

益气养阴活血通络法干预肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smads 信号传导通路的机制

庞立健¹, 吕晓东^{2*}, 袁隼², 刘创¹, 赵仲雪², 臧凝子², 滑振², 杨丽²
(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:探讨益气养阴活血通络法调控肺成纤维细胞转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smads 信号传导通路机制。方法:SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只,采用随机数字法,将 30 只大鼠随机分为 3 组,中药含药血清组,西药含药血清组,正常血清组,第 4 天末次给药后提取含药血清。气管内注入博来霉素造肺纤维化大鼠动物模型,采用胰蛋白酶消化液消化法培养肺成纤维细胞。细胞分为模型组,中药组,西药组,抑制剂组。免疫荧光法鉴定肺成纤维细胞,并分别于第 24,48,72 h 取材,采用逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 TGF- β_1 , Smad2, Smad4, Smad7 mRNA 的表达及流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:第 24,48,72 h 检测结果显示,与模型组比较,中药组、西药组、抑制剂组细胞内 TGF- β_1 , Smad2, Smad4 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.01$);第 24 h 西药组 TGF- β_1 mRNA 表达水平明显低于中药组 ($P < 0.05$);第 48,72 h 检测结果均显示与中药组比较,西药组、抑制剂组 TGF- β_1 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05, P < 0.01$);第 24,48 h 检测结果显示与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad2 mRNA 表达水平下调明显 ($P < 0.01$);中药组、西药组、抑制剂组 3 者表达水平相近,无统计学意义。第 72 h 检测结果显示与中药组比较,西药组、抑制剂组 Smad2 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05$);第 24,48,72 h 检测结果均显示与中药组比较,西药组、抑制剂组 Smad7 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.01$)。第 24,48,72 h 检测结果均显示与模型组比较,中药组、西药组与抑制剂组凋亡率明显上调 ($P < 0.01$);中药组细胞凋亡率明显高于抑制剂组 ($P < 0.01$)。结论:益气养阴活血通络法可能通过下调肺成纤维细胞 TGF- β_1 , Smad2, Smad4 含量和上调 Smad7 含量调控 TGF- β_1 /Smads 信号通路,从而延缓特发性肺纤维化 (IPF) 进展。

[关键词] 特发性肺纤维化; 肺虚络瘀; 转化生长因子- β_1 信号通路; 益气养阴活血通络法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)22-0125-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017220125

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1412.072.html>

[网络出版时间] 2017-08-09 14:12

Intervention Mechanism of Method of Supplementing Qi, Nourishing Yin, Activating Blood Circulation and Dredging Collaterals on TGF- β_1 /Smads Signaling Pathway in Lung Fibroblasts

PANG Li-jian¹, LYU Xiao-dong^{2*}, YUAN Quan², LIU Chuang¹, ZHAO Zhong-xue²,
ZANG Ning-zi¹, HUA Zhen², YANG Li²

(1. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China*; 2. *Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China*)

[Abstract] **Objective:** To discuss the mechanism of the method of supplementing Qi, nourishing Yin, activating blood circulation and dredging collaterals in regulating transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)/Smads signaling pathway in lung fibroblasts. **Method:** A total of 30 SPF male rats were divided into three groups by the

[收稿日期] 20170530(001)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373579);国家自然科学基金青年基金项目(81403290)

[第一作者] 庞立健, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药治疗肺系疾病的基础和临床研究, E-mail: hahaya123@126.com

[通讯作者] * 吕晓东, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗肺系疾病的基础和临床研究, Tel: 18004010055, E-mail: deanoftcm@126.com

