金水缓纤方联合针刺对肺纤维化大鼠上皮间质转化及 TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 通路的影响*

王晨[1]，燕苗苗[2]，邱志广[1]，廖一羲[1]，王搏[1]，田燕歌[1]

1. 河南中医药大学/呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心/河南省中医药防治呼吸病重点实验室，河南 郑州 450046；2. 河南中医药大学第一附属医院，河南 郑州 450000

摘要：目的：探讨金水缓纤方联合针刺调控上皮间质转化（epithelial－mesenchymal transition，EMT）及转化生长因子－β1（transforming growth factor－β1，TGF－β1）/$Smad_{2/3}$ 通路治疗大鼠肺纤维化（pulmonary fibrosis，PF）的作用机制。方法：将 56 只 SD 大鼠随机分为空白组（C 组）、模型组（M 组）、假针组（P 组）、针刺组（A 组）、金水缓纤方组（J 组，7.83 g·kg^{-1}）、联合组（AJ 组）及吡非尼酮组（B 组，100 mg·kg^{-1}），每组 8 只。除 C 组外，其余大鼠采用气管滴注博来霉素的方法制备 PF 模型。干预 29 d 后，检测大鼠肺功能指标，包括深吸气量（inspiratory capacity，IC）、用力肺活量（forced vital capacity，FVC）、功能残气量（functional residual capacity，FRC）及动态肺顺应性（dynamic lung compliance，Cdyn）。采用 HE 染色和 Masson 染色检测大鼠肺脏病理形态，并作肺泡炎评分和 PF 评分。采用免疫组化法检测大鼠肺脏 α－平滑肌肌动蛋白（α－smooth muscle actin，α－SMA）蛋白表达水平；RT－qPCR 法检测肺脏 E－cad、神经钙黏蛋白（N－cadherin，N－cad）、*Vim* mRNA 表达水平；Western blot 法检测肺脏 N－cad、p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平。结果：与 C 组比较，M 组大鼠 IC、FVC、Cdyn、FRC 水平降低（$P<0.01$）。与 M 组比较，4 个干预组大鼠 IC、FVC（A 组除外）、Cdyn 及 FRC（J 组除外）水平升高（$P<0.05$）。与 A 组比较，AJ 组大鼠 IC、FVC、Cdyn 及 FRC 水平升高。与 C 组比较，M 组大鼠的肺泡炎评分和 PF 评分升高（$P<0.01$）。与 M 组比较，4 个干预组大鼠的肺泡炎评分（A 组除外）和 PF 评分降低（$P<0.05$）。与 B 组、J 组、A 组比较，AJ 组大鼠的 PF 评分降低（$P<0.01$）。与 C 组比较，M 组大鼠肺脏 α－SMA 蛋白表达水平和 HYP 含量升高（$P<0.01$）。与 M 组和 P 组比较，4 个干预组大鼠肺脏 α－SMA 蛋白表达水平和 HYP 含量降低（$P<0.01$）。与 B 组、J 组、A 组比较，AJ 组大鼠肺脏 α－SMA 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与 C 组比较，M 组大鼠肺脏 *E－cad* mRNA 水平降低，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平升高（$P<0.01$）。与 M 组比较，4 个干预组大鼠肺脏 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与 B 组、J 组、A 组比较，AJ 组大鼠肺脏 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与 C 组比较，M 组大鼠肺脏 p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与 M 组比较，4 个干预组大鼠肺脏 p－Smad2（A 组除外）、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。结论：金水缓纤方联合针刺能够改善肺纤维化大鼠肺功能，调控 EMT，其机制可能与抑制 TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 通路有关。

关键词：金水缓纤方；针刺；肺纤维化；上皮间质转化；TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 通路；TGF－β1；Smad2；Smad3；大鼠
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.08.257
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)08－1597－09

Effect of Jinshui Huanxian Formula with Acupuncture on Epithelial－Mesenchymal Transition and TGF－β1/$Smad_{2/3}$ Pathway of Pulmonary Fibrosis Rats

WANG Chen[1]，YAN Miaomiao[2]，QIU Zhiguang[1]，LIAO Yixi[1]，WANG Bo[1]，TIAN Yange[1]

*基金项目：2024 年度国家科技创新 2030 重大专项项目（2024ZD0522905）；河南省科技研发计划联合基金项目（232301420020）

1. Henan University of Chinese Medicine/Collaborative Innovation Center for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases/Henan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for the Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou Henan China 450046; 2. The First Affiliated Hospital to Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450000

