

# 肺纤方提取物对肺间质纤维化大鼠 VCAM-1, PAI-1 mRNA 的影响

刘哲, 张晓梅\*, 秦慧慧, 张历元, 陈良, 黄炎芳, 关丽珍, 王琦, 姜良铎  
(北京中医药大学 东方医院, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**探讨肺纤方干预肺间质纤维化炎性反应及纤溶抑制的作用。**方法:**将大鼠分为假手术组、模型组、泼尼松组、氯沙坦组、肺纤方提取物高、中、低剂量组(2.4, 1.2, 0.6 g·kg<sup>-1</sup>)7组,采用气管插管灌注博莱霉素 3 mg·kg<sup>-1</sup>进行大鼠肺间质纤维化造模。造模第 2 天予药物灌胃干预。于第 14, 28 天分两批进行动物处理, HE 染色观察肺泡炎程度, Masson 染色观察肺纤维化程度。RT-PCR 检测血管细胞黏附分子(VCAM-1), 纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)基因表达。**结果:**肺纤方中剂量组能够显著抑制肺泡炎、肺纤维化程度,降低 VCAM-1, PAI-1 mRNA 表达。**结论:**肺纤方通过抑制 VCAM-1, PAI-1 基因表达,减轻炎性反应、改善纤溶抑制而发挥抗纤维化作用。

**[关键词]** 肺纤方提取物; 肺间质纤维化; 血管细胞黏附分子; 纤溶酶原激活物抑制因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0107-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070107

**Feixianfang Extract Interfering Vascular Cell Adhesion Molecule 1 and Plasminogen Activator Inhibitor-1 mRNA Expression in Rat Model of Pulmonary Fibrosis** LIU Zhe, ZHANG Xiao-mei\*, QIN Hui-hui, ZHANG Li-yuan, CHEN Liang, HUANG Yan-fang, GUAN Li-zhen, WANG Qi, JIANG Liang-duo (*Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the intervention of Feixianfang (FXF) in lung inflammatory reaction and fibrosis. **Method:** Rats were randomly divided into 7 groups: the sham operation group, model group, FXF high dose group, FXF middle dose group, FXF low dose group, the control group of Western medicine was divided into two groups: Losartan group, and prednisone group. Rats were given bleomycin (BLM) to induce model via tracheal intubation, 3 mg·kg<sup>-1</sup>. Intragastric administration started from the next day after modeling. The rats were killed on 14 and 28 days after modeling, respectively. HE staining and Masson staining were applied to determine the degree of the alveolitis and pulmonary fibrosis. RT-PCR were applied to detect plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) gene expression. **Result:** FXF middle dose could inhibit the degree of alveolitis ( $P < 0.05$ ). FXF middle dose can inhibit the degree of pulmonary fibrosis and the gene expression of VCAM-1, PAI-1 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** FXF improve pulmonary fibrosis by inhibiting expression of VCAM-1 and PAI-1 genet.

**[Key words]** Feixianfang extract; pulmonary fibrosis; vascular cell adhesion molecule 1; plasminogen activator inhibitor-1

特发性肺间质纤维化是以慢性炎症反应、肺间质纤维过度沉积的慢性呼吸疾病,日久患者肺结构改变、呼吸衰竭而死亡。一般认为炎性反应刺激肺

成纤维细胞大量分泌胶原沉积,引起肺结构损毁,肺纤维化炎性反应可引起肺微血管纤溶异常,纤溶平衡破坏导致纤维沉积于肺间质,加重肺纤维化病情

**[收稿日期]** 20140613(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81273696)

**[第一作者]** 刘哲,在读博士, E-mail: LZ-echo@qq.com

**[通讯作者]** \* 张晓梅,主任医师,硕士生导师, Tel: 010-67689753, E-mail: zhangxm6767@hotmail.com

进展。肺纤方是治疗肺间质纤维化临床中总结出的有效方剂,具有补益肺肾、活血通络、化痰散结、抑制肺间质纤维化的功效。本实验通过检测肺纤方提取物干预肺间质纤维化大鼠血管细胞黏附分子(VCAM-1)、纤溶酶原激活物抑制因子(PAI-1)基因表达影响,研究肺纤方抗肺间质纤维化炎症反应和纤溶抑制的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠,雄性,体重(200 ± 20) g, 156 只,清洁级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。

