

复方鳖甲软肝方对肺纤维化大鼠肺组织转化生长因子- β 1 的影响

付 敏,张东伟,王继峰*,牛建昭,杨美娟,李 健

(北京中医药大学 细胞生物化学实验室,北京 100029)

研究表明转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 在肺纤维化的发生和发展过程中起重要的作用^[1~3]。肺纤维化在发病过程中,炎症和损伤可以诱导 TGF- β 1 的活化和高表达^[4]。活化的 TGF- β 1 通过其受体和 Smad 途径增加细胞外基质的形成,从而进一步诱发肺纤维化。本实验室研究表明复方鳖甲软肝方具有抗博莱霉素诱发的肺纤维化作用^[5,6]。为了深入探讨其作用机制,本实验利用 Western blotting 和免疫组化方法,观察复方鳖甲软肝方对肺纤维化大鼠肺组织中 TGF- β 1 表达的影响,以进一步揭示其抗肺纤维化作用机制。

1 材料

1.1 实验药物:复方鳖甲软肝方(即复方鳖甲软肝片原料粉)由内蒙古福瑞制药有限公司提供,批号 20020501。注射用盐酸博莱霉素,日本化药株式会社制造,批号 X12100。

1.2 实验动物:SD 雄性大鼠,体重(206 \pm 16) g。实验动物和饲料购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验动物饲养在洁净级动物房,适应性喂养 1 周,饲料为该公司提供的固体全价饲料,饮用水为自来水,实验期间自由饮水和进食。

1.3 主要试剂:兔抗-TGF- β 1, Santa Cruz 公司产品。DAB kit、Alkaline phosphatase goat anti-rabbit IgG、NBT/BCIP 显色浓缩液,购自北京中山生物技术有限公司。

1.4 主要仪器:垂直板电泳仪、低温高速离心机、电印迹装置、匀浆器、微波炉、保湿盒、PCR 扩增仪(美国 Ericomp INC)、水平电泳仪、Nikon 4500 数码相机。

2 方法

2.1 大鼠肺纤维化模型复制^[5]:大鼠 1.5% 戊巴比妥钠 ip 麻醉(0.25 mL/100 g)后,固定在解剖台上,颈部剪毛,用碘酒与酒精消毒,切开颈正中部位皮肤,逐层剥离,暴露气管,然后向气管内注入 0.3 mL

博莱霉素生理盐水溶液(1 mg/200 g),继续注入 0.3 mL 空气,注后立即将动物直立并左右旋转,使药液在肺内均匀分布。其中假手术组大鼠肺部注入等体积的生理盐水,正常组大鼠不做任何处理。

2.2 实验动物的分组和给药方法^[6]:SD 大鼠分为假手术组、模型组、复方鳖甲软肝方组,每组 10 只。造模后第 2 天,各组大鼠分别 ig 给药。复方鳖甲软肝方原料粉,在使用时分别用蒸馏水溶解。其中假手术组、模型组大鼠分别 ig 生理盐水,给药剂量为 0.014 L/kg。复方鳖甲软肝方组 ig 复方鳖甲软肝方原料粉混悬液(0.7 g/kg),各组大鼠每天 ig 体积相等。每周连续给药 6 d,连续给药 4 周。到第 28 天时,ip 1.5% 戊巴比妥钠溶液(2.5 mL/kg)麻醉后,将大鼠固定,取肺脏用冷 PBS 清洗后,置于 -70 °C 冻存备用。

2.3 肺组织处理方法:取大鼠的右肺下叶及附叶适量,置于 -70 °C 中冻存。下叶及附叶剩余肺组织,部分用 PBS-甲醛固定,用于免疫组化染色;部分冻存于 -20 °C 冰箱,用于 Western blotting 测定。

2.4 Western blotting 法测肺组织中 TGF- β 1 水平:取 100 mg 肺组织,冻于液氮中。隔铝箔纸捣碎。用 1 mL 缓冲液 A [0.6% NP-40, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1 mmol/L PMSF] 溶解粉末,乳钵匀浆。将匀浆液转入 1.5 mL 管中,0 °C、2 000 \times g 离心 30 s,弃未破碎组织。上清液于冰浴中静置 15 min,0 °C、5 000 \times g 离心 15 min。小心移取上清液,分装,-20 °C 保存,即为胞浆蛋白。采用 15% 分离胶,5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳。半干法转移,5% 牛奶 4 °C 封闭过夜。加兔抗 TGF- β 1 做 1:1 000 稀释(一抗),4 °C 过夜。PBS 洗 5 min,3 次,将膜与 5% 牛奶,羊抗兔 IgG/HRP (二抗,1:2 000) 一起孵育,室温 2 h。PBS 洗 5 min,3~5 次。NBT/BCIP 显色,特异性条带显蓝紫色或蓝黑色。用 PBS 终止反应。照相,图像

收稿日期:2006-03-11

基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0413);国家自然科学基金资助项目(30510403202,30371775)

