

补阳还五汤对肺纤维化中 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用

王振兴, 孙中莉, 王明杰, 季节, 杨昆, 杜全宇*, 王飞*
(成都中医药大学 临床医学院, 成都 610075)

[摘要] **目的:**观察肺纤维化中诱导免疫损伤和异常修复的高迁移率族蛋白 Box-1 (high mobility group Box-1 protein, HMGB1) 及晚期糖基化终产物受体(receptor of advanced glycation end-product, RAGE) 的表达, 及补阳还五汤对 HMGB1-RAGE 信号通路的调控作用。**方法:**144 只 SD 大鼠随机分为 6 组, 分别为正常组, 博来霉素 (BLM) 模型组, 补阳还五汤低、中、高剂量组 (6.83, 13.66, 27.32 g·kg⁻¹), 阳性药组 (强的松, 4.2 mg·kg⁻¹), 动物实验采用博来霉素气管注入法复制肺纤维化模型后, 分别给予补阳还五汤高、中、低剂量和强的松灌胃, 于造模后第 7, 14, 28 天分批提取样本。采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法检测肺组织中的 HMGB1, RAGE mRNA 的表达; 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测 HMGB1, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle action, α -SMA) 的表达。细胞实验采用含药血清药理学的实验方法, 以 5%, 10%, 15%, 20% 的补阳还五汤含药血清和空白血清来干预 HMGB1 诱导刺激的人肺成纤维细胞 (HFL1), 采用 Western blot 法检测 α -SMA 蛋白的表达。**结果:**动物实验中, 与正常组比较, 模型组在第 28 天显著上调 HMGB1 mRNA ($P < 0.01$), 在第 7 天和第 14 天显著上调 RAGE mRNA ($P < 0.01$), 在各时间点显著上调 HMGB1, α -SMA ($P < 0.01$); 与 BLM 模型组比较, 补阳还五汤高剂量组在第 14 天和第 28 天显著下调 HMGB1 mRNA ($P < 0.01$), 在第 7 天和第 14 天显著下调 RAGE mRNA ($P < 0.01$), 在各时间点显著下调 HMGB1 和 α -SMA 蛋白 ($P < 0.01$)。细胞实验中, 与空白组比较, 20% 空白血清预培养加 HMGB1 组显著升高 α -SMA 蛋白 ($P < 0.01$); 与 20% 空白血清预培养加 HMGB1 组比较, 不同剂量的补阳还五汤含药血清显著下调细胞中 α -SMA 蛋白 ($P < 0.01$)。**结论:**补阳还五汤可抑制 HMGB1 在大鼠肺组织中和人肺成纤维细胞中所引起的 RAGE, α -SMA 的表达增加。提示补阳还五汤可能通过阻断 HMGB1/RAGE 信号通路, 减少肌成纤维细胞生成, 对肺纤维化的发生发展起到防治作用。

[关键词] 补阳还五汤; 肺纤维化; 高迁移率族蛋白 Box-1; 晚期糖基化终产物受体
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2017) 13-0138-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130138
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170420.1106.044.html>
[网络出版时间] 2017-04-20 11:06

Regulatory Effect of Buyang Huanwu Tang on HMGB1-RAGE Signaling Pathway in Pulmonary Fibrosis

WANG Zhen-xing, SUN Zhong-li, WANG Ming-jie, JI Jie, YANG Kun, DU Quan-yu*, WANG Fei*
(School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To observe abnormal immune injury and expressions of high mobility group Box-1 protein (HMGB1) and receptor of advanced glycation end-product (RAGE) in rat pulmonary fibrosis, and the regulatory effect of Buyang Huanwu Tang on HMGB1-RAGE signaling pathway. **Method:** A total of 144 SD rats were randomly divided into six groups, namely the normal group, the bleomycin (BLM) group, the low, middle and high-dose Buyang Huanwu Tang groups (6.83, 13.66, 27.32 g·kg⁻¹) and the positive drug group

[收稿日期] 20170208 (006)
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81373597)
[第一作者] 王振兴, 在读博士, 从事中医药防治呼吸和老年病学研究, Tel: 17710267497, E-mail: vinpoet@163.com
[通讯作者] * 杜全宇, 博士, 讲师, 从事中医药防治呼吸和老年病学研究, Tel: 18990209695, E-mail: 14238028@qq.com;
* 王飞, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治呼吸和老年病学研究, Tel: 18980880213, E-mail: wangfei896@163.com

