

当归补血汤对博莱霉素致肺纤维化大鼠 PKD1/NF- κ B/MnSOD 信号通路的影响

刘娜¹, 王杰鹏¹, 鲁辰希¹, 李伟¹, 王硕¹, 方倩¹, 方芳^{1,2}, 方朝义^{1,2*}

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200;

2. 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室, 石家庄 050091)

[摘要] 目的: 观察当归补血汤对博莱霉素致肺纤维化模型大鼠肺组织病理及蛋白激酶 D1(PKD1)/核转录因子- κ B(NF- κ B)/锰超氧化物歧化酶(MnSOD)介导的氧化应激通路的影响, 探讨该方干预肺纤维化作用机制。方法: 32 只雄性 SPF 级 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组、当归补血汤组、泼尼松组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余各组气管内滴注博莱霉素制备肺纤维化大鼠模型。造模 24 h 后, 当归补血汤组给予当归补血汤水溶液(0.81 g·kg⁻¹)灌胃, 泼尼松组给予泼尼松水溶液(0.005 g·kg⁻¹)灌胃, 假手术组、模型组予等体积生理盐水灌胃。于用药 14 d 后, 股动脉采血并分离血清, 剖胸取肺。苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色观察大鼠肺组织病理改变, 并行 Szapiel 评分和 Ashcroft 评分; 测定血清丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶(CAT), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测 PKD1, NF- κ B, MnSOD mRNA 及蛋白的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组 Szapiel 评分和 Ashcroft 评分明显升高($P < 0.05$), 血清 MDA 含量显著升高, SOD, CAT, GSH-Px 活性显著降低, 肺组织 PKD1, NF- κ B, MnSOD mRNA 及蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 当归补血汤组明显下降 Szapiel 评分和 Ashcroft 评分($P < 0.05$), 显著降低血清 MDA 含量, 明显升高 SOD, CAT, GSH-Px 活性, 明显降低肺组织 PKD1, NF- κ B, MnSOD mRNA 及蛋白表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 当归补血汤可通过调节 PKD1/NF- κ B/MnSOD 线粒体核抗氧化通路, 提高机体抗氧化能力, 从而减轻肺纤维化程度。

[关键词] 肺纤维化; 当归补血汤; 氧化应激; 蛋白激酶 D1(PKD1)/核转录因子- κ B(NF- κ B)/锰超氧化物歧化酶(MnSOD)通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)13-0066-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200402.1647.003.html>

[网络出版日期] 2020-4-2 17:19

Effect of Danggui Buxuetang on PKD1/NF- κ B/MnSOD Signal Pathway in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats

LIU Na¹, WANG Jie-peng¹, LU Chen-xi¹, LI Wei¹, WANG Shuo¹, FANG Qian¹,
FANG Fang^{1,2}, FANG Chao-yi^{1,2*}

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

2. Hebei Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Prevention Research on Cardio-cerebrovascular Diseases, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Buxuetang on lung histopathology and protein

[收稿日期] 20191104(005)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(H2019423092);河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究项目(冀财社[2015]118号);河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2016056);河北中医学院青年科研基金项目(QNZ2015009, QNZ2016001);河北中医学院优秀本科生科研能力提升项目(YXZ2019008)

[第一作者] 刘娜, 在读硕士, 从事肺脏病证基础与临床研究, E-mail: liuna3m14@outlook.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

kinase D1 (PKD1), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) and manganese superoxide dismutase (MnSOD)-mediated oxidative stress pathway in rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin, so as to explore the mechanism of intervention of pulmonary fibrosis. **Method:** Thirty-two male SPF SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Danggui Buxuetang group and prednisone group, with 8 rats in each group. Except the sham operation group, the other groups were prepared through the intratracheal instillation with bleomycin. After modeling for 24 h, the rats of Danggui Buxuetang group were administered with Danggui Buxuetang ($0.81 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rats of prednisone group were given aqueous solution of prednisone ($0.005 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The rats of sham operation group and model group were given the same volume of saline. After 14 days of administration, blood was collected from the femoral artery, serum was separated, and the lungs were taken by thoracotomy. The pathological changes of rat lung tissues were observed by hematoxylin-eosin staining (HE) and Masson trichrome staining, and graded by Szapiel score and Ashcroft score at the same time. The content of serum malondialdehyde (MDA), and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) were determined. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to measure mRNA and protein expressions of PKD1, NF- κ B, MnSOD. **Result:** Compared with the rats in sham operation group, the rats in model group had higher Szapiel scores and Ashcroft scores ($P<0.05$), higher serum MDA content, but lower SOD, CAT and GSH-Px activities ($P<0.01$), moreover, the rat lung tissues in model group had higher mRNA and protein expressions of PKD1, NF- κ B and MnSOD ($P<0.01$) than those in sham operation group. Compared with the rats in model group, the Szapiel scores and Ashcroft scores of the rats in Danggui Buxuetang group were decreased significantly ($P<0.05$). The serum MDA content was decreased significantly, and SOD, CAT, GSH-Px activities were increased, whereas mRNA and protein expressions of PKD1, NF- κ B, MnSOD in the rat lung tissues were decreased ($P<0.05, P<0.01$). **Conclusion:** Danggui Buxuetang can reduce the degree of pulmonary fibrosis by regulating the anti-oxidation pathway of PKD1/NF- κ B/MnSOD mitochondrial nucleus and improving the body's antioxidant capacity.

