

理肺化纤方对肺纤维化大鼠的防治作用及对 TGF- β_1 /Smad3 信号转导通路的影响

周语平, 杨成林*

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:以经方升降散为基础,加味组成理肺化纤方,研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用以及对信号转导分子 Smad3(sekelsky mothers against dpp3, Smad3)介导的转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 信号转导通路的影响,并初步阐释其作用机制。**方法:**Wistar 大鼠 100 只,体重(200 ± 20)g,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 20 只。模型组与各治疗组实验大鼠气管内注入博莱霉素 A5 复制肺纤维化模型。正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig,理肺化纤方治疗组给药剂量为 4.41 g·kg⁻¹,强的松对照组给药剂量为 1.05 mg·kg⁻¹,强的松合理肺化纤方治疗组给等量的强的松和理肺化纤方水煎液 ig,实验 7,28 d 末次给药后 2 h,采用 SABC 法检测大鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3 的表达。观察大鼠一般情况及体重与肺系数的变化,用肺组织病理学方法观察苏木精-伊红及 Masson 染色切片的肺泡炎及纤维化程度,采用 SABC 法检测大鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3,其表达采用 BI-2000 医学图像分析系统分析。**结果:**检测结果提示造模成功,各治疗组的肺系数较模型组明显减少,肺泡炎及纤维化程度较模型组明显减轻,TGF- β_1 , Smad3 的表达减少,各治疗组与模型组相比均有疗效,以中药治疗组和中西药合并组疗效更为明显。**结论:**理肺化纤方对博莱霉素 A5 复制的大鼠肺纤维化有一定的治疗作用,其作用机制可能与减少 TGF- β_1 , Smad3 的过度表达有关。

[关键词] 理肺化纤方;肺纤维化;转化生长因子 β_1 , 信号转导分子 Smad3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0151-05

Preventive Effect of Lifei Huaxian Fang on Pulmonary Fibrosis in Rats and its Influence on Signal Transduction of TGF- β_1 /Smad3

ZHOU Yu-ping, YANG Cheng-lin*

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

[Abstract] **Objective:** To study preventive effect of Lifei Huaxian Fang, a prescription based on Shengjiang San, on pulmonary fibrosis. And to investigate its effect on signal transduction molecules, transformation of transforming growth factor β_1 (factor- β_1 , have TGF- β_1) mediated by Sekelsky mothers against mediated dpp3 (Smad3), and to clarify the preliminary mechanism responsible for action. **Method:** One hundred Wistar rats weighing (200 ± 20) g (half male and half female) were divided into 5 groups ($n = 20$ each) randomly. The rats in model group and the treatment group were injected by bleomycin A5 within the trachea to establish pulmonary fibrosis model. Lifei Huaxian Fang administration dosage in the treatment group was 4.41 g·kg⁻¹·d⁻¹. Prednisone administration dosage in the prednisone control group was 1.05 mg·kg⁻¹·d⁻¹. The rats in the prednisone combined with Lifei Huaxian Fang group were ig treated by the above dosages jointly. For normal control group and model group were ig given the same volume of normal saline. By the 7th day and the first 28th day SABC method was applied to detect lung tissue TGF- β_1 , Smad3 expression in the rats with the help of BI-2000 medical image analysis

[收稿日期] 20101201(010)

[基金项目] 甘肃省卫生厅中医药科研项目(甘科鉴字[2009]043号)

[通讯作者] * 杨成林, Tel:15117078625; E-mail:503282482@qq.com

system. The general situation, body weight and changes in pulmonary coefficient were observed for the rats. Alveolar inflammation and fibrosis degree in lung were evaluated by pathological slides with staining of hematoxylin-Masson. **Result:** The results suggest the success of mould establishment. The lung inflammation, fibrosis and lungs coefficient were significantly reduced in the treatment group compared with that in the model group. In each of the treated groups, the alveolar degree was lightening obviously, TGF- β_1 , Smad3 expression were reduced, compared with those in the model group. The effects in the group of combined prednisone with Lifei Huaxian Fang were more obvious. **Conclusion:** Lifei Huaxian Fang has certain treatment effect for pulmonary fibrosis in the model rats induced by bleomycin A5. The mechanisms may be related to inhibition of the excessive expression of TGF- β_1 , Smad3.

