

补肾益肺消癥方对 α -SMA 及 SP-C 蛋白对肺纤维化大鼠病变肺组织分布及表达的影响

杨颖溪 柴立民 晏军 高伟华 吴甜甜 朱紫亨 余佳骏 徐昉

【摘要】 目的 探讨补肾益肺消癥方干预肺纤维化大鼠 α -SMA 及 SP-C 蛋白在病变肺组织中分布及表达的作用机制。**方法** 以博来霉素致大鼠肺纤维化的动物模型,以吡非尼酮作为阳性对照药物,补肾益肺消癥方分别于模型过程中、造模后及实验全程进行干预,观察动物活动及体重变化,免疫组化检测病变肺组织中 α -SMA、SP-C 蛋白表达。**结果** 大鼠体重显示,模型组体重较正常组明显减轻 ($P<0.05$),中药防治组体重较模型组明显升高 ($P<0.05$)。免疫组化、免疫荧光结果显示,模型组病变肺组织中 α -SMA、SP-C 蛋白表达较正常组明显升高 ($P<0.05$),阳性组和中药组 α -SMA、SP-C 蛋白表达较模型组明显减低 ($P<0.05$)。**结论** 补肾益肺消癥方可以通过减少 α -SMA 的表达及成熟 SP-C 蛋白沉积,减少成纤维灶的形成,抑制内质网应激反应,延缓特发性肺纤维化的病理进程,从而达到治疗的目的。

【关键词】 补肾益肺消癥方; 特发性肺纤维化; 内质网应激; α -平滑肌肌动蛋白; 肺泡表面活性蛋白 C

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.005

Influences of Bushen Yifei Xiaozheng decoction on the distribution and expression of α -SMA and SP-C protein in IPF rat YANG Yingxi, CHAI Limin, YAN Jun, et al. Geriatrics Department, Zhengzhou Hospital of traditional Chinese Medicine, Henan 100700, China

Corresponding author: YAN Jun, E-mail: dzmyyyj@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of Bushen Yifei Xiaozheng decoction in the distribution and expression of α -SMA、SP-C protein of pulmonary fibrosis rats. **Methods** IPF rat model were induced by Bleomycin. Rats were treated with pirfenidone and Bushen Yifei Xiaozheng decoction respectively before modeling. To observe the changes of activity and the weight of rats during the modeling, after modeling and the whole experiment. The expression of α -SMA and SP-C protein of lung tissue was detected by immunohistochemical staining method. **Results** The weight of model group was lighter than the normal group ($P<0.05$), and the Chinese medicine group gained more weight than the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression of α -SMA and SP-C were decreased significantly in the treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Bushen Yifei Xiaozheng decoction can reduce the expression of α -SMA and the deposition of the mature SP-C, release the endoplasmic reticulum stress, then to achieve the purpose of treatment.

【Key words】 Bushen Yifei Xiaozheng decoction; Idiopathic pulmonary fibrosis; Endoplasmic reticulum stress; α -SMA; SP-C

基金项目: 国家自然科学基金(81373589)

作者单位: 450006 河南省郑州市中医院分院老年病科[杨颖溪(硕士研究生)]; 中医内科学教育部和北京市重点实验室(柴立民); 北京中医药大学东直门医院呼吸科[晏军、高伟华、吴甜甜、朱紫亨、余佳骏、徐昉(硕士研究生)]

作者简介: 杨颖溪(1990-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治肺系疾病。E-mail: yangyingxi04@163.com

通信作者: 晏军(1968-), 博士, 主任医师。研究方向: 中医药防治肺系疾病。E-mail: dzmyyyj@126.com

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的病理改变主要为弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱, 最终可导致肺间质纤维化。IPF 最初病理表现为肺泡炎, 随疾病进展, 出现成纤维细胞和胶原纤维增生, 肺泡结构被破坏, 最后呈现弥漫性肺纤维化, 形成“蜂窝肺”。成纤维灶是肺纤维化的特征性表现, 其核心是活化的肌成纤维细胞, 而 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 是肌成纤维细胞的特征性标志物^[1]。“蜂窝肺”的形成, 主要是由于 II 型肺泡上皮细胞 (alveolar epithelial cells II, AEC II) 过度凋亡, 不能及时修补破坏的 I 型肺泡上皮细胞, 而被支气管或内皮细胞所代替^[2]。近年来有研究表明内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 可导致 AEC II 凋亡, 肺泡表面活性蛋白 C (surfactant proteins C, SP-C) 分泌减少。本实验以博来霉素 (bleomycin, BLM) 致大鼠肺纤维化为动物模型, 观察补肾益肺消癥方对 α -SMA 及 SP-C 蛋白在肺纤维化大鼠肺组织中分布及表达的影响, 探讨其调控病变肺组织肌成纤维细胞及细胞 ERS 的作用靶点, 研究该方治疗特发性肺纤维化的效应机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 60 只, 雄性, 体重 (200 ± 20) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号: 11400700045968。饲养于东直门医院屏障级实验动物中心。