method of random number table, namely traditional Chinese medicine (TCM) serum group, western medicine serum group and normal serum group. Serums were extracted at the end of the fourth day after administration. Bleomycin was intratracheally injected to make animal model of pulmonary fibrosis in rats, and the lung fibroblasts were cultured by trypsin digestion method. The cells were divided into model group, TCM group, western medicine group and inhibitor group. Lung fibroblasts were identified by immunofluorescence, and materials were collected at 24, 48, 72 h. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2, Smad4, and Smad7, and flow cytometry was used to detect apoptosis rate. **Result:** The results of 24, 48, 72 h showed that compared with model group, the mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad2, and Smad4 in the TCM group, western medicine group and inhibitor group were obviously lower ($P < 0.01$). The mRNA expressions of TGF- β_1 in 24 h western medicine group was lower than that of TCM group ($P < 0.05$). The results of 48, 72 h showed that compared with the TCM group, the mRNA expressions of TGF- β_1 in the western medicine group and the inhibitor group were all obviously lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of 24, 48 h showed that compared with the model group, the Smad2 mRNA expression in TCM group, western medicine group and inhibitor group were obviously lower ($P < 0.01$). The expressions of TCM group, western medicine group and inhibitor group were similar, with no statistical significance. The results of 72 h showed that compared with the TCM group, the Smad2 mRNA expressions in the western medicine group and the inhibitor group were all obviously lower ($P < 0.05$). The results of 24, 48, 72 h showed that compared with the TCM group, the Smad7 mRNA expressions in the western medicine group and the inhibitor group were all obviously lower ($P < 0.01$). The results of 24, 48, 72 h showed that compared with the model group, the apoptosis rates of TCM group, western medicine group and inhibitor group were obviously increased ($P < 0.01$). The apoptosis rate of TCM group was higher than that of inhibitor group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The method of supplementing Qi, nourishing Yin, activating blood circulation and dredging collaterals may delay the progress of idiopathic pulmonary fibrosis by decreasing the content of TGF- β_1 , Smad2 and Smad4, increasing the content of Smad7 and regulating the TGF- β_1 /Smads signaling pathway.

[**Key words**] idiopathic pulmonary fibrosis; lung deficiency collateral stasis; transforming growth factor- β_1 signaling pathway; method of invigorating Qi, nourishing Yin, activating blood circulation and dredging collaterals

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种病因不明的以肺部慢性炎症为主的间质性肺疾病, 主要表现为成纤维细胞灶的出现和大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的沉积, 肺泡结构及肺组织慢性进行性破坏的致命性^[1] 肺疾病。由于其发病机制较为复杂, 至今尚未完全明确, 有研究认为转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 通路为特发性肺纤维化的催化剂, 可作用于成纤维细胞, 参与多种效应机制延缓 ECM 降解, 打破 ECM 生成和降解的平衡, 进而肺组织结构重塑而致纤维化^[2]。基于 TGF- β_1 /Smads 信号传导通路, 探讨药物防治肺纤维化的效应机制, 是目前研究肺纤维化的热点。中医药复方自身具有成分复杂、作用途径多样、效应机制复杂的特点, 为此, 其作用机制体现在多靶点、多途径、多环节, 特别是对调节信号通路作用显著, 如焦芳芳等^[3] 应用中药复方化痰理肺方防治肺纤维化模型大鼠, 结果显示该方可能通过上调 Smad7, 下调 TGF-

β_1 延缓大鼠纤维化, 进而推测其 TGF- β_1 /Smads 通路可能参与肺纤维化进程。课题组基于 IPF 发病特点, 结合肺络结构和功能提出其病机为“肺虚络瘀”, 并据叶天士“大凡络虚, 通补最宜”之旨, 提出益气养阴活血通络法贯穿 IPF 治疗始终, 实验表明益气养阴活血通络法可能通过抑制 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 的高表达, 下调肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 的高表达, 协调基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) / 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 及 TIMP-1 mRNA/MMP-2 mRNA 的平衡, 进而延缓大鼠肺纤维化^[4-6]。为此, 课题组开展细胞培养实验, 以 TGF- β_1 /Smads 信号通路研究为切入点, 采用免疫荧光法、逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR), 噻唑蓝 (MTT) 比色法测细胞生长曲线, 从多层次、多角度阐明益气养阴活血通络法调控 TGF- β_1 /Smads 信号通路关键分子进而有效干预 IPF 的机制, 为络病 (肺络) 理论防治 IPF 提供科学依据, 为提高 IPF 的临床治疗水平奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 体重 (200 ± 20) g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK(辽)2010-0001, 饲养于辽宁中医药大学实验动物中心。动物实验符合辽宁中医药大学伦理委员会标准。

1.2 药物 注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社, 进口药品注册证号 H20090885, 15 mg/支), 使用之前加 0.9% 氯化钠注射液 3 mL, 配成质量浓度为 5 g·L⁻¹ 溶液, 4 °C 保存备用。

