

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.12.016

麦门冬汤对特发性肺间质纤维化小鼠肺组织 PPAR γ 表达和可溶性胶原蛋白含量的影响

刘豹¹, 忽新刚¹, 赵丽敏¹, 刘智达¹, 张晓菊^{2*}, 刘寨华^{2*}

(1. 郑州大学人民医院, 河南省郑州市金水区纬五路 7 号, 450008; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所)

摘要 目的 探讨麦门冬汤治疗特发性肺间质纤维化的可能作用机制。方法 BABL/c 小鼠随机分为模型组、实验组和对照组, 每组 15 只。模型组和实验组小鼠分别在气管内连续 5 次滴注博来霉素 40 mg/kg, 每 2 天 1 次, 建构特发性肺间质纤维化小鼠模型。实验组滴注博来霉素 48 h 后采用麦门冬汤 (浓度为 0.6 g/ml) 混悬液按照 2 ml/200 g 灌胃, 模型组和对照组以等容积生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 灌胃 2 周。干预后检测各组小鼠肺功能 [包括吸气峰流速 (PIF)、呼气峰流量 (PEF) 及每分钟通气量 (MV)]、肺组织可溶性胶原蛋白含量及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) mRNA 及蛋白表达水平。结果 与正常组比较, 模型组小鼠 PIF、PEF 及 MV 均显著下降, 肺组织中 PPAR γ mRNA 及蛋白表达水平均降低, 可溶性胶原蛋白显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 实验组小鼠 PIF、PEF 及 MV 均显著升高, 肺组织中 PPAR γ mRNA 及蛋白表达水平升高, 可溶性蛋白显著降低 ($P < 0.05$)。结论 麦门冬汤可能通过升高肺组织中 PPAR γ 表达, 降低可溶性胶原蛋白含量, 从而改善特发性肺间质纤维化小鼠肺功能。

关键词 麦门冬汤; 特发性肺间质纤维化; 肺功能; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 可溶性胶原蛋白

特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种以肺泡、肺间质、肺小血管及终末气道不同程度的炎症损伤以及损伤后的修复导致纤维化为特征性疾病。IPF 是多种肺部疾病终末期的表现, 其发病隐匿, 多见于中老年, 男性居多, 至今仍然缺乏有效治疗方法, 诊断后平均寿命仅有 2~3 年^[1]。中医学根据肺纤维化的病机和症状, 将其归属于“肺痿”“肺痹”“喘证”“肺胀”“短气”等范畴, 而近年来学术界逐渐达成共识, 多以“肺痿”命名^[2]。麦门冬汤始载于《金匱要略·肺痿肺痛咳嗽上气病脉证治》, 曰“大逆上气, 咽喉不利, 止逆下气者, 麦门冬汤主之”, 具有清养肺胃、止逆下气的作用, 为治疗虚热肺痿的代表方。现代临床研究发现, 麦门冬汤能够改善 IPF 患者的症状, 提高肺功能, 同时可以优化患者动脉血氧分压值, 改善肺功能, 提高免疫力等^[3]。动物实验亦表明, 麦门冬汤对博来霉素所致肺纤维化大鼠肺脏功能具有改善作用^[4]。本研究进一步探

讨麦门冬汤治疗 IPF 的可能作用机制, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 BABL/c 小鼠 45 只, 8 周龄, 体重 16~20 g, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0006, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究通过郑州大学人民医院动物伦理委员会审核同意, 伦理批号: 2017 伦审 (34) 号。

1.2 药物

麦门冬汤组成: 麦冬 42 g、法半夏 9 g、人参 9 g、甘草 6 g、粳米 3 g、大枣 4 枚, 购自北京同仁堂河南药业有限公司 (郑州), 由河南省人民医院中药药剂室煎制成浓缩合剂, 每毫升约含生药 3 g, 实验前使用双蒸水配置成 0.6 g/ml 混悬液。博来霉素粉剂购自哈尔滨博来制药有限公司, 批号: 000505。

1.3 主要试剂及仪器

2% 异戊巴比妥 (货号: 11715-400G)、10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (货号: 92560-40G), 均为 Sigma 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司, 货号: DP431); TaqMan[®] MicroRNA 逆转录

基金项目: 河南省自然科学基金 (162300410312); 河南省科技厅基础研究计划 (132300410365)

* 通讯作者: zhangxiaojun2018@163.com

试剂盒 (货号: AB-4366596)、Platinum SYBR Green qPCR SuperMix (货号: C11733038), 均为 Invitrogen 公司产品; RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: P0013B); 蛋白质定量试剂盒 (Bio-Rad 公司, 货号: 5000002); 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 抗体 (货号: ab45036)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔总 IgG (货号: ab150077), 均为 Abcam 公司产品; 增强化学发光 (ECL) 检测试剂盒 (诺唯赞生物科技有限公司, 货号: E411-01/02/06); 可溶性胶原蛋白检测试剂盒 (Biocolor 公司, 货号: S1000)。