[**Key words**] pulmonary fibrosis; transforming growth factor β_1 ; signal transduction molecules Smad3; experimental study

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是多种病因不同的肺间质疾病发展到晚期的共同病理变化, 是呼吸衰竭的主要病理基础, 其发生发展是以肺泡及间质性肺炎, 肺泡上皮受损及胶原异常聚集为特征, 其病理特点是肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的反复破坏、修复、重建和过度沉积^[1]。

临床上对本病缺乏有效的治疗手段, 传统治疗包括糖皮质激素、免疫抑制剂或细胞毒药物和抗纤维化药物。本课题在研究历代文献和总结多年临床实践的基础上, 在经方升降散 (僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄) 的基础上加味组成理肺化纤方, 具有宣肃肺气, 利湿化浊, 活血通络的功效。为探讨其作用机制, 我们选择研究理肺化纤方对信号转导分子 Smad3 (sekelsky mothers against dpp3, Smad3) 介导的转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 信号转导通路的影响, 并以 TGF- β_1 , Smad3 作为检测指标研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 3~4 月龄 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 (200 ± 20) g, 由甘肃中医学院 SPF 实验中心提供, 合格证号 SCXK(甘)2004-0006, 动物实验设施使用证号 SYXK(甘)2004-0006。动物在 SPF 条件下, 普通饲料喂养, 自由饮水。每周称体重, 观察食量、尿量及精神状态。

1.2 药物 理肺化纤方由 (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) 组成, 每日 1 剂, 共 28 剂。所用药物由甘肃中医学院附属医院提供, 在甘肃中医学院实验中心进行中药提取, 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 1 000 mL 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, 高压灭菌后分装, 4 ℃ 冰箱保存备用。博莱霉素针 (哈尔滨博莱霉素制药有限, 批号 090903); 强的松片 (湛江仙琚制药股份有限公司, 批号 090681); 0.9% 生理盐水注射液 (兰州制药厂, 批号 0906201220); 戊巴比妥钠 (北京化学试剂公司, 批号 090822)。

1.3 试剂 TGF- β_1 , SABC 成套免疫组化试剂盒 (兔 IgG) (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 20100400)。

1.4 仪器 双目生物显微镜 (XS-212-202, 江南光学仪器厂), 电子天平 (BS224S, 德国奥多利斯科学仪器有限公司), 成都泰盟软件公司 BI-2000 数字化医学图像分析系统。

2 方法

2.1 造模分组 Wistar 大鼠 100 只, 适应性喂养 1 周, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 正常对照组 (A 组)、模型组 (B 组)、理肺化纤方治疗组 (C 组)、强的松对照组 (D 组)、强的松合理肺化纤方治疗组 (E 组), 每组 20 只。实验大鼠 3% 戊巴比妥钠 30 mg·kg⁻¹ ip 麻醉后, 无菌操作下行颈部正中切口, 暴露气管。模型组与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, 注药完毕后将大鼠直立旋转 30 s, 尽量使药液在肺内均匀分布, 然后缝合切口。

2.2 给药 造模第 2 天, 按人与大鼠体表面积公式计算出大鼠每天每千克体重的给药量^[2]。强的松对照组用强的松 1.05 mg·kg⁻¹ ig。理肺化纤方治疗组用理肺化纤方水煎液为 4.41 g·kg⁻¹ ig, 强的松合理肺化纤方治疗组, 给等容积的强的松和理肺化纤方

水煎液 ig,正常对照组和模型组给等容积的生理盐水 ig,各组分别连续给药 28 d。

2.3 标本采集 各组于造模前和实验结束时分别称量大鼠体重,各组分别于第 7,28 天末次给药后 2 h 经股动脉放血法处死 10 只大鼠,分离肺组织,用电子天平称量肺质量,右肺中叶经 4% 多聚甲醛固定,制备石蜡切片,进行苏木精-伊红(HE)染色、Masson 三色染色及免疫组化染色。

2.4 观察指标及检测

2.4.1 一般情况观察及大鼠体重(g)与肺系数比较 于造模前和实验第 7,28 天结束时分别称量大鼠体重,肺质量,计算肺系数。

$$\text{肺系数} = \text{肺质量}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

2.4.2 肺组织病理学观察 苏木精-伊红及 Masson 染色,在光学显微镜下依据 Szapitel^[3] 等的方法确定肺泡炎,按程度及范围不同分为 4 级,0 级:无肺泡炎;1 级:轻度肺泡炎,病变区域少于全肺的 20%,肺泡结构正常;2 级:中度肺泡炎受累面积占全肺的 20%~50%;3 级:弥漫性肺泡炎,病变范围 >50%。分别以 0,1,2,3 分表示;评价肺组织切片纤维化程度;利用 Masson 三色染色切片观察肺纤维化在切片中所占的比例,肺纤维化的程度以百分比表示。

