

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.22.012

基于内质网应激信号通路探讨温肺化纤颗粒对肺纤维化模型小鼠肺损伤的影响

朱国双¹, 邱明亮², 柯诗文², 李少峰², 莫丽莎², 徐磊², 刘良倚²✉

1. 江西中医药大学中医学院, 江西省南昌市湾里区梅岭大道 1688 号, 330004; 2. 江西中医药大学附属医院

[摘要] **目的** 探讨温肺化纤颗粒治疗肺纤维化的可能作用机制。**方法** 将 50 只昆明小鼠随机分为空白对照组、模型组及温肺化纤颗粒低、中、高剂量组, 每组 10 只。除空白对照组外, 其余各组小鼠通过气管内滴注博来霉素构建肺纤维化模型。造模后, 温肺化纤颗粒低、中、高剂量组小鼠分别给予温肺化纤颗粒混悬液 2.925、5.85 和 11.7 g/(kg·d) 灌胃, 空白对照组和模型组给予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃, 连续 28 天。末次灌胃 24h 后采用 HE 和 Masson 染色观察小鼠肺组织病理损伤; Real-time PCR 检测小鼠肺组织克老素(Klotho)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) mRNA 表达; Western blot 法检测小鼠肺组织 Klotho、GRP78、CHOP、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X (Bax)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) 蛋白表达; 免疫组化法观察肺组织 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较, 模型组小鼠肺脏病理切片显示肺泡间隔增厚、病变区肺泡结构受到破坏, 可见明显的蓝色胶原纤维沉积。肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显升高, Klotho mRNA 表达明显降低 ($P < 0.01$), TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA、GRP78、CHOP、Bax 蛋白表达明显增加, Klotho、Bcl-2 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 温肺化纤颗粒各剂量组小鼠肺脏损伤减轻、肺泡间隔稍增厚、病变肺泡结构破坏减轻, 小鼠肺脏中蓝色胶原纤维沉积减少, 肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、 α -SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显降低, Klotho mRNA 表达明显升高 ($P < 0.01$), 温肺化纤颗粒中、高剂量组 GRP78、CHOP、Bax 蛋白表达明显降低, 温肺化纤颗粒各剂量组 Klotho、Bcl-2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$); 与温肺化纤颗粒低、高剂量组比较, 温肺化纤颗粒中剂量组蓝色胶原纤维沉积最少, α -SMA、GRP78、CHOP mRNA 降低, Klotho mRNA 表达升高, Bax、GRP78、CHOP 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 温肺化纤颗粒具有抑制肺纤维化的作用, 其机制可能是通过抑制内质网应激介导的凋亡发生, 从而减少上皮间质转化。

[关键词] 肺纤维化; 温肺化纤颗粒; 内质网应激; 上皮间质转化

肺纤维化是一种慢性肺间质炎症及纤维化为主的疾病, 是由肺泡上皮损伤引起的细胞外基质胶原蛋白沉积, 从而导致不可逆性损伤的纤维化疾病, 患者表现为呼吸困难和肺功能持续下降^[1]。肺纤维化病情进展快, 预后较差, 中位生存时间为 3~5 年^[2]。研究显示, 内质网应激 (ERS) 广泛存在于呼吸系统疾病发生过程中, 抑制多种呼吸系统相关细胞 ERS 的发生可以降低肺损伤时肺脏细胞的损

伤程度, 减少炎症因子的生成, 减轻炎症反应, 从而抑制肺纤维化的形成^[3]。炎症小体的活化能够导致肺泡上皮细胞发生 ERS, 介导细胞凋亡的发生, 并进一步诱发肺部炎症及肺纤维化^[4-5]。亦有研究^[6]证实, 肺纤维化的氧化应激可诱导肺脏的 ERS 的发生, 进而介导肺脏损伤的发生。

国医大师洪广祥教授根据多年治疗肺纤维化的临床经验, 提出“治肺不远温”的学术观点, 在此理论上创立的温肺化纤汤^[7]。本课题组前期研究^[8]证实, 温肺化纤汤可通过抗氧化作用, 改善

基金项目: 国家自然科学基金(81260537, 81460708, 81860826)

✉ 通讯作者: liulj1965@163.com

肺纤维化大鼠肺脏的病理损伤。本研究从 ERS 角度探讨温肺化纤颗粒对肺纤维化的干预作用及可能作用机制,并经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批号 JZLLSC20210031)。

1 材料与方法

1.1 动物

50 只 SPF 级雄性昆明小鼠,体质量(27.5 ± 2.5)g,5~6 周龄,购置于江西中医药大学实验动物科技中心,实验动物生产许可证号:SCXK(赣)2018-0003。饲养于江西中医药大学医学院动物实验中心 SPF 级环境中,小鼠以标准饲料喂养,自由饮水。

1.2 药物

温肺化纤颗粒组成:熟地黄 15 g,鹿角霜 15 g,炮姜炭 9 g,肉桂 4 g,麻黄 10 g,炙甘草 10 g,白芥子 10 g,土鳖虫 8 g,桃仁 8 g,红花 10 g,川芎 10 g,地龙 10 g。规格为 15 g/袋,江中制药股份有限公司,批号:20030003,使用时溶于 0.9% 生理盐水中,配置成浓度为 0.2925、0.585、1.17 g/ml 的混悬液。博来霉素冻干疏松块状物,浙江瀚晖制药有限公司,批号:20067411。

