

复方苦参注射液对放射性肺损伤的肺保护作用

王文龙^{1,2}, 卢宏达³, 林胜友², 雷章³, 余涛³, 吴洪斌³, 孔庆志^{3*}

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065;

2. 杭州市中医院, 杭州 310007; 3. 武汉市中心医院, 武汉 430014)

【摘要】 目的: 观察复方苦参注射液对放射性肺损伤模型小鼠转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad3 蛋白 (Smad3), 糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β), β -连环蛋白 (β -catenin) 表达的影响, 并探讨其作用机制。**方法:** 使用美国 XStrahl 小动物精准放疗辐照研究平台 (SARRP), 实施单次 20 Gy 双侧肺野照射建立放射性肺损伤小鼠模型, 将 32 只小鼠随机分为正常组、模型组、复方苦参注射液组 ($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 地塞米松注射液组 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常组和模型组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液, 连续腹腔注射 4 周。苏木素-伊红 (HE) 染色观察肺组织病理; 免疫组化 (IHC) 检测小鼠肺组织 E-钙粘蛋白 (E-cadheren), 波形蛋白 (Vimentin) 表达; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 的表达; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 通道蛋白的表达。**结果:** 与正常组比较, 模型组小鼠肺系数显著升高 ($P < 0.01$), 且小鼠肺脏出现炎症细胞浸润, 肺间质水肿、充血, 肺泡结构破坏, 部分肺泡萎缩。与模型组比较, 复方苦参注射液组小鼠肺脏炎症细胞浸润及肺间质病变减轻, 小鼠肺组织 E-cadheren 的水平显著升高 ($P < 0.01$), 小鼠肺组织 Vimentin 的水平显著降低 ($P < 0.01$), TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与地塞米松注射液组比较, 复方苦参注射液小鼠肺部病理形态学改变相仿, E-cadheren, Vimentin, TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 表达水平未见明显差异。**结论:** 复方苦参注射液能够改善放射性肺损伤模型小鼠肺纤维化, 其机制可能与抑制上皮间质转化 (EMT) 相关的 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 及通道蛋白表达, 进而促进 E-cadheren 表达、抑制 Vimentin 蛋白表达, 最终抑制 EMT 的发生有关。

【关键词】 放射性肺损伤; 复方苦参注射液; Smad3 蛋白; 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1); 糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β); β -连环蛋白 (β -catenin)

【中图分类号】 R2-0; R22; R285.5; R289 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2020)07-0042-08

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20200602

【网络出版地址】 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191206.1041.002.html>

【网络出版时间】 2019-12-06 15:11

Lung Protective Mechanism of Compound Kushen Injection on Radiation-induced Pulmonary Injury

WANG Wen-long^{1,2}, LU Hong-da³, LIN Sheng-you², LEI Zhang³, YU Tao³,
WU Hong-bin³, KONG Qing-zhi^{3*}

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China;

3. Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, China)

【Abstract】 Objective: To observe the effect of compound Kushen injection on the expressions of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), drosophila mothers against decapentaplegic protein 3 (Smad3), glycogen

【收稿日期】 20190808(015)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81372931, 81704023); 浙江省卫生计生委医药卫生科研面上项目(2018KY615); 浙江省中医药管理局中医药科技计划项目(2018ZB091); 杭州市卫生科技计划项目(2017A59)

