

# 麦冬须根清肺饮产品 治疗大鼠肺纤维化的实验报告

实验时间：2021.12-2024.05

实验人员：杜金宇、周芮、安丽萍

实验单位(盖章)：四川中医药高等专科学校



## 研究目的:

揭示麦冬须根清肺饮产品对大鼠实验性肺纤维化的干预作用。

### 1. 材料

1.1 实验动物及药物: 麦冬须根清肺饮固体饮料和含片【来源于申报的“一种麦冬须根清肺饮组合物”发明专利技术, 以下简称: 多元麦冬须根产品】由四川德培源中药科技开发有限公司提供; 吡非尼酮(国药准字: H20133376, 北京康蒂尼药业股份有限公司); SPF 级雄性 SD 大鼠(体质量 180g+20 g), 购于成都达硕实验动物有限公司, 动物许可证号: SCXK(川) 2020-030。

1.2 主要试剂: 博来霉素(批号: S121418, 美国 Selleckchem 公司); 动物总 RNA 提取试剂盒(货号: NO.RE-03014, 成都福际生物技术有限公司); miRNA 第一链 cDNA 合成(茎环法)试剂盒(货号: B532453, 上海生工生物工程股份有限公司); 引物(上海生工生物工程股份有限公司); AccuRT 基因组 DNA 去除试剂盒、EvaGreen Express 2X qPCR MasterMix-No Dye(货号: G492、MasterMix-ES, 爱必梦生物科技有限公司); TGF- $\beta$  1 ELISA 试剂盒(批号: FRM5D1L495, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); HYP 生化试剂盒(批号: 20220419, 南京建成科技有限公司)。

### 2. 方法

2.1 动物分组、造模、给药及标本采集: SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为 6 组, 每组 6 只, 分别为: A. 假手术组、B. 博来霉素组(模型)、C. 吡非尼酮组(阳性对照)、D. 多元麦冬须根产品低剂量组、E. 多元麦冬须根产品中剂量组、F. 多元麦冬须根产品高剂量组。戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉动物, 采用气管插管注射法建立肺纤维化大鼠模型, 博来霉素使用剂量为 5 mg/kg。假手术组气管插管后注入等量生理盐水。造模第 2 天开始药物灌胃干预。吡非尼酮组灌胃吡非尼酮(100 mg/kg); 多元麦冬须根产品低中高剂量组分别灌胃麦冬产品 1.06g/kg、2.13g/kg、4.26g/kg; 假手术组和模型组灌胃等量生理盐水; 每天灌胃 1 次, 持续干预 28 天。末次给药后禁食禁水 8h, 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 腹主动脉采血, 分离血清用于 ELISA 检测; 开胸取肺组织, 左肺固定于 4%多聚甲醛中, 用于 HE 染色和 Masson 染色; 右肺冻存, 用于 RT-qPCR 检测。

## 2.2 HE 和 Masson 染色

将固定好的肺组织用石蜡包埋、切片。按试剂盒说明书进行 HE 染色、Masson 染色，包括脱蜡、染色、透明和封片等步骤。

## 2.3 RT-qPCR 检测

肺组织标本解冻后，取米粒大小，加入匀浆剂研磨后收集匀浆上清提取总 RNA。检测 RNA 浓度合格后进行逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行扩增，引物序列见表 1，PCR 扩增条件：95℃ 预变性 10min，95℃ 变性 10s，60℃ 退火延伸 30 s，40 个循环。以 GAPDH 作为内参，采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	正向: ACAGCAACAGGGTGGTGGAC
	反向: TTTGAGGGTGCAGCGAACTT
Collagen I	正向: TGTTGGTCCTGCTGGCAAGAATG
	反向: GTCACCTTGTTTCGCCTGTCTCAC
Collagen III	正向: AGTCGGAGGAATGGGTGGCTATC
	反向: CAGGAGATCCAGGATGTCCAGAGG
$\alpha$ -SMA	正向: GCCACTGCTGCTTCCTCTTCTTC
	反向: CCCGCCGACTCCATTCCAATG
TGF- $\beta$ 1	正向: GACCGCAACAACGCAATCTATGAC
	反向: CTGGCACTGCTTCCCGAATGTC

## 2.4 ELISA 检测

取大鼠血清，按 ELISA 试剂操作盒说明书进行检测，使用酶标仪测定 450 nm 最大吸收波长，参照标准曲线计算蛋白含量。

## 2.5 生化检测

取大鼠血清和肺组织匀浆上清，采用全自动生化分析仪检测 HYP 含量。

## 3. 结果

### 3.1 HE 和 Masson 染色结果

如图 1-2 所示，大鼠肺组织 HE 染色和 Masson 染色显示，假手组肺脏整体结构较完整，肺泡结构清晰，肺泡间隔无增厚，除支气管和血管周围，其余部位无明显蓝色胶原沉积。模型组大鼠肺结构破坏较严重，肺泡壁断裂，间隔明显增厚，肺泡腔减小，结构紊乱，可见大量炎性细胞浸润，支气管周围及肺泡间隔有较多



