

# 养阴清肺方调控放射性肺炎大鼠外周血 T 细胞 Notch1, Jagged1 信号通路

董广通<sup>1</sup>, 张知云<sup>2</sup>, 祁鑫<sup>1</sup>, 王家伟<sup>1</sup>, 侯炜<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:观察养阴清肺方调控放射性肺炎大鼠 T 细胞 Notch 信号受体 1(Notch1)及 Notch 信号配体 1(Jagged1)表达规律的影响,探讨其对放射性肺炎防治作用的机制。方法:将 40 只雌雄各半的 SD 大鼠以随机数字表法随机分为正常组、模型组、激素组、联合用药组,直线加速器对除正常组外的 3 组大鼠全胸单次照射,剂量为 16 Gy。照射后第 1 天起各组予相应的药物灌胃。照射后 4 周,处死大鼠,取全肺称重计算肺系数,取大鼠肺组织进行苏木素-伊红(HE)染色,马松(Masson)染色,Notch1 免疫组化染色,取全血标本进行免疫磁珠分选提取 T 细胞及流式细胞术检测 Notch1 比率,用提取的 T 细胞进行实时荧光定量 PCR(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 Notch1, Jagged1 mRNA 及蛋白表达,观察各组大鼠在放射后 4 周肺系数改变及 Notch1, Jagged1 表达的变化。结果:放射后 4 周,各组肺系数差异明显,正常组与联合用药组肺系数最为接近;与模型组比较,养阴清肺方联合泼尼松龙可明显降低 Notch1 T 细胞所占比例( $P < 0.05$ ),可明显降低 Notch1, Jagged1 mRNA 表达( $P < 0.05$ ),明显下调 Notch1, Jagged1 相关蛋白表达( $P < 0.05$ )。结论:养阴清肺方能明显下调放射性肺炎大鼠 Notch1, Jagged1 表达,可能是防治放射性肺炎发生发展的机制之一。

**[关键词]** 放射性肺炎; 养阴清肺方; T 细胞; T 细胞 Notch 信号受体 1; Notch 信号配体 1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0121-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240121

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170912.1427.048.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-12 14:27

## Effect of Yangyin Qingfei Decoction on Regulating Notch1 and Jagged1 Signaling Pathway in Peripheral Blood T Cells of Rats with Radiation Pneumonia

DONG Guang-tong<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-yun<sup>2</sup>, QI Xin<sup>1</sup>, WANG Jia-wei<sup>1</sup>, HOU Wei<sup>1\*</sup>

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Yangyin Qingfei decoction in regulating T cells Notch signal receptor 1 (Notch1) and Notch signal ligand 1 (Jagged1) in rats with radiation pneumonia, in order to explore its mechanism for preventing and treating radiation pneumonia. **Method:** Forty male and female SD rats were randomly divided into normal group, model group, hormone group and combination group. The dosage was 16 Gy. On the first day after irradiation, the rats in each group were given the corresponding medicine. At the 4<sup>th</sup> week after irradiation, the rats were put to death, and their lungs were weighed. The lung tissues were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining and Notch1 immunohistochemical staining. Immunohistochemistry was used to extract T cells, and flow cytometry was used to detect Notch1 percentage. The changes in lung function and the expressions of Notch1 and Jagged1 were observed 4 weeks later after irradiation. **Result:** At the 4<sup>th</sup> week after radiotherapy, there were significant differences in lung coefficient between groups,

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473462)

**[第一作者]** 董广通,在读硕士,从事中医药肿瘤防治研究, Tel:13269131177, E-mail:1007809206@qq.com

**[通讯作者]** \* 侯炜,主任医师,博士,博士生导师,从事中西医结合对肿瘤的防治研究, E-mail:houwei1964@souhu.com

and the lung coefficient of normal group was the closest to combined treatment group. Compared with model group, Yangyin Qingfei decoction combined with prednisolone can significantly reduce the proportion of Notch1 T cells ( $P < 0.05$ ), the expressions of Notch1, NICD and Jagged1 were down-regulated significantly ( $P < 0.05$ ), and Notch1 and Jagged1 mRNA expressions were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Yangyin Qingfei decoction can significantly reduce Notch1 and Jagged1 expressions of radioactive pneumonia rats, and may be one of prevention and treatment mechanisms for the occurrence and development of radiation pneumonia.

