

宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad 表达的影响

张 秀^{1,2}, 胡 静^{1*}, 覃 惠¹, 温昊天¹, 顾凯娟¹, 郑敏宇^{3*}, 安世英³

1. 上海中医药大学基础医学院, 上海 201203

2. 徐州市矿山医院, 江苏 徐州 221006

3. 上海中医药大学附属龙华医院 特需病房, 上海 200032

摘要: **目的** 观察宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad2 表达的影响。**方法** 将健康雄性 Wistar 大鼠 (SPF 级) 60 只, 随机分成 6 组, 对照组、模型组、醋酸泼尼松 (0.167 mg/kg) 组及宣肺化痰方高、中、低剂量 (14.38、7.19、3.60 g/kg) 组, 每组 10 只。经鼻滴入博来霉素 7 μ g/g (150 μ L) 建立肺纤维化动物模型。各给药组于造模 8 h 后开始分别 ig 醋酸泼尼松或宣肺化痰方, 每日 1 次。各组大鼠在造模 28 d 后取材。对肺组织行 HE 染色和天狼星红染色, 光镜下观察肺泡炎和肺纤维化改变; 采用碱性水解法测定肺组织中羟脯氨酸 (Hyp) 的量; 应用免疫组织化学法测定大鼠肺组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、Smad4、Smad7 表达; 应用 Western blotting 方法检测转化生长因子 β II 型受体 (TGF- β RII)、Smad2、p-Smad2、Smad7 的蛋白表达水平。**结果** 模型组肺泡结构严重破坏, 肺间质增生, 炎细胞浸润和胶原纤维增生。与对照组比较, 模型组 Hyp 水平、胶原阳性染色面积比值明显升高; 与模型组相比, 宣肺化痰方 3 个剂量组和醋酸泼尼松组肺泡间隔胶原纤维表达明显减少, Hyp 的量显著下降, 其中, 宣肺化痰方高剂量组比低、中剂量组胶原纤维表达更少, Hyp 的量更低。宣肺化痰方组与模型组相比, TGF- β RII、Smad2、p-Smad2、Smad4、 α -SMA 蛋白含量显著降低, 而 Smad7 蛋白表达明显升高。**结论** 宣肺化痰方能有效地防治肺纤维化, 其作用机制可能是通过调控 TGF- β /Smad 信号通路, 抑制 α -SMA 的过度表达, 进而减少胶原纤维的形成。

关键词: 宣肺化痰方; 肺纤维化; 转化生长因子 β 1; Smad2; Smad7

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)14-3326-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.019

Effects of Xuanfei Huayu Formula on expression of TGF- β 1/Smad in lung tissue of pulmonary fibrosis rats

ZHANG Xiu^{1,2}, HU Jing¹, QIN Hui¹, WEN Hao-tian¹, GU Kai-juan¹, ZHENG Min-yu³, AN Shi-ying³

1. College of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Mine Hospital of Xuzhou City, Xuzhou 221006, China

3. Special Wards, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Xuanfei Huayu Formula (XFHY) on the expression of TGF- β 1/Smad2 in pulmonary fibrosis rats. **Methods** Sixty male SPF Wistar rats were randomly divided into six groups: negative control group (group A), pulmonary fibrosis model group (group B), prednisone positive control group (group C, 0.167 mg/kg), the high doses of XFHY groups (group D, 14.38 g/kg), the medium doses of XFHY groups (group E, 7.19 g/kg), and the low doses of XFHY groups (group F, 3.60 g/kg) with ten rats in each group. The pulmonary fibrosis model was established by nasal instillation of bleomycin 7 μ g/g (150 μ L); In 8 h after the model establishment, the rats in C, D, E, and F groups were respectively treated with prednisone acetate or XFHY once daily. Negative control group (group A) and model group (group B) were given equal volume physiological saline. The rats in different groups were executed 28 d after modeling for sampling. The HE and sirius red staining were used to observe alveolitis even pulmonary fibrosis changes in lung tissue under the microscope; The alkaline hydrolysis method was adopted to determine the content

收稿日期: 2018-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001491); 上海市自然科学基金项目 (15ZR1441100); 经方理论应用研究中心 (A1-Z183020110); 上海市“中医学”一流学科科研创新基金项目; 上海中医药大学学院合作项目

作者简介: 张 秀 (1988—), 女, 安徽宿州人, 硕士, 研究方向为中医药防治肺炎、肺纤维化的研究。E-mail: zhangxiuyixue@126.com

***通信作者** 胡 静 (1975—), 女, 齐齐哈尔人, 硕士生导师, 副教授, 医学博士, 研究方向为中医药防治肺炎、肺纤维化的研究。

Tel: 13764428941 E-mail: h6enter@hotmail.com

郑敏宇 (1961—), 女, 上海人, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向为中医药治疗呼吸系统危重疑难病。E-mail: zmy616161@163.com

