

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.05.013

益气养阴活血通络方对特发性肺纤维化模型大鼠血小板活化及肺组织 CD40-CD40L 系统的影响

刘勇明¹, 李斯宇², 庞立健¹, 臧凝子¹, 姜昕³, 王佳然²,
梁元钰², 谢思梦¹, 程美佳¹, 闵冬雨¹, 吕晓东²✉

1. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁省沈阳市皇姑区北陵大街 33 号, 110032; 2. 辽宁中医药大学; 3. 辽宁中医药大学附属第四医院

[摘要] **目的** 基于 CD40-CD40L 系统探讨益气养阴活血通络方治疗特发性肺纤维化 (IPF) 的可能作用机制。**方法** 96 只 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、吡非尼酮组、益气养阴活血通络组, 每组 24 只。除空白组外, 其余各组大鼠采用气管内注射盐酸博来霉素制备 IPF 大鼠模型。造模次日吡非尼酮组采用吡非尼酮胶囊序贯方式灌胃, 第 1~7 天给药剂量 62.5 mg/(kg·d), 第 8~14 天给药剂量 125 mg/(kg·d), 第 15~28 天给药剂量 187.5 mg/(kg·d); 益气养阴活血通络组给予益气养阴活血通络方颗粒剂 18 g/(kg·d) 灌胃; 空白组和模型组每日给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。各组大鼠均每日灌胃 1 次, 连续 28 天。分别于模型制备次日起第 7、14、28 天 (各组每个时间点 8 只大鼠) 时采用 HE 染色观察各组大鼠肺脏组织病理形态学变化; 碱水解法检测肺组织羟脯氨酸 (HYP) 含量; 酶联免疫吸附试验检测血清纤溶酶原激活物抑制因子 (PAI)、凝血因子 IX (FIX)、凝血因子 VII (FVII)、血小板因子 4 (PF-4) 表达水平; 流式细胞术检测血小板 CD41、CD62P 表达水平; 蛋白免疫印迹法检测肺脏组织 CD40、CD40L 蛋白水平。**结果** 空白组大鼠肺组织病理 HE 染色显示正常。模型组大鼠病理显示第 7 天时肺泡间隔增宽、腔内炎症细胞聚集, 肺间质可见明显水肿; 第 14 天时肺间质内可见胶原纤维增生; 第 28 天时肺泡逐渐萎缩, 胶原纤维大量沉积。与空白组同时间点比较, 模型组大鼠第 7、14、28 天肺组织 HYP 含量, 血小板 CD41、CD62P 表达水平, 血清 PAI、FIX、FVII、PF-4 表达水平, 肺组织 CD40、CD40L 蛋白水平均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组同时间点比较, 吡非尼酮组和益气养阴活血通络组大鼠肺组织病理形态学显示炎症细胞浸润明显改善、纤维化程度显著减轻。各给药组大鼠第 7、14、28 天肺组织 HYP 含量, 血小板 CD41 表达水平, 血清 PAI、FIX、FVII、PF-4 表达水平, 肺组织 CD40、CD40L 蛋白水平均有不同程度下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与吡非尼酮组比较, 益气养阴活血通络组大鼠第 7 d、14 d、28 d 肺组织 HYP 含量及血清 PAI、FIX、FVII、PF-4 表达水平均下降, 第 7、28 天血小板 CD41、CD62P 表达水平下降, 第 28 天肺组织 CD40 蛋白水平下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 益气养阴活血通络方治疗 IPF 机制可能与抑制血小板活化和 CD40-CD40L 系统从而改善肺纤维化病理损伤有关。

[关键词] 特发性肺纤维化; 益气养阴活血通络方; 血小板活化; CD40-CD40L 系统

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种以逐渐加重的呼吸困难和肺功能不可逆性下降为特征的慢性、进行性、致命性的纤维化

间质性肺疾病^[1]。西医治疗药物尼达尼布、吡非尼酮虽然能够延缓 IPF 疾病进展、改善肺功能指数, 但无法改变 IPF 患者的生存率^[2]。本项目组受到中医络病理论启发, 提出 IPF 核心病机在于“肺虚络瘀”, 采用补虚通络法、通补络脉法、益气养阴活血通络法进行辨治, 应用益气养阴活血通络方进行干预^[3]。前期临床试验^[4]证实, 补虚通络疗法可

基金项目: 国家自然科学基金 (82204993, 8227440, 82004294); 辽宁省教育厅重点攻关项目 (L202067); 辽宁省教育厅青年科技人才“育苗”项目 (L202029, L202046); 辽宁中医药大学自然科学类重点项目 (2021LZY040)