[Key words] pulmonary fibrosis; Danggui Buxuetang; oxidative stress; protein kinase D1 (PKD1)/nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)/manganese superoxide dismutase (MnSOD) pathway

肺纤维化(PF)是一种慢性且不可逆转的肺间质疾病,患者出现肺功能下降、限制性通气障碍和气体交换障碍,最终因呼吸衰竭而死亡^[1-2]。近年来,该病的发病率持续升高,但其发病机制尚未完全清楚。研究表明,氧化-抗氧化失衡是PF形成的重要病理机制^[3-5]。蛋白激酶D1(PKD1)被证实是一种线粒体氧化压力感受器及抗氧化酶表达的调节器^[6],其在PF大鼠细支气管上皮细胞的纤毛中表达较正常大鼠为高,提示PKD1可能与PF发病密切相关^[7]。业已证实,PKD1/核转录因子- κ B(NF- κ B)/锰超氧化物歧化酶(MnSOD)信号通路介导的氧化应激在PF发病过程中有着重要作用^[8]。PF发病过程伴随着大量活性氧(ROS)释放^[9],PKD1可感知线粒体中过度升高的ROS,从而将信号由线粒体传递至细胞核,进而激活NF- κ B及其下游靶基因MnSOD^[10]。因此,PKD1/NF- κ B/MnSOD信号通路可能是治疗PF的潜在靶点之一。

课题组致力于肺系疾病的临床和基础研究。在多年研究基础上,认为气虚血瘀是PF的重要病机,其治当以益气活血为法^[11]。当归补血汤首载于《内外伤辨惑论》,方由黄芪-当归按5:1组成,具有益气生血之效^[12]。据其药物特征,亦兼具益气活血之功,能有效降低PF患者炎性因子水平,提高运动耐力和生活质量;并可通过抑制NAPDH氧化酶4(NOX4),调节氧化水平改善PF病理状态^[13-14]。为深入探讨当归补血汤抗PF机制,笔者在成功复制PF大鼠模型基础上,观察当归补血汤对PKD1/NF- κ B/Mn-SOD介导的氧化应激通路的影响,从方证相关性揭示PF状态下氧化损伤的病机特点及益气活血法的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD雄性大鼠32只,体质量(200 ± 10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,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。本实验符合河北中医学院动物伦理委员会标准(编号DWLL2018024)。

1.2 药物与试剂 当归补血汤由黄芪30g,当归6g组成(其免煎颗粒由广东一方制药有限公司生产,批号分别为8017093,8032653),其中1g黄芪免煎颗粒相当于5g生药,1g当归相当于3.3g生药,灌胃前以去离子水充分溶解;博莱霉素(日本化药株式会社,批号JX20160394);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号171232);苏木素-伊红(HE)染色液,马松(Masson)三色染色液(珠海贝索公司,批号分别为BA-4097,BA-4079A);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),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A001-3,A003-1,A005,A007-1-1);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(深圳Bioeasy公司,批号BE0101);NF- κ B抗体(美国Thermo公司,批号PA5-16545);PKD1,MnSOD,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国Abcam Ltd公司,批号分别为ab59415,ab13533,ab181602);焦碳酸二乙酯(DEPC,美国Sigma公司,货号D5758);Eastep Super Total RNA ExtractionKit, GoScript Reverse Transcription System, PCR Master Mix(美国Promega公司,货号分别为LS1040,A5001,A6002)。

