

Effects of Qi Invigorating Herbs on the Airway Remodeling of Bleomycin Induced Pulmonary Fibrosis in Rats Model

Jian Zheng^{1*}, Wei Zhang^{2#}, Xue Zhu², Liqin Wang¹, Jingqing Yang¹, Yingying Li¹, Junmei Guo¹

¹Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan

²Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan

Email: 459967264@qq.com, huxizhijia@126.com

Received: Nov. 11th, 2013; revised: Dec. 9th, 2013; accepted: Dec. 13th, 2013

Copyright © 2014 Jian Zheng et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. In accordance of the Creative Commons Attribution License all Copyrights © 2014 are reserved for Hans and the owner of the intellectual property Jian Zheng et al. All Copyright © 2014 are guarded by law and by Hans as a guardian.

Abstract: Objective: To observe the tissue pathology and expression level of transforming growth factor (TGF- β 1) of the bleomycin (BLM) induced pulmonary fibrosis rats model lung, to explore the effect of Qi invigorating herb on pulmonary fibrosis and its mechanism. **Methods:** 32 healthy male SD rats were randomly divided into blank group, model group, Yiqi group and prednisone group, making the pulmonary fibrosis model by intratracheal bleomycin plus, and applying the corresponding drug stomach intervention, the rats were sacrificed at 28 d, observing the lung tissue slice pathological morphology after HE staining, and determining the expression level of TGF- β 1 in lung tissue of rats with ELISA method. **Results:** Compared with the blank group, other groups in the lung tissue of rats with TGF- β 1 expression were obviously increased ($P < 0.01$); in the two treatment groups, pulmonary fibrosis was significantly reduced compared with model group ($P < 0.01$), the expression level of TGF- β 1 was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$); Compared with prednisone group, the degree of pulmonary fibrosis rats was lighter ($P < 0.05$) in Yiqi group, the expression level of TGF- β 1 was significantly lower than the prednisone group ($P < 0.01$) too. **Conclusion:** Qi invigorating herbs can inhibit the expression of TGF- β 1, intervene the airway remodeling in rats with pulmonary fibrosis, inhibit or delay the occurrence and development of pulmonary fibrosis, and have a better effect than prednisone.

Keywords: Pulmonary Fibrosis; Qi Invigorating Herbs; TGF- β 1; Transforming Growth Factor; Airway Remodeling

益气类中药对博来霉素致肺纤维化大鼠模型气道重塑的影响

郑建^{1*}, 张伟^{2#}, 朱雪², 王丽芹¹, 杨景青¹, 李莹莹¹, 郭俊美¹

¹山东中医药大学, 济南

²山东中医药大学附属医院, 济南

Email: 459967264@qq.com, huxizhijia@126.com

收稿日期: 2013年11月11日; 修回日期: 2013年12月9日; 录用日期: 2013年12月13日

摘要: 目的: 观察博来霉素(BLM)所致肺纤维化模型大鼠肺组织病理形态和肺组织中转化生长因子(TGF- β 1)的表达水平, 探讨益气类中药对肺纤维化的作用及其机制。 **方法:** 32只健康雄性SD大鼠随机分为空白组、模型组、益气组、泼尼松组, 采用气管内滴加博来霉素的方法制作肺纤维化模型, 并应用相应的药物灌胃干预, 各组大鼠分别于第28d处死, 肺组织切片经HE染色后观察病理形态, ELISA法测定大鼠肺组织中TGF- β 1的表达水平。 **结果:** 与空白组比较, 其余各组大鼠肺组织中TGF- β 1表达明显增强($P < 0.01$); 两治疗组肺纤维化程度较模型组明显减轻($P < 0.01$), TGF- β 1表达也明显低于模型组($P < 0.01$); 益气组肺纤维化程度较泼尼松组轻

*第一作者。

#通讯作者。

($P < 0.05$), TGF- β 1 表达也明显低于泼尼松组($P < 0.01$)。结论: 益气类中药能够抑制 TGF- β 1 表达, 干预肺纤维化大鼠的气道重塑, 抑制或延缓肺纤维化的发生和发展, 疗效较泼尼松更好。

