

肺痹通方对肺纤维化大鼠胶原蛋白及相关因子的影响

樊茂蓉¹ 李艳艳² 张琼^{1*} 王书臣¹ 张燕萍¹ 张旭丽¹

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091; 2. 中国科学院半导体研究所)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901948); 中国中医科学院西苑医院院内课题(xyky-mp-05)

* 通讯作者: zhangq810@263.net, 13311296665

[摘要] 目的 探讨肺痹通方治疗肺纤维化的作用机制。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、激素组、肺痹通低剂量组及肺痹通高剂量组各 12 只, 除正常对照组外其余各组大鼠气管内注射博来霉素建立肺纤维化大鼠模型。造模后 28 天激素组给予强的松片 3 mg/(kg·d)灌胃, 肺痹通低、高剂量组分别给予肺痹通方 10 g/(kg·d)、20 g/(kg·d)灌胃, 正常对照组和模型组给予 2 ml/d 蒸馏水灌胃, 连续 21 天。观察各组大鼠肺组织病理形态学, 检测血清层粘连蛋白(LN)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、谷胱甘肽(GSH)及肺组织 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶(MMP-1)和其组织抑制因子(TIMP-1)水平的变化。结果 与正常对照组比较, 模型组大鼠血清 LN、TGF- β 1 及肺组织 MMP-1、TIMP-1、I 型胶原、III 型胶原水平升高($P < 0.05$)。激素组与肺痹通高剂量组 LN 水平低于模型组($P < 0.05$); 各组大鼠血清 GSH 水平比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。激素组及肺痹通高、低剂量组 MMP-1、TIMP-1、I 型胶原水平均较模型组显著降低($P < 0.05$); 肺痹通高剂量组 MMP-1 水平较肺痹通低剂量组明显升高($P < 0.05$); 激素组较肺痹通低剂量组 TIMP-1 水平明显降低($P < 0.05$)。结论 肺痹通方可能通过调节 MMPs/TIMPs 比例失衡, 减少 LN 以及 I、III 型胶原纤维的表达, 从而延缓肺纤维化进程。

[关键词] 肺痹通方; 肺纤维化; 胶原蛋白; 基质金属蛋白酶; 层粘连蛋白

Effect of Feibitong Formula on the Collagen and Related Factors in Rats with Pulmonary Fibrosis

FAN Maorong¹, LI Yanyan², ZHANG Qiong¹, WANG Shuchen¹, ZHANG Yanping¹, ZHANG Xuli¹

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091; 2. Institute of Semiconductors, Chinese Academy of Sciences)

ABSTRACT Objective To research the mechanism of Feibitong Formula (formula to treat pulmonary fibrosis) for pulmonary fibrosis. **Methods** Sixty rats were randomized into normal control group, model group, hormone group, Feibitong low-dose group and Feibitong high-dose group, with 12 in each. The pulmonary fibrosis models were established by intratracheal injection of bleomycin in all groups but normal control group. The hormone group, Feibitong low-dose group, Feibitong high-dose group was gavaged with 3 mg/kg Prednisone Tablets, 10 g/kg Feibitong Formula, 20 g/kg Feibitong Formula respectively, normal control group and model group was given 2 ml distilled water 28 days after modeling. The intragastric administration lasted for 21 days. The pathological form in lung tissue was observed. The levels of laminin (LN), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), glutathione (GSH), type I and type III collagens in lung tissues, matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected. **Results** Comparing with the normal control group, the levels of LN, TGF- β 1, MMP-1, TIMP-1, I and III type collagens in lung tissues in the model group were significantly increased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the LN levels were significantly decreased in the hormone group and Feibitong high-dose group ($P < 0.05$). There was no significant difference between groups in the GSH level ($P > 0.05$). Comparing with the model group, the levels of MMP-1, TIMP-1 and type I collagen were significantly decreased in the hormone group and Feibitong high-dose and low-dose groups ($P < 0.05$). The MMP-1 level in the Feibitong high-dose group was significantly higher than that in the Feibitong low-dose group ($P < 0.05$). The TIMP-1 level in the hormone group was significantly lower than that in the Feibitong low-dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Feibitong Formula can delay the process of pulmonary fibrosis by regulating the imbalance of MMPs/TIMPs and reducing the expressions of LN and type I and type III collagens.