(prednisone, 4.2 mg·kg⁻¹). In the animal experiment, the bleomycin trachea injection method was used to reproduce the pulmonary fibrosis animal model, and given high, medium and low-dose Buyang Huanwu Tang by gavage. Samples were extracted on the 7th, 14th, 28th days after modeling. Reverse transcription PCR (RT-PCR) method was adopted to detect the mRNA expressions of HMGB1 and RAGE in lung tissues, and Western blot method was used to detect the protein expressions of HMGB1 and alpha-smooth muscle action (α-SMA). In the cell experiment, the drug-containing serum pharmacological methodology was adopted. Buyang Huanwu Tang -containing serum with concentrations of 5% , 10% , 15% , 20% and blank serum were adopted to intervene normal lung fibroblasts (HFL1) stimulated by HMGB1. Western blot method was used to detect the expression of α-SMA protein. **Result:** Compared with the blank control group, the mRNA expression of HMGB1 in the BLM model group was obviously up-regulated on the 28th day ($P < 0.01$), the mRNA expression of RAGE was visibly up-regulated on the 7th and the 14th days ($P < 0.01$), and the protein expressions of HMGB1 and α-SMA was significantly up-regulated at all times points ($P < 0.01$) in animal experiments. Compared with the BLM model group, in the high-dose Buyang Huanwu Tang group, the mRNA expression of HMGB1 was significantly decreased on the 14th and 28th days ($P < 0.01$), the mRNA expression of RAGE was significantly down-regulated on the 7th and the 14th days ($P < 0.01$), and the protein expressions of HMGB1 and α-SMA was clearly down-regulated on all time points ($P < 0.01$) in animal experiments. Compared with blank control group, the 20% serum added HMGB1 group showed a significant rise in the protein expression of α-SMA ($P < 0.01$). Compared with the 20% serum added with HMGB1 control group, different concentrations of Buyang Huanwu Tang-containing serum significantly reduced the protein expression of α-SMA ($P < 0.01$) in the cell experiment. **Conclusion:** Buyang Huanwu Tang can inhibit the expressions of RAGE and alpha SMA caused by HMGB1 in the rat lung tissues. The results suggest that Buyang Huanwu Tang may prevent and treat pulmonary fibrosis by blocking HMGB1/RAGE signaling pathways and reducing the growth of myofibroblasts.

[**Key words**] Buyang Huanwu Tang; pulmonary fibrosis; high mobility group Box-1 protein (HMGB1); receptor of advanced glycation end-product (RAGE)

肺纤维化是以进行性加重的呼吸困难、喘息、气短、刺激性干咳为主要临床表现,以限制性通气功能障碍、低氧血症、慢性进行性弥漫性肺间质纤维化为特点的纤维增殖性疾病^[1-3]。多种间质性肺疾病(ILD)在疾病的晚期均可进展为弥漫性肺纤维化,如特发性间质性肺炎、结节病、肺朗汉斯细胞组织细胞增生症、过敏性肺炎等,其中以特发性肺纤维化(IPF)最为常见。肺间质纤维化根据病因不同可分为继发性肺纤维化和特发性肺纤维化。由某些明确的间质性肺疾病发展而来的属继发性,预后相对较好。而特发性肺纤维化是指原因不明的慢性进行性肺纤维化,多发于老年人,因缺乏有效的治疗药物,诊断后中位生存期仅3~5年^[4]。目前研究认为,肺泡损伤修复中抗纤维化和致纤维化之间的平衡紊乱是IPF的主要发病机制。高迁移率族蛋白Box-1(HMGB1)作为一种新的重要炎症介质或细胞因子,参与到肺纤维化疾病的发病机制。HMGB1是一种高度保守的非组蛋白核蛋白,在细胞核内参与DNA的复制、转录和修复等,在细胞外可与晚期糖基化终

