

补中益气汤对慢性间歇性低氧诱发的小鼠肺间质纤维化的作用*

唐毅^{1,2}, 刘兵兵^{1,2}, 陈琦^{1,2}, 李亭亭^{1,2}, 吉恩生^{1,2}, 李杰茹^{1,2,Δ}

(1. 河北中医学院生理学教研室, 石家庄 050200; 2. 河北省中西医结合氢医学技术创新中心, 石家庄 050091)

【摘要】 目的: 观察慢性间歇性低氧(CIH)对小鼠肺组织转化生长因子-β(TGF-β)、P-smad3和血清层粘连蛋白(LN)、透明质酸(HA)表达的影响以及补中益气汤对CIH小鼠肺间质沉积损害的干预作用。方法: 随机将50只SPF级C57BL小鼠分为5组($n=10$): 空白对照组、CIH模型组、CIH+低、中、高剂量补中益气汤组。分别置于常氧或CIH条件下, 中药组给予对应剂量药物。在第35日无创肺功能检测后处死。HE染色评估病理学改变, Masson染色行胶原沉积评估; Western blot法检测TGF-β1、P-smad3等通道蛋白和下游α-SMA、Collagen I的蛋白表达水平; ELISA法检测血清中TGF-β1、LN、HA的质量浓度。结果: HE染色显示, CIH小鼠肺泡塌陷, 肺间隔增厚, 上皮细胞坏死; Masson显示, CIH小鼠肺间质大量胶原纤维增生、沉积, 而补中益气汤干预组肺组织上述改变较CIH模型组明显减轻。CIH模型组肺组织中TGF-β1、P-smad3及Collagen I、Collagen III、α-SMA蛋白表达水平与空白对照组相比明显上调($P<0.05$), 血清中TGF-β1、LN的表达明显上调($P<0.05$)。补中益气汤干预组肺组织中TGF-β1、P-smad3、Collagen I蛋白及SMA-α的表达水平相较于CIH组有明显下调($P<0.05$)。结论: 补中益气汤可抑制CIH小鼠肺泡结构改变和肺间质的胶原过度沉积。其机制可能与补中益气汤下调TGF-β/smads信号通路的相关蛋白表达有关。

【关键词】 慢性间歇性低氧; 补中益气汤; 肺间质纤维化; TGF-β1; P-smad3; I型胶原; 小鼠

【中图分类号】 R542.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-175-006

【DOI】 10.12047/j. ejap. 6316. 2022. 104

Effects of Bu Zhong Yi Qi decoction on CIH-induced interstitial lung fibrosis in mice

TANG Yi^{1,2}, LIU Bing-bing^{1,2}, CHEN Qi^{1,2}, LI Ting-ting^{1,2}, JI En-sheng^{1,2}, LI Jie-ru^{1,2,Δ}

(1. Department of Physiology, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200; 2. Hebei Technology Innovation Center of TCM Combined Hydrogen Medicine, Shijiazhuang 050091, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects of chronic intermittent hypoxia (CIH) on the expression of transforming growth factor-β (TGF-β), P-smad3, serum laminin (LN) and hyaluronidase (HA) in mouse lung tissues and the protective effects of Bu Zhong Yi Qi decoction on lung interstitial deposition damage in CIH mice. **Methods:** Fifty SPF-grade C57BL mice were randomly divided into five groups ($n=10$): blank control group, CIH model group, and CIH+ low, medium and high doses of Bu Zhong Yi Qi decoction group. Mice were placed under normoxia or CIH conditions, respectively. The Chinese medicine group was given the corresponding doses of drugs. HE staining was performed to assess pathological changes and Masson staining was performed to assess collagen deposition. Western blot was performed to detect the expressions of channel proteins such as TGF-β1, P-smad3 and down stream α-SMA and Collagen I. ELISA was performed to detect the serum levels of TGF-β1, LN and HA. **Results:** HE staining showed alveolar collapse, septal thickening and epithelial cell necrosis in CIH mice, Masson showed massive collagen fiber proliferation and deposition in lung interstitium, while the above changes in lung tissues were significantly improved in the CIH + Bu Zhong Yi Qi decoction groups compared with the CIH group. TGF-β1, P-smad3 and Collagen I, Collagen III, and α-SMA expression levels were increased compared with the blank control group ($P<0.05$), and the expressions of TGF-β1 and LN in serum were upregulated ($P<0.05$). The expressions of TGF-β1, P-smad3, Collagen I protein and SMA-α in the lung tissues of the CIH+ Bu Zhong Yi Qi decoction groups were downregulated significantly compared with those of the CIH group ($P<0.05$), and the improvement of multiple indexes in the CIH+ high-dose CIH intervention group was better than those of the low-dose group ($P<0.05$). **Conclusion:** Bu Zhong Yi Qi decoction can inhibit alveolar structural changes and excessive collagen deposition in the interstitium of CIH mice, and then improve lung function in CIH mice. The mechanism may be related to the down-regulation of protein expression related to TGF-β/smads signaling pathway by Bu Zhong Yi Qi decoction.