1.2 实验药物

造模用盐酸博来霉素 (15 mg/瓶, 购自日本化药株式会社), 批号: 730342; 补肾益肺消癥方组成: 当归、熟地黄、陈皮、法半夏、浙贝母、水蛭、炙甘草, (4:5:3:3:4:2:2), 为中药全成分免煎颗粒, 由北京康仁堂药业有限公司提供; 吡非尼酮胶囊 (100 mg/粒), 批号: 140101, 购自北京康蒂尼药业有限公司。Rabbit anti-SP-C 购自 Santa CRUZ 生物公司, Mouse anti- α -SMA、Cy3-goat anti-rabbit IgG 购自博士德公司。

1.3 分组及造模

60 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组、中药预防组、中药治疗组、中药防治组, 每组 10 只。3.25% 水合氯醛麻醉大鼠, 除正常组外, 其余大鼠经气管插管以 5 mg/kg 缓慢注入博来霉素^[3], 药物注入后将动物直立旋转, 使药物分布均匀, 正常组注入等量生理盐水。造模后中药预防组、中

药防治组以 12.68 g/(kg·d) 灌胃给药, 正常组和模型组予等量生理盐水, 每周称量大鼠体重, 观察其活动及毛色变化。给药至 28 天后 (模型成功后) 处死中药预防组动物, 并开始阳性组和中药治疗组给药, 阳性对照组以 53.5 mg/(kg·d) 予吡非尼酮, 中药治疗组、中药防治组以 12.68 g/(kg·d) 予中药颗粒剂, 正常组和模型组仍给予等量生理盐水, 继续给药 28 天, 观察大鼠体重和活动状况。

1.4 取材

分别于 28 天、56 天, 取动物病变肺组织。快速分离出肺脏, 用生理盐水洗净血液。取病变肺组织, 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 备免疫组化、免疫荧光检测。

1.5 免疫组化

取石蜡组织切片, 脱蜡复水, 柠檬酸修复液抗原修复, 血清室温封闭, 加 Mouse anti- α -SMA 孵育过夜。biotin-goat anti-rabbit、SABC 室温孵育后 DAB 显色, 流水冲洗后苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。应用 IPP 6.0 软件对图片进行平均光密度值测定, 每组 8 个样本, 每个样本测量两次取平均值。

1.6 免疫荧光

组织切片脱蜡复水及抗原修复同 α -SMA 染色, Rabbit anti-SP-C 孵育过夜。Cy3-goat anti-rabbit IgG 避光孵育后 DAPI 复染核, PBS 冲洗, 水封片后荧光显微镜拍照。应用 IPP 6.0 软件对图片进行平均光密度值测定, 每组 8 个样本, 每个样本测量两次取平均值。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 所有计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠的体重及活动状态变化

正常组大鼠肌肉丰满, 皮毛光泽, 摄食及日常活动正常; 模型组及治疗各组大鼠从造模后第 2、3 天即出现精神不振, 气喘搔鼻, 皮毛暗淡干枯, 体型消瘦, 其中又以模型组动物最为明显。经药物干预, 造模后 3 周, 模型组及治疗各组体重均较正常组低, 其中模型组体重明显减轻 ($P < 0.05$), 造模后 7 周, 中药防治组体重接近正常组, 明显高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠体重变化对比($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 大鼠体重均值(g) | |
|-------|---|---------------------------|---------------------------|
| | | 造模后 3 周 | 造模后 7 周 |
| 正常组 | 8 | 398.13±21.33 | 453.00±31.40 ^b |
| 模型组 | 8 | 333.38±39.10 ^a | 405.25±35.51 ^a |
| 阳性药物组 | 8 | 346.63±21.97 ^a | 412.00±61.44 |
| 中药预防组 | 8 | 344.88±34.52 ^a | --- |
| 中药治疗组 | 8 | 338.50±36.57 ^a | 409.00±37.80 ^a |
| 中药防治组 | 8 | 357.88±35.55 | 450.88±37.80 ^b |