益气养阴活血通络中药复方^[4-6](江阴天江药业有限公司, 批号 1601336, 每袋 0.5 g, 约含有生药 1.98 g), 由当归、川芎等加水煎煮 2 次, 第 1 煎加 10 倍水, 大火加热至沸, 小火保持微沸 1.5 h, 煎液滤过; 第 2 煎加 8 倍水, 大火加热至沸, 小火保持微沸 1 h, 煎液滤过, 合并滤液, 滤液减压浓缩至相对密度 1.08 ~ 1.10(60 °C) 的清膏, 清膏过滤, 喷雾干燥得喷干粉, 喷干粉过 100 目筛后混合均匀, 再制成颗粒, 包装即可。

醋酸泼尼松片(天津天药药业股份有限公司, 国药准字 H12020698, 批号 051108, 5 mg/片); TGF-β₁ 抑制剂 LY2157299[Selleck. cn(中国)公司, 货号 S2230, 质量浓度为 30 μg·L⁻¹]。

1.3 试剂 胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司, 货号 110419); 高糖 DMEM 细胞培养液, 0.25% 胰蛋白酶消化液, MTT(Gibco 公司, 货号均为 12800017); 羊抗波形蛋白多克隆抗体, SABC 3 步法试剂盒(武汉博士德生物有限公司, 货号分别为 BM0135, SA1099); 兔抗 β-肌动蛋白(β-actin) 多克隆抗体, BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德生物有限公司, 货号分别为 BA2305, AR0146); 兔抗 TGF-β₁, Smad2, Smad4 多克隆抗体(CST 公司, 货号分别为 #3711, #5339, #9515); 兔抗 Smad7 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司, 货号 sc-11392); Protein Ladder, ECL 发光液(美国 Thermo 公司, 货号分别为 00150801, D-26012-407); DNA marker(北京全式金生物技术有限公司, 货号 BM101)。β-actin 引物: 上游 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3', 下游 5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3', 扩增长度 263 bp; TGF-β₁ 引物: 上游 5'-GTGTGGAGCAACATGTGGA ACTCTA-3', 下游 5'-CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA-3', 扩增长度 174 bp; Smad2 引物: 上游 5'-TAGATCA GTGGGAACACAACAGG-3', 下游: 5'-GGTGGTGT TTCTGGGATGTAAT-3', 扩增长度 388 bp; Smad4 引

物: 上游 5'-TCAGCCAGCTACTTACCACCA-3', 下游: 5'-ACACGTCCCCTTCACCTTTAC-3', 扩增长度 428 bp; Smad7 引物: 上游 5'-GATACCCGATGGATT TCTCAA-3', 下游: 5'-AGGGCTCTTGGACACAGTA GAG-3', 扩增长度 210 bp; 均由北京三博远志生物技术有限公司合成。

1.4 仪器 BB5060UV 型细胞培养箱(美国 Heraeus 公司); AIRTECH 型超净工作台(苏净集团安泰公司); LEICA DM IL 型倒置生物显微镜(德国徕卡公司); MLS-3780 型高压蒸气灭菌器(日本三洋公司); 3548 型细胞培养板(美国 Corning 公司); 430720 型细胞培养瓶(美国 Costar 公司); CX41-12C02 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); PE9600 型 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司); DYCP-33A 型电泳槽(北京六一仪器厂); Tanon Gis 型凝胶图像分析系统, 2038 型转膜仪(上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 中药复方含药血清的制备 将实验大鼠饲养于辽宁中医药大学实验动物中心, 室温(22 ± 2) °C, 相对湿度(55 ± 5)%, 12 h 昼夜节律, 常规颗粒饲料喂养, 隔日更换垫料。采用随机数字法, 将 30 只大鼠按体重随机分为 3 组: 分别为中药含药血清组即中药复方 0.5 g/次^[4-6], (约 2.5 g·kg⁻¹ 体重给药), 2 次/d 灌胃大鼠; 西药含药血清组即醋酸泼尼松片 1.25 mg/次(约 6.25 mg·kg⁻¹ 体重给药), 2 次/d 灌胃大鼠; 正常血清组为相同剂量的生理盐水大鼠。灌胃 3 d, 第 3 天大鼠禁食, 第 4 天 1 次给予大鼠 1 d 全部剂量的药物。第 4 天灌胃 1 h 后, 应用乙醚将大鼠麻醉, 腹主动脉取血后, 血样室温常规静置 1 ~ 2 h, 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min, 后取上清液灭活补体(56 °C 水浴锅 30 min), 并在超净台应用过滤膜(0.22 μm) 滤除细菌后将标本置于 -80 °C 冰箱保存。

