滞,留而成瘀,结合临床患者多以咳嗽、短气、口唇青紫为主要临床表现^[19-20],“气虚血瘀”为IPF重要的证候特征。前期研究显示,IPF大鼠存在蜷卧懒动,鼻头、口唇和爪

表 11 补阳还五汤对 IPF 大鼠肺组织中 Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 11 Effect of Buyang Huanwutang on mRNA and protein expression of Keap1, Nrf2 and HO-1 in IPF rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1 mRNA	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA	Keap1/GAPDH	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH
假手术组		1.52±0.18	0.77±0.08	0.50±0.13	0.60±0.02	0.42±0.02	0.30±0.02
模型组		1.06±0.15 ²⁾	1.07±0.12 ²⁾	0.82±0.10 ²⁾	0.53±0.02 ²⁾	0.56±0.03 ²⁾	0.41±0.03 ²⁾
补阳还五汤组	14.84	0.90±0.11 ³⁾	1.36±0.10 ⁴⁾	1.28±0.15 ⁴⁾	0.48±0.02 ³⁾	0.68±0.02 ⁴⁾	0.56±0.02 ⁴⁾
尼达尼布组	0.1	0.89±0.10 ³⁾	1.33±0.11 ⁴⁾	1.23±0.13 ⁴⁾	0.47±0.03 ³⁾	0.68±0.03 ⁴⁾	0.55±0.03 ⁴⁾

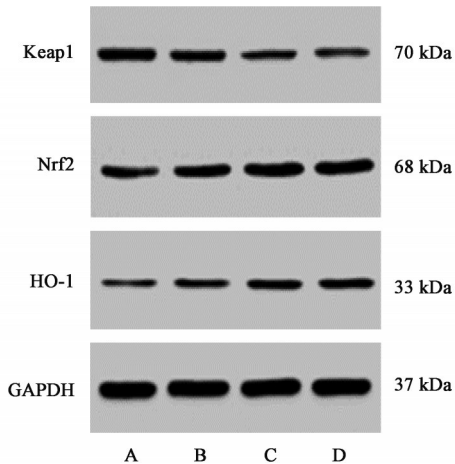


图 3 大鼠肺组织 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Keap1, Nrf2 and HO-1 proteins expression in rat lung tissue

甲紫暗等变化,且负重游泳时间减少、全血黏度升高,表明 IPF 大鼠具有典型的气虚血瘀征象^[21],益气活血法当为 IPF 的重要治疗方法。

补阳还五汤载于《医林改错》,系燕赵名医王清任所创,由黄芪、当归尾、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙组成。方中重用生黄芪为君药,补益肺气,使气旺则血行,《本草求真》中记载黄芪“能入肺补气”,“为补气诸药之最”;臣以归尾活血养血,兼具降逆平喘之功,即如《神农本草经》所谓“主咳逆上气”;川芎、赤芍、桃仁、红花,助归尾活血祛瘀而为佐,配以性善走窜、长于通络之地龙,与生黄芪配合,增强补气通络、开通玄府之力,使药力能周行全身。临床证据显示,补阳还五汤可改善 IPF 患者临床症状和缺氧状态,提高患者生存质量^[22];与 N-乙酰半胱氨酸胶囊合用可有效缓解 IPF 患者呼吸困难、改善肺功能各项指标、调节支气管肺泡灌洗液相关炎症因子水平^[23]。以上为深入研究补阳还五汤抑制 IPF 机制提供了临床依据。

氧化-抗氧化失衡是 IPF 的重要病理环节。肺组织损伤后,氧自由基过度积累引发脂质过氧化反应,氧化程度超出氧化物清除能力,使氧化还原平衡状态被破坏,进而促进细胞因子和生长因子诱发

炎症反应,刺激肌成纤维细胞活化,最终导致肺纤维化^[24]。因此,通过抗氧化以纠正氧化-抗氧化失衡可作为防治 IPF 的重要途径。

外源性有毒物质和氧化应激的感受器 Nrf2 调控的下游 II 相代谢酶和抗氧化蛋白/酶在细胞防御保护中发挥重要作用,是近年来抗氧化研究领域的热点。Keap1/ARE 信号通路是机体内重要的抗氧化防御机制,具有保护细胞免受氧化应激损伤的作用^[25-26]。Keap1 为 E3 泛素酶的组成部分,正常情况下与靶基因 Nrf2 进行泛素化和蛋白酶体依赖性降解;当机体存在氧化-抗氧化失衡状态时,Keap1 的半胱氨酸残基被修饰,改变构象,导致 Nrf2 释放进入细胞核内,与小 Maf 蛋白形成异源二聚体,并与 ARE 结合,诱导下游 HO-1、GSH-Px、CAT 等抗氧化酶的表达^[27]。

本研究通过补阳还五汤干预 IPF 大鼠,而呈现出的大鼠肺组织 Keap1 表达降低,但 Nrf2、HO-1 表达升高,并结合 MDA 含量降低和 SOD、GSH-Px、CAT 活性升高的趋势,证明补阳还五汤可促进细胞中的 Nrf2 核转移进而诱导 HO-1 的表达,从而有效清除氧自由基、降低脂质过氧化水平,减轻 IPF 大鼠的氧化损伤。结合大鼠肺功能改善以及炎症、胶原沉积的减少,证实了该方可通过启动抗氧化效应改善 IPF 的病理进程。本课题在益气活血法对 PKD1/NF-κB/MnSOD 介导的抗氧化机制研究基础上^[28],进一步明确了益气活血法通过调节 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路以改善 IPF 病理过程的内在机制,为临床应用相关治法和方药治疗 IPF 提供了实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] PHAN T, PALIOGIANNIS P, NASRALLAH G, et al. Emerging cellular and molecular determinants of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(5): 2031-2057.