1.3 主要试剂与仪器

一抗:葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78,批号:1152920301)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP,批号:0601520401)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2,批号:3507482104)、B 淋巴细胞瘤 2 相关 X (Bax,批号:3560003008);二抗:辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的山羊抗兔抗体(批号:9300014001)、ABScript II RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover (批号:9619580410)、2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (批号:9619030716),均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;克老素 (Klotho) 一抗(批号:87471702),美国 Sigma 公司;转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 一抗(批号:YT4632),美国 Immuno-way 生物科技有限公司; α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 一抗(批号:ab7817A),英国 Abcam 公司;苏木素染液(批号:ZH200205)、伊红染色液(批号:ZH202404)、Masson 三色染色液(批号:ZH203506)、BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号:HJ201012)、考马斯亮蓝染色(批号:HJ201203)、Trizol 试剂盒(批号:HP192402)、蛋白酶抑制剂(批号:HJ202008)、SDS-PAGE(批号:HJ202025)、山羊血清(批号:HP203608),武汉赛维尔生物科

技有限公司;水合利醛(批号:C11916117),武汉安特捷生物技术有限公司。

全自动核酸蛋白分析仪(杭州厚泽生物科技有限公司,型号:Qsep100);高速冷冻离心机(上海艾研生物科技有限公司,型号:5425R);实时荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96 Touch)、电泳仪(型号:PowerPac)、蛋白转印系统(型号:1704150)、成像系统(型号:ChemiDoc Touch),美国 BioRad 公司;光学显微镜及照相系统(深圳市星明光学仪器有限公司,型号:XM-50)、激光共聚焦扫描显微镜(北京普瑞赛司仪器有限公司,型号:Smart-proof 5);自动生物组织包埋机(济南童鑫生物科技有限公司,型号:BK-TEI 型);切片机(德国 Leica 公司,型号:RM2255);电动匀浆器[桂宁(上海)实验器材有限公司,型号:749540-0000];全自动组织研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司,型号:KZ-II)。

1.4 造模、分组及给药

采用随机数字表法将 50 只小鼠分为空白对照组、模型组和温肺化纤颗粒低、中、高剂量组,每组 10 只。除空白对照组外,其余各组小鼠腹腔注射 4% 水合利醛 0.1 ml/10 g 麻醉,气管内一次性滴入博来霉素 5 mg/kg 建立肺纤维化模型^[9],空白对照组给予小鼠气管内滴入等量的生理盐水。本研究模型组最终成模 7 只,温肺化纤颗粒低、中、高剂量组分别成模 8、9、9 只。造模后温肺化纤颗粒灌胃剂量经人与小鼠体表面积比值折算,其中中剂量为人与小鼠的等效剂量 5.85 g/kg,低剂量为 2.925 g/kg,高剂量为 11.7 g/kg,每日 1 次,给予药物体积为 0.1 ml/10 g 灌胃。模型组和空白对照组给予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃,各组均连续灌胃 28 天,期间小鼠可自由饮食、饮水。

1.5 观察指标及方法

末次给药 24 h 后,腹腔注射 4% 水合利醛 0.1 ml/10 g 麻醉后处死小鼠,取小鼠左肺上叶于 4% 多聚甲醛固定 24 h,以备包埋切片,用于 HE 染色、Masson 染色以及免疫组化检测;剩余肺组织液氮冻存,于 -80℃ 冰箱保存。

1.5.1 肺脏病理形态 HE 染色:于 4% 多聚甲醛固定的小鼠肺脏过夜,乙醇梯度脱水、二甲苯透明,石蜡常规包埋和切片,进行脱蜡至水,放入苏木素中浸泡,自来水洗,进行 1% 盐酸酒精分化,5 s 后自来水冲洗,再乙醇脱水,二甲苯透明,最后中性树脂封片,并在显微镜下镜检,图像采集分析。

Masson 染色：包埋步骤同 HE 染色，取小鼠肺脏石蜡块，常规脱蜡、乙醇梯度脱水，参照 Masson 染色试剂盒操作，再进行乙醇梯度脱水，二甲苯透明，最后采用中性树脂封片，并于显微镜下观察拍照。

1.5.2 Real-time PCR 法检测肺组织 Klotho、 α -SMA、TGF- β 1、GRP78、CHOP mRNA 表达 各组根据随机数字表法分别取 3 只小鼠肺组织 20 mg。置于 EP 管中，按 Trizol 说明书进行提取总 RNA，采用全自动核酸蛋白分析仪测定 RNA 浓度。测定完成后，依据 ABScript II RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover 说明书进行逆转录操作，反应完成后，获得实验所需的 cDNA，并进行扩增。以 1 μ l cDNA 为模板扩增，依次 95 $^{\circ}$ C 3 min，1 个循环；95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 30 s，共 40 个循环。按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析，引物均由武汉赛维尔生物科技有限公司进行合成，详见表 1， β -actin 为内参。

