

美洲大蠊提取物对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的疗效研究

胡侃¹, 杨永寿¹, 何正春², 肖培云^{2*} (1.大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000; 2.云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

摘要: 目的 探讨美洲大蠊抗肺纤维化活性提取物(ML-HB)对博来霉素诱导肺纤维化大鼠的保护作用。方法 将SD雄性大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(地塞米松 3 mg·kg⁻¹, qd)及ML-HB高、中、低剂量组(120, 60, 30 mg·kg⁻¹, qd), 采用气管暴露式注入博来霉素(5 mg·kg⁻¹)制备大鼠肺纤维化模型, 造模24 h后经腹腔给药干预。给药第30天处死大鼠, 测定肺指数, ELISA法检测肺匀浆中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)的表达, 紫外法检测羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)的表达, HE染色观察肺组织炎症病变, Masson染色判定肺纤维化程度, 免疫组化法观察 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)与I型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)的表达。结果 与正常组比, 模型组肺指数和TNF- α 、TGF- β 1、HYP表达均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肺组织炎症和肺纤维化程度较严重, α -SMA与COL-I的表达均升高。ML-HB中剂量组较模型组肺指数和TNF- α 、TGF- β 1、HYP表达均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肺组织炎症和肺纤维化程度减轻, α -SMA与COL-I的表达均降低。结论 ML-HB可降低TNF- α 、TGF- β 1、HYP、 α -SMA和COL-I的表达, 延缓肺组织病变、干预纤维化的进一步发展。

关键词: 美洲大蠊; 活性提取物; 肺纤维化; 博来霉素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)02-0129-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.02.001

引用本文: 胡侃, 杨永寿, 何正春, 等. 美洲大蠊提取物对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的疗效研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(2): 129-133.

Effect of *Periplaneta Americana* Extract on Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats

HU Kan¹, YANG Yongshou¹, HE Zhengchun², XIAO Peiyun^{2*} (1.College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China; 2.Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Dali 671000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of anti-pulmonary fibrosis active extract from *Periplaneta Americana*(ML-HB) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into normal group, model group, positive group(dexamethasone, 3 mg·kg⁻¹, qd) and ML-HB high, middle and low dosages groups (120, 60, 30 mg·kg⁻¹, qd). The pulmonary fibrosis model was established through tracheotomy with bleomycin(5 mg·kg⁻¹). The rats were intervened by treating with intraperitoneal administration after modeling 24 h. The rats were sacrificed on the 30th day after administration, lung index was determined, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and transforming growth factor- β 1(TGF- β 1) in lung homogenate were detected by ELISA, hydroxyproline(HYP) was detected by UV, the inflammatory lesions of lung tissue was observed by HE staining, the degree of pulmonary fibrosis was determined by Masson staining, and α -smooth muscle actin(α -SMA) and type I collagen(COL-I) were observed by immunohistochemical staining. **RESULTS** Compared with the normal group, the model group showed higher lung index, and higher expression of TNF- α , TGF- β 1 and HYP($P < 0.05$ or $P < 0.01$), lung tissue inflammation and pulmonary fibrosis were serious, α -SMA and COL-I expression were elevated. Compared with the model group, the ML-HB middle dosage group showed lower lung index, and lower expression of TNF- α , TGF- β 1, and HYP($P < 0.05$ or $P < 0.01$), lung tissue inflammation and pulmonary fibrosis were alleviated, α -SMA and COL-I expression were decreased. **CONCLUSION** ML-HB can reduce the expression of TNF- α , TGF- β 1, HYP, α -SMA and COL-I, and delay lung tissue lesions, interfere with the further development of fibrosis.

KEYWORDS: *Periplaneta Americana*; active extract; pulmonary fibrosis; bleomycin

肺纤维化一直是困扰人类的顽疾, 症状主要表现为运动性呼吸困难、干咳等, 是以弥漫性的肺泡炎、肺间质炎症和间质纤维化为组织学特点的一组疾病群, 至今尚无能逆转肺纤维化的药物^[1]。

最新研究^[2]发现, 某些药物治疗肺纤维化的机制可能是通过减少自由基的产生, 增加自由基的清除使体内氧化-抗氧化系统恢复平衡, 减轻脂质过氧化, 降低中性粒细胞积聚实现的。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360634, 81560634); 云南省科技计划项目(2015FA025)

作者简介: 胡侃, 男, 实验师 Tel: 13628721615 E-mail: 777224@qq.com *通信作者: 肖培云, 女, 教授, 硕士 Tel: 13887219065 E-mail: xpy990120@126.com