Abstract: Objective: To investigate the mechanism of Jinshui Huanxian Formula combined with acupuncture in the treatment of pulmonary fibrosis (PF) in rats with epithelial - mesenchymal transition (EMT) and transforming growth factor - β1 (TGF - β1)/$Smad_{2/3}$ pathway. Methods: A total of 56 SD rats were randomly enrolled in blank group (group C), model group (group M), sham acupuncture group (group P), acupuncture group (group A), Jinshui Huanxian Formula group (J group, 7.83 g · kg^{-1}), combined group (AJ group) and pirfenidone group (group B, 100 mg · kg^{-1}), with 8 rats in each group. Except for group C, the other rats were prepared by tracheal instillation of bleomycin. After 29 days of intervention, the lung function indexes of rats were measured, including inspiratory capacity (IC), forced vital capacity (FVC), functional residual capacity (FRC) and dynamic lung compliance (Cydn). HE staining and Masson staining were used to detect the pathological morphology of rat lung, and alveolitis score and PF score were obtained. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression level of α α - smooth muscle actin (α - SMA) in rat lungs. The mRNA expression levels of E - cad, N - cadherin (N - cad) and Vim in lung were detected by RT - qPCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of N - cad, p - Smad2, p - Smad3 and TGF - β1 in lungs. Results: Compared with group C, the levels of IC, FVC, Cdyn and FRC in group M decreased ($P<0.01$). Compared with group M, the levels of IC, FVC (except group A), Cdyn and FRC (except group J) in the four intervention groups were increased ($P<0.05$). Compared with group A, the levels of IC, FVC, Cdyn and FRC in AJ group were increased. Compared with group C, the alveolitis score and PF score of group M were increased ($P<0.01$). Compared with group M, the alveolitis score (except group A) and PF score of the four intervention groups were reduced ($P<0.05$). Compared with group B, group J and group A, the PF score of the rats in the AJ group was decreased ($P<0.01$). Compared with group C, the expression level of α - SMA protein and the content of HYP in the lungs of group M were increased ($P<0.01$). Compared with the M group and the P group, the expression level of α - SMA protein and the content of HYP in the lungs of the four intervention groups decreased ($P<0.01$). Compared with group B, group J and group A, the expression level of α - SMA protein in the lungs of rats in AJ group decreased ($P<0.01$). Compared with group C, the levels of *E - cad* mRNA in the lungs of group M decreased, and the levels of *N - cad* mRNA and *Vim* mRNA increased ($P<0.01$). Compared with group M, the levels of *E - cad* mRNA in the lungs of the four intervention groups increased, and the levels of *N - cad* mRNA and *Vim* mRNA decreased ($P<0.01$). Compared with group B, group J and group A, the levels of *E - cad* mRNA in AJ group increased, and the levels of *N - cad* mRNA and *Vim* mRNA decreased ($P<0.01$). Compared with group C, the protein expression levels of p - Smad2, p - Smad3 and TGF - β1 in the lungs of group M were increased ($P<0.01$). Compared with group M, the protein expression levels of p - Smad2 (except group A), p - Smad3 and TGF - β1 in the lungs of the four intervention groups were decreased ($P<0.01$). Conclusion: Jinshui Huanxian Formula combined with acupuncture can improve lung function and regulate EMT in rats with pulmonary fibrosis, and the mechanism may be related to the inhibition of TGF - β1/$Smad_{2/3}$ pathway.

Key words: Jinshui Huanxian Formula; acupuncture; pulmonary fibrosis; epithelial - mesenchymal transition; TGF - β1/$Smad_{2/3}$ pathway; TGF - β1; Smad2; Smad3; rat

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因未明、进行性加重的肺间质疾病,其特征是肺泡上皮细胞损伤、肺实质破坏以及细胞外基质过度沉积[1]。该病急性加重期病死率超过50%,且确诊后中位生存时间较短[1]。IPF 严重影响患者的生活质量,造成沉重的社会负担[2]。目前,IPF 的常用药物尼达尼布和吡啡尼酮虽能缓解临床症状,延缓疾病进展,但其远期疗效不明,且存在一些不良反应[3]。因此,积极探索有效的 IPF 防治策略至关重要。

研究表明,上皮间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)与肺纤维化的发生发展密切相关[4],转化生长因子 - β1(transforming growth factor - β1, TGF - β1)/Smad 信号通路是调控 EMT 过程的重要途径之一[5]。TGF - β1 与受体结合形成四聚体复合物,进而促使 Smad2 和 Smad3 磷酸化并转移至细胞核,调控细胞外基质的表达,从而加速肺纤维化的进展[6-7]。

中医药及中医康复治疗 IPF 的疗效显著[8]。李建生教授基于多年临床经验拟定的金水缓纤方(专利号:ZL. 201610877761. 4)能有效改善 IPF 患者的肺功能和运动耐量[9]。前期研究显示,该方剂可有

效改善博来霉素诱导的肺纤维化大鼠肺功能、减轻肺组织病理损伤，并减少肺组织胶原沉积[10-11]。作为肺康复治疗的核心方法之一，针刺具有成本低廉、不良反应少等优点，可减轻炎症反应，改善患者肺功能，提高生活质量[12]。前期临床观察发现，金水缓纤方联合特定穴位针刺可减轻患者临床症状，但作用机制尚需阐明。因此，本研究以肺纤维化大鼠为研究对象，探讨金水缓纤方联合针刺干预 EMT 及 TGF－β1/$Smad_{2/3}$通路治疗 IPF 的机制，为临床应用提供基础依据。

1　材料

1.1　实验动物　SPF 级雄性 SD 大鼠 56 只，8 周龄，体质量（200 ± 20）g，购于斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SCXK（京）2019－0010，动物合格证号：110324220102348616。本研究通过河南中医药大学实验动物伦理审查委员会批准，批准号：DWLL202203014。

1.2　药物与试剂　吡非尼酮胶囊（北京康蒂尼药业有限公司，规格：100 mg × 54 粒）；硫酸博来霉素（日本株式会社公司，货号：H20171103，规格：15 mg）；羟脯氨酸（hydroxyproline，HYP）测定试剂盒（南京建成科技有限公司，货号：A030－2－1）；α－平滑肌肌动蛋白（α－smooth muscle actin，α－SMA）抗体（Cell Signaling Technology 公司，货号：19245T）；p－Smad2 抗体、p－Smad3 抗体（Affinity 生物公司，货号：AF3449、AF3362）；苏木素染液、伊红染色液、Masson 染色液（北京索莱宝科技有限公司，货号：G1120、G1110、G1340）；BCA 蛋白定量试剂盒（上海雅酶生物科技有限公司，货号：ZJ101）；GAPDH 抗体、神经钙黏蛋白（N－cadherin，N－cad）抗体、TGF－β1 抗体（Proteintech 公司，货号：10494－1－AP、22018－1－AP、21898－1－AP）。