蓝色胶原。吡非尼酮组大鼠肺结构与模型组相比得到改善，大部分区域肺泡结构完整，无明显蓝色胶原，少部分区域肺泡间隔增厚。多元麦冬须根产品低中高不同剂量组与模型组比较，大鼠肺泡结构均得到明显改善，肺泡间隔增厚和胶原沉积均较模型组减轻。

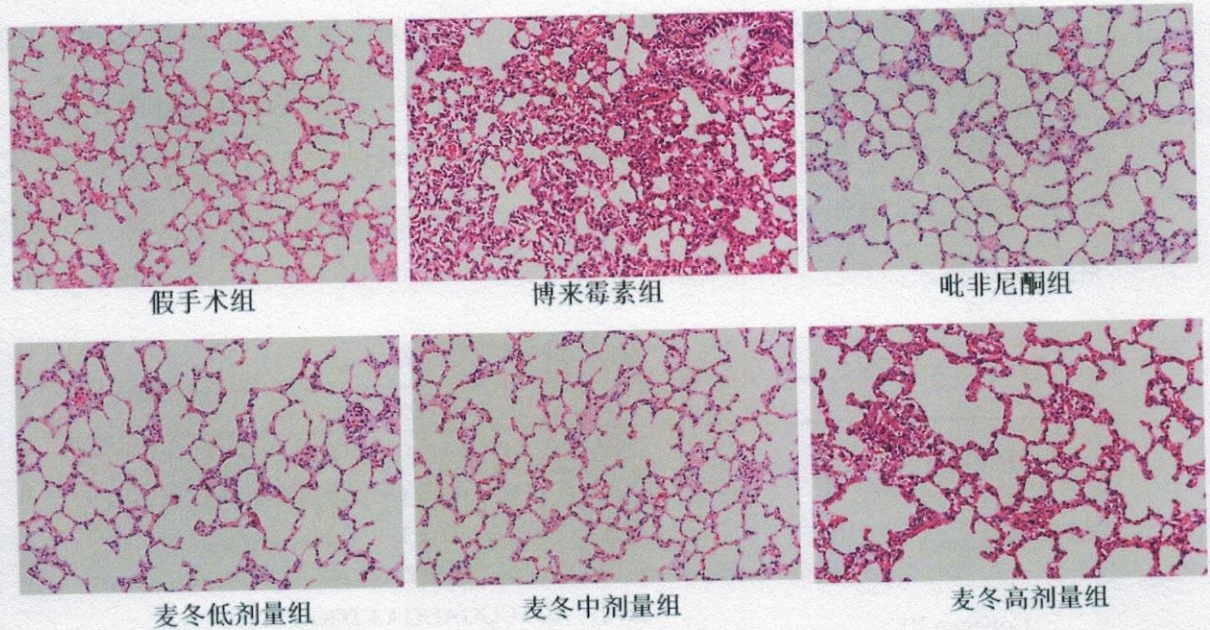


图 1. 肺纤维化大鼠肺脏 HE 染色 (X 200)