✉ 通讯作者: deanofctcm@126.com

有效改善 IPF 患者肺功能指数,在延缓 IPF 急性加重方面疗效明确。动物实验证实,益气养阴活血通络方可有效减轻 IPF 大鼠的肺组织炎症程度和纤维化程度,降低肺组织羟脯氨酸(HYP)含量以减少细胞外基质沉积^[5-6]。目前,血小板活化在 IPF 发病过程中的重要作用越来越受到重视,成为早期干预 IPF 的研究焦点,但具体机制尚不清楚^[7]。研究发现,CD40-CD40L 系统是成纤维细胞和其他结构细胞的重要活化剂,属于肿瘤坏死因子超家族成员共刺激分子,当血小板被二磷酸腺苷(ADP)、凝血酶等激活后表达于活化的血小板膜表面,在肺部急性炎症、肺纤维化过程中发挥关键作用^[8]。因此,本研究从血小板活化和 CD40-CD40L 系统方面探讨益气养阴活血通络方治疗 IPF 的潜在作用机制,为临床推广应用提供参考。本研究已通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(批准号:210000420020016)。

1 材料

1.1 动物

SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 96 只,6~8 周龄,体质量(180±20)g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司统一提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2019-0010,饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房,饲养条件:室温(20±2)℃,相对湿度(70±10)%,昼夜节律 12 h 光照,适应性饲养 1 周。

1.2 药物

益气养阴活血通络方组成:黄芪、北沙参、熟地黄、地龙、当归、川芎、炙甘草等(涉及保密),比例分别为 3:2:1.5:1.5:1.5:1.5:1.5,颗粒剂由江阴天江药业有限公司提供,溶于蒸馏水,4℃保存。吡非尼酮胶囊(北京康蒂尼药业有限公司,国药准字 H20133376,规格:100 mg/粒,批号:20190830),溶于生理盐水,4℃保存。

1.3 主要试剂及仪器

注射用盐酸博来霉素(瀚晖制药有限公司,规格:1.5 万单位/瓶,批号:20026111),每瓶加入 3 ml 生理盐水,充分混匀,4℃保存;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:P0010);高效 RIPA 裂解液(批号:R0010)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号:G1120),索莱宝生物科技有限公司;4%多聚甲醛溶液(批号:D16013)、水合氯醛(批号:C804539),上海麦克

林生化科技有限公司;大鼠纤溶酶原激活物抑制因子(PAI)、凝血因子 IX(FIX)、凝血因子 VII(FVII)、血小板因子 4(PF-4)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml003021、ml003137、ml059276、ml003001);HYP 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号:A030-2-1);CD40 抗体(ABclonal 公司,批号:A13285);CD40 L 抗体(Abcam 公司,货号:ab65854);CD41 抗体(Biorbyt 公司,批号:orb7680);CD62P 抗体(Bio-Legend 公司,批号:148305);HRP 标记亲和纯化山羊抗兔 IgG 二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:SA00001-2)。

Centrifuge 5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);BX41 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Gel Doc™ XR+型全自动凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);RM2245 型半自动轮转式病理切片机(德国 Leica 公司);Tanon-5200Multi 型全自动化学发光荧光成像系统(上海天能科技有限公司);Infinite F50 型酶标仪(德国 Tecan 公司);CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 动物造模与分组

96 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法选取 24 只作为空白组,造模过程中一次性给予气管内注射生理盐水(5 mg/kg)。剩余 72 只大鼠再按照随机数字表法分为模型组、吡非尼酮组、益气养阴活血通络组,每组 24 只,造模过程中一次性给予气管内注射盐酸博来霉素(5 mg/kg)^[9]制备 IPF 大鼠模型。肺组织 HE 染色结果显示肺泡间隔明显增宽且伴有塌陷,胶原纤维大量沉积,或伴有炎性细胞浸润以及肺组织 HYP 含量显著升高,提示造模成功^[9]。

2.2 给药方法

根据人与动物体表面积折算等效剂量比率表^[10]计算,益气养阴活血通络组大鼠给予益气养阴活血通络方颗粒剂 18 g/(kg·d)灌胃,每日 1 次;吡非尼酮组大鼠按照临床应用规律和药物说明书“剂量递增原则”采用序贯方式灌胃,第 1~7 天给药剂量为 62.5 mg/(kg·d),第 8~14 天给药剂量为 125 mg/(kg·d),第 15~28 天给药剂量为 187.5 mg/(kg·d),每日 1 次。空白组和模型组每日给予 10 ml/kg 生理盐水灌胃。各组大鼠均于造模后次日灌胃给药,共 28 天。

2.3 观察指标及方法

于模型制备次日起第 7、14、28 天 3 个时间点进行取材, 各组大鼠各时间点采用随机数字表法取 8 只, 禁食 24 h 后采用 7% 水合氯醛 (0.5 ml/100 g) 腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 4℃、3600 r/min (离心半径为 8.7 cm) 离心 10 min, 分离血清, -80℃密封保存备用。快速打开胸腔, 充分剥离两侧肺脏, 右肺组织放入 4% 多聚甲醛固定液, 室温固定 48 h; 左肺组织放入冻存管, 置于液氮, -80℃密封保存备用。

2.3.1 观察大鼠一般状态 实验期间观察各组大鼠的呼吸、活动、精神、皮毛、摄食量、饮水量、体质量情况。

2.3.2 观察肺脏组织病理学表现 取出右肺, 脱水透明, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm, HE 染色, 光学显微镜观察肺脏组织病理学表现。

