

平纤宁肺颗粒剂对肺纤维化大鼠肺组织中转化生长因子 β_1 和 I、III 型胶原表达的影响

张传名¹ 茆俊卿¹ 朱琴梅² 陈 静¹

(1 江苏省扬州市中医院,扬州,225002; 2 扬州市职业大学,扬州,225009)

摘要 目的:观察平纤宁肺颗粒剂对盐酸博莱霉素所致大鼠肺纤维化的保护作用。方法:60 只 SD 大鼠,雄性,按体质量随机分为正常对照组、模型组、平纤宁肺颗粒剂高剂量组、低剂量组,每组 15 只。盐酸博莱霉素气管内注射诱发肺纤维化,造模后给药,分别在给药 7、14、28 d 每组处死 5 只,取肺脏做组织病理学检测,同时免疫组化法检测肺组织内转化生长因子 β_1 (Transforming Growth Factor- β_1 , TGF- β_1)、I 型胶原、III 型胶原。结果:模型组大鼠肺组织出现明显的炎细胞浸润,纤维结缔组织增生,平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组大鼠在第 14、28 天的病理变化均较同期模型组减轻。模型组大鼠肺组织 TGF- β_1 、I、III 型胶原表达在第 7、14、28 天均明显高于同期正常对照组,与正常对照组比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组 TGF- β_1 、I、III 型胶原表达与同期模型组比较明显降低,有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$)。结论:平纤宁肺颗粒剂可以有效减轻肺纤维化,抑制肺组织中 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原的表达。

关键词 平纤宁肺颗粒剂;肺纤维化;病理学;转化生长因子 β_1 ; I 型胶原;III 型胶原

Effect of Pingxianningfei Granule on the Expression of TGF- β_1 , Type I and Type III Collagen in Rats with Pulmonary Fibrosis

Zhang Chuanming¹, Mao Junqing¹, Zhu Qinmei², Chen Jing¹

(1 Yangzhou Hospital of Chinese Medicine, Yangzhou 225002, China; 2 Yangzhou Polytechnic College, Yangzhou 225009, China)

Abstract Objective: To observe the protection effect of Pingxianningfei Granule in rats with Bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into a control group, a model group (MG), a high-dose Pingxianningfei Granule group (HG) and a low-dose Pingxianningfei Granule group (LG), 15 in each. Model rats with Pulmonary Fibrosis were induced by injecting bleomycin into trachea. Respectively, 7, 14, 28 days after successfully medication, the rats were sacrificed, 5 in each group. Taking the lung, and analysis in histopathology. And the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), type I and type III Collagen in lung tissue was assayed by immunohistochemistry. **Results:** Infiltration of inflammatory cells were obvious in lung tissue of MG and the fibrous connective tissue proliferated. The pathologic changes of lung in HG and LG at 14, 28 days were milder than those in MG. The expression of TGF- β_1 , type I and type III Collagen in MG at 7, 14, 28 days was much higher than that of the control group, with statistical significance ($P < 0.01$). Compared with the MG, the expression of TGF- β_1 , type I and type III Collagen of the lung in HG and LG was decreased, which showed significant difference ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion:** Pingxianningfei Granule can effectively reduce the formation of pulmonary fibrosis and inhibit the expression of TGF- β_1 , type I and type III Collagen in lung tissue.

Key Words Pingxianningfei Granule; Pulmonary fibrosis; Pathology; TGF- β_1 ; Collagen type I; Collagen type III

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.041

肺纤维化是一种渐进的慢性肺间质疾病,其主要病理特点是早期弥漫性的肺泡炎和后期大量成纤维细胞的病理性增生及基质胶原进行性沉积并取代正常的肺组织结构,大部分患者会在 3~8 年内死于呼吸衰竭^[1-2]。尽管肺纤维化的患者死亡率很高,但