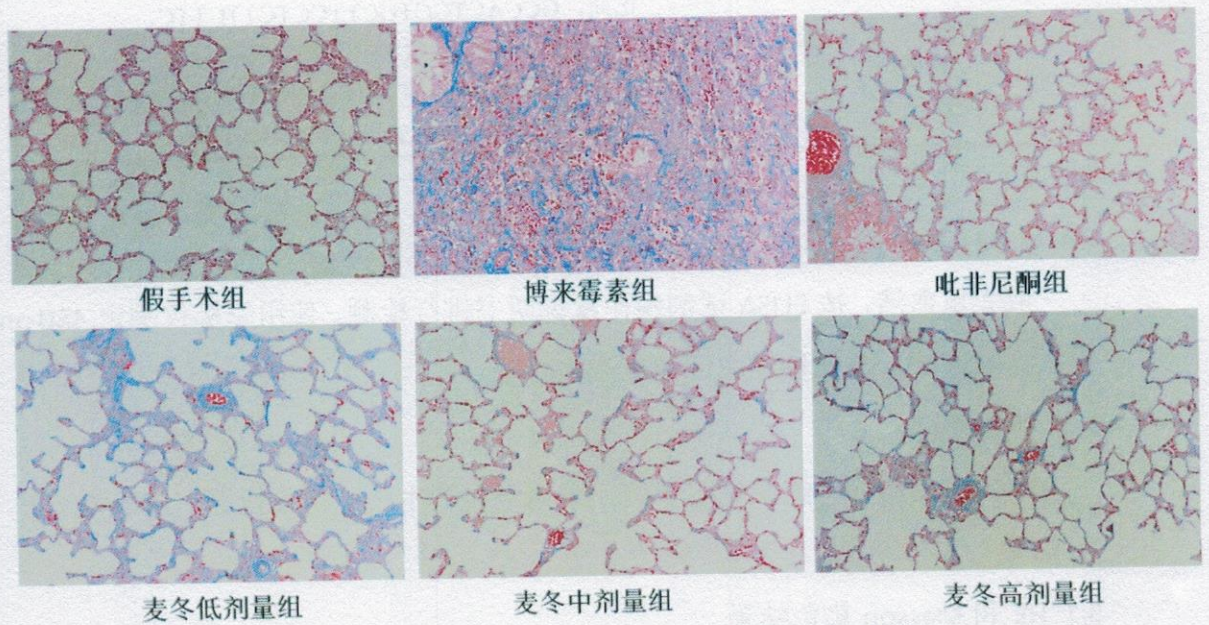


图 2. 肺纤维化大鼠肺脏 Masson 染色 (X 200)

### 3.2 RT-qPCR 结果

如图 3 所示，博来霉素气管滴注后可诱导大鼠肺内 TGF- $\beta$ 1、Collagen I、Collagen III、 $\alpha$ -SMA 等肺纤维化相关因子的表达显著增加，与空白组比较，