表 1 肺组织 Klotho、 α -SMA、TGF- β 1、GRP78、CHOP mRNA 引物序列

引物	序列 (5'-3')	产物长度/bp
Klotho	上游: GGCCGACCATTTTCAGGGATT	138
	下游: GGCGGAAAGAGGTGTTGTAGAG	
α -SMA	上游: TGAGCGTGGCTATTCCTTCGT	105
	下游: GCAGTGGCCATCTCATTTTCAA	
TGF- β 1	上游: GGCGGTGCTCGCTTTGTAC	131
	下游: TCCCGAATGTCTGA CGTATTGA	
GRP78	上游: TCTTTGCGGCTATGTACTATCT	176
	下游: TTCTAATAGGACCTTCACGT	
CHOP	上游: GAGACATGGGCATACAGGAGCT	113
	下游: AGCATCCAGCAAACCATCAACT	
β -actin	上游: GTGACGTTGACATCCGTAAAGA	287
	下游: GTAACAGTCCGCCiAGAAGCAC	

注：Klotho，克老素； α -SMA， α 平滑肌肌动蛋白；TGF- β 1，转化生长因子 β 1；GRP78，葡萄糖调节蛋白 78；CHOP，C/EBP 同源蛋白。

1.5.3 Western blot 法检测小鼠肺组织 Klotho、GRP78、CHOP、Bax、Bcl-2 蛋白表达 各组根据随机数字表法分别取 3 只小鼠肺组织 50 mg 置于 2 ml EP 管中，加入提前配置好的含有蛋白酶抑制剂的总蛋白提取液，于全自动组织研磨仪中充分研磨后，置于冰上静置 30 min，并于 4 $^{\circ}$ C 高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心（离心半径 6.2 cm）15 min，小心吸取上清液，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。样品在电泳仪下 100 V 电泳 2 h。电泳完成后，取出胶体，放入转膜液里静置 15 min，考马斯亮蓝室

温染色显影，转膜液中转膜，转膜仪下电压 50 V、电流 250 mA，时间持续 2 h。转膜完成后，5% 脱脂奶粉封闭 2 h，洗膜，滴加 1 : 1000 一抗稀释液，4 $^{\circ}$ C 摇床过夜，1 : 2000 二抗稀释液室温孵育 2 h，最后进行显色反应，并在成像系统中扫描、拍照，获取图片，采用 Image J 1.44 软件进行灰度值分析。

1.5.4 免疫组化法检测小鼠肺组织 TGF- β 1 和 α -SMA 表达 各组根据随机数字表法分别取 3 只小鼠肺脏石蜡块，进行常规切片、脱蜡，3% 过氧化氢室温 10 min，清除过氧化物酶活性，纯水冲洗 3 次，每次 6 min；然后将切片放入固定容器内，加入 PBS，置于高温烤箱中，温度控制在 95 $^{\circ}$ C，持续 15 min 进行高温抗原修复，室温静置 15 min 后，加入 5% 山羊血清封闭，静置 15 min，甩去血清，加入 1 : 200 一抗稀释液，4 $^{\circ}$ C 过夜，进行室温复温，而后 PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。滴加 1 : 500 二抗稀释液，37 $^{\circ}$ C 恒温箱静置 30 min，PBS 冲洗 3 次，每次 5 min。最后进行 DAB 显色，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树脂封片，显微镜拍照读片，Image J 1.44 进行图片分析。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量数据均符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，方差齐性者采用 LSD 法，方差不齐者采用 Dunnett T° 检验， $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况比较

空白对照组小鼠形态正常，精神状态佳，皮毛光亮致密有泽，进食、饮水正常，活跃，精神状态良好。模型组小鼠形体较瘦小，毛发光泽度差，动作迟缓，精神差，饮食、饮水较差。温肺化纤颗粒低、中、高剂量组小鼠形态、精神状态、进食、饮水和活跃度均优于模型组，其中以温肺化纤颗粒中剂量组小鼠状态最佳，其次为温肺化纤颗粒高剂量组，再次为温肺化纤颗粒低剂量组。

2.2 各组小鼠肺组织病理形态结果

图 1、图 2 示，空白对照组小鼠肺脏 HE 染色可见小鼠肺脏结构清晰完整，肺泡间隔未见增生，未见成纤维细胞聚集；Masson 染色未见蓝色胶原纤维的沉积。与空白对照组比较，模型组小鼠肺脏 HE 染色可见肺泡间隔增厚，出现明显的炎性细胞

浸润以及纤维组织增生，病变区肺泡结构受到破坏，部分肺泡间隔出现断裂；Masson 染色可见明显的蓝色胶原纤维沉积。与模型组比较，温肺化纤颗粒各剂量组肺脏 HE 染色可见肺泡间隔稍增厚，炎性细胞浸润及纤维组织增生减少，病变肺泡结构破坏减轻，肺泡间隔断裂情况稍好转；Masson 染色可见温肺化纤颗粒各剂量组小鼠肺脏中蓝色胶原纤维沉积减少，其中温肺化纤颗粒中剂量组蓝色胶原纤维沉积最少，其次为温肺化纤颗粒高剂量组，温肺化纤颗粒低剂量组蓝色胶原纤维沉积最多。

2.3 各组小鼠肺组织中 Klotho、TGF-β1、α-SMA、GRP78 和 CHOP mRNA 表达比较

表 2 示，与空白对照组比较，模型组小鼠肺脏 TGF-β1、α-SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显升高，Klotho mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，温肺化纤颗粒各剂量组小鼠肺脏

