

## 三七总皂苷对肺心病兔肺纤维化组织 Cathepsin B 表达的影响

张济周<sup>1)</sup>, 李青<sup>2)</sup>, 林萍<sup>3)</sup>, 杨梁梓<sup>2)</sup>, 宋精玲<sup>3)</sup>

(1) 温州市中医院肿瘤科, 浙江温州 325000; 2) 昆明医学院第二附属医院中西医结合科, 云南昆明 650101; 3) 昆明医学院病理教研室, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 从病理学角度研究三七总皂苷对肺心病兔肺纤维化 Cathepsin B 表达的调控。 **方法** 健康日本大耳兔 40 只, 随机分为五组, 每组 8 只, 分别为正常对照组、肺心病模型组、三七总皂苷预防组、治疗组及西药治疗组。观察光镜下五组动物 CB 蛋白的表达及肺组织的病理结构变化。 **结果** 与模型组相比, 三七总皂苷预防组能明显减轻肺泡水肿, 减轻肺间质、肺细小动脉及肺泡壁纤维化, 明显减少肺泡水肿液及炎细胞渗出, 降低 CB 蛋白在肺组织中的表达; 三七总皂苷治疗组及西药治疗组也有上述作用, 但不及三七总皂苷预防组明显。 **结论** 三七总皂苷能明显改善肺心病兔肺纤维化的程度, 显降低 CB 蛋白在支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞的表达, 减轻致纤维化因素对肺间质、肺部细小动脉及肺泡壁的病理损伤, 对肺心病肺脏损伤具有保护作用。

**[关键词]** 三七总皂苷; 肺心病; 肺纤维化; 兔; Cathepsin B; 表达调控; 病理学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2011) 01 - 0036 - 05

## Pathological Study of PNS in Regulating Cathepsin B Expression in Rabbits with Pulmonary Fibrosis of Pulmonary Heart Disease

ZHANG Ji - zhou<sup>1)</sup>, LI Qing<sup>2)</sup>, LIN Ping<sup>3)</sup>, YANG Liang - zi<sup>2)</sup>, SONG Jing - ling<sup>3)</sup>

(1) Dept. of Tumour, Wenzhou Chinese Medicine Hospital, Wenzhou Zhejiang 325000; 2) Dept. of Integrative Medicine, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Dept. of Pathology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of PNS in regulating the expression of Cathepsin B in rabbits with pulmonary fibrosis of pulmonary heart disease from the perspective of pathology. **Methods** Forty healthy Japanese rabbits were randomly divided into five groups (eight rabbits in each group): the control group, the PF model group, the PNS prevention group, treatment group and the western medicine treatment group. The expression of CB protein and the pathological structural changes in lung tissue were observed under light microscope. **Results** Compared with the model group, PNS significantly reduced the pulmonary edema, reducing pulmonary interstitial, pulmonary arteries and alveolar wall fibrosis, significantly reduced pulmonary edema fluid and inflammatory cell exudate, reducing CB protein in lung tissue expression of rabbits in the prevention group.

---

**[基金项目]** 云南省卫生厅科研基金资助项目 (2009NS065)

**[作者简介]** 张济周 (1982~), 男, 浙江温州市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事肿瘤科临床研究工作。

**[通讯作者]** 宋精玲. E-mail: ynkmsongjingling@sina.com

PNS treatment group and western medicine treatment group also had effects, but the effects were significantly less than the PNS prevention group. **Conclusions** PNS can significantly improve the extent of pulmonary fibrosis, reduce the CB protein levels in bronchial epithelial cells, alveolar epithelial cells, reduce the inducing factors of pulmonary interstitial fibrosis, pulmonary arterioles and alveolar wall's pathological damage, in rabbits with pulmonary heart disease. Therefore, PNS can protect lung of rabbits with pulmonary heart disease against damage.

[**Key words**] PNS; Pulmonary heart disease; Pulmonary fibrosis; Rabbit; Cathepsin B; Expression regulation; Pathology

肺心病为临床常见多发病, 据国内近年统计, 其平均患病率为 0.4% ~ 0.47%<sup>[1]</sup>, 并随着年龄增长其患病率增高, 严重地危害着中老年人的健康. 在其发病过程中, 肺纤维化是必经阶段, 可导致肺组织结构及功能异常, 直接关系着肺心病的发生发展. 目前, 对肺纤维化阶段的研究甚多, 但肺纤维化的真正发病机制并未明确<sup>[2]</sup>. 研究表明溶酶体组织蛋白酶 B (Cathepsin, CB) 在肺纤维化组织中过度表达, 认为 CB 在肺组织中的过度表达对致肺纤维化起到了非常关键的作用<sup>[3]</sup>. 本研究主要通过观察 CB 在肺心病兔肺纤维化发病过程中的表达, 从细胞水平、病理学角度研究三七总皂苷 (络泰) 的抗纤维化作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料及试剂

