

· 论 著 ·

益气化痰化痰法对肺纤维化大鼠 TGF- β_1 、PAI-1 的影响*贺 雄,曹文富 Δ ,赵莘利,李 艳,黄 欣

(重庆医科大学附属第一医院中西医结合科 400016)

摘要:目的 探讨益气化痰化痰法对肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)的影响。方法 采用气管内一次性注射博来霉素 5 mg/kg 诱导生成肺纤维化大鼠模型。将 105 只 SD 大鼠分为:正常对照组、模型组、益气组、化痰组、化痰组、益气化痰化痰组、激素组。正常对照组和模型组采用生理盐水灌胃,其余各组于造模后 28 d 分别给予益气汤、化痰汤、化痰汤、益气化痰化痰汤 30 g·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ 灌胃,激素组给予皮下注射氢化可的松 20 mg·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ 干预,2 个月后处死各组大鼠,ELISA 法检测各组大鼠血浆 PAI-1 含量,Western blot 法检测各组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白表达。结果 益气组、化痰组、化痰组及益气化痰化痰组大鼠血浆 PAI-1 含量水平较模型组均降低($P<0.05$),其中益气化痰化痰组降低最显著($P<0.05$);益气组、化痰组、化痰组及益气化痰化痰组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白表达较模型组均减弱($P<0.05$),尤以益气化痰化痰组减弱最明显($P<0.05$)。结论 益气、化痰、化痰法能显著改善博来霉素所致大鼠肺纤维化的程度,其机制可能与抑制 TGF- β_1 及 PAI-1 的表达有关。

关键词:肺纤维化;转化生长因子 β_1 ;纤溶酶原激活物抑制物 1;益气化痰化痰法

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.19.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)19-1903-03

Effects of therapeutics of benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm on TGF- β_1 and PAI-1 of rats with pulmonary fibrosis*

He Xiong, Cao Wenfu Δ , Zhao Pingli, Li Yan, Huang Xin

(Department of Chinese Traditional Medicine and West Medicine, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of therapeutics of benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm on transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) of rats with pulmonary fibrosis. **Methods** We built the model of pulmonary fibrosis in rats by disposable endotracheal injection of bleomycin 5 mg/kg. 105 SD rats were divided into 7 groups, including normal group, model group, the benefiting qi group, the expelling blood stasis group, the dissipating phlegm group, the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm group, hormone group. Normal control group and model group were lavaged with normal saline, hormone group was given subcutaneous injection of hydrocortisone 20 mg·kg $^{-1}$, the rest groups were lavaged with corresponding medicines 30 g·kg $^{-1}$ ·d $^{-1}$ (the benefiting qi decoction, the expelling blood stasis decoction, the dissipating phlegm decoction, the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm decoction) separately for 28 d after pulmonary fibrosis models were established. All rats were killed after 2 months' intervening treatment. We measured plasma PAI-1 levels in each group by ELISA, and detected the lung tissue expression of TGF- β_1 protein by Western blot. **Results** PAI-1 contents in plasma of rats in the benefiting qi group, the expelling blood stasis group, the dissipating phlegm group, the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm group were lower than those of the model group ($P<0.05$), especially the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm group reduced most obviously ($P<0.05$). TGF- β_1 protein expressions in the benefiting qi group, the expelling blood stasis group, the dissipating phlegm group, the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm group were weaker than those in the model group ($P<0.05$), the benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm group weakened most obviously ($P<0.05$). **Conclusion** The therapeutics of benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm can significantly inhibit bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats, and the possible mechanism was by inhibiting TGF- β_1 and PAI-1 expression in the fibrotic process.

Key words: pulmonary fibrosis; transforming growth factor β_1 ; plasminogen activator inhibitor 1; the therapeutics of benefiting qi, expelling blood stasis and dissipating phlegm

肺纤维化是肺组织在受到外界各种刺激后,引起的肺组织炎性损伤,结构破坏,逐渐伴有肺间质细胞增生的组织修复过程。研究表明,大量的细胞因子参与纤维化进程中,其中转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是促进纤维细胞激活向肌成纤维细胞转化的关键因子^[1-2],也是目前最

公认的致纤维化细胞因子;纤溶酶原激活物抑制物(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)则主要参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解过程,PAI-1 的增加会导致 ECM 降解减少,致使 ECM 的生成与降解失衡,最终导致肺纤维化^[3]。目前治疗肺纤维化以激素和免疫抑制剂为主,但尚无较

