

黄芪当归对药对特发性肺纤维化小鼠生存状况及组织修复相关基因表达水平的影响

李丽君 范盎然 葛东宇 吴谦 王淑艳 李根茂 陈萌 李丽娜

【摘要】 目的 观察不同剂量与配伍比例的黄芪、当归对药对特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 小鼠生存率、体质量及组织修复相关基因 c-kit 原癌基因及碱性成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor2, FGF2) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达水平的影响, 并探讨其相互关系及保护机制。**方法** SPF 级 ICR 雄性小鼠 80 只, 随机分为正常对照组、模型组, 以及 6 个中药治疗组 (大剂量黄芪 50 g 当归 10 g 组、大剂量黄芪 30 g 当归 30 g 组、大剂量黄芪 10 g 当归 50 g 组、小剂量黄芪 25 g 当归 5 g 组、小剂量黄芪 15 g 当归 15 g 组、小剂量黄芪 5 g 当归 25 g 组), 除正常对照组外, 其余各组采用气管内注射博来霉素 (5 mg/kg) 复制小鼠肺纤维化模型, 于 28 天处死小鼠, 采用 real time-PCR 法检测组织修复相关基因 c-kit、FGF2 及 VEGF 表达水平, HE 染色及武兆发简化 Mallory 氏染色, 观察肺组织形态变化。**结果** HE 染色及武兆发简化 Mallory 氏染色显示, 6 个中药治疗组较模型组均有所改善, 其中中药治疗第 1、6 组改善明显, 肺泡结构已基本恢复。第 28 天时, 与模型组比较, 各组小鼠体质量均呈上升的趋势, 中药第 1 组小鼠体质量上升趋势较大 ($P < 0.05$)。28 天死亡率, 中药治疗组小鼠的死亡率较模型组降低, 其中第 1 组死亡率与模型组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组 c-kit、FGF2、VEGF mRNA 表达水平均高于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 从小鼠的生存率与体质量变化及病理形态观察, 大剂量黄芪当归 5 : 1 组能明显改善小鼠的生存质量, 其作用机制可能与抑制 VEGF mRNA 的表达水平, 促进 c-kit 及 FGF2 mRNA 的表达水平有关。

【关键词】 肺纤维化; 黄芪; 当归; 碱性成纤维细胞生长因子; 血管内皮生长因子

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.12.005

Influence of the pair drugs of astragalus and angelica on the IPF living conditions and tissue repair related gene expression level in mice LI Li-jun, FAN Ang-ran, GE Dong-yu, et al. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LI Wei-hua, E-mail: liweihua@medmail.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of different doses and compatibility proportion of the pair drugs of astragalus and angelica on the survival rate, weight and tissue repair kit and FGF2 c-related genes, level of VEGF expression of IPF mice and discuss the relationship between the pair drugs and the protection mechanism. **Methods** 80 SPF ICR male mice were randomly divided into the normal control group, the model group, the traditional Chinese medicine treatment group and 6 (Three groups of large dose of astragalus membranaceus and angelica: 1. 50 g and 10 g; 2. 30 g and 30 g; 3. 10 g and 50 g. Three groups of small doses of Astragalus and Angelica: 4. 25 g and 5 g; 5. 15 g and 15 g; 6. 5 g and 25 g). Except the normal control group, other groups by intratracheal injection of bleomycin (5mg/kg) to replicate the model of pulmonary fibrosis in mice, the mice were sacrificed after 28 days. The expression levels of the repair of FGF2 and VEGF related gene c-kit were tested by RT-PCR; the morphological

基金项目: 北京中医药大学自主选题 (2013-SYJS-113)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院 [李丽君 (硕士研究生)、范盎然、葛东宇、吴谦 (硕士研究生)、王淑艳、李根茂、陈萌、李丽娜]

作者简介: 李丽君 (1987-), 女, 2012 级在读硕士研究生。研究方向: 经方治疗疑难病的分子机制。E-mail: 798985179@qq.com

通讯作者: 李丽娜 (1973-), 女, 博士, 副教授, 副主任医师。研究方向: 经方治疗疑难病的分子机制。E-mail: lilina1024@126.com

changes of lung tissue were observed by HE staining and Wu Zhaofa simplified Mallory's staining. **Results**

