

# 补肺一号方通过TGF- $\beta$ 1/Smad 通路抑制慢阻肺大鼠肺纤维化

魏萍, 兰岚, 王斌灿

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州

收稿日期: 2022年5月19日; 录用日期: 2022年6月23日; 发布日期: 2022年6月30日

## 摘要

目的: 熏香烟联合气道内滴注脂多糖(LPS)法制造慢阻肺(COPD)大鼠模型, 研究我省名老中医陈志斌教授经验方补肺一号方对COPD大鼠肺纤维化的抑制作用。方法: 选择30只3周龄SPF级别SD大鼠随机分为空白组、模型组、补肺一号方低剂量组、补肺一号方中剂量组、补肺一号方高剂量组, 其中模型组、中药组给予香烟联合气道内滴注LPS (1 mg/kg)建立COPD模型, 低、中、高剂量组分别采用每天灌胃1.5 g/(kg·d)、3.0 g/(kg·d)、6.0 g/(kg·d)干预, 空白组、模型组灌胃生理盐水。8周后, HE染色观察大鼠肺组织, Western blot检测肺组织TGF- $\beta$ 1、Smad蛋白表达量。结果: 与空白组比较, 模型组气道及肺泡破坏严重, 肺组织TGF- $\beta$ 1、Smad蛋白显著升高( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 低、中剂量组气道及肺泡结构恢复正常, TGF- $\beta$ 1、Smad蛋白显著降低( $P < 0.05$ )。结论: 补肺一号方能改善COPD大鼠肺组织炎症, 这可能与其能抑制TGF- $\beta$ 1/Smad通路, 减轻氧化应激及炎症损伤有关。

## 关键词

补肺一号方, 慢性阻塞性肺疾病, 肺纤维化, Smad蛋白

# Tonic Lung of NO.1 Inhibite Pulmonary Fibrosis in COPD Rats through TGF- $\beta$ 1/Smad Pathway

Ping Wei, Lan Lan, Bincan Wang

The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: May 19<sup>th</sup>, 2022; accepted: Jun. 23<sup>rd</sup>, 2022; published: Jun. 30<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

**Objective:** The rat model of COPD was made by smoking cigarettes combined with airway dripping of lipopolysaccharide (LPS), to investigate the mechanism of inhibition of pulmonary fibrosis in COPD rats of tonic lung of NO.1 by professor Chen Zhibin, a famous old traditional Chinese medicine doctor in our province. **Methods:** Thirty 3-week-old SPF SD rats were randomly divided into blank group, model group, low/medium/high-dose groups. Model group and medicine groups were given cigarette combined with LPS (1 mg/kg) to establish COPD model. Medicine groups were given 1.5 g/(kg·d), 3.0 g/(kg·d) and 6.0 g/(kg·d). Blank group and model group were given physiological saline. After 8 weeks, lung tissues of rats were observed by HE, and the expression levels of TGF- $\beta$ 1 and Smad proteins in lung tissues were detected by Western blot. **Results:** Contrast to the blank group, the airway and alveolar in model group were notably broken, and TGF- $\beta$ 1 and Smad proteins in lung tissues were remarkably enhanced ( $P < 0.05$ ). Contrast to model group, the airway and alveolar in low and medium dose groups were back to regular, while TGF- $\beta$ 1 and Smad proteins were remarkably reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tonic lung of NO.1 can improve lung inflammation in COPD rats, associated with the restrain of TGF- $\beta$ 1/Smad pathway and the reduction of oxidative stress and lesions.