注：与正常组比，^a $P<0.05$ ；与模型组比，^b $P<0.05$ 。

2.2 补肾益肺消癥方对大鼠病变肺组织中 α -SMA 表达的影响

α -SMA 免疫组化结果显示：正常组大鼠肺组织中可见少量包浆呈棕黄色染色的 α -SMA 阳性细胞。与正常组相比，模型组病变肺组织中 α -SMA 表达明显增多，染色涂片平均光密度值显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比，治疗各组阳性细胞数量均较模型组明显减少，染色涂片平均光密度值降低 ($P<0.05$)，其中阳性组及中药防治组降低明显。见图 1、表 2。

2.3 补肾益肺消癥方对大鼠病变肺组织中 SP-C 表达的影响

SP-C 免疫荧光结果显示：正常组中可见少量红色 SP-C 蛋白沉积，与正常组相比，模型组中 SP-C 蛋白沉积明显增多，染色涂片平均光密度值显著升高 ($P<0.05$)。与模型组相比，除中药治疗组外，其余各组阳 SP-C 蛋白沉积染色面积均减小，染色涂片平

均光密度值降低 ($P<0.05$)。见图 2、表 3。

表 2 各组大鼠肺组织 α -SMA 染色平均密度值($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | α -SMA |
|-------|---|------------------------|
| 正常组 | 8 | 0.29±0.02 ^b |
| 模型组 | 8 | 0.50±0.09 ^a |
| 阳性对照组 | 8 | 0.31±0.07 ^b |
| 中药预防组 | 8 | 0.35±0.03 ^b |
| 中药治疗组 | 8 | 0.34±0.03 ^b |
| 中药防治组 | 8 | 0.28±0.06 ^b |

注：与正常组比，^a $P<0.05$ ；与模型组比，^b $P<0.05$ 。

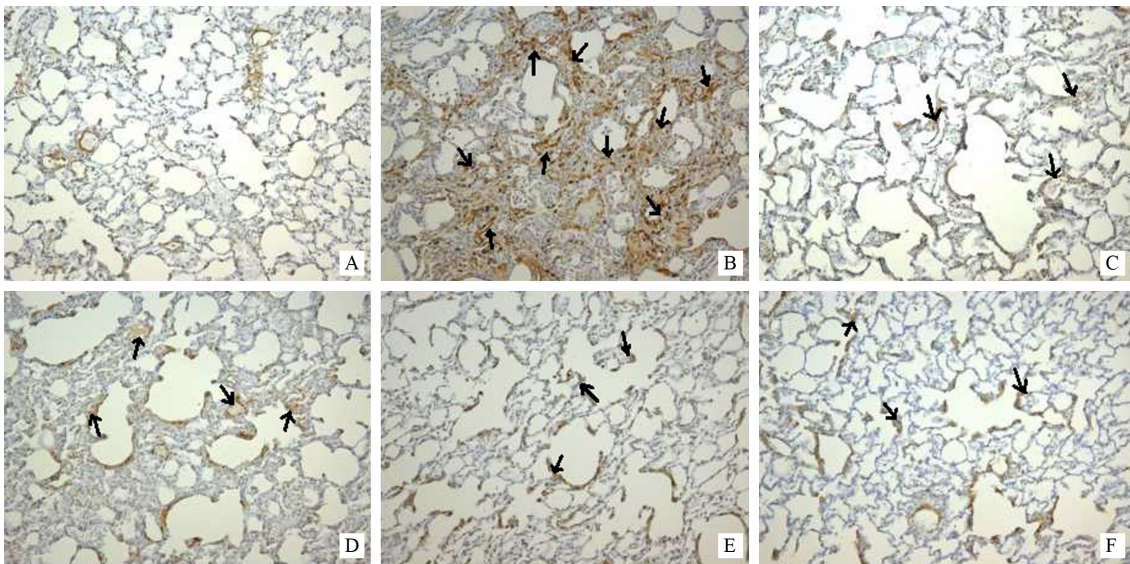
表 3 各组大鼠肺组织 SP-C 染色平均密度值($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | SP-C |
|-------|---|------------------------|
| 正常组 | 8 | 1.23±0.11 ^b |
| 模型组 | 8 | 1.34±0.06 ^a |
| 阳性对照组 | 8 | 1.18±0.08 ^b |
| 中药预防组 | 8 | 1.22±0.07 ^b |
| 中药治疗组 | 8 | 1.31±0.10 |
| 中药防治组 | 8 | 1.15±0.07 ^b |