TGF-β1、α-SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显降低，Klotho mRNA 表达明显升高 ($P<0.01$)；与温肺化纤颗粒低剂量组比较，温肺化纤颗粒中、高剂量组 TGF-β1、α-SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显降低，温肺化纤颗粒中剂量组 Klotho mRNA 表达明显升高 ($P<0.01$)；与温肺化纤颗粒高剂量组比较，温肺化纤颗粒中剂量组 α-SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达明显降低，Klotho mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

2.4 各组小鼠肺组织中 TGF-β1、α-SMA 蛋白免疫组化检测

图 3、图 4 示，空白对照组小鼠肺组织可见少量 TGF-β1、α-SMA 蛋白的表达；与空白对照组比较，模型组小鼠肺组织中 TGF-β1、α-SMA 蛋白含量明显增加；与模型组比较，温肺化纤颗粒各剂量组小鼠肺组织中 TGF-β1、α-SMA 蛋白含量明显减

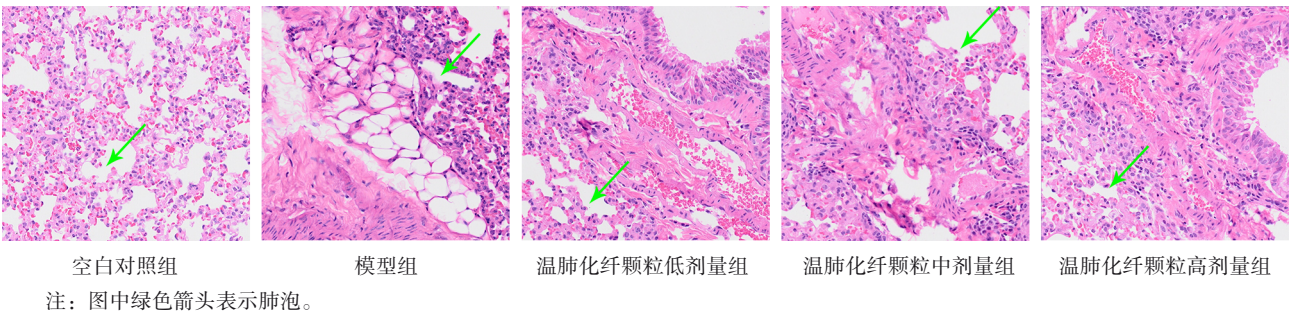


图 1 各组小鼠肺组织病理形态 HE 染色结果 (×200)

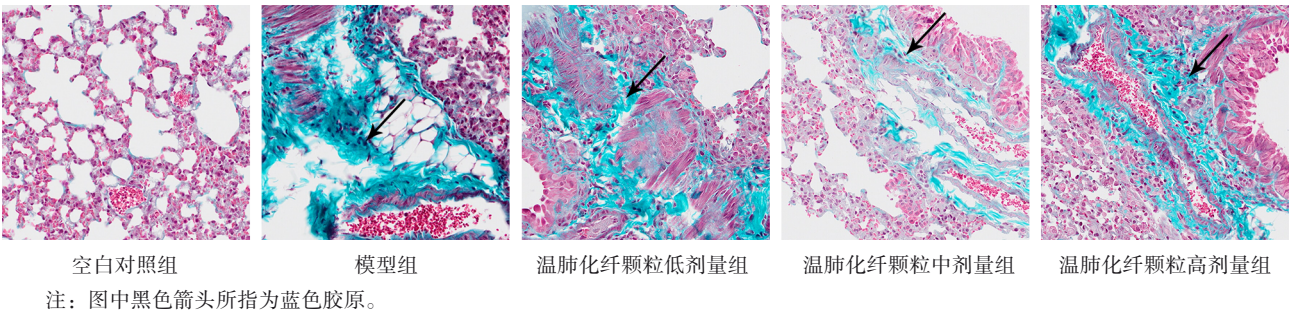
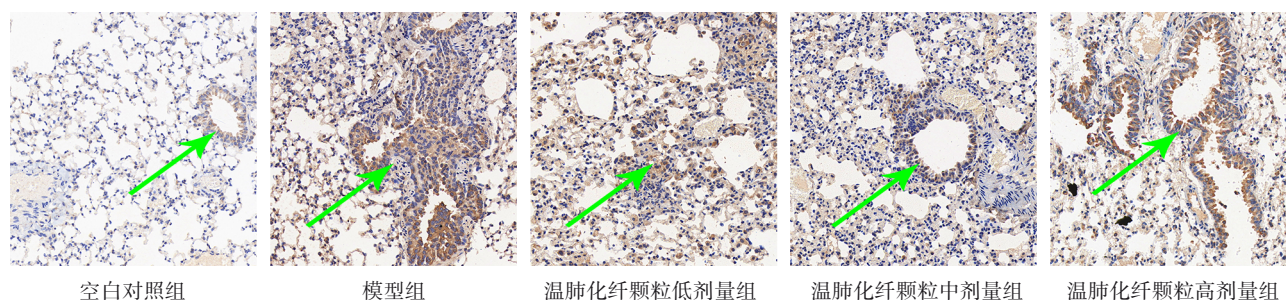


图 2 各组小鼠肺组织病理形态 Masson 染色结果 (×200)