**1.2 药物、试剂** 博莱霉素(BLM,批号 130282,日本化药株式会社;用生理盐水配制成 1 g·L<sup>-1</sup> 溶液)。肺纤方由黄芪 15 g,红景天 10 g,炙麻黄 6 g,白果 10 g,海蛤壳 30 g,水蛭 5 g,冬虫夏草 3 g 等组成,由北京师范大学资源管理学院中药实验室经水煮提取为颗粒,每剂生药 89.5 g 提取出颗粒药粉 25.14 g。强的松(天津力生制药公司,批号 1303041),氯沙坦(默沙东药业,批号 120411),HE 染料(苏木精-伊红)试剂盒及改良 Masson 染色试剂盒(北京雷根生物技术有限公司),逆转录试剂盒及 PCR × MIX 试剂盒(Fermentas 产品)。

**1.3 仪器** 18 号留置气管套管(美国 BD 公司),KMI135 型病理切片机(德国 Leica 公司),DMLB 型光学显微镜(德国 Leica),BX51T-32F01 型全自动显微摄像系统(日本 Olympus),Evolution 200 型紫外-可见光分光光度计(Thermo 公司),Mastercycler Nexuseco 型 PCR 仪(德国 Eppendorf),Flour Chem HD2 型凝胶成像系统(美国 Protein Simple 公司),165-8028 型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad),165-8062 型湿转电泳仪(美国 Bio-Rad),5415D 型低温高速多功能离心机(德国 Eppendorf)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与造模** 动物分组:将 156 只大鼠随机分成 7 组,分别为假手术组,造模时注入生理盐水,造模后不给药,ig 生理盐水,12 只。模型组,BLM 造模后不给药,ig 生理盐水,24 只。氯沙坦组,BLM 造模后 ig 氯沙坦,24 只。泼尼松组,BLM 造模后灌服泼尼松,24 只。肺纤方 E ~ G 组:BLM 造模后 ig 肺纤方提取物高、中、低剂量组(2.4,1.2,0.6 g·kg<sup>-1</sup>),每组 24 只。

造模:将大鼠用 10% 水合氯醛 3.5 mL·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于手术板上,经气管轻轻插入 18 号大鼠导管,将细棉絮放在气管插管口,细

棉絮随大鼠呼吸而摆动,气管插管成功。假手术组一次性气管内注入生理盐水 1 mL·kg<sup>-1</sup>,模型组、氯沙坦组、泼尼松组、肺纤方提取物高、中、低剂量组注入博莱霉素 3 mg·kg<sup>-1</sup>,随即注入空气 0.3 mL,完毕后立即将动物直立、旋转,以利药物在肺中分布均匀。动物清醒后随意进食、饮水。

造模次日开始常规灌胃方法给药,每日 1 次。按照 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig 容积新鲜配制药品。每周称量体重,根据体重变化调整给药剂量。肺纤方提取物高、中、低剂量组,给药剂量分别为提取药粉 2.4,1.2,0.6 g·kg<sup>-1</sup>,分别为人临床用药的 2,1,0.5 倍,由于颗粒较粗,为增加可溶性,各实验组药均用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC)配制。氯沙坦组:氯沙坦 10 mg·kg<sup>-1</sup>,泼尼松组:泼尼松 5 mg·kg<sup>-1</sup>,模型组和假手术组给予等体积的生理盐水。喂药至动物处理前 1 d。

**2.2 肺组织病理检测** 于造模后第 14,28 天,随机分两批 10% 水合氯醛 3.5 mL·kg<sup>-1</sup> 麻醉,将大鼠仰卧固定,打开胸腔,止血钳夹闭右侧肺。从左心尖置入针头,用止血钳连左心室一起夹住,针头连接 50 mL 注射器(针头磨平),右心耳剪一约 2 mm 左右切口。向左心室快速均匀灌注生理盐水 100 mL,至肺内血液冲洗干净,肺组织洁白。将灌注液体换为 4% 多聚甲醛,继续灌注 100 mL,直至大鼠全身变硬,停止灌注。剪下灌注后的左肺,放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h,切取合适大小组织放入包埋盒、流水过夜、常规脱水、石蜡包埋,连续组织切片(厚 4 μm),进行苏木精-伊红(HE)染色和三色(Masson)染色;右肺迅速剪下,锡纸包裹,放入 -80 °C 水箱保存,行 RT-PCR 检测。大鼠肺组织病理学检测按肺组织病理学半定量分析,参照 Szaopiel<sup>[1]</sup> 4 级分类方法检测肺泡炎和肺纤维化。