美洲大蠊(*Periplaneta Americana*)为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属, 始载于《神农本草经》^[3], 研究^[4-5]表明, 美洲大蠊提取物具有清除自由基和抑制脂质过氧化的作用, 过氧化反应能促进纤维化性疾病的发展, 故美洲大蠊有望通过抑制机体过氧化反应达到抑制肺纤维化的目的。体外实验研究发现^[6], 美洲大蠊提取物 ML-HB 能显著抑制人胚肺成纤维细胞(human embryonic lung fibroblast, HEL)生长, 本实验拟在前期研究^[7]的基础上, 通过博来霉素(bleomycin, BLM)复制大鼠肺纤维化模型, 研究 ML-HB 对 BLM 致大鼠肺纤维化的干预作用, 为美洲大蠊抗肺纤维化的研究打下基础。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠, ♂, 60 只, 体质量 180~200 g, 批号: 20160911; 许可证号: SCXK(湘)2013-0004, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 饲养环境符合 GB14952-2010《实验动物环境及设施》有关无特定病原体级的要求。

1.2 试剂

大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号: R160729-102a)、大鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)ELISA 试剂盒(批号: R160831-107a)均购于欣博盛生物科技有限公司; 鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体、兔抗 I 型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)多克隆抗体均购于英国 Abcam 公司; 注射用 BLM(日本化药株式会社产品, 批号: Y50512; 规格: 每支 15 mg); 戊巴比妥钠(德国 Sigma 公司); 美洲大蠊抗肺纤维化活性提取物 ML-HB(笔者所在实验室自制, 冻干粉); 地塞米松磷酸钠注射液(遂成药业有限公司, 国药准字: H41021255; 规格: 5 mg·mL⁻¹)。

1.3 仪器

RHY III 组织切片机、BMJ-III 组织包埋机及 PHY-III 病理组织漂烘仪均来自江苏省常州市中威电子仪器有限公司; ASP-300S 自动脱水机(德国 Leica 公司); CKX41SF 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); SN255939 型连续波长酶标仪(美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 模型制备

腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠(0.2 mL·kg⁻¹), 仰卧手术台, 固定大鼠头部及四肢, 于颈部正中脱去毛发, 常规消毒后, 用手术剪剪开

颈部皮肤, 手术刀颈正中切口, 分离颈部两侧肌肉, 暴露出气管, 用 1 mL 注射器刺入大鼠气管软骨环间隙, 迅速注入 BLM 生理盐水溶液(5 mg·kg⁻¹)。正常组大鼠相同条件下注入等体积生理盐水。药物注入后立即将大鼠直立, 有频率地轻揉大鼠胸部, 使药液充分扩散, 缝合、消毒, 将大鼠以仰卧位放置于笼中, 保持呼吸顺畅, 清醒后于清洁级动物房常规饲养。

2.2 分组与给药

随机将 SD 大鼠分为模型组, ML-HB 高、中、低剂量组, 阳性组, 正常组, 每组 10 只, 按“2.1”项下方法造模 24 h 后腹腔注射给药, ML-HB 高、中、低剂量组分别给予 120, 60, 30 mg·kg⁻¹ 的 ML-HB 生理盐水溶液, 阳性组给予 3 mg·kg⁻¹ 的地塞米松溶液, 模型组给予等体积的生理盐水, 正常组正常饲养。

2.3 处死与肺组织表征情况

连续给药第 30 天后处死大鼠, 取肺用生理盐水洗净, 吸水纸吸干并称重。按公式(1)测定肺指数, 取左肺固定于 10% 中性甲醛溶液中, 精密称取右肺 0.4 g, 制成 10% 肺组织匀浆液, 离心取上清, -80 °C 保存备用。紫外法检测羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)的表达, ELISA 法检测匀浆液中的 TNF- α 和 TGF- β 1 含量, 按试剂盒说明书操作测定。

$$\text{肺指数}(\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{肺湿重}}{\text{体质量}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4 病理标本制备

将左肺组织从 10% 中性甲醛溶液中取出, 取相同部位用石蜡包埋, 制作厚度为 5 μ m 的切片, HE 染色观察肺组织炎症病变, Masson 染色判定肺纤维化程度, 并以 Szapiel 等^[8]的半定量法进行评分, 利用 HE 染色将肺泡炎分为 4 级, 用 Masson 染色将肺纤维化分为 4 级, 见表 1。免疫组化染色观察肺组织中 α -SMA 与 COL-I 的表达。

2.5 统计学分析

实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组与组之间的比较采用秩和检验(Mann-Whitney), 多个样本均数间的两两比较用最小显著差法, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义, 以 $P < 0.01$ 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 ML-HB 对大鼠肺指数、HYP、TGF- β 1、TNF- α 的影响