The result of HE dyeing and reduction Wu Zhaofa Mallory showed that six Chinese medicine treatment groups were improved compared to the model group and the Chinese medicine group of 1 and 6 showed significant improvement, and the alveolar structure have been restored. Compared to the model group, mice weight of each group showed ascendant trend, and Chinese medicine group of 1 showed significantly larger trend of weight gain in mice ($P < 0.05$). Mice mortality was reduced in the Chinese medicine treatment groups compared to the model group, and the group 1 showed significant difference ($P < 0.05$). Expression levels of c-kit, FGF2, VEGF mRNA in the model group were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The results showed that the large dose of astragalus and angelica group of 5 : 1 can obviously improve the quality of the survival of mice and its mechanism may be related to inhibit the expression of VEGF mRNA level, and promote the c-kit and FGF2 mRNA expression level.

【Key Words】 Pulmonary fibrosis; Astragalus membranaceus; Angelica; Fibroblast growth factor 2; Vascular endothelial growth factor

肺纤维化是多种急慢性肺病发展到一定阶段的共同结果,特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)属于肺间质性疾病的一种,主要表现为肺组织的损伤与异常修复,对于 IPF 的发病机制和原因目前尚未完全阐明。支气管肺泡干细胞(bronchioalveolar stem cells, BASCs)由 Kim 于 2005 年首次报道^[1]。BASCs 具有分化成肺泡 II 型上皮细胞和肺泡 I 型上皮细胞的能力^[2],参与肺组织的稳态维持和损伤修复。本实验从肺纤维化小鼠生存率 BASCs 存活关键基因 c-kit 原癌基因及碱性成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor2, FGF2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达水平的变化,探讨不同配比与剂量的黄芪当归对 IPF 小鼠的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 SPF 级 ICR 雄性小鼠 80 只,体质量 18 ~ 22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。小鼠随机分为正常对照组、模型组、以及 6 个中药治疗组 C 组:大剂量黄芪 50 g、当归 10 g;D 组:大剂量黄芪 30 g、当归 30 g;E 组:大剂量黄芪 10 g、当归 50 g;F 组:小剂量黄芪 25 g、当归 5 g;G 组:小剂量黄芪 15 g、当归 15 g;H 组:小剂量黄芪 5 g、当归 25 g。

1.1.2 实验药物 实验用中药配方颗粒(北京康仁堂药业有限公司),盐酸博莱霉素(日本化药株式会社),将博莱霉素用生理盐水配制成 5 mg/mL 的溶液。

1.1.3 主要实验仪器及试剂 GIO-3A 型高速冷冻离心机(北京医用离心机厂),PCR 仪(PE 公司),紫外分光光度计(Beck men 公司),M-MLV 逆转录酶

和 DNA 聚合酶(Promega 公司),SYBR Green Supermix(BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 参考文献方法^[3]制备小鼠肺纤维化模型:将各组小鼠用 10% 水合氯醛按小鼠体质量 0.004 mL/g 进行腹腔注射麻醉。纵向剪开颈部皮肤,暴露气管,在第一、二气管环之间缓缓注入博莱霉素(5 mg/kg),立即将动物直立旋转,使药液在肺部均匀分布,手术缝合。

1.2.2 给药方法 造模第二天起,6 个中药治疗组给予中药水煎液灌胃治疗,灌胃剂量为 0.1 mL/10 g。模型组和正常对照组给予等体积生理盐水灌胃。每周称重后调整给药剂量,各组连续灌胃 28 天。

1.2.3 标本收集与处理 小鼠于给药后第 28 天腹主动脉放血处死,迅速开胸,切下右肺中叶,Trizol 法提取肺组织总 RNA,real time-PCR 法检测 c-kit 原癌基因及 FGF2 和 VEGF 表达水平。右下肺叶用 4% 的多聚甲醛溶液固定 72 小时,经脱水、浸蜡、包埋后制成石蜡切片,用于 HE 染色及武兆发简化 Mallory 氏胶原染色,观察肺组织形态变化与胶原含量变化。

1.3 实验数据统计分析

所有实验数据均采用统计软件 SPSS 20.0 进行正态性检验,若各组均呈正态性分布,则用 one-way ANOVA 进行单因素方差分析比较组间差异,用 LSD 法比较两组间差异,各组实验结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若不符合正态分布,则用非参数检验,若 $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般形态