产物受体(RAGE),样受体家族(TLRs)等受体结合,启动多条信号通路,参与免疫损伤与异常修复^[5]。研究显示,由HMGB1放大的炎症反应造成的组织损伤可导致肺上皮细胞经过表型改变分化为以成纤维细胞和肌纤维母细胞为主的间质细胞形成上皮间质转化(EMT)效应^[6]。有学者研究认为HMGB1蛋白的截断分子还能够作为α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)基因启动子的特异性转录激活子与α-SMA后动子特异性结合,活化α-SMA基因的转录,从而调节其表达,在肺上皮细胞—间质细胞转化中发挥作用,参与了肺纤维化进程中上皮向肌纤维母细胞转化的病理过程^[7]。HMGB1致纤维化的胞内信号通路研究迄今甚少,尤其在肺纤维化中的胞内信号通路尚未见报道。针对“损伤异常修复学说”的细胞因子靶点,寻找有效的抗肺纤维化药物,成为了当今国内外研究的热点和诊治难点。

肺纤维化根据其主要临床表现和病机特点,在祖国医学中多归属到“肺痿”、“肺痹”等疾病范畴^[8]。在早期或急性发作期,以邪实为主,由外邪

阻络,肺为邪痹,气血不通,络脉痹阻引起,多归属于“肺痹”范畴;在中后期以本虚为主,由肺络虚损不荣,气血不充,肺叶挛缩,痿而不用引起,多归属于“肺痿”范畴^[9]。课题组前期研究认为气虚血瘀、肺络闭阻是肺纤维化疾病发生发展的核心病机^[10-11],在临床上使用益气活血法进行治疗可较好的改善患者症状及生存质量^[12]。本研究选用补阳还五汤为益气活血代表方,以博莱霉素气管注入至肺纤维大鼠和人肺成纤维细胞为受试对向,以 HMGB1 为作用靶点,在体内和体外同时探寻补阳还五汤防治肺纤维化的分子机制。

1 材料

1.1 动物及细胞 雄性 SPF 级 SD 大鼠购于成都达硕实验动物有限公司,体重(220±20)g,动物合格证号 SCXK(川)2008-0024,成都中医药大学伦理委员会编号 2014DL-023,此次动物实验得到伦理委员会批准。人肺成纤维细胞(HFL1),购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 药物及试剂 补阳还五汤按《医林改错·瘫痪论》所载药物和配比[黄芪(生)120g,当归尾6g,赤芍4.5g,地龙、川芎、桃仁、红花各3g]转换为大鼠等效剂量使用,水提液浓缩至每1mL药液含原生药材3g,灭菌后于4℃冰箱保存备用。补阳还五汤饮片:黄芪(批号1503072),当归尾(批号1412031),赤芍(批号1407105),地龙(批号1511049),川芎(批号1405227),桃仁(批号1509053)和红花(批号1402080);以上所有中药饮片均购于四川新荷花中药饮片股份有限公司,经成都中医药大学药学院马云桐教授鉴定为正品。重组人HMGB-1(纯度>90%,美国Sigma公司,批号02K0720);抗体HMGB1,抗体α-SMA,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(美国Abcam公司,批号分别为201412,201504,201504);硫酸博莱霉素(大连美仑生物,批号20151008);强的松(浙江仙居制药股份有限公司,批号140137)。

1.3 仪器 Midi40 型二氧化碳恒温细胞培养箱, Varioskan 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);HH-2 型数显恒温水浴锅(上海赫田科学仪器有限公司);DMi1 型倒置显微镜(德国徕卡公司);Zj-003 型台式高速离心机(科大中佳公司);DQHY-2000M 型恒温摇床(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);JY300C 型通用电泳仪(北京六一仪器厂);Typhoon FLA7000 多功能激光分子成像系统(通用电气医疗系统贸易发展有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 144 只 SD 大鼠随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,补阳还五汤低、中、高剂量组,阳性药组。除正常组外,其余各组均采用气管内注射博莱霉素的方法复制肺纤维化大鼠模型,正常组气管内注入等量生理盐水。于造模第 2 天对补阳还五汤低、中、高剂量组、阳性药组开始灌胃给药,补阳还五汤低、中、高剂量组分别给予补阳还五汤 6.83,13.66,27.32 g·kg⁻¹,阳性药组给予强的松 4.2 mg·kg⁻¹。于造模后第 7,14,28 天分 3 批处死动物,每组 8 只。取左肺固定,通过苏木素-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色进行病理检测。右肺匀浆,提取 RNA 和蛋白,通过逆转录 PCR(RT-PCR)法检测 HMGB1,RAGE mRNA 的表达、蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测 HMGB1,α-SMA 蛋白的表达。