**2.3 检测肺纤维化大鼠肺组织 VCAM-1, PAI-1 mRNA 表达** ①按照 Trizol 试剂说明书步骤严格操作,提取右肺组织总 RNA,采用分光光度计测量 RNA 样品纯度,吸光度(A)介于 1.9 ~ 2.2 认为有效,测定浓度。②采用反转录试剂盒合成 cDNA。取 2 μL 总 RNA 作为模板,寡核苷酸(oligo-dT)做引物,反应体系为 20 μL,所得混合物 25 °C 退火 5 min,42 °C 延伸 1 h,70 °C 灭活 15 min。得到 cDNA。③RT-PCR:PCR 循环条件为 95 °C 2 min 1 个循环,95 °C : 15 s,60 °C : 60 s 40 个循环,95 °C : 15 s,60 °C : 15 s,95 °C : 15 s 1 个循环。为了消除样本提取、

逆转录和 PCR 反应过程中造成的差异,同时进行管家基因  $\beta$ -actin mRNA 表达的测定。引物序列见表

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	前引物(5'-3')	后引物(5'-3')
$\beta$ -actin	TCCCTGGAGAAGAGCTATGAG	TCCATACCCAGGAAGGAAG
VCAM-1	GGAGGAAATTGGCACAAAAGT	CGGAGCAACGTTGACATAAA
PAI-1	GAGGCACACCAAAGGTATGA	ATTGGCCGTTGAAATAGAGG

**2.4 统计学方法** 所有数据均采用 SPSS 19.0 版进行统计处理,用  $\bar{x} \pm s$  表示所测数据。多组间比较,采用单因素方差分析,符合正态分布的运用 LSD 法进行两两比较,以  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 对 BLM 致肺间质纤维化大鼠肺泡炎程度的影响** 肺组织进行 HE 染色,假手术组肺泡清晰完整,肺泡隔无增厚,气管肌层可见胶原沉积。造模组可见肺泡塌陷融合,肺泡隔增厚,肺实变呈斑片状分布,气管周围明显。14 d 炎症细胞浸润较重,28 d 较前减轻。14, 28 d 时肺纤方中剂量组肺泡炎程度较模型组有改善( $P < 0.05$ )。14 d 时,泼尼松组及肺纤方高剂量组较模型组肺泡炎有改善( $P < 0.05$ );其中肺纤方中剂量组改善最为明显。见表 2。

表 2 各组肺间质纤维化大鼠肺泡炎程度( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Each group of rats with pulmonary fibrosis alveolitis degree ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	病变分级/级	
			14 d	28 d
假手术	-	6	0.2 ± 0.5 <sup>1)</sup>	0.4 ± 0.6 <sup>1)</sup>
模型	-	12	2.4 ± 0.7	2.1 ± 0.7
泼尼松	5 × 10 <sup>-3</sup>	12	1.3 ± 0.9 <sup>2)</sup>	1.7 ± 0.8
氯沙坦	1 × 10 <sup>-2</sup>	12	2.3 ± 0.8	2.0 ± 0.9
肺纤方	0.6	12	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.7
	1.2	12	1.2 ± 1.0 <sup>2)</sup>	1.3 ± 0.5 <sup>2)</sup>
	2.4	12	1.4 ± 0.8 <sup>2)</sup>	1.7 ± 0.7

注:与假手术组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 3 ~ 5 同)。

**3.2 对 BLM 致肺间质纤维化大鼠肺纤维化程度的影响** 肺组织进行 Masson 染色,假手术组极少量纤维,其余各组局部可见成纤维灶,气管及肺泡周围可见胶原纤维沉积。肺局部可见出血,以及大小不等的囊性气腔,28 d 时胶原沉积较 14 d 加重。纤维化

