

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.13.013

温肺化纤汤对系统性硬化症相关间质性肺病模型小鼠肺组织纤维化及内质网应激的影响

邱明亮^{1,2}, 熊佳丽³, 肖晨晓¹, 周鑫珠¹, 莫丽莎^{1,2}, 柯诗文^{1,2}, 朱国双³, 刘良倚^{1,2}✉

1. 江西中医药大学临床医学院, 江西省南昌市八一大道 445 号, 330006; 2. 江西中医药大学附属医院; 3. 江西中医药大学中医学院

[摘要] **目的** 探讨温肺化纤汤治疗系统性硬化症相关间质性肺病 (SSc-ILD) 肺纤维化的作用机制。**方法** 将 60 只 C3H/He 雌鼠随机分为对照组、模型组、吡非尼酮组及温肺化纤汤低、中、高剂量组。除对照组外, 其余各组小鼠予博来霉素溶液 0.04 mg/d 背部皮下连续注射 28 天建立 SSc-ILD 小鼠模型。造模成功后, 吡非尼酮组予吡非尼酮胶囊 300 mg/(kg·d) 灌胃, 温肺化纤汤低、中、高剂量组分别给予温肺化纤汤 7.81、15.62、31.24 g/(kg·d) 灌胃, 对照组及模型组予生理盐水 0.1 ml/10 g 灌胃, 共 21 天。干预结束后采用 HE 染色和 Masson 染色观察小鼠皮肤及肺组织的病理变化; 检测小鼠皮肤及肺组织的羟脯氨酸含量; Western blot 法测定小鼠肺组织中的内质网应激相关蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (BIP) 和 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 及核因子 κ B (NF- κ B) 通路中 p65 的蛋白表达水平; ELISA 测定小鼠血清中的 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达水平。**结果** HE 染色、Masson 染色结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织表皮棘层肥厚, 胶原纤维明显增粗、膨大, 数量增多, 炎性细胞明显增多; 肺组织出现明显的炎性细胞反应, 大量胶原纤维增生, 并伴有炎性细胞浸润。与模型组比较, 吡非尼酮组和温肺化纤汤各剂量组皮肤组织和肺组织胶原纤维增生明显减少, 炎性细胞浸润减少, 且吡非尼酮组和温肺化纤汤中、高剂量组效果基本相当。与对照组比较, 模型组小鼠皮肤组织和肺组织羟脯氨酸含量, 血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量, 肺组织 BIP 和 CHOP 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 吡非尼酮组和温肺化纤汤低、中剂量组皮肤组织羟脯氨酸含量降低, 温肺化纤汤中剂量组肺组织羟脯氨酸含量下降, 吡非尼酮组和温肺化纤汤高剂量组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量及肺组织 BIP、CHOP 和 p65 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。温肺化纤汤中剂量组肺组织羟脯氨酸含量明显低于温肺化纤汤低、高剂量组, 温肺化纤汤低、中剂量组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量高于温肺化纤汤高剂量组, 温肺化纤汤高剂量组 BIP 蛋白表达水平明显低于温肺化纤汤低、中剂量组 ($P < 0.05$)。**结论** 温肺化纤汤可改善 SSc-ILD 模型小鼠皮肤组织及肺组织纤维化, 其作用机制可能是通过抗炎、抑制 NF- κ B 通路, 进而抑制内质网应激, 最终阻抑纤维化进程。

[关键词] 系统性硬化症; 间质性肺病; 温肺化纤汤; 内质网应激; 核因子 κ B

系统性硬化症 (systemic sclerosis, SSc) 是一种自身免疫性结缔组织疾病, 其特征是免疫失调和

进行性纤维化, 通常影响皮肤, 并累及肺脏等内脏器官^[1]。间质性肺病 (interstitial lung disease, ILD) 是 SSc 患者最常见的合并症之一, 也是导致死亡的主要原因^[1]。根据临床表现, SSc 可归属于中医学“皮痹”范畴, ILD 可归属于“肺痹”“肺痿”范畴。SSc 萎缩期脏腑受损日重, 则机能失调、正气虚衰, 可出现肺痹^[2]。肺痹加重, 可转化为肺痿, 甚则喘脱^[3]。因此, 我们认为皮痹、肺痹、肺痿分

基金项目: 国家自然科学基金 (82305162, 82260912); 江西省自然科学基金 (20212BAB206061, 20232BAB206145, 20224BAB216098); 江西省应用研究培育项目 (20212BAG70038); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2200912, GJJ211220); 江西省卫生健康委科技计划项目 (202210778); 中央引导地方科技发展资金项目 (20222ZDH01096)

✉ 通讯作者: llj6505@163.com

别是系统性硬化症相关间质性肺病 (SSc-ILD) 的不同阶段。基于洪广祥教授“治肺不远温”的学术思想^[4-6], 本团队将“全程温法”应用于肺间质纤维化, 创温肺化纤汤治疗本病, 临床疗效确切^[7], 其作用机制可能通过增强肺间充质干细胞的有氧糖酵解, 改善过氧化氢诱导的氧化应激损伤^[8], 或通过抑制内质网 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 应激介导的凋亡发生, 减少上皮-间质转化, 从而发挥抗肺纤维化作用^[9]。SSc-ILD 常见肺组织的病理类型与肺间质纤维化基本一致, 均可为非特异性间质性肺炎、寻常型间质性肺炎等^[10]。因此, 本团队拟将温肺化纤汤拓展应用于 SSc-ILD 的治疗。

ERS 是肺纤维化的分子机制之一^[11]。其中核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 信号通路是具有多种转录调控活性的转录调控因子, NF- κ B 的激活导致上皮细胞损伤、成纤维细胞增殖、实质炎症、基底膜损伤和胶原沉积, 从而促进肺间质和肺泡内的纤维化^[12]。本研究将基于 NF- κ B 信号通路观察温肺化纤汤对 SSc-ILD 模型小鼠肺组织内质网应激及肺纤维化的影响, 探讨其可能作用机制。本实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理审批号: JZLLSC20210031)。