【第一作者】 王文龙, 博士, 副主任医师, 从事中西医结合防治肿瘤的临床及基础研究, E-mail: hero365888@163.com

【通信作者】 *孔庆志, 教授, 博士生导师, 主任医师, 从事中西医结合防治肿瘤的临床及基础研究, E-mail: kqzswz@hotmail.com

synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and β -catenin mice models with radiation-induced pulmonary injury (RIPI), in order to explore its possible mechanism of action. **Method:** On XStrahl precision radiation research platform for small animals (SARRP), a single 20 Gy bilateral lung field irradiation was performed to establish a mice model of RIPI. Thirty-two mice were randomly divided into normal control group, model group, compound Kushen injection group and dexamethasone injection group. The normal control group and the model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution and injected intraperitoneally for 4 weeks. The pathology of lung tissue tissues was observed by using hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemical (IHC) was used to detect the expressions of E-cadheren and Vimentin proteins in mice lung tissues. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin. Western blot was used to detect the protein expressions of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin. **Result:** Compared with the normal group, the pulmonary coefficient of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$). Inflammatory cell infiltration, pulmonary interstitial edema, congestion, destruction of alveolar structure and partial alveolar atrophy were observed in the lung tissues of the model group. Compared with the model group, in the compound Kushen injection group, the levels of infiltration of lung inflammatory cells and pulmonary interstitial lesions in mice, the expression of Vimentin in lung tissues ($P < 0.01$), and the expressions of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin were significantly decreased ($P < 0.01$), whereas the expression of E-cadheren was significantly increased ($P < 0.01$). However, compared with the dexamethasone injection group, in the compound Kushen injection group, the pathological changes of lung tissues were similar, and the expression levels of E-cadheren, Vimentin, TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin were not significantly different. **Conclusion:** Compound Kushen injection can alleviate pulmonary fibrosis of lung in the treatment of RIPI, and the mechanism may be associated with inhibiting the mRNA and protein expressions of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin related to epithelial-mesenchymal transition (EMT), promoting the expression of E-cadheren, and inhibiting the expression of Vimentin, so as to inhibit the occurrence of EMT.

[Key words] radiation-induced pulmonary injury (RIPI); compound Kushen injection; drosophila mothers against decapentaplegic protein 3 (Smad3); transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β); β -catenin (β -catenin)

放射性肺损伤(RIPI)是胸部肿瘤放疗最常见的并发症之一,包括早期的放射性肺炎及晚期的放射性肺纤维化两个阶段^[1-3]。RIPI 发病率较高,而且一旦发生纤维化后是不可逆的,已经成为严重影响肿瘤控制和患者生活质量的一个关键问题^[4-5]。尽管国内外学者作出了巨大的努力,其发病机制尚未明确,目前尚无公认的最佳治疗方法^[5],因此正确认识 RIPI 并寻求新的有效防治方法已成为肿瘤放射领域亟待解决的难题之一。

近期有多项研究表明,复方苦参注射液对放射性肺损伤有较好防护作用^[6-9]。Meta 分析表明复方苦参注射液治疗 RIPI 存在其独有的优势,可有效防治放疗引起的放射性肺损伤,增强患者的免疫力并改善患者的生活质量^[7]。刘方雷等^[10]报导复方苦参注射液能够全面减少急性放射性肺炎发生率以及肺受损程度,增强机体耐受性,并改善患者的临床症状及生活质量,有效预防 RIPI。对于临床放

射性肺损伤的治疗,西医专家共识推荐使用糖皮质激素,其中地塞米松注射液具有起效快,抗炎及抗肺纤维化效力强,在症状较重或病情较急时推荐静脉使用地塞米松^[11],因此本实验西药组选用地塞米松注射液。本课题组前期前期预实验研究发现,放射后小鼠发生肺损伤与肺纤维化,复方苦参注射液通过抑制炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-4(IL-4)等释放,并抑制上皮间质转化,防治放射性肺损伤疗效确切。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smads 被认为是 RIPI 的“开关”性分子,并被作为治疗的靶分子^[12],可调节细胞外基质的生成、调控炎症反应等。Smad 信号通路是 TGF- β 主要且特异性的关键信号转导通路。Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号转导通路是诱导肿瘤上皮间质转化(EMT)现象的重要通路^[13],当 Wnt 信号被激活,糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)活性受到抑制, β -catenin 在胞内大量累积,就可转位进入细胞核内并与 T 细胞因子

(TCF)/淋巴增强结合因子(LEF)形成转录复合物,来启动并调控 Wnt 靶基因表达,直接控制着与 EMT 相关基因的表达,促进细胞黏附的丧失,可导致细胞骨架丧失,造成 EMT。

已有实验和临床研究表明,中医药对放疗导致的局部损伤也具有较好的防治作用,因此基于放射性肺损伤热毒壅肺的主要病机选用复方苦参注射液干预 RIPI 模型小鼠,通过不同检测方面检测小鼠肺组织病理变化及 E-钙黏蛋白(E-cadheren),波形蛋白(Vimentin)和 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 表达,从组织及分子生物学水平探讨复方苦参注射液防治 RIPI 的有效作用靶点,为中医药防治 RIPI 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 雄性 SPF 级 C57bl/6 小鼠 32 只,由浙江中医药大学动物实验研究中心提供,体质量(25 \pm 5)g,许可证号 SYXK(浙)2013-0184。饲养于浙江中医药大学实验动物中心。本实验通过浙江中医药大学实验动物管理和伦理委员会批准,编号 ZSLL-2018-015。