2.2 肺纤维化大鼠模型制备 参照 Szapiel 等^[7] 方法, 用 3% 戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹) 腹腔注射麻醉大鼠, 模型、泼尼松、中药复方组分别气管内注入博来霉素溶液 0.2 ~ 0.3 mL(按 5 mg·kg⁻¹ 体重给药), 正常组在同等条件下气管内注射等容生理盐水。

2.3 肺成纤维细胞原代提取及培养(胰蛋白酶消化法) 第 29 天处死肺纤维模型大鼠, 并将其浸泡消毒(75% 乙醇, 5 min)。无菌实验室, 取出模型大鼠肺组织, 将其放入 PBS 缓冲液(含青链霉素 1 000 U·mL⁻¹) 中, 反复冲洗(3 ~ 4 次) 去除肺组织表面的血污, 肺组织表面变白后将胸膜剔除。取距

离肺边缘 ($<1\text{ mm}$) 的组织剪切并置于无菌培养皿中直至剪碎。把剪碎的标本置于离心管后,加入胰蛋白酶消化液进行消化(2 倍体积,20 min)后,放入 10% FBS DMEM 培养基(2 倍体积,5 min)进行终止消化。用移液器混匀并离心(5 min);弃上清制备细胞悬液(10% FBS DMEM 的培养基)。将细胞悬液置于培养箱内进行培养($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 , 饱和湿度),2 d 进行 1 次换液。等原代细胞聚合成片,大约培养到培养瓶面积的 80% ~ 90% 时,应用 0.25% 胰蛋白酶进行消化(5 min),并按照 1:2 进行传代后继续培养。

2.4 细胞分组和处理 模型组给予正常血清组血清的模型组大鼠的肺成纤维细胞;中药组给予益气养阴活血通路法之中药复方含药血清干预的模型组大鼠的肺成纤维细胞;西药组给予醋酸泼尼松片含药血清干预的模型组大鼠的肺成纤维细胞;抑制剂组给予 TGF- β_1 抑制剂 LY210976 的模型组大鼠的肺成纤维细胞。

2.5 细胞的形状与生长的状态 应用倒置显微镜定期的观察和记录。

2.6 免疫荧光法鉴定肺成纤维细胞 ①细胞爬片,将细胞接种于(放有多聚赖氨酸包被的盖玻片)6 孔板中,培养 24 h 后,取出,PBS 冲洗;②固定,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 冲洗;③破膜,滴加 1% triton 1 滴,静置 25 min,PBS 冲洗;封闭,2% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h;一抗波形蛋白(vimentin)一抗(1:160), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 冲洗;荧光二抗 FITC 标记的羊抗兔二抗(1:160), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,孵育 1 h,PBS 冲洗后荧光显微镜下采集照片。

2.7 RT-PCR 检测与判定 按 trizol 液说明书操作方法提取肺成纤维细胞的总 RNA,紫外分光光度计测量 RNA 的浓度后定量,模板量均取 2 μL 。反应条件为预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,30 个循环。PCR 扩增仪热盖设定温度为 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。RT-PCR 产物的判定与分析:RT-PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,加样量均为 5 μL ,采用 Tanon Gis 凝胶成像分析系统测定电泳条带积分吸光度 IA,以各组目的基因(TGF- β_1)与内参照(β -actin)的 IA 比值变化判定与分析。

2.8 流式细胞仪测细胞凋亡率 ①悬浮细胞:用不含 EDTA 的胰酶消化贴壁的成纤维细胞后,采用 300 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 收集成纤维细胞;②用预冷的