健康日本大耳兔雌雄不限, 体重在 2 000 ~ 2 500 g, 3 月龄, 由昆明医学院动物科提供. 三七总皂苷 (络泰), 由昆明制药集团股份有限公司提供, 批号 20030102.01, 规格: 200 mg/支. 氢化可的松片由浙江仙居制药股份有限公司提供, 批号 20030901, 规格: 5 mg/片. 三氯化铁由天津市东升化学试剂厂生产, 批号 20030922, 分析纯度 99%. 羊抗兔 CB 多克隆抗体及 SABC 免疫组化试剂盒 (进口), 由 Fermentas 公司生产, 批号 072008, 规格: 0.5 mL, 效价: 1:100 ~ 200.

### 1.2 实验动物及分组

取健康日本大耳兔 40 只, 随机分为五组, 每组 8 只. A 组为正常对照组: 输入与其它组等量的 0.9% 氯化钠注射液. B 组为肺心病模型组: 复制肺心病模型: 用 1% 三氯化铁复制肺纤维化模型, 第 1 ~ 4 周每周缓慢耳缘静脉注射 2 次, 每次 0.5 mL; 第 5 ~ 6 周每周注射 2 次, 每次 0.75 mL; 第 7 周每周注射 4 次, 每次 1 mL. C 组为三七总

皂苷预防组: 在复制肺心病模型同时静脉给予络泰 50 mg/kg, 加入 0.9% NaCl 注射液 5 mL 中溶解后缓慢耳缘静脉推注, 1 次/d, 连续 28 d. D 组为三七总皂苷治疗组: 在复制肺心病模型后静脉给予络泰 50 mg/kg, 加入 0.9% NaCl 注射液 5 mL 中溶解后缓慢耳缘静脉推注, 1 次/d, 连续 28 d. E 组为西药治疗组: 在复制肺心病模型后开始给予氢化可的松治疗, 按 35 mg/kg 溶于 0.9% 氯化钠注射液 5 mL 中, 给予静脉注射每 1 次/d, 连续 28 d.

### 1.3 取材及方法

取材: A 组 4 只兔取肺组织时间与 B、C 两组同时, B、C 组取采组织时间为复制肺心病模型第 8 周, A 组另 4 只与 D、E 两组则在治疗后 28 d 取采组织. 方法: 利用空气栓塞法, 通过耳缘静脉注射 20 ~ 40 mL 空气, 造成气栓, 直至死亡. 处死后, 打开腹腔胸腔, 取出肺组织.

### 1.4 光镜标本制作及观察

取各组兔部分肺组织, 用 10% 甲醛固定, 常规石蜡切片, 片厚约 3  $\mu$ m. 经 HE 染色, 观察纤维化的肺组织.

### 1.5 免疫组化染色

采用免疫组化 SABC 法检测 (方法步骤严格按试剂盒的说明书进行), CB 多克隆抗体按 1:150 稀释, 将免疫组化结果在光镜 200 倍视野下, 每张玻片取 8 个视野, 以细胞胞浆内有棕黄色颗粒且着色明显高于背景者为阳性<sup>[4]</sup>, 观察各组实验兔肺组织中 CB 蛋白的表达及肺组织中肺间质、肺泡、肺泡壁、支气管及肺细小动脉的光镜和组织结构变化.

### 1.6 统计学处理

观察各组实验兔肺组织形态学 HE 染色、CB 蛋白表达和病理组织结构特征, 依据 Szaipil 等<sup>[5]</sup>方法对其肺组织病变 (炎性渗出、上皮变性坏死、细胞充血瘀血等) 及肺纤维化程度进行分级

(分为+~+++级). 各组各级别例数采用《中国医学百科全书医学统计学》统计软件包PEMS处理, 应用秩和检验做组间比较,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 实验兔肺组织 HE 染色

光镜观察正常对照组肺组织结构清晰, 肺泡腔完整, 肺泡、肺间质、肺小动脉结构均正常. 模型组肺动脉壁增厚, 毛细血管瘀血明显, 间质胶原纤维增生, 肺小动脉管壁纤维化明显, 管腔狭窄, 肺泡间隔明显增厚, 部分肺泡呈囊状扩张, 肺泡内有淡红色水肿液; 可见大面积肺间质中巨噬细胞浸润, 病变广泛, 少数肺组织肺泡腔中亦有巨噬细胞浸润. 三七总皂苷预防组、治疗组及西药治疗组的肺纤维化组织亦有不同程度的显色, 说明除正常对照组外各组肺心病兔肺纤维化造模成功.