2.4.3 免疫组化染色 采用 SABC 法检测大鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3,严格按照 TGF- β_1 , Smad3 试剂盒说明书上所提供的方法和步骤进行。肺组织中的 TGF- β_1 , Smad3 的表达采用 BI-2000 医学图像分析系

统(成都泰盟),每个标本随机取 5 个视野($\times 200$),通过计算机图像分析系统分别对视野中的各组结果进行平均吸光度(A)和平均灰度值的测定,定量表达视野中阳性染色强度。

2.5 统计处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,等级计数资料转换为计量资料进行统计,多组间差异的显著性分析采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 法检验,方差不齐时采用 Tamhane 法检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠体重与肺系数变化 见表 1。A 组体重增加明显,喜活动,体格健壮,毛发有光泽,食欲旺盛,至 28 d 全部存活;B 组体重增加缓慢,精神差,活动少,瘦弱,毛发无光泽,食少,实验 7 d 中死亡 1 只,实验 7~28 d 中死亡 2 只,体重与肺系数变化同 A 组比较均有显著性差异($P < 0.01$);各药物组实验 7 d 体重与肺系数变化同 A 组、B 组比较均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),各药物组之间无显著性差异;实验 28 d 时各药物组体重增加明显,实验 7~28 d 中各药物组各死亡 1 只,各组体重变化与肺系数同 B 组比较均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),各药物组之间体重变化无显著性差异,而肺系数变化比较,C 组、E 组与 D 组比较差异有显著性($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重与肺系数变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	开始体重 /g	给药 7 d		给药 28 d			
				n	体重/g	肺系数/mg·g ⁻¹	n	体重/g	肺系数/mg·g ⁻¹
正常对照	-	20	195.8 ± 6.65	10	234.7 ± 3.58	5.35 ± 0.43	10	284.1 ± 3.34	5.52 ± 0.38
模型	-	20	197.9 ± 8.41	9	214.5 ± 7.20 ¹⁾	7.99 ± 0.78 ¹⁾	8	239.5 ± 8.74 ¹⁾	8.01 ± 0.74 ¹⁾
理肺化纤方	4 410	20	196.6 ± 7.13	10	224.2 ± 4.56 ^{1,4)}	6.40 ± 0.40 ^{1,3)}	9	260.8 ± 7.26 ^{1,3)}	6.26 ± 0.36 ^{1,3,6)}
强的松对照	1.05	20	199.7 ± 7.18	10	225.3 ± 5.66 ^{1,4)}	6.78 ± 0.71 ^{1,4)}	9	253.9 ± 9.59 ^{1,4)}	6.83 ± 0.61 ^{1,3)}
中药合强的松	4 410 + 1.05	20	197.5 ± 7.41	10	228.4 ± 4.85 ^{2,3)}	6.29 ± 0.69 ^{2,3)}	9	270.8 ± 6.28 ^{2,3)}	6.03 ± 0.32 ^{2,3,5)}

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$;与强的松对照组比较⁵⁾ $P < 0.01$,⁶⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

3.2 组织病理学观察

3.2.1 肺组织形态学变化

3.2.1.1 外观检查 A 组两肺叶表面光滑,色泽粉红明润,饱满;B 组表面凹凸不平,为暗红色,肺叶成灰白色,表面有灰白色斑点,边缘有点状出血点;各药物组部分呈暗红色,部分肺叶表面光滑。

3.2.1.2 光镜检查 HE 染色:A 组正常支气管腔

内干净,皱壁完整,内膜完整,外周间质狭窄,肺泡壁薄;B 组管腔有脱落的黏膜上皮,局限性肌层增厚,支气管外壁明显增厚,大部分肺泡壁增厚,肺泡结构破坏,肺实质结构紊乱,局部炎细胞浸润。各药物治疗组(C, D, E 组)支气管黏膜完整,肺泡壁大多较薄,支气管壁轻度增厚或增厚不明显,大多数肺泡壁较薄或增厚不明显。