理想的药物,如何通过有效抑制 TGF- β_1 等因子的表达,使 ECM 的生成减少,或者减少 PAI-1 等因子的生成而促进 ECM 降解,最终改善肺组织代谢状况等新途径来治疗肺纤维化,成为当前该领域研究的重点^[4-5]。本研究基于西医对肺纤维化理论的认识和中医药治疗肺纤维化的独特优势,采用益气化痰法探索治疗肺纤维化的新途径,选用黄芪、白术、川芎、姜黄、半夏、海藻共六味中药,对博来霉素致肺纤维化大鼠进行治疗,报道如下。

1 材料与与方法

1.1 实验动物与试剂 SD 大鼠 105 只(雌雄不限),体质量 180~220 g,由重庆医科大学 SPF 级实验动物研究中心提供,动物生产许可证:SCXK(渝)2007-0001,SPF 级清洁环境喂养;盐酸博来霉素由日本化药株式会社生产(批号:H20090885,规格 15 毫克/瓶);氢化可的松注射液由天津金耀氨基酸有限公司生产(批号:H12020887,规格:20 毫升/支);大鼠 PAI-1 ELISA 试剂盒由重庆鼎国生物技术有限公司提供(RD 分装);TGF- β_1 蛋白抗体为 Santa Cruz 公司产品;中药饮片由重庆桐君阁中药批发有限责任公司提供;实验指标的测定在重庆医科大学眼科学重庆市市级重点实验室完成。

1.2 动物分组与肺纤维化模型建立 采用随机法将 105 只大鼠分为 7 组:正常对照组、模型组、激素组、益气组、化痰组、化痰组、益气化痰化痰组,每组各 15 只。适应性喂养 2 周后,对照组一次性气管内注射生理盐水 0.1 mL/100 g,其余各组均采用一次性气管内注射等量盐酸博来霉素(5 mg/kg)制作大鼠肺纤维化模型^[6-7],于造模后 28 d 处死模型组 3 只大鼠,电镜下观察纤维化造模是否成功,然后给予中药及激素干预治疗。益气组由黄芪、白术组成煎剂灌胃,化痰组由半夏、海藻组成煎剂灌胃,化痰组由川芎、姜黄组成煎剂灌胃,益气化痰化痰组由以上所有中药组成煎剂灌胃,各组煎剂中按照每 1 mL 含生药 2 g 进行熬制,各组灌胃剂量按照 30 g·kg⁻¹·d⁻¹ 进行。激素组给予氢化可的松 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 进行腹腔注射。模型组及正常对照组每日给予等量生理盐水灌胃,干预 2 个月后处死全部大鼠。

1.3 标本取材与处理

1.3.1 血浆采集 10%水合氯醛按 0.3 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉大鼠,常规消毒,备皮,切开胸腔,暴露心脏,将空针直刺入心室取血,置于抗凝管内,摇匀,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液分装在 1.5 mL 离心管内,-80 °C 冰箱中保存待检。

1.3.2 肺组织匀浆上清液制备 将采血完后的大鼠立即置于 4 °C 冰盒上,将肺组织剪成小块状,生理盐水清洗,称质量,加入裂解液,蛋白酶抑制剂,超声打碎,直至组织完全裂解,3 000 r/min 离心 7 min 后取匀浆上清液分装在 1.5 mL 离心管内,置于-20 °C 冰箱中保存待检。

1.4 血浆 PAI-1 和肺组织 TGF- β_1 水平测定

1.4.1 血浆 PAI-1 测定 采用 ELISA 法,敏感度为 1.0 pg/mL,操作按照试剂盒说明书进行。

1.4.2 肺组织 TGF- β_1 测定 采用 Western blot 法,取肺组织匀浆上清液,先用 BCA 蛋白浓度测定试剂测定每组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白含量,再按照 SDS-PAGE 电泳,蛋白质转膜,膜的封闭,抗体孵育,化学发光,显影,定影,用凝胶图像处理系统分析目标蛋白带的相对分子质量,用 Image J 软件计算蛋白净