关键词: 肺纤维化; 益气类中药; TGF- β 1; 转化生长因子; 气道重塑

1. 引言

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是由各种原因引起的急慢性间质性肺疾病(interstitial lung disease, ILD)的最终结局, 以肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质的过度沉积为病理特点, 其发病机制目前尚不明确, 临床主要表现为刺激性干咳、进行性加重的呼吸困难, 最终导致低氧血症和呼吸衰竭^[1]。其患病率和死亡率逐年增加, 5 年生存率为 70%, 确诊后中位生存期为 3 年, 或出现症状后 5 年, 目前肺纤维化尚缺乏有效的治疗手段, 预后较差^[2]。近年来中医药治疗肺纤维化越来越受到重视, 许多研究表明人参、黄芪等益气类中药可以通过多种途径抑制或延缓肺纤维化的发生发展^[3-5], 但从中药类别角度研究抗肺纤维化作用的很少。本研究通过益气类中药对肺纤维化大鼠进行干预, 观察大鼠肺组织病理形态及肺组织中 TGF- β 1 的表达水平, 探讨益气类中药对肺纤维化大鼠的作用及其机制。

2. 文献数据分析

2.1. 数据收集

以“咳嗽, 肺痿, 肺痹, 间质性肺病, 特发性间质性肺炎(特发性肺纤维化, 特发性肺间质性肺炎), 非特异性间质性肺炎, 尘肺, 矽肺; 中药, 方剂”等为主题词, 以知网、维普、万方、Elsevier ScienceDirect 数据库为主要检索目标, 检索自有文献记录以来所有有报道的临床治疗和动物实验中用到的中药单药及复方, 对其中符合纳入标准的文献进行筛选, 按照“十一五规划教材”中国中医药出版社出版的《中药学》中的分类方法, 将其归类, 建立数据表格。

2.2. 数据分析方法

采用频数分析方法, 计算药物的种类及每味药的使用频次。对使用频次超过 5 次以上的药物, 按药物的功效主治以分层聚类法进行聚类分析, SPSS17.0 软件完成。采用 Apriori 算法挖掘药对配伍规律, 设

最小支持度 2%, 可信度 100%。见图 1。

2.3. 数据分析结果

通过以上分析方法显示, 文献中治疗肺纤维化最常用的有活血化瘀类中药、化痰类中药、益气类中药、补阴类中药、清热解毒类中药等, 该结果表明益气类中药在肺纤维化临床治疗中有着重要的作用, 另外, 结果还显示益气类中药中常用的配伍组合为党参和黄芪, 因此本研究选用党参、黄芪作为益气类中药代表药物。

3. 动物实验

3.1. 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量(200 ± 20) g。(山东中医药大学实验动物中心, 许可证号: SCXK(鲁)20110003)。

3.2. 实验药品

益气类中药(党参、黄芪)、强的松(山东省中医院购得); 博来霉素(invitrogen 公司, 批号: 1134142); 10%水合氯醛(山东大学齐鲁医院购得)。

3.3. 主要仪器

酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS, 型号: 352 型); 洗板机(芬兰 Thermo Labsystems, 型号: AC8); 微量高速离心机(国产, 型号: TG16W); 隔水式恒温培养箱(国产, 型号: GNP-9080 型)。

4. 方法

4.1. 分组及造模

大鼠适应性饲养 7 d 后, 采用数字表法随机分为空白组、模型组、益气组、泼尼松组, 每组各 8 只, 模型组、益气组、泼尼松组均采用博来霉素(BLM)复制大鼠肺纤维化模型, 气管内一次性按体质量(5 mg/Kg)注入博来霉素溶液 A5(5 mg/ml), 空白组以同样方