2.3.3 碱水解法检测肺组织 HYP 含量 精确称取肺组织湿重 80 mg, 剪碎加入水解液 1 ml, 研磨组织至充分混匀, 沸水浴水解 20 min, 调节 pH 值至指示剂颜色变成黄绿色, 双蒸水定容至 10 ml, 活性炭吸附, 按照试剂盒说明书操作步骤进行, 取上清, 使用酶标仪波长 550 nm 测定各管吸光度值。

2.3.4 酶联免疫吸附试验检测血清 PAI-1、FIX、FVII、PF-4 表达水平 取血清, 严格按照试剂盒说明书的操作步骤进行, 使用酶标仪获取吸光度值, 根据标准曲线计算 PAI-1、FIX、FVII、PF-4 表达水平。

2.3.5 流式细胞术检测血小板 CD41、CD62P 表达水平 腹主动脉采集新鲜抗凝血 5 ml, 4℃、1000 r/min (离心半径为 5.2 cm) 离心 20 min, 分离外周血小板, 采集上层富含血小板液体层, 加入 PBS 重悬血小板, 进行流式细胞术分析, 使用 CD41、CD62P 流式抗体染色, 避光常温孵育 30 min, 采用流式细胞仪分析血小板细胞百分比。

2.3.6 蛋白免疫印迹法检测肺组织 CD40、CD40L 蛋白水平 每组采用随机数字表法选取 6 只大鼠肺组织进行检测。取研碎肺组织, 加入高效 RIPA 裂解液, 组织研磨机低温高速离心取上清液, 检测总蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, PVDF 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭。1:1000 稀释一抗, 加入一抗 CD40、CD40L 孵育过夜。PBS 冲洗, 1:10 000 稀释二抗, 加入二抗室温孵育 60 min, 再次 PBS 冲洗, 化学发光显色, Image Pro Plus 6.0 软件进行条带灰度分析。计算各目的条带与内参 β-actin 光密

度比值作为各蛋白的相对表达量。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。计量资料均符合正态分布, 以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐者组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett's T^s 法。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般状态

实验期间, 空白组大鼠精神状态良好, 反应灵敏, 体态正常, 活动自如, 皮毛光亮顺滑, 进食量和饮水量正常。造模后, 大鼠精神状态萎靡, 反应迟钝, 体质量下降明显, 蜷缩懒动, 皮毛凌乱发黄且易脱落, 出现咳嗽、喘息、呼吸困难, 进食量、饮水量明显减少。给药后, 各给药组大鼠的一般状态较模型组均有一定改善, 且各给药组大鼠一般状态差异不明显。

3.2 各组大鼠不同时间肺脏病理学情况

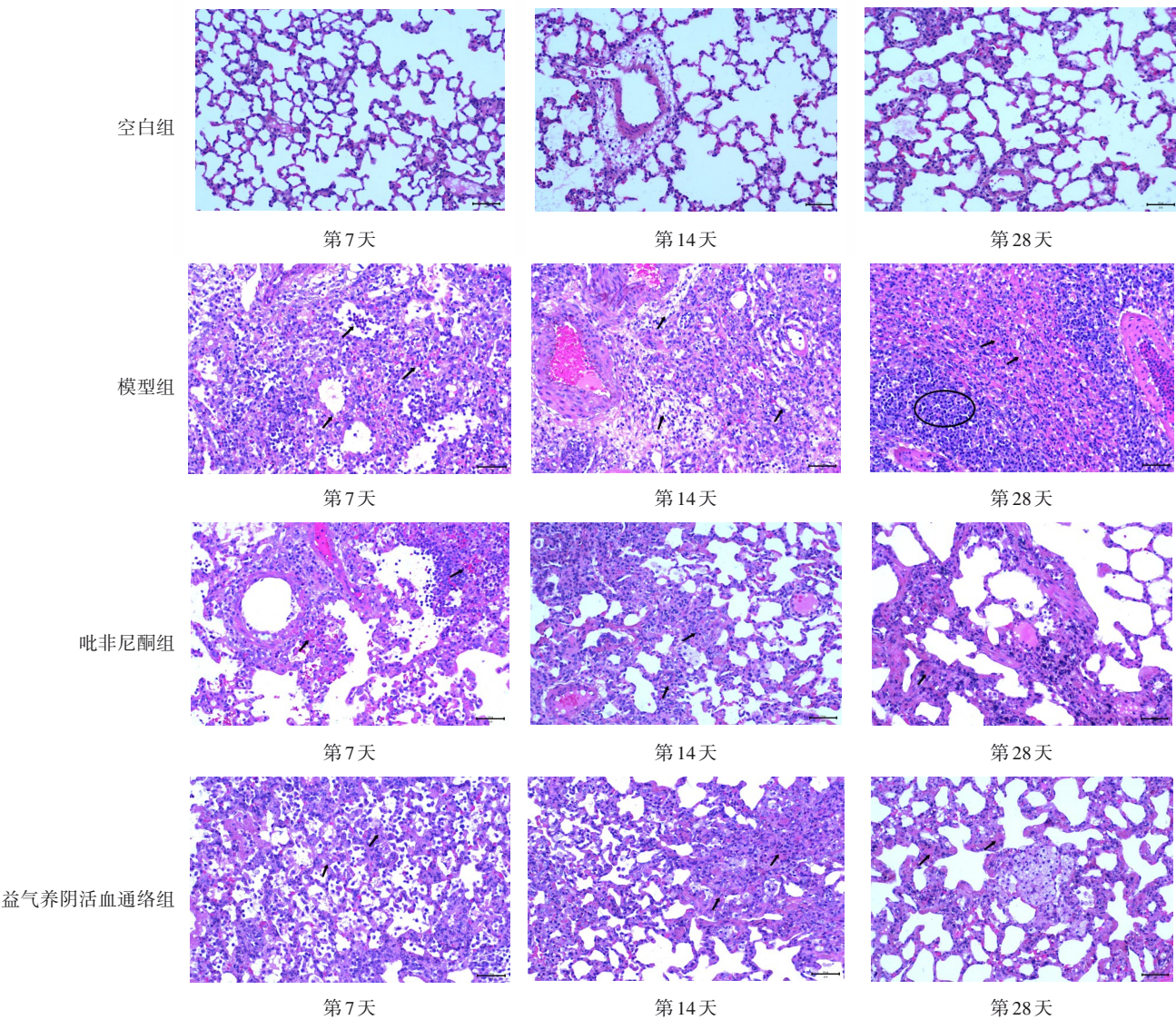
图 1 示, 空白组大鼠肺泡间隔正常、腔内无渗出物, 肺间质未见充血、水肿、炎性浸润与纤维化改变。模型组大鼠第 7 天时肺泡间隔增宽、腔内炎症细胞聚集, 肺间质可见明显水肿; 第 14 天时肺泡间隔增宽、肺泡腔缩小, 腔内炎症细胞减少且成纤维细胞取而代之, 肺间质内可见胶原纤维增生; 第 28 天时肺泡间隔明显增宽且伴有塌陷, 肺泡逐渐萎缩, 胶原纤维大量沉积, 可见纤维瘢痕与蜂窝肺形成。与模型组比较, 吡非尼酮组和益气养阴活血通络组大鼠第 7 天炎症细胞浸润明显改善, 第 14 天胶原纤维增生显著减轻, 第 28 天显著抑制纤维程度并使肺泡结构相对完整。吡非尼酮组和益气养阴活血通络组相比, 第 28 天病理改变差异不显著。