DSI Buxco 型非束缚清醒动物全身体积描记系统, 北京华运安科技有限责任公司; ABI Prism 7900 HT 型序列检测系统, Applied Biosystems 公司; SmartSpec™ Plus 型分光光度计, Bio-Rad 公司。

1.4 IPF 模型构建及分组、给药

BABL/c 小鼠适应性饲养 1 周后筛选体重范围在 18~22 g 的小鼠, 根据 Liu 等^[8]的研究方法进行 IPF 模型构建。将筛选出的小鼠进行标记, 通过随机数表法分为模型组、实验组和对照组, 每组 15 只。模型组和实验组分别在气管内连续 5 次滴注博来霉素 40 mg/kg, 每 2 天 1 次, 对照组气管内滴注 200 μ l 的 PBS。实验组滴注博来霉素 48 h 后采用麦门冬汤混悬液 (浓度 0.6 g/ml) 按照 2 ml/200 g 灌胃, 每日下午 3:30 给药 1 次; 模型组和对照组以等容积生理盐水灌胃, 均灌胃 2 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 肺功能测定 参考 Zhou 等^[8]实验方法, 采用非束缚清醒动物全身体积描记系统检测记录各组小鼠的肺功能, 包括吸气峰流速 (PIF)、呼气峰流速 (PEF) 及每分钟通气量 (MV)。每只动物独立扫描 3 次, 记录扫描数据并计算平均值。

1.5.2 肺组织 PPAR γ mRNA 检测 用 2% 异戊巴比妥 45 mg/kg 腹腔麻醉小鼠, 小鼠心脏采血后通过右心室生理盐水灌洗去除残留血液, 取左肺液氮急冻后 -80℃ 保存用于 RT-qPCR 检测。1) 使用动物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 后, 使用 Taq-Man[®] MicroRNA 逆转录试剂盒逆转录 1 μ g 总 RNA 形成 cDNA。使用 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix 在 ABI Prism 7900 HT 序列检测系统中进行所有 PCR 反应。使用 GAPDH 作为参考基因, 引物由深圳华大基因科技有限公司合成。PPAR γ 上游: 5'-GCATCTCCACCTTATTATTC-3', 下游: 5'-ACAGACACGACATTCAAT-3'; GAPDH 上游: 5'-

CTCTGGTAAAGTGGATATTGT-3', 下游: 5'-GGTG-GAATCATATTGGAACA-3'。mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

1.5.3 肺组织 PPAR γ 蛋白检测 取右肺进行 Western blot 检测。使用 RIPA 裂解液在冰上提取细胞或肺组织总蛋白。使用蛋白质定量试剂盒测定所得总蛋白质浓度。10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶以每个泳道 30 μ g 蛋白质的量进行电泳分离后, 转移到 PVDF 膜上。使用 5% 脱脂奶粉 PBST 溶液室温孵育 2 h 阻断非特异性蛋白质结合。用抗 PPAR γ 抗体 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 接着用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔总 IgG (1:2000) 室温孵育 2 h。使用 ECL 检测试剂盒根据制造商的说明书和使用 FX-成像系统 (Bio-Rad 公司) 捕获图像并进行分析。

1.5.4 肺组织可溶性胶原蛋白含量 采用可溶性胶原蛋白检测试剂盒检测肺组织中可溶性胶原蛋白的含量, 步骤按试剂盒说明书进行, 并在分光光度计 540 nm 处测量吸光度, 绘制标准曲线计算样本胶原含量。

1.6 统计学方法

使用 Graph Pad Prism 7.0 软件进行分析。计量资料呈正态分布采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺功能比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组和实验组小鼠 PIF、PEF 及 MV 均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 实验组小鼠 PIF、PEF 及 MV 均显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠肺功能指标比较 (ml/s, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PIF	PEF	MV
正常组	15	5.12 $\pm$ 0.35	3.48 $\pm$ 0.21	37.89 $\pm$ 4.23
模型组	15	2.51 $\pm$ 0.55*	1.72 $\pm$ 0.39**	22.92 $\pm$ 3.29*
实验组	15	3.31 $\pm$ 0.28* Δ	2.15 $\pm$ 0.22 * Δ	27.33 $\pm$ 1.25* Δ