1.2 药物与试剂 复方苦参注射液(山西振东制药股份有限公司,批准文号国药准字 Z14021231,批号 20171121);注射用地塞米松磷酸钠(沈阳光大制药有限公司,批准文号国药准字 H20052187,批号 20180314);RNA 提取试剂盒(武汉谷歌生物技术有限公司,批号 1800714);RT 反转录试剂盒, RNA 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司,货号分别为 RR047A, RR820A);trizol 试剂(美国 Thermo 公司,批号 15596026);苏木素,伊红(南昌雨露实验器材有限公司,批号分别为 20180318, 20181205);免疫组化 Vimentin 和 E-cadheren 一抗,蛋白免疫印迹法(Western blot) TGF- β_1 , Smad3, β -catenin, GSK-3 β , 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 5741S, 3195S, 9523S, 8480S, 12456S, 5174S, 5174S);超敏酶标山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 聚合物,辣根过氧化酶标记羊抗鼠 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号分别为 PV-6002, ZB-2305);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 PR2547)。

1.3 仪器 CFX96 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);MDF 86V588D 型超低温冰箱(美国 Thermo Scientific 公司);STP 120 型组织切片机(美国 Microm 公司);DMI3000B 型荧光倒置显微镜

(德国莱卡公司);ST16R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司);SARRP 型小动物精准放疗辐照研究平台(美国 XStrahl 公司);DYCZ-25D 型电泳仪, DYCZ-40G 型垂直电泳转膜仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模^[14-16]与给药 将 32 只小鼠随机分为正常组、模型组、复方苦参注射液组、地塞米松注射液组,每组 8 只,通过使用美国 XStrahl 小动物精准放疗辐照研究平台(SARRP),实施单次 20 Gy 双侧肺野照射建立 C57bl/6 小鼠放射性肺损伤模型,经组织病理学鉴定模型制备成功。正常组与模型组给予 0.9% 氯化钠溶液,药物用量计算以成人每日临床剂量为参考,根据小鼠的等效剂量折算系数,换算为小鼠每日给药剂量。复方苦参注射液组按 5 g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,地塞米松注射液组予 0.5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,均每日 1 次腹腔注射给药,连续给药 4 周,分别于造模后的第 2, 4 周 2 个时间点戊巴比妥钠麻醉后分别处死小鼠,其中 4 周每组取材 6 只小鼠,2 周正常组及模型组各取材 2 只小鼠,分别予以留取血及肺组织标本,肺组织置于液氮或超低温冰箱保存。

2.2 观测指标

2.2.1 一般情况和肺系数检测 观察小鼠精神状态、皮毛颜色、光泽、脱毛、活动量、饮水进食、呼吸频率等情况。测小鼠体质量后处死,迅速取完整肺脏,滤纸吸干后称质量,计算出肺系数[肺系数 = 肺湿重(mg)/小鼠体质量(g) \times 100%]。

2.2.2 苏木素-伊红(HE)染色观察肺脏病理形态学变化 将小鼠肺肝组织浸泡 4% 多聚甲醛固定 48 h,切成小薄片,放入样本盒中,依次经过乙醇脱水、组织透明、浸蜡、石蜡包埋后在切成 5 μ m 石蜡切片,烤片机上烤片,然后依次予以二甲苯脱蜡、乙醇脱水,温水中冲洗,苏木素染液染色 10 ~ 15 min,自来水冲洗 2 min,0.5% 盐酸-乙醇溶液分化 1 ~ 2 s,自来水冲洗 3 ~ 5 min,氨水返蓝,自来水冲洗 3 min,伊红染色 3 ~ 5 min,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察肺脏病理形态学变化,表现为肺间质及肺毛细胞管扩张充血、水肿,部分肺泡腔积液并有大量红细胞聚积,大量炎症细胞浸润,肺泡结构破坏,部分肺泡壁断裂,肺泡结构塌陷紊乱、融合,部分肺泡萎缩,并有轻微肺泡间质纤维化等表现,提示放射性肺损伤造模成功。

