

理肺化纤方对肺纤维化 CTGF 和 FN 信号 转导通路影响的研究

周语平, 郭宏亮*

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**用气管注射博莱霉素方法模拟肺纤维化模型,观察理肺化纤方对肺纤维化结缔组织生长因子(CTGF)信号转导通路和纤维连接蛋白(FN)信号转导通路的影响,探讨其防治肺纤维化的机制。**方法:**Wistar 大鼠 100 只,随机分为 5 组:正常对照组、模型组、醋酸泼尼松片组、理肺化纤方组、醋酸泼尼松片加理肺化纤方组,每组 20 只。采用气管内滴注博莱霉素造模法造模,各组均于造模后第 2 天开始 ig 给药,醋酸泼尼松片组大鼠给予醋酸泼尼松片 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig,理肺化纤方治疗组用理肺化纤方水煎液 $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,醋酸泼尼松片加理肺化纤方治疗组给醋酸泼尼松片和理肺化纤方水煎液 ig,正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig,各组动物分别于 7,28 d 随机处死 10 只,末次给药后 2 h 经腹主动脉放血法处死,取血,肺组织置于 4% 中性甲醛固定,肺组织病理切片 HE 染色和 Masson 染色观察肺泡炎和肺纤维化改变,血清羟脯氨酸(Hyp)含量测定法检测大鼠的肺纤维化程度;免疫组化方法观察 CTGF, FN 在肺组织中的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠肺泡炎及肺纤维化评分,血清 Hyp 含量,CTGF, FN 表达均明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组大鼠肺泡炎及肺纤维化评分,血清 Hyp, CTGF, FN 含量均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**理肺化纤方可能通过抑制大鼠肺组织 CTGF, FN 的表达,从而具有抗肺纤维化的作用。

[关键词] 理肺化纤方;肺纤维化;结缔组织生长因子;纤维连接蛋白;信号转导通路;羟脯氨酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0201-05

Influence of Lifei Huaxian Decoction on Connective Tissue Growth Factor and Fibronectin Signal Transduction Pathway in Pulmonary Fibrosis

ZHOU Yu-ping, GUO Hong-liang*

(Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Lifei Huaxian decoction (LFHX) on connective tissue growth factor (CTGF) and fibronectin (FN) signal transduction pathway in pulmonary fibrosis in rats. **Method:** Five randomized groups of Wistar rats were setup ($n = 20$ each). Then experimental pulmonary fibrosis induced by bleomycin injection through tracheal was carried in the rats on day 0; treatments were ig given on day 1 by as prednisone acetate tablets $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, LFHX $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, prednisone acetate-LFHX joint treatment, and normal saline in the control group and the model group. Ten animals in each group were randomly killed on day 7 and day 28 by bleeding through the aorta. The killing was carried out 2 h after last ig administration; blood sample was collected and lung tissue (right middle lobe) was kept in 4% neutral formaldehyde. Alveolitis and pulmonary fibrosis were evaluated with pathological slides stained by HE and Masson. Pulmonary fibrosis was measured by content of serum hydroxyproline (Hyp); CTGF, FN in lung tissue by immunohistochemistry. **Result:** Levels of

[收稿日期] 20110128(007)

[基金项目] 甘肃省卫生厅中医药科研项目(甘科鉴定[2009]043号)

[第一作者] 周语平, 教授, 硕士生导师. Tel:13909449815, E-mail: zypjwc@163.com

[通讯作者] * 郭宏亮, Tel:13359400683, E-mail:765912986@qq.com

alveolitis and pulmonary fibrosis, serum HYP, CTGF, FN of model group were significantly increased compared with those in control group ($P < 0.05$); while the above indicators of treatment groups were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** LFHX shows anti-pulmonary fibrosis action. It is likely related with CTGF, FN inhibition.