## Keywords

Tonic Lung of NO.1, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Pulmonary Fibrosis, Smad Protein

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

慢性阻塞性肺疾病(COPD)最主要的病理生理改变是气流受限[1], 最主要的病理基础是炎症, 大量的炎症因子风暴如 IL-6、TNF- $\alpha$  在促进 COPD 早期炎症, TGF- $\beta$ 1 则可促进成纤维细胞迁移、转换成肌纤维细胞, 产生大量细胞外基质, 最终形成纤维细胞灶[2] [3]。从中医角度, COPD 和肺纤维化病机都是气阴两虚、痰瘀阻肺。笔者所在团队便是从益气养阴祛瘀角度运用补肺一号方治疗慢性阻塞性肺疾病患者获得很好的临床疗效, 大大提高了患者 FEV1 和 6 分钟步行距离。本次研究通过建立 COPD 模型大鼠, 探讨补肺一号方对 COPD 大鼠肺纤维化的影响及可能机制。

## 2. 材料与方方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 试剂

水合氯醛(Aladdin, K913111)、香烟(安徽中烟工业有限公司, 1042930159292532)、LPS (sigma, MB5198)、Smad3 (Proteintech, 66516-1-Ig)、Smad7 (Proteintech, 25840-1-ap)。补肺一号方(黄芪 18 g, 刺五加 9 g, 黄精 15 g, 仙鹤草 18 g), 由我院中药房一次性购齐、鉴定、称取, 浸泡 30 min, 煎煮 20 min 两次, 煎煮液浓缩至 1 kg/L, 分装后 4℃冰箱备用, 使用前超纯水稀释后 37℃水浴预温。

### 2.1.2. 仪器

自制吸烟箱、移液器(德国 eppendorf)、酶标仪(美国伯乐公司)、DHG-9091A 干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)、自动组织脱水机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司, KH-TS)、包埋机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司, KH-BL)、超纯水机(法国 Millipore MILLI-Q)、电泳仪及半干转膜仪(美国伯乐公司)、Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统(广州云星仪器有限公司)。

## 2.2. 方法

### 2.2.1. 应用熏香烟联合气道内滴注脂多糖(LPS)的方法造成大鼠 COPD 模型[4]

经动物伦理委员会审查同意后,选择 30 只 3 周龄,体质量( $200 \pm 20$ ) g, SPF 级别 SD 大鼠。适应环境 3 天后,随机分空白组、模型组、补肺一号方低/中/高剂量组。① 模型组、中药组:于实验的第 1 和第 14 天将 LPS (1 g/L)经大鼠气道内缓慢注入,200  $\mu$ g/次。每天将大鼠暴露于点燃 10 支香烟的吸烟舱内 2 小时,共持续 8 周。② 空白组:大鼠于实验的第 1 和第 14 天经气道内注入等量的 0.9%氯化钠,与模型组在同等的条件下(室温、安静、避强光)正常饲养。建模 28 d 后开始药物干预,每天一次,方法如下:1) 空白组、模型组灌胃 0.9%氯化钠 10.0 ml/(kg·d)。2) 中药组分别灌胃补肺一号方 1.5 g/(kg·d)、3.0 g/(kg·d)、6.0 g/(kg·d)。持续给药 28 d,给药过程中继续进行吸烟造模。

### 2.2.2. HE 染色

取左肺用 0.9% NaCl 冲洗,福尔马林浸泡固定后切片,分别行 15 min、15 min、10 min 脱蜡三次;分别用 100%、90%、80%、70%的酒精脱苯 10 min;蒸馏水冲洗,苏木素染核,0.5%的盐酸酒精分色;再冲洗,酒精浸泡,复染伊红,酒精分化脱水,二甲苯透明 3 次,最后用中性树脂封片观察。

### 2.2.3. Western Blot 检测肺组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad 蛋白

取右中叶肺组织,PBS 清洗 3 次,裂解提取总蛋白并检测总蛋白浓度,转移蛋白质至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h,加入一抗于 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,次日加入二抗室温封闭 1 h,显色并统计灰度值计算相对表达量。

## 2.3. 统计学分析

所有数据均用 SPSS23.0 进行分析,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。方差齐且服从正态分布则组间比较用 One-Way ANOVA,反之则用秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