2.2 含药血清制备 将 30 只 SD 大鼠随机分为正常组和补阳还五汤含药血清制备组,每组各 15 只。根据文献《血清药理实验中采血时间的通法方案》^[13]和《补阳还五汤血清药理学的方法学研究进展》^[14]中的方法进行含药血清制备。补阳还五汤使用 13.66 g·kg·d⁻¹的剂量进行灌胃,正常组给予等体积的生理盐水。每天早晚各灌胃 1 次,连续给药 7 d。在末次灌胃后 1 h,按 3 mL·kg⁻¹使用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,行腹主动脉采血,采血前禁食 12 h。取血后室温静置 4 h,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,收获上清,56℃水浴灭活 30 min,0.22 μm 微孔滤膜滤过除菌后分装,-20℃冰箱冻存备用。

2.3 细胞培养及分组 取对数生长期 HFL1 细胞,以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,采用含 10% 胎牛血清,1% 双抗(青霉素-链霉素混合溶液)的 F12K 培养液,在 37℃ 5% CO₂,饱和湿度条件培养 48 h,细胞融合达 80% 后,换用无血清培养液继续培养 24 h,使细胞同步化。将细胞分为 7 组,分别为正常组,HMGB1 刺激组,20% 空白血清预培养加 HMGB1 组,补阳还五汤含药血清预培养加 HMGB1 刺激组,含药血清终体积分数分别为 5%,10%,15%,20%。补阳还五汤含药血清预培养组按分组加入对应体积的含药血清,再加入空白血清,使各组血清终体积均为 20%。37℃ 5% CO₂,饱和湿度条件培养 0.5 h 后,加入 HMGB1 蛋白(终质量浓度为 100 μg·L⁻¹)刺激 24 h 后提取细胞总蛋白。

2.4 RT-PCR 检测方法 取大鼠肺组织 50 mg 样品,快速匀浆,使用 Trizol 试剂提取总 RNA。然后取

总 RNA 5 μg 进行逆转录,总反应总体积为 20 μg。从美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中搜索下载大鼠 HMGB1, RAGE 及对应的 β-actin 基因全序列,设计筛选引物,引物信息如下:β-actin 上游为 5'-ACGCACGATTTCCCTCTCA-3',下游为 5'-CTCATGCCATCCTGCGTCT-3',产物长度为 116 bp; HMGB1 上游为 5'-CGCCAAGCTGAAGGAGAAGT-3',下游为 5'-CCTCCTCGTCGTCTTCCTCT-3',产物长度 182 bp; RAGE 上游为 5'-CGAGTCCGAGTCTACCAGA TTC-3',下游为 5'-CCATCCAAGTGCCAGCTAAG-3',产物长度为 143 bp。反应程序为 95 ℃ 预变性 10 min, 95 ℃ 变性 5 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 40 个循环,采集荧光。最后使用软件分析 PCR 过程中各检测样本的 C_t 值,参照文献[15]通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对 mRNA 表达水平。

2.5 Western blot 检测方法 制备 SDS-PAGE 凝胶,将提取的蛋白样品进行蛋白定量后上样,每孔 20 μg。于电压 120 V 和 180 V 进行电泳,电泳完成后取出 PAGE 凝胶,按 3 张滤纸/PAGE 胶/PVDF 膜/3 张滤纸的顺序层叠排列,于 110 V 电压下转膜 2 h。取出 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,漂洗 3 次,加入稀释好的 HMGB1 (1:1 000), α-SMA (1:1 000) 抗体,室温孵育 1~2 h, 4 ℃ 过夜。漂洗 3 次,加入稀释的 HRP 标记二抗(1:2 000),室温孵育 1 h,漂洗 3 次。使用 ECL 发光液对已孵育完成的 PVDF 膜进行显色,凝胶成像分析系统对显影条带进行分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,其中计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用 LSD 法,方差不齐时用 Tamhane's T2 法,两组间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤对纤维化大鼠肺组织中 HMGB1, RAGE mRNA 表达的调控作用 第 7 天模型组,第 28 天补阳还五汤低剂量组及强的松组各死亡 1 只大鼠。与正常组比较,模型组大鼠肺组织中 HMGB1, RAGE mRNA 的表达增高, HMGB1 mRNA 在第 14, 28 天较明显 ($P < 0.01$), RAGE mRNA 在第 7 和 14 天较明显 ($P < 0.01$)。与模型组比较,使用补阳还五汤不同剂量干预后均可降低 HMGB1, RAGE mRNA 的表达,其中补阳还五汤高剂量组第 14 天和 28 天下调 HMGB1 mRNA 的表达效果最明显 ($P < 0.01$)。对 RAGE mRNA 的调控作用仍以补