PBS 洗涤细胞 2 次,每次均需 300 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 细胞;加入结合缓冲液重悬细胞 100 μL 后加入 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI Staining Solution 5 μL 后混匀;在避光、室温条件下反应 10 min;并加入结合缓冲液 400 μL ,混匀;1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用 t 检验,多组比较用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肺成纤维细胞的生长及形态的影响 采用胰蛋白酶消化法提取的肺成纤维细胞,应用倒置显微镜观察细胞形态,观察显示,培养第 2 天培养基内见散在细胞生长,可见分布不均的单个贴壁细胞,其细胞较大、呈梭形或不规则形,其边界清晰伴有少量圆形细胞。培养 7 ~ 8 d,可见圆形细胞消失,大量成纤维细胞的胞体逐渐变小,外形多呈梭形,可见核为椭圆形,其生长面积已达到培养基的 90%。随着时间推移,细胞数量增多,细胞的增殖能力逐渐增加。见图 1,2。

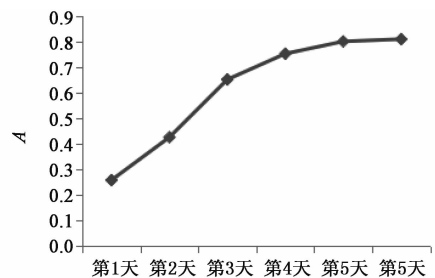
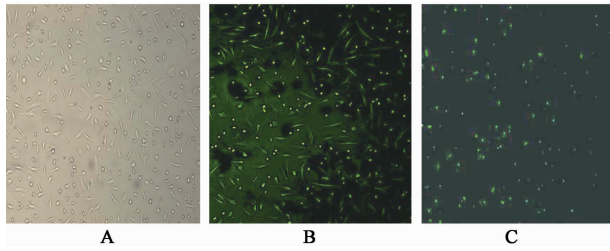


图 1 肺成纤维细胞生长曲线

Fig.1 Pulmonary fibroblast growth curve

3.2 免疫荧光法鉴定肺成纤维细胞 免疫荧光法检测肺成纤维细胞中波形蛋白的表达与定位,波形蛋白染色表达阳性,阳性信号定位在胞浆,以 PBS 代替一抗为阴性对照。显微镜下观察培养所得细胞见图 2。

3.3 对肺成纤维细胞内 TGF- β_1 mRNA 表达的影响 第 24 h 检测结果显示,与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 TGF- β_1 mRNA 的表达明显下调($P < 0.01$);西药组 TGF- β_1 mRNA 表达水平明显低于中药组($P < 0.05$);抑制剂组与中药组比较无统计学差异。第 48,72 h 检测结果均显示,与模型组比较,抑制剂、西药、中药各组细胞内 TGF- β_1 mRNA 表达均下调明显($P < 0.01$);与中药组比较,西药、抑制剂组 TGF- β_1 mRNA 表达均明显下调($P <$



A. 正常组; B. 阳性组; C. 阴性组

图 2 不同处理条件下成纤维细胞的表达 (FITC, ×400)

Fig. 2 Expression of fibroblasts under different conditions was observed (FITC, ×400)

0.05, $P < 0.01$)。西药组与抑制剂组比较数值

相近,无统计学差异。见表 2,图 3。

3.4 对各组别肺成纤维细胞中 Smad2 mRNA 表达的影响 第 24,48 h 检测结果显示,与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad2 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$);中药组、西药组、抑制剂组 3 者表达水平相近,无统计学意义。第 72 h 检测结果显示,与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad2 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$);与中药组比较,西药组、抑制剂组 Smad2 mRNA 表达水平在均明显下调 ($P < 0.05$)。西药组与抑制剂组比较无统计学差异。见表 1,图 3。