对照组小鼠造模后皮毛光亮如初,活泼好动,

肌肉丰满,食欲旺盛,呼吸平稳,体质量逐渐增加,该状态一直持续;模型组小鼠造模后,绝大部分出现精神萎靡,行动缓慢,身体逐渐佝偻消瘦,食欲不振,皮毛逐渐暗淡枯槁,体温降低,呼吸急促;中药治疗组中,C、E、H 组小鼠较其他组精神状态良好,活动基本正常,皮毛光亮,食欲旺盛,呼吸平稳,接近对照组;D、F、G 组造模后小鼠精神、食欲尚可,部分小鼠出现皮毛稀疏枯槁,活动量减少及消瘦,状态不及成模前期,但较模型组稍好。

2.2 小鼠体质量变化情况

称量各组小鼠第 0 天、7 天、14 天、21 天、28 天体质量,结果见表 1。第 7 天时,除中药治疗 E、F 组外,其他各组小鼠体质量均呈下降的趋势。中药第 C、E 组体质量高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);第 14 天时,各组小鼠体质量均呈上升的趋势,但均低于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。第 21 天时,除模型组和中药治疗 H 组外,其余各组小鼠体质量均呈上升趋势,但仍低于对照组,其中中药治疗 C 组小鼠体质量上升趋势较大;第 28 天时,与模型组比较,

各组小鼠体质量均呈上升的趋势,中药治疗 C、E 组小鼠体质量上升趋势较大($P<0.05$)。

2.3 小鼠生存率情况

模型组 7 天死亡率为 40%,各中药治疗组小鼠的 7 天死亡率较模型组均降低,其中 H 组死亡率与模型组的差异有统计学意义($P<0.05$);模型组 28 天死亡率为 70%,各中药治疗组小鼠的 28 天死亡率较模型组均降低,其中 C 组死亡率与模型组的差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 1 及图 2。

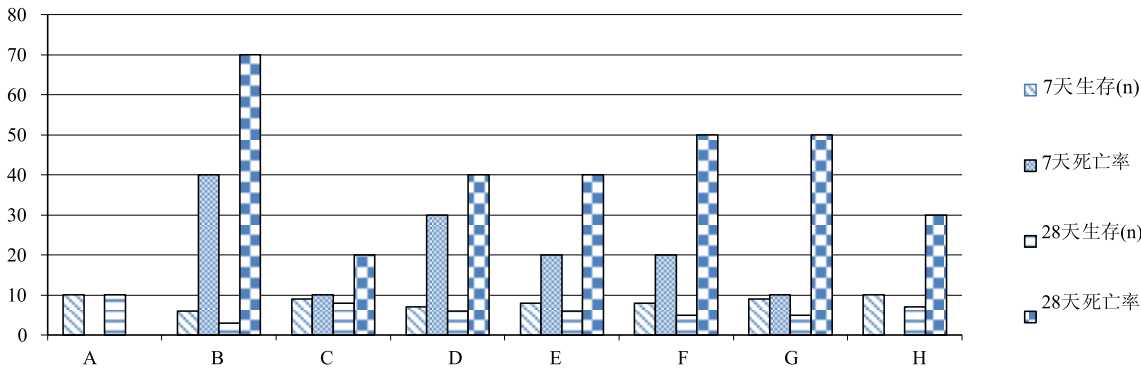
2.4 HE 染色观察

光镜下观察,与对照组比较,模型组小鼠可见支气管周围及肺泡间隔有大量炎症细胞浸润,纤维化程度明显。中药 C、H 组肺炎明显好转,肺泡内未见明显的炎性细胞,肺泡隔、细支气管周围的纤维化病灶较模型组有明显改善,肺泡结构已基本恢复。中药 D、E、F、G 组肺炎较对照组重,但与模型组比较有不同程度地减轻,肺泡隔纤维增生灶较模型组有所改善,但不如 C、H 组明显。光镜观察 HE 染色各组炎症和纤维化程度的结果见图 3。

表 1 各组小鼠不同时期体质量($\bar{x}\pm s, g$)