1 材料与方法

1.1 动物

C3H/He 健康雌鼠 60 只, 6 周龄, 体质量 (20±2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物使用许可证号: SCXK[京]2021-0011888。饲养于江西中医药大学实验动物科技中心, 温度 (22±1) °C, 相对湿度为 50%, 昼夜交替环境。

1.2 药物

温肺化纤汤组成: 麻黄 2 g、鹿角霜 9 g、肉桂 3 g、炮姜 2 g、熟地黄 30 g、白芥子 6 g、炙甘草 3 g、地龙 9 g、土鳖虫 6 g、桃仁 9 g、红花 9 g、川芎 9 g、卫矛 6 g。由江西中医院大学附属医院中药制剂室制备成浓度为含生药量 4 g/ml, 密封, 4 °C 保存, 临用时稀释。吡非尼酮胶囊 (货号: H20133376, 北京康蒂尼药业股份有限公司)。

1.3 主要试剂及仪器

盐酸博来霉素 (15 mg/支, 货号: HH20171103, 日本化药株式会社), 用 PBS 缓冲液 (pH=7.4) 配制成浓度为 3 mg/ml 溶液, 置于 -20 °C 冰箱保存; DAB 试剂盒 (货号: CW2069S, 康为世纪生物科技有限公司); 4% 中性甲醛 (货号: BL539A-1,

Biosharp 公司); 羟脯氨酸测定试剂盒 (货号: A030-2-1, 南京建成生物有限公司); HE 染色试剂盒 (货号: 1120, 北京索莱宝科技有限公司); MASSON 三色染色液 (货号: DC0034, 北京雷根生物技术有限公司); 白细胞介素 6 (IL-6) ELISA 试剂盒 (货号: MM-0163M1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号: MM-0132M1)、 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂盒 (货号: MM-0182M1), 江苏酶免生物科技有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (货号: G2026)、RIPA 裂解液 (货号: G2002)、葡萄糖调节蛋白 78 (BIP) 一抗 (货号: GB11098-1)、p65 一抗 (货号: GB121421)、HRP-山羊抗兔 (货号: GB23303)、HRP-山羊抗小鼠 (货号: GB25301), Servicebio 公司; C/EBP 同源蛋白 (CHOP, 货号: 60304-1-IG, 武汉三鹰生物技术有限公司)。

组织包埋机 (型号: 1150H, 德国莱卡公司); 高速冷冻离心机 (型号: D3024R, DragonLab 公司); 酶标仪 (型号: RT-6100, Thermo Scientific 公司); 垂直电泳仪 (型号: SVE-2, Servicebio 公司); 转印电泳仪 (型号: SVT-2, Servicebio 公司); 化学发光仪 (型号: 6100, CLINX 公司)。

1.4 动物分组与造模方法

采用随机数字表法将小鼠分为对照组、模型组、吡非尼酮组及温肺化纤汤低、中、高剂量组, 每组各 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠参照文献^[10]造模: 将 C3H/He 小鼠背部中央去毛使皮肤裸露, 将盐酸博来霉素溶液稀释成浓度为 0.4 mg/ml, 皮下注射 0.1 ml, 连续注射 28 天, 构建 SSc-ILD 小鼠模型。对照组小鼠给予等量的 PBS 皮下注射。满足以下两项要求^[13]则造模成功: 1) 根据 HE、Masson 染色显示, 模型小鼠皮肤的胶原纤维束数量增多, 形状增粗, 排列紧密, 向深部扩展至部分替代皮下脂肪组织; 肺组织中出现肺泡间隔增宽伴有炎性细胞渗出及浸润, 肺泡结构破坏。2) 模型小鼠皮肤组织及肺组织胶原含量较正常小鼠明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

本研究模型组 9 只小鼠造模成功, 吡非尼酮组 8 只, 温肺化纤汤低、中、高剂量组分别 8、8、7 只造模成功。

1.5 干预方法

造模成功次日, 根据剂量经人与小鼠体表面积比值^[14]折算, 温肺化纤汤中剂量组给予 15.62 g/(kg·d) 灌胃 (人与小鼠的等效剂量), 温肺化纤汤

低、高剂量组分别给予浓度 7.81、31.24 g/(kg·d) 灌胃, 各组给予药物体积为 0.1 ml/10 g; 吡非尼酮组给予吡非尼酮胶囊 300 mg/(kg·d) 灌胃; 对照组、模型组小鼠给予生理盐水 0.1 ml/(10 g·d) 灌胃。各组均连续灌胃 21 天。

1.6 观察指标及方法

最后一次灌胃后禁食禁水, 次日取材。收集静脉血 5 ml, 普通离心机(4℃, 半径 16.21 cm)5000 r/min, 离心 5 min 后, 取血清标本, -20℃冰箱保存。处死小鼠取标本。首先于注射部位处取 1 cm×1 cm 皮肤标本, 一半浸于液氮中, 一半浸于 4 中性甲醛溶液中, 待测病理和免疫组化; 接着取肺, 左叶存于液氮中, 右叶浸于 4% 中性甲醛溶液中。

1.6.1 HE 染色、Masson 染色 皮肤和肺组织经 4% 中性甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片, 行 HE 及 Masson 染色, 按试剂盒说明书步骤进行。

1.6.2 皮肤和肺组织羟脯氨酸含量测定 取大小约 0.3 cm×0.3 cm 的皮肤和左肺组织的 1/2, 加生理盐水用匀浆器研磨成 10% 的匀浆。用羟脯氨酸试剂盒按试剂说明书进行检测, 羟脯氨酸含量=(测定 D 值-空白 D 值)/(标准 D 值-空白 D 值)×标准品浓度/样本含量/所加匀浆介质。