1.3　仪器　针灸针（苏州针灸用品有限公司；规格：0.3 mm × 13.0 mm）；动物肺功能检测系统（美国 BUXCO 公司）；Olympus DP70 型显微镜及显微照相系统（日本奥林巴斯株式会社）；ChemiDoc MP 型全能型成像系统、Trans－Blot Turbo System 蛋白转印系统、通用电泳仪（美国 Bio－Rad 公司）；QuantStudio 6Flex 实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；Multiskan MK3 酶标仪（美国 ThermoFisher Scientific 公司）。

2　方法

2.1　药物制备　金水缓纤方：取人参、熟地黄、炙淫羊藿、浙贝母等中药材，加入 12 倍体积双蒸水浸泡 30 min。武火加热至沸腾后，转文火继续煎煮 30 min，经双层纱布过滤取水煎液。药渣加入 12 倍体积双蒸水，武火煮沸后转文火煎煮 30 min，过滤收集水煎液。合并 2 次滤液，经减压浓缩、干燥处理后，粉碎成细粉，每克干粉含生药 2.51 g。使用前充分溶于纯水，配制成混悬液备用。

2.2　肺纤维化大鼠模型制备　采用一次性气管滴注博来霉素的方法制备大鼠肺纤维化模型[13]。具体方法如下：使用 1% 戊巴比妥钠溶液（50 mg · kg^{-1}）麻醉大鼠，经气管插管后滴注博来霉素（3 mg · kg^{-1}，3 g · L^{-1}），直立旋转大鼠使药物于肺内均匀分布。空白组大鼠在气管内滴注等剂量生理盐水，方法同此。

2.3　分组及干预方式　将 56 只大鼠采用随机数字表法分为空白组、模型组、非经非穴针刺组（简称假针组）、针刺组、金水缓纤方组、金水缓纤方联合针刺组（简称联合组）及吡非尼酮组，每组 8 只。除空白组外，其余大鼠按照上述方法进行造模。第 14 天起，金水缓纤方组大鼠给予金水缓纤方（7.83 g · kg^{-1}）灌胃；针刺组大鼠给予电针治疗：选取大椎、膏肓、肺俞、肾俞、足三里进行针刺，直刺 5 mm，每周 3 次，每次 20 min，频率 1 Hz，电流 1 mA，穴位定位参考《实验针灸学》[14]；假针组大鼠在上述穴位旁开 5 mm 浅刺，不给予电流刺激；联合组大鼠给予金水缓纤方联合针刺干预；吡非尼酮组大鼠给予吡非尼酮（100 mg · kg^{-1}）灌胃，第 42 天取材。其中，药物剂量采用等效剂量系数换算公式计算，D：剂量，HI：体型系数，W：体质量。

$$D_{大鼠} = D_{人} \times (HI_{大鼠}/HI_{人}) \times (W_{大鼠}/W_{人})^{2/3}$$

2.4　肺功能指标检测　在整个造模和干预过程中，模型组、假针组、针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠分别死亡 2 只、2 只、2 只、2 只、1 只、2 只。剩余大鼠经腹腔注射麻醉后行气管插管，采用动物肺功能检测系统测定大鼠肺功能指标，包括深吸气量（inspiratory capacity，IC）、用力肺活量（forced vital capacity，FVC）、功能残气量（functional residual capacity，FRC）及动态肺顺应性（dynamic lung compliance，Cdyn）。

2.5　肺组织病理形态检测　取各组大鼠完整左肺组织，在近肺门处切取 3 mm 厚的组织薄块，脱水后石蜡固定、切片，分别进行苏木素－伊红（hematoxylin－eosin，HE）染色和 Masson 染色。每只大鼠随机选取 6 张切片，每张切片选取 6 个视野，在光学显微镜下观察大鼠肺间质纤维化和胶原沉积情况。采用

Szapiel 法对肺泡炎进行病理评分[15]，Ashcroft 法对肺纤维化进行病理评分[16]。

2.6　肺组织 HYP 含量检测　每组取 6 只大鼠肺组织(20 mg)研磨，按照 HYP 测定试剂盒说明书的步骤进行操作。采用酶标仪检测 560 nm 波长处的光密度值，并计算肺组织中 HYP 含量。

2.7　免疫组化法检测肺组织 α－SMA 蛋白表达水平　取大鼠肺组织石蜡包埋切片，常规脱蜡至水，采用枸橼酸修复液热修复抗原后，用过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性。切片滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液，室温封闭 30 min。滴加 α－SMA 抗体(1∶1 000)，4 ℃孵育过夜。随后滴加 HRP 标记山羊抗兔二抗，室温孵育 20 min，PBS 浸洗后晾干。滴加 DAB 显色液显色，苏木素复染细胞核，脱水透明后中性树胶封片，最后在显微镜下观察。采用 IPP 6.0 软件分析积分光密度值(integrated optical density，IOD)，代表 α－SMA 蛋白表达水平。

2.8　RT－qPCR 法检测肺组织 *E－cad*、*N－cad*、*Vim* mRNA 表达水平　取大鼠肺组织，按试剂盒方法提取总 RNA，定量检测 RNA 纯度。将提取的 RNA 逆转录为 cDNA，反应条件：50 ℃ 15 min，85 ℃ 10 s，4 ℃。按照试剂盒反应体系进行 PCR 扩增，反应条件：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火 30 s，扩增 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因的相对表达量，引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	正向引物(5′－3′)	反向引物(5′－3′)	长度/bp
GAPDH	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	252
E－cadherin	CCACCAGATGACGATACCCG	GAATCACTTCCGGTCTGGCA	124
N－cadherin	GTATCCAGTCCGATCCGCAG	AAGGGAGTCATATGGTGGGG	109
Vimentin	ATGTCCACCAGGTCCGTGTC	GGTCACATAGCTCCGGTTGGA	96

