

实验研究

鳖甲煎丸对肺纤维化大鼠 TGF- β_1 及 smad 信号通路的影响

唐志宇 李天朗 唐小宾 杨 红

(四川省德昌县人民医院, 四川省德昌县德州镇东风路 20 号, 615500)

摘要 目的:观察鳖甲煎丸抗博来霉素所诱导的大鼠肺纤维化的作用机制。方法:SD 大鼠 50 只,随机分为生理盐水组,模型组,醋酸泼尼松组,鳖甲煎丸中剂量组,鳖甲煎丸高剂量组。采用博来霉素气管内注入法,制备肺纤维化模型,于实验第 28 天留取标本,用免疫组化技术检测 TGF- β_1 及 smad₃、smad₇ 在肺组织中的表达。结果:鳖甲煎丸中、高剂量组大鼠 TGF- β_1 表达减弱、smad₇ 表达增强,smad₃ 在鳖甲煎丸高剂量组表达减弱。结论:鳖甲煎丸能够减轻博来霉素导致的大鼠肺纤维化程度,其作用机制与调控 TGF- β_1 的 smad 蛋白表达有关。

关键词 鳖甲煎丸;肺纤维化;TGF- β_1 ;smad

Impact of Biejia Pill on Expression of TGF- β_1 and smad in Rats with Pulmonary Fibrosis

Tang Zhiyu, Li Tianlang, Tang Xiaobin, et al.

(People's Hospital of Dechang, Add.: No. 20 Dongfeng Road, Dezhou, Dechang County, Sichuan Province, Post code: 615500)

Abstract Objective: To investigate mechanism of action of Biejia Pill on rats with Bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Methods:** Fifty SD rats were randomized to 5 groups: model group, saline group, Prednisone Acetate group, medium dose Biejia Pill group, and high dose Biejia Pill group. The rat model of pulmonary fibrosis was established using Bleomycin. On Day28, TGF- β_1 , smad₃ and smad₇ in lung tissues were assessed using SABC methods. **Results:** In medium dose and high dose Biejia Pill groups, TGF- β_1 expression decreased, smad₇ expression increased. In high dose Biejia Pill group, smad₃ expression decreased. **Conclusion:** Biejia Pill can reduce Bleomycin induced pulmonary fibrosis in rats, the mechanism of which is related to regulation of TGF- β_1 , smad_{3/7} expression.

Key Words Biejia Pill, Pulmonary fibrosis, TGF- β_1 , smad

肺纤维化是一类预后极差,严重影响患者生存质量的疾病。TGF- β 是公认的肺纤维化形成与发展的开关性细胞因子,其主要通过 smad 信号转导通路在肺纤维化的进程中发挥重要作用。鳖甲煎丸具有活血化瘀、软坚散结、补益气血的作用,用于治疗疟母和癥瘕。大量实验证明鳖甲煎丸具有抗肝纤维化、肾纤维化的作用,但尚未见到对肺纤维化的相关研究,本实验进一步深入研究其抗肺纤维化的机制及途径。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠 50 只,体重(180±20)g,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 模型制作 适应性喂养 3 天后,以 10% 水合氯醛麻醉大鼠(3.5mL/kg),切开颈部皮肤,暴露气管,向气管内注入 0.2~0.3mL 博来霉素生理盐水溶液(5mg/kg 体重),注射后立即以大鼠身体长轴为中心,正反快速旋转鼠板 1~2min,使药液在肺内均匀分布,缝合皮肤,局部涂抹碘伏,室温保持在 24℃~25℃待苏醒,动物自然清醒后置笼内常规饲养。对照组在同样操作下,气管内注入等量生理盐水。

1.3 分组及给药 将大鼠随机分为生理盐水组、模型组、泼尼松组、鳖甲煎丸中剂量组和鳖甲煎丸高剂量组,每组 10 只。灌胃给药:生理盐水组、模型组灌胃生理盐水,鳖甲煎丸中剂量组、鳖甲煎丸高剂量组分别灌胃鳖甲煎丸溶液 5mL/kg 体重(给药浓度分别为 1.6g/kg 体重、3.2g/kg 体重),醋酸泼尼松组灌胃醋酸泼尼松 5mg/kg 体重。连续给药 28 天。

1.4 取材及检测 实验第 28 天给药后 2h,将动物称重后处死,颈总动脉放血,于超净工作台上,无菌操作取右下叶肺组织,10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,在高倍镜下行组织病理学观察。同时进行免疫组化染色检测 TGF- β_1 及 smad₃、smad₇。免疫组化切片阳性细胞计数:每组 10 只动物,每只动物取 4 张组织切片,每张切片随机选取 2 个视野,以阳性细胞个数/高倍视野(×200)计算阳性细胞平均数;计算积分光密度。

1.5 统计学方法 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差 LSD 检验,取 $P < 0.05$ 作为差异显著性的临界值。

2 结果

2.1 一般情况 模型组大鼠造模后体重下降明显,同

时进食减少,甚至出现停止进食,并有脱毛,活动明显减少等表现,鳖甲煎丸组和泼尼松组大鼠进食情况改善快,体重变化不明显,活动与生理盐水组无明显差异。

2.2 病理组织学观察 生理盐水组大鼠各期肺内结构均正常,肺泡间隔无水肿、炎症及纤维化表现,肺泡内无明显渗出。模型组有轻度肺泡炎,肺泡结构破坏,由胶原纤维和成纤维细胞占据,形成严重纤维化。泼尼松组和鳖甲煎丸高、中剂量组与模型组的病理变化有同一规律,但鳖甲煎丸高、中剂量治疗组病理变化均较同期模型组减轻,与泼尼松组比较病变程度类似。