2.2.3 免疫组化(IHC)检测小鼠肺组织 E-cadheren, Vimentin 蛋白的表达 小鼠的肺组织切

片,常规脱蜡至水,烤片 2 h,二甲苯脱蜡,乙醇脱水,温水冲洗,高压热修复,自然冷却,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,3% H₂O₂ 溶液阻断内源性过氧化物酶,室温下孵育 10 min,冷水冲洗后 PBS 中清洗,5% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 ~ 15 min,弃去血清,滴加 1:300 倍数稀释后一抗后置于湿盒中 4 ℃ 孵育过夜,室温下进行复温后 37 ℃ 孵育 60 min,温水及 PBS 冲洗,滴加 1:1 000 倍数稀释超敏酶标山羊抗小鼠 IgG 聚合物(即二抗),37 ℃ 生化培养箱中孵育 30 min,PBS 浸洗,滴加 DAB 染色液染色 1 ~ 5 min,冷水冲洗,苏木素复染 10 min,冷水冲洗后盐酸乙醇溶液分化 1 ~ 2 s,自来水冲洗,氨水返蓝,乙醇脱水,中性树胶封片,置于显微镜下观察并拍照,光学显微镜下观察结果,采用 Image Pro Plus 软件测取各组积分吸光度,最后用平均积分吸光度表示 E-cadheren, Vimentin 表达强弱。

2.2.4 Real-time PCR 检测小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 的表达 称取小鼠肺组织 50 mg 以提取 RNA, trizol 法提取各组总 RNA, 检测 RNA 的浓度和纯度,用逆转录试剂盒合成 cDNA,按照设计体系及条件进行 Real-time PCR,并以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参,Real time PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 3 min;40 个循环(95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s);熔解曲线:从 55 ℃ 开始,每 30 s 升高 0.5 ℃,直到 95 ℃,循环 1 次。采用公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算结果。TGF- β_1 引物上游 5'-CCACCTGCAA GACCATCGAC-3',下游 5'-CTGGCGAGCCTTAGTTT GGAC-3',片段长度 91 bp; Smad3 引物上游 5'-AGGGGCTCCCTCACGTTATC-3',下游 5'-CATGGCC CGTCACGTTATC-3',片段长度 77 bp; GSK-3 β 引物上游 5'-ATGGCAGCAAGGTAACCACAG-3',下游 5'-TCTCGGTTCTTAAATCGTTGTC-3',片段长度 193 bp; β -catenin 引物上游 5'-GGCCATTGTAGAACTGGTG-3',下游 5'-CTGCTTAGTCGCTGCATCTG-3',片段长度 143 bp; β -actin 引物上游 5'-CATCCGTAA AGACCTCTATGCCAAC-3',下游 5'-ATGGAGCCAC CGATCCACA-3',片段长度 90 bp。

2.2.5 Western blot 检测小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达 采用蛋白裂解液提取小鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白,使用 BCA 法定量测定蛋白浓度,先配制分离胶和浓缩胶,然后电泳后使用湿转法将蛋白电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,加入特异的 1:1 000 倍数稀释后一抗摇匀并孵育

过夜,次日取出并清洗后加入对应的 1:1 万倍数稀释后二抗孵育 1 h,显影,定影,再采用 Quantity One 软件分析蛋白条带灰度值。

2.3 统计学方法 使用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况观察 正常组小鼠皮毛有光泽、活动量大、饮水进食正常;模型组小鼠精神变差,皮毛暗淡无光泽,甚至皮毛倒翻及脱毛现象,呼吸频率加快,活动量减少,体质量逐渐减轻。实验中为验证造模是否成功,处死小鼠 2 只,意外死亡 1 只。

3.2 对 RIPI 小鼠肺系数的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺系数显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,复方苦参注射液及地塞米松注射液组小鼠肺系数显著降低($P < 0.01$);与复方苦参注射液组比较,地塞米松注射液组小鼠肺系数无显著性差异。见表 1。

表 1 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of compound Kushen injection on lung coefficient of mice with RIPI($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 肺系数 |
|---------|-----------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 4.615 ± 0.031 |
| 模型 | - | 6.815 ± 0.126 ¹⁾ |
| 复方苦参注射液 | 5 | 5.111 ± 0.085 ²⁾ |
| 地塞米松注射液 | 5 × 10 ⁻⁴ | 5.107 ± 0.088 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.3 对 RIPI 小鼠肺脏病理形态学的影响 正常组小鼠肺组织的肺泡壁较薄,肺泡结构清晰,未见明显病理改变;模型组可见炎症细胞浸润,肺间质水肿、充血,肺泡结构破坏,部分肺泡萎缩;复方苦参注射液组及地塞米松注射液组肺部渗出性病变较轻,肺间质水肿、充血及炎性细胞浸润程度等均较模型组明显减轻;地塞米松注射液组各时间点与复方苦参注射液高剂量组无明显差别。见图 1。

3.4 对 RIPI 小鼠肺组织 E-cadheren, Vimentin 的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织 E-cadheren 的表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,复方苦参注射液组及地塞米松注射液组,小鼠肺组织 E-cadheren 表达水平显著降低($P < 0.01$);与地塞米松注射液组比较,复方苦参注射液组未见明显差别。与正常组比较,模型组小鼠肺组织 Vimentin 的表达水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,复方