of hydroxyproline (Hyp) in lung tissue; The immunohistochemical method was used to determine the expression of α -SMA, Smad4, and Smad7 in rat lung tissues. The expression levels of TGF- β RII, Smad2, p-Smad2, and Smad7 proteins were detected by Western blotting. **Results** The alveolar structure of the model group was severely damaged, and the interstitial hyperplasia, inflammatory cell infiltration, and collagen fibrosis were observed. Compared with the negative control group, the content of hydroxyproline and collagen staining was significantly increased in the model group. Compared with the model group, the expression of collagen fibers in the alveolar interval of three-dose group and prednisolone acetate group was significantly reduced, and the content of hydroxyproline was decreased significantly. Among them, the collagen fiber expression in XFHY high-dose group was less than XFHY low- and medium-dose group, and the hydroxyproline content was much lower. The above results showed that XFHY had a certain dose-effect relationship with the efficacy of pulmonary fibrosis. On this basis, the mechanism of the action of XFHY continues to it should be further explored. It was found that the protein content of TGF- β RII, Smad2, p-Smad2, Smad4, and α -SMA were decreased significantly, while the expression of Smad7 was higher in the XFHY group compared with the model group. **Conclusion** XFHY can effectively prevent and treat pulmonary fibrosis, and its mechanism may relate to inhibit the over-expression of the α -SMA by regulating the TGF- β /Smad signaling pathway, thereby reducing the formation of collagen fibers.

Key words: Xuanfei Huayu Formula; lung fibrosis; TGF- β 1; Smad2; Smad7

肺纤维化是一种慢性和致命性的人类疾病，其特点是肺功能的减弱和成纤维细胞/肌成纤维细胞的激活和细胞外基质（ECM）的过度形成和胶原沉积持久的病理改变，并最终形成肺实质纤维化病灶。除肺移植外，目前尚缺乏有效的治疗肺纤维化的方法^[1]。转化生长因子 β （TGF- β 1）是至今发现的最强的 ECM 积聚诱导剂之一，参与多条信号通路，TGF- β 1 首先与 TGF- β II 型受体（TGF- β RII）结合，被活化的 TGF- β RII 会使 I 型受体的丝甘氨酸（GS）序列结构域磷酸化后，与 I 型受体形成异源聚体复合物，激活下游的 Smads 信号转导通路^[2]。Smads 家族中的 Smad2 是 TGF- β /Smads 信号通路活化蛋白，其正常表达与肺纤维化的形成直接相关；Smad7 则担负着抑制该信号通路活化的功能^[3]。近年来关于肺纤维化的中医探索性研究蓬勃发展，其主要病位在肺，也与脾肾密切相关。病性属本虚标实，病因主要为热（毒）、瘀、痰，痰热壅肺、痰瘀互阻型为肺纤维化治疗的关键所在，治则为宣肺平喘、清热化痰、活血化痰^[4-6]。本课题选用的宣肺化痰方（组方药材：生石膏、苦杏仁、瓜蒌皮、桃仁、土鳖虫）在临床上取得了较好的疗效，大大提高了患者的生存质量^[7]。本研究以博来霉素诱导大鼠肺纤维化为模型，观察宣肺化痰方对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2、Smad7 蛋白表达的影响，探讨其防治肺纤维化的可能机制，也为抗肺纤维化药物的研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 60 只，体质量 180~

210 g，由中国医学科学院药物研究所上海实验动物中心 [SCXK（沪）2013-0016] 提供，动物许可证号 SYXK（沪）2014-0008，喂养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 饲养间。

1.2 药物与仪器

宣肺化痰方组方药材的中药饮片均购自上海中医药大学附属曙光医院，经曙光医院杨涛副研究员鉴定均为《中国药典》2015 年版收录的正品；博来霉素粉剂（每支 15 mg，日本化药株式会社生产，批号 270560）；醋酸泼尼松片（上海医药集团有限公司信谊制药总厂生产公司，批号 120447）；羟脯氨酸（Hyp）试剂盒（南京建成生物工程有限公司）；酶标仪 Winooski VT 05404（BioTek 公司）；Powerpac universal 电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）；化学发光成像系统 FC-M（美国 ProteinSimple 公司）。

2 方法

2.1 宣肺化痰方水煎剂的制备

宣肺化痰方由生石膏 30 g、苦杏仁 6 g、瓜蒌皮 15 g、桃仁 9 g、土鳖虫 9 g 组成，药品规格为每剂含生药 69 g。生石膏先煎 20 min，余药加水浸泡 1 h 后先用武火急煎，沸后改用文火缓煎，头煎沸后 30 min，二煎沸后 15 min，煎煮完毕后分别滤过取汁，合并 2 次药液后水浴浓缩为每毫升药液含 1 g 生药（采用 TSQ-Quantum 液质联用系统对苦杏仁苷进行测定，质量分数为 40.9 mg/g），备用。

2.2 动物分组、模型制备及给药

健康雄性 Wistar 大鼠（SPF 级）60 只，随机分为 6 组，对照组、模型组、醋酸泼尼松组及宣肺化痰方高、中、低剂量组，除对照组外，其余各组大

鼠均以博莱霉素 7 $\mu\text{g/g}$ (150 μL) 的方法经鼻滴入给药制备肺纤维化动物模型; 对照组以同样的方法经鼻滴入等体积的生理盐水。造模 8 h 后开始 ig 给药, 宣肺化痰方高、中、低剂量组大鼠的给药剂量分别为 14.38、7.19、3.60 g/kg (其中中剂量相当于成人的临床等效剂量); 醋酸泼尼松组 ig 给予醋酸泼尼松混悬液 (0.167 mg/kg); 对照组和模型组分别 ig 等体积的生理盐水。各组大鼠连续给药 28 d, 在造模 28 d 时处死, 取材。