【KEY WORDS】 chronic intermittent hypoxia; Bu Zhong Yi Qi decoction; pulmonary fibrosis; TGF-β1; P-smad3; type I collagen; mice

阻塞型睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea hypopnea syndrom, OSAHS) 是多因素介导的在睡眠状态时反复出现呼吸暂停和(或)低通气,造成低氧血症和高碳酸血症,进而使机体发生相关的临床综合征^[1]。OSAHS 对机体多系统都有损害,其中包括呼吸系统。在与 OSAHS 相关的呼吸系统损伤中,肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)的危害易被忽视。慢性间歇性低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)是引起肺组织损伤的一个重要的病理因素,可引起肺部炎症进而导致肺间质中的胶原沉积等病变,而 CIH 引起肺损伤的机制目前仍不太明确,且相关研究较少。

转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 主要通过 TGF- β /smads 信号通路发挥作用,此通路与 PF 高度相关^[2],而抑制 TGF- β /smads 信号通路,则能抑制肺间质中胶原的沉积从而改善 PF。目前西医药对此病收效不佳。例如:西药一线抗纤药物吡非尼酮的副作用明显且不宜长期服用施加手术治疗常有后遗症^[3],而天然中医药对其虽有良好效果且能避免西医疗法的副作用,但缺少相关实验数据支持。

祖国医学通常将 PF 或其症候归属于肺萎范畴,《金匱要略》中论治肺萎有虚寒虚热两种证类,然不论寒热之别,肺萎皆应循培土生金之法,以补益脾胃为要^[4]。补中益气汤出自《内外伤辨惑论》,其方既适用于脾虚气陷的肺萎病也适用于肺脾气虚的鼾证后期,在《鼾症中医诊疗专家共识意见中》也明确指出,补中益气汤可用于治疗鼾症后期^[5]。本研究旨在探索该方对 CIH 导致的小鼠 PF 的干预作用及其可能的机制,为 OSAHS 导致的肺损伤的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 C57BL 雄性小鼠 50 只,体重 20 ~ 25 g,北京维通利华实验动物技术有限公司处购买。于科研楼标准动物房中适应性喂养 2 周,正常饮食饮水,实验动物设计经过我校伦理委员会审查。

1.2 药物与试剂

补中益气汤中药饮片成份为黄芪 36 g、炙甘草 18 g、党参片 12 g、白术 18 g、北柴胡 12 g、当归 6 g、

升麻 12 g、陈皮 12 g。生药饮片以水煮醇沉法加工制备小鼠灌胃药液,含生药 1.26 g/ml。方中所有中药药材均购自于神威药业集团有限公司、Tubulin 抗体 (Proteintech, 批号:66031-1-Ig)、山羊抗兔 IgG (Service bio, 批号:GB23303) 和山羊抗小鼠 IgG (Service bio, 批号:GB23301) P-Smad3 抗体 (Abclonal, 批号:AP0727) Smooth muscle 抗体 (华安生物, 批号:ET1607-43) Collagen I 抗体 (赛维尔, 批号:GB11022-2) Collagen III 抗体 (赛维尔, 批号:GB11023) TGF- β (Bioss, 批号:bs-0086R)。

1.3 仪器

Finepoint WBP 无创肺功能检测系统(美国 Buxco 公司)、动物慢性间歇性低氧装置(美国 Bio Spherix, Oxycycler Model 84)、Mini-PROTEAN[®] Tetra 电泳槽(美国 BIO RAD 公司,1658004),Power Pac[™] 电泳仪(美国 BIO RAD 公司,043BR58047)。