2.9　Western blot 法检测肺组织 N－cad 和 TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 通路相关蛋白表达水平　取大鼠肺组织(20 mg)制备蛋白样本，采用 BCA 法测量蛋白浓度。经 SDS－PAGE 电泳、转膜、封闭后，加入一抗[N－cad(1∶1 000)、TGF－β1(1∶1 000)、p－Smad2(1∶500)、p－Smad3(1∶1 000)、GAPDH(1∶10 000)]孵育。加入山羊抗兔 IgG 抗体(1∶5 000)，室温孵育 1 h，TBST 洗膜 3 次。蛋白条带使用凝胶成像分析仪显影，并采用 Image J 软件分析灰度值。

2.10　统计学方法　采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。若数据服从正态分布和方差齐性，多组间比较采用单因素方差分析，组间比较采用 *Student－Newman－Keuls* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数秩和检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　金水缓纤方联合针刺对大鼠肺功能的影响　与空白组比较，模型组大鼠 IC、FVC、Cdyn、FRC 水平降低($P<0.01$)。与模型组比较，针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠 IC、FVC(针刺组除外)、Cdyn 及 FRC(金水缓纤方组除外)水平升高($P<0.05$)。与吡非尼酮组比较，针刺组大鼠 IC 水平降低，联合组大鼠 FVC 水平降低、FRC 水平升高($P<0.05$)。与金水缓纤方组比较，联合组大鼠 IC、FRC 水平升高($P<0.05$)。与针刺组比较，联合组大鼠 IC、FVC、Cdyn 及 FRC 水平升高，吡非尼酮组大鼠 IC 水平升高($P<0.05$)。与假针组比较，4 个干预组大鼠 IC、FVC、Cdyn 及 FRC 水平升高($P<0.05$)。见表 2。

表 2　各组大鼠 IC、FVC、Cdyn、FRC 水平比较　($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IC(V/mL)	FVC(V/mL)	Cdyn/L·cm H_2O^{-1}	FRC(V/mL)
空白组	8	15.24 ± 0.92	14.27 ± 1.10	0.39 ± 0.07	5.65 ± 0.87
模型组	6	5.79 ± 0.92^{aa}	6.83 ± 1.43^{aa}	0.14 ± 0.05^{aa}	2.96 ± 0.58^{aa}
假针组	6	5.52 ± 0.82	7.21 ± 0.54	0.14 ± 0.04	2.91 ± 0.69
针刺组	6	10.33 ± 1.41^{bbceff}	9.04 ± 0.38^{ff}	0.26 ± 0.05^{bbff}	3.76 ± 0.37^{bf}
金水缓纤方组	6	11.17 ± 1.58^{bbff}	10.23 ± 1.04^{bff}	0.30 ± 0.03^{bbff}	3.71 ± 0.79^{f}
联合组	7	12.59 ± 1.21^{bbdeeff}	10.32 ± 0.98^{bbceff}	0.36 ± 0.09^{bbeeff}	4.70 ± 0.58^{bbcdeff}
吡非尼酮组	6	12.35 ± 1.00^{bbeeff}	12.30 ± 0.87^{bff}	0.33 ± 0.04^{bbff}	3.76 ± 0.47^{bf}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，b$P<0.05$，bb$P<0.01$；与吡非尼酮组比较，c$P<0.05$，cc$P<0.01$；与金水缓纤方组比较，d$P<0.05$，dd$P<0.01$；与针刺组比较，e$P<0.05$，ee$P<0.01$；与假针组比较，f$P<0.05$，ff$P<0.01$。

3.2　金水缓纤方联合针刺对大鼠肺组织病理形态的影响　空白组大鼠肺组织未见炎症细胞浸润及纤维化病灶。模型组大鼠肺组织结构紊乱，肺泡壁增厚，纤维条索增加，胶原沉积明显。与模型组比较，针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠肺组织炎症细胞浸润减轻，纤维化病灶缩小，肺泡结构有所恢复，见图 1。

病理评分显示，与空白组比较，模型组大鼠的肺泡炎评分和肺纤维化评分升高（$P<0.01$）。与模型组比较，针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠的肺泡炎评分（针刺组除外）和肺纤维化评分降低（$P<0.05$）。与吡非尼酮组、金水缓纤方组、针刺组比较，联合组大鼠的肺纤维化评分降低（$P<0.01$）。与假针组比较，4 个干预组大鼠的肺纤维化评分降低（$P<0.01$），联合组大鼠的肺泡炎评分降低（$P<0.05$）。见表 3。

表 3　各组大鼠肺泡炎和肺纤维化评分比较　（$\bar{x}\pm s$，分）

组别	n	肺泡炎评分	肺纤维化评分
空白组	8	0.13 ± 0.35	0.25 ± 0.46
模型组	6	2.33 ± 0.52^{aa}	6.33 ± 1.37^{aa}
假针组	6	2.17 ± 0.75	5.83 ± 1.17
针刺组	6	1.33 ± 0.52	4.00 ± 0.89^{bbff}
金水缓纤方组	6	1.17 ± 0.41^{b}	3.83 ± 0.75^{bbff}
联合组	7	0.43 ± 0.53^{bbf}	1.14 ± 0.90^{bbccddeeff}
吡非尼酮组	6	1.00 ± 0.00^{b}	3.00 ± 0.89^{bbff}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，b$P<0.05$，bb$P<0.01$；与吡非尼酮组比较，c$P<0.05$，cc$P<0.01$；与金水缓纤方组比较，d$P<0.05$，dd$P<0.01$；与针刺组比较，e$P<0.05$，ee$P<0.01$；与假针组比较，f$P<0.05$，ff$P<0.01$。