组别	0 天(n)	7 天(n)	14 天(n)	21 天(n)	28 天(n)
对照组	22.59±1.75(10)	22.22±1.75(10)	31.56±1.81(10)	34.05±2.50(10)	35.47±2.75(10)
模型组	22.47±1.41(10)	21.05±3.94 ^b (6)	23.68±6.80 ^b (5)	22.57±5.70 ^b (3)	23.23±6.90 ^b (3)
C 组(大剂量黄芪当归 5:1)	22.89±1.30(10)	22.52±3.22 ^b (9)	25.08±2.70 ^a (8)	29.11±2.88 ^{ac} (8)	30.29±3.09 ^{bc} (8)
D 组(大剂量黄芪当归 1:1)	22.57±0.69(10)	19.99±3.02 ^b (7)	23.12±3.66 ^b (6)	26.23±4.00 ^b (6)	27.80±5.00 ^b (6)
E 组(大剂量黄芪当归 1:5)	22.40±0.62(10)	23.07±4.47 ^a (8)	23.71±7.05 ^b (8)	27.30±7.86 ^a (7)	30.30±5.56 ^{ac} (6)
F 组(小剂量黄芪当归 5:1)	21.54±0.83(10)	21.81±4.26 ^b (8)	24.87±5.24 ^a (6)	27.68±4.34 ^a (5)	28.70±3.86 ^b (5)
G 组(小剂量黄芪当归 1:1)	22.25±0.79(10)	20.34±4.30 ^b (9)	22.65±7.70 ^b (6)	26.14±8.39 ^b (5)	27.36±9.64 ^a (5)
H 组(小剂量黄芪当归 1:5)	22.28±1.30(10)	21.69±3.80 ^b (10)	25.26±3.36 ^a (7)	23.83±5.30 ^b (7)	24.47±6.20 ^b (7)

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$;n 代表小鼠存活只数。



A 对照组 B 模型组 C 组(大剂量黄芪当归 5:1) D 组(大剂量黄芪当归 1:1) E 组(大剂量黄芪当归 1:5)
F 组(小剂量黄芪当归 5:1) G 组(小剂量黄芪当归 1:1) H 组(小剂量黄芪当归 1:5)

图 1 各组小鼠 7 天、28 天死亡率(%)

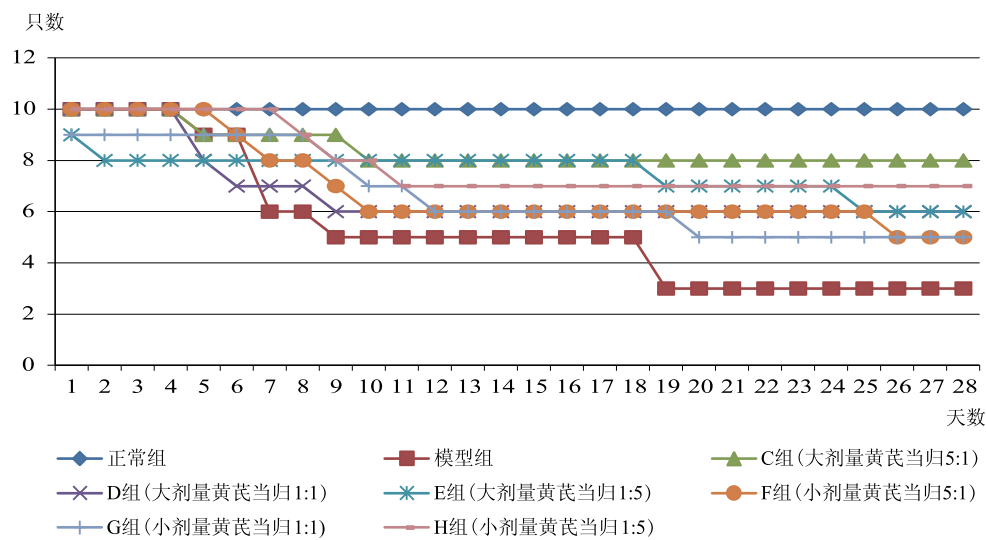
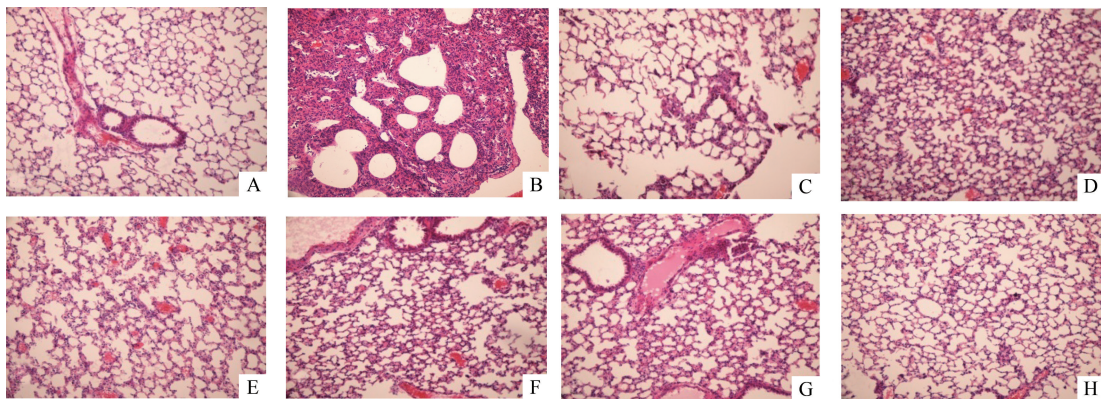
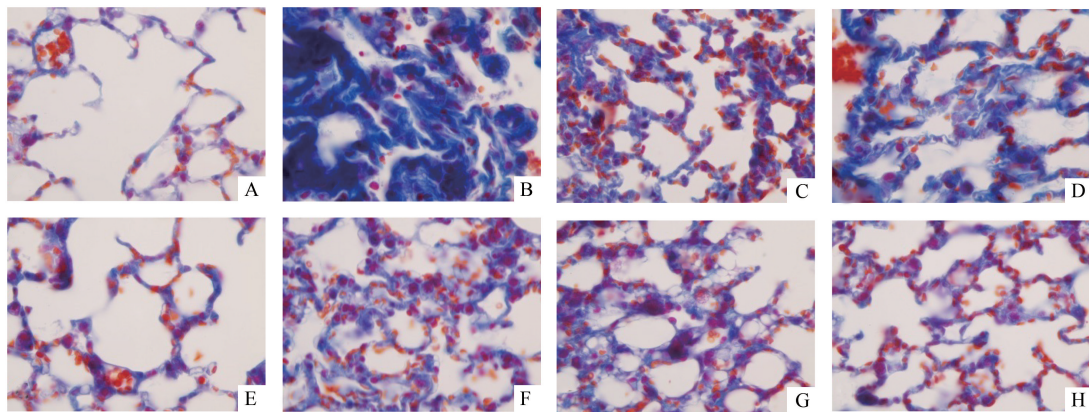