1.4 动物分组及模型制备

适应性喂养 2 周,随机分组为:空白对照组、CIH 模型组、CIH+低、中、高剂量补中益气汤组 3 组,每组 10 只。开始 1.5 min 时段充入 100% 氮气使仓内 O₂ 浓度降低至 9%,后 1.5 min 充入氧气(>99.5%),使仓内 O₂ 浓度升至 21%。如此 3 min 一个完整循环,上仓期间保持不间断循环,每日 9:00 am-5:00 pm 上仓,共持续 35 d。常氧处理组充入舱内的是常氧空气^[6]。CIH+高中低各剂量组于每日 8:00 前给补中益气汤灌胃(生药量 33 g/(kg·d)、22 g/(kg·d)、11 g/(kg·d)),单纯 CIH 组与空白对照组灌服同体积生理盐水。CIH 处理 35 d 后,对小鼠行肺功能检测后麻醉实施安乐死,分离肺组织。剥离肺叶后部分于多聚甲醛固定液中固定,待 HE 染色和 MASSON 组织染色实验。剩余部分肺组织-80℃ 保存,待 Western blot 法以检测蛋白表达情况。

1.5 无创肺功能检测

Fine Pointe WBP 系统在多种小动物(小鼠、大鼠、豚鼠)的 PF、哮喘、睡眠呼吸暂停综合征、慢性阻塞性肺疾病模型的肺功能检测实验中被广泛使用。流程有以下 4 步:①检测前检查确定腔体和传感器的连接、罐体的密闭良好,并校正;②选择检测程序中的 WBP Volume;③按顺序对于各个阶段时长进行设定。预设 10 min 适应时间,使小鼠活跃度降低,从而获得一个较为稳定的检测结果。④设定完毕后将小鼠置入体积描记腔体中施行检测。

1.6 肺组织病理学观察

小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥麻醉,予右心室取血后实施安乐死,打开胸腔分离肺组织。取部分肺

*【基金项目】河北省重点研发计划项目(18277786D);河北中医学科学院科技能力提升项目(KTY2019058)

【收稿日期】2022-05-12【修回日期】2022-09-28

△【通讯作者】Tel: (0311)89926229; E-mail: Lijr666@sina.com

叶浸入4%多聚甲醛中予以固定保存。梯度浓度乙醇渐进脱水后蜡液包埋制成蜡块。蜡块切片,切片行HE染色并评估其形态学和病理学改变,行Masson染色并在光镜下观察拍照,并对镜下图像行胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF)的测定。

1.7 小鼠血清ELISA检测

给药35 d后,全部组别小鼠禁食不禁水24 h,麻醉后,用注射器左心腔穿刺取血法取血,并实施安乐死。小鼠全血以3 000 r/min转速离心10 min分离上层血清,于冰箱-20℃保存待试剂盒检测。采用免疫酶联吸附法对小鼠血清中TGF-β1、HA、LN等水平进行检测。

1.8 Western blot法检测蛋白表达量

称取30 mg小鼠肺组织剪碎,加入裂解液、蛋白酶抑制剂后匀浆裂解。将组织匀浆离心,分离上清液。BCA法测得蛋白浓度,添加上样缓冲液后混匀加热变性。SDS凝胶恒压电泳,湿转法转膜于聚偏氟乙烯膜上。5%浓度脱脂奶粉溶液封闭2.5 h,洗2次,每次5 min。分别加入TGF-β1、P-Smad3、α-SMA、Collagen I、Collagen III的单克隆抗体1:1 000稀释液,4℃孵育过夜后清洗。加入与一抗种属对应的羊抗兔或者抗鼠IgG二抗,此二抗需由辣根过氧化物酶标记过。室温下孵育2 h后清洗。滴加ECL发光液后置于Fusion FX5 Spectra多功能成像系统中获得条带灰度图像。灰度图像用vision capt软件进行灰度值的量化。用目的蛋白条带灰度值与同膜内参Tublin蛋白条带灰度值之比作为蛋白的相对表达量。

1.9 统计学处理

实验所得数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。采用SPSS 23.0统计学软件对实验数据进行统计学分析。各组均值的比较性单因素方差分析后组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 补中益气汤对小鼠肺潮气量和气道狭窄指数的影响