1.3 仪器 EG11508型组织包埋机, RM2255型全自动轮转式切片仪, HI1210型摊片机(德国Leica公司); BX53型光学显微镜(日本Olympus公司); Plus384型酶标仪(美国Molecular Devices公司); DYCZ-40K型电泳仪和转膜仪(北京六一仪器厂); CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司); Fusion FX5 Spectra化学发光成像系统成像(法国Vilber公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药 采用随机数字表法,将大鼠随机分为假手术组、模型组、当归补血汤组、泼尼松组,每组8只。适应性喂养1周后,气管内滴注博莱霉素制备PF大鼠模型^[15-16],大鼠以2%戊巴比妥钠(0.04 g·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,造模各组均经气管滴注博莱霉素(0.005 g·kg⁻¹),随后将大鼠直立并行左右摇晃和旋转,以使药液在肺内均匀分布。假手术组滴入等体积生理盐水。造模24h后开始灌胃。依据文献^[17]确定灌胃剂量。当归补血汤组灌服当归补血汤水溶液(0.81 g·kg⁻¹,按成人体质

量60kg计算),泼尼松组灌服泼尼松水溶液(0.005 g·kg⁻¹),假手术组、模型组均灌服等体积生理盐水。每日1次,连续14d。

2.2 观察指标 灌胃结束后,以2%戊巴比妥钠(0.04 g·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,股动脉取血,室温静置30min,离心(3000 r·min⁻¹,15min,4℃),分离血清,-80℃冻存备检。肺组织以4℃预冷生理盐水洗涤,取左肺组织修成1.0cm×1.0cm×0.3cm组织块,4%多聚甲醛固定;右肺组织置于冻存管,液氮速冻后,-80℃储存备检。

2.2.1 HE染色和Masson染色观察肺组织病理变化和评分 肺组织固定24h后脱水,石蜡包埋,5 μ m厚度切片。将切片置于二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水(95%,90%,80%,70%),自来水冲洗,苏木素染色,1%盐酸-乙醇分化,水洗蓝化,伊红染色,梯度乙醇脱水;Masson染色以试剂盒说明书进行染色,二甲苯透明,中性树脂封片。观察组织病理改变,据Szapiel评分标准^[18]和Ashcroft评分标准^[19]分别进行肺炎程度和PF程度评分。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1,2。

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

PF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

2.2.2 血清MDA含量及SOD,CAT,GSH-Px活性测定 TBA法测定MDA含量,WST-1法测定SOD活性,可见光法测定CAT活性,比色法测定GSH-Px

活性,均按试剂盒说明书进行操作。

2.2.3 Real-time PCR 检测大鼠肺组织 PKD1, NF-κB, MnSOD mRNA 表达 称取肺组织 30 mg, 经液氮研磨并加入 RNA 裂解液 0.5 mL, 静置 5 min, 室温离心 (12 000 r·min⁻¹, 5 min), DNA 酶 I 消化, 加入无核酸酶水 100 μL, 室温离心 (12 000 r·min⁻¹, 1 min), 提取总 RNA, 一步法逆转录扩增, 按逆转录试剂盒说明书操作。以 GAPDH 作为内参基因。反应条件为 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 60 s, 循环 44 次。每次循环后, 检测信号。结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法进行分析。引物由上海普洛麦格生物产品有限公司合成, 见表 3。

表 3 PCR 引物序列

Table 3 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PKD1	上游 GTGGGTGCTGATGTTTCGTAG	183
	下游 AAGCACACCGAGGTGAGTAG	
NF-κB	上游 TGAGTCCCGCCCTTCTAAA	120
	下游 CCTGGATCACTTCAATGGCCT	
MnSOD	上游 CACCGAGGAGAAGTACCACG	149
	下游 TGGGTCTCCACCACCTTA	
GAPDH	上游 AGGAAATGATGACCTCCTGAACT	79
	下游 TGTTTTGTAAAGTACTTGGTGCCT	