1.6.3 ELISA 检测血清 IFN-γ、IL-6、TNF-α 含量 按说明书使用 ELISA 试剂盒检测, 血清加样加酶。温育后洗涤, 加显色剂。终止反应后, 用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值), 计算得出各组 IFN-γ、IL-6、TNF-α 水平。

1.6.4 Western blot 法检测肺组织 BIP、CHOP、p65 蛋白表达水平 取左肺组织的 1/4, 称重后在 EP 管中剪碎。加入 RIPA 裂解液及研磨珠, 研磨机研磨至组织匀浆。4℃消化 30 min 后, 使用高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 使用 BCA 试剂在波长为 562 nm 条件下测定蛋白 OD 值, 计算上机量。经电泳、转膜、封闭、孵育一抗[参照一抗说明书, 按以下比例分别加入 ACTIN(1:3000)、p65(1:500)、BIP(1:500)和 CHOP(1:500)一抗稀释液, 4℃过夜孵育]、洗膜、孵育二抗[ACTIN、BIP 加入辣根酶标记山羊抗兔二抗(1:3000); CHOP、p65 加入辣根酶标记山羊抗鼠二抗(1:5000), 室温孵育 1 h]、洗膜及显影等步骤, 根据显影系统自带灰度分析软件(alpha-EaseFC, Alpha Innotech 公司)及图像分析软件(Adobe PhotoShop 2021, Adobe 公司)分析图像灰度, 精确计算各组与内参的条带比值, 每批样品蛋

白重复 3 次。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行分析。计量资料均用($\bar{x} \pm s$)表示, 若符合正态分布且方差齐则选择方差分析, 两两比较采用 LSD 法; 若不服从正态分布, 两两比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠皮肤组织 HE 及 Masson 染色结果

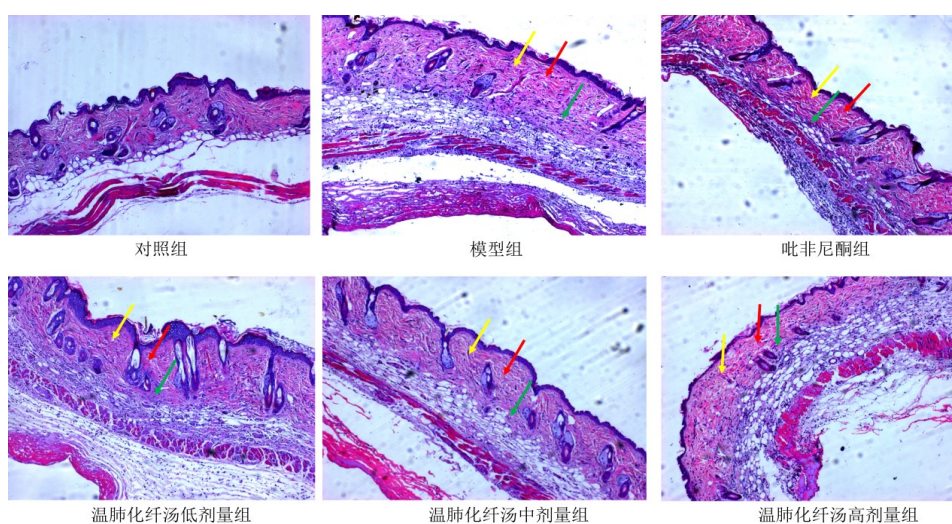
图 1、图 2 示, 对照组皮肤组织表皮层、真皮层、脂肪层、肌肉层未见明显结构变化; 模型组表皮棘层肥厚, 皮下出现大量无定形物质, 真皮层明显增厚, 胶原纤维明显增粗、膨大, 数量增多, 排列紧密, 均质化, 炎性细胞明显增多; 与模型组比较, 吡非尼酮组表皮棘层无明显肥厚, 皮下出现无定形物质明显减少, 真皮层未见明显增厚, 胶原纤维明显减少, 排列疏松, 均质化, 炎性细胞明显减少; 温肺化纤汤各剂量组均出现不同程度的好转, 胶原纤维排列较疏松, 真皮层变薄, 血管壁较薄, 毛囊增加, 脂肪层出现, 炎性细胞明显减少, 呈一定的剂量依赖性, 以温肺化纤汤中、高剂量组更为显著, 且与吡非尼酮组疗效基本相当。

2.2 各组小鼠肺组织 HE 及 Masson 染色结果

图 3、图 4 示, 对照组小鼠肺组织结构完整清晰, 肺泡间隔薄, 无明显炎细胞浸润; 模型组肺组织表现出明显的炎性细胞反应, 大量胶原纤维增生, 并伴有炎性细胞浸润; 与模型组比较, 吡非尼酮组胶原纤维增生明显减少, 炎性细胞浸润减少; 温肺化纤汤高、中和低剂量组, 其胶原纤维增生减少、炎性细胞浸润减少, 呈一定的剂量依赖性, 温肺化纤汤中、高剂量组更为显著, 且与吡非尼酮组疗效基本相当。