与空白对照组比较,CIH模型组小鼠潮气量(TVB)显著降低,气道狭窄指数(enhanced pause, Penh)显著升高($P<0.01$)。与CIH模型组比较,CIH+补中益气汤高剂量组TVB显著升高,Penh显著降低($P<0.01$,表1)。

Tab. 1 Results of pulmonary function of mice in each group($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	TVB(ml)	Penh
Control	0.152±0.064	0.128±0.012
CIH	0.132±0.030**	0.288±0.012**
CIH+low-dose BZYQ	0.138±0.046	0.282±0.013
CIH+medium-dose BZYQ	0.139±0.050	0.250±0.013**
CIH+high-dose BZYQ	0.152±0.073**	0.222±0.012**

** $P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs CIH group

2.2 补中益气汤对小鼠肺组织形态学的影响

HE染色镜下可见,空白对照组小鼠肺泡饱满,肺泡壁厚度正常,肺泡上皮细胞形态正常,Masson染色可见肺间质无明显胶原沉积;与空白对照组比较,CIH模型组肺泡结构塌陷,肺泡上皮细胞变形坏死,肺间质可见大量胶原纤维增生、胶原沉积;与CIH模型组比较,补中益气汤低、中、高剂量组的肺组织结构破坏和肺泡上皮形态都有显著的改善,肺间质胶原蛋白沉积显著减少,胶原纤维增生显著改善(图1)。与空白对照组比较,CIH模型组肺组织的胶原容积分数明显增加($P<0.05$),与CIH模型组比较,CIH+补中益气汤低、中、高剂量组小鼠肺组织胶原容积分数明显减少($P<0.05$,表2)。

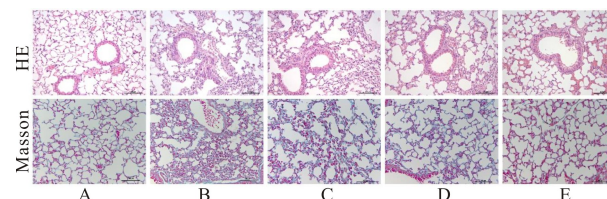


Fig. 1 HE and Masson light microscopy in five groups of mice (HE/Masson $\times 200$)

A: Normal control group; B: Model control group; C: Low-dose buzhongyiqi decoction group; D: Medium-dose buzhongyiqi decoction group; E: High-dose buzhongyiqi decoction group

2.3 补中益气汤对CIH小鼠血清质量浓度的影响

与空白对照组比较,CIH模型组小鼠血清中TGF-β1、LN质量浓度均明显上调($P<0.05$),HA含量明显降低($P<0.05$);与CIH模型组比较,CIH+补中益气汤中、高剂量组TGF-β1、LN质量浓度都有明显降低($P<0.05$),HA质量浓度显著升高($P<0.05$,表2)。提示中、高剂量的补中益气汤均能改善小鼠肺间质沉积情况。

2.4 补中益气汤对CIH小鼠TGF-β/Smads信号通路及其下游相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,CIH模型组的相关蛋白TGF-β1、P-Smad3、Collagen I、Collagen III、α-SMA的表达量显著增加($P<0.05$);与CIH模型组比较,

CIH+补中益气汤组低、中、高剂量组肺组织中的 TGF- β 1、P-Smad3、Collagen I、Collagen III、 α -SMA 等蛋白表达量显著减少($P<0.05$,表3,图3)。

Tab. 2 Comparison of CVF of rats and expressions of TGF- β 1, LN, HA in serum in each group($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	TGF- β 1 (ng/ml)	LN (ng/ml)	HA (ng/ml)	CVF (%)
Control	50.33 \pm 9.33	7.65 \pm 1.59	260.25 \pm 58.62	13.81 \pm 2.88
CIH	86.34 \pm 26.54*	11.98 \pm 2.86**	177.01 \pm 22.79*	18.42 \pm 1.12*
CIH+low-dose BZYQ	73.29 \pm 12.85	9.58 \pm 1.54	195.87 \pm 38.82	14.53 \pm 3.65#
CIH+medium-dose BZYQ	63.14 \pm 10.34	8.80 \pm 1.78#	247.79 \pm 36.71#	14.32 \pm 1.64#
CIH+high-dose BZYQ	55.72 \pm 6.71	8.25 \pm 0.87#	258.39 \pm 59.91#	13.91 \pm 2.08#