### 2.2 各组实验兔肺组织中 CB 蛋白的表达

正常对照组: 光镜下仅见散在的棕黄色颗粒, CB 蛋白表达弱阳性, 主要分布于支气管粘膜上皮细胞, 肺组织结构清晰, 细支气管、肺泡腔完整, 肺泡壁无增厚, 肺泡间隔无增宽, 肺泡、肺间质、肺小动脉结构均正常 (见图 1-A). 模型组: 镜下可见细胞胞浆内大量的明显的棕黄色固缩的细胞核, 信号成强阳性, 主要分布于支气管粘膜上皮细胞、肺泡上皮细胞、巨嗜细胞及部分血管内皮细胞的胞浆中, 其中以支气管粘膜上皮细胞、肺泡上皮细胞最为明显. 肺小动脉管壁纤维化, 肺动脉壁增厚, 管腔狭窄, 毛细血管瘀血明显, 间质胶原纤维增生, 肺泡间隔增厚明显, 大量肺泡腔萎闭、融合、成片状纤维化, 部分肺泡呈囊状扩张, 内有淡红色水肿液; 可见大面积肺间质中巨噬细胞浸润, 病变广泛, 少数肺组织肺泡腔中亦有巨噬细胞浸润, 肺组织结构破坏明显 (见图 1-B、C、D). 三七总皂苷预防组与正常对照组相比, 肺组织中可见棕黄色阳性颗粒, CB 蛋白表达弱阳性, 但比正常对照组明显, 主要分布在肺间质、支气管上皮细胞, 表现为部分肺组织、肺泡、肺泡间隔、肺泡壁及细支气管粘膜上皮有少量的纤维胶原生成, 纤维化并不明显, 部分肺泡亦有萎缩 (见图 2-B); 与三七总皂苷治疗组及西药治

疗组相比, 预防组光镜下肺组织中棕黄色的固缩细胞核颗粒明显少于此两者, 即 CB 蛋白在肺组织中的表达明显较此两组弱, 且肺组织、肺泡上皮细胞及支气管上皮细胞的破坏也明显减轻, 脉管壁纤维化轻微, 肺动脉壁增厚不明显, 间质胶原纤维少量增生, 肺泡间隔相对薄, 未见肺泡囊状扩张及淡红色水肿液, 肺泡萎闭及肺间质纤维化较治疗组减轻. 三七总皂苷治疗组及西药治疗组相比, 无论在 CB 蛋白表达还是肺组织结构的改变上并无多大差异, 表现为支气管粘膜、肺间质、肺泡、肺泡间隔都有明显的棕黄色固缩颗粒, 肺泡间隔增厚, 大量的肺泡萎缩或破裂成细缝状, 肺组织结构破坏明显, 肺间质纤维化明显. 三七总皂苷预防组、治疗组及西药治疗组与模型组比较, 则此三组 CB 蛋白表达及肺纤维化等病理学改变都较模型组明显减轻 (见图 2-A、C、D).

### 2.3 各组实验兔肺部病变和肺纤维化分级比较

光镜下三七总皂苷预防组、治疗组及西药治疗组与模型组比较, 差异有统计学意义, 且三七总皂苷治疗组及西药治疗组对兔肺病理组织结构的影响不及三七总皂苷预防组明显 ( $P < 0.05$ ), 见表 1; 三七总皂苷治疗组与西药治疗组组间疗效比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 即三七总皂苷治疗组及西药治疗组对肺心病兔肺纤维化组织结构影响的差别不明显.