阳还五汤高剂量组在第 7 天和 14 天效果较好 ($P < 0.01$)。强的松组强的松对 HMGB1 mRNA 的表达调控效果与补阳还五汤高剂量组在第 14 天和 28 天相近 ($P < 0.01$)。见表 1, 2。

表 1 补阳还五汤对大鼠肺组织中 HMGB1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang on expression of HMGB1 mRNA in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
正常	—	1.34 ± 0.62	1.46 ± 0.27	1.17 ± 0.11
模型	—	1.06 ± 0.31	2.17 ± 0.55 ¹⁾	3.31 ± 0.63 ²⁾
补阳还五汤	6.83	1.03 ± 0.56	2.57 ± 0.31	1.36 ± 0.41
	13.66	1.33 ± 0.26	1.97 ± 0.12	0.89 ± 0.32
	27.32	0.91 ± 0.21	1.01 ± 0.09 ³⁾	1.27 ± 0.19 ³⁾
强的松	4.2 × 10 ⁻³	0.93 ± 0.22	1.21 ± 0.51 ³⁾	1.36 ± 0.37 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 补阳还五汤对大鼠肺组织中 RAGE mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwu Tang on expression of RAGE mRNA in lung tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	7 d	14 d	28 d
正常	—	0.33 ± 0.09	0.36 ± 0.15	0.29 ± 0.13
模型	—	1.05 ± 0.26 ¹⁾	0.96 ± 0.21 ¹⁾	0.66 ± 0.28
补阳还五汤	6.83	0.37 ± 0.14 ²⁾	0.85 ± 0.21	0.47 ± 0.22
	13.66	0.39 ± 0.16 ²⁾	0.38 ± 0.22	0.89 ± 0.02
	27.32	0.36 ± 0.14 ³⁾	0.41 ± 0.09 ³⁾	0.52 ± 0.13
强的松	4.2 × 10 ⁻³	0.48 ± 0.24 ²⁾	0.66 ± 0.21	0.48 ± 0.25

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 补阳还五汤对纤维化大鼠肺组织中 HMGB1, α-SMA 蛋白表达的调控作用 与正常组比较,肺纤维化大鼠在 7, 14, 28 d 肺组织内 HMGB1, α-SMA 蛋白表达增高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,使用补阳还五汤高、中、低剂量干预后,可不同程度的低模型大鼠肺组织内 HMGB1, α-SMA 蛋白的表达,结果呈现出较明显的量效关系,药物剂量越高 HMGB1, α-SMA 蛋白的表达量越少,补阳还五汤高剂量组在各时间点均较显著 ($P < 0.01$)。使用强的松药强的松干预后,模型大鼠肺组织内 HMGB1, α-SMA 蛋白的表达亦明显降低,结果与补阳还五汤高剂量组相似。见表 3, 4 及图 1, 2。

表 3 补阳还五汤对肺纤维化大鼠 HMGB1 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwu Tang on HMGB1 protein in pulmonary fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)