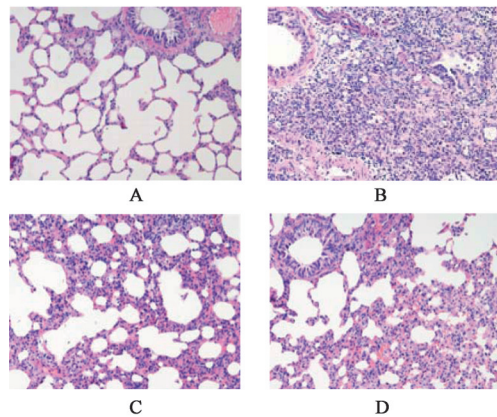
2.2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大鼠肺组织 PKD1, NF-κB, MnSOD 蛋白的表达 按照试剂盒说明书操作, 提取大鼠肺组织蛋白。样品蛋白以 BCA 法测定含量, 使每个样本蛋白含量为 30 μg, 之后将蛋白样品于沸水中煮 5 min 使其变性。根据 SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒说明书进行电泳, 每泳道加蛋白样品 20 μL。之后将蛋白转移 PVDF 膜, 以 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, 再以 PBST 洗涤 4 次。加一抗 (PKD1 稀释 1: 500, NF-κB 稀释 1: 500, MnSOD 稀释 1: 3 000, GAPDH 稀释 1: 5 000), 以 GAPDH 抗体作为内参, 4 °C 孵育, 过夜。PBST 洗涤 4 次后, 再以辣根过氧化物酶结合的二抗 (1: 5 000) 室温孵育 2 h, PBST 洗涤 4 次后, 用 ECL 显影液在室温下显色 5 min, 然后使用 Fusion FX5 Spectra 化学发光成像系统成像。以 Image-Pro Plus 6.0 软件测定目的蛋白灰度值, 目的蛋白相对含量=目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

2.3 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 软件进行统计, 计量资料数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较用单因素方差分析, 方差齐时组间比较采用 LSD

法, 方差不齐时用 Duunett's T3 法, 等级资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 PF 大鼠肺组织病理形态的影响 假手术组大鼠肺组织结构清晰, 未见炎性渗出和纤维组织增生。与假手术组比较, 模型组大鼠肺泡及肺泡间隔存在大量炎性渗出, Szapiel 评分明显升高 ($P < 0.05$), 肺泡间隔明显增宽增厚, 纤维组织成斑片状或条索状分布, Ashcroft 评分明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 当归补血汤组和泼尼松组炎性细胞浸润和纤维化程度轻, 其 Szapiel 评分和 Ashcroft 评分明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1, 2, 表 4。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 当归补血汤组; D. 泼尼松组 (图 2, 3 同)

图 1 当归补血汤对 PF 大鼠肺组织病理形态影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Danggui Buxuetang on pathological morphology of lung tissue in PF rats (HE, ×200)

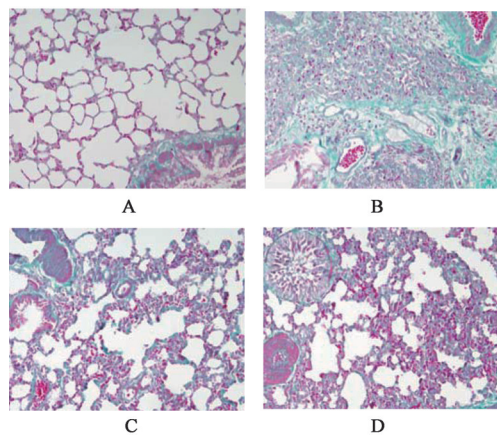


图 2 当归补血汤对 PF 大鼠肺组织胶原纤维影响 (Masson, ×200)

Fig. 2 Effect of Danggui Buxuetang on Massom staining of lung tissues in PF rats (Masson, ×200)

3.2 对 PF 大鼠血清 MDA 含量及 SOD, CAT, GSH-Px 活性的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), SOD, CAT, GSH-Px

表4 当归补血汤对PF大鼠肺组织Szapiel评分和Ashcroft评分影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Danggui Buxuetang on Szapiel score and Ashcroft score of pulmonary tissue in PF rats ($\bar{x} \pm s, n=8$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Szapiel评分	Ashcroft评分
假手术	-	0.50±0.53	0.88±0.84
模型	-	2.50±0.53 ¹⁾	6.88±0.83 ¹⁾
当归补血汤	0.81	1.88±0.35 ²⁾	5.00±1.07 ²⁾
泼尼松	0.005	1.88±0.35 ²⁾	5.75±1.04 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05。