注：与正常组比，^a $P<0.05$ ；与模型组比，^b $P<0.05$ 。

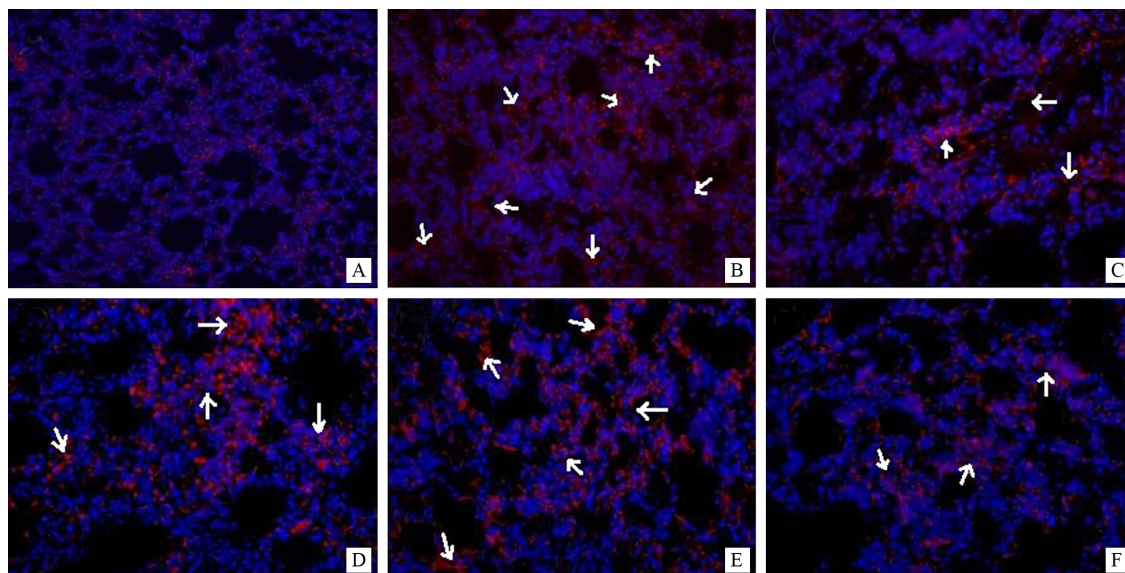
3 讨论

目前西医对 IPF 的治疗多使用糖皮质激素或免疫抑制剂，长期使用依从性差，毒副反应多。笔者根据多年呼吸系统疾病的临床防治经验和科学研究，形成了对本病的系统认识，提出“肺络微型癥瘕”的中医病机理论^[4]，以补肺通络、化痰消癥为治则，方用补肾益肺消癥方，在临床上加减治疗特



注：A：正常组；B：模型组；C：阳性组；D：中药预防组；E：中药治疗组；F：中药防治组 箭头所指处即为 α -SMA 阳性细胞

图 1 大鼠病变肺组织 α -SMA 免疫组化染色结果($\times 100$)



注:A:正常组;B:模型组;C:阳性组;D:中药预防组;E:中药治疗组;F:中药防治组 箭头所指处即为 SP-C 蛋白沉积

图2 大鼠病变肺组织 SP-C 免疫荧光染色结果($\times 100$)

发性肺纤维化。方中熟地黄、当归滋阴养血,补肺肾之不足,陈皮、半夏、浙贝母、水蛭理气祛痰消癥,炙甘草调和诸药,共奏滋阴养血,健脾祛痰之功。

肺纤维化的病理过程通常伴随细胞外基质的沉积和成纤维灶的形成。肌成纤维细胞(Myofibroblast, MF)是细胞外基质的主要来源,它是由成纤维细胞表型转化而来,其超微结构介于成纤维细胞和平滑肌细胞之间^[5]。 α -SMA 是肌成纤维细胞的表型标志^[6],表达阳性的肌成纤维细胞分泌细胞外基质的能力较正常成纤维细胞明显增强。 α -SMA 可以反映平滑肌数量及收缩能力的改变,是平滑肌细胞收缩的结构基础,促进 I 型胶原的沉积,进而形成纤维化^[7]。