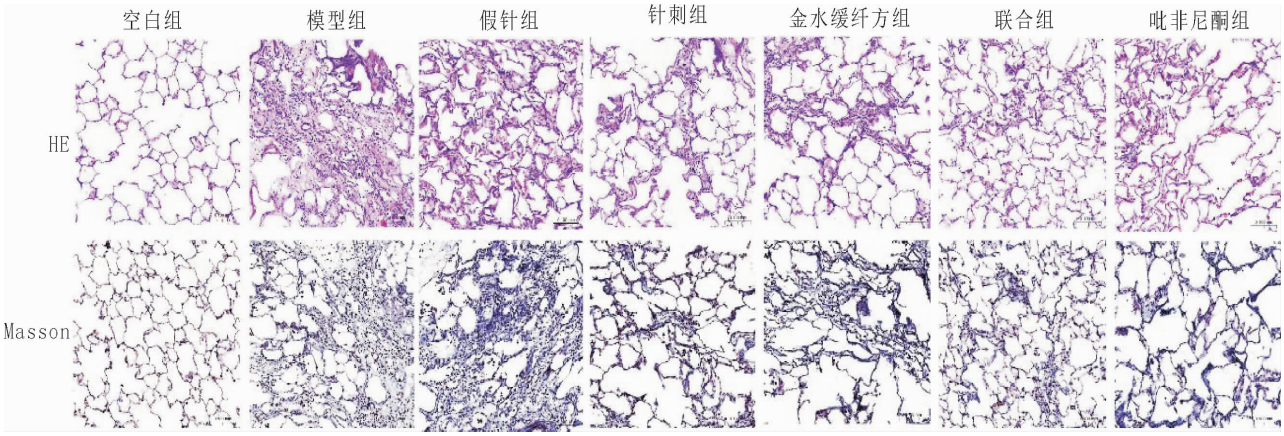


图 1　各组大鼠肺组织 HE 染色和 Masson 染色图（×200）

3.3　金水缓纤方联合针刺对大鼠肺组织胶原沉积的影响　与空白组比较，模型组大鼠肺组织 α－SMA 蛋白表达水平和 HYP 含量升高（$P<0.01$）。与模型组和假针组比较，针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠肺组织 α－SMA 蛋白表达水平和 HYP 含量降低（$P<0.01$）。与吡非尼酮组、金水缓纤方组、针刺组比较，联合组大鼠肺组织 α－SMA 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。见图 2、表 4。

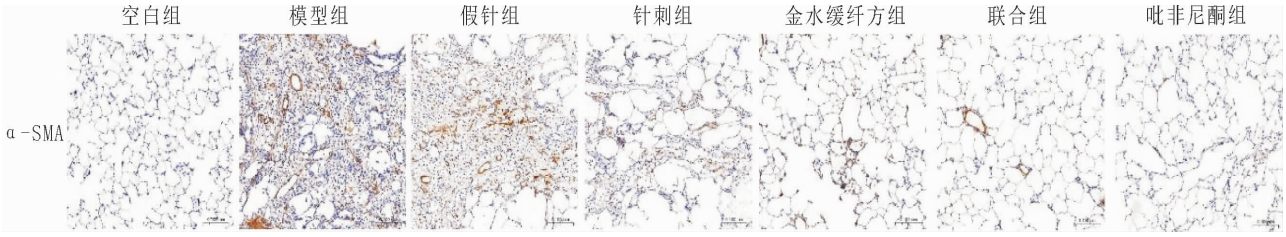


图 2　各组大鼠肺组织 α－SMA 蛋白免疫组化染色图（×200）

3.4　金水缓纤方联合针刺对大鼠肺组织 EMT 标志物的影响　与空白组比较，模型组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平降低，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平升高（$P<0.01$），N－cad 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，针刺组、金水缓纤方组、联合组及吡非尼酮组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$），N－cad 蛋白表达水平降低（针刺组除外）（$P<0.01$）。与吡非尼酮组比较，联合组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$），金水缓纤方组大鼠肺组织 *Vim* mRNA 水平升高（$P<0.05$）。与金水缓纤方组比较，联合组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低，N－cad 蛋白

表达水平降低（$P<0.01$）。与针刺组比较，联合组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。与假针组比较，针刺组大鼠肺组织 *E－cad* mRNA 水平升高，*N－cad* mRNA、*Vim* mRNA 水平降低（$P<0.01$）。见图 3、表 5、表 6。

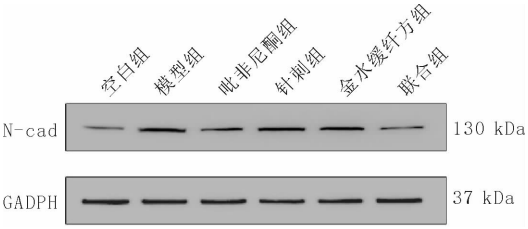


图 3　各组大鼠肺组织 N－cad 蛋白条带图

表 4　各组大鼠肺组织 HYP 含量、α－SMA 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	HYP 含量（ρ/mg·L^{-1}）	α－SMA 表达水平
空白组	6	1.20±0.16	11.22±0.85
模型组	6	1.93±0.19^{aa}	26.71±0.32^{aa}
假针组	6	1.85±0.14	26.71±0.90
针刺组	6	1.45±0.06^{bbff}	16.76±1.13^{bbff}
金水缓纤方组	6	1.44±0.13^{bbff}	15.06±0.62^{bbff}
联合组	6	1.30±0.17^{bbff}	13.15±0.30^{bbccddeeff}
吡非尼酮组	6	1.43±0.11^{bbff}	14.77±0.12^{bbff}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，bb$P<0.01$；与吡非尼酮组比较，cc$P<0.01$；与金水缓纤方组比较，dd$P<0.01$；与针刺组比较，ee$P<0.01$；与假针组比较，ff$P<0.01$。