表 1 益气养阴活血通络中药复方对肺成纤维细胞内 TGF- β_1 , Smad2, Smad4, Smad7 mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of traditional Chinese medicine compound of invigorating Qi, nourishing Yin, activating blood circulation and dredging collaterals on expression of TGF- β_1 , Smad2, Smad4 and Smad7 mRNA in pulmonary fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ g · kg ⁻¹	TGF- β_1 / β -actin			Smad2/ β -actin		
		第 24 h	第 48 h	第 72 h	第 24 h	第 48 h	第 72 h
模型	-	0.694 ± 0.059	0.701 ± 0.081	0.678 ± 0.062	0.653 ± 0.083	0.661 ± 0.077	0.673 ± 0.061
中药	0.5	0.519 ± 0.052 ¹⁾	0.521 ± 0.035 ¹⁾	0.521 ± 0.034 ¹⁾	0.520 ± 0.044 ¹⁾	0.528 ± 0.030 ¹⁾	0.528 ± 0.034 ¹⁾
西药	0.006 25	0.441 ± 0.034 ^{1,2)}	0.430 ± 0.031 ^{1,3)}	0.452 ± 0.046 ^{1,2)}	0.470 ± 0.072 ¹⁾	0.465 ± 0.040 ¹⁾	0.459 ± 0.053 ^{1,2)}
抑制剂	-	0.464 ± 0.054 ¹⁾	0.464 ± 0.041 ^{1,2)}	0.459 ± 0.051 ^{1,2)}	0.465 ± 0.063 ¹⁾	0.470 ± 0.062 ¹⁾	0.446 ± 0.072 ^{1,2)}

组别	剂量/ g · kg ⁻¹	Smad4/ β -actin			Smad7/ β -actin		
		第 24 h	第 48 h	第 72 h	第 24 h	第 48 h	第 72 h
模型	-	0.666 ± 0.064	0.675 ± 0.062	0.670 ± 0.049	0.267 ± 0.050	0.260 ± 0.043	0.251 ± 0.044
中药	0.5	0.532 ± 0.045 ¹⁾	0.493 ± 0.022 ¹⁾	0.535 ± 0.040 ¹⁾	0.398 ± 0.057 ¹⁾	0.400 ± 0.042 ¹⁾	0.421 ± 0.039 ¹⁾
西药	0.006 25	0.448 ± 0.077 ^{1,2)}	0.450 ± 0.053 ¹⁾	0.454 ± 0.071 ^{1,2)}	0.577 ± 0.042 ^{1,3)}	0.547 ± 0.028 ^{1,3)}	0.557 ± 0.028 ^{1,3)}
抑制剂	-	0.456 ± 0.057 ^{1,2)}	0.469 ± 0.069 ¹⁾	0.469 ± 0.061 ¹⁾	0.584 ± 0.015 ^{1,3)}	0.592 ± 0.029 ^{1,3)}	0.577 ± 0.024 ^{1,3)}

注:与模型组¹⁾ $P < 0.01$;与中药组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对各组别肺成纤维细胞中 Smad4 mRNA 表达的影响 第 24 h 检测结果显示:与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad4 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$);与中药剂组比较,西药组、抑制剂组 Smad4 mRNA 表达水平在均明显下调 ($P < 0.05$)。西药组与抑制剂组比较无统计学差异。

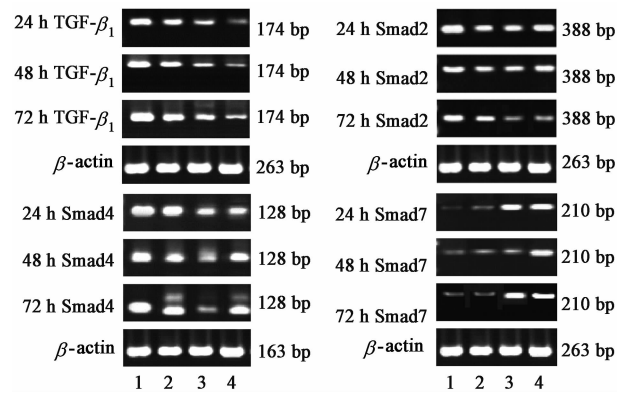
第 48 h 检测结果显示,与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad4 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$);中药组与西药组、抑制剂组比较,无统计学差异。西药组与抑制剂组比较无统计学差异。

第 72 h 检测结果显示,与模型组比较,中药、西药、抑制剂各组细胞内 Smad4 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$);与中药组比较,西药组 Smad4 mRNA 表达水平在均明显下调 ($P < 0.05$)。西药组与抑制剂

组比较无统计学差异。见表 1,图 3。

3.6 对各组别肺成纤维细胞中 Smad7 mRNA 表达的影响 第 24,48,72 h 检测结果均显示,与模型组比较,中药组、西药组、抑制剂组细胞内 Smad7 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.01$);与中药组比较,西药组、抑制剂组 Smad7 mRNA 表达水平在均明显下调 ($P < 0.01$)。西药组与抑制剂组比较无统计学差异。见表 1,图 3。