2.3 免疫组化测定 与模型组比较,鳖甲煎丸中、高剂量 TGF- β_1 和 smad $_7$ 积分光密度值均明显降低。鳖甲煎丸高剂量组 smad $_3$ 积分密度值也较模型组降低。

表 1 各组大鼠肺组织 TGF- β_1 、smad $_3$ 、smad $_7$ 积分光密度比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TGF- β_1	smad $_3$	smad $_7$
生理盐水组	624.25 $\pm$ 37.24	713.51 $\pm$ 98.44	98.37 $\pm$ 16.22
模型组	953.29 $\pm$ 68.81	1006.35 $\pm$ 124.51	73.26 $\pm$ 16.71
鳖甲煎丸中剂量组	840.12 $\pm$ 59.30 *	993.51 $\pm$ 113.68	90.78 $\pm$ 18.54 *
鳖甲煎丸高剂量组	828.77 $\pm$ 60.33 *	847.81 $\pm$ 109.37 *	92.63 $\pm$ 19.04 *
泼尼松组	896.74 $\pm$ 56.13	1023.15 $\pm$ 121.33	95.84 $\pm$ 17.37 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$ 。

各组大鼠肺组织免疫组化染色(TGF- β_1 及 smad $_3$ 、smad $_7$ 的表达):鳖甲煎丸组 TGF- β_1 与模型组比较表达明显减弱,且呈现量效关系。鳖甲煎丸高剂量组 smad $_3$ 与模型组比较表达明显减弱。与模型组比较,鳖甲煎丸组和泼尼松组 smad $_7$ 表达均明显增强;鳖甲煎丸中、高剂量组之间 smad $_7$ 的表达无明显差异。

3 讨论

肺纤维化中医归于“肺痿”“喘证”“肺痹”等范畴。病位在肺、肾,以瘀、痰、虚为特点。脾气虚弱、络气不足,导致肺络瘀阻、痰瘀交互阻滞肺络是其基本病机,为本虚标实证。鳖甲煎丸具有寒热并用、攻补兼施、活血化痰、软坚散结、益气健脾的功效。本研究发现,该方具有一定的抗肺纤维化作用。

TGF- β 是一类调节细胞生长和分化的多肽,能促进成纤维细胞趋化,产生胶原与纤维连接蛋白,抑制胶原降解,协调组织纤维增生及修复。TGF- β_1 是 TGF- β 超家族中的一员,是致纤维化关键性的细胞因子,可通过自我诱导,扩大生物学效应,调节细胞外基质。TGF- β_1 已被大多数学者公认为肺纤维化形成及发展的关键性因子,是肺纤维化形成关键性的下游介质。Smad 蛋白表达的调控在纤维化发病机制中起重要作用,为 TGF- β 受体下游的主要信号转导因子,其中

smad $_3$ 是纤维化疾病的重要介导者,smad $_3$ 的丧失可影响巨噬细胞的趋化和 TGF- β 的自身诱导^[1],导致 TGF- β 功能的下降。目前关于纤维化动物模型的研究显示 smad $_3$ 的丢失可导致纤维化反应的减轻,提示其对纤维化过程有抵抗作用。smad $_7$ 是 TGF- β 信号转导途径的主要抑制性蛋白,可调节肺发育、损伤和修复过程中异常的 TGF- β 信号转导途径^[2]。它们的异常表达可影响 TGF- β 活性,进而改变纤维化进程。TGF- β -Smads 通路中各型 Smads 分子之间精密协调,共同完成生理及病理状态下 TGF- β 的生物学效应^[3]。调控该通路各分子的表达可能为治疗肺纤维化疾病提供一种新手段。

本实验在大鼠肺纤维化造模过程中,使用鳖甲煎丸干预大鼠肺纤维化过程,经 28 天干预治疗,发现鳖甲煎丸中、高剂量组的 TGF- β_1 与模型组比较表达明显减弱,且呈现量效关系($P < 0.05$)。鳖甲煎丸高剂量组与模型组比较 smad $_3$ 表达减弱,鳖甲煎丸各组和泼尼松组 smad $_7$ 与模型组比较表达明显增强($P < 0.05$)。病理观察显示,模型组大鼠双肺有轻度肺泡炎,肺泡结构破坏,由胶原纤维和成纤维细胞占据,形成严重纤维化,鳖甲煎丸高、中剂量治疗组病理变化均较模型组减轻。鳖甲煎丸抗肺纤维化作用,与调控 TGF- β -smad 信号转导通路的表达有关。

参考文献

- [1] Ashcroft G S, Yang X, Glick A B, et al. Mice lacking smad $_3$ show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. Nat Cell Bio, 1999, 1(5):260-266.
- [2] Zhao J, Shi W, Chen H, et al. smad $_7$ and smad $_6$ differentially modulate transforming growth factor beta-induced inhibition of embryonic lung morphogenesis. J Biol Chem, 2000, 275(31):23992-23997.
- [3] Flanders KC. smad $_3$ as a mediator of the fibrotic response. Int J Exp Pathol, 2004, 85(2):47-64.

(2010-08-26 收稿)

书讯:《叶天士诊治大全》修订再版

叶天士是清代著名中医大师,他对中医学的发展作出了重大的贡献,创造了温病学派,同时对杂病也有许多创见。因此,中医界把他的医案遵之为“临证指南”,为中医必修课程。由于叶天士医案散有 8 本之多,作者将这 8 本医案综合汇集分析,并且诠释他的理、法、方、药,使读者能深入全面地了解叶天士的医术。该书在 1995 年初版,曾获好评。最近应出版社和读者之邀,作了一次修订,已经由人民军医出版社再版发行,欢迎购阅。邮购电话:(010)51927252。