2.3 取材

大鼠以 20% 乌拉坦溶液 (5 mL/kg) ip 麻醉后固定于大鼠解剖台, 逐层分离各层组织, 迅速摘取肺, 并用冷生理盐水清洗, 取右下叶肺组织经 10% 福尔马林溶液固定, 每个肺组织蜡块连续切片 5 张, 1 张做常规 HE 染色, 1 张用 0.1% 苦味酸天狼星红溶液进行天狼星红染色, 光镜下观察肺间质纤维化的有无及程度。3 张切片进行免疫组化; 其余组织存于 EP 管中, 移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存, 分别用于测定 Hyp 水平和蛋白 Western blotting 检测。

2.4 肺组织病理形态学观察

病理切片行 HE 染色和天狼星红染色, 光镜下观察病理组织学变化并摄片, 参照 Lin 等^[8]方法评价各组大鼠肺组织肺炎程度及肺纤维化程度。

2.5 肺组织 Hyp 水平测定

将肺组织样本水解, 调 pH 值; 对空白管、标准管、测定管分别按实验说明书进行操作; 使用酶标仪在 550 nm 处, 1 cm 光径下, 双蒸水调零, 测各管吸光度值, 根据试剂盒说明计算 Hyp 水平。

2.6 免疫组织化学法测定大鼠肺组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、Smad4、Smad7 表达

将肺组织切片常规脱蜡至水, 用 PBS 配制新鲜的 3% H_2O_2 , 室温封闭 5 min, 用微波法进行抗原修复 (100 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min), 滴加正常山羊血清封闭液 (室温、20 min), 分别滴加兔抗鼠 α -SMA、Smad4、Smad7 单克隆抗体一抗 50 μL (1:100、37 $^{\circ}\text{C}$ 、60 min), 再滴加生物素二抗 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 min), 按即用型免疫组织化学试剂盒说明书 (SP 法) 进行 DAB 显色操作。再进行常规苏木素复染, 脱水、透明、封片、镜检。用 PBS 代替一抗进行免疫组织化学染色, 结果作为阴性对照。用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件系统采集肺组织免疫组织化学图像, 进行半定量分析, 每组取 9~10 张切片, 随机取染色区域 6 个高倍视野 ($\times 200$), 测量每个

视野阳性染色的面积 (μm^2), 计算阳性染色面积与总面积 ($4\,076 \times 3\,068$) 的比值, 进行比较与分析。

2.7 Western blotting 法测定肺组织 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2、Smad7 的蛋白表达

提取肺组织总蛋白; 按 BCA 法检测总蛋白的浓度; 电泳 135 min (60 V, 45 min 后转 100 V, 90 min), 再用 PVDF 膜转移 (400 mV, 1 h); 含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h 后, 用特异性一抗 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日以二抗稀释液 (1:3 000) 孵育 1 h; 结束后 TBST 洗涤 3 次, 最后采用美国 Protein Simple 化学发光成像系统曝光, 并用 Alpha View SA 软件测定灰度值, 以目的蛋白/GAPDH 计算目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析, 结果用中位数或四分位数间距和 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若不符合参数方法应用条件, 则先数据转换后再进行相应的方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠肺组织病理形态的影响

3.1.1 HE 染色结果 对照组大鼠肺组织结构及肺泡壁均完整, 肺泡隔无增宽, 少数细支气管壁及肺泡隔可见少量炎细胞浸润。模型组造模 28 d 时可见肺组织结构严重破坏, 细支气管壁上皮细胞水肿、坏死、部分脱落, 管壁纤维化, 腔内见大量炎性渗出物, 局部 II 型肺泡上皮细胞增生, 肺泡腔内可见大量炎细胞浸润, 肺间质纤维组织广泛增生, 纤维化区可见大量增生的纤维细胞和胶原纤维沉积, 可见大小不等的囊性纤维气腔形成即“蜂窝肺”。醋酸泼尼松组及宣肺化痰方 3 个剂量组与模型组比较病理改变程度有所减轻, 成纤维细胞、胶原沉积减少, 炎性细胞浸润也减轻。结果见图 1。

3.1.2 天狼星红染色结果 对照组大鼠支气管周围、肺泡隔及血管壁可见少量红色的胶原纤维沉积, 为肺间质的正常组织成分; 模型组各级支气管壁、肺泡隔及肺血管壁均可见片状或束状的胶原纤维沉积, 同时大量红色胶原沉积于肺泡腔内, 与对照组比较, 胶原纤维沉积面积增加, 差异显著 ($P < 0.01$); 醋酸泼尼松组与宣肺化痰方 3 个剂量组大鼠肺支气管壁与血管壁的胶原纤维主要聚集于肌层下, 肺泡间隔胶原纤维表达较模型组显著减少 ($P < 0.01$)。其中, 宣肺化痰方高剂量组比宣肺化痰方低剂量 ($P < 0.05$) 和中剂量组胶原纤维表达更少。结果见图 1 和表 1。