注: PIF, 吸气峰流速; PEF, 呼气峰流速; MV, 每分钟通气量; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组小鼠肺组织 PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠肺组织中 PPAR γ mRNA 及蛋白表达水平均降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组小鼠肺组织中 PPAR γ mRNA 及蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肺组织 PPAR γ 蛋白及 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PPAR γ 蛋白 (相对表达量)	PPAR γ mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
正常组	15	1.00 $\pm$ 0.08	0.98 $\pm$ 0.03
模型组	15	0.36 $\pm$ 0.14*	0.59 $\pm$ 0.12*
实验组	15	0.49 $\pm$ 0.06 Δ	0.77 $\pm$ 0.09 Δ

注: PPAR γ , 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 各组小鼠肺组织可溶性胶原蛋白表达比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组和实验组小鼠肺组织中可溶性胶原蛋白显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验组小鼠肺组织可溶性蛋白显著降低 ($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肺组织可溶性胶原蛋白含量比较 ($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	可溶性胶原蛋白
正常组	15	96.63 $\pm$ 5.43
模型组	15	237.00 $\pm$ 21.80*
实验组	15	181.60 $\pm$ 24.15* Δ

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

麦门冬汤始载于张仲景的《金匱要略》中, 用于火气上逆、肺有虚热导致的肺痿以及胃阴不足, 具有清养肺胃、降逆下气的功效, 临床上可用于治疗呼吸、消化、内分泌系统及肿瘤疾病等^[1]。临床研究表明, 麦门冬汤在治疗支气管炎、肺气肿并感染、百日咳、胃炎、术后呕吐、梅核气、妊娠呕吐等方面也具有一定疗效^[2]。已有研究显示, 加味麦门冬汤能够改善 IPF 患者的临床症状^[3]。本研究结果显示, IPF 模型小鼠肺功能较正常小鼠明显减弱, 而经麦门冬汤干预后, IPF 模型小鼠 PIF、PEF 及 MV 都有显著升高, 说明麦门冬汤可改善 IPF 小鼠的肺功能, 对 IPF 小鼠有一定治疗作用, 与我们前期研究^[10-11]结果一致。

IPF 是一种进行性疾病, 可导致呼吸衰竭, 其病理特征在于细胞外基质蛋白的过度沉积导致的肺组织瘢痕形成^[12-13]。目前, PPAR γ 配体正在成为炎症和纤维化及其他疾病的治疗靶点^[14-16]。PPAR γ 活化诱导脂肪生成和分化, 并抑制炎症^[17-18]。既往研究表明, PPAR- α 激动剂通过抑制心脏成纤维细胞的增殖来抑制心脏纤维化^[19], 减少由博来霉素诱导的肺损伤^[20]。IPF 的特征在于炎性细胞的浸润, 过量胶原蛋白的生成和肌成纤维

细胞的积累, 其中正常肺实质被富含活化成纤维细胞和胶原蛋白 I 的功能障碍性瘢痕所取代^[21]。Bouros 等^[22]研究发现, 肺纤维化相关可溶性介质显著影响正常对照组人肺成肌细胞促纤维化因子表达和胶原蛋白的生成, 诱导成肌细胞迁移, 促进伤口愈合。通过限制纤维状胶原蛋白交联可以减轻纤维化, 从而潜在地阻碍 IPF 中病理性微环境的形成^[23]。本研究结果显示, 麦门冬汤干预能够提高 IPF 模型小鼠肺组织 PPAR γ mRNA 及蛋白表达, 有效抑制可溶性胶原蛋白的表达, 可能是麦门冬汤治疗 IPF 的作用机制之一。

参考文献

- [1] 王国琛, 刘江彦. 特发性肺纤维化中医研究进展 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(2): 243-245.
- [2] 樊茂蓉, 张燕萍, 苗青, 等. 肺间质纤维化的中医发病机制与治则探讨 [J]. 中医杂志, 2012, 5(3): 203-204.
- [3] 李宁, 宋建平, 王振亮. 麦门冬汤最新药理研究与临床应用进展 [J]. 中医研究, 2013, 26(8): 74-76.
- [4] 雷宁宁, 叶传冬, 刘锐. 肺纤维化发病机制及麦门冬汤对其治疗研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(17): 69-71.
- [5] LIU T, DE LOS SANTOS FG, PHAN SH. The bleomycin model of pulmonary fibrosis. [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1627: 27-42. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8_2.
- [6] ZHOU Y, LI P, DUAN JX, et al. Aucubin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model [J]. Inflammation, 2017, 40(6): 1-12.
- [7] 王高玉. 麦门冬汤的研究进展 [J]. 现代养生, 2017(12): 178-179.
- [8] 陈素行. 麦门冬汤的临床新用 [J]. 湖北中医杂志, 2001, 23(1): 40-41.
- [9] 于龙. 麦门冬汤治疗特发性肺纤维化 30 例 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2015, 13(6): 55-56.
- [10] 张瑞, 宋建平, 李瑞琴, 等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠形成阶段的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(9): 2022-2024.
- [11] 臧明月, 韩玉生, 侯志涛, 等. 麦门冬汤对肺纤维化大鼠 TGF- β 1、Smad3 和 Smad7 蛋白表达的影响 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2017, 38(24): 2856-2857.
- [12] SIME PJ, O'REILLY KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment [J]. Clin Immunol, 2001, 99(3): 308-319.
- [13] MELTZER EB, NOBLE PW. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Orphanet J Rare Dis, 2008, 3: 8. doi: 10.1186/1750-1172-3-8.
- [14] BURGESS HA, DAUGHERTY LE, Thatcher TH, et al. PPAR gamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production:

- implications for therapy of lung fibrosis [1]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(6): L1146-L1153.
- [5] HART CM, ROMAN J, REDDY R, et al. PPARgamma: a novel molecular target in lung disease [J]. J Invest Med, 2008, 56(2): 515-517.
- [6] ROMAN J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and lung cancer biology: implications for therapy [J]. J Invest Med, 2008, 56(2): 528-533.
- [7] TONTONOV P, SPIEGELMAN BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma [J]. Annu Rev Biochem, 2008, 77: 289-312. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- [8] FERGUSON HE, KULKARNI A, LEHMANN GM, et al. Electrophilic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands have potent antifibrotic effects in human lung fibroblasts [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(6): 722-730.
- [9] OGATA T, MIYAUCHI T, SAKAI S, et al. Stimulation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) attenuates cardiac fibrosis and endothelin-1 production in pressure-overloaded rat hearts [J]. Clin Sci (Lond), 2002, 103 (Suppl48): 284S-288S.
- [20] GENOVESE T, MAZZON E, DI PAOLA R, et al. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the development of bleomycin-induced lung injury [J]. Shock, 2005, 24(6): 547-555.
- [21] GIMÉNEZ ALÍCIA, PAULA D, MARTA P, et al. Dysregulated collagen homeostasis by matrix stiffening and TGF-β1 in fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis patients: role of FAK/Akt [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11): 2431. doi: 10.3390/ijms18112431.
- [22] BOUROS E, FILIDOU E, ARVANITIDIS K, et al. Lung fibrosis-associated soluble mediators and bronchoalveolar lavage from idiopathic pulmonary fibrosis patients promote the expression of fibrogenic factors in subepithelial lung myofibroblasts [J]. Pulm Pharmacol Ther, 2017, 46: 78-87. doi: 10.1016/j.pupt.2017.08.012.
- [23] TJIN G, WHITE ES, FAIZ A, et al. Lysyl oxidases regulate fibrillar collagen remodelling in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(11): 1301-1312.

Effects of *Maimendong Decoction* (麦门冬汤) on PPAR γ Expression and Soluble Collagen Content in Lung Tissue of Mice with Idiopathic Pulmonary Interstitial Fibrosis

LIU Bao¹, HU Xingang¹, ZHAO Limin¹, LIU Zhida¹, ZHANG Xiaojun¹, LIU Zhaihua²

(1. Zhengzhou University People's Hospital, Zhengzhou, 450008; 2. Institute of Basic Theory of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Maimendong Decoction* (麦门冬汤) in the treatment of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis. **Methods** BABL/c mice were randomly divided into a model group, an experimental group and a control group, with 15 mice in each group. In the model group and the experimental group, bleomycin 40 mg/kg was instilled in the trachea for 5 times every 2 days to construct a mouse model of idiopathic pulmonary interstitial fibrosis. In the experimental group, after 48 hours of instilling bleomycin, the suspension of *Maimendong Decoction* (concentration of 0.6 g/ml) was administered 2 ml/200 g. The model group and the control group were intragastrically administered with equal volume of normal saline, once a day, gavage for 2 weeks. Pulmonary functions including peak inspiratory flow (PIF), peak expiratory flow (PEF) and minute ventilation (MV), soluble collagen content in lung tissue and peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) mRNA and protein expression levels of each group were measured after intervention. **Results** Compared with the normal group, the PIF, PEF and MV of the model group were significantly decreased, the expression of PPAR γ mRNA and protein in the lung tissue decreased, and the soluble collagen was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, PIF, PEF and MV were significantly increased in the experimental group. PPAR γ mRNA and protein expression levels were increased in lung tissue, and soluble protein was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Maimendong Decoction* may improve the lung function of mice with idiopathic pulmonary fibrosis by increasing the expression of PPAR γ in lung tissue and decreasing the content of soluble collagen.

Keywords *Maimendong Decoction* (麦门冬汤); idiopathic pulmonary interstitial fibrosis; pulmonary function; peroxisome proliferator-activated receptor γ ; soluble collagen

(收稿日期: 2018-12-17; 修回日期: 2019-03-21)

编辑: 邓 媛