1。PCR 结束后,分析结果并计算,用 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup> 法来决定目的基因在各组的相对表达量。

呈进展趋势,其中肺纤方中剂量组 14, 28 d 纤维化程度均较模型组弱( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠肺纤维化程度( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Each group of rats lung fibrosis degree ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	病变分级/级	
			14 d	28 d
假手术	-	6	0.7 ± 0.5 <sup>1)</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>1)</sup>
模型	-	12	2.0 ± 0.8	2.4 ± 0.8
泼尼松	5 × 10 <sup>-3</sup>	12	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.7
氯沙坦	1 × 10 <sup>-2</sup>	12	1.8 ± 0.8	2.0 ± 0.9
肺纤方	0.6	12	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.8
	1.2	12	1.3 ± 0.7 <sup>2)</sup>	1.6 ± 0.7 <sup>2)</sup>
	2.4	12	1.5 ± 0.9	1.7 ± 0.8

**3.3 对 BLM 致肺间质纤维化大鼠 VCAM-1 mRNA 表达水平的影响** 模型组较假手术组 VCAM-1 表达水平升高( $P < 0.05$ )。肺纤方中剂量组表达水平 14, 28 d 均较模型组降低( $P < 0.05$ )。氯沙坦组表达水平在 14 d 时较模型组低( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组肺间质纤维化大鼠 VCAM-1 mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Each VCAM-1 mRNA in rat lung fibrosis expression ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	VCA-1 mRNA/2 <sup>-<math>\Delta\Delta Ct</math></sup>	
			14 d	28 d
假手术	-	6	0.27 ± 0.10 <sup>1)</sup>	0.23 ± 0.29 <sup>1)</sup>
模型	-	12	2.28 ± 0.14	2.25 ± 0.76
泼尼松	5 × 10 <sup>-3</sup>	12	2.14 ± 0.47	2.00 ± 0.43
氯沙坦	1 × 10 <sup>-2</sup>	12	1.70 ± 0.78 <sup>2)</sup>	1.70 ± 0.57
肺纤方	0.6	12	1.88 ± 0.43 <sup>2)</sup>	1.80 ± 0.51
	1.2	12	1.66 ± 0.31 <sup>2)</sup>	1.58 ± 0.43 <sup>2)</sup>
	2.4	12	1.90 ± 0.20	1.94 ± 0.50

**3.4 对 BLM 致肺间质纤维化大鼠 PAI-1 mRNA 表达水平的影响** 模型组较假手术组 PAI-1 基因表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。肺纤方中剂量组 PAI-1 基因表达水平较模型组明显降低( $P < 0.05$ )。氯沙

坦组 14 d 表达水平较模型组明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 5。

表 5 各组肺间质纤维化大鼠 PAI-1 mRNA 表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Each PAI-1 mRNA in rat lung fibrosis expression ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	PAI-1 mRNA/2 <sup>-ΔΔCt</sup>	
			14 d	28 d
假手术	-	6	1.2 ± 0.5 <sup>1)</sup>	1.2 ± 0.4 <sup>1)</sup>
模型	-	12	24.7 ± 5.8	32.2 ± 2.2
泼尼松	5 × 10 <sup>-3</sup>	12	21.6 ± 2.3	30.0 ± 1.3
氯沙坦	1 × 10 <sup>-2</sup>	12	15.2 ± 3.7 <sup>2)</sup>	24.2 ± 3.0
肺纤方	0.6	12	22.0 ± 2.6	25.6 ± 2.4
	1.2	12	15.5 ± 2.9 <sup>2)</sup>	20.6 ± 3.7 <sup>2)</sup>
	2.4	12	20.4 ± 3.1	24.4 ± 3.6

#### 4 讨论

肺间质纤维化主要表现为咳嗽、少痰、喘息、气短、乏力、口唇及爪甲紫绀、心慌、舌暗、舌紫等，肺间质纤维化患者存在显著的瘀血症状，笔者认为肺间质纤维化以肺肾亏虚、痰瘀痹阻凝结肺络为基本病机<sup>[2]</sup>。肺纤方是临床治疗肺间质纤维化总结的有效方剂，由黄芪、红景天、冬虫夏草、炙麻黄、白果、水蛭等组成，具有补益肺肾、活血通络、散结化痰之用。既往实验研究显示其有抗纤维化、抗血管生成和抗基质金属蛋白酶沉积等作用<sup>[3-4]</sup>。