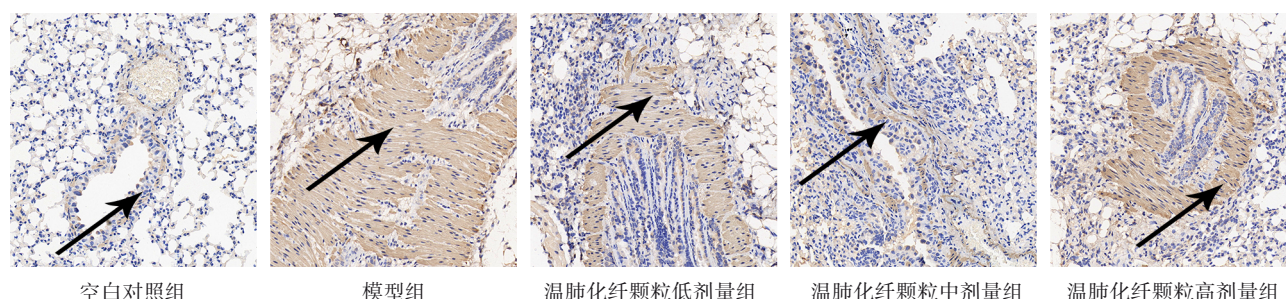
表 2 各组小鼠肺组织中 Klotho、TGF-β1、α-SMA、GRP78、CHOP mRNA 表达比较 (/β-actin, $\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	Klotho	TGF-β1	α-SMA	GRP78	CHOP
空白对照组	3	0.99±0.08	0.20±0.01	0.29±0.02	0.23±0.02	0.29±0.04
模型组	3	0.37±0.04 ^{a)}	1.05±0.03 ^{a)}	1.09±0.05 ^{a)}	1.03±0.32 ^{a)}	1.07±0.18 ^{a)}
温肺化纤颗粒低剂量组	3	0.57±0.07 ^{b)}	0.67±0.04 ^{b)}	0.77±0.13 ^{b)}	0.81±0.14 ^{b)}	0.71±0.08 ^{b)}
温肺化纤颗粒中剂量组	3	0.72±0.03 ^{b) c) d)}	0.52±0.03 ^{b) c)}	0.51±0.06 ^{b) c) d)}	0.54±0.06 ^{b) c) e)}	0.55±0.03 ^{b) c) e)}
温肺化纤颗粒高剂量组	3	0.58±0.03 ^{b)}	0.55±0.08 ^{b) c)}	0.66±0.04 ^{b) c)}	0.61±0.05 ^{b) c)}	0.63±0.03 ^{b) c)}

注：Klotho，克老素；TGF-β1，转化生长因子β1；α-SMA，α平滑肌肌动蛋白；GRP78，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，C/EBP同源蛋白。
 a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与温肺化纤颗粒低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与温肺化纤颗粒高剂量组比较， $P<0.01$ ；e) 与温肺化纤颗粒高剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：绿色箭头所指为蛋白阳性表达部位。

图3 各组小鼠肺组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 蛋白免疫组化阳性表达结果



注：黑色箭头所指为蛋白阳性表达部位。

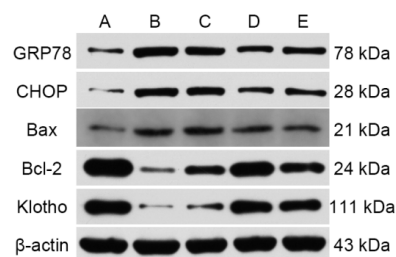
图4 各组小鼠肺组织中 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 蛋白免疫组化阳性表达结果

少，其中温肺化纤颗粒中剂量组褐色阳性表达量最少，其次为温肺化纤颗粒高剂量组、温肺化纤颗粒低剂量组。

2.5 各组小鼠肺组织中 Klotho、GRP78、CHOP、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达比较

表3示，与空白对照组比较，模型组小鼠肺组织中GRP78、CHOP、Bax蛋白表达明显升高，Klotho、Bcl-2蛋白表达明显降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，温肺化纤颗粒低剂量组GRP78、CHOP蛋白表达明显降低，温肺化纤颗粒中、高剂量组GRP78、CHOP、Bax蛋白表达明显降低，温肺化纤颗粒各剂量组Klotho、Bcl-2蛋白表达明显升高 ($P<0.01$)；与温肺化纤颗粒低剂量组比较，温肺化纤颗粒中、高剂量组Bax、GRP78、CHOP蛋白表达明显降低，Klotho、Bcl-2蛋白表达明显升高 ($P<0.01$)；与温肺化纤颗粒高剂量组比较，温肺化纤

颗粒中剂量组Bax、GRP78、CHOP蛋白表达明显降低，Bcl-2表达明显升高 ($P<0.01$)。各组小鼠肺组织中Klotho、GRP78、CHOP、Bax和Bcl-2蛋白电泳图见图5。



注：A，空白对照组；B，模型组；C，温肺化纤颗粒低剂量组；D，温肺化纤颗粒中剂量组；E，温肺化纤颗粒高剂量组；GRP78，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，C/EBP同源蛋白；Bax，B淋巴细胞瘤2相关X；Bcl-2，B淋巴细胞瘤2；Klotho，克老素。