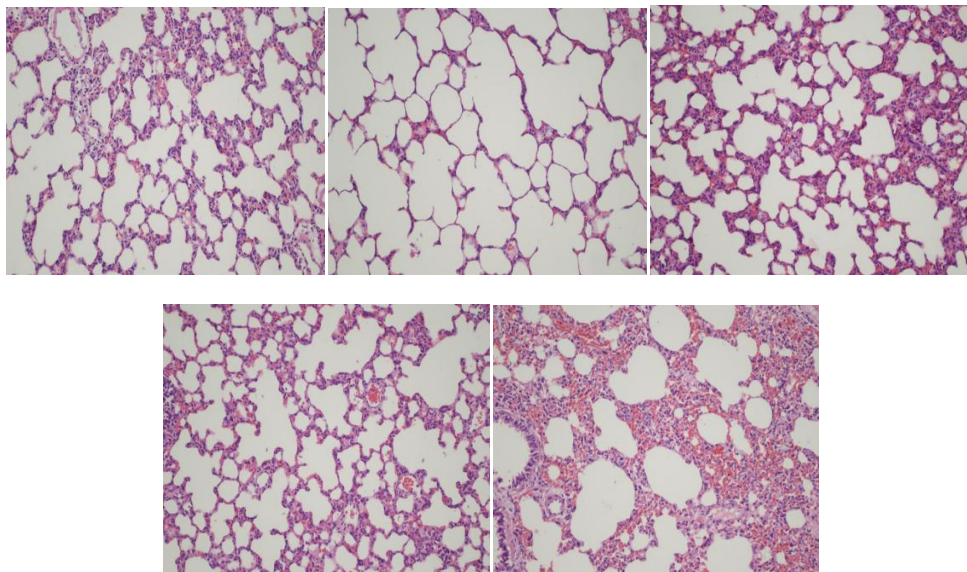
## 3. 结果

### 3.1. 各组大鼠 HE 染色观察肺组织结构变化

HE 染色实验显示,与空白组相比,模型组大鼠气道严重变形,肺泡融合,炎性细胞浸润;与模型组相比,低、中剂量组大鼠气道、肺泡结构相对完整,少见肺大泡,炎性细胞浸润现象明显减轻,中剂量组改善尤其显著,提示补肺一号方对 COPD 大鼠肺组织有显著的保护作用。高剂量组气道及肺泡结构紊乱,大量炎性细胞浸润,提示可能存在毒性作用。(图 1)。

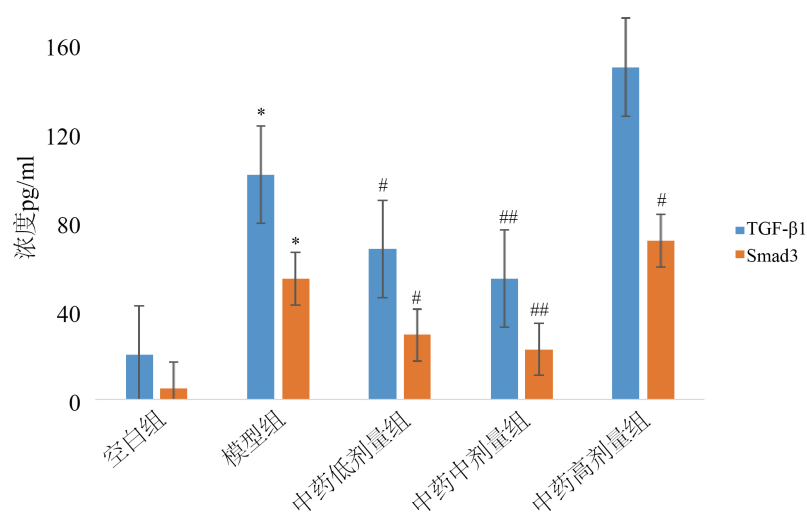
### 3.2. Western Blot 检测

结果显示:与空白组比较,模型组肺组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad3 蛋白水平显著升高;与模型组比较,低、中剂量组肺组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad3 蛋白显著下降,中剂量组最为显著(图 2),而高剂量组则显著升高。