## 3 讨论

在肺心病发病过程中, 致肺纤维化的机理主要有: (1) 慢性长期反复炎症刺激, 与其它致病因素协同作用, 病变可累及邻近肺小动脉, 引起血管炎, 管壁增厚、管腔狭窄或纤维化, 甚至完全闭塞, 从而使肺血管阻力增加, 产生肺动脉高压, 这是导致肺心病发生发展的重要环节. (2) 长期慢性缺氧, 使肺血管收缩, 管壁张力增高可直接刺激管壁增生. 同时缺氧时, 肺内产生多种生长因子 (如多肽生长因子). 肺细小动脉及肌型微动脉的平滑肌细胞肥大或是萎缩, 细胞间质增多, 内膜弹力纤维及胶原增生, 非肌型微动脉肌化, 使血管壁增厚硬化, 管腔狭窄, 血流阻力增大. 缺氧可使无肌型微动脉的内皮细胞向平滑肌细胞转化, 使动脉管腔狭窄或纤维化. (3) 随着肺气肿的加重, 肺泡内压增高, 压迫肺泡毛细血

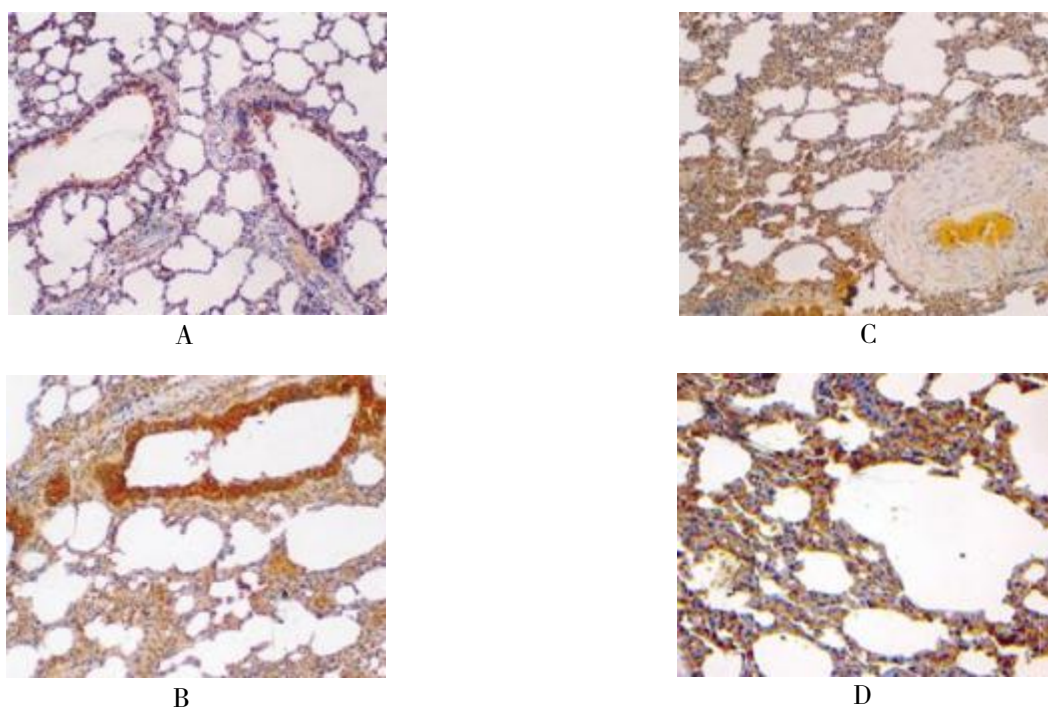


图 1 光镜下肺纤维化组织 CB 蛋白的表达

Fig. 1 The expression of CB protein in pulmonary fibrosis under light microscope

A:正常组; B、C、D:模型组.