Keywords Feibitong Formula (formula to treat pulmonary fibrosis); pulmonary fibrosis; collagen; matrix metalloproteinase; laminin

肺间质纤维化是呼吸系统的难治疾病, 病情呈进行性发展, 其发病机制尚不明确, 现代医学目前尚无安全有效的治疗方法^[1]。本课题组前期采用通痹

活血、益气养阴的配伍中药治疗特发性肺间质纤维化(IPF)患者取得较好的疗效^[2]。本实验通过观察同样具有除痹活血、益气养阴功效的肺痹通方对肺

纤维化大鼠血清层粘连蛋白(LN)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、谷胱甘肽(GSH)及肺组织 I 型胶原、III 型胶原、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)和其组织抑制因子-1(TIMP-1)水平的影响,探讨该方治疗肺纤维化的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重(120 $\pm$ 10)g,购自北京市维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2005-2006。饲养在中国中医科学院西苑医院二级动物室,适应性喂养 1 周。

1.2 主要药品与试剂

肺痹通方由威灵仙 15 g,黄芪 20 g,川芎 10 g,沙参 20 g,百部 10 g,紫苑 10 g,甘草 10 g 等中药组成,取上述生药,分别以 8 倍、6 倍、4 倍水煎 3 次,每次煎药时间 3 h,最后将 3 次水煎液混合后浓缩至约 1 g/ml 的溶液,由中国中医科学院西苑医院药剂科提供。博莱霉素(批号 040902)购自天津太河制药有限公司,强的松片(批号 050209)购自天津力生制药股份有限公司。LN(批号 20050825)放射免疫试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司,GSH(批号 050825)试剂盒购自北京环亚泰克生物工程有限公司,TGF- $\beta 1$ (批号 EL10029)试剂盒购自加拿大 YESBIOTECH 公司,MMP-1(批号 BA1270)及 TIMP-1(批号 BA0575)抗体,I、III 型胶原抗体(批号分别为 BA0325,BA0326)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 主要仪器和设备

802 台式离心机:上海医疗器械厂;SN-6110 型(10)探头放射免疫 γ 计数器:上海核所日环光电仪器有限公司;石蜡切片机:LECIA 公司,德国;日立 7600 型全自动生化分析仪:日立公司,日本;图像分析系统:ELICA-Q550CW,德国。

1.4 模型制备

将博莱霉素溶于生理盐水中,配制浓度为 5 g/L 的溶液。模型建立参考文献[3]方法,用 3.5%水合氯醛腹腔麻醉大鼠(10 ml/kg)后,切开颈部皮肤,以血管钳钝性分离暴露气管,2 ml 注射器在环状软骨间刺入气管腔,按 5 mg/kg 体重,向气管内注射配制好的博莱霉素溶液,正常对照组动物在相同条件下气管内注射生理盐水,然后立即将大鼠直立并前后旋转,使药物在大鼠肺内分布均匀,建立大鼠肺纤维化模型。

1.5 动物分组及给药

SD 大鼠按区组随机法分为正常对照组、模型组、激素组、肺痹通低剂量组及肺痹通高剂量组,每组 12 只。各组大鼠均于术后 28 天开始灌胃给药,连续 21 天。正常对照组和模型组每日给予 2 ml 蒸馏水灌胃,激素组将强的松片溶于蒸馏水,每日给予 3 mg/kg 灌胃,肺痹通低、高剂量组分别每日给予肺痹通方 10 g/kg、20 g/kg 灌胃。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 血清 LN、TGF- $\beta 1$ 、GSH 含量测定 用 3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,固定,暴露胸腔,腹主动脉取血,静置 1 h 后离心 15 min,取血清保存到-70℃冰箱中备检,分别用放射免疫法和酶联免疫法测定,按照试剂盒说明书操作。