[**Key words**] radiation pneumonia; Yangyin Qingfei decoction; T cell; Notch1; Jagged1

放射治疗(RT)是现代肿瘤治疗的常用手段之一,肺癌、食管癌、乳腺癌等胸腔恶性肿瘤常常需要接受胸部RT。放射性肺炎为放疗过程中常见的并发症。发生率为5%~10%,严重影响到肿瘤患者的预后及生活质量<sup>[1]</sup>。目前西医学对于放射性肺炎主要以糖皮质激素及免疫抑制剂干预治疗,中医药在放射性肺炎的防治中同样优势明显,疗效显著。目前有学者已发现放射性肺炎与免疫功能关系密切<sup>[2-3]</sup>,这为放射性肺炎的防治提供了新的临床治疗思路。放射性肺炎在免疫学中的确切病因目前尚处于探索阶段,药物干预也无法很好地阻止放射性肺炎的病变进程。所以对于放射性肺炎探索新的治疗策略非常必要。

T细胞Notch信号受体1(Notch1)信号通路是一个经典的调节细胞分化的信号通路,脊椎动物细胞主要是对于4种Notch受体(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4)及5种Notch配体(Jagged1, Jagged2, delta-like1, 3, 4)有相应的表达<sup>[4]</sup>。Notch受体与配体在肺组织微血管中都有表达<sup>[5]</sup>,可以调控呼吸系统中多种免疫细胞的分化,维持体内呼吸道细胞种类和功能的均衡<sup>[6-7]</sup>。已有研究显示,Notch信号再经过3次酶切后释放出有活性的活化型Notch1(NICD),可刺激白细胞介素(IL)-3, IL-5等炎症因子的表达,加重肺部炎症反应。Notch1, Jagged1作为Notch信号通路的重要组成,在多种炎症与纤维化疾病中异常表达。目前在放射性肺炎治疗中对Notch信号研究报道尚少。前期研究显示,养阴清肺方治疗放射性肺炎取得了较好的临床疗效和实验结果<sup>[8-9]</sup>,本研究旨在干预放射性肺炎模型大鼠的过程中,以Notch1为切入点,观察Jagged1, Notch1及其活化形式NICD在大鼠外周血T细胞的变化与表达,探讨养阴清肺方防治放射性肺炎的作用机制,为临床治疗放射性肺纤维化提供理论依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠雌雄各20只,鼠龄

50 d,体重(200±10)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001。于中国中医科学院广安门医院SPF级实验动物中心常规饲养,许可证号SYXK(京)2014-0041。使用经<sup>60</sup>Co辐照灭菌饲料,22~25℃,自动控温,自动光控(12h明/12h暗)。本次研究所涉及到的相关实验操作均在中国中医科学院广安门医院实验动物伦理委员会实验动物中心批准下进行,编号20160726。

1.2 药物 养阴清肺方,组成为麦冬15g,地黄10g,西洋参6g,炒栀子15g,连翘15g,鱼腥草25g,苦参15g,川贝(粉)<sup>冲服</sup>5g。各药物由中国中医科学院广安门医院药剂科提供,并经本院药剂科杨响光主任药师鉴定符合2015年版《中国药典》规定。以上药材纯水浸泡30min后,依次6,4,2倍量水煎3次,3次混合,于旋转蒸发仪75℃恒温下旋转蒸发浓缩至含生药1g·mL<sup>-1</sup>药液,4℃冰箱保存。

醋酸泼尼松龙注射液(华中药业股份有限公司,批号20151001),以生理盐水制成0.25,0.125g·L<sup>-1</sup>的溶液,备用。

1.3 仪器 Precise型医用直线加速器(瑞典医科达公司);FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司);CF15D2型高速冷冻离心机(日本Hitachi公司);RM2235型病理切片仪(德国莱卡公司);KD-P型组织摊片机(浙江金华市科迪仪器设备有限公司);NIKON CI-S型倒置显微镜,NIKON DS-U3型成像系统(日本尼康公司);Thermo NanoDrop 2000型分光光度计(美国基因有限公司);7500 Fast实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystems公司);VE180型垂直电泳槽,VE186型转移电泳槽(上海天能公司)。

1.4 试剂 CD3抗体(APC标记,美国EB公司,批号17-0030-82);Notch1抗体,Notch1同型对照抗体(PE标记,美国CST公司,批号分别为15004s, 5742S);CD4抗体(FITC标记,美国BD公司,批号554833);16% Formaldehyde(w/v)(美国Pierce公司,批号28906);牛血清白蛋白V(北京索莱宝公

司,批号 SA8130);Pan T Cell MicroBeads,LS 阳性分选柱 Buffer(德国美天旎公司,批号分别为 130-090-320,130-042-401);兔抗鼠 Notch1,Jagged1,NICD 单克隆一抗, $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)(美国 CST 公司,批号分别为 3608,2620,4147,4970);山羊抗兔二抗(北京中衫金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301);RIPA 裂解液,二喹啉甲酸(BCA)法蛋白定量试剂盒(北京普利莱生物技术有限公司,批号分别为 C1053,P1511);总 RNA 提取试剂盒,cDNA 第一链合成试剂盒(北京天根生物科学技术有限公司,批号分别为 DP431,KR106)。