肺泡 II 型上皮细胞有合成、分泌和循环利用肺泡表面活性物质的功能,表面活性蛋白 SP-B、SP-C 和磷酸双磷脂是表面活性物质的重要组成部分^[8]。AEC II 中内含丰富的内质网以合成表面活性蛋白。在肺纤维化疾病的进展过程中,肺泡表面活性蛋白 SP-C 的突变与 AEC II 慢性损伤和凋亡相关。成熟的 SP-C 蛋白具有攻击细胞的特点,在 AEC II 中表达后可导致细胞死亡,因此,SP-C 蛋白在 AEC II 内以蛋白前体的形式存在,最后与脂质共同分泌出细胞膜。但是突变的 SP-C 前体在 AEC II 中不能被进一步加工,最终会沉积在细胞内,与正常的 SP-C 聚集形成凝聚体^[9],并引起未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),启动 ERS,引起细胞坏死,最终导致 AEC II 凋亡、肺部慢性间质炎症及肺纤

维化^[10-11]。

实验研究结果显示,补肾益肺消癥方对特发性肺纤维化有较好的治疗效果。大鼠体重变化显示,经过西药及中药干预,大鼠体重均较模型组增加,其中中药防治组体重接近正常组,明显高于模型组($P < 0.05$)。病变肺组织中 α -SMA 免疫组化结果显示,模型组肺组织中 α -SMA 表达明显增多,中西药治疗组均较模型组表达减少,以阳性组和中药防治组最为明显。病变肺组织中 SP-C 蛋白免疫荧光结果显示,模型组中有大量 SP-C 蛋白沉积,阳性组及中药防治组较模型组明显减少。因此笔者认为该方可以通过降低 α -SMA 在肺组织肌成纤维细胞中的表达,抑制成熟 SP-C 蛋白的合成,从而减少细胞外基质的沉积和成纤维灶的形成,减轻细胞内质网应激反应,延缓和抑制特发性肺纤维化的病理改变进程,以达到治疗目的,这可能是该方治疗特发性肺纤维化的作用机制之一。

参 考 文 献

- [1] ZHENG L, ZHOU Z, LIN L. Carbon monoxide modulates alpha-smooth muscle actin and small proline rich-1 a expression in fibrosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(1): 85-92.
- [2] Razzaque MS, Ahsan N, Taguchi T. Role of apoptosis in fibrogenesis[J]. Nephron, 2002, 90: 365-372.
- [3] Zeng M, Liao B, Zhu C, et al. Aerosolized STAT1 antisense Oligodeoxynucleotides decrease the concentrations of inflammatory mediators in bronchoalveolar lavage fluid in bleomycin-induced rat pulmonary fibrosis[J]. Cell Mol Immunol, 2008, 5(3): 219-224.

- [4] 柴立民,刘涓,王珍,等.从“肺络微型症瘕”论治特发性肺纤维化[J].广西中医药,2012,35(2):44-45.
- [5] Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation[J]. Circ Res, 2010, 106(11):1675-1680.
- [6] Luo F, Zhuang Y, Sides MD, 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, 15:51.
- [7] 夏永良,王媛,杨珺超,等.补肺汤对肺纤维化大鼠肺组织成纤维细胞 α -SMA 表达的影响[J].中华中医药学刊,2014,32(8):1916-1918.
- [8] Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited[J]. Respir Res, 2001, 2(1):33-46.
- [9] Nogee LM, Dunbar AE 3rd., Wert SE., et al. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease[J]. N Engl J Med, 2001, 344:573-579.
- [10] Zhong Q, Zhou B, Ann DK, et al. Role of ER stress in EMT of alveolar epithelial cells: effects of misfolded surfactant protein [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(3):498-509.
- [11] Nerelius C, Martin E, Peng S, et al. Mutations linked to interstitial lung disease can abrogate anit-amyloid function of pro-surfactant C[J]. Biochem J, 2008, 416(2):201-209.

(收稿日期: 2016-03-18)

(本文编辑: 禹佳)