3.3 各组大鼠不同时间肺组织 HYP 含量比较

表 1 示, 与空白组同时时间点比较, 模型组大鼠第 7 天、第 14 天、第 28 天肺组织 HYP 含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组同时时间点比较, 各给药组大鼠第 7 天、第 14 天、第 28 天肺组织 HYP 含量均显著下降 ($P < 0.01$); 与吡非尼酮组同时时间点比较, 益气养阴活血通络组大鼠第 7 天、第 14 天、第 28 天肺组织 HYP 含量均下降 ($P < 0.01$)。

3.4 各组大鼠不同时间血小板 CD41、CD62P 表达水平比较

表 2 示, 与空白组同时时间点比较, 模型组大鼠第 7 天、第 14 天、第 28 天血小板 CD41、CD62P 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组同时时间



注：箭头为炎性细胞浸润，圆圈为胶原纤维沉积。

图1 各组大鼠不同时间肺脏组织病理学形态（HE，×200）

Figure 1 Histopathological Morphology of the Lung Tissues of Rats in Each Group at Different Timepoints (HE, ×200)

表1 各组大鼠不同时间肺组织HYP含量比较

Table 1 Comparison of HYP Content in Lung Tissues at Different Timepoints in Each Group of Rats (μg·mg⁻¹, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第7天	第14天	第28天
空白组	8	0.789±0.042	0.812±0.134	0.808±0.101
模型组	8	2.453±0.080 ^{a)}	2.796±0.140 ^{a)}	2.854±0.053 ^{a)}
吡非尼酮组	8	1.664±0.172 ^{b)}	1.595±0.122 ^{b)}	1.472±0.072 ^{b)}
益气养阴活血通络组	8	1.246±0.135 ^{b)c)}	1.127±0.093 ^{b)c)}	1.031±0.091 ^{b)c)}

注：HYP，羟脯氨酸。

a) 与空白组同时间点比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时间点比较， $P<0.01$ ；c) 与吡非尼酮组同时间点比较， $P<0.01$ 。

点比较，除吡非尼酮组第28天时CD62P表达差异无统计学意义外，益气养阴活血通络组和吡非尼酮组各时间点血小板CD41、CD62P表达水平均下降($P<0.01$)；与吡非尼酮组同时间点比较，益气养阴活血通络组大鼠第7天、第28天血小板CD41、

CD62P表达水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.5 各组大鼠不同时间血清PAI、FⅨ、FⅦ、PF-4表达比较