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs CIH group

Tab. 3 Comparison of the protein expressions of TGF- β 1, α -SMA, Collagen I, p-Smad3 and Collagen III ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	TGF- β 1	Collagen I	Collagen III	P-smad3	α -SMA
Control	1.002 \pm 0.110	0.58 \pm 0.10	1.00 \pm 0.01	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.05
CIH	1.412 \pm 0.130*	1.42 \pm 0.05*	2.24 \pm 0.19*	1.61 \pm 0.09*	1.24 \pm 0.05*
CIH+low-dose BZYQ	0.960 \pm 0.090#	0.83 \pm 0.05#	1.46 \pm 0.27	1.46 \pm 0.11	1.01 \pm 0.10#
CIH+medium-dose BZYQ	0.858 \pm 0.130#	0.67 \pm 0.09#	1.27 \pm 0.06#	1.10 \pm 0.17#	0.92 \pm 0.04#
CIH+high-dose BZYQ	0.766 \pm 0.150#	0.56 \pm 0.03#	1.16 \pm 0.35#	0.86 \pm 0.06 Δ	0.57 \pm 0.08#

* $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs CIH group; $\Delta P<0.05$ vs low -dose group

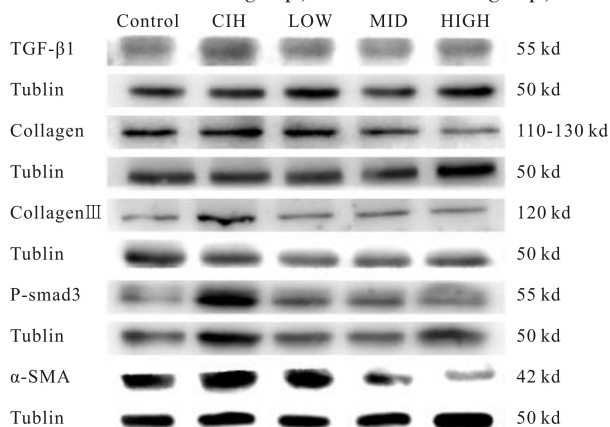


Fig. 3 The protein expressions of TGF- β 1, α -SMA, Collagen I, p-Smad3 and Collagen III in lung tissues of mice
 α -SMA: Alpha-smooth muscle actin; TGF- β 1: Transforming growth factor- β 1; Collagen I: Type I Collagen; Collagen III: Type III Collagen; P-smad3: Phospho-Smad3

3 讨论

补中益气汤临床多用于治疗各类脏器萎垂,对慢性肠胃炎,重症肌无力等,均有显著疗效^[7]。其对于饮食减少,体倦肢软,少气懒言,面色萎黄,大便稀溏,舌淡,脉虚等临床症候也有显著疗效,此临床症候与肺萎之表现吻合。鼯证后期专家共识推荐方也为补中益气汤^[8]。补中益气汤中组分如甘草、黄芪糖蛋白、人参总皂苷等可通过 PGE2, COX-2/p53, TGF- β 等信号通路调控肺间质纤维化进程^[9-11]。陈皮生物碱可抑制肺成纤维细胞衰老而起到抗 PF 的作用^[4]。

美国 PF 诊疗指南将 OSAHS 纳入相关并发症。

PF 患者中 OSAHS 的共患率高达 62% ~ 82%。PF 可使肺泡结构塌陷,肺间质厚度增加,累及肺泡间微血管^[12]。作为 IPF 相关合并症,OSAHS 能引起慢性间歇性低氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH), 而 CIH 作为其导致肺损伤的重要病理因素,可在引起肺部炎症的同时导致肺间质中纤维组织增生胶原沉积^[13]。严重时会出现轻度间质纤维化。本实验中小鼠 CIH 处理 35 d 后,与空白对照组比较,HE 染色可见 CIH 模型组肺泡结构塌陷,肺泡上皮细胞变形坏死,Masson 染色可见肺间质中大量胶原纤维增生、胶原沉积,蛋白质免疫印迹实验也同样发现肺组织中 Collagen I、Collagen III 和成纤维细胞向肌成纤维细胞转化标志的 α -SMA 的表达明显上调^[14],这说明 CIH 处理后小鼠确实存在着病理性肌成纤维细胞的大量增殖和肺间质中胶原的过度沉积。在给予 CIH 小鼠补中益气汤后,小鼠肺泡的塌陷和肺间隔增厚等肺组织结构的异常都得到明显的减轻,纤维蛋白沉积显著减少 Collagen I、Collagen III 和 α -SMA 的表达也明显降低。这说明补中益气汤能够减轻 CIH 诱发的肌成纤维细胞的增殖和小鼠肺间质中胶原的沉积与肺泡结构破坏。