[**Key words**] Lifei Huaxian decoction; connective tissue growth factor; fibronectin; signal transduction pathway; pulmonary fibrosis; hydroxyproline

肺纤维化发病机制复杂,至今尚无特效治疗药物,已成为临床治疗的难点。研究肺纤维化发病机制和寻找行之有效治疗方法,是目前医学界迫切需要解决的问题。近年发现的结缔组织生长因子具有促进胞外基质合成、成纤维细胞有丝分裂等功能,与肺纤维化关系密切^[1]。纤维连接蛋白是存在于血浆和组织中的一种大分子量糖蛋白。由于它能连接细胞、胶原和其他结缔组织成分,并能通过趋化作用吸引细胞,刺激成纤维细胞的增殖,因而被认为是细胞-基质间相互作用的中介物^[2]。课题前期已经初步证实理肺化纤方具有抗纤维化作用,但作用机制不明,我们通过研究理肺化纤方对结缔组织生长因子信号转导通路和纤维连接蛋白信号转导通路的影响,并以结缔组织生长因子(CTGF),纤维连接蛋白(FN),血清羟脯氨酸(Hyp)做为该通路上的重要检测指标。另外选择 7,28 d 对各指标进行动态检测,目的在于研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,购于甘肃中医学院动物实验中心,合格证号 SCXK(甘)2004-0006。

1.2 药物 注射用盐酸博莱霉素 A5(BLM,批号 090903),系哈尔滨博莱制药有限公司产品,理肺化纤方(僵蚕 6 g,蝉蜕 3 g,姜黄 9 g,大黄 9 g,葶苈子 9 g,白芥子 6 g)制备:理肺化纤方加水 1 000 mL 浸泡 30 min 后煮沸,30 min 滤过取汁,再加水煮 30 min 滤过取汁,合并 2 次药液,水浴浓缩成含生药 1 g·mL⁻¹的药液,高压灭菌后备用。2% 戊巴比妥钠针(批号 090822)由甘肃中医学院实验室提供,醋酸泼尼松片(批号 090681),天津力生制药股份有限公司生产。Hyp 检测试剂盒,免疫组化染色试剂盒, DAB 显色试剂盒和 SABC 试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 石蜡切片机(型号 LEICA RM2135), LEICA DMLB 显微镜(德国),Olympus 全自动显微

摄象系统(日本),DA-2000 显微图像分析系统。

2 方法

2.1 模型的建立及给药 大鼠用随机数字表法分为 5 组:正常对照组、模型组、醋酸泼尼松片对照组、理肺化纤方治疗组、醋酸泼尼松片合理肺化纤方治疗组,每组 20 只。除正常组外,其余动物以 2% 的戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹ip 麻醉后,无菌操作暴露气管,模型组和治疗组气管内注入博莱霉素 A5(5 mg·kg⁻¹)水溶液 0.2 ~ 0.3 mL,对照组注入等量生理盐水,注药完毕后缝合,将大鼠直立旋转,尽量使药液在肺内均匀分布。造模第 2 日,按人与大鼠体表面积公式计算出大鼠给药剂量,醋酸泼尼松片 0.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹,理肺化纤方治疗组用理肺化纤方煎液 ig 3.78 g·kg⁻¹·d⁻¹;醋酸泼尼松片加理肺化纤方给药量为 0.9 mg·kg⁻¹·d⁻¹ + 3.78 g·kg⁻¹·d⁻¹,正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig。

2.2 标本采集 各组分别于第 7,28 天末次给药后 2 h 经腹主动脉放血法处死 10 只大鼠,用注射器取血,静置,以 3 500 r·min⁻¹离心,移取上层血清,供测 Hyp 用。取右肺中叶置于 4% 中性甲醛固定,制备石蜡切片供组织学检查及免疫组化。

2.3 病理组织学观察 将 HE 染色和 Masson 染色后的石蜡切片置于光镜下观察肺组织病理变化,根据 Szapiel 等的方法^[3]确定肺泡炎和肺纤维化的程度。HE 染色的病理切片将肺泡炎分为 4 级。无肺泡炎(-),轻度肺泡炎(+):肺泡隔因细胞浸润增宽,病变范围局限在全肺的 20% 以下;中度肺泡炎(++),病变范围占全肺的 20% ~ 50%;重度肺泡炎(+++):呈弥漫性分布,病变范围 > 50%。Masson 氏三色染色的切片将肺间质纤维化亦分为 4 级⁽³⁾。无纤维化(-);轻度肺纤维化(+):受累范围小于 20%;中度肺纤维化(++):受累范围占全肺的 20% ~ 50%,肺泡结构紊乱;重度肺纤维化(+++):受累范围 > 50%,肺泡融合,肺实质结构紊乱。

2.4 血清 Hyp 测定 按照 Hyp 试剂盒的操作要求

测定,按下列公式计算血清 Hyp 含量。

$$\text{Hyp 含量 (mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{标准管羟脯氨酸含量 (5mg} \cdot \text{L}^{-1}) \times (\text{水解液总体积} / \text{取样量})$$