表3示，与空白组同时间点比较，模型组大鼠第7天、第14天、第28天血清PAI、FⅨ、FⅦ、PF-4表

表2 各组大鼠不同时间血小板CD41、CD62P表达水平比较

Table 2 Comparison of the Expression of CD41 and CD62P in Platelet at Different Timepoints in Each Group or Rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD41			CD62P		
		第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
空白组	8	8.678±0.661	8.535±0.555	8.685±0.657	13.457±0.608	12.975±1.038	13.938±1.248
模型组	8	14.203±0.791 ^{a)}	15.642±0.906 ^{a)}	18.498±0.506 ^{a)}	24.078±1.100 ^{a)}	33.447±0.713 ^{a)}	49.553±1.846 ^{a)}
吡非尼酮组	8	12.240±1.046 ^{b)}	13.342±0.394 ^{b)}	15.533±0.693 ^{b)}	21.383±0.891 ^{b)}	30.567±0.995 ^{b)}	45.390±4.140
益气养阴活血通络组	8	11.228±0.728 ^{b) c)}	12.757±0.246 ^{b)}	14.233±0.460 ^{b) d)}	16.150±1.172 ^{b) d)}	30.510±1.036 ^{b)}	34.908±1.254 ^{b) d)}

注：a) 与空白组同时时间点比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时时间点比较， $P<0.01$ ；c) 与吡非尼酮组同时时间点比较， $P<0.05$ ；d) 与吡非尼酮组同时时间点比较， $P<0.01$ 。

表3 各组大鼠不同时间血清PAI、FIX、FⅦ、PF-4表达比较

Table 3 Comparison of Serum PAI, FIX, FⅦ, and PF-4 Expressions in Each group of Rats at Different Timepoints ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PAI/pg·ml ⁻¹			PF-4/ng·ml ⁻¹		
		第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
空白组	8	2378.968±165.651	2314.484±171.951	2352.183±184.815	10.610±0.309	10.586±0.323	10.620±0.328
模型组	8	3244.048±109.459 ^{a)}	3418.651±190.275 ^{a)}	3523.810±219.943 ^{a)}	12.775±0.208 ^{a)}	12.967±0.257 ^{a)}	13.046±0.321 ^{a)}
吡非尼酮组	8	2960.317±50.015 ^{b)}	2991.071±58.543 ^{b)}	3057.540±46.809 ^{b)}	12.008±0.107 ^{b)}	12.101±0.120 ^{b)}	12.322±0.134 ^{b)}
益气养阴活血通络组	8	2763.889±31.958 ^{b) d)}	2797.619±45.887 ^{b) d)}	2820.436±41.552 ^{b) d)}	11.461±0.166 ^{b) d)}	11.653±0.145 ^{b) d)}	11.683±0.144 ^{b) d)}

组别	鼠数	FIX/ng·ml ⁻¹			FⅦ/ng·ml ⁻¹		
		第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
空白组	8	76.599±3.253	76.656±3.142	76.599±3.368	31.113±1.413	30.924±1.502	30.865±1.449
模型组	8	92.855±2.249 ^{a)}	97.556±4.357 ^{a)}	103.078±6.156 ^{a)}	39.172±1.378 ^{a)}	41.402±1.732 ^{a)}	42.582±3.203 ^{a)}
吡非尼酮组	8	87.106±0.856 ^{b)}	87.984±1.090 ^{b)}	88.578±1.399 ^{b)}	36.210±0.442 ^{b)}	36.717±0.477 ^{b)}	37.178±0.298 ^{c)}
益气养阴活血通络组	8	82.915±0.972 ^{b) d)}	83.509±1.054 ^{b) d)}	84.019±1.083 ^{b) d)}	33.897±0.657 ^{b) d)}	34.641±0.565 ^{b) d)}	35.089±0.408 ^{b) d)}

注：PAI，纤溶酶原激活物抑制因子；PF-4，血小板因子4；FIX，凝血因子IX；FⅦ，凝血因子Ⅶ。

a) 与空白组同时时间点比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时时间点比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组同时时间点比较， $P<0.05$ ；d) 与吡非尼酮组同时时间点比较， $P<0.05$ 。

达水平均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组同时时间点比较，各给药组大鼠第7天、第14天、第28天血清PAI、FIX、FⅦ、PF-4表达水平均有不同程度下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与吡非尼酮组同时时间点比较，益气养阴活血通络组大鼠第7天、第14天、第28天血清PAI、FIX、FⅦ、PF-4表达水平均下降 ($P<0.05$)。

3.6 各组大鼠不同时间肺组织CD40、CD40L蛋白水平比较

表4示，与空白组同时时间点比较，模型组大鼠

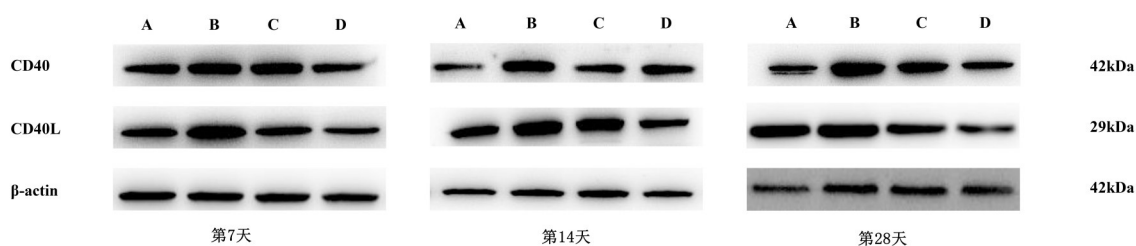
第7天、第14天、第28天肺组织CD40、CD40L蛋白水平均显著升高 ($P<0.01$)；与模型组同时时间点比较，各给药组大鼠第7天、第14天、第28天肺组织CD40、CD40L蛋白水平均有不同程度下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与吡非尼酮组同时时间点比较，益气养阴活血通络组大鼠第14天肺组织CD40蛋白水平显著升高、第28天肺组织CD40蛋白水平显著降低 ($P<0.05$)。各组大鼠肺组织CD40、CD40L蛋白电泳图见图2。