表5 当归补血汤对PF大鼠血清中MDA含量和SOD,CAT,GSH-Px活性影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Danggui Buxuetang on MDA Content and SOD, CAT and GSH-Px activities in serum of PF rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·L ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹	CAT/U·L ⁻¹	MDA/nmol·L ⁻¹
假手术	-	237.89±7.32	1 110.24±229.66	16.67±2.04	7.22±1.74
模型	-	213.21±15.79 ¹⁾	669.23±147.18 ¹⁾	5.13±1.19 ¹⁾	11.81±1.58 ¹⁾
当归补血汤	0.81	229.51±10.28 ³⁾	953.98±314.42 ²⁾	8.91±1.09 ³⁾	7.59±0.74 ³⁾
泼尼松	0.005	236.54±9.49 ³⁾	942.53±327.90 ²⁾	8.63±1.87 ³⁾	7.90±1.02 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.01;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表6,7同)。

表6 当归补血汤对PF大鼠肺组织中PKD1,NF-κB,MnSOD mRNA表达影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 6 Effect of Danggui Buxuetang on mRNA expression on lung tissue PKD1, NF-κB and MnSOD in PF rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKD1	NF-κB	MnSOD
假手术	-	1.00±0.29	1.05±0.27	1.00±0.31
模型	-	1.90±0.48 ¹⁾	1.80±0.51 ¹⁾	1.74±0.55 ¹⁾
当归补血汤	0.81	1.45±0.42 ²⁾	1.25±0.34 ³⁾	1.16±0.45 ³⁾
泼尼松	0.005	1.44±0.47 ²⁾	1.23±0.42 ³⁾	1.14±0.27 ³⁾

3.4 对PF大鼠肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD蛋白表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,当归补血汤组和泼尼松组肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD蛋白表达明显降

活性显著降低(P<0.01);与模型组比较,当归补血汤组和泼尼松组大鼠血清MDA含量显著降低(P<0.01),SOD,CAT,GSH-Px活性明显升高(P<0.05,P<0.01)。见表5。

3.3 对PF大鼠肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD mRNA表达的影响 与假手术组比较,模型组肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD mRNA表达显著升高(P<0.01);与模型组比较,当归补血汤组和泼尼松组肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD mRNA表达明显降低(P<0.05,P<0.01)。见表6。

低(P<0.05,P<0.01)。见图3,表7。

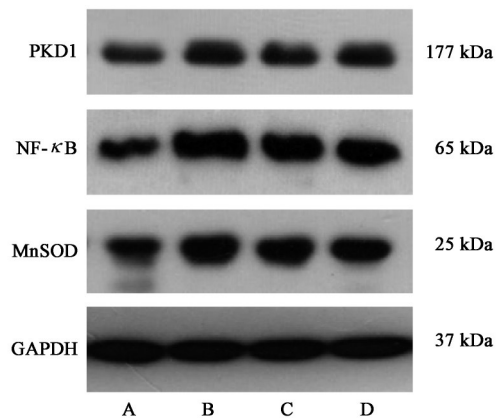


图3 大鼠肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of PKD1, NF-κB, MnSOD proteins expression in lung tissue of rats

表7 当归补血汤对PF大鼠肺组织PKD1,NF-κB,MnSOD蛋白表达影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 7 Effect of Danggui Buxuetang on protein expression on lung tissue of PKD1, NF-κB, MnSOD in PF rat ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKD1/GAPDH	NF-κB/GAPDH	MnSOD/GAPDH
假手术	-	0.12±0.02	0.16±0.03	0.23±0.03
模型	-	0.23±0.03 ¹⁾	0.59±0.04 ¹⁾	0.48±0.04 ¹⁾
当归补血汤	0.81	0.16±0.03 ²⁾	0.44±0.03 ³⁾	0.41±0.03 ³⁾
泼尼松	0.005	0.19±0.03 ²⁾	0.40±0.03 ³⁾	0.40±0.04 ³⁾

4 讨论

目前PF尚无特效治疗药物和手段,中医药在PF的治疗中发挥了重要作用^[20-22]。中医学无PF病

名,一般据其临床表现归属“肺痹”“肺痿”等病证范畴。中医学认为,气虚血瘀是PF的重要病机,其治当以益气活血^[23]。当归补血汤由黄芪、当归2味药

物组成。方中黄芪味甘微温,归肺、脾经,能补肺气之本虚;当归味甘辛性温,活血化痰,补血而不伤血,并具降逆平喘之功,《神农本草经》谓其“主咳逆上气也”。现代研究证实,当归补血汤具有良好的抗纤维化作用,联合泼尼松应用可有效改善患者的临床症状^[13,24]。本研究显示,PF模型大鼠出现肺泡结构紊乱,肺泡间隔增宽、融合,肺泡结构塌陷、破坏甚至消失,并呈现炎性细胞浸润和胶原沉积;经当归补血汤干预后,肺组织炎症和纤维化程度减轻,表明当归补血汤对PF具有治疗作用。