## 2 方法

**2.1 大鼠放射性肺纤维化模型建立** 以随机数字表法将 40 只大鼠随机分为正常组、模型组、激素组、联合用药组 4 组,每组 10 只,雌雄各半。参考文献[10]将大鼠用 10% 的水合氯醛麻醉,平躺,四肢固定于自制木架,充分暴露胸部,6MV-X 射线加速器单次全胸照射 16 Gy,照射面积约为 3.5 cm × 4.0 cm(上至两腋窝、下至胸骨剑突,其余部分用 10 cm 厚铅砖屏蔽),源靶距为 100 cm,剂量率 250 cGy·min<sup>-1</sup>。正常组大鼠在同等条件下肺部假照射 0 Gy,实验组大鼠正常剂量全胸照射。

**2.2 养阴清肺方干预方法** 各组于照射后第 1 天开始灌胃给药,每日 1 次,每周 7 次,持续至取材。每周按体重变化调整 1 次灌胃剂量,按 1 mL·(100 g)<sup>-1</sup> 给药。给药剂量根据《医用实验动物学》<sup>[11]</sup> 人鼠剂量换算法折换大鼠用量,参考文献调整给药方案<sup>[12]</sup>,激素组,1~2 周予 1.25 mg·kg<sup>-1</sup> 泼尼松水溶液灌胃给药,第 3 周予 0.625 mg·kg<sup>-1</sup> 泼尼松水溶液灌胃给药;联合用药组,1~2 周予中药 9.7 g·kg<sup>-1</sup> + 1.25 mg·kg<sup>-1</sup> 泼尼松,3 周起予 9.7 g·kg<sup>-1</sup> + 0.625 mg·kg<sup>-1</sup> 泼尼松,1 次/d,灌胃;模型组及正常组采用生理盐水灌胃。

取材,于照射后 4 周,取各组大鼠每组 10 只,称重后麻醉大鼠,固定于木板上,腹主动脉取血,每只肝素钠抗凝管留取 2 mL,并摘取全肺称重。

**2.3 肺脏系数计算** 按照公式计算肺系数,肺系数 = 肺湿重(mg)/末次体重(g) × 100%。

**2.4 肺组织形态学改变及分级评定标准** 全肺在 10% 中性甲醛缓冲液中固定 48 h,通过脱水、浸蜡、包埋、切片、脱蜡,苏木素-伊红(HE)染色,苏木精、丽春红、苯胺蓝三色(Masson)染色。在光学显微镜下观察肺组织 HE,Masson 染色切片病理改变。根据 Szapiel 等的半定量方法确定其分级情况<sup>[13]</sup>,HE

染色检测肺泡炎程度,肺泡炎程度分为 0~4 级,无肺泡炎(I 级),1 分;轻度肺泡炎,主要表现为肺泡间隔增宽,出现炎性浸润,且肺泡炎面积小于全视野的 20%,肺泡结构正常(II 级),2 分;中度肺泡炎,肺泡炎的总面积占全视野面积的 20%~50%(III 级),3 分;重度肺泡炎,肺泡炎呈弥散性,且面积占全视野面积的 51% 以上,偶尔可见肺泡腔内有单核细胞及出血导致的实质性变化(IV 级),4 分。Masson 染色检测肺间质胶原含量,纤维化程度分为 0~4 级,无胶原沉积(I 级),1 分;轻度胶原沉积,肺泡间隔轻度增厚,且胶原沉积面积小于全视野面积 20%,部分区域仍有正常肺泡(II 级),2 分;中度胶原沉积,肺泡结构紊乱,肺泡间隔中都,且胶原沉积面积为全视野面积的 21%~50%(III 级),3 分;重度胶原沉积,肺实质结构紊乱,肺泡融合,可见大小不等的囊气腔,且胶原沉积面积占全视野面积的 51% 以上(IV 级),4 分。

**2.5 免疫组化检测肺组织 Notch1 蛋白表达** 组织常规包埋切片,二甲苯中脱蜡,梯度乙醇溶液脱水,将切片置于乙二胺四乙酸(EDTA)中进行抗原修复(96 °C 反应 1 h);将上述处理后的切片冲洗后用牛血清白蛋白 V 室温孵育 30 min,加入兔抗大鼠 Notch1 一抗(1:100)4 °C 过夜,37 °C 的条件下用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对内源性过氧化物酶进行灭活处理,二抗 37 °C 温箱 30 min 孵育,冲洗后 DAB 显色剂显色,苏木精染核,脱水并封片。每张免疫组化切片于 200 倍视野拍摄照片。应用 Image Pro-Plus 6.0 软件计算图片中黄色区域的积分吸光度 IA 和黄色区域的面积。