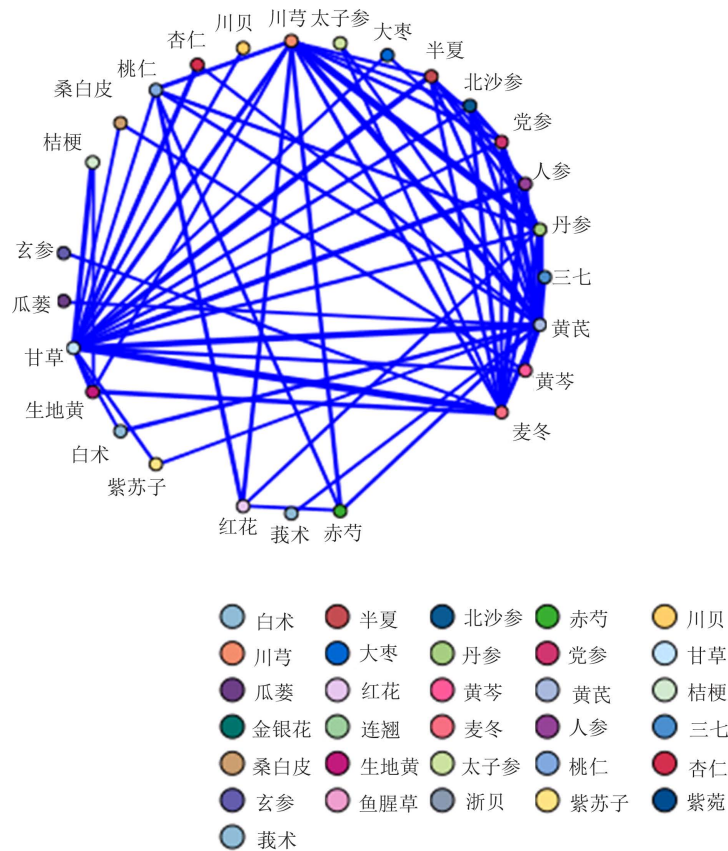


Figure 1. Association rule graph
图 1. 关联规则图形

法注入等体积生理盐水。

4.2. 给药

造模后第 2 d 起，益气组每日以党参(生药量 1.8 g/Kg)、黄芪(生药量 2.7 g/Kg)水煎液灌胃，泼尼松组每日以泼尼松混悬液(3 mg/Kg)灌胃，持续 28 d。

4.3. 观察指标

4.3.1. 病理学观察

第 28 d，各组大鼠以 10%水合氯醛(50 mg/Kg)腹腔注射麻醉，取左肺下叶用 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋、切片。病理切片行 HE 染色，采用 Mikawa 的^[6]方法进行大鼠肺组织病理评分。根据以下四项指标进行观察：1) 肺泡充血；2) 出血；3) 间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集；4) 肺泡间隔增厚或透明膜形成。评分标准：极轻度损伤分；轻度损伤 1 分；中度损伤 2 分；重度损伤 3 分；严重损伤 4 分，以上四项得分相加作为总分。

4.3.2. 酶联免疫吸附测定法(ELISA 法)测定肺组织中 TGF-β1 的表达水平

取左肺下叶组织，洗净，称取 400 mg~500 mg 肺组织在冰盘上剪碎，以每克肺组织加入 10 ml 生理盐水，冰浴下用组织匀浆机 15,000 r/min 研磨制成 10% 的组织匀浆，4℃、12,000 r/min 离心 15 min，取上清液，ELISA 法测定肺组织匀浆中 TGF-β1 含量，按试剂盒说明书操作。

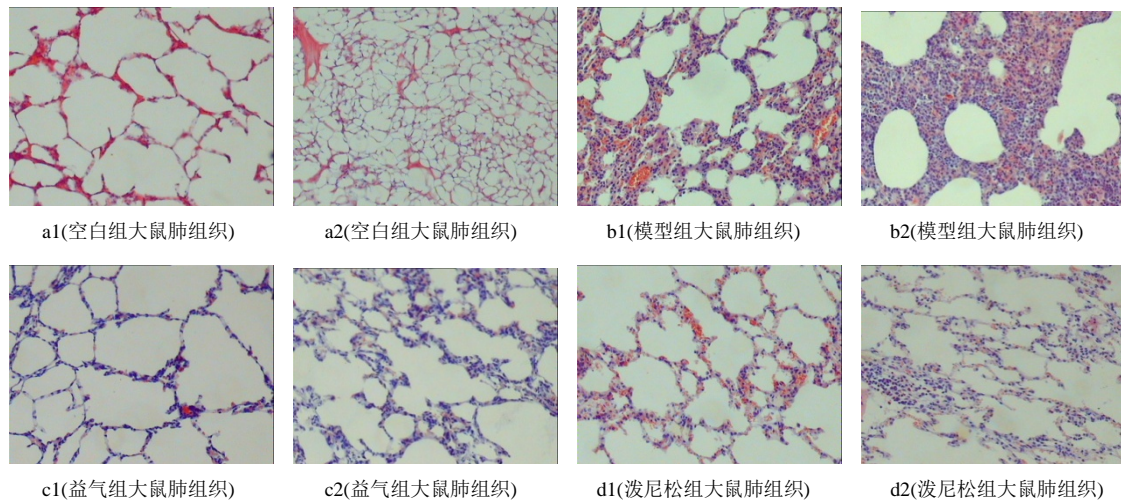
4.4. 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示，组间比较采用单因素方差分析，P < 0.01 差异有显著统计学意义，P < 0.05 差异有统计学意义。