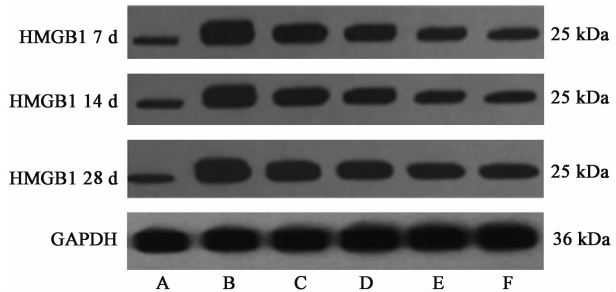
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	7 d	14 d	28 d
正常	—	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.23 ± 0.01
模型	—	0.53 ± 0.05 ¹⁾	0.59 ± 0.03 ¹⁾	0.62 ± 0.03 ¹⁾
补阳还五汤	6.83	0.40 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.51 ± 0.01
	13.66	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.35 ± 0.05
	27.32	0.27 ± 0.01 ²⁾	0.31 ± 0.01 ²⁾	0.32 ± 0.02 ²⁾
强的松	4.2×10^{-3}	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.03 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

表 4 补阳还五汤对肺纤维化大鼠 α -SMA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwu Tang on α -SMA protein in pulmonary fibrosis rats($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	7 d	14 d	28 d
正常	—	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.21 ± 0.02
模型	—	0.69 ± 0.02 ¹⁾	0.66 ± 0.01 ¹⁾	0.61 ± 0.01 ¹⁾
补阳还五汤	6.83	0.48 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.03
	13.66	0.28 ± 0.01 ²⁾	0.32 ± 0.01 ²⁾	0.30 ± 0.01 ²⁾
	27.32	0.27 ± 0.01 ²⁾	0.32 ± 0.01 ²⁾	0.29 ± 0.01 ²⁾
强的松	4.2×10^{-3}	0.20 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.22 ± 0.01 ²⁾



A. 正常组;B. BLM 模型组;C. 补阳还五汤 $6.83 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. 补阳还五汤 $13.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 补阳还五汤 $27.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;F. 强的松组(图 2 同)

图 1 各组大鼠 HMGB1 蛋白的表达

Fig.1 Expression of HMGB1 protein in pulmonary fibrosis rats

3.3 补阳还五汤含药血清对 HMGB1 诱导后人肺成纤维细胞中 α -SMA 的调控作用 HMGB1 诱导 24 h 后,HFL1 细胞中 α -SMA 的表达增高,在对照血清组较 HMGB1 无血组增高更明显。HMGB1 加 20% 对照血清组与正常组比较 ($P < 0.01$)。不同浓度的补阳还五汤含药血清均能降低 HFL1 细胞中 α -SMA 的表达,与 HMGB1 加 20% 对照血清组比较 ($P < 0.01$)。见表 5 和图 3。

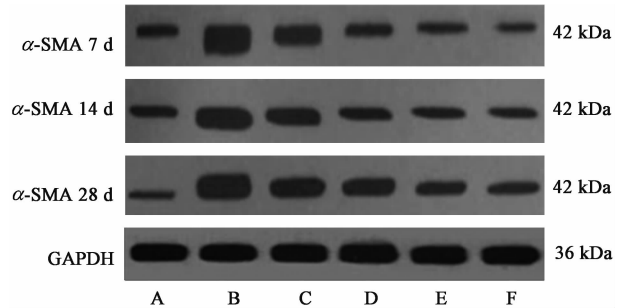


图 2 各组大鼠 α -SMA 蛋白的表达

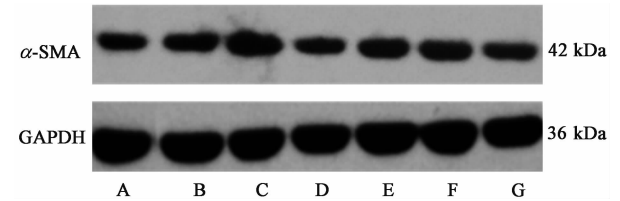
Fig.2 Expression of α -SMA protein in pulmonary fibrosis rats

表 5 补阳还五汤对 HFL1 细胞中 α -SMA 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwu Tang on α -SMA protein in HFL1 cells($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	体积分数/%	α -SMA/GAPDH
正常	—	0.63 ± 0.03
HMGB1	—	0.54 ± 0.01
对照血清	20	0.84 ± 0.09 ¹⁾
补阳还五汤含药血清	5	0.58 ± 0.01 ²⁾
	10	0.62 ± 0.01 ²⁾
	15	0.51 ± 0.01 ²⁾
	20	0.46 ± 0.02 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与对照血清组比较²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组;B. HMGB1 组;C. 20% 对照血清组;D. 5% 含药血清组;E. 10% 含药血清组;F. 15% 含药血清组;G. 20% 含药血清组