1.6.2 肺组织 I 型胶原、III 型胶原、MMP-1 和 TIMP-1 的表达 大鼠取动脉血后迅速摘取肺脏,选取大鼠左肺下叶同一部位,于福尔马林中固定,石蜡包埋,切片进行组织病理学检查及免疫组织化学方法检测,染色结果由图像分析系统计算光密度值(OD 值)。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡情况

共造模 48 只大鼠,造模当天模型组及肺痹通高剂量组各死亡 1 只;造模后 7 天内模型组死亡 3 只,激素组及肺痹通小剂量组各死亡 4 只;造模 7 天后至给药前肺痹通高剂量组死亡 2 只,模型组死亡 1 只。

2.2 各组大鼠肺组织病理学观察

正常对照组大鼠肺组织结构清晰,肺泡结构完整,肺泡隔窄,无炎性细胞浸润,肺泡腔透亮,毛细血管充盈;模型组肺泡结构破坏,肺泡壁显著增厚,大量胶原沉积,肺实质结构紊乱,部分肺泡腔缩小甚至消失,毛细血管腔闭塞;激素组与肺痹通高、低剂量组的肺泡间隔厚度和肺泡萎陷程度均较模型组减轻,其中以肺痹通高剂量组与激素组改善最为明显。

2.3 各组大鼠血清 LN、TGF- $\beta 1$ 及 GSH 含量比较

表 1 示,与正常对照组比较,模型组大鼠血清 LN、TGF- $\beta 1$ 水平升高($P < 0.05$);激素组与肺痹通高剂量组 LN 水平低于模型组($P < 0.05$);肺痹通高、低剂量组和激素组 TGF- $\beta 1$ 水平较正常对照组

显著升高($P<0.05$)。激素组、肺痹通高、低剂量组大鼠 LN、TGF- β 1 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠血清 GSH 水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠血清 LN、TGF- β 1 及 GSH 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	LN (ng/ml)	TGF- β 1 (μ g/ml)	GSH (mmol/L)
正常对照组	12	32.28 $\pm$ 6.22	2.67 $\pm$ 1.35	0.65 $\pm$ 0.53
模型组	7	41.03 $\pm$ 6.85*	9.23 $\pm$ 5.99*	0.28 $\pm$ 0.08
激素组	8	32.02 $\pm$ 4.88 Δ	7.72 $\pm$ 3.26*	0.26 $\pm$ 0.25
肺痹通高剂量组	9	35.54 $\pm$ 5.84 Δ	8.75 $\pm$ 6.39*	0.42 $\pm$ 0.48
肺痹通低剂量组	8	35.96 $\pm$ 5.07	10.00 $\pm$ 5.54*	0.34 $\pm$ 0.59

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

2.4 各组大鼠肺组织 MMP-1、TIMP-1 以及 I 型胶原、III 型胶原水平比较

正常对照组大鼠肺组织 MMP-1、TIMP-1 有少量染色阳性,着色浅;模型组染色呈深棕色,主要分布于肺泡间质巨噬细胞、肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞及胶原;激素组及肺痹通高、低剂量组染色呈浅棕色,分布同模型组,染色阳性面积较模型组少。正常对照组肺组织 I、III 型胶原染色呈浅黄色;模型组大鼠肺组织染色阳性面积增加,呈深棕色,主要分布于肺间质、肺血管、细支气管周围;激素组及肺痹通高、低剂量组染色呈浅棕色,分布同模型组,染色阳性面积较模型组少。

表 2 示,与正常对照组比较,模型组 MMP-1、TIMP-1、I 型胶原、III 型胶原水平均明显升高($P<0.05$);激素组及肺痹通高、低剂量组 MMP-1、TIMP-1、I 型胶原水平均较模型组显著降低,肺痹通高剂量组 III 型胶原较模型组显著降低($P<0.05$);肺痹通高剂量组 MMP-1 水平较肺痹通低剂量组明显升高($P<0.05$);激素组 TIMP-1 水平较肺痹通低剂量组明显降低($P<0.05$)。