是目前还没有治疗该病的有效方法,此病的发病机制及发展进程也不清楚。本研究使用盐酸博莱霉素 (Bleomycin, BLM) 制造大鼠肺纤维化模型^[3],观察平纤宁肺颗粒剂对盐酸博莱霉素所致大鼠肺纤维化的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 大鼠, 60 只, SPF 级, 由浙江省实验动物中心提供, 许可证号为 SCXK (浙) 2014-0001。给药前后, SD 大鼠分笼饲养, 每笼 5 只, 喂以全价颗粒鼠饲料 (南京协同生物工程有限公司), 自由饮水饮食, 室温 20 ~ 25 °C, 每天人工光照 12 h, 室内通风良好, 实验室相对湿度: 65% ~ 70%。

1.1.2 药物 平纤宁肺颗粒剂 (由党参、干地黄、玄参、黄精、桑白皮、黄芩、金银花、虎杖、当归、丹参、红景天、川芎、甘草组成), 由江阴天江药业有限公司生产。

1.1.3 试剂与仪器 盐酸博来霉素, 日本化药株式会社, 批号 730342。Leica ASP300S 全自动真空组织脱水机、Shandon 包埋机、Shandon 手动切片机、Shandon 全自动染色机、OLYMPUS 显微镜。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 60 只 SD 大鼠随机分 4 组: 正常对照组、模型组、平纤宁肺颗粒剂高剂量治疗组及平纤宁肺颗粒剂低剂量治疗组各 15 只。4 组动物饲养 1 周后造模, 除正常对照组外, 其余各组均用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠, 仰卧固定于实验台上, 颈部乙醇消毒后逐层暴露气管, 博来霉素 (5 mg/mL) 一次性气管内注射 (1 mL), 注射后立即将动物直立并旋转, 使药液在肺内分布均匀; 正常对照组在同样的条件下气管内注入相同体积的生理盐水。

1.2.2 给药方法 4 组实验动物于造模后 2 h 开始灌药, 中药平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组比例为高剂量组: 低剂量组 = 3: 1, 低剂量组给予 5 mL/kg, 高剂量组给予 15 mL/kg; 正常对照组和模型组给予等量的生理盐水, 1 次/d。

1.2.3 检测指标与方法 每组动物于给药后第 7、14、28 天各处死 5 只, 取右肺置于 10% 福尔马林液中固定; 石蜡包埋; 按 6 μ m 厚连续切片 4 张, 1 张 HE 染色, 3 张分别为 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原免疫组化染色; 备以光学显微镜观察。免疫组化试验步骤: 1) 石蜡切片常规脱蜡至水; 2) PBS 洗 2 遍, 5 min/遍; 3) 用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H_2O_2 室温封闭 10 分钟蒸馏水洗 1 次; 4) 抗原修复; 5) PBS 洗 5 min; 6) 滴加正常山羊血清封闭液, 室温 10 min; 7) 甩去多余液体, 滴加一抗 4 °C 过夜 (过夜后在 37