**2.6 免疫磁珠分选大鼠外周血 T 细胞** 无菌取肝素抗凝血 4 mL,加入稀释后的溶血素 80 mL,静置 10 min 后 1 300 × g 离心 5 min。加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次。细胞计数,将 1 × 10<sup>7</sup> 个细胞 1 300 × g 离心 10 min 后重悬在细胞缓冲液(buffer) 80 μL 中,加入 Pan T Cell microBeads 20 μL,混匀,4 °C 冰箱中避光孵育 15 min,加入 buffer 2 mL 混匀,1 300 × g 离心 10 min,弃上清,每 1 × 10<sup>8</sup> 个细胞重悬在 buffer 500 μL 中,先用 buffer 3 mL 润洗 LS 柱,待润洗缓冲液快走完后,将下面的试管换成干净的试管收集阴性成分,将标本混匀,将标本加入分选柱中。buffer 3 mL 冲洗分选柱,总共 3 次,取下分选柱,往分选柱中加入 buffer 5 mL,迅速用力用活塞推出阳性成分细胞,其中即含有所需纯化的细胞。加入 CD3 抗体,流式细胞仪鉴定纯度。

**2.7 流式细胞术检测外周血 T 细胞 Notch1 表达**  
取大鼠外周血 200  $\mu\text{L}$ , 分别加入带有荧光标记的 CD3, CD4 单克隆抗体, 避光孵育 30 min, 入稀释后的溶血素 4 mL, PBS 洗涤 2 次。将细胞重悬在 PBS 0.5 ~ 1 mL 中。加入甲醛溶液至终百分体积为 2% ~ 4%。37  $^{\circ}\text{C}$  水浴固定 10 min, 冰上降温 1 min。离心去除固定剂, 然后将细胞沉淀重悬在 90% 甲醇 PBS 溶液中, 冰上放置 30 min 后用孵育缓冲液 (BSA 0.5 g + PBS 100 mL) 2 mL 洗涤 2 次, 将细胞分别重悬在 Notch1 抗体及同型 100  $\mu\text{L}$  中, 室温避光孵育 1 h, 孵育缓冲液洗涤 2 次。加入 PBS 200  $\mu\text{L}$  或 1% 多聚甲醛上机检测。

**2.8 Real-time PCR 技术检测外周血 T 细胞 Notch1, Jagged1 mRNA 表达**  
取免疫磁珠纯化的 T 细胞, 按照试剂盒说明书加入裂解液 1 mL, 加入三氯甲烷 200  $\mu\text{L}$ , 剧烈振荡 15 s, 室温放置 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 13 400  $\times g$  离心 15 min, 把水相转移到新管中, 缓慢加入转移液体积 1.5 倍的无水乙醇, 将得到的溶液和沉淀一起转入向吸附柱 miRspin 中, 室温 13 400  $\times g$  离心 30 s, 加入去蛋白液 MRD 500  $\mu\text{L}$ , 漂洗后加入 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 30 ~ 100  $\mu\text{L}$ , 室温放置 2 min, 13 400  $\times g$  离心 2 min。运用 Nanodrop 测 RNA 浓度与纯度, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录, 用 cDNA 为模板对大鼠 T 细胞 Notch1, Jagged1 进行 PCR 扩增, 扩增反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$  SyBr Green Mix 10  $\mu\text{L}$ , 正反向引物各 1  $\mu\text{L}$ , DEPC H<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。Notch1, Jagged1 引物由中国赛百盛生命技术公司设计并合成 (表 1)。采用 PowerUp™ SYBR® Green Master Mix 进行 PCR 反应, 反应体系 20  $\mu\text{L}$ , 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 共 40 次循环。程序运行结束后, 取 C<sub>t</sub> 值 (扩增动力曲线拐点), 按 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法计算待测目的基因相对表达量。

表 1 Notch1, Jagged1 引物序列

Table 1 Notch1, Jagged1 primer sequence

引物	序列 (5'-3')	定位	长度 /bp	扩增产物长度 /bp
GAPDH	上游 CCATGGAGAAGGCTGGG	381	17	195
	下游 CAAAGTTGTCATGGATGGACC	575	20	
Jagged1	上游 TGCCGAACCCCTGTCATAAT	2 632	20	176
	下游 TTCGCACCCGTACCAGTTAT	2 807	20	
Notch1	上游 GGAGCCAACAAAGACATGCA	6 347	20	193
	下游 CATCCAAAAGCCGCACHATA	6 539	20	

**2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测外周血 T 细胞 Notch1, Jagged1, NICD 蛋白表达**  
取免疫磁珠纯化的 T 细胞, 加入 RIPA 裂解液, 提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 上样后进行 SDS-PAGE 电泳 1.5 h, PVDF 转膜 1 h, 取出 PVDF 膜, 用脱脂奶粉 1 g + TBST 配制封闭液 20 mL, 室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h, Notch1, Jagged1, NICD 一抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h 或 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 洗涤 3 次, 二抗 (1:5 000) 室温下孵育 1 h 后, 洗涤 3 次, 超敏化学发光法显色, 置于凝胶成像系统进行检测, 用 Quantity One 软件导出图片, 并对各组条带灰度值进行分析。