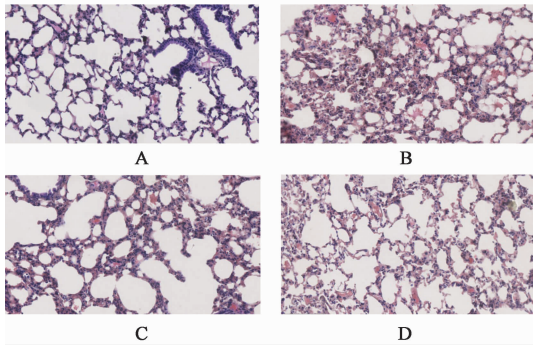


图 1 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺脏病理形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of compound Kushen injection on lung pathomorphology of mice with RIPI (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of compound Kushen injection on lung pathomorphology of mice with RIPI (HE, ×200)

苦参注射液组及地塞米松注射液组,小鼠肺组织 Vimentin 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与地塞米松注射液组比较,复方苦参注射液组未见明显差别。见图 2,3,表 2。

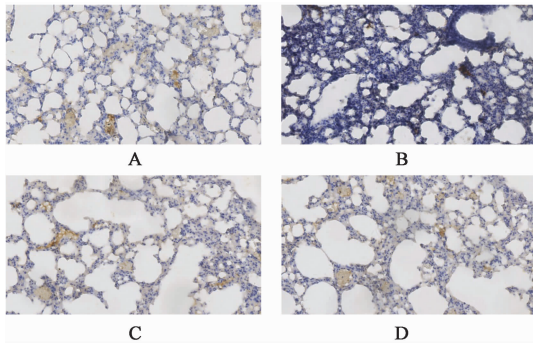


图 2 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺组织中 E-cadherin 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of compound Kushen injection on lung E-cadherin of mice with RIPI (IHC, ×200)

表 3 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of compound Kushen injection on expression of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin mRNA in lung tissues of RIPI mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | TGF- β_1 | Smad3 | GSK-3 β | β -catenin |
|---------|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 0.61 ± 0.12 | 0.53 ± 0.12 | 0.25 ± 0.07 | 0.18 ± 0.04 |
| 模型 | - | 1.11 ± 0.09 ¹⁾ | 1.09 ± 0.20 ¹⁾ | 0.59 ± 0.05 ¹⁾ | 0.45 ± 0.05 ¹⁾ |
| 复方苦参注射液 | 5 | 0.81 ± 0.03 ²⁾ | 0.79 ± 0.11 ²⁾ | 0.50 ± 0.04 ²⁾ | 0.28 ± 0.04 ²⁾ |
| 地塞米松注射液 | 5 × 10 ⁻⁴ | 0.80 ± 0.06 ²⁾ | 0.78 ± 0.10 ²⁾ | 0.49 ± 0.10 ²⁾ | 0.27 ± 0.05 ²⁾ |

3.6 对 RIPI 小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型

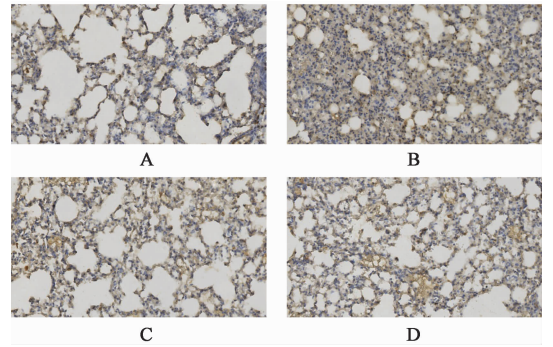


图 3 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺组织中 Vimentin 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of compound Kushen injection on lung Vimentin of mice with RIPI (IHC, ×200)

表 2 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺组织中 E-cadherin, Vimentin 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of compound Kushen injection on expression of E-cadherin, Vimentin in lung tissues of RIPI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | E-cadherin | Vimentin |
|---------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 0.090 ± 0.001 | 0.062 ± 0.001 |
| 模型 | - | 0.049 ± 0.001 ¹⁾ | 0.129 ± 0.005 ¹⁾ |
| 复方苦参注射液 | 5 | 0.073 ± 0.001 ²⁾ | 0.085 ± 0.001 ²⁾ |
| 地塞米松注射液 | 5 × 10 ⁻⁴ | 0.074 ± 0.001 ²⁾ | 0.084 ± 0.001 ²⁾ |