$P < 0.0001$ 。使用吡非尼酮和多元麦冬须根产品治疗后，均可显著降低这些纤维化因子的表达，与博来霉素组比较， $P < 0.05$ 。

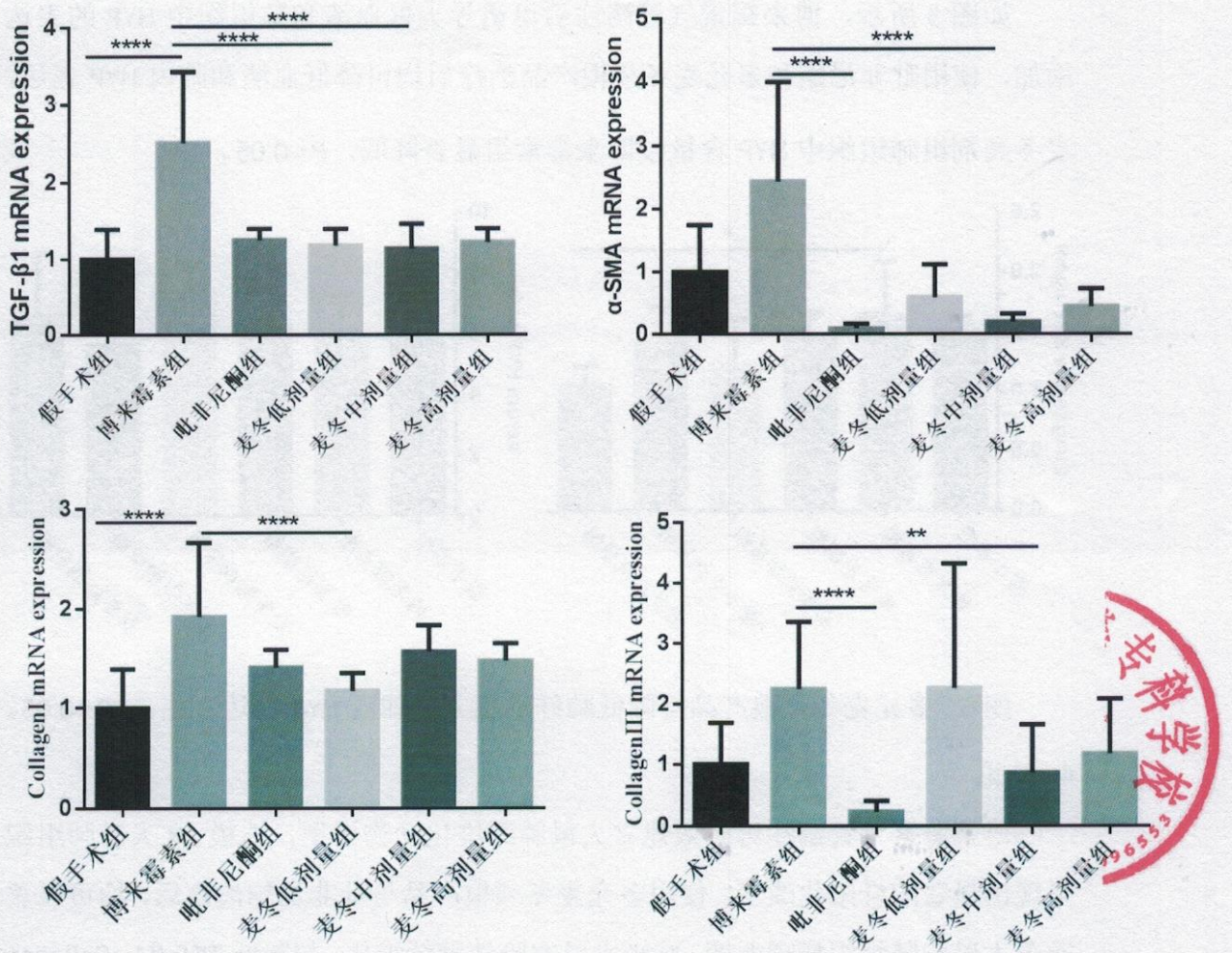


图 3. 多元麦冬须根产品可降低肺纤维化大鼠肺内 TGF-β1、Collagen I、Collagen III、α-SMA 的 mRNA 表达。注：\*\*\*\* $P < 0.0001$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

### 3.3 ELISA 结果

如图 4 所示，博来霉素气管滴注后可诱导大鼠血清中 TGF-β1 的表达增加，使用吡非尼酮和多元麦冬须根产品治疗后均可降低血清中 TGF-β1 表达，结果不具有显著性差异。

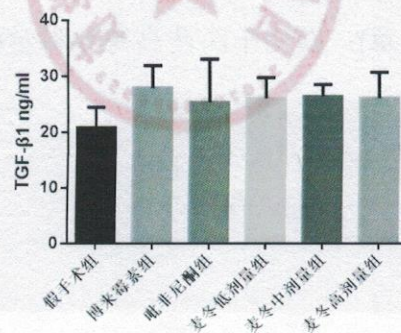


图 4. 多元麦冬须根产品可降低肺纤维化大鼠血清中 TGF-β1 表达

### 3.4 生化结果

如图 5 所示，博来霉素气管滴注后可诱导大鼠血清和肺组织中 HYP 的表达增加，使用吡非尼酮和多元麦冬须根产品治疗后均可降低血清和肺内 HYP 表达，麦冬高剂组肺组织中 HYP 含量较博来霉素组显著降低， $P < 0.05$ 。

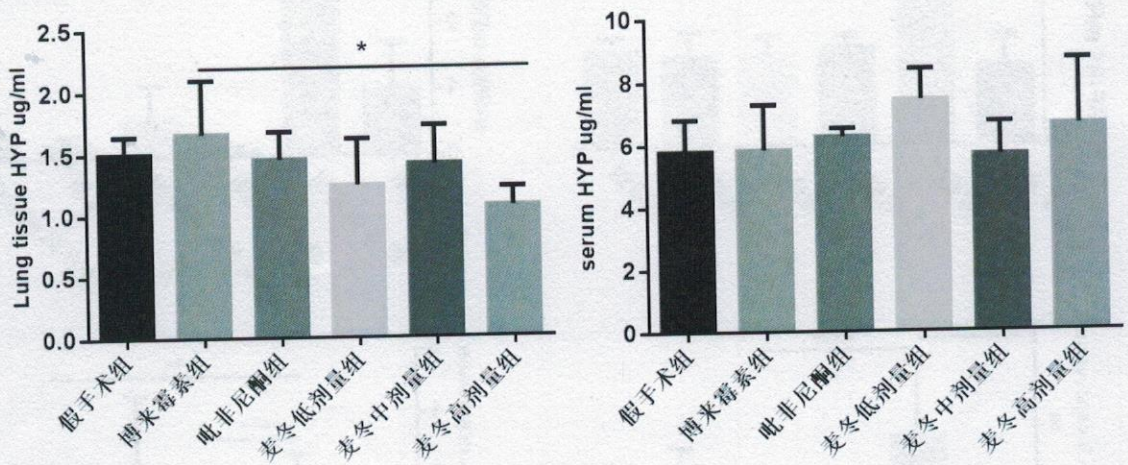


图 5. 多元麦冬须根产品可降低肺纤维化大鼠肺内 HYP 表达。注：\* $P < 0.05$ 。

### 4. 结论

博来霉素气管滴注可有效建立大鼠肺纤维化动物模型，造模 28 天后肺组织呈现出显著的纤维化改变。使用多元麦冬须根产品与吡非尼酮治疗后，均可显著改善大鼠的肺组织病理改变，减轻大鼠实验性肺纤维化，与降低 TGF-β1、Collagen I、Collagen III、α-SMA、HYP 等纤维化因子的表达相关。

实验报告人员（签字）：

实验单位(盖章)：四川中医药高等专科学校

2024 年 7 月 8 日