TGF- β 1 通过促成纤维细胞增殖分化和细胞外基质生成并抑制细胞外基质的降解来产生致纤维化作用。在 TGF- β /smads 通路中, smad3 及其活化后产物 P-smad3 作为下游的受体调节蛋白,能够调节胶原等基因的表达,加速细胞外基质中胶原的沉积速度。随着 Collagen I、Collagen III 的表达增加,并不断沉积于肺间质中,肺组织正常生理结构进而丢

失,最后发展成为 PF^[15]。在本实验中,CIH 模型组血清中 TGF- β 1 的质量浓度明显高于空白对照组,给予补中益气汤干预后,血清 TGF- β 1 质量浓度明显降低。CIH 模型组小鼠肺组织中 TGF- β 1、P-Smad3 蛋白及下游的 α -SMA、Collagen I、Collagen III 表达明显上调。表明 TGF- β / Smads 信号通路在 CIH 条件下被过度激活,并且可见 CIH 小鼠的肺组织中大量的成纤维细胞已被转化为肌成纤维细胞,且小鼠肺间质中已沉积大量胶原纤维。而补中益气汤干预后,TGF- β / Smads 及下游的 Collagen I、Collagen III 和 α -SMA 蛋白表达量明显低于 CIH 模型组,提示补中益气汤通过抑制 TGF- β / Smads 信号通路改善 CIH 小鼠的肺损伤,潮气量和气道狭窄指数的变化也进而证明其能改善 CIH 对小鼠肺功能的损害。

HA 作为一种酸性粘多糖在肺间质中大量富集时,能够在炎症细胞与肺成纤维细胞的前期过量增殖过程中为其不断供给基质,从而促进纤维组织生成^[16, 17]。LN 为基膜中的非胶原糖蛋白,能提高成纤维细胞与上皮细胞的胶原合成能力。因而,可以说 HA 和 LN 是两种具有代表性的血清纤维化指标^[18]。本实验中,CIH 模型组血清中 LN 的质量浓度升高明显高于空白对照组,说明 CIH 可使小鼠的肺间质中胶原沉积程度明显加重;而补中益气汤干预后,血清中 LN 质量浓度明显降低。CIH 模型组的血清 HA 含量相较于空白对照组降低,可能与 CIH 的促成纤维细胞分化增殖^[19]作用诱发纤维细胞增殖而消耗大量血清中的 HA 有关,而补中益气汤可通过调节纤维化上游通路抑制成纤维细胞的过度增殖,所以后期经药物干预后成纤维细胞增加被抑制,其对 HA 的消耗减少,HA 的血清质量浓度因而有所恢复。

综上所述,激活 TGF- β /Smads 通路,上调肺组织中 TGF- β 1、 α -SMA、P-smad3、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达可致肺组织间质胶原沉积。补中益气汤可通过对 TGF- β / Smads 信号通路的负调控,下调肺组织中 TGF- β 1、 α -SMA、Collagen I、Collagen III 的蛋白表达,从而改善 CIH 条件下出现的肺组织细胞间质沉积和早期的肺泡炎症与肺泡结构紊乱的情况,延缓 CIH 条件下小鼠 PF 的进展。以往研究多侧重于某一单体药物的抗纤效果,如白介素 11 拮抗剂或辣椒素的抗小鼠肺纤维化的作用^[20,21]。本文以补中益气汤全方作为干预纤维化进程药物,符合祖国医学以方为重,协同作用的原则。本研究结果表明补中益气汤方剂对于 CIH 或其他低氧因素诱