2.3 各组小鼠皮肤及肺组织羟脯氨酸含量比较

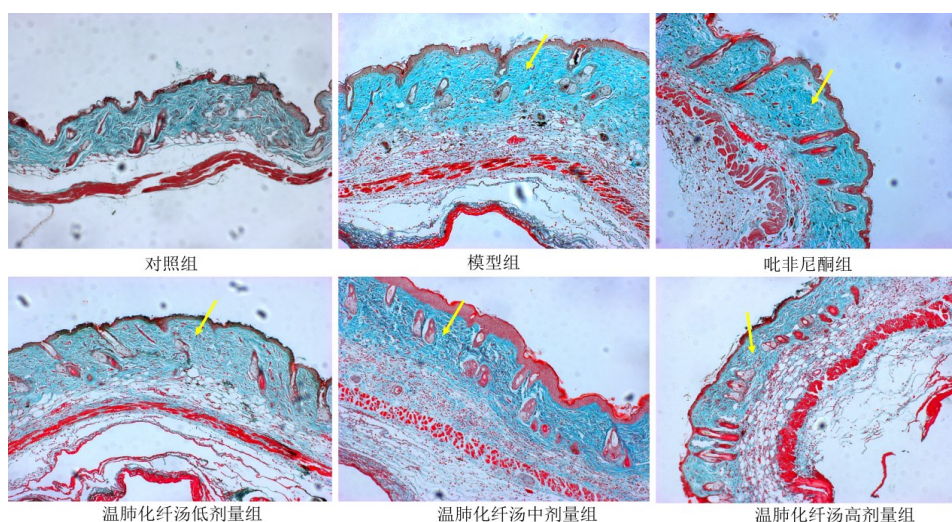
表 1 示, 与对照组比较, 模型组皮肤组织羟脯氨酸含量升高, 模型组、吡非尼酮组和温肺化纤汤高剂量组肺组织羟脯氨酸含量升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 吡非尼酮组和温肺化纤汤低、中剂量组皮肤组织羟脯氨酸含量降低, 温肺化纤汤中剂量组肺组织羟脯氨酸含量下降($P < 0.05$)。与吡非尼酮组比较, 温肺化纤汤高剂量组皮肤组织羟脯氨酸含量升高, 温肺化纤汤各剂量组肺组织羟脯氨酸含量均降低($P < 0.05$)。温肺化纤汤各剂量组间比较, 皮肤组织羟脯氨酸含量水平差异无统计



注：黄色箭头指示为胶原纤维；红色箭头指示为表皮；绿色箭头指示为炎性细胞。

图1 各组小鼠皮肤组织HE染色结果 (×100)

Figure 1 HE staining results of skin tissues in rats of each group (×100)



注：黄色箭头指示为胶原纤维。

图2 各组小鼠皮肤组织Masson染色结果 (×100)

Figure 2 Masson staining results of skin tissues in rats of each group (×100)

学意义 ($P>0.05$)；温肺化纤汤中剂量组肺组织羟脯氨酸含量低于温肺化纤汤低、高剂量组 ($P<0.05$)。

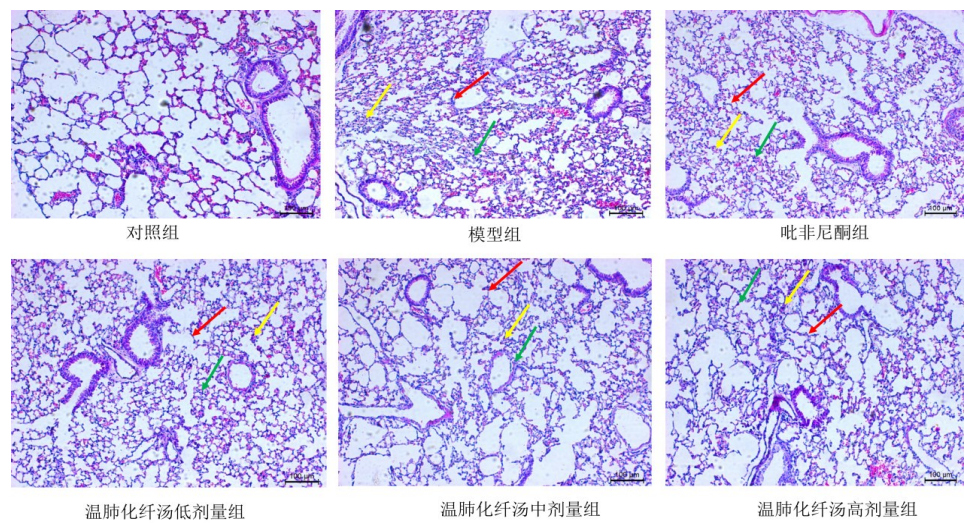
2.4 各组小鼠血清IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量比较

表2示，与对照组比较，其余各组小鼠血清IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量均升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，吡非尼酮组和温肺化纤汤高剂量组小鼠血清IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量均降低 ($P<0.05$)。与吡非尼酮组比较，温肺化纤汤各剂量组小鼠血清IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量均升高 ($P<0.05$)。与温肺化纤汤高剂量组比较，温肺化纤汤低、中剂量组小鼠血清IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量

均升高 ($P<0.05$)。温肺化纤汤低、中剂量组组间比较，各指标差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 各组小鼠肺组织BIP、CHOP及p65蛋白表达水平比较

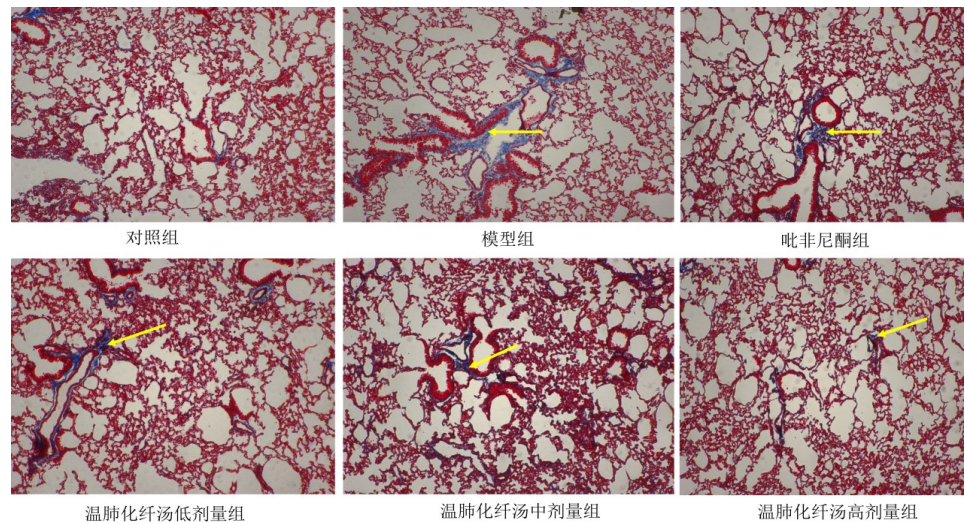
表3示，与对照组比较，模型组、温肺化纤汤低剂量组肺组织BIP和CHOP蛋白表达水平明显升高 ($P<0.05$)。与模型组比较，吡非尼酮组和温肺化纤汤高剂量组BIP、CHOP和p65蛋白表达均下降，温肺化纤汤中剂量组BIP蛋白表达下降 ($P<0.05$)。与吡非尼酮组比较，温肺化纤汤低剂量组BIP和CHOP蛋白表达升高，温肺化纤汤低剂量组CHOP蛋白表达升高 ($P<0.05$)。与温肺化纤汤低