PF是一种破坏性、进行性肺间质疾病,氧化应激是该病的重要病理环节,主要表现为ROS的过度积累从而损害大分子细胞(如DNA,蛋白质和脂类),并导致严重的线粒体损伤,甚至细胞凋亡,最终使细胞氧化还原平衡状态被破坏^[4,25-26]。MDA是机体脂质过氧化的最终产物,可反映组织过氧化损伤程度。机体细胞内有多种活性酶可解毒线粒体ROS。SOD,CAT,GSH-Px为有效清除体内ROS的抗氧化剂。本研究结果显示,模型组MDA含量显著升高,SOD,CAT,GSH-Px活性降低,表明大鼠呈现氧化-抗氧化失衡是PF发生发展的重要病理机制。当归补血汤组MDA含量显著降低,SOD,CAT,GSH-Px活性升高,说明当归补血汤能有效清除氧自由基,降低脂质过氧化,减轻氧化应激对PF大鼠的影响。

最近研究表明,PKD是线粒体氧化应激的传感器,其介导的NF- κ B/MnSOD信号通路是已证实的线粒体-核抗氧化系统,具有保护细胞免受氧化应激介导的损伤和死亡的作用^[7,27]。当ROS的产生超过抗氧化防御时,可通过线粒体-核信号传导通路来监测线粒体超氧化物的产生;与此同时,该通路尚具有调节细胞的解毒作用^[28]。ROS异常增加导致PKD上Tyr463的酪氨酸磷酸化导致NF- κ B快速由细胞质转位至细胞核以激活特定靶基因MnSOD的表达^[29]。MnSOD仅存在于线粒体基质中,是保护组织和细胞抗氧化的关键酶,能催化超氧阴离子自由基的歧化反应,将之转化为H₂O₂和O₂,GSH-Px和CAT进一步将过氧化氢其转化为H₂O,从而发挥保护作用^[30]。

本研究结果显示,与假手术组比较,模型组PKD1,NF- κ B,MnSOD表达无论从转录水平还是从蛋白水平均显著升高。一般而言,大量ROS激活PKD1促使NF- κ B活化激活下游靶基因MnSOD,以减轻组织氧化损伤。该通路表达上调为线粒体适

应性反应,通过提高分解活性氧的能力以对机体起到保护作用。MnSOD表达增加能有效清除ROS,但产生大量H₂O₂,需要消耗大量的GSH-Px和CAT以将H₂O₂转化为H₂O,故PF大鼠GSH-Px和CAT活性显著下降。当归补血汤组PKD1/MnSOD通路相关蛋白和基因水平均有所下调,这一结果与通路的生物学意义存在矛盾,似乎不能解释该通路的抗氧化作用,但也由此说明氧化损伤的产生不完全是由抗氧化能力的高低体现,更多的是在于活性氧的产生和抗氧化能力的平衡状态。博莱霉素造模后活性氧大量的产生,氧化应激反应明显,氧化损伤程度加重,PKD1/NF- κ B/MnSOD抗氧化通路激活并表达明显;用药后氧化/抗氧化失衡状态得到纠正,故PKD1-MnSOD线粒体核抗氧化通路亦呈现下调。

综上所述,当归补血汤可通过提高机体的抗氧化能力、减弱氧化损伤,调节氧化/抗氧化失衡状态进而抑制PF的病理进程。其中,PKD1/NF- κ B/MnSOD信号通路是其抗氧化能力的具体体现。课题组将围绕该方药的具体调节机制进行深入研究。

[参考文献]

- [1] MA W H, LI M, MA H F, et al. Protective effects of GHK-Cu in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via anti-oxidative stress and anti-inflammation pathways [J]. *Life Sci*, 2019, doi: org/10.1016/j.lfs.2019.117139.
- [2] 唐磊,申萌萌,朱曼,等. 右归饮对肺纤维化大鼠的疗效评价及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(13):93-99.
- [3] CHU H, SHI Y, JIANG S, et al. Treatment effects of the traditional Chinese medicine Shenks in bleomycin-induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta/Smad3 signaling and oxidative stress [J]. *Sci Rep*, 2017, doi:10.1038/s41598-017-02293-z.
- [4] ANATHY V, LAHUE K G, CHAPMAN D G, et al. Reducing protein oxidation reverses lung fibrosis [J]. *Nat Med*, 2018, 24(8):1128-1135.
- [5] SHIMIZU Y, DOBASHI K, SANO T, et al. ROCK activation in lung of idiopathic pulmonary fibrosis with oxidative stress [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2014, 27(1):37-44.
- [6] COWELL C F, DOPPLER H, YAN I K, et al. Mitochondrial diacylglycerol initiates protein-kinase D1-mediated ROS signaling [J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(7):919-928.