发的 PF 进程有延缓作用,为补中益气汤用于临床抗肺纤维化药物的开发研究提供实验依据。

【参考文献】

- [1] 纪赏, 陆学超. 阻塞性睡眠呼吸暂停综合征合并慢性阻塞性肺疾病的中西医研究进展[J]. 中文科技期刊数据库(引文版)医药卫生, 2019, 9(3): 293.
- [2] Weng D, Chen JX, Li HH, et al. 2-aminopurine suppresses the Tgf- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition and attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 4(1): 17-27.
- [3] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Pathogenesis and management[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32-50.
- [4] 吕凌, 庞立健, 于漫, 等. 基于中医象思维的补中益气汤防治特发性肺纤维化研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 252-255.
- [5] 刘丽婷, 李杰, 吴童, 等. 从“治未病·既病防变——培土生金法”论《金匱要略·肺痿》篇中组方思路[J]. 天津中医药, 2019, 36(6): 572-574.
- [6] 杨胜昌, 郭亚净, 于富洋, 等. 内皮素受体拮抗剂波生坦通过降低肾交感神经活性改善间歇性低氧大鼠的高血压[J]. 生理学报, 2018, 70(4): 354-360.
- [7] 孟媛. 补中益气汤的临床应用进展[J]. 江西中医药, 2021, 52(11): 74-76.
- [8] 陈志斌, 兰岚. 鼾症中医诊疗专家共识意见[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(1): 1-5.
- [9] 管淑红, 王智刚, 朱煜明, 等. 柴胡皂甙 D 对肺纤维化小鼠上皮-间质转化的干预作用及机制研究[J]. 重庆医学, 2018, 47(22): 2913-2916.
- [10] 栾智华, 柴智, 任晋宏, 等. 黄芪糖蛋白对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的干预作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(6): 1411-1413.
- [11] 罗文, 王涛, 熊国江, 等. 补中益气汤加减对非小细胞肺癌术后化疗患者 VEGF, IGF-1, TGF- β 1, 免疫功能的影响及安全性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(16): 90-95.
- [12] Varone F, Sgalla G, Iovene B, et al. Nintedanib for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(1/6): 167-175.
- [13] 张旭, 魏华华, 谢敏, 等. 灯盏花素对低氧诱导的大鼠肺泡炎症及细胞外基质沉积的作用[J]. 西部医学, 2018, 30(8): 1099-1106.
- [14] Kato S, Inui N, Hakamata A, et al. Changes in pulmonary endothelial cell properties during bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 127-139.
- [15] Jenkins RG, Simpson JK, Saini G, et al. Longitudinal change in collagen degradation biomarkers in idiopathic

- pulmonary fibrosis: an analysis from the prospective, multicentre profile study[J]. *Lancet Resp Med*, 2015, 3(6): 462-471.
- [16] 肖青雯, 陆金健, 陈修平. 靶向上皮间质转化: 中药抗肿瘤转移和器官纤维化新策略[J]. *医药导报*, 2018, 37(4): 401-409.
- [17] 苏 韞, 张 毅, 李 娟, 等. 红芪有效部位对肺间质纤维化模型大鼠肺组织胶原面积、透明质酸及层粘连蛋白的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(4): 72-76.
- [18] Morales-Nebreda LI, Rogel MR, Eisenberg JL, et al. Lung-specific loss of $\alpha 3$ laminin worsens bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Resp Cell Mol Biol*, 2015, 52(4): 503-512.
- [19] Weng TT, Poth JM, Karmouty-Quintana H, et al. Hypoxia-induced deoxycytidine kinase contributes to epithelial proliferation in pulmonary fibrosis[J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2014, 190(12): 1402-1412.
- [20] 吴礼循, 吴 翔. 白介素 11 拮抗剂对实验性小鼠肺纤维化的作用[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 308-312.
- [21] 卢林明, 俞婷婷, 何晓伟, 等. 小剂量辣椒素抗小鼠肺纤维化的作用及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(3): 216-222.