°C 复温 45 min); 8) PBS 洗 2 次各 5 min; 9) 滴加生物素化二抗, 37 °C 孵育 30 min; 10) PBS 洗 2 次各 5 min; 11) 滴加辣根过氧化物酶标记链霉菌抗生物素蛋白溶液, 37 °C 孵育 20 min; 12) PBS 洗 2 次各 5 min; 13) DAB 显色 5 ~ 10 min 在显微镜下掌握染色程度; 14) 蒸馏水洗终止染色, 苏木素复染; 15) 脱水, 透明, 封片, 镜检。每张切片随机选取 5 个高倍视野 ($\times 400$), 用 Image Pro Plus 5.0.2 图像分析软件测定肺内 TGF- β_1 、I 型、III 型胶原的表达。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件包进行统计学处理, 实验数据为连续性变量用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析进行检验, 方差齐性, 使用 LSD 法进行验后多重比较, 检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 平纤宁肺颗粒剂对肺纤维化大鼠肺组织病理学的影响 每组动物于给药后第 7、14、28 天各处死 5 只, 取右肺置于 10% 福尔马林液中固定; 石蜡包埋; 按 6 μ m 厚连续切片, HE 染色。病理组织学检测表明: 正常对照组大鼠肺脏肺小叶结构正常, 肺泡上皮细胞未见明显变性、坏死和脱落, 肺泡壁无充血、水肿, 肺泡腔及支气管腔内无渗出物, 间质未见炎细胞浸润。模型组第 7 天肺泡间质可见轻度炎细胞浸润, 纤维结缔组织增生; 第 14 天, 有较多炎性细胞浸润, 伴有大量的纤维结缔组织增生; 第 28 天, 肺泡结构破坏, 纤毛粘连倒伏、变性、坏死, 间质可见中度炎细胞浸润, 纤维结缔组织重度增生。平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组大鼠肺也出现炎细胞浸润, 纤维结缔组织增生病理表现, 但在第 14、28 天的病理变化均较同期模型组减轻, 其中以中药高剂量治疗组最为显著。见表 1, 图 1。

2.2 平纤宁肺颗粒剂对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β_1 、I 型胶原、III 型胶原的影响 模型组与正常对照组比较, TGF- β_1 、I、III 型胶原平均光密度在第 7、14、28 天均明显高于同期正常对照组, 说明其表达明显增强, 与正常对照组比较有统计学意义 ($P < 0.01$)。平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组 TGF- β_1 、I、III 型胶原平均光密度与同期模型组比较明显降低, 有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$), 但仍比正常对照组高 ($P < 0.05, 0.01$), 说明平纤宁肺颗粒剂可以有效抑制 TGF- β_1 、I、III 型胶原的表达。见表 2, 图 2、图 3、图 4。

表 1 平纤宁肺颗粒剂对肺纤维化大鼠肺组织病理学的影响

时间	组别	支气管纤毛上皮脱落				纤毛变性、坏死				纤维结缔组织增生				炎细胞浸润			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++
给药 7 d	正常对照组	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0
	模型组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	5	0	0
给药 14 d	正常对照组	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0
	模型组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	1	4	0	0	1	4	0	0	0	1	1	3	1	3	1	0
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	1	4	0	3	2	0
给药 28 d	正常对照组	5	0	0	0	5	0	0	0	5	0	0	0	3	2	0	0
	模型组	0	5	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	5	0	0	0	3	2	0	0	3	2	0	0	2	3	0	0
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	1	4	0	0	0	5	0	0	0	1	2	2	0	3	2	0

表 2 平纤宁肺颗粒剂对肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β₁、Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

时间	组别	光密度 (MOD)		
		TGF-β ₁	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
给药 7 d	正常对照组	2.386 8 ± 0.479 7	0.0281 ± 0.0032	0.0330 ± 0.0025
	模型组	4.863 3 ± 0.180 2 **	0.0376 ± 0.0045 **	0.0634 ± 0.0041 **
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	4.0520 ± 0.275 5 **△△	0.0322 ± 0.0026 **△	0.0514 ± 0.0038 **△△
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	4.2030 ± 0.435 8 **△	0.0330 ± 0.0028 **	0.0579 ± 0.0034 **△
给药 14 d	正常对照组	2.216 9 ± 0.389 2	0.0296 ± 0.0033	0.0324 ± 0.0032
	模型组	5.0040 ± 0.211 6 **	0.0535 ± 0.0041 **	0.0810 ± 0.0018 **
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	4.265 6 ± 0.373 1 **△△	0.421 6 ± 0.0310 **△△	0.0696 ± 0.0050 **△△
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	4.428 1 ± 0.509 6 **△	0.0446 ± 0.0042 **△△	0.0729 ± 0.0049 **△△
给药 28 d	正常对照组	2.3550 ± 0.4320	0.0275 ± 0.0042	0.0321 ± 0.0015
	模型组	5.443 2 ± 0.368 9 **	0.0625 ± 0.0038 **	0.0914 ± 0.0022 **
	平纤宁肺颗粒剂高剂量组	4.500 7 ± 0.3580 **△△	0.437 6 ± 0.0345 **△△	0.0747 ± 0.0057 **△△
	平纤宁肺颗粒剂低剂量组	5.0017 ± 0.179 4 **△	0.0502 ± 0.0019 **△△	0.0833 ± 0.0042 **△△