**Figure 1.** The evaluation of lung tissue cells morpholog though HE ( $\times 200$ )

**图 1.** HE 肺组织细胞形态( $\times 200$ )



注: \*与空白组对比  $P < 0.05$ , #与模型组对比  $P < 0.05$ , ##与模型组对比  $P < 0.01$

**Figure 2.** The expression level of factors in lung tissue by western blot

**图 2.** 免疫印迹实验检测肺组织中 TGF-β1、Smad3 蛋白( $\bar{x} \pm s$ )

#### 4. 讨论

大量炎症细胞聚集的炎症反应是 COPD 病理的基础和核心, 病变由上及下, 直至侵犯细支气管和肺泡, 损伤-修复过程持续存在, 最终导致肺纤维化[5]。本研究显示, 相比空白组, 模型组气道及肺泡结构严重破坏, 炎性细胞、成纤维细胞聚集; 补肺一号方低、中剂量干预后气道及肺泡结构恢复完整性, 炎性细胞、成纤维细胞聚集现象明显减轻; 而补肺一号方高剂量导致气道及肺泡结构紊乱, 加重炎症反应, 提示高剂量可能存在毒性作用。

TGF-β1 是纤维化发生发展的“开关”, Smad 蛋白是 TGF-β 信号通路传导过程中关键的受体后信使蛋白, 通过调控靶基因的转录来建立细胞质与细胞核之间的通路, 促进纤维化的形成[6]。本研究显示,

补肺一号方低、中剂量组可显著下调肺组织中 TGF- $\beta$ 1、Smad3 蛋白的表达, 而高剂量组截然相反。

“补肺一号方”乃福建省名老中医陈志斌教授的经验方, 由黄芪、刺五加、黄精、仙鹤草四味药组成, 方中黄芪补气固表为君; 刺五加益气健脾为臣药, 配合黄芪补肺气; 黄精益气养阴、健脾润肺, 仙鹤草补虚益气, 佐以黄芪补益之功。本方精简至极, 兼具补肺健脾、益气养阴之效, 长期应用于 COPD 患者可改善机体自身免疫调节[7][8][9]。

综上所述, 本研究显示补肺一号方可能通过 TGF- $\beta$ /Smad 通路抑制慢阻肺大鼠气道及肺泡的炎症反应, 抑制肺纤维化进展。但高剂量服用可能造成毒性反应, 加重肺组织损伤, 应严格掌握安全剂量。

## 基金项目

本文为福建省卫生健康中青年骨干人才培养项目(2020GGA066); 福建中医药大学校管临床专项课题(XB2020020)。

## 参考文献

- [1] GOLD 委员会. 慢性阻塞性肺疾病全球倡议(2022 年版) [R]. 2022: 1-123.
- [2] 张琼. 生脉饮加味对 COPD 合并肺间质纤维化患者肺功能、血气分析及血清 TGF- $\beta$ 1、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(5): 534-537.
- [3] 美国胸科学会, 欧洲呼吸学会, 日本呼吸学会, 拉丁美洲胸科协会, 黄慧, 孙雪峰, 徐作军. 特发性肺纤维化诊治循证指南(摘译本) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(7): 486-494.
- [4] 魏萍, 陈志斌, 王春娥, 李大治, 陈可强. 槲皮素对慢性阻塞性肺疾病大鼠的保护作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(21): 2570-2575.
- [5] 陈蓉. 慢性阻塞性肺疾病合并肺间质纤维化的临床及病理变化特点分析[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(21): 167-168.
- [6] Wollin, L., Wex, E., Pautsch, A., *et al.* (2015) Mode of Action of Nintedanib in the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *European Respiratory Journal*, **45**, 1434-1445. <https://doi.org/10.1183/09031936.00174914>
- [7] 兰岚, 陈阿贞, 陈志斌, 陈志斌. 补肺一号方配合呼吸康复训练对慢性阻塞性肺疾病稳定期免疫调节的临床研究[J]. 按摩与康复医学, 2018, 9(24): 4-6.
- [8] 陈志斌, 刘中友, 连林辉, 陈比特, 陈国通. 补肺一号方治疗 COPD 肺气虚证的临床研究[J]. 中医临床研究, 2011, 3(19): 14-16.
- [9] 王斌灿, 陈志斌, 王春娥, 刘萍. 补肺一号方治疗慢性阻塞性肺疾病稳定期肺气虚证的临床研究[J]. 广西中医药, 2016, 39(4): 7-10.