2.5 免疫组化 按免疫组化试剂盒进行,以细胞胞质内出现棕褐色颗粒为阳性,每张切片在 400 倍视野下随机取 5 个视野,采用 DA-2000 显微图像分析系统进行分析。测定 CTGF, FN 在阳性细胞中阳性颗粒的吸光度值总和,然后转化成自然对数,计算出均值,作为该片的代表值。

2.6 统计学处理 各组数据采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 和 $P_{50} (P_{25}, P_{75})$ 表示。符合正态性和方差齐性多组计量资料采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验;不符合正态性和方差齐性的多组计量资料采用非参 Kruskal-Wallis H 检验。组间比较采用 Nemenyi 检验和 Dunnett's T 3 和两独立样本 t 检验进行,计数资料采用秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

表 1 各组大鼠肺泡炎程度 (HE 染色) 比较

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	第 7 天				n	第 28 天			
			-	+	++	+++		-	+	++	+++
正常	-	10	9	1	0	0 ¹⁾	10	10	0	0	0 ²⁾
模型	-	9	0	3	3	3	8	0	2	3	3
醋酸泼尼松	9 × 10 ⁻⁴	10	5	3	2	0 ¹⁾	10	3	4	3	0
理肺化纤方	3.78	10	5	2	2	1 ¹⁾	10	3	3	3	1 ¹⁾
醋酸泼尼松 + 理肺化纤方	3.78 + 9 × 10 ⁻⁴	10	5	5	0	0 ²⁾	10	2	6	2	0 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 各组大鼠肺纤维化程度 (Masson 染色) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	第 7 天				n	第 28 天			
			-	+	++	+++		-	+	++	+++
正常	-	10	10	0	0	0 ²⁾	10	10	0	0	0 ²⁾
模型	-	9	0	5	3	1	8	3	4	1	0
醋酸泼尼松片	9 × 10 ⁻⁴	10	5	3	2	0 ¹⁾	10	5	4	1	0 ¹⁾
理肺化纤方	3.78	10	3	5	2	0 ¹⁾	10	3	3	4	0 ¹⁾
醋酸泼尼松片 + 理肺化纤方	3.78 + 9 × 10 ⁻⁴	10	1	4	5	0 ¹⁾	10	5	5	0	0 ¹⁾

采用 Wilcoxon 秩和检验进行等级资料的组间差异性比较,7,28 d 时肺泡炎、肺纤维化分级结果,显示总体上差异具有统计学意义,模型组及治疗组明显高于正常组,模型组评分明显高于治疗组,有显著性差异,醋酸泼尼松片组与理肺化纤方组间无显著性差异。

3.2 血清 Hyp 含量 由表 3 可见,模型组第 7,28

3 结果

3.1 肺组织病理观察

3.1.1 肺组织肉眼观察 正常组双肺呈淡粉色,表面光滑弹性好。模型组肺颜色暗红,肺叶轮廓不清,质地变硬,肺体积略缩小,可见小片状、凸凹不平的苍白灶。治疗各组肺颜色略显暗,表面稍粗糙,触之弹性尚好,体积无明显缩小。

3.1.2 HE 染色镜下观察 正常组肺组织结构正常,肺泡间隔无明显充血及水肿,肺泡内未见明显炎性细胞。模型组肺泡间隔明显增宽伴重度纤维组织增生,肺泡腔变形,含有较多炎性细胞。治疗各组肺泡间隔增宽及炎性细胞浸润均较模型组明显减轻。见表 1。

3.1.3 Masson 染色镜下观察 正常组含有少量胶原纤维,为细胞外基质的主要组成部分。模型组第 7 天时肺泡间隔少量纤维增生,28 天时肺泡间质增厚增宽,纤维呈片状,条索状增生,纤维增生加重。治疗各组纤维化程度均较模型组轻。见表 2。

天的血清 Hyp 显著高于正常组 ($P < 0.05$);治疗组血清 Hyp 显著低于模型组 ($P < 0.05$);醋酸泼尼松片加理肺化纤方组显著高于理肺化纤方组和醋酸泼尼松片组 ($P < 0.05$)。

3.3 大鼠肺组织 CTGF 表达量 由表 4 可见,模型组 CTGF 显著高于正常组 ($P < 0.05$),醋酸泼尼松片组及理肺化纤方组的 CTGF 明显低于醋酸泼尼松