光密度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间两两比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 与正常对照组比较,模型组大鼠第 2 天表现为精神极差,毛发疏松耸立,活动及进食均明显减少;造模后第 3 天或 4 天,除了出现上述症状外,大鼠双眼、鼻部、唇部及舌体颜色明显变乌黑暗淡,表现出严重的缺氧状态,体质量也逐渐减轻。造模 28 d 后模型组大鼠肺组织结构电镜照片,见封 2 图 1。造模过程中约 1/6 的大鼠会出现腹部胀大,且逐渐加重,直至腹胀如蛙腹,大便稀溏,极度消瘦等症状,甚至死亡。经中药干预治疗后,大鼠的精神、毛发、活动等一般情况得到有效改善。益气化痰化痰组大鼠肺组织结构电镜照片,见封 2 图 2。

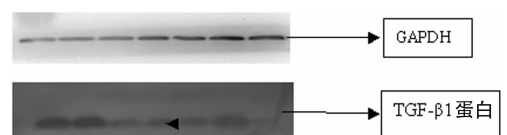
2.2 各组大鼠血浆 PAI-1 水平 各组大鼠血浆 PAI-1 水平见表 1。

表 1 各组大鼠 PAI-1 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	PAI-1(pg/mL)
正常对照组	15	30.452 0 ± 1.807 2
模型组	12	173.709 7 ± 54.904 9*
益气组	15	55.313 5 ± 5.971 0* [△]
化痰组	15	63.084 2 ± 2.189 9* [△]
化痰组	15	74.642 2 ± 7.837 5* [△]
益气化痰化痰组	15	47.206 5 ± 4.276 9* [△] [☆]
激素组	15	35.481 2 ± 2.274 3* [△] [◇]

*: $P < 0.05$,与正常对照组比较;[△]: $P < 0.05$,与模型组比较;[☆]: $P < 0.05$,与益气组、化痰组、化痰组比较;[◇]: $P < 0.05$,与益气化痰化痰组比较。

2.3 各组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白表达情况 各组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白表达情况见图 3,表 2。



注:图片条带从左到右依次为化痰组、模型组、益气化痰化痰组、益气组、激素组、化痰组、正常对照组。

图 4 各组大鼠肺组织 Western blot 电泳照片

表 2 各组大鼠肺组织 TGF- β_1 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- β_1 光密度值
正常对照组	15	0.195 6 ± 0.003 0
模型组	12	0.613 4 ± 0.001 0*
益气组	15	0.232 5 ± 0.001 0* [△]
化痰组	15	0.387 2 ± 0.004 0* [△]
化痰组	15	0.576 1 ± 0.002 0* [△]
益气化痰化痰组	15	0.224 3 ± 0.003 0* [△] [☆]
激素组	15	0.228 6 ± 0.005 0* [△] [☆]

*: $P < 0.05$,与正常对照组比较;[△]: $P < 0.05$,与模型组比较;[☆]: $P < 0.05$,与益气组、化痰组、化痰组比较。

3 讨 论

TGF- β_1 是一种参与各种生物过程的多功能细胞因子,如胚胎发育,肿瘤的生长和分化,细胞增殖和凋亡,纤维组织的修复和调节免疫反应等^[8-9]。TGF- β_1 表达的上调是肺、肝、肾等纤维化疾病产生的关键步骤^[10-11]。PAI-1 是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员之一,能调节纤溶蛋白水解和抑制纤溶酶原激活。血浆 PAI-1 水平的升高可作为观察各种血栓形成的条件,包括心肌梗死、深静脉血栓和弥散性血管内凝血等^[12-13]。肺纤维化、肾小球肾炎等 PAI-1 基因的表达水平明显增加,同时研究证明 PAI-1 还可以使 TGF- β_1 信号明显增强,进一步导致 ECM 的积累和增加 PAI-1 的表达,形成纤维化进程的恶性循环^[14-15]。目前争对上述两种细胞因子在纤维化进程中的具体作用机制尚未充分认识,因此西医目前未研究出一种能作用在这两种细胞因子上的有效药物。

在已知纤维化形成的相关机理上,采用传统中医药进行研究,有利于中西医结合理论更深层次的结合。中医在肺纤维化的治疗中强调益气、化痰、化瘀,通过补益肺气,使津液正常运化代谢,从而阻断痰浊生成;通过化痰化瘀,以消除实邪,达到邪扶正之功效。本研究中选择益气药黄芪和白术,其中黄芪为补气之要药,尤其针对肺脾气虚效果显著,配白术以增强其补气功效,相关文献已有报道黄芪能够延缓甚至抑制纤维化的进程;化痰药选取川芎和姜黄,其中川芎为“血中之气药”,对气滞血瘀证作用明显,文献报道其主要成分川芎嗪能降低博来霉素诱导的肺纤维化大鼠血清及肺组织 TGF- β_1 的表达^[9],降低肺纤维化的增生程度,并配姜黄以加强行气活血之功;化痰药选取半夏和海藻,其中半夏为治疗痰证的要药,健脾化痰以消除生痰之源,配海藻以增强其化痰散结的功效。以上六味中药配伍能达到祛实邪、补肺气的作用效果。