**2.10 统计学分析**  
采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 计量分析用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析, 组间比较用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠一般状况的影响**  
与正常大鼠比较, 受照射大鼠照射 2 ~ 4 周后, 受照射部位毛质粗糙, 活动能力下降, 体重增长减缓; 有的大鼠甚至开始脱毛甚至皮肤溃烂, 嘴角和鼻孔发现出血, 取材时发现受照射大鼠有大量胸腔积液, 严重者肺组织甚至与胸腔黏连。上述情况表现程度与模型组比较, 联合用药组病变反应最轻, 模型组最严重。

**3.2 对大鼠肺系数变化的影响**  
正常组大鼠肺湿重变化不大, 但体重增长明显, 中药组及联合用药组体重变化不明显, 肺湿重略有增加。照射后各组大鼠肺系数与正常组比较均明显增大 ( $P < 0.05$ ), 联合用药组肺系数明显低于模型组, 下降趋势明显 ( $P < 0.05$ ), 激素组与模型组比较虽无差异但联合用药组更为明显。见表 2。

表 2 养阴清肺方对大鼠肺系数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Yangyin Qingfei decoction on pulmonary coefficient in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	肺系数
正常	-	10	3.54 $\pm$ 0.17
模型	-	7	7.15 $\pm$ 0.78 <sup>1)</sup>
激素	1.2, 0.625	9	5.88 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>
联合用药	9.7 + 1.25, 9.7 + 0.625	9	4.98 $\pm$ 0.45 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 ~ 6 同)。

**3.3 对大鼠病理形态的影响**  
正常组大鼠肺组织结构正常, 支气管壁完整, 平滑肌厚度正常, 未见炎性细胞浸润。照射后模型组大鼠表现出急性炎症的变化, 肺泡壁增宽, 炎性渗出水肿明显, 肺泡间隔

增宽,肺间质及毛细血管壁充血,肺间质及肺泡腔内可见大量巨噬细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润,并可见纤维素样渗出物,纤维结缔组织增生。给药 30 d 后,激素组、联合用药组肺组织充血、水肿、渗出等炎性病变均比模型组改善,联合用药组除支气管平滑肌厚度不同程度降低外,炎细胞浸润也不同程度的减轻,优于激素组。见图 1,表 3。

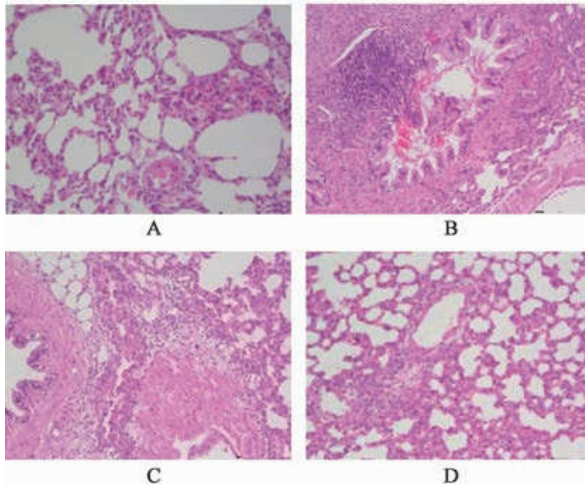


图 1 养阴清肺方对各组大鼠肺脏病理组织学改变的影响 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 1 Effect of Yangyin Qingfei decoction on pathological changes of lung in rats (HE,  $\times 100$ )

表 3 养阴清肺方对组大鼠肺泡炎,纤维化,Notch1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of Yangyin Qingfei decoction on alveolitis, fibrosis and Notch1 expression in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	HE 染色 积分/分	Masson 染色 积分/分	Notch1 蛋白 IA
正常	-	10	1 ± 0	1 ± 0	0.054 ± 0.003
模型	-	7	3 ± 0.82 <sup>1)</sup>	3 ± 0.82 <sup>1)</sup>	0.161 ± 0.004 <sup>1)</sup>
激素	1.2, 0.625	9	2.17 ± 0.24 <sup>2)</sup>	2.33 ± 0.47 <sup>2)</sup>	0.098 ± 0.009 <sup>2)</sup>
联合用药	9.7 + 1.25, 9.7 + 0.625	9	1.67 ± 0.28 <sup>2)</sup>	1.67 ± 0.24 <sup>2)</sup>	0.062 ± 0.001 <sup>2)</sup>

**3.4 对大鼠胶原纤维的影响** 正常组大鼠未观察到有胶原纤维沉积。模型组呈中度至重度胶原沉积,各级支气管、肺泡壁和增厚的肺泡隔均可见大量蓝色胶原纤维增生。与模型组比较,给药 30 d 后激素组和联合用药组纤维结缔组织增生均有不同程度的改善,其中尤以联合用药组效果较好,优于激素组。见图 2,表 3。