[2] HYLDGAARD C, HILBERG O, BENDSTRUP E.

- How does comorbidity influence survival in idiopathic pulmonary fibrosis? [J]. *Respir Med*, 2014, 108(4): 647-653.
- [3] ARYAL S, NATHAN S D. An update on emerging drugs for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2018, 23(2): 159-172.
- [4] IKEDA S, SEKINE A, BABA T, et al. Negative impact of anorexia and weight loss during prior pirfenidone administration on subsequent nintedanib treatment in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *BMC Pulm Med*, 2019, 19(1): 78.
- [5] COULTAS D B. Coagulation disorders and the IPF puzzle [J]. *Thorax*, 2014, 69(3): 203-204.
- [6] 吴孝政, 黄高, 李文, 等. 益气活血法治疗特发性肺纤维化的临床疗效和安全性的系统评价及 Meta 分析 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(2): 218-223.
- [7] WANG J, WANG H, FANG F, et al. Danggui Buxue Tang ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by suppressing the TLR4/NLRP3 signaling pathway in rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, doi: 10. 1155/2021/8030143.
- [8] 鲁辰希, 王杰鹏, 刘娜, 等. 当归补血汤对特发性肺纤维化大鼠血管新生因子 HIF-1 α 和 endostatin 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(3): 1683-1687.
- [9] 张帆, 尹正海, 李震. 补阳还五汤联合汉防己甲素片改善矽肺肺纤维化的效果 [J]. *哈尔滨医药*, 2019, 39(1): 70-71.
- [10] WANG X, LI X, WANG L, et al. Buyang Huanwu decoction ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via downregulation of related protein and gene expression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, doi: 10. 1155/2018/9185485.
- [11] CHO H Y, REDDY S P, YAMAMOTO M, et al. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis [J]. *FASEB J*, 2004, 18(11): 1258-1260.
- [12] LIU Q, GAO Y, CI X. Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, doi: 10. 1155/2019/7090534.
- [13] LIU T, DE LOS SANTOS F G, PHAN S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1627: 27-42.
- [14] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学* [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1937.
- [15] 蒋莉莉. 尼达尼布对肺泡上皮细胞间质转分化的作用及机制研究 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2019.
- [16] 王杰鹏, 王浩, 方朝义, 等. 基于肺脏生理特性的络通纤溶饮调节细胞焦亡抑制肺纤维化机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2349-2354.
- [17] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [18] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale [J]. *J Clin Pathol*, 1988, 41(4): 467-470.
- [19] 任璐瑶, 孟泳, 贺启萌. 益气活血固本方治疗特发性肺纤维化的临床观察 [J]. *中医临床研究*, 2020, 12(11): 29-32.
- [20] 吴之煌, 张晓霞. 补肺活血汤治疗特发性肺纤维化临床观察 [J]. *北京中医药*, 2010, 29(2): 118-120.
- [21] 王杰鹏, 王少贤, 方朝义, 等. 当归补血汤干预肺纤维化大鼠气虚血瘀状态机制初探 [J]. *解放军医学杂志*, 2020, 32(3): 24-28.
- [22] 谭文奎, 田正鉴. 田正鉴教授运用补阳还五汤加减方治疗特发性肺纤维化疗效观察 [J]. *四川中医*, 2014, 32(10): 113-114.
- [23] 颜晓霞, 袁帆, 郑访江. 补阳还五汤联合 N-乙酰半胱氨酸胶囊治疗特发性肺纤维化患者的效果评价 [J]. *内科*, 2015, 10(4): 468-470.
- [24] FOIS A G, PALIOGIANNIS P, SOTGIA S, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: A systematic review [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 51.
- [25] ABED D A, LEE S, HU L. Discovery of disubstituted xylylene derivatives as small molecule direct inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(6): 115343.
- [26] LEE S, HU L. Nrf2 activation through the inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction [J]. *Med Chem Res*, 2020, 29(5): 846-867.
- [27] LEE J M, CALKINS M J, CHAN K, et al. Identification of the NF-E₂-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis [J]. *J Bio Chem*, 2003, 278(14): 12029-12038.
- [28] 刘娜, 王杰鹏, 鲁辰希, 等. 当归补血汤对博来霉素致肺纤维化大鼠 PKD1/NF- κ B/MnSOD 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13): 66-72.

[责任编辑 孙丛丛]