相关文献报道经博来霉素诱导生成的大鼠肺纤维化模型致死率可高达 50%,且部分大鼠肺组织在造模后 28 d 有自限性倾向,在本实验中造模后大鼠的致死率约为 40%,需通过反复造模来保证大鼠纤维化模型的数量,且 28 d 后未发现自限性倾向。实验结果表明,益气化痰化瘀组大鼠血浆 PAI-1 水平较模型组明显降低($P < 0.05$),且效果优于其他中药组($P < 0.05$);益气化痰化瘀组大鼠 TGF- β_1 蛋白表达光密度值明显低于模型组,与正常对照组和激素组数值较为接近。根据本研究结果推测,益气化痰化瘀可以有效降低血浆 PAI-1 含量及肺组织 TGF- β_1 的表达,从而在一定程度上抑制了 ECM 的生成和堆积,增加了组织纤维的降解,达到改善肺组织纤维化的治疗效果。本研究结果还可推广至肝、肾等器官纤维化的治疗,但其具体的作用机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] 张念志,徐祥稳,李国林,等. 参七虫草胶囊对肺纤维化大鼠 TGF- β_1 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医急症,2010,19(1):89-91.
[2] 王新华,朱渊红,王真,等. 丹参合参麦注射液对肺纤维化大鼠的干预作用及对 TGF- β_1 表达的影响[J]. 中国中医药科技,2009,16(6):441-442.

[3] 张艳,姜华,于睿,等. 益气活血复方对动脉粥样硬化家兔 PAI-I 及 t-PA 影响的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2009,7(8):934-935.
[4] 蔡望喜,尹杉杉,常建方. 中药益气化纤汤抗大鼠肺纤维化的实验研究[J]. 广州中医药大学学报,2009,26(3):263-265.
[5] 卢春美. 中医药治疗肺间质纤维化的临床研究概述[J]. 中国民族民间医药,2009,18(24):157-158.
[6] 高丽,马国强,杨敬平,等. 转化生长因子 β_1 和结缔组织生长因子在大鼠肺纤维化中的表达[J]. 临床肺科杂志,2009,14(8):1038-1040.
[7] 周小焯,郑雪冰,刘畅,等. 转化生长因子- β_1 和 III 型前胶原肽在百草枯中毒引发肺纤维化中的作用及机制研究[J]. 中国实验诊断学,2010,14(4):569-571.
[8] 易琳琳,彭素岚. 转移生长因子 β_1 与肺疾病研究进展[J]. 西南军医,2010,12(3):509-511.
[9] 李江,黄茂,武芳,等. 川芎嗪对博来霉素致肺纤维化大鼠病理形态学干预作用[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(2):143-145.
[10] Bachiller PR, Nakanishi H, Roberts JD Jr. Transforming growth factor-beta modulates the expression of nitric oxide signaling enzymes in the injured developing lung and in vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2010,298(3):L324-L334.
[11] Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, et al. Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor β_1 in lung fibroblasts and epithelial cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol,2010,118(3):142-150.
[12] Amal Abdul-Hafez Ruijie Shu, Bruce DU. JunD and HIF-1 α mediate transcriptional activation of angiotensinogen by TGF- β_1 in human lung fibroblasts[J]. FASEB J,2009,23(6):1655-1662.
[13] Zhou Y, Koli K, Hagood JS, et al. Latent transforming growth factor- β_1 -Binding protein-4 regulates transforming growth factor- β_1 bioavailability for activation by fibrogenic lung fibroblasts in response to bleomycin[J]. Am J Pathol,2009,174(1):21-33.
[14] Tarantal AF, Chen H, Shi TT, et al. Overexpression of transforming growth factor-beta1 in fetal monkey lung results in prenatal pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir J,2010,36(4):907-914.
[15] Allen GB, Cloutier ME, Larrabee YC, et al. Neither fibrin nor plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects lung function in a mouse model of acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2009,296(3):L277-L285.