**3.5 对大鼠肺组织 Notch1 蛋白表达的影响** 正常组在支气管周围、血管周围、肺间质中只看到淡黄色

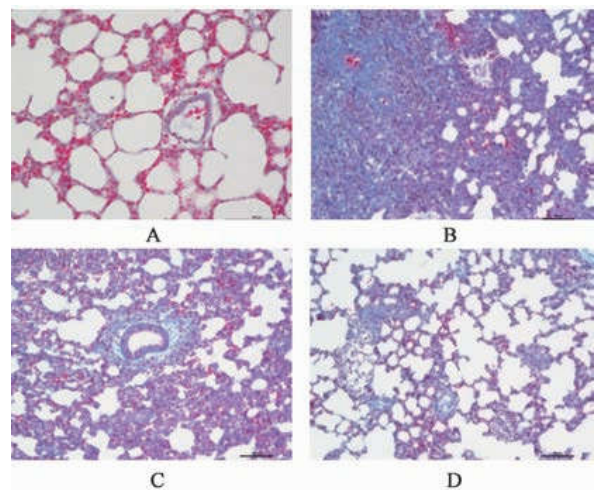


图 2 养阴清肺方对各组大鼠肺脏胶原纤维的影响 (Masson,  $\times 100$ )  
Fig. 2 Effect of Yangyin Qingfei decoction on collagen fibrils changes of lung in rats (Masson,  $\times 100$ )

颗粒,只有极少数深黄色或棕色颗粒。模型组 Notch1 表达强阳性,尤其在支气管上皮及周围多见棕黄色颗粒,Notch1 表达明显高于正常组 ( $P < 0.05$ ),给药 30 d 后与模型组比较,激素组与联合用药组 Notch1 蛋白表达均降低 ( $P < 0.05$ ),其中又以联合用药效果最为明显。见图 3,表 3。

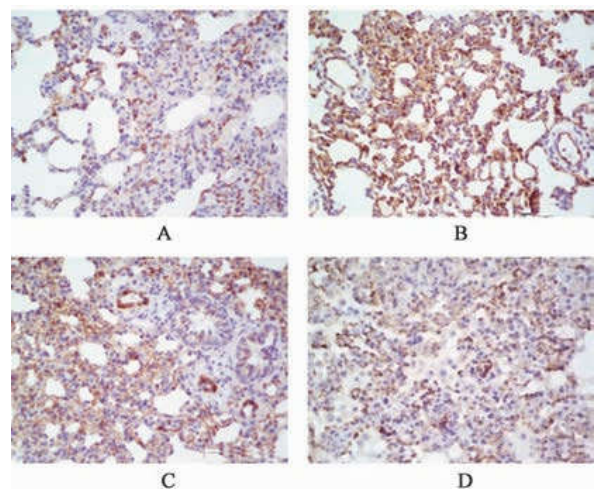


图 3 养阴清肺方对各组大鼠肺组织 Notch1 蛋白表达的影响 (免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of Yangyin Qingfei decoction on Notch1 protein expression of lung in rats (IHC,  $\times 200$ )

**3.6 对大鼠外周血 T 细胞 Notch1 蛋白表达的影响** 照射后大鼠外周血 T 细胞 Notch1 细胞阳性率明显高于正常组大鼠,与正常组比较,模型组 Notch 蛋白表达比例明显升高 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,激素组、联合用药组 Notch1 蛋白表达阳性率均明显下调 ( $P < 0.05$ ),但联合用药组与正常组比较差异不明显,提示联合用药组下调 Notch1 表达的效果最为接近正常。见表 4。

**3.7 对大鼠外周血 T 细胞 Notch1, Jagged1 mRNA**

表 4 养阴清肺方对大鼠外周血 T 细胞 Notch1 细胞阳性率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of Yangyin Qingfei decoction on Notch1 positive expression in peripheral blood T cells of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	Notch1 阳性细胞率/%
正常	-	10	15.0 ± 1.9
模型	-	7	94.0 ± 5.7 <sup>1)</sup>
激素	1.2, 0.625	9	57.0 ± 13.9 <sup>2)</sup>
联合用药	9.7 + 1.25, 9.7 + 0.625	9	27.0 ± 3.7 <sup>2)</sup>

表达的影响 与正常组比较,模型组 Notch1, Jagged1 mRNA 表达明显增高 ( $P < 0.05$ )。用药干预后,与模型组比较,激素组、联合用药组 Notch1, Jagged1 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ),其中又以联合用药组降低最为明显。见表 5。