3 讨论

肺纤维化是呼吸系统疾病的危急难治病,根据其临床表现与中医“肺痹”经络壅闭、气血不行的病

机不谋而合^[4]。本课题组认为间质性肺病多有肺络闭阻、气阴两虚、气虚血瘀的病机存在,应用通痹活血、益气养阴的配伍中药治疗肺间质纤维化,初步取得较好的临床疗效^[2]。肺痹通方中以威灵仙为君药,味辛行散,性温通利,通行十二经脉,既能祛风除湿,活血除痹,舒筋脉之拘挛,又能治“心隔痰水久积”,尤宜于肺络痹阻之证。方中黄芪大补元气,令气旺血行,瘀去络通,以起痿废;配合川芎活血祛瘀,通经止痛;沙参具有养阴润肺、化痰益气之功效,共为臣药。百部、紫苑等润肺化痰止咳,宣降肺气,开肺郁,共为佐药。甘草益气补中又调和诸药为使药。诸药配伍以气运血,气血互用,气足血活,元气复来,全方共奏活血除痹,益气养阴之功。

TGF- β 是关键性致纤维化因子之一^[5],成纤维细胞、巨噬细胞、上皮细胞等是其主要来源,可刺激未成熟的成纤维细胞生长,并促使组织的成纤维细胞聚集、扩散和分化。Holgate 等^[6]认为 TGF- β 通过减少基质金属蛋白酶(MMPs)的合成和分泌,增加基质金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)的合成和分泌,造成 MMPs/TIMPs 比例失衡,从而促进 I 型胶原和 III 型胶原等细胞外基质(ECM)的过度表达;同时活化的 MMPs 进一步促进 TGF- β 的释放。Hashimoto 等^[7]发现 TGF- β 可诱导肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,而肌成纤维细胞具有较纤维母细胞更强的胶原合成能力。因此认为 TGF- β 可以通过影响基质金属蛋白酶系统的平衡,引起胶原过度表达,从而形成 ECM 的沉积。本实验中模型组大鼠血清中 TGF- β 1 及肺组织 MMP-1、TIMP-1、I 型和 III 型胶原水平较正常对照组明显升高($P<0.05$),而肺痹通高剂量组肺组织 MMP-1、TIMP-1、I 型胶原、III 型胶原与模型组比较明显降低($P<0.05$)。

LN 是 ECM 的非胶原成分,与胶原一起构成基底膜骨架。有研究认为, LN 参与了上皮细胞损伤过程,特别在肺间质纤维化形成过程中发挥了重要

表 2 各组大鼠肺组织 MMP-1、TIMP-1 及 I、III 型胶原水平比较(OD 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	MMP-1	TIMP-1	I 型胶原	III 型胶原
正常对照组	12	0.215 $\pm$ 0.012	0.212 $\pm$ 0.003	0.214 $\pm$ 0.083	0.189 $\pm$ 0.039
模型组	7	0.251 $\pm$ 0.007*	0.268 $\pm$ 0.010*	0.245 $\pm$ 0.014*	0.248 $\pm$ 0.005*
激素组	8	0.222 $\pm$ 0.014 Δ	0.223 $\pm$ 0.009 Δ ▲	0.227 $\pm$ 0.009 Δ	0.228 $\pm$ 0.007
肺痹通高剂量组	9	0.234 $\pm$ 0.013 Δ ▲	0.229 $\pm$ 0.004 Δ	0.230 $\pm$ 0.004 Δ	0.222 $\pm$ 0.005 Δ
肺痹通低剂量组	8	0.220 $\pm$ 0.008 Δ	0.239 $\pm$ 0.009 Δ	0.233 $\pm$ 0.013 Δ	0.225 $\pm$ 0.009