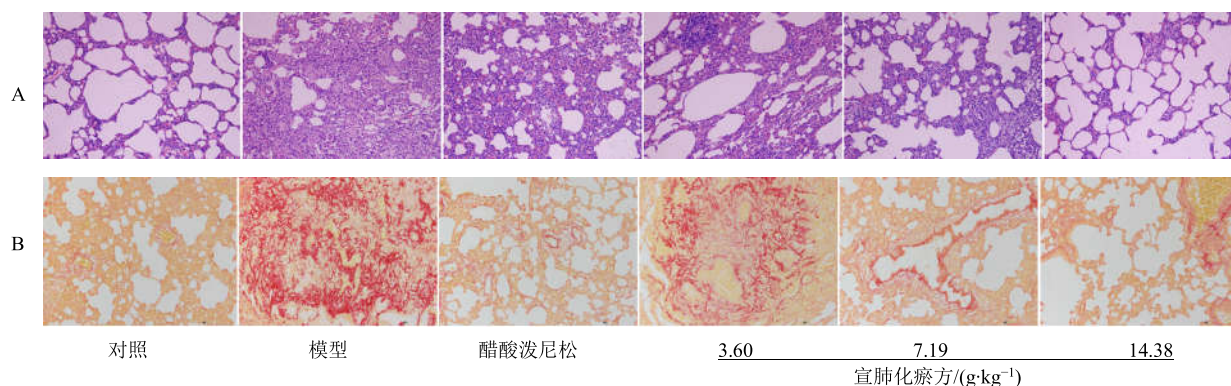


图 1 各组大鼠肺组织切片 HE 染色 (A) 和天狼星红染色 (B) 结果 ($\times 200$)

Fig. 1 HE staining (A) and sirius red staining (B) of lung tissues of rats in each group ($\times 200$)

表 1 各组大鼠肺组织 Hyp、胶原阳性染色面积比值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Level of Hyp and positive staining area ratio of collagen in lung tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Hyp/($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)	胶原阳性染色 面积比值
对照	—	0.932 0 $\pm$ 0.154 6	0.012 4 $\pm$ 0.008 1
模型	—	1.789 4 $\pm$ 0.173 2**	0.240 9 $\pm$ 0.064 6**
醋酸泼尼松	1.67 $\times 10^{-4}$	1.101 4 $\pm$ 0.057 6 ^{###}	0.038 7 $\pm$ 0.016 6 ^{###}
宣肺化痰方	3.60	1.404 1 $\pm$ 0.052 9 ^{###$\Delta\Delta\Diamond$}	0.059 6 $\pm$ 0.018 5 ^{###$\Diamond$}
	7.19	1.360 6 $\pm$ 0.041 6 ^{###$\Delta\Delta\Diamond$}	0.045 8 $\pm$ 0.010 7 ^{###}
	14.38	1.223 9 $\pm$ 0.152 0 ^{###Δ}	0.035 2 $\pm$ 0.018 9 ^{###}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与醋酸泼尼松组比较: ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$; 与宣肺化痰方高剂量组比较: ^{$\Diamond$} $P < 0.05$ ^{$\Diamond\Diamond$} $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs model group; ^{$\Delta\Delta$} $P < 0.01$ vs Prednisone acetate group; ^{$\Diamond$} $P < 0.05$ ^{$\Diamond\Diamond$} $P < 0.01$ vs high dose of Xuanfei Huayu Formula group, same as below

表 2 各组大鼠肺组织 α -SMA、Smad4、Smad7 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison on protein expression of α -SMA, Smad4, and Smad7 in lung tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	阳性染色面积比值		
		α -SMA	Smad4	Smad7
对照	—	0.007 4 $\pm$ 0.003 2	0.001 9 $\pm$ 0.000 9	0.025 3 $\pm$ 0.008 1
模型	—	0.115 4 $\pm$ 0.042 8**	0.030 0 $\pm$ 0.014 1**	0.007 4 $\pm$ 0.003 7**
醋酸泼尼松	1.67 $\times 10^{-4}$	0.015 6 $\pm$ 0.005 1 ^{##}	0.009 1 $\pm$ 0.005 1 ^{##}	0.025 5 $\pm$ 0.012 4 ^{##}
宣肺化痰方	14.38	0.017 5 $\pm$ 0.005 3 ^{##}	0.005 0 $\pm$ 0.003 3 ^{##Δ}	0.020 4 $\pm$ 0.004 8 ^{##}

3.4 对大鼠肺组织 Smad4 和 Smad7 表达的影响

以肺组织中出现棕黄色颗粒为 Smad4、Smad7 阳性显色。对照组大鼠肺组织中有少量 Smad4 阳性表达, 主要分布于支气管黏膜上皮细胞, Smad7 阳性表达较多, 主要分布于肺支气管上皮、肺泡上皮和肺泡巨噬细胞。模型组肺组织中的 Smad4 阳性表

3.2 对大鼠肺组织 Hyp 水平的影响

结果显示, 造模 28 d 后, 模型组大鼠肺组织的 Hyp 水平较对照组明显增加, 差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠肺组织中 Hyp 的量均明显降低, 差异显著 ($P < 0.01$)。其中, 宣肺化痰方高剂量组比低剂量 ($P < 0.01$) 和中剂量组 ($P < 0.05$) Hyp 水平更低。见表 1。