表 3 第 7,28 天各组大鼠血清 Hyp 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Hyp/mg·L ⁻¹			
		n	第 7 天	n	第 28 天
正常	-	10	0.095 ± 0.040 ¹⁾	10	0.068 ± 0.038 ¹⁾
模型	-	9	0.550 ± 0.035	8	0.679 ± 0.111
醋酸泼尼松	9 × 10 ⁻⁴	10	0.355 ± 0.074	10	0.159 ± 0.038 ¹⁾
理肺化纤方	3.78	10	0.227 ± 0.022 ^{1,2)}	10	0.181 ± 0.034 ¹⁾
醋酸泼尼松 + 理肺化纤方	3.78 + 9 × 10 ⁻⁴	10	0.454 ± 0.028 ^{1,2,3)}	10	0.300 ± 0.030 ^{1,2,3)}

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05;与醋酸泼尼松片组比较²⁾ P < 0.05;与理肺化纤方组比较³⁾ P < 0.05(表 4~5 同)。

表 4 大鼠肺组织 CTGF 表达量比较 P₅₀(P₂₅, P₇₅)

组别	剂量		A
	/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	
正常	-	20	0.334(0.325,0.376)
模型	-	17	0.485(0.478,0.491)
醋酸泼尼松	9 × 10 ⁻⁴	20	0.385(0.379,0.478) ¹⁾
理肺化纤方	3.78	20	0.370(0.363,0.466) ¹⁾
醋酸泼尼松 + 理肺化纤方	3.78 + 9 × 10 ⁻⁴	20	0.437(0.426,0.485) ^{1,2,3)}

片加理肺化纤方组(P < 0.05)。

3.4 大鼠肺组织 FN 表达量 由表 5 可见,模型组 FN 显著高于正常组,比较有显著性差异(P < 0.05),醋酸泼尼松片组及理肺化纤方组的 FN 明显低于醋酸泼尼松片加理肺化纤方组(P < 0.05)。

表 5 大鼠肺组织 FN 表达量比较 P₅₀(P₂₅, P₇₅)

组别	剂量		A
	/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	n	
正常	-	20	0.297(0.288,0.331)
模型	-	17	0.427(0.425,0.429)
醋酸泼尼松	9 × 10 ⁻⁴	20	0.323(0.292,0.334) ¹⁾
理肺化纤方	3.78	20	0.347(0.290,0.394) ¹⁾
醋酸泼尼松 + 理肺化纤方	3.78 + 9 × 10 ⁻⁴	20	0.367(0.355,0.389) ^{1,2,3)}

4 讨论

实验采用博莱霉素气管内注射制备肺纤维化大鼠模型。肺组织病理学观察发现模型组大鼠早期出现明显肺泡炎,后期出现明显纤维化表现,而治疗各组大鼠早期肺泡炎症和后期肺纤维化程度均明显轻于模型组大鼠。血清 Hyp 含量变化与病理结果相一致,结果表明肺纤维化模型制作成功。

肺纤维化是一种病因未明的肺间质性疾病,病理特点为弥漫性肺泡炎、成纤维细胞的病理性增生、基质胶原进行性积聚并取代正常的肺组织结构。研

究认为,多种细胞因子在肺局部损伤、炎症反应以及随后的组织修复和纤维化形成过程中起重要作用^[4-6]。CTGF 是由 349 个氨基酸组成、相对分子质量为 (36 ~ 38) × 10³ 的富含半胱氨酸的分泌肽^[7],属于即刻早期反应基因中的 CCN 家族成员。此后研究证实,CTGF 广泛存在于多种人类组织器官中,它具有促有丝分裂、趋化细胞、诱导黏附、促进细胞增生和 ECM 合成等作用,并参与机体组织的创伤修复过程,在生理状态时,机体组织细胞可有基础量 CTGF 分泌,病理状态下,CTGF 过度表达与某些增生性或纤维化疾病的发生密切相关。Lasky^[8] 等应用 Northern 杂交方法,观察了 CTGF mRNA 在 BLM 诱导的大鼠、小鼠肺纤维化模型中各个阶段的表达特点,首次证明了人、鼠肺成纤维细胞同样表达 CTGF,其表达规律与 TGF-β₁ 有着密切的联系,并与肺纤维化的程度密切相关。CTGF 作为 TGF-β₁ 的下游因子,可能是一个关键的调节因子。纤维连接蛋白^[9] 是一种大分子量糖蛋白,除在细胞-细胞,细胞-结缔组织基质的相互作用中起连接作用外,对成纤维细胞也有趋化作用,使之向肺内集中,还能使之向细胞外基质的胶原成分黏附、固定,刺激其增殖, FN 在其增殖中起“能动因子”作用,使静止的肺内成纤维细胞进入细胞循环的 G₁ 期,并与“进展因子”一起刺激成纤维细胞内 DNA 合成,促进细胞增殖。细胞外基质成分含量的高低,是反映肺间质纤维化严重程度的重要标志。本实验治疗 4 周后观察,发现理肺化纤方能抑制博莱霉素诱发的肺纤维化大鼠体内 CTGF, FN 的过度表达,并且发现理肺化纤方能减轻其肺组织纤维化程度,提示理肺化纤方对肺纤维化形成过程中大鼠的肺脏具有一定的保护作用,据此,我们认为理肺化纤方具有抗纤维化形成的作用,其作用机制可能与理肺化纤方抑制 CTGF, FN 在肺组织中的过度表达有关。