图5 各组小鼠肺组织中Klotho、GRP78、CHOP、Bax和Bcl-2蛋白电泳图

表3 各组小鼠肺组织中Klotho、GRP78、CHOP、Bax和Bcl-2蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	GRP78	CHOP	Bax	Bcl-2	Klotho
空白对照组	3	0.21±0.01	0.27±0.04	0.20±0.03	1.28±0.14	0.96±0.05
模型组	3	1.08±0.06 ^{a)}	1.05±0.04 ^{a)}	0.62±0.08 ^{a)}	0.44±0.04 ^{a)}	0.39±0.03 ^{a)}
温肺化纤颗粒低剂量组	3	0.76±0.11 ^{b)}	0.87±0.03 ^{b)}	0.57±0.05	0.61±0.04 ^{b)}	0.54±0.07 ^{b)}
温肺化纤颗粒中剂量组	3	0.56±0.03 ^{b) c) d)}	0.55±0.10 ^{b) c) d)}	0.37±0.05 ^{b) c) d)}	0.86±0.08 ^{b) c) d)}	0.66±0.04 ^{b) c)}
温肺化纤颗粒高剂量组	3	0.61±0.04 ^{b) c)}	0.66±0.09 ^{b) c)}	0.45±0.03 ^{b) c)}	0.79±0.07 ^{b) c)}	0.63±0.03 ^{b) c)}

注：GRP78，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，C/EBP同源蛋白；Bax，B淋巴细胞瘤2相关X；Bcl-2，B淋巴细胞瘤2；Klotho，克老素。

a) 与空白对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与温肺化纤颗粒低剂量组比较， $P<0.01$ ；d) 与温肺化纤颗粒高剂量组比较， $P<0.01$ 。

3 讨论

肺纤维化属中医学“肺痿”范畴。对于其病机的论述,任玉娇等^[10]认为,气虚是肺纤维化的发病之本,心肾阳虚是本病发展的必然趋势,血络瘀阻贯穿疾病始终。苏健等^[11]认为,肺虚是本病之本,同时伴痰浊、瘀血等病理产物的产生。可见,肺纤维化病机特点为本虚邪实。肺为娇脏,外合皮毛,开窍于鼻,故六淫等邪气侵袭多易犯肺,损伤肺之阳气,致肺阳亏虚。气是血液生成和运行的动力,肺内阳气亏虚,不能推动血行,血液凝滞为瘀^[12]。脾主运化水液,上输于肺,通过肺的宣发肃降输布全身。若肺内阳气亏虚,不能行水,水道不通,出现脾的运化功能异常,津液停聚为痰,阻碍脾气,气机阻滞,加重瘀血的内生;肺失肃降,肾之纳气功能受损,转而发为咳喘。国医大师洪广祥教授提出“治肺不远温”的学术观点,认为肺纤维化的治疗应采用“全程温肺”的治疗之法^[13]。本团队在凝练洪广祥教授学术观点的基础上,发现肺纤维化的病机为阳气亏虚、寒凝痰瘀,与外科“阴疽”病机十分相似。根据中医“异病同治”的治疗原则,以阳和汤为基础方,加入活血化瘀之品;而久病入络,再予虫类药物以达“搜剔窜透”之功,最终创立温肺化纤汤,具有温阳益气、化痰散瘀、散寒通络之效^[7]。

目前普遍认为,肺泡上皮和成纤维细胞相互作用、肺泡上皮细胞的损伤以及上皮间质转化(EMT)是导致肺纤维化发病的关键机制^[14],而EMT形成的标志性蛋白为 α -SMA表达增高^[15]。TGF- β 1是目前公认导致肺纤维化的重要细胞因子,在肺纤维化的形成中起决定性作用,能促进大量炎症因子的产生并趋化至特定组织,进而影响成纤维细胞的增殖,导致EMT的发生^[16]。另有研究^[17]表明,在暴露于具有破坏内质网蛋白糖基化的抗生素衣霉素中,ERS被激发,并通过激发TGF- β 1介导的Smad2/3信号通路,最终导致EMT的发生。当体内ERS持续存在时,ERS标志性蛋白GRP78表达明显上调,激活内质网中凋亡诱导因子CHOP的表达,并启动凋亡相关机制,通过下调抑制凋亡相关蛋白Bcl-2的表达,增加促凋亡相关蛋白Bax的表达。而Klotho基因作为体内抗衰老基因,可通过缓解ERS诱导肺脏病理损伤的发生,发挥肺脏的保护作用^[18-19]。