3.3 对大鼠肺组织 α -SMA 表达的影响

以肺组织中出现棕黄色颗粒为 α -SMA 阳性显色。对照组大鼠肺组织的较大气管和血管平滑肌偶见 α -SMA 阳染细胞; 模型组肺组织可见大量 α -SMA 阳染细胞, 形成成纤维细胞灶, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); 宣肺化痰方高剂量组和醋酸泼尼松组肺组织未见成纤维细胞灶, 与模型组比较, α -SMA 阳染细胞明显减少 ($P < 0.01$)。结果见表 2 和图 2。

达明显增多, 主要分布于肺泡巨噬细胞、支气管黏膜上皮细胞、血管内皮细胞及成纤维细胞, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$); Smad7 阳性表达明显减少, 在肺泡上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及支气管上皮细胞、血管内皮细胞中始终见极低表达, 与对照组比较, 差异显著 ($P < 0.01$)。宣肺化

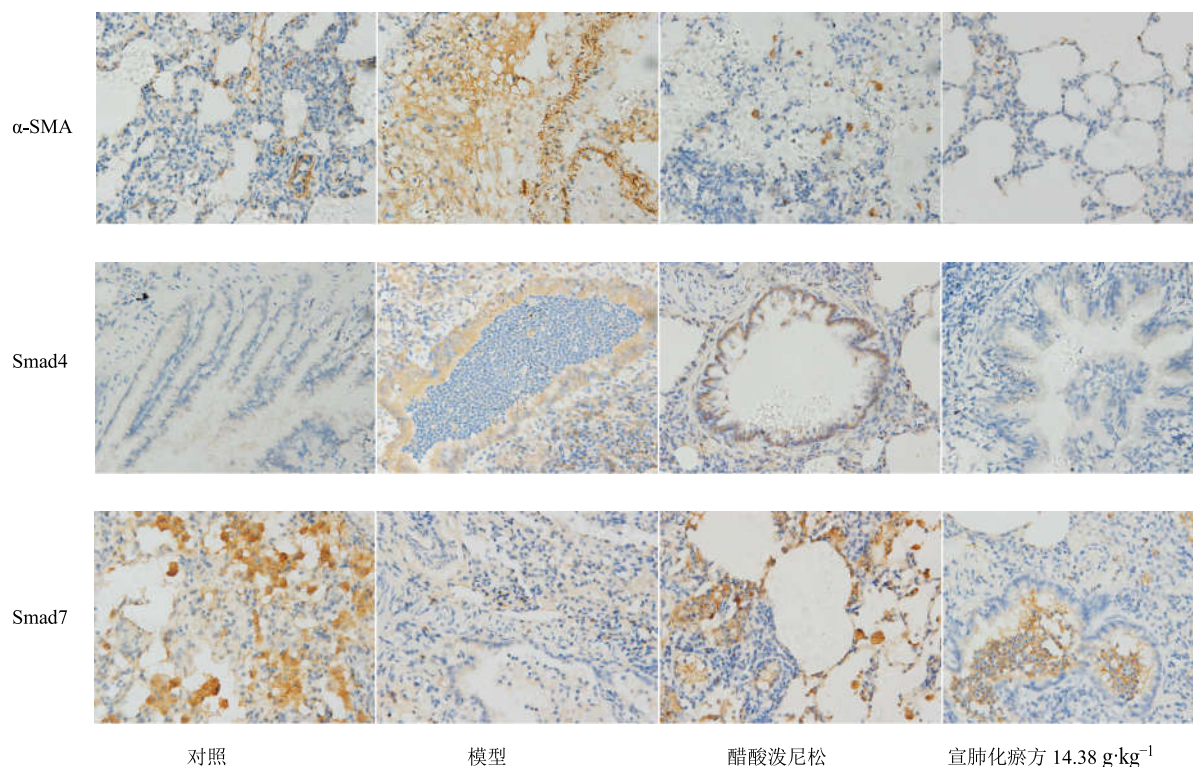


图 2 各组大鼠肺组织 α -SMA、Smad4、Smad7 的免疫组化染色 ($\times 400$)

Fig. 2 Immunohistochemical staining of α -SMA, Smad4, and Smad7 in lung tissues of rats in each group ($\times 400$)

痰方组和醋酸泼尼松组 Smad4 阳染细胞较模型组明显减少 ($P < 0.01$); 而 Smad7 阳染细胞较模型组明显增加 ($P < 0.01$)。见表 2 和图 2。

3.5 对肺组织 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2、Smad7 蛋白表达的影响

Western blotting 测定结果显示, 造模 28 d, 与对照组比较, 模型组大鼠肺组织中 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2 的相对蛋白表达量明显增高; 与模型组比较, 醋酸泼尼松组和宣肺化痰方 (14.38 g/kg) 组的 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2 表达量降低。而模型组大鼠肺组织中 Smad7 的相对蛋白表达量较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 醋酸泼尼松组和宣肺化痰方组大鼠肺组织中 Smad7 较模型组明显升高, 且差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 3。

4 讨论

近年来, 随着以 PM 2.5 为主的城市环境污染物的加重, 呼吸道抵御疾病的能力逐渐减弱, 肺纤维化的患病率及致死率均呈明显上升趋势, 据最新估计, 肺纤维化的出现率由每 10 万人中的 6.8~16.3 上升为每 10 万人中的 11.0~42.7, 西医学对本病的治疗仅局限于糖皮质激素和免疫抑制剂, 有临床研究显示激素和(或)免疫抑制剂治疗组和非治疗组的中位生存期