注:与正常对照组比较,**P* < 0.05、***P* < 0.01;与模型组比较,△*P* < 0.05、△△*P* < 0.01。

3 讨论

肺纤维化常常归属于中医“肺痿”“肺痹”范畴,有医家提出正气虚损、痰瘀互结的病理机制,我们总结临床病例的基础上提出肺肾不足,气阴耗伤,兼痰、热、瘀等病理产物为患的病机,确定补肺肾、清痰热、祛血瘀的治疗大法,故拟平纤宁肺颗粒剂治疗肺纤维化。通过实验观察,盐酸博莱霉素制造的大鼠

肺纤维化模型早期以肺泡炎为主,后期以间质纤维化改变为主,平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组大鼠肺也出现炎细胞浸润、纤维结缔组织增生的病理表现,但在第 14、28 天的病理变化均较同期模型组减轻,其中高剂量组最为显著,说明平纤宁肺颗粒剂能改善大鼠肺纤维化的病理变化。众多研究表明^[4-13]转化生长因子 β₁ 是细胞外基质沉积最强的促进剂,还能

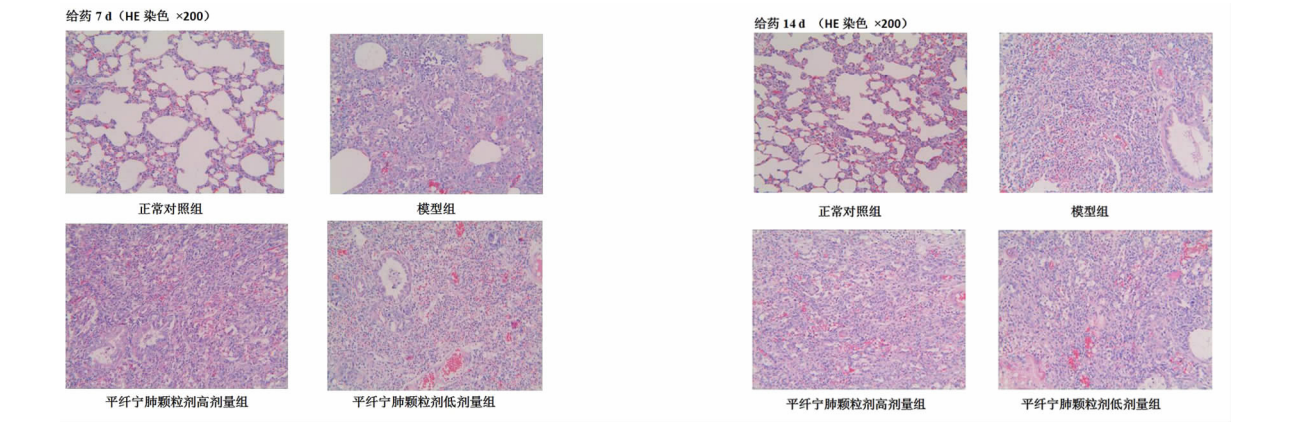
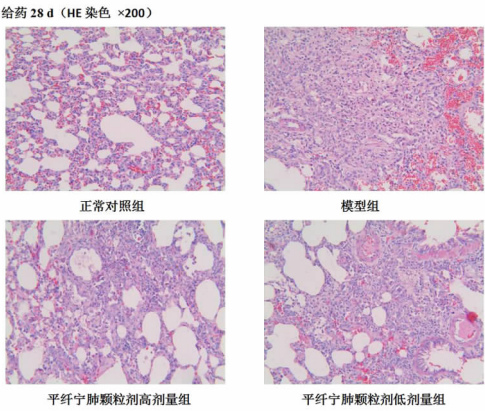