本研究结果显示,模型组小鼠肺脏HE和

Masson染色出现了明显的肺泡结构的破损、炎性细胞浸润、纤维组织增生以及蓝色胶原纤维沉积,表明博来霉素诱导的小鼠可出现典型的肺纤维化病理表型。另外,模型组小鼠肺组织促上皮细胞发生EMT的TGF- β 1以及EMT发生的标志性蛋白 α -SMA表达较空白对照组明显增加,可见本次实验的造模是成功的。并且TGF- β 1的表达增加可诱导ERS的发生,并诱导小鼠肺脏细胞出现凋亡^[17]。本研究结果还显示,与空白对照组比较,模型组小鼠肺脏ERS发生的标志性蛋白GRP78 mRNA和蛋白表达明显增加,提示肺脏中ERS被启动。与空白对照组比较,模型组小鼠肺脏凋亡诱导因子CHOP以及促凋亡蛋白Bax表达明显增加,抑制凋亡蛋白Bcl-2表达减少,这提示肺纤维化小鼠肺脏激活了ERS介导凋亡相关信号通路。另外,模型组小鼠抗衰老蛋白Klotho表达明显降低,这表明肺纤维化小鼠肺脏出现的细胞凋亡可能是由于Klotho蛋白表达降低导致ERS被激活所致。而经过温肺化纤颗粒各剂量干预28天后,小鼠精神状态、活跃度以及肺脏病理改变均得到明显改善,其中以温肺化纤颗粒中剂量组效果最佳。在分子生物学水平上,温肺化纤颗粒中剂量组还可降低肺组织TGF- β 1及 α -SMA mRNA和蛋白表达,降低ERS标志性蛋白GRP78及凋亡诱导因子CHOP mRNA和蛋白表达,以及促细胞凋亡蛋白Bax蛋白的表达;增加抑制凋亡蛋白Bcl-2蛋白以及抗衰老蛋白Klotho mRNA和蛋白表达。综上,温肺化纤颗粒改善肺纤维化的作用机制,可能是通过上调肺脏中抗衰老蛋白Klotho蛋白的表达,抑制ERS介导的凋亡发生,减少EMT进而达到改善肺纤维化的目的。

本实验仅初步从体内实验对温肺化纤颗粒改善肺纤维化的机制做了初步探索。今后本课题组将进行细胞实验,构建肺纤维化模型,深入探讨Klotho抑制ERS的具体作用机制以及温肺化纤颗粒在其中的干预作用。

参考文献

- [1] ARASE Y, SUZUKI F, SUZUKI Y, et al. Hepatitis C virus enhances incidence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(38): 5880-5886.
- [2] INVERNIZZI R, BARNETT J, RAWAL B, et al. Bacterial burden in the lower airways predicts disease progression in idiopathic pulmonary fibrosis and is independent of radiological disease extent [J]. Eur Respir J, 2020, 55(4): 1901519. doi: 10.1183/13993003.01519-2019.

- [3] WANG YC, DONG J, NIE J, et al. Amelioration of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by chlorogenic acid through endoplasmic reticulum stress inhibition [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(9):1147-1156.
- [4] ZHENG Q, TONG M, OU B, et al. Isorhamnetin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 117-126.
- [5] LIAO J, KAPADIA VS, BROWN LS, et al. The NLRP3 inflammasome is critically involved in the development of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8977. doi: 10.1038/ncomms9977.
- [6] 谢汝佳, 韩冰, 张成俊, 等. 内质网应激与氧化应激在肺纤维化中的作用及中药丹芍化纤胶囊对它的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(7):805-808.
- [7] 胡李慧, 朱伟, 张元兵, 等. 温肺化纤汤的组方原则与临床应用[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(5):1168-1169.
- [8] 李少峰, 魏兴洪, 高洁, 等. 温肺化纤汤干预肺纤维化大鼠肺组织中 Nrf2 含量研究[J]. *亚太传统医药*, 2020, 16(10):34-37.
- [9] 卢锦辉, 张丽, 刘子豪, 等. 博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型的建立及评价[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2019, 45(6):37-42.
- [10] 任玉娇, 朱雪, 张伟. 益气温阳活血化痰法论治特发性肺纤维化合并肺动脉高压[J]. *中医杂志*, 2017, 58(14):1186-1188, 1195.
- [11] 苏健, 张伟. 基于肺络癥瘕聚散理论探讨特发性肺间质纤维化的病机及治疗[J]. *中医杂志*, 2021, 62(11): 947-950, 970.
- [12] 景传庆, 张伟. 在“肺生血”理论下论“肝肺循环轴”与特发性肺纤维化[J]. *中医杂志*, 2019, 60(16):1371-1373, 1377.
- [13] 龚年金, 李少峰, 刘良倚. 治肺不远温思想在特发性肺间质纤维化治疗中的运用[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2):905-908.
- [14] DOTAN Y, SHAPIRO WB, MALE E, et al. Clinical predictors and explant lung pathology of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *ERJ Open Res*, 2020, 6(4):00261-2019.
- [15] YAMADA M, KUBO H, OTA C, et al. The increase of microRNA-21 during lung fibrosis and its contribution to epithelial-mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells[J]. *Respir Res*, 2013, 14(1):95.
- [16] LIM WC, CHOI JW, SONG NE, et al. Polysaccharide isolated from persimmon leaves (*Diospyros kaki* Thunb.) suppresses TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in A549 cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 164:3835-3845. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.155.
- [17] 曹林峰, 赵卉, 秦厚应, 等. 褪黑素减轻博来霉素诱发小鼠肺纤维化早期的内质网应激反应[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(2):227-232.
- [18] MYTYCH J. Klotho and neurons: mutual crosstalk between autophagy, endoplasmic reticulum, and inflammatory response [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(8): 1542-1543.
- [19] DELITSIKOU V, JARAD G, RAJARAM RD, et al. Klotho regulation by albuminuria is dependent on ATF3 and endoplasmic reticulum stress[J]. *FASEB J*, 2020, 34(2):2087-2104.