5. 结果

5.1. 各组大鼠肺组织病理学观察

空白组大鼠肺组织结构正常，肺泡壁无充血、水



肿，肺泡腔无出血，未见纤维化组织(a1、a2)；模型组大鼠肺组织正常肺泡结构破坏，肺泡间隔明显增厚，肺泡腔融合、闭陷、消失，大量炎性细胞浸润，纤维组织增生明显(b1、b2)；益气组大鼠肺组织正常肺泡结构轻微破坏，肺泡间隔轻度增厚，少量炎性细胞浸润和纤维组织增生(c1、c2)；泼尼松组大鼠肺组织正常肺泡结构轻-中度破坏，肺泡间隔略增厚，少量炎性细胞浸润，可见纤维组织增生(d1、d2)。

模型组纤维化程度最重，与其他组相比较有显著差异($P < 0.01$)；益气组、泼尼松组纤维化程度较模型组明显减轻($P < 0.01$)，益气组较泼尼松组疗效更好，二者比较有统计学差异($P < 0.05$)。见表 1。

5.2. 各组大鼠肺组织中 TGF-β1 的表达水平

与空白组比较，模型组、益气组、泼尼松组 TGF-β1 的表达水平均明显增高，差异有显著的统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，益气组、泼尼松组 TGF-β1 的表达水平明显降低，差异有显著的统计学意义($P < 0.01$)。益气组 TGF-β1 的表达水平较泼尼松组低，差异有显著的统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

6. 讨论

肺纤维化是一种以弥漫性肺泡炎、肺泡结构紊乱、肺间质纤维增生为特征的肺部疾病，预后较差，目前尚缺乏有效的治疗措施，其发病机制尚不明确。气道重塑是肺纤维化气道病变的病理生理特征之一，表现为气道平滑肌的增厚、气道基底膜增厚及细胞外基质的沉积，而炎性细胞浸润和腺体增生肥大、上皮纤

Table 1. The lung tissue pathological score of each group rats ($\bar{X} \pm S, n = 8$)

表 1. 各组大鼠肺组织病理评分($\bar{X} \pm S, n = 8$)

组别	病理评分
空白组	0.00 ± 0.00
模型组	6.00 ± 1.20 [△]
益气组	3.00 ± 0.76 ^{△▲}
泼尼松组	4.38 ± 1.60 ^{△▲*}

注：与空白组比较：[△] $P < 0.01$ ；与模型组比较：[▲] $P < 0.01$ ；与益气组比较：^{*} $P < 0.05$ 。

Table 2. The expression level of TGF-β1 in lung tissue of each group rats ($\bar{X} \pm S, n = 8, \text{ng/L}$)

表 2. 各组大鼠肺组织中 TGF-β1 的表达水平($\bar{X} \pm S, n = 8, \text{ng/L}$)

组别	TGF-β1 含量
空白组	118.60 ± 6.74
模型组	171.53 ± 3.43 [△]
益气组	129.42 ± 4.65 ^{△▲}
泼尼松组	148.60 ± 4.94 ^{△▲□}

注：与空白组比较：[△] $P < 0.01$ ；与模型组比较：[▲] $P < 0.01$ ；与益气组比较：[□] $P < 0.01$ 。

维化形成及气道壁胶原的沉积增加是气道重塑的重要病理改变^[7]。

目前认为，细胞因子网络失衡是肺纤维化发生发展的主要机制，而 TGF-β1 是细胞因子网络中的关键性因子之一，主要由肺泡巨噬细胞产生^[8]，TGF-β1 可以刺激肺成纤维细胞合成细胞外基质成分^[9]，抑制对新合成的基质蛋白的酶解，使细胞外基质沉积增多，是迄今发现的最强的细胞外基质沉积促进剂^[10]。TGF-