注：黄色箭头指示为胶原纤维；红色箭头指示为肺泡间隔；绿色箭头指示为炎性细胞。

图3 各组小鼠肺组织HE染色结果 (×100)

Figure 3 HE staining results of lung tissues in rats of each group (×100)



注：黄色箭头指示为胶原纤维。

图4 各组小鼠肺组织Masson染色结果 (×100)

Figure 4 HE staining and Masson staining results of lung tissues in rats of each group (×100)

表1 各组小鼠皮肤及肺组织羟脯氨酸含量比较
Table 1 Comparison of hydroxyproline content in skin and lung tissues of rats in each group (μg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	皮肤组织	肺组织
对照组	4	2.81±0.72	0.60±0.17
模型组	3	4.25±0.47 ^{a)}	0.71±0.03 ^{a)}
吡非尼酮组	4	2.70±0.83 ^{b)}	0.75±0.03 ^{a)}
温肺化纤汤低剂量组	3	2.74±0.50 ^{b)}	0.66±0.10 ^{c) d)}
温肺化纤汤中剂量组	4	2.89±0.68 ^{b)}	0.59±0.06 ^{b) c)}
温肺化纤汤高剂量组	4	3.46±1.59 ^{c)}	0.69±0.04 ^{a) c) d)}

注：a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与吡非尼酮组比较， $P<0.05$ ；d) 与温肺化纤汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。

剂量组比较，温肺化纤汤中剂量组 BIP 蛋白表达降低，温肺化纤汤高剂量组 BIP 和 CHOP 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$)；温肺化纤汤高剂量组 BIP 蛋白表达水平明显低于温肺化纤汤中剂量组 ($P<0.05$)。各组小鼠肺组织中 BIP、CHOP、p65 蛋白电泳图见图 5。

3 讨论

《素问·痹论篇》曰：“风寒湿三气杂至，合而为痹……以秋遇此者为皮痹”，又曰：“痹……在于皮则寒”，说明寒邪是皮痹的重要致病因素。皮痹亦可传变为肺痹，如《素问·痹论篇》言：“皮痹不已，复感于邪，内舍于肺。所谓痹者，各以其时

表 2 各组小鼠血清 IFN- γ 、IL-6、TNF- α 含量比较

Table 2 Comparison of serum IFN- γ , IL-6, TNF- α levels of rats in each group (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	IFN- γ	IL-6	TNF- α
对照组	10	785.65 $\pm$ 16.45	122.31 $\pm$ 3.76	848.69 $\pm$ 42.35
模型组	9	1169.26 $\pm$ 23.73 ^{a)}	164.89 $\pm$ 7.39 ^{a)}	1213.86 $\pm$ 26.14 ^{a)}
吡非尼酮组	8	902.62 $\pm$ 18.82 ^{a) b)}	127.96 $\pm$ 6.97 ^{a) b)}	899.55 $\pm$ 44.02 ^{a) b)}
温肺化纤汤低剂量组	8	1152.02 $\pm$ 30.14 ^{a) c) d)}	163.26 $\pm$ 5.59 ^{a) c) d)}	1081.96 $\pm$ 43.45 ^{a) c) d)}
温肺化纤汤中剂量组	8	1187.63 $\pm$ 17.38 ^{a) c) d)}	159.97 $\pm$ 4.07 ^{a) c) d)}	1219.43 $\pm$ 20.86 ^{a) c) d)}
温肺化纤汤高剂量组	7	992.06 $\pm$ 31.52 ^{a) b) c)}	147.13 $\pm$ 2.14 ^{a) b) c)}	1061.56 $\pm$ 135.10 ^{a) b) c)}

注：IFN- γ ， γ 干扰素；IL-6，白细胞介素6；TNF- α ，肿瘤坏死因子 α 。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与吡非尼酮组比较， $P<0.05$ ；d) 与温肺化纤汤高剂量组比较， $P<0.05$ 。