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$;与肺痹通低剂量组比较,▲ $P<0.05$

作用,为检测肺间质纤维化病变的一个较敏感的标志^[8]。本实验结果发现,肺痹通高剂量组与激素组血清中 LN 水平较模型组明显下降($P < 0.05$),肺痹通高剂量可能在一定程度上减轻上皮细胞损伤、抑制 ECM 的过度沉积,起到延缓肺间质纤维化进程的作用。正常肺组织有抗氧化自由基系统,GSH 是其重要组成成分,而氧自由基可刺激成纤维细胞增生。Teramoto 等^[9]测定了 14 例 IPF 患者与 12 例正常人血清中 GSH,发现 IPF 患者血清中 GSH 显著低于正常组。本实验发现大鼠血清中 GSH 水平各组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但模型组与正常对照组比较有下降趋势,而肺痹通高、低剂量组与模型组比较血清中 GSH 水平有所上升。提示氧自由基与抗氧化自由基失衡可能是肺间质纤维化发病的机制之一,肺痹通方可能通过提高机体抗氧化能力减轻肺泡炎和纤维化程度的作用,其具体机制有待于进一步深入观察研究。

参考文献

- [1] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(6): 788-824.
- [2] 樊茂蓉, 苗青, 罗海丽, 等. 肺纤通方治疗气阴两虚、肺络闭阻型特发性肺纤维化疗效观察[J]. 中国中医急症, 2012, 21(9): 1377-1379.

(上接第 1849 页)

证、阳虚证、水湿证、湿浊证呈正相关;阳虚质与血瘀证、气虚证、阳虚证、水湿证、湿浊证呈正相关;瘀血质与血瘀证、湿热证、气虚证、阳虚证、水湿证、湿浊证呈正相关;湿热质与湿热证、血瘀证、气虚证、阴虚证、水湿证、湿浊证呈正相关。提示不同体质的特异性可能决定着疾病的发生及发病后所表现的证候特点。因此,将辨体质与辨证融为一体,将在很大程度上提高临床辨证施治效果,符合中医整体观及辨证论治思想。中医综合诊治 CKD 应注重调整人体脏腑、气血功能,扶正祛邪,最终达到调整体质失衡,改善预后。

参考文献

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hospitalization discharge diagnoses for kidney disease—United States, 1980—2005[J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2008, 57(12): 309-312.
- [2] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社,

- [3] Clark JG, Kostal KM, Marino BA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. An alveolar macrophage product increase fibroblast prostaglandin E2 and cyclic adenosine monophosphate and suppresses fibroblast proliferation and collagen production[J]. J Clin Invest, 1983, 72(6): 2082-2091.
- [4] 赵兰才, 武维屏. 肺间质纤维化的中医研究进展述评[J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(4): 70-72.
- [5] Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I, et al. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells[J]. J Immunol, 2002, 168(12): 6470-6478.
- [6] Holgate ST, Davies DE, Lackie PM, et al. Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(2Pt1): 193-204.
- [7] Hashimoto S, Gno Y, Takeshita I, et al. IL-4 and IL-13 induce myofibroblastic Phenotype of human lung fibroblasts through a c-jun NH2-terminal kinase dependent pathway[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(6): 1001-1008.
- [8] Sree K, White J, Vaiaunt P, et al. Acute lung injury fibroblast migration of a fibrin matrix is mediated by CD44[J]. J Clin Invest, 1996, 98(8): 1713-1727.
- [9] Teramoto S, Fukuchi Y, Uejima Y, et al. Superoxide anion formation and glutathione metabolism of blood in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Biochem Mol Med, 1999, 55(1): 66-70.

(收稿日期: 2013-02-19; 修回日期: 2013-05-16)

[编辑: 邓 媛]

2008; 1815.

- [3] Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)[J]. Kidney Int, 2005, 67(6): 2089-2100.
- [4] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 163-168.
- [5] 中华中医药学会. 中医体质分类与判定[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009: 1-7.
- [6] 董飞侠. 中西医结合提高慢性肾炎疗效的思路与方法[J]. 中医杂志, 2006, 47(11): 861-863.
- [7] 李亚好, 鲁盈, 陈洪宇, 等. 慢性肾脏病 3 期患者中医临床证候分析[J]. 浙江中医药大学学报, 2010, 34(6): 845-847.
- [8] 田松, 赵丽娟, 梁晓薇, 等. 500 例冠心病患者中医体质分布特点及其与证候的关系[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(6): 21-23.

(收稿日期: 2013-07-26; 修回日期: 2013-08-29)

[编辑: 邓 媛]