$\beta 1$ 可增加肺泡上皮 II 型细胞表面的 FNmRNA 的表达, 而肺泡上皮 II 型细胞在修复损伤的肺泡上皮及引起细胞外基质沉积方面具有重要作用^[11]。同时, TGF- $\beta 1$ 还可诱导肺脏的结缔组织生长因子、人血清糖皮质激素依赖激酶(hSGK-1)和基质金属蛋白-2(MMP-2)的高表达, 活化蛋白激酶 C- δ (PKC- δ)等^[10], 可见, TGF- $\beta 1$ 在肺纤维化气道重塑中起重要作用。

本研究结果显示, 模型组大鼠肺组织中 TGF- $\beta 1$ 的表达水平较空白组明显增高, 表明 TGF- $\beta 1$ 在肺纤维化的发生发展中起重要作用, 与文献一致。益气组和泼尼松组 TGF- $\beta 1$ 的表达水平较模型组明显降低, 而益气组又明显低于泼尼松组, 表明益气类中药和泼尼松对肺纤维化均有治疗作用, 可以干预纤维化大鼠气道重塑, 且益气类中药比泼尼松作用更强, 疗效更好。病理形态学观察也同样证实了益气类中药和泼尼松对肺纤维化大鼠的治疗作用, 两组的肺纤维化程度较模型组均明显减轻, 而益气组较泼尼松组纤维化程度减轻更明显。笔者推测这可能与益气类中药可以抑制 TGF- $\beta 1$ 的表达有关, 它们可能是通过抑制 TGF- $\beta 1$ 的表达而减少肺成纤维细胞合成细胞外基质成分, 增加对新合成的基质蛋白的酶解, 抑制细胞外基质的沉积, 从而改善肺纤维化大鼠的气道重塑, 抑制或延缓肺纤维化的形成。此外, 中医认为肺纤维化属“肺痿”范畴, 气虚血瘀贯穿疾病始终, 益气类中药既可补气, 改善气虚, 又能补气以行血, 延缓血瘀的行成, 从而达到治疗疾病的目的。

综上所述, 益气类中药对肺纤维化大鼠有明显的治疗作用, 可以干预大鼠的气道重塑, 其机制可能与

降低 TGF- $\beta 1$ 的表达水平有关, 本研究的这一发现为探索肺纤维化的发病机制和中医药防治肺纤维化的作用提供了实验依据。

基金项目

泰山学者建设工程专项经费资助(No. ts20110819)。

参考文献 (References)

- [1] Bois, R.M. (2010) Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, **9**, 129-140.
- [2] Subodh, V. and Arthur, S. (2007) Idiopathic pulmonary fibrosis—new insights. *New England Journal of Medicine*, **13**, 1370-1372.
- [3] 盛丽, 姚岚, 王莉 (2006) 沙参水蛭黄芩人参对博来霉素小鼠肺纤维化的影响. *中医药学刊*, **24**, 1000-1002.
- [4] 彭清, 辛建保, 苏良平等 (2007) 黄芪对肺纤维化大鼠 MMP-2 和 TIMP-1 表达的影响. *华中科技大学学报(医学版)*, **36**, 35-37.
- [5] 刘永琦, 李金田, 李娟等 (2008) 黄芪对肺纤维化大鼠血清细胞因子及肺超微结构的影响. *中国免疫学杂志*, **24**, 980-983.
- [6] Mikawa, K., Nishina, K., Takao, Y., et al. (2003) ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin—Induced acute lung in rabbits. *Anesthesia & Analgesia*, **97**, 1751-1755.
- [7] 刘磊, 刘彬, 朱莉莉等 (2011) 参芎葡萄糖注射液对特发性肺间质纤维化患者气道重塑的影响. *中国老年学杂志*, **22**, 4301-4302.
- [8] Khalil, N., Whitman, C., Zuo, L., et al. (1993) Regulation of alveolar macrophage transforming growth factor- β secretion by corticosteroids in bleomycin-induced pulmonary inflammation in the rat. *Journal of Clinical Investigation*, **92**, 1812.
- [9] Denia, M. and Ghadirian, E. (1992) Transforming growth factor- β is generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen synthesis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **7**, 156.
- [10] 钟南山, 王辰 (2008) 呼吸内科学. 人民卫生出版社, 北京, 289.
- [11] Maniscalco, W.A., Sinkin, R.A., Watkins, R.H., et al. (1994) Transforming growth factor- $\beta 1$ modulates type II cell fibronectin and surfactant protein C expression. *American Journal of Physiology*, **267**, L569.