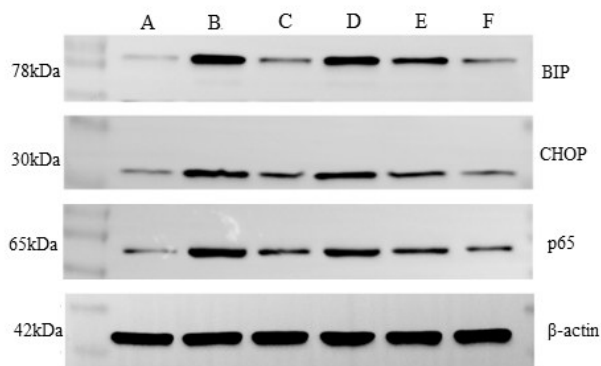
表 3 各组小鼠肺组织 BIP、CHOP 和 p65 蛋白表达水平比较

Table 3 Comparison of protein expression levels of BIP, CHOP and p65 in lung tissue of rats in each group (/actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BIP	CHOP	p65
对照组	3	0.37 $\pm$ 0.24	0.31 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.21
模型组	3	0.97 $\pm$ 0.45 ^{a)}	0.82 $\pm$ 0.52 ^{a)}	0.63 $\pm$ 0.32
吡非尼酮组	3	0.43 $\pm$ 0.03 ^{b)}	0.41 $\pm$ 0.19 ^{b)}	0.40 $\pm$ 0.15 ^{b)}
温肺化纤汤低剂量组	3	0.87 $\pm$ 0.35 ^{a) c)}	0.73 $\pm$ 0.41 ^{a) c)}	0.54 $\pm$ 0.25
温肺化纤汤中剂量组	3	0.66 $\pm$ 0.19 ^{b) c) d)}	0.56 $\pm$ 0.29	0.49 $\pm$ 0.21
温肺化纤汤高剂量组	3	0.35 $\pm$ 0.10 ^{b) d) e)}	0.37 $\pm$ 0.12 ^{b) d)}	0.42 $\pm$ 0.01 ^{b)}

注：BIP，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，C/EBP同源蛋白。

a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ ；c) 与吡非尼酮组比较， $P<0.05$ ；d) 与温肺化纤汤低剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与温肺化纤汤中剂量组比较， $P<0.05$ 。



注：BIP，葡萄糖调节蛋白78；CHOP，C/EBP同源蛋白；A，对照组；B，模型组；C，吡非尼酮组；D，温肺化纤汤低剂量组；E，温肺化纤汤中剂量组；F，温肺化纤汤高剂量组。

图 5 各组小鼠肺组织中 BIP、CHOP、p65 蛋白电泳图

Figure 5 Electrophoresis of BIP, CHOP and p65 proteins in lung tissues of rats in all groups

重感于风寒湿之气也”，以及《素问·玉机真脏论篇》曰：“风寒客于人……弗治，病入舍于肺，名

曰肺痹”。肺痿病名最早见于《金匱要略》。《金匱要略·脏腑经络先后病脉证》中记载：“息张口短气者，肺痿唾沫”，《金匱要略·肺痿肺痛咳嗽上气病脉证治》指出，“肺痿吐涎沫而不咳者，其人不渴，必遗尿，小便数……以上虚不制下……为肺中冷”，说明肺痿存在阳虚证。肺主皮毛，肺与皮毛相表里，皮毛病传变于肺，肺之病变累及皮毛^[15]。我们认为，皮痹日久不已，外感风寒湿邪，失治而邪留于肺；且久病伤阳，阳虚寒凝，夹痰夹瘀，终成合并肺痹/肺痿之病症。综上所述，阳虚寒凝、痰瘀互结亦为 SSc-ILD 的重要病机。针对此病机，我们选用温肺化纤汤治疗本病。该方由阳和汤加川芎、桃仁、红花、卫矛、地龙、土鳖虫化裁而成。其中，川芎活血行气，桃仁、红花活血化瘀，卫矛活血通经。然瘀血重证，非草木之品能解，为此又加虫类药物（如地龙、土鳖虫）搜剔脉络，直达病络。全方共奏温阳补血，散寒通滞之效。

本研究 HE 染色、Masson 染色病理结果及羟脯氨酸含量测定结果示，模型组小鼠皮肤组织及肺组织中胶原纤维大量形成，并伴有炎性细胞浸润。同时，模型组中羟脯氨酸含量明显增加，提示 SSc-ILD 小鼠造模成功。经过药物干预后，吡非尼酮组可有效缓解皮肤组织及肺组织中的胶原纤维增生及炎性细胞浸润，同时明显减少皮肤组织中的羟脯氨酸含量，提示其可有效缓解皮肤纤维化。温肺化纤汤中、高剂量组可更明显地减少 SSc-ILD 小鼠皮肤及肺组织中的胶原纤维形成，减少其炎症细胞浸润。且温肺化纤汤中剂量组可更明显地减少 SSc-ILD 小鼠皮肤及肺组织中的羟脯氨酸含量。与吡非尼酮组比较，温肺化纤汤中剂量组减少皮肤中羟脯氨酸含量的效果相当，而减少肺组织中羟脯氨酸含量的疗效更好。因此，温肺化纤汤中、高剂量可能是有效剂量，其整体疗效与吡非尼酮基本相当。

ERS已被证明可以调节NF- κ B和激活蛋白-1等炎症信号通路,而NF- κ B的激活可导致上皮细胞损伤,进而启动肺纤维化^[16]。ERS可通过促进Ⅱ型肺泡上皮细胞的凋亡、调控炎症反应、诱导上皮-间充质转化、肌成纤维细胞分化和M2巨噬细胞极化等过程,参与肺纤维化进程^[17-18]。有研究^[19]表明CHOP通过促进活性氧生成,激活下游NF- κ B通路,从而加速肺泡上皮细胞衰老,参与ERS诱导的肺纤维化。吡非尼酮通过抑制ERS和线粒体损伤,在体内和体外阻断脂蛋白诱导的Ⅱ型肺泡上皮细胞凋亡,从而改善脂蛋白诱导的急性肺损伤^[20]。本研究结果显示,温肺化纤汤高剂量组及吡非尼酮组均可有效抑制BIP、CHOP的表达,抑制ERS。因此,高剂量温肺化纤汤及吡非尼酮均可能是通过抑制ERS而发挥作用。