表 5　各组大鼠肺组织 *E－cad*、*N－cad*、*Vim* mRNA 水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	*E－cad* mRNA	*N－cad* mRNA	*Vim* mRNA
空白组	6	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.11
模型组	6	0.29±0.04^{aa}	3.51±0.13^{aa}	3.53±0.13^{aa}
假针组	6	0.29±0.04	3.47±0.14	3.66±0.31
针刺组	6	0.66±0.04^{bbff}	2.61±0.13^{bbff}	2.66±0.17^{bbff}
金水缓纤方组	6	0.64±0.04^{bb}	2.64±0.11^{bb}	2.81±0.06^{bbc}
联合组	6	0.85±0.05^{bbccddee}	1.92±0.09^{bbccddee}	1.90±0.06^{bbccddee}
吡非尼酮组	6	0.64±0.04^{bb}	2.68±0.11^{bb}	2.53±0.01^{bb}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，bb$P<0.01$；与吡非尼酮组比较，c$P<0.05$，cc$P<0.01$；与金水缓纤方组比较，dd$P<0.01$；与针刺组比较，ee$P<0.01$；与假针组比较，ff$P<0.01$。

表 6　各组大鼠肺组织 N－cad 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	N－cad
空白组	3	0.24±0.03
模型组	3	0.89±0.14^{aa}
吡非尼酮组	3	0.43±0.12^{bb}
针刺组	3	0.76±0.15^{d}
金水缓纤方组	3	0.56±0.11^{bb}
联合组	3	0.30±0.02^{bbdd}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，bb$P<0.01$；与金水缓纤方组比较，d$P<0.05$，dd$P<0.01$。

3.5　金水缓纤方联合针刺对大鼠肺组织 TGF－β1/Smad$_{2/3}$通路关键蛋白的影响　与空白组比较，模型组大鼠肺组织 p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。与模型组比较，吡非尼酮组、针刺组、金水缓纤方组、联合组大鼠肺组织 p－Smad2（针刺组除外）、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与吡非尼酮组比较，联合组大鼠肺组织 p－Smad3 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与金水缓纤方组比较，吡非尼酮组和联合组大鼠肺组织 p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与针刺组比较，吡非尼酮组和联合组大鼠肺组织 p－Smad2、p－Smad3（吡非尼酮组除外）、TGF－β1 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。见图 4、表 7。

表 7　各组大鼠肺组织 p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	p－Smad2	p－Smad3	TGF－β1
空白组	3	0.16±0.03	0.37±0.05	0.12±0.01
模型组	3	1.21±0.11^{aa}	1.28±0.12^{aa}	0.91±0.13^{aa}
吡非尼酮组	3	0.34±0.07^{bbddee}	0.66±0.06^{bbdd}	0.23±0.02^{bbddee}
针刺组	3	1.05±0.26	0.98±0.12^{bb}	0.66±0.11^{bb}
金水缓纤方组	3	0.80±0.04^{bb}	0.75±0.10^{bb}	0.47±0.12^{bb}
联合组	3	0.31±0.11^{bbddee}	0.44±0.05^{bbcddee}	0.20±0.06^{bbddee}

注：与空白组比较，aa$P<0.01$；与模型组比较，bb$P<0.01$；与吡非尼酮组比较，c$P<0.05$；与金水缓纤方组比较，dd$P<0.01$；与针刺组比较，ee$P<0.01$。

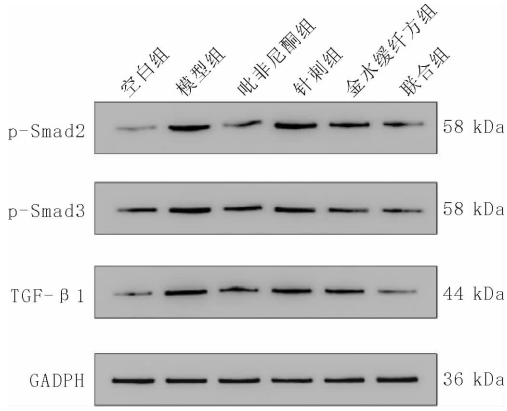


图 4　各组大鼠肺组织 p－Smad2、p－Smad3、TGF－β1 蛋白条带图

4　讨论

EMT 是多种疾病发展过程中的关键生物学现象，例如癌症的侵袭和转移、肺纤维化等[17]。目前，抑制 EMT 改善相关疾病的治疗策略包括小分子抑制剂、抗体治疗及抗纤维化药物[18]。吡非尼酮和尼达尼布是由美国食品药品监督管理局（FDA）批准用于治疗肺纤维化的药物[19]。鉴于肺纤维化治疗的局限性，亟须开发更有效的防治策略。

中医药治疗肺纤维化具有独特优势，并在临床上得到了广泛应用[20－21]。李建生教授认为，“正虚络痹积损”是肺纤维化的主要病机，据此提出“扶正通络消积”的治疗原则，拟定补益肺肾、化痰祛瘀的扶正通络消积三方，即养清抗纤方、保肺化纤方、金水缓纤方[22－24]。其中，金水缓纤方由人参、麦冬、淫羊藿、熟地黄等中药组成，具有补益肺肾、活血化痰通络的功效。临床实践表明，该方可显著改善患者临床症状，提升肺功能，降低病死率。动物实验显示，金水缓纤方可有效抑制肺纤维化大鼠肺组织中 TGF－β1、α－SMA 蛋白和基因表达，上调 E－cadherin 表达，减少胶原沉积[10－11]。近年来，中医康复疗法治疗肺部疾病取得较大进展，主要包括八段锦、简化太极拳、易筋经、五禽戏、呼吸导引术、针刺和灸法等[25]。其中，针刺疗法被广泛应用于肺纤维化的临床治疗[12]，通过刺激人体腧穴和经络，调和气血，恢复脏腑功能，以达到治疗疾病和未病先防的效果。临床研究发现，针刺可调控与肺纤维化进展相关的炎症介质，并改善患者肺功能[26－28]。