理肺化纤方由温病学的经典名方升降散的基础上加葶苈子、白芥子组成,升降散源自清代杨栗山的《伤寒瘟疫条辨》。升降散由僵蚕、蝉蜕、大黄、姜黄4味药组成。本方僵蚕化痰散结,蝉蜕散风除热,姜黄、大黄活血化瘀,清热除湿,葶苈子泻肺降气、祛痰平喘,白芥子温肺化痰,以上诸药合用,标本兼治,虚实共调,共奏“宣肃肺气,利湿化浊,活血通络”的功效。现代药理学研究,大黄中分离提纯的蒽醌衍生物大黄素能够抑制体外培养 LF 的增殖,并随着剂量增加而抑制效应增强。大黄素还可以提高 LF 细胞周期中 G₁ 期细胞的比例,降低 S 期和 G₂ 期细胞的比例^[10]。抑制 TGF- β 的表达来发挥其抗纤维化的作用^[11]。姜黄素可以抑制大鼠肺纤维化模型中 ECM 的过度沉积,从而使肺间质中纤维沉积减少^[12],并能调节肺纤维化大鼠体内自由基水平,减轻自由基对肺组织结构的氧化损伤^[13],发挥其抗纤维化的作用。

综上所述,CTGF, FN 在肺纤维化组织中出现高表达,提示 CTGF, FN 与肺纤维化的发生发展密切相关。理肺化纤方能够降低 CTGF, FN 表达,可能是该药阻抑肺纤维化发生发展的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] 杨华,祝筱姬. 特发性肺纤维化的药物治疗进展[J]. 现代诊断与治疗, 2004, 15(1):50.
- [2] 黄山英,宋良文. 效应细胞、细胞因子及相关基因调控在肺纤维化发生中的作用研究进展[J]. 国外医学:呼吸系统分册, 2005, 25(5):328.
- [3] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D. Bleomycin-induced

interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4):893.

- [4] Coker P K, Laurent G J. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance[J]. Eur Respir, 1998, 11(6):1218.
- [5] 郑金旭,徐丽娜,范丽娟,等. IL-31 在实验性小鼠肺纤维化过程中的动态表达及意义[J]. 山东医药, 2009, 49(13):26.
- [6] 郑金旭,张小燕,端礼荣,等. 转化生长因子- β_1 诱导 A549 细胞向间充质细胞转化的作用研究[J]. 江苏大学学报:医学版, 2008, 18(4):327.
- [7] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulation related to connective tissue growth factor[J]. FEBS Lett, 1993, 327(2):125.
- [8] Lasky J A, Ortiz L A, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis [J]. Am J Physiol, 1998, 275(2 Pt 1):365.
- [9] Bitterman P B, Wewers M D, Rennard S I, et al. Modulation of alveolar macrophage-derived fibroblast proliferation by alternative macrophage mediators[J]. J Clin Invest, 1986, 77:700.
- [10] 屈云,姚平,李廷谦. 大黄素对肺成纤维细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 四川大学学报:医学版, 2004, 35(1):74.
- [11] 钟富宽,葛敏,戴令娟. 大黄素对大鼠肺间质纤维化的治疗作用[J]. 江苏医药, 2007, 33(8):828.
- [12] 张曼颖,吴艳峰,潘春芝,等. 姜黄素的抗肺纤维化作用[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(14):1337.
- [13] 周刚,牛建昭. 姜黄素抗肺纤维化大鼠自由基损伤作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8):669.

[责任编辑 聂淑琴]