的差异无统计学意义, 且会产生严重的副作用^[9-10]。肺移植虽然是一种有效的治疗手段, 但合适的肺源极度缺乏, 且手术成本极高, 很难为患者接受。而中医学对肺纤维化的防治进行了许多有益的探索, 并在探索中愈来愈突显出其独特的优势^[11-12]。

4.1 TGF- β 1/Smad 通路在肺纤维化形成中的核心作用

研究表明^[13], TGF- β 1 可引起成纤维细胞活化, 胶原合成、沉积并致纤维化, 对多数细胞的免疫调节、创伤修复、胚胎发生、细胞凋亡等方面都发挥着不同的功能。特别是 TGF- β 1 能够从损伤部位周围募集成纤维细胞, 刺激未成熟的成纤维细胞增生和分化, 直接导致纤维化后期的 ECM 过量沉积^[14]。TGF- β 的交互功能主要是通过复杂的丝氨酸/苏氨酸激酶受体的跨膜活动, TGF- β 受体分为 I 型和 II 型受体。Li^[15]课题组通过敲除 TGF- β RII 的特殊上皮组织来干预博来霉素诱导的肺纤维化实验模型, 证明了 TGF- β RII 信号在肺纤维化过程中的特殊作用。Oruqaj 等^[16]也已证实在 TGF- β RII 基因敲除小鼠模型研究中, TGF- β 信号阻止了博来霉素诱导的过氧化物酶体的下调, 从而中断了肺纤维化的进程。刺激或者激活 TGF- β 导致 Smad2 和 Smad3 的

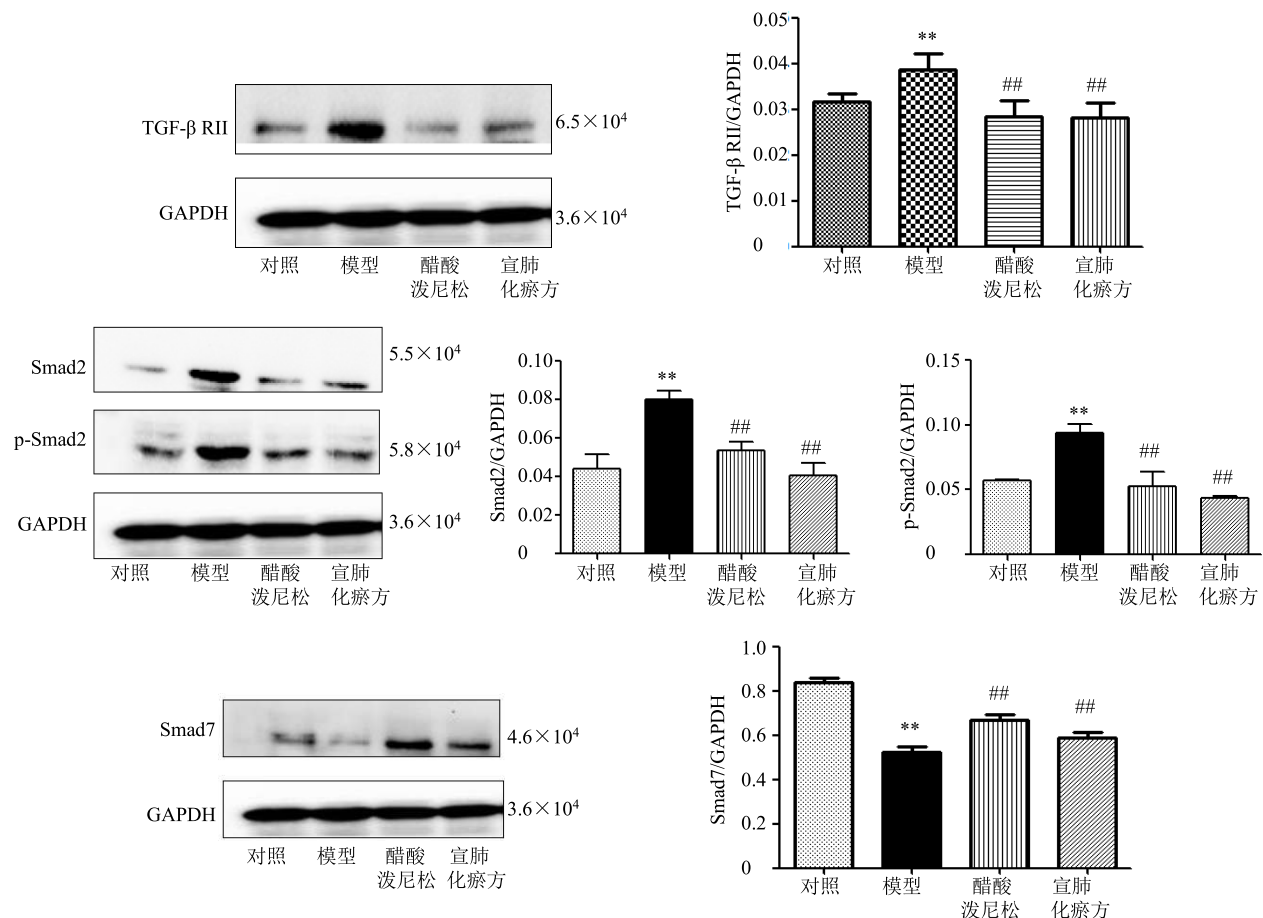


图 3 各组大鼠肺组织 TGF-β RII、Smad2、p-Smad2、Smad7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Comparison on protein expression of TGF-β RII, Smad2, p-Smad2, and Smad7 in lung tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