表 5 养阴清肺方对大鼠 T 细胞 Notch1, Jagged1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of Yangyin Qingfei decoction on Notch1 and Jagged1 mRNA expressions in T cell of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	Notch1	Jagged1
正常	-	10	0.198 ± 0.058	0.280 ± 0.212
模型	-	7	1.484 ± 0.355 <sup>1)</sup>	2.109 ± 0.353 <sup>1)</sup>
激素	1.2, 0.625	9	0.935 ± 0.135 <sup>2)</sup>	1.360 ± 0.296 <sup>2)</sup>
联合用药	9.7 + 1.25, 9.7 + 0.625	9	0.538 ± 0.156 <sup>2)</sup>	0.538 ± 0.219 <sup>2)</sup>

3.8 对大鼠外周血 T 细胞 Notch1, NICD, Jagged1 蛋白表达的影响 Notch1, NICD, Jagged1 在正常肺组织中仅少量表达,模型组大鼠 T 细胞 Notch1, NICD, Jagged1 表达在造模后均明显高于正常组 ( $P < 0.05$ )。各给药组 Notch1, NICD, Jagged1 表达均明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ),其中联合用药组效果最好,Notch1, NICD 下调均优于激素组 ( $P < 0.05$ ),且 Notch1, NICD 与正常组比较无统计差异。见表 6,图 4。

表 6 养阴清肺方对大鼠 T 细胞 Notch1, NICD, Jagged1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Effect of Yangyin Qingfei decoction on Notch1, NICD and Jagged1 protein expressions in rat T cells ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	Notch1/ $\beta$ -actin	NICD/ $\beta$ -actin	Jagged1/ $\beta$ -actin
正常	-	10	0.215 ± 0.049	0.295 ± 0.013	0.217 ± 0.029
模型	-	7	0.680 ± 0.539 <sup>1)</sup>	0.739 ± 0.082 <sup>1)</sup>	0.596 ± 0.027 <sup>1)</sup>
激素	1.2, 0.625	9	0.395 ± 0.034 <sup>2)</sup>	0.520 ± 0.059 <sup>2)</sup>	0.317 ± 0.015 <sup>2)</sup>
联合用药	9.7 + 1.25, 9.7 + 0.625	9	0.242 ± 0.038 <sup>2)</sup>	0.356 ± 0.044 <sup>2)</sup>	0.287 ± 0.025 <sup>2)</sup>

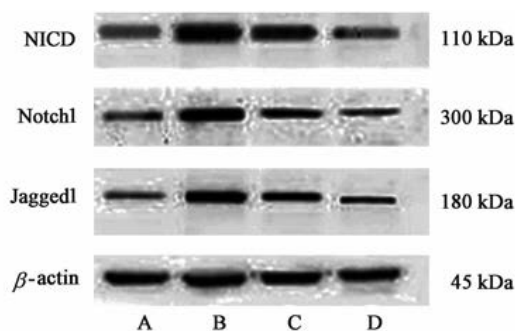


图 4 大鼠 T 细胞 Notch1, NICD, Jagged1 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Notch1, NICD and Jagged1 protein expressions in rat T cells

#### 4 讨论

放射性肺炎是一种复杂的进行性病变,炎症反应和自身免疫在其发病过程中的作用越来越受到重视。中医学认为,肺为娇脏,不耐攻伐,放射性肺炎属中医“肺痿”、“肺痹”等范畴。电离辐射属于外来火热邪毒,热邪犯肺可耗伤气血阴津,致使肺失濡养,造成干咳、气喘、出血等典型症状。侯伟教授根据放射线致病特点以及肿瘤患者特殊体质,在“扶正培本”的基础上按照清热解毒,养阴润肺的治法在临床中研制出了防治放射性肺炎的临床经验方养阴清肺方,具有养阴益肺,润燥解毒的功能。因此深入挖掘该方作用机制在临床与实验中都非常必要。

Notch 信号是高度保守的信号家族,其中 Notch1 蛋白是主要的受体<sup>[14]</sup>,是调控细胞分化的关键信号通路之一,与放射性肺损伤的发生、发展及预后密切相关<sup>[15]</sup>,参与了炎症反应、免疫反应、微血管新生等多种病理生理过程。有国外学者研究证实,放射性肺损伤发生后是自我修复还是逐步发展为后期的纤维化病变谱系阴性,上皮干(祖)细胞中的 Notch 信号通路会起部分决定性作用<sup>[16]</sup>。Notch1 可诱导 IL 等炎症因子的分泌,而这类细胞因子与放射性肺炎的发生密切相关。干预这一信号通路,有望延缓放射性肺损伤进程,为放射性肺炎治疗提供切实有据的指导。

本研究采用直线加速器单次全胸照射 16 Gy,成功地构建出了放射性肺损伤模型,这与潘纯国等<sup>[10]</sup>研究中报道一致,放射性肺损伤在早期表现为放射性肺炎,以炎性细胞浸润,出血水肿及肺泡间隔逐渐增厚为特征,甚者兼有纤维化病灶形成的趋势。本研究结果表明,养肺活血方能显著改善放射性肺炎大鼠的肺泡炎和肺纤维化程度,有效防治肺损伤的发生进展。并证实养阴清肺方联合激素用药可在