图 1 给药 7 d、14 d、28 d 之后 HE 染色结果



续图 1 给药 7 d、14 d、28 d 之后 HE 染色结果

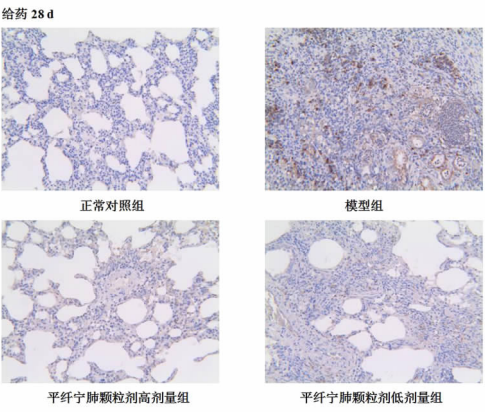
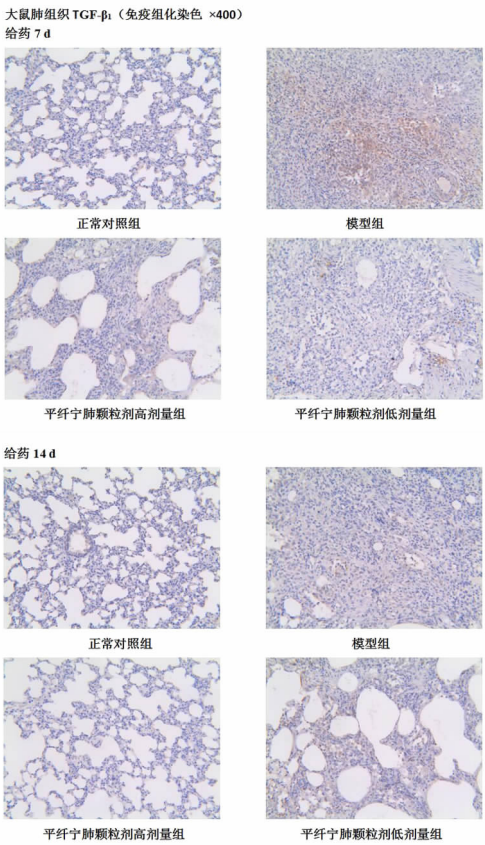