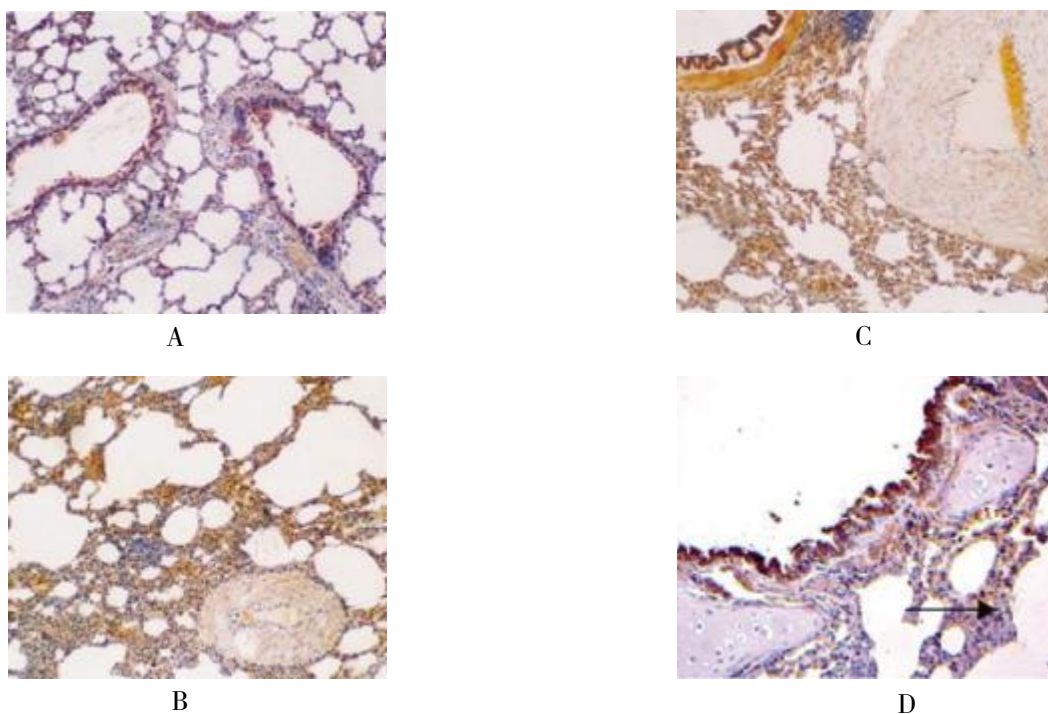


图 2 光镜下肺纤维化组织 CB 蛋白的光镜下表达

Fig. 2 The expression of CB protein in pulmonary fibrosis under light microscope

A:正常组; B:预防组; C、D:治疗组.

表1 各组不同程度肺泡病变和肺纤维化结果比较 (n)

Fig. 1 Different degrees of lung lesions and pulmonary fibrosis results in each group (n)

组别	n	各级别肺泡病变例数			各级别肺纤维化例数		
		+	++	+++	+	++	+++
肺心病模型组	8	1	4	3	2	2	4
三七总皂苷预防组	8	5*	2*	1*	5*	2	1*
三七总皂苷治疗组	8	3*	2*	3	4*	2	2*
西药治疗组	8	3*	3*	2	4*	2	2*

与肺心病模型组比较, \* $P < 0.05$ .

管,造成毛细血管管腔狭窄、闭塞。(4)肺血管性疾病、间质性疾病等也可引起肺血管病理改变,使血管管腔狭窄、闭塞或纤维化<sup>[1]</sup>。从上述原因可以看出肺纤维化与肺心病的发生关系极为密切,是从炎症及其它致病因素到肺心病发生的一个极其重要的中间环节,是肺心病发生发展的必经阶段。故研究肺心病发生过程中的肺纤维化是今后肺心病治疗取得突破的一个大的方向。

CB是一种属于肽酶或蛋白酶家族的酶蛋白。其作用非常广泛,主要为降解各种组织蛋白,参与机体多种生理、病理过程,广泛分布于各种组织细胞的溶酶体中。对于人类来说,它是由CTSB基因编码的。蛋白质编码基因是一种由二聚体二硫键相连重型和轻型链所组成的溶酶体半胱氨酸蛋白酶,同时来源于单一蛋白前体,它是肽酶C1家族成员之一。CB过度表达已在食管腺癌和其他肿瘤所证实,且具有组织特异性。近年来,国内外对纤维化的发病机制做了大量的研究发现:在正常肺组织CB表达较弱,可能仅参与细胞结构与功能的稳定性,但在肺纤维化组织中CB过度表达,认为其对致肺纤维化起到了非常重要的作用<sup>[9]</sup>。在本研究中笔者发现,正常对照组中CB呈弱表达;模型组中CB表达强阳性,而且广泛的分布于支气管粘膜上皮细胞、肺泡上皮细胞、巨嗜细胞及部分血管内皮细胞的胞浆中,肺纤维化非常明显;三七总皂苷预防组、治疗组及西药治疗组中光镜下CB蛋白的表达明显比模型组减轻,其中以三七总皂苷预防组最为明显,肺纤维化程度也明显减轻。光镜下笔者发现CB蛋白表达越强的组织,纤维化就越明显,呈正比例关系,这对笔者研究CB在肺纤维化中的作用提供了非常重要的客观依据。