IPF 的主要特征是肺泡上皮损伤和修复造成的细胞外基质过度沉积，肺组织结构变形导致的瘢痕形成[29]。肺泡间隔破坏、肺组织实变及纤维化等病理改变又会严重影响气体交换功能，表现为肺容积减少、气流受限、肺组织硬度增加，造成肺活量和深吸气量下降，肺组织弹性降低和气道阻力升高，肺内残气量增加[25,30－32]。本研究显示，金水缓纤方、针刺和吡非尼酮可有效减少 IPF 大鼠肺残气量，改善肺活量和肺组织病理形态，且针药联合改善肺功能和病理形态的作用更佳。

α－SMA 是肌成纤维细胞的标志物，在 EMT 过程中发挥重要作用。α－SMA 表达上调，标志着细胞向肌成纤维细胞的方向分化[29,33－34]。分化形成的肌成纤维细胞是细胞外基质成分（包括胶原蛋白）的主要生产者。羟脯氨酸作为胶原蛋白中特有的氨基酸，不仅参与肺上皮损伤的修复，反映肺纤维化程度，同时可间接反映 EMT 的活性[35]。本研究显示，各干预措施均可不同程度改善 IPF 大鼠肺组织的胶原沉积，并降低 α－SMA 和羟脯氨酸水平。

EMT 是肺泡上皮细胞向间充质细胞转化的过程，伴随上皮细胞特有功能和特征的丧失，是肺纤维化发生发展的重要病理机制。这一转变过程中，E－cadherin 的表达水平降低[36]，N－cadherin 和 Vimentin 的表达水平升高[37]。这些变化导致细胞间黏附功能减弱，从而促进肺纤维化的形成[38－39]。TGF－β1 参与 EMT 过程，是肺纤维化的关键调节因子[40－41]。研究发现，当受到外界刺激时，TGF－β1 被激活并与Ⅱ型受体结合，随后发生磷酸化与激活的Ⅰ型受体结合，进而诱导下游分子 Smad2 和 Smad3 磷酸化并形成复合物。磷酸化是 Smad 蛋白激活的关键步骤，磷酸化的 Smad 蛋白进入细胞核，与转录因子结合，共同调节与 EMT 相关的基因表达[42－43]。通过阻断 TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 信号通路可有效抑制 EMT，从而延缓肺纤维化进程[44]。本研究显示，针刺、金水缓纤方及针药联合可显著下调 EMT 的关键基因表达，同时降低 TGF－β1、p－Smad2 和 p－Smad3 蛋白表达，且以针药联合干预效果最优。

综上所述，金水缓纤方联合针刺可改善肺纤维化大鼠的肺功能和病理，调控 EMT，其机制可能与抑制 TGF－β1/$Smad_{2/3}$ 通路有关。

参考文献：

[1] PODOLANCZUK A J, THOMSON C C, REMY - JARDIN M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: state of the art for 2023[J]. Eur Respir J, 2023, 61(4): 2200957.

[2] RYERSON C J, COTTIN V, BROWN K K, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: shifting the paradigm[J]. Eur Respir J, 2015, 46(2): 512 - 520.

[3] RAGHU G, REMY - JARDIN M, RICHELDI L, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (an update) and progressive pulmonary fibrosis in adults: an official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205(9): e18 - e47.

[4] JEONG S H, SON E S, LEE Y E, et al. Histone deacetylase 3 promotes alveolar epithelial - mesenchymal transition and fibroblast migration under hypoxic conditions[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(7): 922 - 931.

[5] LI Y L, WANG L Q, ZHANG Q Y, et al. Blueberry juice attenuates pulmonary fibrosis via blocking the TGF - β1/smad signaling pathway[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 825915.

[6] GAO S Y, LI X H, JIANG Q Y, et al. PKM2 promotes pulmonary fibrosis by stabilizing TGF - β1 receptor I and enhancing TGF - β1 signaling[J]. Sci Adv, 2022, 8(38): eabo0987.

[7] INUI N, SAKAI S, KITAGAWA M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF - β and the ubiquitin - proteasome pathway[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 6107.

[8] 王露，张海龙，张东，等. 中药治疗特发性肺纤维化系统评价/Meta 分析的再评价[J]. 世界科学技术：中医药现代化，2021，23(4)：988 - 997.

[9] LI J S, YU X Q, XIE Y, et al. Efficacy and safety of traditional Chinese medicine treatment for idiopathic pulmonary fibrosis: an exploratory, randomized, double - blinded and placebo controlled trial[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 1053356.

[10] 李建生，陈龙飞，李亚，等. 扶正通络消积三方分期治疗肺纤维化大鼠疗效评价[J]. 中华中医药杂志，2021，36(3)：1671 - 1676.

[11] 陈龙飞，李亚，田燕歌，等. 扶正通络消积三方对肺纤维化大鼠肺组织上皮间质转化的影响[J]. 中华中医药杂志，2021，36(2)：741 - 747.

[12] 谢洋，王佳佳，王明航，等. 特发性肺纤维化针刺临床研究思考[J]. 中华中医药杂志，2019，34(3)：1102 - 1104.

[13] MILES T, HOYNE G F, KNIGHT D A, et al. The contribution of animal models to understanding the role of the immune system in human idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Clin Transl Immunology, 2020, 9(7): e1153.

[14] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京：中国中医药出版社，2003.

[15] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin - induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893 - 899.

[16] ASHCROFT T, SIMPSON J M, TIMBRELL V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467 - 470.