表4 各组大鼠肺组织CD40、CD40L蛋白水平比较

Table 4 Comparison of CD40 and CD40L Protein Levels in Lung Tissue in Each Group of Rats ($/\beta$ -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CD40			CD40L		
		第7天	第14天	第28天	第7天	第14天	第28天
空白组	6	0.952±0.053	0.810±0.039	0.730±0.064	1.000±0.060	1.181±0.048	0.868±0.110
模型组	6	1.257±0.115 ^{a)}	1.357±0.155 ^{a)}	1.265±0.054 ^{a)}	1.607±0.086 ^{a)}	1.490±0.125 ^{a)}	1.170±0.034 ^{a)}
吡非尼酮组	6	1.142±0.059 ^{b)}	1.053±0.091 ^{c)}	0.864±0.019 ^{c)}	1.121±0.055 ^{c)}	1.344±0.124 ^{b)}	0.913±0.088 ^{c)}
益气养阴活血通络组	6	1.124±0.044 ^{c)}	1.200±0.066 ^{b) d)}	0.799±0.051 ^{c) d)}	1.078±0.120 ^{c)}	1.223±0.094 ^{c)}	0.924±0.095 ^{c)}

注：a) 与空白组同时时间点比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组同时时间点比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组同时时间点比较， $P<0.01$ ；d) 与吡非尼酮组同时时间点比较， $P<0.05$ 。



注：A，空白组；B，模型组；C，吡非尼酮组；D，益气养阴活血通络组。

图2 各组大鼠肺组织CD40、CD40L蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of CD40 and CD40L in Lung Tissues of Rats in Each Group

4 讨论

目前，IPF发病机制尚不明确，临床证候错综复杂。根据IPF临床表现特点，中医将其归为“肺痹”“肺痿”等范畴。我们认为IPF病变过程中的气道炎症、肺间质改变、肺微血管内皮细胞异常修复、肺成纤维细胞过度活化、细胞外基质大量沉积与中医邪入络脉、肺络构效失衡、影响脏腑功能相似，可归属于“络病”范畴^[11]，病机核心在于肺虚络瘀。“肺虚”以肺阴亏虚为本、络虚不荣为枢，“络瘀”以痰瘀伏络为本、痰热毒瘀互结为要，因此，从益气养阴活血通络角度立法制定益气养阴活血通络方。方中黄芪、北沙参、熟地黄针对IPF“肺络空虚”之根本，黄芪益气通络，北沙参、熟地黄养阴通络，以上三味重在通补络脉；当归兼具补血、活血之功，川芎有活血、行气之效，以上二味辛香走窜，重在活血通络；地龙具有平喘通络之效，剔邪搜络，可引诸药直达病变之肺络；炙甘草既可润肺止咳、又可调和诸药。全方旨在表里并调、五脏兼顾，体现辛以通络、虫以通络、络虚通补之用药特点，共达益气养阴、活血通络之效。

有研究发现，大量巨核细胞在肺内动态生产血小板^[12]，这一研究打破了人们以往对血小板生成部位的认识。高凝状态及持续纤维蛋白沉积是导致IPF进展的重要因素^[13]。血小板主要以非活化形式在机体中循环，然而当血小板暴露于化学刺激物时，将发生结构变化即血小板活化^[14]。血小板活化与细胞表面标志物CD41、CD62P表达增加有关，是血小板活化的灵敏标记物^[15]。血小板活化后引发的高凝状态和持续纤维蛋白沉积则可导致IPF发生发展，亦可直接或间接导致凝血功能障碍^[16]。FⅦ能够与组织因子结合，激活FⅨ以促进高凝状态形成^[17-18]。PAI在老年小鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞和肺成纤维细胞中均高度表达，PF-4是一种由血小板α粒子构成的特殊蛋白，PAI、PF-4表达亢进均

能够促进血管新生以产生促纤维效应^[19]。研究发现，CD40-CD40L系统参与介导血小板活化，IPF发病机制与血小板活化以及活化后导致凝血功能障碍关系密切^[20]，因此CD40-CD40L系统介导血小板活化为深入阐明IPF发病机制提供研究思路。