磷酸化，与 Smad4 结合，形成复杂的结合体。此复杂的结合体易位至细胞核，与靶基因结合，通过 DNA 进而与相应的特异启动转录因子互动^[17]。Smads 蛋白是 TGF-β 家族的特异性细胞内信号转导分子，其中 Smad2 是主要的 TGF-β/Smads 信号通路活化蛋白，Aschner 等^[18]通过建立 Ptpa^{-/-}成纤维细胞模型观察到模型组 α-SMA, EDA-纤连蛋白, collagen-1A 和结缔组织生长因子 (CTGF) 的表达量减少，论证了该模型可以调控 TGF-β 诱导的 Smad2/3 转录活动，以此来阻断肺纤维化进程。Meng 等^[19]指出 TGF-β 不仅会调控 Smad7 的转录活动，也会通过活化 Smad2/3 依赖的 Smurf 介导的泛素化酶体途径来抑制 Smad7 的表达，因此在肺纤维化疾病中维持 TGF-β1 介导的 Smad2/3 和 Smad7 表达的平衡，是一个很值得研究探讨的问题。

4.2 肺纤维化的中医认识

肺间质纤维化在中医古籍中无相对应的病名，但根据其临床表现，如咳嗽、咳痰、进行性呼吸困难等症状，多将其归属于“咳嗽”“喘证”“痰饮”等范畴，同时又具有反复发作或缠绵不愈的特性，又与“肺痹”“肺痿”相吻合^[20-21]。中医学认为，邪气积留，宣肃不彻，导致肺中气血津液受损，渐生痰浊、瘀血等病理产物是肺泡炎向肺纤维化病理阶段转变的主要特点。赵晶晶等^[22]通过大量的理论总结和临床观察认为肺气虚弱以及络气不足易致痰瘀交互、阻滞肺络，是肺纤维化的基本病机之一。但肺纤维化病因病机复杂，要进一步加强对其病机的研究，完善辨证分型的标准。近年来，不少名医专家依据临床经验或结合实验研究对其辨证分型提出了很有见地的想法。庞立健等^[23]提出解毒通络法是治疗肺间质纤维化的重要治法，临床上当区分继发

与特发, 灵活用药。早期以毒损肺络, 痰瘀壅滞为主要病机特点, 治当强调解毒排毒, 活血化痰通络。肺纤维化以及继发性肺纤维化晚期, 虚、痰、瘀、毒互结, 治当标本兼治, 通补兼施。卢绪香等^[24]将所收集的中医药抗纤维化处方应用频数分析、聚类分析、因子分析方法, 对其进行数据挖掘, 对主要药物、药对规律进行探讨, 将其病理因素根于痰和瘀, 病理性质以热为主, 燥热伤肺、痰热蕴结、痰瘀痹阻、气阴两虚为肺纤维化的主要病理机制。

4.3 宣肺化痰方的组方原则

肺纤维化早期可症见身热、咳嗽或气喘、胸闷甚则胸痛, 痰黄而黏稠, 舌苔黄腻, 痰涎壅盛, 潮热便秘, 属痰热壅肺、痰瘀互阻型。治则为宣肺平喘、清热化痰、活血化痰。宣肺化痰方由经典方剂宣白承气汤合下瘀血汤去生大黄和制大黄所成, 主要药物为生石膏(先) 30 g、苦杏仁 6 g、瓜蒌皮 15 g、桃仁 9 g、土鳖虫 9 g。宣白承气汤是温病大家吴鞠通《温病条辨》中焦篇治疗痰热壅滞、肺气郁而不降的有效方剂。下瘀血汤是《金匱要略》中张仲景活血化痰法的经典方。王雪菲等^[25]通过梳理近年来关于下瘀血汤实验研究的成果发现, 下瘀血汤具有抗纤维化、保护肾功能、抗肿瘤等作用。前期研究^[26]发现, 宣肺通腑化痰方通过抑制 TGF- β 1 蛋白表达, 可以减轻博来霉素所致的小鼠肺泡炎及纤维化程度, 采用的宣肺通腑化痰方是由宣白承气汤合下瘀血汤去制大黄而成。近 13 年来, 本课题组在上海中医药大学附属龙华医院、上海市中医医院收集病例, 针对无便秘、非短时间用药可愈的间质性肺病患者, 运用宣肺通腑化痰方去生大黄(简称宣肺化痰方)治疗, 取得了较好的临床疗效。

4.4 宣肺化痰方对肺纤维化大鼠 TGF- β 1/Smad 表达的影响

本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠可见肺泡结构有不同程度的破坏, 肺间质增生, 炎细胞浸润和胶原纤维增生, Hyp 的量明显增加; 与模型组比较, 醋酸泼尼松组和宣肺化痰方 3 个剂量组的肺泡炎和肺纤维化程度均有不同程度的改善, Hyp 的量均有明显的降低。其中, 宣肺化痰方高剂量组比低剂量组($P < 0.05$)和中剂量组胶原纤维表达更少, Hyp 的量更低, 呈一定的量效关系。在此基础上, 笔者进一步探讨了宣肺化痰方防治肺纤维化的作用机制。免疫组化和 Western blotting 结果显示, 与模型组比较, 醋酸泼尼松组、宣肺化痰方组