图 3 各组 HFL1 细胞中 α -SMA 的表达

Fig.3 Expression of α -SMA protein in HFL1 cells

4 讨论

特发性肺纤维化的典型病理表现为普通型间质性肺炎,在镜下可见正常肺组织与纤维化区域交替存在,伴散在的成纤维细胞灶,病变部位主要集中在胸膜下和基底部^[16-18]。成纤维细胞灶主要由成纤维细胞和肌成纤维细胞组成,表达 α -SMA 是肌成纤维细胞的特征^[19]。目前研究显示,HMGB1 在细胞核内可作为 α -SMA 的基因转录活化因子^[20]。HMGB1 是一种高度保守的非组蛋白核蛋白,在细胞核内参与 DNA 的复制、转录和修复等^[21]。可通过活化的免疫细胞和损伤坏死的细胞主动分泌到细胞外^[22],与细胞膜上的 RAGE,TLRs 等受体结合,启动多条信号通路,参与免疫损伤与异常修复。肺泡上

皮慢性损伤和异常修复导致肺组织中细胞外基质的过度积聚和成纤维细胞灶的形成^[23],同时引起肺泡上皮持续损害,最终导致肺的结构破坏和功能丧失^[24],形成肺纤维化。

补阳还五汤方中重用黄芪大补肺脾之气,使亏损的五成元气得以复。现代研究显示,补阳还五汤复方具有改善机体血流动力学、血液流变学、抗血栓形成、抑制血小板聚集、调节免疫等作用^[25]。在对肺纤维化的实验观察中发现,黄芪可升高肺纤维化大鼠血中干扰素- γ (IFN- γ),降低白细胞介素-4(IL-4),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[26],并调节 Th1/Th2 细胞因子和基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶抑制剂(MMPs/TIMPs)的平衡^[27]通过抑制成纤维细胞增殖、减少胶原分泌起到抗纤维化作用。黄芪提取物含药血清在体外能抑制大鼠肺成纤维细胞的增殖,降低细胞中促纤维化因子 TGF- β ,TNF- α 的表达,增加抗纤维化因子肝细胞生长因子及角化生长因子的表达^[28]。黄芪甲苷可减少肺组织上皮细胞的凋亡,抑制肺纤维化大鼠肺中组织蛋白酶 B 的 mRNA 表达水平,减轻肺纤维化程度^[29]。

综上所述,由博莱霉素气管注入所引起的肺纤维化大鼠体内 HMGB1 mRNA 及其受体 RAGE mRNA 的表达均增加,肺组织中 HMGB1 和 α -SMA 在蛋白水平表达增加,说明 HMGB1 参与了肺纤维化大鼠肺内复杂的免疫炎症过程,并可促进肌成纤维细胞标志物 α -SMA 的表达。在体外, HMGB1 可促进人肺成纤维细胞表达 α -SMA。使用补阳还五汤干预后,可有效抑制这些蛋白的表达,以高剂量组效果最明显,说明补阳还五汤可能通过阻断 HMGB1/RAGE 信号通路,对肺纤维化的发生发展起到防治作用。

[参考文献]

[1] Navaratnam V, Fleming K M, West J, et al. The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U. K. [J]. Thorax, 2011, 66 (6) : 462-467.

[2] Raghu G, Collard H R, Egan J J, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183 (6) : 788-824.

[3] Raghu G, Rochwerg B, ZHANG Y, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 192 (2) : e3-e19.

[4] Katzenstein A L, Zisman D A, Litzky L A, et al. Usual interstitial pneumonia: histologic study of biopsy and explant specimens [J]. Am J Surg Pathol, 2002, 26 (12) : 1567-1577.

[5] Lotze M T, Zeh H J, Rubartelli A, et al. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity [J]. Immunol Rev, 2007, 220 (1) : 60-81.

[6] Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T, et al. The role of high mobility group box1 in pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39 (4) : 440-447.

[7] 蔡琳,徐军. HMGB1 RNA 干扰对博莱霉素诱导肺纤维化小鼠 α 平滑肌肌动蛋白的抑制作用 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29 (4) : 322-326.