Effect of *Wenfei Huaxian Granule* (温肺化纤颗粒) on Lung Injury in Mice with Pulmonary Fibrosis based on Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathway

ZHU Guoshuang¹, QIU Mingliang², KE Shiwen², LI Shaofeng², MO Lisha², XU Lei², LIU Liangji²

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004; 2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Wenfei Huaxian Granule* (温肺化纤颗粒, WHG) in treating pulmonary fibrosis (PF). **Methods** Fifty Kunming mice were randomly divided into blank control group, model group, WHG low, medium and high dose groups, with 10 mice in each group. Except for the blank control group, bleomycin were instilled into the trachea of the mice to develop PF models. After modelling, the suspension of WHG at the dose of 2.925 g/(kg·d), 5.85 g/(kg·d) and 11.7 g/(kg·d) were given by gavage to the mice in WHG low, medium and high dose groups, respectively, while the blank control group and the model group were given 0.1mL/10g of normal saline by gavage; the administration in all the groups lasted for 28 days. HE and Masson staining were used to detect the pathological changes of lung in mice 24h after the last administration; real-time PCR was used to detect the Klotho, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), α -smooth muscle actin (α -SMA), glucose regulatory protein 78 (GRP78) and C/EBP homologous protein (CHOP) mRNA expression; the expressions of Klotho, GRP78, CHOP, B lymphoma 2 related X (Bax) and B lymphoma 2 (Bcl-2) protein were detected by Western blotting; TGF- β 1 and α -SMA protein expression in the lung tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared to those in the blank group, the alveolar septum in the model group was thickened;

the alveolar structure in the lesion area was damaged, and obvious deposition of blue collagen fibers was observed. The expression of TGF- β 1, α -SMA, GRP78 and CHOP mRNA increased significantly ($P<0.01$), while Klotho mRNA decreased significantly ($P<0.01$); the expression of TGF- β 1, α -SMA, GRP78, CHOP and Bax protein increased significantly ($P<0.01$), while the expression of Klotho and Bcl-2 protein decreased significantly ($P<0.01$). Compared to those in the model group, the lung injury, alveolar septum thickening, alveolar structure damage and deposition of blue collagen fibers in the lung of mice in WHG low, medium and high dose groups were improved; the expression of TGF- β 1, α -SMA, GRP78 and CHOP mRNA decreased significantly ($P<0.01$), while Klotho mRNA expression increased significantly ($P<0.01$); the expression of GRP78, CHOP and Bax proteins in the WHG medium and high dose groups decreased significantly ($P<0.01$), and the expression of Klotho and Bcl-2 proteins in all the dose groups of WHG increased significantly ($P<0.01$). When compared between different doses of WHG, the medium dose group had the least blue collagen fiber deposition, the lowest expression of α -SMA, GRP78, and CHOP mRNA, the highest expression of Klotho mRNA, the lowest expression of Bax, GRP78 and CHOP proteins, and the highest expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** WHG can inhibit the PF, and its mechanism maybe related to the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, thereby reducing epithelial-mesenchymal transition.

Keywords pulmonary fibrosis; *Wenfei Huaxian Granule* (温肺化纤颗粒); endoplasmic reticulum stress; epithelial-mesenchymal transition

(收稿日期: 2021-06-28; 修回日期: 2021-09-10)

[编辑: 王利芬]

(上接第 1987 页)

Effect of Early Pulmonary Rehabilitation Combining Tuna (Exhalation and Inhalation) and Tuina on Exercise Endurance and Quality of Life in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease

LAI Xue, LI Shan, WU Wei, GAO Feng, WANG Bin

Wangjing Hospital, Chinese Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102

ABSTRACT **Objective** To explore the clinical effect of early pulmonary rehabilitation therapy of Tuna (exhalation and inhalation) and Tuina on exercise endurance and quality of life of patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). **Methods** Totally 66 AECOPD patients were randomly assigned to control group (33 cases) and treatment group (33 cases). Patients in both groups were treated with conventional therapy; additionally, rehabilitation program combining Tuna and Tuina was performed in treatment group within 3 days after admission. Treatment lasted for 3 weeks, and was followed up till the 8th week since enrollment. The forced expiratory volume in the first second (FEV1), the six-minute walking distance (6MWD) and the chronic obstructive pulmonary disease assessment test (CAT) score were assessed before treatment, after treatment and at follow up. Pearson correlation analysis was performed to evaluate the correlations between the indicators. **Results** Compared to those before treatment, FEV1 and 6MWD significantly increased in both groups after treatment and at follow-up, while the CAT scores decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); higher FEV1 and 6MWD as well as lower CAT score were found at follow-up than after treatment in the treatment group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while only higher 6MWD ($P<0.05$) and not significant differences in the FEV1 and CAT score ($P>0.05$) were shown in the control group when compared between after treatment and at follow up. There was a significant positive correlation between 6MWD and FEV1 ($r=0.333$, $P=0.009$), and a significant negative correlation between 6MWD and CAT ($r=-0.384$, $P=0.002$) in both groups before treatment. **Conclusion** The early pulmonary rehabilitation combining Tuina and Tuna within three days after admission has a certain effect on improvement of the respiratory function, exercise endurance and quality of life of patients with AECOPD, and the effect is lasting after the treatment.

Keywords chronic obstructive pulmonary disease; acute exacerbation; pulmonary rehabilitation; Tuna (exhalation and inhalation); Tuina; exercise endurance; quality of life

(收稿日期: 2021-06-24; 修回日期: 2021-08-31)

[编辑: 叶晨]