图2 各组小鼠生存曲线



A 对照组 B 模型组 C 组(大剂量黄芪当归 5:1) D 组(大剂量黄芪当归 1:1) E 组(大剂量黄芪当归 1:5)
F 组(小剂量黄芪当归 5:1) G 组(小剂量黄芪当归 1:1); H 组(小剂量黄芪当归 1:5)

图3 各组小鼠肺组织的病理变化(HE 染色,×200)



A 对照组 B 模型组 C 组(大剂量黄芪当归 5:1) D 组(大剂量黄芪当归 1:1) E 组(大剂量黄芪当归 1:5)
F 组(小剂量黄芪当归 5:1) G 组(小剂量黄芪当归 1:1) H 组(小剂量黄芪当归 1:5)

图4 各组小鼠肺组织的胶原含量变化(武兆发简化 Mallory 氏染色,×1000)

表 2 各组 c-kit、FGF2、VEGF mRNA 含量($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	c-kit	FGF2	VEGF
对照组	10	31.49±1.44	31.76±0.99	27.12±1.82
模型组	3	31.62±1.49 ^a	32.36±0.92 ^a	27.55±1.40 ^a
C 组(大剂量黄芪当归 5:1)	8	31.98±1.18 ^{ac}	33.24±2.46 ^{bc}	27.34±1.32
D 组(大剂量黄芪当归 1:1)	6	31.66±0.84 ^{ac}	30.80±0.86 ^{ad}	27.35±0.82
E 组(大剂量黄芪当归 1:5)	6	31.05±0.25 ^{bc}	30.98±0.50 ^{ad}	26.27±1.65 ^{bc}
F 组(小剂量黄芪当归 5:1)	5	32.02±1.18 ^{ac}	32.13±1.00 ^a	28.06±1.51 ^{bc}
G 组(小剂量黄芪当归 1:1)	5	31.32±1.14 ^c	31.70±1.47 ^c	28.14±1.90 ^{bc}
H 组(小剂量黄芪当归 1:5)	7	31.41±1.16 ^c	31.45±1.13 ^c	27.11±1.12 ^c