- [7] GAN H, MCKENZIE R, HAO Q, et al. Protein kinase D is increased and activated in lung epithelial cells and macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101983.
- [8] 倪娜, 刘乃国, 高海洋, 等. 活性维生素D3对大鼠肺纤维化中蛋白激酶D1介导的抗氧化通路的影响[J]. 解剖学杂志, 2016, 39(5): 534-538.
- [9] PALIOGIANNIS P, FOIS A G, COLLU C, et al. Oxidative stress-linked biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review and Meta-analysis[J]. Biomark Med, 2018, 12(10): 1175-1184.
- [10] STORZ P. Mitochondrial ROS-radical detoxification, mediated by protein kinase D [J]. Trends Cell Biol, 2007, 17(1): 13-18.
- [11] 王杰鹏, 王少贤, 方倩, 等. 通肺饮及其拆方对博来霉素致肺纤维化大鼠TGF- β_1 /Smads信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(11): 5400-5403.
- [12] 靳如娜, 齐晓甜, 孙蓉, 等. 经典名方当归补血汤的药效物质基础和质控研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(16): 220-228.
- [13] 彭艳芳, 岳莹莹, 张莹雯, 等. 芪归方联合泼尼松治疗特发性肺纤维化的临床研究[J]. 世界中医药, 2018, 13(8): 1908-1912.
- [14] ZHAO P, ZHOU W, LI D, et al. Total glucosides of danggui buxue tang attenuate BLM-induced pulmonary fibrosis via regulating oxidative stress by inhibiting NOX4[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, doi: 10. 1155/2015/645814.
- [15] 金晓光, 代华平, 庞宝森, 等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的动态病理变化及其发生机制[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4): 708-714.
- [16] LIU T, DE LOS S F, PHAN S H. The bleomycin model of pulmonary fibrosis [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1627: 27-42.
- [17] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1937.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 刘晓, 于文涛, 靳贺超, 等. 补肾通络方对肺纤维化大鼠肺组织TGF- β_1 /Smads通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 96-102.
- [21] 潘怡, 王振兴, 郭静, 等. 补阳还五汤对肺纤维化小鼠中介导细胞自噬的mTOR蛋白的调控机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 23-31.
- [22] 王慧慧, 蒙艳丽, 杨志敏, 等. 地龙对肺纤维化小鼠肺组织中纤维化因子TGF- β_1 及 α -SMA表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5473-5478.
- [23] 史良恬, 王祺. 益气活血法治疗特发性肺纤维化的Meta分析[J]. 新中医, 2018, 50(2): 151-154.
- [24] 王琳娜, 陈常勇, 陈小永, 等. 当归补血汤对尿毒症大鼠心肌纤维化组织瞬时受体电位M7通道表达及胶原蛋白合成的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(30): 7-12.
- [25] QUINLAN C L, TREBERG J R, PEREVOSHCHIKOVA I V, et al. Native rates of superoxide production from multiple sites in isolated mitochondria measured using endogenous reporters [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 53(9): 1807-1817.
- [26] CADENAS E. Mitochondrial free radical production and cell signaling [J]. Mol Aspect Med, 2004, 25(1/2): 17-26.
- [27] STORZ P, DOPPLER H, TOKER A. Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19): 8520-8530.
- [28] STORZ P. Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases [J]. Sci Signal, 2006, 332: e3.
- [29] DÖPPLER H, STORZ P. Mitochondrial and oxidative stress-mediated activation of protein kinase D₁ and its importance in pancreatic cancer [J]. Front Oncol, 2017, doi: 10. 3389/fonc. 2017. 00041.
- [30] OKADO-MATSUMOTO A, FRIDOVICH I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria [J]. J Biol Chem, 2001, 276(42): 38388-38393.

[责任编辑 周冰冰]