图 2 给药 7 d、14 d、28 d 之后大鼠肺组织 TGF- β_1 免疫组化染色结果

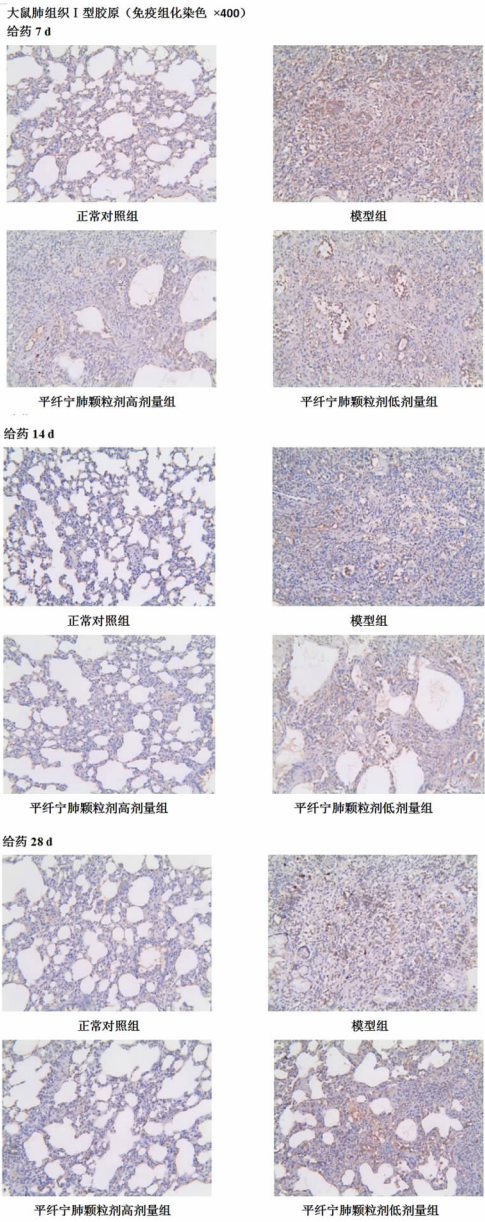


图 3 给药 7 d、14 d、28 d 之后大鼠肺组织 I 型胶原免疫组化染色结果

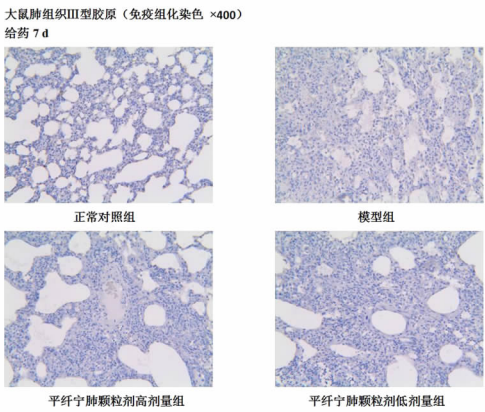
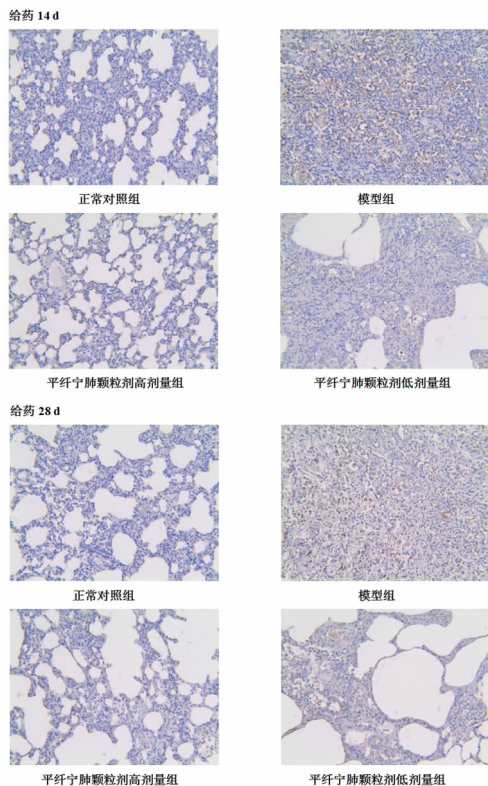


图 4 给药 7 d、14 d、28 d 之后大鼠肺组织 III 型胶原免疫组化染色结果



续图 4 给药 7 d、14 d、28 d 之后大鼠肺组织
Ⅲ型胶原免疫组化染色结果

抑制胶原的降解,在肺纤维化发病机制中的作用显著,说明抑制转化生长因子 β_1 的产生或阻断其表达途径可抑制肺纤维化的疾病进展。实验中平纤宁肺颗粒剂高、低剂量组转化生长因子 β_1 的平均光密度与同期模型组比较明显降低,表明平纤宁肺颗粒剂有抑制转化生长因子 β_1 表达的作用。大鼠和人在发生肺纤维化时,胶原代谢出现紊乱,以 I、Ⅲ型胶原含量增加为主, I 型和Ⅲ型胶原比例失调,导致胶原在肺间质中沉积,使肺组织基质结构紊乱而发生肺纤维化^[13-14]。显然发生肺纤维化时,降低 I、Ⅲ型胶原含量可以改善肺纤维化。有人发现^[15]气虚血瘀证患者Ⅲ型胶原含量明显增高,而益气活血可显著降低其含量,平纤宁肺颗粒剂组方能补益肺气,活血化瘀,实验亦显示平纤宁肺颗粒剂能明显抑制肺纤维化大鼠模型 I、Ⅲ型胶原的表达,具有抗肺纤维化的作用,为临床治疗肺纤维化提供了有利依据。