低氧训练对骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路基因表达的影响*

李 洁¹△, 赵丽丽²

(1. 西北师范大学体育学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 陇南师范高等专科学校体育与健康学院, 甘肃 陇南 742500)

【摘要】 目的: 探讨低氧训练对大鼠骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路基因表达的影响, 以及对线粒体有氧氧化供能能力的影响。方法: 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组 ($n=10$), 低住低练组 (LoLo)、高住高练组 (HiHi) 和高住高练低训组 (HiHiLo)。以当地海拔 1 500 m 为常氧环境, 模拟海拔 3 500 m 为低氧环境, 各组大鼠按训练方案训练 5 周后, 取股四头肌行匀浆及提取线粒体。Real-time PCR 检测 p53、细胞色素 c 氧化酶合成 2 (SCO2)、细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COX I) 和谷氨酰胺酶 2 (GLS2) mRNA 表达, Western blot 检测 p53、SCO2、COX I 和 GLS2 蛋白表达; ELISA 测定 α -酮戊二酸脱氢酶 (α -KGDHC)、细胞色素 c 氧化酶 (COX) 及 ATP 合酶 (ATP synthase) 活性。结果: ①与 LoLo 组比较, HiHi 和 HiHiLo 组 p53 mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$), HiHiLo 组 p53 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.01$); HiHi 和 HiHiLo 组 SCO2 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.01$); HiHiLo 组 COX I mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$), HiHi 组显著降低 ($P<0.01$), HiHi 组 COX I 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); HiHi 和 HiHiLo 组 GLS2 mRNA 水平均显著升高 ($P<0.05, P<0.01$), HiHiLo 组 GLS2 蛋白表达水平显著下降 ($P<0.01$)。②与 LoLo 组比较, HiHi 组 α -KGDHC 和 COX 活性均显著降低 ($P<0.01, P<0.05$), HiHiLo 组均显著升高 ($P<0.01$); HiHi 和 HiHiLo 组 ATP synthase 总活性和特异性活性均显著升高 ($P<0.01$)。结论: 高住高练低训上调大鼠骨骼肌 p53 及其调控的线粒体有氧代谢信号通路相关因子基因转录水平, 提高骨骼肌线粒体有氧氧化供能能力。

【关键词】 p53; 细胞色素 c 氧化酶合成 2; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I; 谷氨酰胺酶 2; α -酮戊二酸脱氢酶; 细胞色素 c 氧化酶; ATP 合酶

【KEY WORDS】 p53; synthesis of cytochrome c oxidase 2; cytochrome c oxidase subunit I; glutaminase 2; α -Ketoglutaric dehydrogenase; cytochrome c oxidase; ATP synthase

【中图分类号】 C804.7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-180-005

【DOI】 10.12047/j.cjap.6314.2022.105

众所周知, p53 是 20 世纪 80 年代发现的又一抑癌基因, 位于人 17 号染色体短臂上约 16 ~ 20 KB 的基因组 DNA 中^[1], 编码产生 53 KD 蛋白, 具有与双链或单链 DNA 结合调节基因转录的能力^[2]。近年来的研究发现, p53 还是一种调节能量代谢信号通路的转录因子, 具有降低糖酵解和增强细胞线粒体呼吸的作用。其调控能量代谢主要通过诱导 TI-GAR (Tp53-induced glycolysis and apoptosis regulator) 以及抑制磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase, PGM) 降低糖

酵解, 诱导细胞色素 c 氧化酶合成 2 (synthesis of cytochrome c oxidase 2, SCO2) 和谷氨酰胺酶 2 (glutaminase 2, GLS2) 增强线粒体的有氧呼吸; p53 缺失会导致机体耗氧量下降或促使细胞有氧呼吸转向糖酵解, 不利于提高机体有氧耐力水平^[3,4]。p53 与运动训练相关的研究表明, p53 对运动训练的反应具有肌纤维类型的特异性和运动强度的敏感性^[5], p53-SCO2-COX II-有氧呼吸轴对耐力训练和大强度间歇训练均可产生良好的适应^[6]。低氧训练是近年来用于提高机体有氧耐力和运动成绩的新型辅助训练方法, 目前有关低氧训练对 p53 及其调控的线粒体有氧代谢通路相关因子的影响鲜有报道。鉴于此, 本研究拟通过观测低氧训练下大鼠骨骼肌 p53 及其调控线粒体有氧代谢通路相关因子——SCO2、COX

*【基金项目】国家自然科学基金资助项目(31760295)

【收稿日期】2022-05-17【修回日期】2022-09-16

△【通讯作者】Tel: 13919079404; E-mail: lijie2005ty@126.com