3.2.1.3 光镜检查 Masson 染色:A 组血管壁和支气管壁有少量的胶原纤维。肺泡和肺间质大部分没有胶原纤维组织,大部分为肌纤维组织。B 组可见大量的蓝绿色胶原沉积,支气管壁、血管壁、肺间质、肺泡壁大量胶原纤维明显增生,灶性纤维形成,肺纤维化程度多为中重度。各治疗组(C,D,E 组)血管壁、肺泡壁仅有少量的胶原纤维增生,纤维化程度较模型组明显减轻。

3.2.2 各组大鼠肺泡炎及肺纤维化程度比较 见

表 2 各组大鼠肺泡炎及肺纤维化程度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg/kg ⁻¹	给药 7 d			给药 28 d		
		n	肺泡炎评分	肺纤维化/%	n	肺泡炎评分	肺纤维化/%
正常对照	-	10	0.50 ± 0.52	4.55 ± 1.80	10	0.60 ± 0.51	4.60 ± 1.64
模型	-	9	2.55 ± 0.52 ¹⁾	46.88 ± 11.53 ¹⁾	8	2.62 ± 0.51 ¹⁾	53.87 ± 8.47 ¹⁾
理肺化纤方	4 410	10	1.60 ± 0.51 ^{1,3)}	26.40 ± 11.51 ^{1,3)}	9	1.33 ± 0.50 ^{1,3)}	22.55 ± 9.81 ^{1,3)}
强的松对照	1.05	10	1.80 ± 0.42 ^{1,3)}	35.60 ± 12.16 ^{1,4)}	9	1.55 ± 0.52 ^{2,3)}	28.88 ± 8.20 ^{1,3)}
中药合强的松	4 410 + 1.05	10	1.50 ± 0.52 ^{1,3)}	24.60 ± 13.71 ^{1,3,6)}	9	1.11 ± 0.78 ^{1,3)}	19.88 ± 6.09 ^{2,3,6)}

3.2.3 各组免疫组化结果 以细胞浆中出现黄色或棕黄色颗粒为阳性反应,其阳性染色强度与平均

表 2。实验 7,28 d,B 组和各治疗组肺泡炎及肺纤维化的程度较 A 组明显增加($P < 0.01$),说明肺纤维化模型复制成功;各治疗组肺泡炎评分及肺纤维化(%)较 B 组均有明显减少,比较均有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$);其中 C 组和 E 组降低最为明显($P < 0.01$);实验 7 d 和 28 d,各治疗组肺泡炎无显著性差异,肺纤维化(%)C 组与 D 组、E 组比较无显著性差异,而 E 组与 D 组比较有差异($P < 0.05$),提示 E 组抗纤维化疗效优于单纯激素组。

A 成正比,各组大鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3 表达结果见表 3,表 4。

表 3 各组大鼠肺组织 TGF- β_1 表达平均 A 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药 7 d		给药 28 d	
		n	A	n	A
正常对照	-	10	0.347 ± 0.015	10	0.376 ± 0.043
模型	-	9	0.641 ± 0.085 ¹⁾	8	0.706 ± 0.042 ¹⁾
理肺化纤方	4 410	10	0.468 ± 0.033 ^{1,3)}	9	0.435 ± 0.043 ^{1,3,6)}
强的松对照	1.05	10	0.487 ± 0.060 ^{1,3)}	9	0.480 ± 0.034 ^{1,3)}
中药合强的松	4 410 + 1.05	10	0.430 ± 0.038 ^{1,3)}	9	0.421 ± 0.069 ^{2,3,5)}

表 4 各组大鼠肺组织 Smad3 表达平均 A 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药 7 d		给药 28 d	
		n	A	n	A
正常对照	-	10	0.322 ± 0.011	10	0.359 ± 0.013
模型	-	9	0.633 ± 0.041 ¹⁾	8	0.675 ± 0.067 ¹⁾
理肺化纤方	4 410	10	0.443 ± 0.035 ^{1,3)}	9	0.410 ± 0.038 ^{2,3,6)}
强的松对照	1.05	10	0.451 ± 0.033 ^{1,3)}	9	0.461 ± 0.033 ^{2,3)}
中药合强的松	4 410 + 1.05	10	0.436 ± 0.035 ^{1,3)}	9	0.391 ± 0.025 ^{3,5)}

4 讨论

随着人们对于自身健康的日益重视,运用保健或无副作用的药物进行疾病的预防也日益受到重视。近年来各方面研究报道显示,中医辨病与辨证结合组方用药能提高疗效,且毒副作用小,中医治疗肺纤维化有一定疗效,尤其与激素合用,较单用激素