本实验结果表明平纤宁肺颗粒剂有减轻肺泡炎和抗肺纤维化的作用,且有剂量依赖关系,提示应用

中医复方平纤宁肺颗粒剂治疗肺纤维化具有可行性,但仍需从药物剂量、药物安全性及其作用机制等方面进行进一步的探讨。

参考文献

- [1] Gharraee-Kermani M, Phan SH. Molecular mechanisms of and possible treatment strategies for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Curr Pharm Des, 2005, 11(30): 3943-3971.
- [2] 蔡后荣. 2011 年特发性肺纤维化诊断和治疗循证新指南解读[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2011, 10(4): 313-316.
- [3] 张伟, 鲁香凤, 张晓梅, 等. 气管插管快速灌注博莱霉素复制大鼠肺间质纤维化模型[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(1): 60-67.
- [4] Wilkins-Port CE, Ye Q, Mazurkiewicz JE, et al. TGF- β_1 + EGF-initiated invasive povasive potential in transformed human keratinocytes is coupled to a plasmin/MMP-10/MMP-1-dependent collagen remodeling axis: role for PAI-1[J]. Cancer Res, 2009, 69(9): 4081.
- [5] Douglas HE. TGF- β in wound healing: a review[J]. J Wound Care, 2010, 19(9): 403.
- [6] 叶青, 虞永鑫, 周敏, 等. TGF- β_1 的表达与特发性间质性肺炎关系分析[J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(7): 1231-1233.
- [7] 张蕾, 包天佑. 麻杏二三汤对哮喘大鼠肺组织 TGF- β_1 和 ET-1 表达的影响[J]. 世界中医药, 2015, 10(7): 1055-1058.
- [8] 陈静, 赵文娟, 李玉卿, 等. TGF- β_1 、MMP-9 在哮喘大鼠气道重建模型中的表达及丹参的干预作用[J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 479-482.
- [9] 冯淳灵, 张前, 刘治坤, 等. 芪蛭益肺颗粒对 COPD 模型大鼠肺组织 TGF- β_1 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 36(4): 238-241.
- [10] 黄成亮, 李艳艳, 范贤明, 等. 丹参联合川芎嗪对肺纤维化大鼠血清、支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 和 TGF- β_1 水平的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(7): 673-676.
- [11] 李秀荣, 齐元富, 李慧杰. 芪连扶正胶囊对 TGF- β 介导 EMT 作用的影响[J]. 世界中医药, 2015, 10(4): 557-559.
- [12] 闫慧明, 丁利芳, 刘媛, 等. 转化生长因子- β_1 与结缔组织生长因子在类风湿关节炎合并肺间质病变患者血清中的表达水平及临床意义[J]. 中国全科医学, 2012, 15(10A): 3268-3270.
- [13] 刘绍霞, 张立英, 赵国强, 等. 腺病毒 siRNA 沉默 TGF- β_1 对肺间质纤维化大鼠 TGF- β_1 的表达及 I、Ⅲ型胶原含量的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2012, 47(6): 785-790.
- [14] GHOSH A K. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression; implication in fibrosis[J]. Exp Biol Med, 2002, 227(5): 301-314.
- [15] 刘剑勇, 杨芳, 范伏元. 益气活血化瘀汤治疗慢性肾炎(气虚血瘀证)30 例临床观察[J]. 中医药导报, 2007, 13(8): 20-22.

(2016-04-18 收稿 责任编辑: 徐颖)