炎症启动是SSc-ILD纤维化进展的一个重要特点,并贯穿于整个病程^[21]。而IL-6、TNF- α 及IFN- γ 均是SSc-ILD纤维化过程中的重要致炎细胞因子。其中,IL-6能够激活成纤维细胞为肌成纤维细胞,促进胶原蛋白、细胞外基质的分泌,促进纤维化进程,而利用IL-6受体抗体阻断IL-6功能,能明显降低博来霉素诱导的SSc模型肌成纤维细胞数量^[22],并改善肺纤维化^[23]。TNF- α 与SSc密切相关,SSc患者的皮肤成纤维细胞和内皮细胞可被TNF- α 激活^[24]。TNF- α 通过调节成纤维细胞功能,参与血管内皮的激活、免疫反应的调节和结缔组织的代谢等^[25],进而促进肺纤维化及皮肤纤维化进程,SSc患者的皮肤成纤维细胞和内皮细胞亦可被IFN- γ 激活^[26]。吡非尼酮已被证明可降低博来霉素诱导肺纤维小鼠模型血清中IFN- γ 、IL-6的表达水平^[27],亦可降低结缔组织病相关ILD患者血清中TNF- α 的表达水平^[28]。ELISA结果显示,温肺化纤汤各剂量组及吡非尼酮组均可显著降低SSc-ILD小鼠血清中IFN- γ 、IL-6、TNF- α 炎症细胞因子水平。因此,温肺化纤汤与吡非尼酮可能通过抗炎而发挥抑制皮肤及肺纤维化的作用。

浸润的炎性细胞协同刺激血管内皮细胞、肺泡上皮细胞等释放多种趋化因子,招募更多的炎性细胞,进一步持续产生大量炎症因子,这一炎症循环过程导致持续的肺损伤。NF- κ B是具有多种转录调控活性的转录调控因子,NF- κ B的激活导致上皮细胞损伤,成纤维细胞增殖,实质炎症,基底膜损伤和胶原沉积,从而促进肺间质和肺泡内的纤维化^[28]。NF- κ B同样在SSc中有重要作用。研究^[29]

显示,相对于健康人,NF- κ B的表达明显升高,且通过抑制NF- κ B,可以减少皮肤成纤维细胞基因的表达水平,并可减少IL-6、IL-8的表达,从而缓解皮肤等组织的损伤。本研究结果显示,温肺化纤汤高剂量组及吡非尼酮组肺组织中p65表达较模型组显著降低。因此,高剂量温肺化纤汤可能通过抑制NF- κ B通路,抑制纤维化进程。

综上,本研究初步验证了温肺化纤汤可有效改善SSc-ILD小鼠皮肤及肺纤维化,中、高剂量疗效与吡非尼酮基本相当。其作用机制可能是通过有效抑制炎症因子表达,抑制NF- κ B信号通路及ERS,进而阻抑SSc-ILD小鼠肺纤维化进程。本研究亦存在一定局限性,仅在动物模型中基于NF- κ B信号通路初步探讨了温肺化纤汤对ERS的影响。未来本团队仍将进行细胞实验以探讨其调控ERS阻抑肺纤维化的具体作用机制。

参考文献

- [1]PERELAS A, SILVER RM, ARROSSI AV, et al. Systemic sclerosis-associated interstitial lung disease [J]. *Lancet Respir Med*, 2020,8(3): 304-320.
- [2]娄玉钤. 中医风湿病学[M]. 北京: 人民卫生出版, 2010:89-95.
- [3]王蕾,何东仪,陈园园,等. 分期治疗系统性硬化症[J]. *中医杂志*, 2022,63(21): 2098-2100.
- [4]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.
- [5]赵凤达,蔡灿林. 洪广祥“治肺不远温”在慢性咳嗽病中的运用[J]. *江西中医药*, 1993, 24(2): 3-4.
- [6]郑洁,洪广祥. “治肺不远温”在慢性阻塞性肺疾病(COPD)急性发作期的临床研究[J]. *江西中医药*, 2000, 31(6): 20-22.
- [7]刘良倚,闻海菊,李少峰. 温肺化纤汤治疗肺间质纤维化6例分析[J]. *中医药通报*, 2011,10(6): 55-58.
- [8]莫丽莎,邱明亮,朱国双,等. 温肺化纤汤对过氧化氢诱导的肺间充质干细胞氧化应激损伤模型有氧糖酵解功能的影响[J]. *中医杂志*, 2022,63(3): 262-268.
- [9]朱国双,邱明亮,柯诗文,等. 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[J]. *中医杂志*, 2021,62(22): 1988-1995.
- [10]VEERARAGHAVAN S, NICHOLSON AG, WELLS AU. Lung fibrosis: new classifications and therapy [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2001,13(6): 500-504.
- [11]DELBREL E, SOUMARE A, NAGUEZ A, et al. HIF-1 α triggers ER stress and CHOP-mediated apoptosis in alveo-