的 TGF- β RII、Smad2、p-Smad2、Smad4 的蛋白表达量降低, 而宣肺化痰方组 Smad7 的蛋白表达量较模型组增加, 均具有统计学意义。综上所述, 宣肺化痰方对博来霉素所致大鼠肺纤维化有一定的防治作用, 其机制可能与抑制 TGF- β /Smad 信号通路中的 TGF- β IIR、Smad2、p-Smad2 的过度表达, 上调 Smad7 蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组. 特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(6): 427-432.
- [2] Lee C M, Jin W P, Won-Kyung C, et al. Modifiers of TGF- β 1 effect or function as novel therapeutic targets of pulmonary fibrosis [J]. *Korean J Intern Med*, 2014, 29(3): 281-290.
- [3] Yu W, Liu D, Liang C, et al. Sulfur dioxide protects against collagen accumulation in pulmonary artery in association with downregulation of the transforming growth factor- β 1/Smad pathway in pulmonary hypertensive rats [J]. *J Amer Heart Assoc*, 2016, doi: 10.1161/JAHA.116.003910.
- [4] 黄云鉴, 龚婕宁. 中医治疗肺纤维化方药规律的文献分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 206-210.
- [5] 公 腾, 闫丹丹, 窦迎春, 等. 肺纤维化中医研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2016, 40(6): 579-582.
- [6] 郭永红. 中医治疗肺间质性疾病的研究进展 [J]. 四川中医, 2016, 34(1): 220-222.
- [7] 安世英, 赵文清, 郑敏宇, 等. 加味下瘀血汤联合乙酰半胱氨酸治疗间质性肺纤维化的临床研究 [J]. 上海中医药杂志, 2017, 51(9): 57-59.
- [8] Lin C, Thüsen J, Daalhuisen J, et al. Pharmacological targeting of protease-activated receptor 2 affords protection from bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Mol Med*, 2015, 21(1): 576-583.
- [9] 陈 宵. 联合药物治疗肺纤维化的临床疗效观察 [J]. 临床研究, 2016, 14(2): 144-145.
- [10] 王恺京, 陆 英, 赵 倩, 等. 特发性肺纤维化的发病机制和临床治疗 [J]. 中国医药导报, 2015, 12(12): 32-39.
- [11] 苏凤哲, 赵 昕, 刘 真, 等. 中药抗肺纤维化临床研究概况 [J]. 中医临床研究, 2016, 8(6): 107-111.
- [12] 蔡 健, 顾振纶, 蒋小岗, 等. 黄芩总黄酮对博来霉素致大鼠肺纤维化的干预作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 119-124.
- [13] Hu N P, Duan J L, Li H H, et al. Hydroxysafflor yellow A ameliorates renal fibrosis by suppressing

- TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *PLoS One*, 2016, 18(4): 1-14.
- [14] Luo F Y, Zhuang Y, Sides M D, *et al.* Arsenic trioxide inhibits transforming growth factor- β 1-induced fibroblast to myofibroblast differentiation *in vitro* and bleomycin induced lung fibrosis *in vivo* [J]. *Respir Res*, 2014, 5(1): 51-65.
- [15] Li M, Krishnaveni M S, Li C G, *et al.* Epithelium-specific deletion of TGF- β receptor type II protects mice from bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 277-287.
- [16] Oruqaj G, Karnati S, Vijayan Vijith, *et al.* Compromised peroxisomes in idiopathic pulmonary fibrosis, a vicious cycle inducing a higher fibrotic response via TGF- β signaling [J]. *PNAS*, 2015, 112(16): E2048-E2057.
- [17] Li L, Huang W T, Li K L, *et al.* Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- β signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43605-43619.
- [18] Aschner Y, Khalifah A P, Briones N, *et al.* Protein tyrosine phosphatase a mediates profibrotic signaling in lung fibroblasts through TGF- β responsiveness [J]. *Amer J Pathol*, 2014, 184(5): 1498-1502.
- [19] Meng X M, Tang M K, Li J, *et al.* TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis [J]. *Frontiers in Physiol*, 2015, 6(82): 1-8.
- [20] 纪娟, 张念志. 浅析益气活血法治疗肺纤维化 [J]. 光明中医, 2016, 31(5): 644-646.
- [21] 贾新华, 陈宪海, 张兴彩. 肺纤维化从“痹”论治 [J]. 中医药信息, 2013, 30(2): 1-3.
- [22] 赵晶晶, 李志更. 从络病理论谈肺纤维化的辨治 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(4): 461-463.
- [23] 庞立健, 吕晓东, 刘创, 等. 基于络病理论中医药防治肺纤维化证治研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4135-4137.
- [24] 卢绪香, 张伟. 基于数据挖掘特发性肺纤维化方药优化研究 [J]. 辽宁中医药杂志, 2014, 41(10): 2070-2072.
- [25] 王雪菲, 刘成, 曹勤, 等. 下瘀血汤实验研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(1): 137-139.
- [26] 胡静, 郭永洁, 刘旭凌. 宣肺通腑化痰法对肺间质纤维化小鼠羟脯氨酸和转化生长因子- β 1 含量的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(4): 234-237.