作者简介:付 敏(1979—),湖北武汉人,北京中医药大学 2001 级博士研究生,研究方向为中药作用的生化机制。

E-mail: fmess@163.com

* 通讯作者 王继峰 E-mail: wangjifeng@126.com

分析。实验重复 6 次。

2.5 免疫组化法测肺组织中 TGF-β1 的表达:将肺组织固定于中性甲醛液中,常规石蜡包埋,连续做厚 5 μm 的切片。免疫组化染色采用 SP 法,用 PBS 代替一抗作阴性对照。第一抗体浓度为 1:200。第二抗体为 HRP 标记,DAB 显色。显微镜观察,照相。图像分析。每组随机取 5 张切片,每张切片随机取 5 个视野,统一放大倍数为 200 倍,测定阳性细胞的面密度(阳性目标总面积/统计场总面积)。

2.6 实验结果处理:图像分析使用北航 CMIAS 医学图像分析管理系统,由军事医学科学院放射免疫所病理图像分析室分析,测定肺组织 TGF-β1 转移印迹图的吸光度值、免疫组化的面密度和 PCR 产物的吸光度值。实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 Western blotting 实验结果:见图 1 和表 1。模型组大鼠肺组织蛋白中 TGF-β1 的水平明显高于假手术组大鼠 ($P < 0.01$),说明肺纤维化大鼠肺组织中 TGF-β1 高度表达。而复方鳖甲软肝方组大鼠肺

组织蛋白中 TGF-β1 的水平降低。

3.2 TGF-β1 蛋白表达的免疫组化实验结果见图 2 及表 2。大鼠肺组织中 TGF-β1 的阳性部位主要在

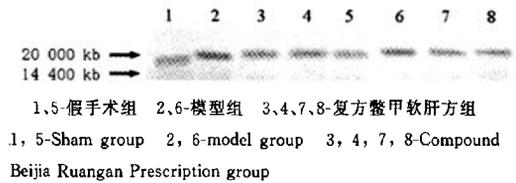


图 1 肺纤维化大鼠肺组织 TGF-β1 的 Western blotting 图像

Fig. 1 Images of Western blotting of TGF-β1 in lung tissue of pulmonary fibrosis rats

表 1 Western blotting 图像分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Results of image analysis of Western blotting ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	吸光度值
假手术	—	0.89 ± 0.12
模型	—	1.35 ± 0.21**
复方鳖甲软肝方	700	1.22 ± 0.16**

与假手术组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group

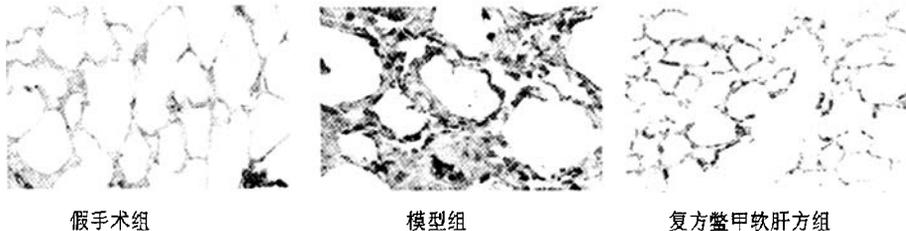


图 2 TGF-β1 免疫组化结果

Fig. 2 Results of immunohistochemistry of TGF-β1

表 2 免疫组化图像分析 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Image analysis of immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	面密度
假手术	—	0.010 0 ± 0.002 2
模型	—	0.036 0 ± 0.015 3**
复方鳖甲软肝方	700	0.013 9 ± 0.003 3△△

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Sham group; △△ $P < 0.01$ vs model group

细胞浆。假手术组大鼠主要分布于支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞、支气管周围结缔组织细胞、血管内皮细胞和肺内间质细胞。模型组大鼠 TGF-β1 大量表达,主要分布于上皮细胞、肺泡巨噬细胞和肺内间质细胞。复方鳖甲软肝方组的 TGF-β1 的表达量下降(与模型组相比, $P < 0.01$),主要分布于上皮细胞和肺内间质细胞。

4 讨论

目前研究发现,细胞因子网络在肺纤维化的发生和发展中起重要的作用。在众多的细胞因子中,TGF-β1 是导致肺纤维化关键性的细胞因子,它不仅可直接促进细胞外基质(ECM)沉积,而且还与其他细胞因子如 CTGF、血小板衍生生长因子(PDGF)、NF-κB/IκB、血管内皮生长因子(VEGF)、TNF-α 以及 Fas/Fas-L 等相互作用,组成一个复杂的信号网络,共同调节肺部的微环境。因此,对 TGF-β1 在肺纤维化变化情况的研究,将有助于进一步认识肺纤维化的发病机制,从而为临床的诊断和治疗肺纤维化提供科学的依据。

本实验利用 Western blotting 方法证明,肺纤维化大鼠肺组织蛋白中 TGF-β1 水平明显高于假手术组,这与文献报道结果相一致^[7,8]。TGF-β1 的活

化可诱导细胞的迁移、增殖及细胞外基质的过度合成^[8],诱发肺纤维化,这一点在肺纤维化的病人和实验动物中已经得到证实^[9]。阻断 TGF-β1 的活化或 TGF-β1 基因敲除的动物则不容易发生肺纤维化^[10,11]。本实验中观察到,大鼠 ig 复方鳖甲软肝方后肺组织蛋白中 TGF-β1 的水平有一定程度的降低,说明复方鳖甲软肝方能够从蛋白翻译水平调节肺组织 TGF-β1 的活性。