3.7 对各组别肺成纤维细胞凋亡率的影响 第 24,48,72 h 检测结果均显示:与模型组比较,中药组、西药组与抑制剂组凋亡率亦明显上调 ($P < 0.01$);中药组细胞凋亡率明显高于抑制剂组 ($P < 0.01$),而西药组与抑制剂组间凋亡率相近,无统计学意义。见表 2。



1. 模型组; 2. 中药组; 3. 西药组; 4. 抑制剂组
图 3 各组肺成纤维细胞内 TGF-β₁, Smad2, Smad4, Smad7 mRNA 表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of mRNA expressions of TGF-β₁, Smad2, Smad4 and Smad7 in each group of pulmonary fibroblasts

表 2 益气养阴活血通络中药复方对细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of traditional Chinese medicine compound of invigorating Qi, nourishing Yin, activating blood circulation and dredging collaterals on apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 24 h	第 48 h	第 72 h
模型	-	3.316 ± 2.838	4.698 ± 4.597	5.026 ± 5.480
中药	2.5	18.694 ± 4.688 ²⁾	20.26 ± 6.175 ²⁾	21.896 ± 4.300 ²⁾
西药	0.006 25	14.430 ± 4.181 ²⁾	15.278 ± 5.336 ²⁾	16.052 ± 7.018 ²⁾
抑制剂	-	11.726 ± 3.344 ^{2,4)}	12.106 ± 3.107 ^{1,3)}	13.13 ± 5.640 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与西药组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01。

要调控因子。故 TGF-β₁/Smads 信号通路在 IPF 形成过程中扮演着重要的角色,亦是复杂机制网络失衡在 IPF 发病中的关键信号通路。同时其在诱发细胞纤维化的过程中, TGF-β₁/Smads 通路作用于上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞等不同的细胞,调控不同的机制,促使细胞进入纤维化进程,转变为肌成纤维细胞。

Wiggins^[9]提出 TGF-β₁/Smads 信号通路可以调节下游 ILK, PINCH-1, β₁-integrin, Wnt, Snail, α-SMA, MMP2 等转分化相关基因的表达诱导肺泡、肾小管等多种上皮细胞发生 EMT,促进上皮细胞转变为肌成纤维细胞。Kitao 等^[10]应用 TGF-β₁ 诱导人真皮微血管的内皮细胞分化时,细胞核内磷酸化 Smad2 表达升高,出现内皮细胞外形呈肌成纤维细胞的梭型的形态特征,同时发现 I 型胶原蛋白的表达也同时增加,结果可能提示 TGF-β₁/Smad2 促进纤维化进程。目前,大量实验证据显示, TGF-β₁/Smads 信号传导通路在肺纤维化疾病进展过程中起关键枢纽作用。在这复杂的发病进程中,各种细胞

4 讨论

IPF 的发病机制尚不明确,存在多种学说,如 ECM 生成与降解失衡,细胞凋亡, Th1/Th2 型细胞因子失衡,氧化应激,免疫反应,端粒/端粒酶活性异常,细胞因子网络失衡,上皮-间充质细胞转化等,上述各种学说的相关指标之间存在着密切联系,彼此之间形成了复杂的机制网络。现代研究已经证实 TGF-β₁/Smads^[4] 信号转导通路是目前调控肺纤维化发生发展最主要的信号传导通路, TGF-β₁ 的生物学功能则依靠下游的 Smads 家族蛋白的介导, Smad2 属于 R-Smads, Smad2^[8] 其磷酸化代表 Smads 通路被激活,并与 Smad4 结合成复合体,起到反应链; Smad7 属于 I-Smad, 现被证实为 Smads 通路的负向调控因子,故这 3 个指标作为 Smads 通路上的主

因子的相互作用、相互干预,又构成了一个复杂的网络系统。基于此,探索调控 TGF-β₁/Smads 信号通路促肺纤维化的病理进程,从而达到延缓肺纤维化的目的是当前研究的重点。

课题组基于络病理论,以肺络构效(生理特性和生理功能)为核心,提出 IPF 核心病机及重症病机为“肺虚络瘀”^[10-12],其中“肺虚”以肺阴亏虚为本,络虚不荣为枢;“络瘀”以痰瘀伏络为本,痰热毒瘀互结为要,提出益气养阴活血通络法,并通过动物实验探寻其作用靶点。