3.5 对 RIPI 小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 的表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,复方苦参注射液组及地塞米松注射液组,小鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与地塞米松注射液组比较,复方苦参注射液组未见明显差别。见表 3。

组小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,复

方苦参注射液组及地塞米松注射液组,小鼠肺组织 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达水平显

著降低 ($P < 0.01$);与地塞米松注射液组比较,复方苦参注射液组未见明显差别。见表 4,图 4。

表 4 复方苦参注射液对 RIPI 小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of compound Kushen injection on expression of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin protein in lung tissues of RIPI mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | TGF- β_1 /GAPDH | Smad3/GAPDH | GSK-3 β /GAPDH | β -catenin/GAPDH |
|---------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 0.44 \pm 0.08 | 0.38 \pm 0.04 | 0.33 \pm 0.05 | 0.30 \pm 0.05 |
| 模型 | - | 0.82 \pm 0.05 ¹⁾ | 0.63 \pm 0.06 ¹⁾ | 0.59 \pm 0.06 ¹⁾ | 0.55 \pm 0.04 ¹⁾ |
| 复方苦参注射液 | 5 | 0.61 \pm 0.06 ²⁾ | 0.46 \pm 0.05 ²⁾ | 0.35 \pm 0.07 ²⁾ | 0.37 \pm 0.07 ²⁾ |
| 地塞米松注射液 | 5×10^{-4} | 0.60 \pm 0.08 ²⁾ | 0.44 \pm 0.03 ²⁾ | 0.34 \pm 0.04 ²⁾ | 0.35 \pm 0.03 ²⁾ |

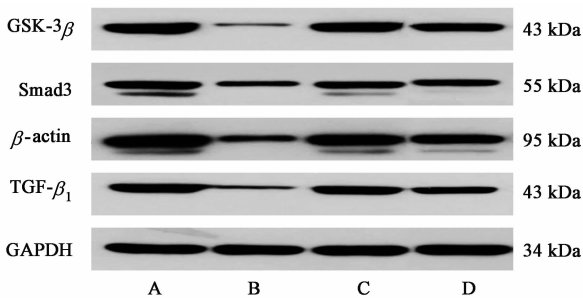


图 4 RIPI 小鼠肺组织中 TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β 和 β -catenin 蛋白的表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TGF- β_1 , Smad3, GSK-3 β and β -catenin protein expression in lung tissues of RIPI mice

4 讨论

肺癌是世界发病率及病死率最高的恶性肿瘤,放疗是肺癌主要治疗手段且其具有明显的剂量-效应学关系,伴随着射线照射剂量增加,RIPI 的发病率明显升高。已有研究表明,RIPI 是由多因素、多细胞共同参与的复杂、动态的病理反应过程。放疗可引起各种细胞因子释放并诱发包括成纤维细胞、纤维细胞等一系列病理反应。在细胞水平上,放疗后可引起肺泡上皮细胞损伤及肺间质血管内皮细胞改变,进而导致肺泡张力变化、血管通透性增加,早期可见炎症细胞浸润、肺泡渗出增加、肺顺应性降低,晚期可出现肺间质水肿、充血,肺泡结构破坏,部分肺泡萎缩,肺泡塌陷和不张。在分子水平上,多种细胞因子如 TGF- β_1 , TNF- α , IL-6 等参与了 RIPI 发生及发展过程^[17]。在组织水平上,RIPI 可表现为早期放射性肺炎为主,随着病变的进展,逐渐出现放射性肺纤维化为主的动态病理变化过程,相应影像学表现为局部肺内斑片渗出影、实变影、条索影或蜂窝样改变。

RIPI 根据其咳嗽、咯痰、气喘等临床表现,当属

中医“咳嗽”“肺痿”“肺痹”“肺痛”“喘证”等病证范畴。放射治疗导致的 RIPI 为放射热毒病邪内袭,易灼伤人体津液,耗伤人体正气和阴血。RIPI 的病位主要在肺,热毒为 RIPI 的主要病因,热毒贯穿于 RIPI 发病的始终,本病的基本病机为本虚标实在治疗上,以清、补为治则,根据其证候特点,可分别予以清热解毒、益气养阴、宣肺化痰等为治法,故运用复方苦参注射液防治 RIPI 是“放射热毒病邪内袭于肺”理论的体现。