鉴于 TGF-β1 的高表达在肺纤维化发生中的重要作用,应用免疫组化方法对 TGF-β1 蛋白的来源进行研究。结果发现,TGF-β1 主要位于肺间质的纤维增生区域附近,部分小支气管及血管周围也有表达。文献报道 TGF-β1 主要来源于肺泡上皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞等^[12]。TGF-β1 在肺间质表达较假手术组也明显增强,这种高表达一直持续到第 80 天,提示肺内间质局部 TGF-β1 在纤维化持续发展中发挥重要作用。而组织病理学研究表明,80 d 时肺内成纤维细胞大量增生,肺泡结构破坏,纤维灶形成。免疫组化结果显示,肺成纤维灶呈强阳性反应,提示在肺纤维化进展期,肺内间质细胞是 TGF-β1 的主要来源之一。TGF-β1 蛋白在肺纤维化病灶中增加原因:(1)肺泡炎时肺泡巨噬细胞、嗜酸性细胞等高表达;(2)肺损伤时支气管和肺泡上皮细胞高表达;(3)肺纤维化时成纤维细胞、肌成纤维细胞等间质细胞高表达^[13]。高表达的 TGF-β1 能促进细胞外基质持续过量沉积,是肺纤维化发生和发展的主要原因。

肺纤维化大鼠 TGF-β1 在转录和翻译水平均表达增高,高水平的 TGF-β1 主要来源于上皮细胞和肺间质细胞。复方鳖甲软肝方能从蛋白水平上调节 TGF-β1 的分泌,从而发挥治疗肺纤维化的作用,这是复方鳖甲软肝方抗肺纤维化的机制之一。而复

方鳖甲软肝方是否具有影响其他相关细胞因子的作用,有待进一步研究。

References:

- [1] Kasper M, Seidel D, Knels L, et al. Early signs of lung fibrosis after *in vitro* treatment of rat lung slices with CdCl₂ (2) and TGF-beta (1) [J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 121 (2): 131-140.
- [2] Koslowski R, Seidel D, Kuhlisch E, et al. Evidence for the involvement of TGF-beta and PDGF in the regulation of prolyl 4-hydroxylase and lysyl oxidase in cultured rat lung fibroblasts [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2003, 55(4): 257-264.
- [3] Gauldie J, Galt T, Bonniaud P, et al. Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 2575-2584.
- [4] Bartram U, Speer C P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease [J]. *Chest*, 2004, 125(2): 754-765.
- [5] Zhang D W, Wang J F, Niu J Z, et al. Experimental Study on protection of compound Biejia Tablet exaggerated extracellular matrix accumulation of pulmonary fibrosis rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 34(4): 545-548.
- [6] Niu J Z, Zhang D W, Fu M, et al. Effect of Compound Biejia Ruangan Prescription on preventing injury of free radical in pulmonary fibrosis rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(10): 1510-1514.
- [7] Xu Y D, Hua J, Mui A, et al. Release of biologically active TGF-beta1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(3): L527-L539.
- [8] Krein P M, Winston B W. Roles for insulin-like growth factor I and transforming growth factor-beta in fibrotic lung disease [J]. *Chest*, 2002, 122 (6 Suppl): 289S-293S.
- [9] Bartram U, Speer C P. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease [J]. *Chest*, 2004, 125(2): 754-765.
- [10] Kelly M, Kolb M, Bonniaud P, et al. Re-evaluation of fibrogenic cytokines in lung fibrosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(1): 39-49.
- [11] Kolb M, Bonniaud P, Galt T, et al. Differences in the fibrogenic response after transfer of active transforming growth factor-beta1 gene to lungs of "fibrosis-prone" and "fibrosis-resistant" mouse strains [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27(2): 141-150.
- [12] Venkatesan N, Roughley P J, Ludwig M S. Proteoglycan expression in bleomycin lung fibroblasts: role of transforming growth factor-beta (1) and interferon-gamma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 283(4): L806-L814.
- [13] Zhang K, Flanders K C, Phan S H. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin induced pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 1995, 147(2): 352-354.

黄芪多糖对麻醉犬急性心源性休克血流动力学和氧代谢的影响

吕文伟¹,刘淑杰²,王秋静¹,李天舒¹,石卓^{1*}

(1. 吉林大学基础医学院 药理学教研室,吉林 长春 130021; 2. 白求恩医科大学制药厂,吉林 长春 130012)

心源性休克是急性心肌梗死的严重并发症之一,是引起急性心肌梗死死亡的主要原因^[1]。因此研

究开发具有正性肌力及保护心肌的药物尤其重要。黄芪始载于《神农本草经》,味甘、性温,有补气升阳,

收稿日期:2006-03-10

作者简介:吕文伟(1961-),男,吉林省长春市人,主管技师,主要从事心血管药理学研究。

*通讯作者 石卓 Tel:(0431) 5619799