肺部炎症反应介导血管细胞损伤和凝血纤溶变化是肺间质纤维化病理过程的重要环节，肺纤维化动物模型早期观察到的肺炎性反应时肺血管内皮损伤，血管内皮细胞增生，由抗黏附、抗凝、舒张表型转换为促黏附、促凝、收缩表型<sup>[5]</sup>。VCAM-1 介导白细胞与血管内皮细胞及细胞外基质的黏附、促进血管内皮黏附、促凝血<sup>[6-7]</sup>。损伤的血管内皮能够激活外源性及内源性凝血系统，抗凝血系统及纤维蛋白溶解系统也被激活以限制凝血过程。凝血纤溶变化促进了纤维蛋白在肺间质沉积，纤溶系统包括组织型纤溶酶原激活物 (tPA)，尿激酶型纤溶酶原激活物 (uPA)，纤溶酶原，纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1)，纤维蛋白溶解抑制因子 (TAF1) 等。其中 uPA，tPA 能催化纤溶酶原为纤溶酶，纤溶酶能降解包括纤维蛋白在内的多种细胞外基质 (ECM) 成分<sup>[8]</sup>。

PAI-1 通过与 PA 结合，抑制 PA 活性，促进了肺间质的异常累计，导致纤维化的形成，Osterholzer 等研究发现小鼠肺间质纤维化模型，PAI-1 表达显著升高，当使用 PAI-1 基因敲除的小鼠进行实验时发现纤维化程度明显减轻，提示 PAI-1 在促进纤维化发展中的重要作用<sup>[9]</sup>。

本实验结果提示肺纤方能够抑制 14 d 及 28 d 时 VCAM-1 mRNA 和 PAI-1 mRNA 表达，从而抑制炎症反应程度，通过抑制 PAI-1 mRNA 表达改善血凝及纤维蛋白积累，从而发挥其抗纤维化作用。

#### [参考文献]

- [1] Szapiel S V, Elson N A, Fulmur J D, et al. Bleomycin induced interstitial pulmonary disease in the nude, athy micmouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120:893-897.
- [2] 姜良铎, 张晓梅, 肖培新. 特发性肺间质纤维化的病因病机探讨[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23 (11): 984-986.
- [3] 颜林枫, 南海燕, 崔光彬, 等. 肺微血管内皮细胞表型改变与博莱霉素所致大鼠肺纤维化的关系[J]. 第四军医大学学报, 2008, 28(16): 1458-1461.
- [4] 张晓梅, 姜良铎, 张伟, 等. 肺纤方对博莱霉素大鼠肺纤维化模型基质金属蛋白酶 1, 2 及组织金属蛋白酶抑制剂 1, 2 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23 (3): 212-214.
- [5] 支开叶, 康永, 倪艳, 等. 肺纤方干预博莱霉素致肺纤维化大鼠的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 212-216.
- [6] Parra E R, Silvério da Costa L R, Ab' Saber A, et al. Nonhomogeneous density of CD34 and VCAM-1 alveolar capillaries in major types of idiopathic interstitial pneumonia[J]. Lung, 2005, 183(5): 363-373.
- [7] 陈利萍, 刘华, 贺永锋, 等. 血管细胞黏附分子-1 在肺间质纤维化肺血管损害中的作用[J]. 第四军医大学学报, 2007, 27(6): 537-539.
- [8] 艾进颖, 王红阳. 凝血系统的变化与肺间质纤维化关系的研究进展[J]. 华北煤炭医学院学报, 2009, 11 (3): 332-334.
- [9] Osterholzer J J, Christensen P J, Lama V, et al. PAI-1 promotes the accumulation of exudate macrophages and worsens pulmonary fibrosis following type II alveolar epithelial cell injury [J]. J Pathol, 2012, 228 (2): 170-180.

[责任编辑 聂淑琴]