复方苦参注射液是以苦参、白土茯苓为原料经提取加工精制而成的纯中药制剂,具有清热利湿,凉血解毒,散结止痛之功效,临床常用于癌肿疼痛、出血,为临床上恶性肿瘤的常用防辅助治疗剂。其中苦参清热燥湿,白土茯苓清热解毒。苦参在《滇南本草》中被记载:凉血,解热毒,疥癩,脓窠疮毒。疗皮肤瘤痒,血风癣疮,顽皮白屑,肠风下血,便血。消风,消肿毒,痰毒。白土茯苓在《本草正》中被记载:疗痈肿、喉痹、除厨身寒湿、恶疮。现代药理研究表明,苦参其主要有效成分为氧化苦参碱、苦参碱和苦参黄酮类等,具有抗肿瘤、抑制肿瘤细胞的侵袭与转移、抗癌增敏减毒、抗炎、镇痛、止血、改善造血功能、调控上皮间质转化、调节机体免疫力等多种药理作用^[9],这与 RIPI 的西医发病机制想契合。

EMT 指的是上皮细胞失去了他们原本的特点而获得了一些间质细胞的特性,转化为纤维条索样或叶状结构的一种生物学过程,其主要表现为细胞 E-cadheren 等上皮标志物表达缺失,以及 Vimentin 等间质标志物表达增加^[18-19]。现已证实 EMT 在慢性炎症、组织重建、肿瘤侵袭转移和多种纤维化疾病中发挥重要作用^[20-22],亦是引起肺纤维化的重要步骤。

TGF- β_1 /Smads 及 Wnt/ β -catenin 信号通路是

EMT 的经典信号通路,其在 RIPI 肺纤维化发生、发展过程中发挥极为重要的作用,有望可能成为复方苦参注射液有效防治 RIPI 的药物作用靶点。官键等^[23]研究也同样证实了 TGF- β_1 /Smad 信号通路中最主要的因子是 TGF- β_1 和 Smad3 分子,通过阻断 TGF- β_1 /Smad 通路可能减少照射后肺间质炎症反应及降低纤维化程度。李冀等^[24]回顾最新研究文献,提示清热解毒药如苦参、黄芩等中药可通过调控 Wnt/ β -catenin 等多个细胞信号转导通路起到抑制肿瘤的作用。吉晶等^[25]研究提示中药抗纤灵方可通过抑制 TGF/Smad 通路来延缓肾纤维化。任周新等^[26]研究表明补肺益肾方抑制 TGF- β_1 与骨形成蛋白-4(BMP-4)合用诱导的肺动脉平滑肌细胞的增殖,其机制可能与抑制 p-Smad2/3/结缔组织生长因子(CTGF)通路的活化有关。Wnt/ β -catenin 信号转导通路是一条在生物进化中极为保守的通路。在正常的体细胞中, β -catenin 只是作为一种细胞骨架蛋白在胞膜处与 E-cadherin 形成复合体对维持同型细胞的黏附、防止细胞的移动发挥作用。在胞浆中无 Wnt 信号时,GSK-3 β 与 β -catenin 形成巨大的“降解复合体”。当 Wnt 信号激活时,GSK-3 β 活性受到抑制, β -catenin 在胞内大量累积,可调控 EMT 相关基因的表达,并诱导 EMT 现象。

本研究采用单次 20 Gy 双侧肺野照射建立的 RIPI 模型组小鼠肺系数,Vimentin,TGF- β_1 ,Smad3,GSK-3 β 和 β -catenin 水平较正常组小鼠明显升高,E-cadherin 的水平明显降低,且模型组小鼠肺脏出现炎症细胞浸润,肺间质水肿、充血,肺泡结构破坏,部分肺泡萎缩。给予复方苦参注射液干预后,小鼠肺脏炎症细胞浸润及肺间质病变减轻,小鼠肺组织 Vimentin,TGF- β_1 ,Smad3,GSK-3 β 和 β -catenin 的水平明显降低,小鼠肺组织 E-cadherin 的水平明显升高,但与地塞米松注射液组比较,其 E-cadherin,Vimentin,TGF- β_1 ,Smad3,GSK-3 β 和 β -catenin 等指标表达水平未见明显差异。本实验研究结果提示,TGF- β_1 /Smads 及 Wnt/ β -catenin 信号通路是机体 RIPI 炎症、上皮间质转化及肺纤维化调控的关键靶点。复方苦参注射液可减轻 RIPI 模型小鼠的肺损害程度,抑制小鼠放射性肺炎及放射性肺纤维化,其机制可能与复方苦参注射液抑制 EMT 相关的 TGF- β_1 /Smads 及 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,促进 E-cadherin 表达,抑制 Vimentin 蛋白表达,调控上皮间质转化,进而减轻 RIPI 肺组织炎症反应及肺纤维化程度,达到防治 RIPI 肺纤维化的目的。此