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;n 代表小鼠存活只数。

2.5 胶原染色观察

油镜下可见对照组肺泡结构正常,只有肺间质及部分支气管周围有少量胶原存在。模型组小鼠肺泡壁及肺泡间隔明显增厚,肺泡结构被破坏,肺泡腔基本消失,小支气管壁可见大量蓝色胶原纤维沉积。各中药组胶原含量较模型组均减少,表明这几组中药在减轻胶原纤维沉积和抗纤维化方面的都有一定的作用。其中中药 C、H 组与模型组比较差异明显,在减轻胶原纤维沉积和抗纤维化方面效果显著。光镜观察武兆发简化 Mallory 氏胶原染色纤维化程度的结果见图 4。

2.6 肺组织中 c-kit 及 FGF2、VEGF mRNA 的表达

与对照组比较,模型组肺组织 c-kit、FGF2 和 VEGF 的 mRNA 转录水平均升高($P<0.05$)。中药 E、G、H 组 c-kit mRNA 的表达低于模型组($P<0.05$),C、D、F 组高于模型组($P<0.05$)。FGF2 mRNA 的表达,中药 D、E、G、H 组明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),C 组高于模型组($P<0.05$)。中药 E、H 组 VEGF mRNA 表达水平较模型组降低($P<0.05$),F、G 组高于模型组($P<0.05$),差异有统计学意义。结果见表 2。

3 讨论

许多研究结果显示,急性肺损伤后,异常激活的肺泡上皮细胞产生的介质刺激上皮间质转化诱导成纤维细胞灶的形成,造成疤痕和肺结构的破坏。损伤肺的修复引起弥漫性肺纤维化。干细胞作为体内未分化细胞具有很强地自我更新和向其他细胞分化的能力,在组织的自我修复中起到非常关键的作用。小鼠模型试验显示,间质干细胞迁移到肺组织内,发生类上皮样分化,可减少博来霉素诱导的肺纤维化^[10]。Wang 等^[11]研究人胚胎干细胞分化来源的肺泡 II 型上皮细胞在博来霉素诱导的小鼠模型中的作用,结果发现这些肺泡 II 型上皮

细胞可以分化成为肺泡 I 型上皮细胞,并阻止炎症反应及纤维化反应的发生。

本课题组前期研究发现:BASCs 在博来霉素导致的小鼠肺纤维化模型中数量显著下降,提示 BASCs 的数量和功能可能与肺纤维化的发生与进展相关。实验研究显示:黄芪、当归生药和其提取物均有一定的抗肺纤维化作用,但黄芪当归对药及其提取物对 IPF 肺组织干细胞的干预作用及对 IPF 肺组织局部免疫微环境影响研究较少。有研究显示,黄芪及含有黄芪当归的药物对 c-kit 阳性细胞具有促进增殖的作用,且对 c-kit 和干细胞因子(stem cell factor, SCF)蛋白表达具有一定的促进作用^[4-6],而 SCF/c-kit 信号恰恰是 BASCs 存活必要条件。本实验发现中药 C、D、F 组能促进 c-kit 的表达,提示黄芪当归可能通过 c-kit 通路调节 BASCs 的功能,抑制肺纤维化的进展。

FGF2 能促进新生血管形成,启动创伤愈合过程^[7]。有研究发现,小鼠肺组织中 FGFR 各亚型的表达随年龄增长而下降,其中 FGF2 表达量最高,也成下降趋势,鼠龄较大的小鼠其肺组织更多的表现出纤维化改变,这可能与衰老过程中 FGFR 的表达水平下调有关^[8]。推测大剂量黄芪当归 5:1 组的治疗作用与上调 FGF2 基因、促进组织修复有关。

VEGF 是近年来发现的一种特异的作用于血管内皮细胞的生长因子,具有促进血管内皮细胞分裂、增殖、促进血管形成,并具有促进血管通透性增加和维持血管正常状态和完整性的作用^[9]。血管生成是组织损伤后进行修复的必要条件之一,也是肺部纤维化的重要病理改变。研究显示,在 BLM 导致的大鼠肺损伤区域,VEGF 免疫反应细胞明显增加,并随着肺纤维化发展过程中各类细胞数量的增加,VEGF 表达量亦增加^[14]。本实验中药治疗 C、D、E、H 组均降低了 VEGF 基因的表达水平,其中 E 组

(下转本期 1451 页)