[17] SAITOH M. Transcriptional regulation of EMT transcription factors in cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2023, 97: 21 - 29.

[18] DONG S T, FANG H P, ZHU J J, et al. Inhalable siRNA targeting IL - 11 nanoparticles significantly inhibit bleomycin - induced pulmonary fibrosis[J]. ACS Nano, 2025, 19(2): 2742 - 2758.

[19] MAHER T M. Interstitial lung disease: a review[J]. JAMA, 2024, 331(19): 1655 - 1665.

[20] 姜文，王俊，王凤婵，等. 扶正化纤方水煎液对博来霉素诱导小鼠肺纤维化及肺组织 CFTR 表达的影响[J]. 中成药，2022，44(11)：3468 - 3475.

[21] 张兴，苏子舰，吴佳敏，等. 健脾通络方治疗特发性肺纤维化脾虚络瘀型患者 58 例随照试验[J]. 中医杂志，2023，64(2)：139 - 145.

[22] BAI Y P, LI J S, ZHAO P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress via upregulating Nrf2[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 628.

[23] 李建生，宋建平. 正虚络痹积损为弥漫性间质性肺疾病的主要病机[J]. 中医杂志，2013，54(1)：23 - 25.

[24] 李建生. 特发性肺纤维化中医辨证治疗概要[J]. 中医学报，2017，32(6)：929 - 931.

[25] 世界中医药学会联合会肺康复专业委员会. 特发性肺纤维化中医康复指南(2021 - 10 - 21)[J]. 世界中医药，2023，18(2)：155 - 162.

[26] 丁玉文，李瑞琴，金艳，等. 中医药对肺纤维化大鼠肺组织超微结构的影响[J]. 世界中医药，2017，12(1)：237 - 240.

[27] 徐慧卿. 针药并用治疗特发性肺纤维化疗效观察[J]. 上海针灸杂志，2010，29(10)：641 - 642.

[28] 李戎，闫智勇，李文军，等. 针灸治疗特发性肺纤维化临

床观察[J]. 针灸临床杂志,2004,20(2):13 - 14,59.
[29]吴亚娜,刘东玲,宋忠阳,等. 特发性肺纤维化中上皮 - 间质转化的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(23):3499 - 3503.
[30]TRAVIS W D,COSTABEL U,HANSELL D M,et al. An official American thoracic society/European respiratory society statement:update of the international multidisciplinary classification of the idiopathic interstitial pneumonias[J]. Am J Respir Crit Care Med,2013,188(6):733 - 748.
[31]GLAAB T,BRAUN A. Noninvasive measurement of pulmonary function in experimental mouse models of airway disease[J]. Lung,2021,199(3):255 - 261.
[32]GLAAB T,TAUBE C,BRAUN A,et al. Invasive and noninvasive methods for studying pulmonary function in mice [J]. Respir Res,2007,8(1):63.
[33]李娜,郑雁,李萍,等. 上皮间质转化在器官纤维化中作用及中药干预机制的研究进展[J]. 中成药,2022,44(8):2573 - 2579.
[34]李汉清,可燕. 上皮间质转化的机制研究进展[J]. 中国药理学通报,2017,33(10):1342 - 1344.
[35]CISSELL D D,LINK J M,HU J C,et al. A modified hydroxyproline assay based on hydrochloric acid in Ehrlich′s solution accurately measures tissue collagen content[J]. Tissue Eng Part C Methods,2017,23(4):243 - 250.
[36]YANG J,ANTIN P,BERX G,et al. Guidelines and definitions for research on epithelial - mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2020,21(6):341 - 352.
[37]BARRIERE G,FICI P,GALLERANI G,et al. Epithelial mesenchymal transition:a double - edged sword[J]. Clin Transl Med,2015,4:14.
[38]ZHU S,MIN Z X,QIAO X L,et al. Expression profile - based screening for critical genes reveals S100A4,ACKR3 and CDH1 in docetaxel - resistant prostate cancer cells [J]. Aging (Albany NY),2019,11(24):12754 - 12772.
[39]KAO H H,KUO C Y,CHEN K S,et al. Preparation of gelatin and gelatin/hyaluronic acid cryogel scaffolds for the 3D culture of mesothelial cells and mesothelium tissue regeneration[J]. Int J Mol Sci,2019,20(18):4527.
[40]DONG R,LIU M,HUANG X X,et al. Water - soluble C60 protects against bleomycin - induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Int J Nanomedicine,2020,15:2269 - 2276.
[41]ZHANG L H,LUO W P,LIU J,et al. Modeling lung diseases using reversibly immortalized mouse pulmonary alveolar type 2 cells (imPAC2)[J]. Cell Biosci,2022,12(1):159.
[42]LIU H L,LAI W Q,NIE H P,et al. PM2.5 triggers autophagic degradation of Caveolin - 1 via endoplasmic reticulum stress (ERS) to enhance the TGF - β1/Smad3 axis promoting pulmonary fibrosis [J]. Environ Int,2023,181:108290.
[43]BAIK J E,PARK H J,KATARU R P,et al. TGF - β1 mediates pathologic changes of secondary lymphedema by promoting fibrosis and inflammation[J]. Clin Transl Med,2022,12(6):e758.
[44]DU C,MA C,GENG R Y,et al. Bruceine A inhibits TGF - β1/Smad pathway in pulmonary fibrosis by blocking gal3/TGF - β1 interaction [J]. Phytomedicine,2025,136:156267.

收稿日期:2025 - 02 - 20

作者简介:王晨(1998 -),女,河南郑州人,硕士研究生,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。
通信作者:田燕歌(1984 -),女,医学博士,副教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治呼吸系统疾病。E - mail:yange0910@126.com

编辑:刘凯歌