一定程度减轻急性放射性肺炎及防止慢性放射性肺纤维化病变,可观察到养阴清肺方对正常肺组织无明显毒副作用。Notch1 在正常组中仅少量表达,经照射后,模型组 Notch1 受体占 CD4 细胞比例明显增多,说明在放射性肺炎期,SD 大鼠 T 细胞存在 Notch1 增多的趋势,激素组、联合用药组 Notch1 表达低于模型组,表达趋于正常,尤以联合用药效果显著,同时研究结果显示 Notch1, Jagged1, NICD 表达的变化趋势也与流式细胞相近,与 ZHOU 等<sup>[17]</sup>研究大致一致,提示作为 Notch 信号通路的主要配体, Jagged1 可有效激活 Notch1 信号,而 NICD 是 Notch1 的活性形式,其表达量的多少直接反映了 Jagged1/Notch1 的活化状态。由此可见,肺纤维化的发生与 Notch 信号通路的激活有关。

综上所述,养阴清肺方防治放射性肺炎的作用机制应与下调 Notch1, Jagged1 的表达有关,提示该方可通过干预 Notch 信号转导来防治放射性肺炎,从一定程度上可以成为治疗放射性肺损伤的作用靶点,具有重要的临床意义。至于是否存在其他机制,如对 Notch 信号通路的下游 Hes1 等基因的影响,或对局部组织(肺)T 细胞 Notch1 的影响,本研究将继续进行探讨。

[参考文献]

[ 1 ] Al-Dahir S, Gillard C, Brakta F, et al. Antimicrobial susceptibilities of respiratory pathogens in the surgical/trauma intensive care unit compared with the hospitalwide respiratory antibiogram in a level I trauma center[J]. Surg Infect;Larchmt,2015,16(1):62-67.

[ 2 ] Park H R, Jo S K. Lasting effects of an impairment of Th1-like immune response in  $\gamma$ -irradiated mice: a resemblance between irradiated mice and aged mice[J]. Cell Immunol,2011,267(1):1-8.

[ 3 ] 赵东长,王淑珍.血清补体活性和 C 反应蛋白水平及血小板计数与全身炎症反应综合征的预后[J]. 中华儿科杂志,2002,40(3):169-172.

[ 4 ] Thibaut Q, Julie D, Stephanie C, et al. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction [J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80 ( 12 ): 2032-2041.

[ 5 ] Raymond T, Schaller M, Hogaboam C M, et al. Toll-like

receptors, Notch ligands, and cytolines drive the chronicity of lung inflammation [J]. Proc Am Thorac Soc,2007,4(8):635-641.

[ 6 ] ZHANG S, Loch A J, Radtke F, et al. Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways[J]. Dev Dyn,2013,242(6):678-686.

[ 7 ] 于秀克,曾林祥. Notch 信号通路与肺纤维化[J]. 生命的化学,2012,32(2):155-158.

[ 8 ] 王苏,侯炜,赵彪,等. 养阴清肺方治疗放射性肺炎的临床观察[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2013,20(4):18-20.

[ 9 ] 王苏,杜欣颖,侯炜,等. 养阴清肺方对放射性肺炎大鼠肺组织病理改变及血清 TGF- $\beta_1$  表达的影响[J]. 北京中医药,2012,30(11):858-860.

[ 10 ] 潘纯国,刘智华,王静怡,等. 单次与分次剂量照射大鼠放射性肺损伤模型的建立[J]. 实用癌症杂志,2015,30(10):1423-1425,1429.

[ 11 ] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1987:417.

[ 12 ] 王寒蕾,毛艳,梁洁,等. 马蔺子素对大鼠放射性肺损伤的防护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):151-159.

[ 13 ] LI X, XU G, QIAO T, et al. Effects of CpG oligodeoxynucleotide 1826 on acute radiation-induced lung injury in mice[J]. Biol Res,2016,49(1):1-6.

[ 14 ] MA D, DONG X, ZANG S, et al. Aberrant expression and clinical correlation of Notch signaling molecules in breast cancer of Chinese population[J]. Asia Pac J Clin Oncol,2011,7(4):385-391.

[ 15 ] Kavian N, Servettaz A, Mongaret C, et al. Targeting ADAM-17/Notch signaling abrogates the development of systemic sclerosis in a murine model [J]. Arthritis Rheum,2010,62(11):3477-3487.

[ 16 ] Vaughan A E, Brumwell A N, XI Y, et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury [J]. Nature, 2015, 517 ( 7536 ): 621-625.

[ 17 ] ZHOU Y, LIAO S P, ZHANG Z W, et al. Astragalus injection attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via down-regulating Jagged1/Notch1 in lungs [J]. J Pharm Pharmacol,2016,68(3):389-396.

[责任编辑 张丰丰]