本研究结果显示，模型组大鼠一般状态不佳且出现咳嗽、喘息、呼吸困难症状，肺组织HE染色发现随着时间点推移出现肺泡腔内炎症细胞聚集、肺间质明显水肿逐渐被肺泡萎缩、腔内成纤维细胞聚集，肺间质胶原纤维大量沉积的现象，表明博来霉素诱导大鼠可出现典型肺纤维化病理表型。模型组大鼠肺组织HYP含量较空白组明显增加，可见本研究模型成功建立。本研究探讨了益气养阴活血通络方对IPF模型大鼠血小板活化与CD40-CD40L系统的作用，结果显示，益气养阴活血通络方能够显著改善IPF大鼠的一般状态、肺组织病理学形态以及降低肺组织HYP含量，且相较于吡非尼酮，益气养阴活血通络方对于肺组织HYP含量改善程度更为明显；益气养阴活血通络法能够显著降低各时间点IPF大鼠血小板CD41、CD62P表达水平，且相较于吡非尼酮，益气养阴活血通络方在第7天、第28天对于血小板CD41、CD62P表达水平改善程度更为明显，说明益气养阴活血通络方能够在IPF早期发挥血小板活化抑制作用，且作用效果持续显著；益气养阴活血通络方能够显著降低各时间点IPF大鼠血清PAI、FⅨ、FⅦ、PF-4表达水平，且相较于吡非尼酮，益气养阴活血通络方在各时间点对于血清PAI、FⅨ、FⅦ、PF-4表达水平改善程度更为明显，提示益气养阴活血通络方改善IPF大鼠凝血功能障碍效果优于吡非尼酮。与吡非尼酮组同时间比较，益气养阴活血通络组大鼠第14天肺组织CD40蛋白水平显著升高、第28天肺组织CD40蛋白水平显著降低，提示吡非尼酮可能对于早中期CD40调节效果良好，而益气养阴活血通络

方可能对于晚期 CD40 调节效果良好,但需要进一步实验证实。以上结果说明经益气养阴活血通络方干预后能够明显下调 CD40-CD40L 表达,与既往研究结果^[21-22]一致,均表明抑制血小板活化和 CD40-CD40L 系统对于延缓 IPF 进程具有积极作用。

综上,益气养阴活血通络方能够有效降低 IPF 大鼠血小板 CD41、CD62P 表达水平以及血清 PAI、F IX、F VII、PF-4 表达水平,抑制肺组织 CD40、CD40L 蛋白水平,改善肺组织病理改变,其机制可能与抑制血小板活化和 CD40-CD40L 系统有关。本研究不足之处在于,未利用透射电镜等技术从直观角度观察益气养阴活血通络方干预后对血小板形态的影响,今后需进一步深入探究。

参考文献

- [1] 中华中医药学会内科分会,中国民族医药学会肺病分会,中华中医药学会肺系病分会. 特发性肺纤维化中医证候诊断标准(2019 版)[J]. 中医杂志,2020,61(18): 1653-1656.
- [2] SGALLA G, FRANCIOSA C, SIMONETTI J, et al. Pamrevlumab for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2020, 29(8): 771-777.
- [3] 刘创,庞立健,吕晓东. 特发性肺纤维化“肺虚络瘀”病机发微[J]. 上海中医药杂志,2014,48(3): 22-24.
- [4] 任延毅,吕晓东,庞立健,等. 补虚通络疗法治疗特发性肺纤维化的预后分析[J]. 中华中医药杂志,2016,31(5): 1959-1962.
- [5] 庞立健,吕晓东,袁佳,等. 益气养阴活血通络法干预肺成纤维细胞 TGF- β 1/Smads 信号传导通路的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22): 125-131.
- [6] 郑钰,吕晓东,刘创,等. 通补络脉法干预特发性肺纤维化大鼠肺组织 Hyp 及下丘脑 DA、NE 影响研究[J]. 中华中医药学刊,2019,37(4): 846-849, 1044.
- [7] 王佳然,刘勇明,庞立健,等. 基于“肺生血”理论探讨特发性肺纤维化的效应机制[J]. 时珍国医国药,2021,32(12): 2987-2989.
- [8] 王淑娟,胡魁,韩静茵,等. CD40-CD40L 交联系统在矽肺纤维化形成中的作用机制[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2020,38(2): 96-100.
- [9] 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.
- [10] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9): 1069-1072.
- [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] LEFRANÇAIS E, ORTIZ-MUÑOZ G, CAUDRILLIER A, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors [J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 105-109.
- [13] NTOLOS P, PAPANAS N, NENA E, et al. Mean platelet volume as a surrogate marker for platelet activation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2016, 22(4): 346-350.
- [14] LINDBERG U, SVENSSON L, HELLMARK T, et al. Increased platelet activation occurs in cystic fibrosis patients and correlates to clinical status[J]. *Thromb Res*, 2018, 162: 32-37. doi: 10. 1016/j. thromres. 2017. 12. 012.
- [15] 陈曾凤,兰培敏,陈汉玉,等. 雷公藤多苷联合甲氨蝶呤治疗类风湿关节炎活动期患者的疗效及对血清 CD62p、CD41 的影响[J]. 现代生物医学进展,2018,18(20): 3909-3912, 3921.
- [16] 刘勇明,吕晓东,庞立健,等. 肺间质纤维化凝血机制探微[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(4): 880-882.
- [17] LIN C, BORENSZTAJN K, SPEK CA. Targeting coagulation factor receptors-protease-activated receptors in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *J Thromb Haemost*, 2017, 15(4): 597-607.
- [18] ZHANG T, LIU M, GAO Y, et al. Salvianolic acid B inhalation solution enhances antifibrotic and anticoagulant effects in a rat model of pulmonary fibrosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111475. doi: 10. 1016/j. biopha. 2021. 111475.
- [19] 顾燕兰,张雅琴,孙钢. 莪术醇对大鼠肺纤维化模型的干预作用及对 TGF- β 1 和 PAI-1 表达的影响[J]. 中医药导报,2019,25(10): 27-31.
- [20] DAVÌ G, FERRONI P. CD40-CD40L interactions in platelet activation [J]. *Thromb Haemost*, 2005, 93(6): 1011-1012.
- [21] ZHAN T, WEI T, DONG L, et al. Cangrelor alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis by inhibiting platelet activation in mice[J]. *Mol Immunol*, 2020, 120: 83-92. doi: 10. 1016/j. molimm. 2020. 01. 017.
- [22] CHENG W, WANG F, FENG A, et al. CXXC5 attenuates pulmonary fibrosis in a bleomycin-induced mouse model and MLFs by suppression of the CD40/CD40L pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7840652. doi: 10. 1155/2020/7840652.