三七总皂苷是名贵中草药三七的主要生物活

性成分<sup>[6,7]</sup>,具有化瘀止血、活血定痛、抗炎之功效。前期实验已证明,三七总皂苷能有效抑制肺纤维化、减少胶原纤维增长、改善心肺功能<sup>[8,9]</sup>。在本研究中发现,三七总皂苷预防组、治疗组肺组织中棕黄色的固缩细胞核颗粒较模型组明显减少,即三七总皂苷能有效的抑制CB蛋白在兔纤维化肺组织中的表达,对纤维化组织有一定的治疗作用。其中,三七总皂苷预防组比治疗组作用更为明显(CB蛋白的表达量在光镜下可以观察),说明三七总皂苷对肺纤维化不仅有治疗作用,还有早期防治作用,该药运用越早防治纤维化的作用就越明显。病理结果显示:肺动脉壁胶原纤维增生减轻,肺泡壁明显增厚、纤维结缔组织增生、部分毛细血管腔闭塞、肺小动脉中膜平滑肌间质纤维结缔组织增生等都得到明显的改善。为三七总皂苷在临床中预防肺纤维化的发生及三七总皂苷走上保健品市场提供了可靠的依据。

同时,笔者在研究中还发现三七总皂苷治疗组与西药治疗组在抑制CB蛋白表达及改变肺组织病理结构上并无多大差别,临床中众所周知西药激素抗纤维化有明显的毒副作用,而且不能长期应用,在临床中一直是未解决的难题,本研究为解决此难题提供了一个重要的理论依据。如果三七总皂苷在临床中能达到与激素相同的治疗效果,则为寻找一种有效的副作用少的抗纤维化药物提供了可能,为肺心病及肺纤维化临床安全用药开辟了一个新的途径,同时也对开发三七的临床药用价值有着重大意义。

#### [参考文献]

- [1] 叶任高,陆再英主编. 内科学[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社,2000:49-50

(下转第54页)

## [参考文献]

- [1] 马航,朱杰,张建辉,等. 微炎症反应状态在慢性肾功能衰竭患者心血管病变中的作用[J]. 疑难病杂志, 2007,6(7):392-394.
- [2] 徐群红,费晓,王鸣,等. 维持性血液净化患者微炎症状态的临床研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008,9(1):42-44.
- [3] 何勤. 慢性肾衰竭的心血管病危险因素[J]. 中国疗养医学,2010,19(3):241-243.
- [4] RAMIREZ R, CARRACEDO J, MERINO A, et al. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport[J]. *Kidney Int*, 2007,72(1):108-113.
- [5] AMANN K, WANNER C, RITZ E, et al. Cross-Talk between the kidney and the cardiovascular system[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006,17(8):2112-2119.
- [6] MCCULLOUGH P A, JURKOVITZ C T, PERGOLA P, et al. Independent components of chronic kidney disease as a cardiovascular risk state: results from the Kidney Early evaluation program (KEEP) [J]. *Arch Intern Med*, 2007,167(11):1122-1129.
- [7] 张丽,戴勇. 慢性肾功能不全患者心血管病变的研究 [J]. 医学综述, 2008,14(2):243-244.
- [8] TOUSOULIS D, KAMPDIAM, STEFANADIE, et al. New biochemical markers in acute coronary syndromes [J]. *Curr Med Chem*, 2008,15(13):1288-1296.
- [9] ZAKYNTHINOS E, PAPPAS N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease [J]. *J Cardiol*, 2009,53(3):317-333.
- [10] 唐良秋, 万槐斌. C反应蛋白和心血管疾病研究新进展[J]. 广东医学, 2010,31(7):923-924.  
(2010-11-17 收稿)
- 
- (上接第 40 页)
- [2] 张济周,杨梁梓,李青. 中西医对肺纤维化发病机制的研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2008,31(9):75-76.
- [3] KOSLOWSKI R, KNOCH K, WENZEL K W. Proteinases and proteinase inhibitors during the development of pulmonary fibrosis in rat[J]. *Clin Chim Acta*, 1998,271:45-56.
- [4] 李杰平,张平,张书杰,等. 实验性肺纤维化大鼠肺组织Cathepsin B表达的动态变化[J]. 中国现代医学杂志, 2008,15(1):65-68.
- [5] SZAIPIIL S V, ELSON N A, FULMER J D. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979,120:893.
- [6] 李晓宇,郝海平,王广基,等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物, 2008,6(5):377-381.
- [7] 魏均娴,杜元冲. 三七—现代科学研究及应用[M]. 昆明:云南科技出版社, 1996:384-385.
- [8] 李青,詹青. 注射用血塞通(络泰)对肺心病脏器损伤的保护作用的病理学研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004,11(3):130-132.
- [9] 赵国厚,李青. 血塞通(络泰)对肺心病急性加重期组织器官损伤的保护和治疗作用研究[J]. 中华实用医学杂志, 2004,3(4):314-315.  
(2010-10-03 收稿)