[8] 鞠铮嵘. 肺痿理论——晁恩祥名老中医治疗肺纤维化经验总结 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.

[9] 李辉,代媛媛,李国勤. 重温肺痿肺痹文献,探讨特发性肺间质纤维化治疗 [J]. 北京中医药, 2010, 29 (11) : 839-842.

[10] 王飞,陈平,曹国平,等. 补阳还五汤对肺纤维化大鼠肺泡巨噬细胞肿瘤坏死因子的影响 [J]. 中药药理与临床, 2005, 21 (3) : 5-7.

[11] 王振兴,王飞. 环境毒邪对肺系疾病的影响初探 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22 (2) : 206-208.

[12] 王振兴,张秀,王宇帆,等. 从大气下陷论治肺间质纤维化 [J]. 中医杂志, 2016, 57 (7) : 567-569.

[13] 李仪奎,吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15 (6) : 93-94.

[14] 宫丽,张继平. 补阳还五汤血清药理学的方法学研究进展 [J]. 中医药信息, 2007, 24 (1) : 43-45.

[15] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method [J]. Methods, 2001, 25 (4) : 402-408.

[16] 李水芹,李学君,王飞,等. 补阳还五汤大鼠含药血清对肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smad/ERK 信号通路的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42 (12) : 2436-2439.

[17] 杨晗,王飞,王全林,等. 补阳还五汤对肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β_1 /Smad3 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (24) : 240-244.

[18] Benton J A, Kern H B, Leinwand L A, et al. Stains block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting α -smooth muscle actin [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29 (11) : 1950-1957.

[19] Darby I, Skalli O, Gabbiani G. α -smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing [J]. Lab Invest, 1990, 63 (1) : 21-29.

[20] 蔡琳,徐军. HMGB1 RNA 干扰对博莱霉素诱导肺纤维化小鼠 α 平滑肌肌动蛋白的抑制作用[J]. 免疫学杂志,2013,29(4):322-326.

[21] Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins[J]. Mol Cell Biol,1999, 19(8): 5237-5246.

[22] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(4):331-342.

[23] Phan S H. The myofibroblast in pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2002,122(s6):286-289.

[24] Scotton C J, Chambers R C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast infocus[J]. Chest, 2007,132(4):1311-1321.

[25] ZHANG J P,LI C L,GUO X X,et al. Effect of buyang

huanwu decoction on platelet activating factor content in arterial blood pre-and post-arterial thrombosis in rats [J]. J Tradit Chin Med,2001,21(4):299-302.

[26] 刘永琦,李金田,李娟,等. 黄芪对肺纤维化大鼠血清细胞因子及肺超微结构的影响[J]. 中国免疫学杂志,2008, 24(11):980-983.

[27] 彭清,辛建保,苏良平,等. 黄芪对肺纤维化大鼠 MMP-2 和 TIMP-1 表达的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2007,36(1):35-37.

[28] 栾增强,曹文富. 黄芪防治肺纤维化的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):275-277.

[29] 张平,李杰平,于小华,等. 黄芪甲甙对实验性肺纤维化大鼠 Cathepsin B 表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2007,7(6):860-862.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》2014—2016 年度优秀审稿专家名单

- 田元祥教授(中国中医科学院中医临床基础医学研究所)
- 刘春生教授(北京中医药大学)
- 沈祥春教授(贵阳医学院药学院)
- 王长虹教授(上海中医药大学)
- 倪艳教授(山西省中医药研究院)
- 倪健教授(北京中医药大学)
- 赵艳玲研究员(解放军 302 医院)
- 李孝栋教授(福建中医药大学)
- 康文艺教授(河南大学)
- 张艳教授(辽宁中医药大学)
- 任钧国研究员(中国中医科学院西苑医院)
- 蔡宇教授(暨南大学药学院)
- 王冰副教授(上海中医药大学)
- 袁子民副教授(辽宁中医药大学)
- 张华副教授(山东中医药大学)

获奖的优秀审稿专家是在 2014—2016 年度一贯积极支持编辑部工作,能认真负责、按时完成审稿任务,且审稿数量较多的专家,由责任编辑推荐,编委会年会通过并颁发了获奖证书及奖金。