- lar epithelial cells, a key event in pulmonary fibrosis [J]. Sci Rep, 2018,8(1): 17939.
- [12] KILIC T, PARLAKPINAR H, POLAT A, et al. Protective and therapeutic effect of molsidomine on bleomycin-induced lung fibrosis in rats [J]. Inflammation, 2014,37(4): 1167–1178.
- [13] 张立, 李正, 曾海英, 等. 硬皮病伴发肺间质病变小鼠模型的建立及发病机制研究 [J]. 复旦学报(医学版), 2015,42(4): 491–497.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [15] 白彦萍, 张丽亚, 曾梅英, 等. 从过敏性皮肤病与肺病相关性探讨“肺主皮毛”理论的依据 [J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2008, 15(6): 43–44.
- [16] HOTAMISLIGIL GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. Cell, 2010,140(6): 900–917.
- [17] TANJORE H, BLACKWELL TS, LAWSON WE. Emerging evidence for endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(8): L721–L729.
- [18] BURMAN A, TANJORE H, BLACKWELL TS. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis [J]. Matrix Biol, 2018, 68–69: 355–365. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.015.
- [19] JING X, SUN W, YANG X, et al. CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) homologous protein promotes alveolar epithelial cell senescence via the nuclear factor-kappa B pathway in pulmonary fibrosis [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2022, 143: 106142. doi: 10.1016/j.biocel.2021.106142.
- [20] DU Y, ZHU P, WANG X, et al. Pirfenidone alleviates lipopolysaccharide-induced lung injury by accentuating BAP31 regulation of ER stress and mitochondrial injury [J]. J Autoimmun, 2020,112: 102464. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102464.
- [21] NABENO M, AKAHOSHI F, KISHIDA H, et al. A comparative study of the binding modes of recently launched dipeptidyl peptidase IV inhibitors in the active site [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 434(2): 191–196.
- [22] KITABA S, MUROTA H, TERAOKA M, et al. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma [J]. Am J Pathol, 2012,180(1): 165–176.
- [23] SAITO F, TASAKA S, INOUE K, et al. Role of interleukin-6 in bleomycin-induced lung inflammatory changes in mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008,38(5): 566–571.
- [24] COLASANTI T, STEFANANTONI K, FANTINI C, et al. The Prostacyclin Analogue Iloprost Modulates CXCL10 in Systemic Sclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2022,23(17): 10150.
- [25] ALEKPEROV RT, TIMCHENKO AV, NASONOV EL. Tumor necrosis factor alpha in systemic scleroderma [J]. Klin Med (Mosk), 2003,81(12): 4–7.
- [26] XING X, LI A, TAN H, et al. IFN- γ ⁺ IL-17⁺ Th17 cells regulate fibrosis through secreting IL-21 in systemic scleroderma [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(23): 13600–13608.
- [27] OKU H, SHIMIZU T, KAWABATA T, et al. Antifibrotic action of pirfenidone and prednisolone: different effects on pulmonary cytokines and growth factors in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis [J]. Eur J Pharmacol, 2008,590(1–3): 400–408.
- [28] VERMA R, KUSHWAH L, GOHEL D, et al. Evaluating the ameliorative potential of quercetin against the bleomycin-induced pulmonary fibrosis in wistar rats [J]. Pulm Med, 2013: 921724. doi: 10.1155/2013/921724.
- [29] DI LUIGI L, SGRÒ P, DURANTI G, et al. Sildenafil reduces expression and release of IL-6 and IL-8 induced by reactive oxygen species in systemic sclerosis fibroblasts [J]. Int J Mol Sci, 2020,21(9): 3161.

The Effects of *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤) on Pulmonary Fibrosis and Endoplasmic Reticulum Stress in Systemic Sclerosis-Associated Interstitial Lung Disease Model Mice

QIU Mingliang^{1,2}, XIONG Jiali³, XIAO Chenxiao¹, ZHOU Xinzhu¹, MO Lisha^{1,2}, KE Shiwen^{1,2}, ZHU Guoshuang³, LIU Liangji^{1,2}

1. Clinical Medical College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang, 330004; 2. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine; 3. School of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤) in treatment of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease (SSc-ILD). **Methods** Sixty C3H/He female rats were randomly divided into a control group, a model group, a pirfenidone group, and low-, medium-,

and high-dose *Wenfei Huaxian Decoction* groups. The SSc-ILD model mice was established by subcutaneous injection of bleomycin solution 0.04 mg/d into the back of mice for 28 days in all groups but the control group. After successful modelling, the pirfenidone group was given pirfenidone capsule 300 mg/(kg·d) by gavage, the low-, medium- and high-dose *Wenfei Huaxian Decoction* groups were given *Wenfei Huaxian Decoction* 7.81, 15.62, and 31.24 g/(kg·d) by gavage, respectively, and the control group as well as the model group were given normal saline 0.1 ml/10 g by gavage, for a total of 21 days. At the end of the intervention, HE staining and Masson staining were used to observe the pathological changes in the skin and lung tissues; the hydroxyproline content of the skin and lung tissues was detected; the protein expression levels of endoplasmic reticulum stress-related proteins glucose-regulated protein 78 (BIP) and C/EBP homologous protein (CHOP) as well as those of nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway p65 were measured by western blot; ELISA was performed to determine the expression levels of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 6 (IL-6) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) in serum of rats. **Results** The results of HE and Masson staining indicated that compared with the control group, the dermis significantly thickened, the number of collagen fibers significantly enlarged, and the number of inflammatory cells significantly increased in the model group; the lung tissue showed a marked inflammatory cellular response with massive collagen fibre proliferation with inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the skin tissue and lung tissue collagen fibre proliferation significantly reduced and inflammatory cell infiltration reduced in the pirfenidone group and all dose groups of *Wenfei Huaxian Decoction*, and the effects of pirfenidone group and *Wenfei Huaxian Decoction* medium- and high-dose groups were basically comparable. Compared with the model group, the content of hydroxyproline in skin and lung tissue, the serum level of IFN- γ , IL-6 and TNF- α , and the expression levels of BIP and CHOP protein in lung tissue increased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the content of hydroxyproline in skin tissue of pirfenidone group, low- and medium-dose *Wenfei Huaxian Decoction* groups decreased, and the content of hydroxyproline in lung tissue of medium-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group decreased. The serum level of IFN- γ , IL-6, TNF- α and the expression levels of BIP, CHOP and p65 protein in lung tissue of rats in pirfenidone group and high-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group decreased ($P < 0.05$). The content of hydroxyproline in lung tissue of medium-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group was significantly lower than that of low-dose and high-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group, and the serum level of IFN- γ , IL-6, TNF- α in low- and medium-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group were higher than those in high-dose *Wenfei Huaxian Decoction* group. The expression level of BIP protein in high-dose group was significantly lower than that in low- and medium-dose *Wenfei Huaxian Decoction* groups ($P < 0.05$). **Conclusion** *Wenfei Huaxian Decoction* can improve the skin and lung fibrosis of SSc-ILD rats, which may act through anti-inflammation, inhibition of NF- κ B pathway, and then inhibition of endoplasmic reticulum stress, which ultimately blocked the fibrotic process.

Keywords systemic sclerosis; interstitial lung disease; *Wenfei Huaxian Decoction* (温肺化纤汤); endoplasmic reticulum stress; nuclear factor kappa B

(收稿日期: 2024-01-24; 修回日期: 2024-03-24)

[编辑: 邓媛]