外,RIPI 发病机制十分复杂,对于复方苦参注射液防治 RIPI 的详细机制还有待进一步更深入全面的研究和探讨。

[参考文献]

- [1] 周罗瑜,骆学新. 中医药治疗放射性肺损伤研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(3):1138-1140.
- [2] WANG J, ZHOU F, LI Z, et al. Pharmacological targeting of BET proteins attenuates radiation-induced lung fibrosis[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):998.
- [3] HAO Y H, RAN Y H, LU B H, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on canine radiation-induced lung injury[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 102(2):407-416.
- [4] XU T, ZHANG Y Y, CHANG P Y, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for radiation-induced lung injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):18.
- [5] YAO Y, ZHENG Z, SONG Q. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in radiation-induced lung injury[J]. Thorac Cancer, 2018, 9(2):208-217.
- [6] 么金凤,周晋华. 放射性肺炎中医药治疗研究进展[J]. 中医临床杂志,2017,29(7):1129-1133.
- [7] 赵春阳,杨立超,蔡佳怡,等. 复方苦参注射液防治放射性肺损伤的 Meta 分析[J]. 中医药导报,2018,24(8):74-78.
- [8] 尹业辉,谢雁鸣,张寅,等. 基于医院信息系统数据对复方苦参注射液真实世界临床应用特征的研究[J]. 中医杂志, 2018,59(11):26-31.
- [9] 董俊,晏菲,邓洁,马燕凌,等. 复方苦参注射液抗肿瘤机制及其临床应用进展[J]. 天津药学,2019,31(1):71-74.
- [10] 刘方雷,王鹏飞,田春香,等. 复方苦参注射液对原发性肺癌放射性肺炎的防治探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2018,45(2):317-319.
- [11] 王绿化,傅小龙,陈明,等. 放射性肺损伤的诊断及治疗[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2015, 24(1):4-9.
- [12] MARTIN M, LEFAIX J, DELANIAN S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000, 4(2): 277-290.
- [13] ZHANG J Q, CHEN S, GU J N, et al. MicroRNA-300 promotes apoptosis and inhibits proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition via the Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting CUL4B in pancreatic cancer cells[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 1027-1040.
- [14] 韩光,周云峰,彭敏,等. 小鼠放射性肺损伤模型的建立与鉴定[J]. 中华放射医学与防护杂志,2006,26

- (5):442-445.
- [15] 亓润智,刘剑刚,吴显文.多种放射性肺损伤动物模型的建立和效应评价研究[J].中华放射肿瘤学杂志,2019,28(6):472-475.
- [16] 周芊,王东,李梦侠,等.小鼠放射性肺损伤动物模型的建立与鉴定[J].重庆医学,2010,39(19):2553-2557.
- [17] HAO Y, RAN Y, LU B, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on canine radiation-induced lung injury[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2018, 102(2):407-416.
- [18] RADISKY D C. Epithelial-mesenchymal transition[J]. J Cell Sci, 2005, 118(19):4325-4326.
- [19] 闫飞,刘颖,冯年平.调控 EMT 的中药有效成分纳米递送系统抑制肿瘤转移的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20192246.
- [20] YU T T, TAO Z, XI L, et al. B7-H3 promotes metastasis, proliferation, and epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 4693-4700.
- [21] 刘文虎,袁江北,张帆,等.姜黄素通过 Wnt3a/ β -catenin/EMT 信号通路抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J].中国中药杂志,2019,44(14):3107-3115.
- [22] 高云星,蒋莉莉,张倩,等.吴茱萸次碱通过抑制 Notch1/eIF3a 信号通路保护博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化[J].中国中药杂志,2018,43(17):3530-3538.
- [23] 官键,刘来星,李启生,等.TGF- β 在放射性肺损伤大鼠肺组织中的表达及意义[J].重庆医学,2012,41(10):964-965.
- [24] 李冀,李想,高彦宇,等.清热解毒药对肿瘤治疗及其信号通路调节作用的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20191727.
- [25] 吉晶,何立群.抗纤灵方对肾纤维化大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):69-75.
- [26] 任周新,李建生,沈俊岭,等.补肺益肾方对 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的肺血管平滑肌细胞 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):126-132.

[责任编辑 周冰冰]