前期研究结果已经证实益气养阴活血通络法能够可能通过抑制 TGF-β₁ 蛋白和 mRNA 的高表达^[4] 或抑制 TNF-α mRNA 的表达^[5],调控上调 TIMP-1 mRNA 的表达来抑制 MMP2 mRNA 表达水平^[6],从而起到改善肺组织损伤愈合与纤维化过程。但能否通过调控 TGF-β₁/Smads 信号通路发挥抗纤维化作用尚有待证实。本实验研究益气养阴活血通络法中药复方对 TGF-β₁/Smads 信号转导通路中 TGF-β₁, Smad2, Smad4, Smad7 蛋白及 mRNA 的表达的影响,

意在进一步研究益气养阴活血通络法对 TGF- β_1 介导的 Smads 信号通路的调控作用。实验结果表明,与模型组比较,中药组、西药组、抑制剂组肺成纤维细胞中 TGF- β_1 蛋白表达均有所下调,证实三者均可作用于肺纤维化中的关键性细胞因子 TGF- β_1 ,进而减缓肺纤维化的发展。另外,西药组与抑制剂组在该靶点上的效果较中药组更强。针对 TGF- β_1 /Smads 信号通路上的关键因子,实验结果表明中药组、西药组、抑制剂组细胞中 Smad2, Smad4 的蛋白和 mRNA 表达较模型组均有不同程度地下调,而 Smad7 蛋白和 mRNA 表达作为负向调控因子则有一定的上调,推测中药复方能够抑制 Smad2, Smad4 的表达,而促进 Smad7 的表达,该作用机制可能与中药复方的抗肺纤维化作用有关。

TGF- β_1 /Smads 信号通路参与肺纤维化发病多个病理环节、发挥多种作用方式的复杂的生物化学效应已得到人们的共识,通过本课题实验研究,为了寻求有效、作用明确中医药,开展基于 TGF- β_1 复杂的细胞因子网络和信号传导通路的作用机制研究,进而为深入探索中药复方通过调控 TGF- β_1 /Smads 信号通路作用某一特定的机制奠定基础。

[参考文献]

[1] 孔勤,陈民利. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(8):74-80.
[2] 杨晗. 基于 TGF- β /Smad/ERK 信号转导通路的补阳还五汤拮抗肺纤维化机制研究[D]. 成都:成都中医药大学,2013.
[3] 焦芳芳,刘世青,李飞,等. 化痰理肺方对大鼠肺间质纤维化时 Smad7 和 TGF- β 表达的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2007,45(10):1054-1058.
[4] 庞立健,刘创,臧凝子,等. 基于肺虚络瘀病机理论的参龙煎剂颗粒剂对特发性肺纤维化大鼠肺组织 TGF-

β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(5):1560-1565.
[5] 吕晓东,庞立健,王琳琳,等. 参龙煎剂对肺纤维化中肺组织 TNF- α mRNA 表达影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(1):176-171.
[6] LU X D, PANG L J, WANG L L, et al. Effects of Chinese herbal medicine Shenlong decoction on mRNA expressions of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin[J]. Chin J Integr Med,2010,8(10):961-967.
[7] 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.
[8] 冯佳,向阳,夏燕,等. 益气养阴方对大鼠肺纤维化的干预作用及对 Smad2、Smad7 蛋白的影响[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(3):334-338.
[9] Wiggins R C. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases [J]. Kidney Int, 2007,71(12):1205-1214.
[10] Kitao A, Sato Y, Kitamura S S, et al. Endothelial to mesenchymal transition via transforming growth factor- β_1 /Smad activation is associated with portal venous stenosis in idiopathic portal hypertension [J]. Am J Pathol,2009,175(2):616-626.
[11] 刘创,庞立健,吕晓东. 基于肺络性能的特发性肺纤维化“肺虚络瘀”病机发微[J]. 上海中医药杂志,2014,60(3):28-30.
[12] 庞立健,臧凝子,王琳琳,等. 肺间质纤维化重症病机内涵(肺虚络瘀)初探[J]. 中华中医药杂志,2013,28(12):3497-3499.

[责任编辑 邹晓翠]