Effect of *Yiqi Yangyin Huoxue Tongluo Formula* (益气养阴活血通络方) on Platelet Activation and Lung Tissue CD40-CD40L System in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Model Rats

LIU Yongming¹, LI Siyu², PANG Lijian¹, ZANG Ningzi¹, JIANG Xin³, WANG Jiaran², LIANG Yuanyu², XIE Simeng¹, CHENG Meijia¹, MIN Dongyu¹, LYU Xiaodong²

1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese medicine, Shenyang, 110032; 2. Liaoning University of Traditional Chinese medicine; 3. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine Hospital Subsidiary Fourth

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Yiqi Yangyin Huoxue Tongluo Formula* (益气养阴活血通络方, YYHTF) in treating idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) based on CD40-CD40L system. **Methods** Totally, 96 Wistar rats were randomly divided into blank group, model group, pirfenidone group, and YYHTF group, with 24 rats in each group. IPF rat model was established by intratracheal injection of bleomycin hydrochloride in all groups except for the blank group. On the next day after modeling, the pirfenidone group was given pirfenidone capsules by sequential gavage; the dosage was 62.5 mg/kg each day on the 1st to 7th day, while 125 mg/kg on the 8th to 14th day, and 187.5 mg/kg on the 15th to 28th day. The YYHTF group was given YYHTF granules at the dosage of 18 g/kg by gavage. The blank group and model group were given 10 ml/kg of normal saline by gavage. All interventions were given once a day for 28 days. On the 7th, 14th, and 28th day since the next day after modelling (8 rats were measured at each timepoint of each group), hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of lung tissue; the contents of hydroxyproline (HYP) in lung tissue of rats in each group were detected by alkaline hydrolysis, and the expression levels of plasminogen activator inhibitor (PAI), coagulation factor IX (FIX), coagulation factor VII (FVII) and platelet factor 4 (PF-4) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay; the expression levels of CD41 and CD62P in platelets were detected by flow cytometry, and the protein levels of CD40 and CD40L in lung tissue of rats were detected by western blotting. **Results** HE staining showed normal in the lung tissue of the rats in the blank group. In the model group, pathological results showed that the alveolar septum were widened, and the inflammatory cells in the lumen were gathered with obvious edema in the pulmonary interstitium on the 7th day; collagen fibers hyperplasia was seen in the pulmonary interstitium on the 14th day; the alveoli was gradually atrophied, and a large number of collagen fibers were deposited on the 28th day. There were increased contents of HYP in lung tissue, as well as the expression levels of CD41 and CD62P in platelets, the serum PAI, FIX, FVII and PF-4 expression levels, and protein levels of CD40, CD40L in lung tissue in the model group than in the blank group measured on the same timepoint on the 7th, 14th and 28th days ($P < 0.01$). Compared to those measured at the same timepoint in the model group, the infiltration of inflammatory cells in the pirfenidone group and YYHTF group was significantly improved and the fibrosis was significantly reduced according to the pathological morphology; the contents of HYP in lung tissue, the expression levels of CD41 in platelets, expression levels of serum PAI, FIX, FVII and PF-4, and protein levels of CD40 and CD40L in lung tissue of rats in two medication groups significantly decreased to varying degrees on the 7th, 14th and 28th days ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the pirfenidone group, the contents of HYP in lung tissue, and the serum expression levels of serum PAI, FIX, FVII and PF-4 in the YYHTF group decreased on the 7th, 14th and 28th days, while the expression levels of CD41 and CD62P in platelet decreased on the 7th and 28th days, and the expression level of CD40 in lung tissue decreased on the 28th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of YYHTF in the treatment of IPF may be related to the inhibition of platelet activation and CD40-CD40L system.

Keywords idiopathic pulmonary fibrosis; *Yiqi Yangyin Huoxue Tongluo Formula* (益气养阴活血通络方); platelet activation; CD40-CD40L system

(收稿日期: 2022-06-09; 修回日期: 2022-08-23)

[编辑: 邓媛]