疗效好,且能减轻激素的副作用,提高患者自身免疫力。

目前,有关肺纤维化的发病机制尚不十分明确,但细胞因子网络表达在肺纤维化的发生发展及其修复中是不可缺少的,它们之间相互制约、相互调控,从而构成了复杂的肺内细胞因子网络,共同参与肺

纤维化的形成过程。细胞因子通过细胞内外的信号转导通路发挥生物学效应,导致肺间质纤维化的形成^[1]。TGF- β_1 在肺纤维化中发挥着重要作用,是研究最深入、作用最重要的细胞因子,已被大多数学者公认是肺纤维化形成与发展的关键性作用细胞因子,TGF- β_1 是最重要的致纤维化细胞因子,在器官纤维化发挥关键性作用,已成为器官纤维化治疗的靶标^[5]。TGF- β 在肺纤维化发生发展的多个环节起作用,主要通过刺激 ECM 产生细胞合成大量 ECM,通过抑制 ECM 降解酶(如 MMPs)的活性,增强这些降解酶的活性,从而减少 ECM 的降解^[1]。有人研究发现大鼠器官内注入博莱霉素 2 h 后,全肺 TGF- β 升高,第 7 天达高峰^[5],本实验选择 7,28 d 对各指标进行动态检测,造模第 2 天即 ig 给药,目的在于研究理肺化纤方对肺纤维化的防治作用。大鼠气管注入博莱霉素后 3 d,即有 TGF- β 的 I 型受体(T β R I) mRNA 表达,并在损伤修复期持续增加,提示 TGF- β 信号转导通路可能涉及肺纤维化的发生机制^[6]。TGF- β 受体拮抗剂能减轻博莱霉素所致的肺内胶原沉积^[7],Smad3 作为 TGF- β 信号转导通路的拮抗剂,能减轻博莱霉素所致大鼠肺纤维化程度,因此 Smad3 通路在调控 TGF- β 介导的 ECM 积聚过程中处于十分重要的地位,这些细胞因子之间的相互作用在肺纤维化的发生发展中起到了重要作用。

本课题选择温病经典方升降散加味组成药理肺化纤方,具有宣肃肺气、活血通络、利湿化浊的功效。通过本实验可以看出,B 组造模 7 d 的 TGF- β_1 , Smad3 的表达明显增加,造模 28 d,肺纤维化大鼠的 TGF- β_1 , Smad3 的表达进一步增加。而经过药物干预的各组,实验 7 d,28 d 均较模型组 TGF- β_1 , Smad3 的表达明显减少,其中实验 28 d 时 E 组 Smad3 的表达已接近正常组,与正常组无显著性差异;实验 7 d 和 28 d,各治疗组肺泡炎无显著性差异,但较模型组有明显减少,提示各治疗组治疗均有效;实验 28 d

肺纤维化百分比 C 组同 D 组比较无显著性差异,而 E 组与 D 组比较有差异($P < 0.01$),E 组 TGF- β_1 , Smad3 的表达减少均较 D 组有显著性差异($P < 0.01$),提示中药合强的松组抗纤维化疗效优于强的松对照组。C 组实验 28 d 时的肺系数与 TGF- β_1 , Smad3 表达虽未达到正常组的水平,但 C 组与 E 组差异并不明显,较 D 组比较有差异($P < 0.05$),提示中药组抗纤维化的疗效稍优于强的松对照组。

综上所述,理肺化纤方对博莱霉素引起的肺纤维化大鼠有一定的预防和治疗作用,其作用机制可能与减少和下调 TGF- β_1 , Smad3 的过度表达有关。

[参考文献]

- [1] 李才. 器官纤维化基础与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:188.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:203.
- [3] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin2induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120 (4):893.
- [4] Border W A, Noble N A. TGF- β_1 in kidney fibrosis; a target for gene therapy [J]. Kidney Int, 1997, 51 (10):1388.
- [5] 曾庆富,赵勇,钱仲棗,等. 肺泡 II 型上皮细胞 TGF- β_1 和 PDGF 基因表达及其在肺纤维化中的意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2001,17(1):53.
- [6] Zhao Y, Shah D U. Expression of transforming growth factor- β type I and II receptors is altered in rat lungs undergoing bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Exp Mol Pathol,2000,69(2):67.
- [7] Dennis M. Neutralization of transforming growth factor β_1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis[J]. Immunology,1994,82(4):584.

[责任编辑 聂淑琴]