与正常组相比, 模型组的肺脏指数、TGF- β 1 含量及 TNF- α 含量显著升高($P < 0.01$), HYP 含量

表1 肺泡炎症程度和肺纤维化程度分级标准

Tab. 1 Grading criteria for alveolar inflammation and pulmonary fibrosis

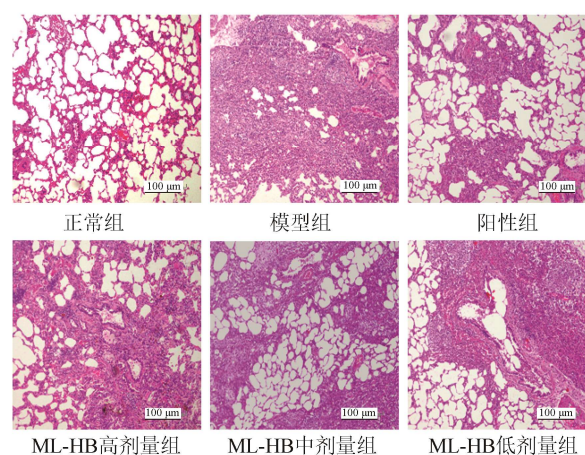
等级	HE 染色肺泡炎评分标准	Masson 染色肺纤维化评分标准
0	无肺泡炎	无肺纤维化
1	轻度肺泡炎, 单核细胞浸润导致肺泡隔增宽, 局部以及近胸膜部, 受累面积小于全肺的 20%, 肺泡结构无异常	轻度肺纤维化, 受累面积小于全肺的 20%
2	中度肺泡炎, 受累面积占全肺的 20%~50%, 近胸膜部受累较为严重	中度肺纤维化, 受累面积占全肺的 20%~50%
3	重度肺泡炎, 受累面积>50%, 偶见肺泡腔内有单核细胞及出血造成的实质性病变	重度肺纤维化, 受累面积>50%, 肺泡结构紊乱

升高($P<0.05$)。与模型组相比, 阳性组与 ML-HB 中剂量组肺指数降低($P<0.05$), ML-HB 高、低剂量组肺指数降低无统计学差异; 阳性组与 ML-HB 中剂量组 HYP 含量显著降低($P<0.01$), ML-HB 高、低剂量组 HYP 含量也降低($P<0.05$); ML-HB 高、中、低剂量组 TGF- β 1 含量降低($P<0.05$), 阳性组 TGF- β 1 含量显著降低($P<0.01$); 阳性组与 ML-HB 中剂量 TNF- α 含量显著降低($P<0.01$), ML-HB 高、低剂量组 TNF- α 含量降低($P<0.05$)。结果见表 2。

3.2 对大鼠肺组织病理学变化的影响

3.2.1 对 HE 染色的影响 正常组肺组织未见炎症细胞浸润和肺实质胶原沉积, 肺泡结构完整且肺泡壁薄而细。模型组肺泡结构明显破坏, 肺泡壁塌陷融合成一个大空腔结构, 肺泡壁增生变厚, 有明显肺部炎症病变, 邻近肺泡内有大量的淋巴细胞巨噬细胞聚集、浸润。阳性组肺损伤程度减轻, 肺实变现象轻微, 有正常的肺泡结构, 评分结果显示, 阳性组与模型组相比有显著性差异($P<0.01$)。ML-HB 高剂量组肺泡炎受累面积小于

模型组, 评分结果显示与模型组相比差异无统计学意义。ML-HB 中、低剂量组有完整肺泡结构, 病变范围主要集中气管及支气管周围, 且肺炎症较轻、肺实变受累面积小, 与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 1 和表 3。

图1 ML-HB 对大鼠肺组织 HE 染色的影响(100 $\times$)Fig. 1 Effect of ML-HB on HE staining of rats' lung tissue(100 $\times$)表2 ML-HB 对大鼠肺指数、HYP、TGF- β 1、TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab. 2 Effect of ML-HB on lung index, HYP, TGF- β 1, TNF- α in rats($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肺指数/g·g ⁻¹	HYP/ μ g·mL ⁻¹	TGF- β 1/ng·mL ⁻¹	TNF- α / μ g·mL ⁻¹
正常组	—	0.582 6 $\pm$ 0.035 9	3.426 4 $\pm$ 0.414 4	2.061 8 $\pm$ 0.778 4	0.352 8 $\pm$ 0.094 1
模型组	—	1.018 5 $\pm$ 0.128 0 ²⁾	4.115 5 $\pm$ 0.477 4 ¹⁾	4.888 3 $\pm$ 1.830 7 ²⁾	0.659 8 $\pm$ 0.101 5 ²⁾
阳性组	3	0.808 4 $\pm$ 0.139 1 ³⁾	3.359 8 $\pm$ 0.654 2 ⁴⁾	2.543 8 $\pm$ 1.205 3 ⁴⁾	0.388 4 $\pm$ 0.120 4 ⁴⁾
ML-HB 高剂量组	120	0.908 0 $\pm$ 0.378 1 ¹⁾	3.504 1 $\pm$ 0.671 9 ³⁾	3.091 0 $\pm$ 1.260 8 ³⁾	0.512 3 $\pm$ 0.110 3 ¹⁾³⁾
ML-HB 中剂量组	60	0.871 3 $\pm$ 0.254 2 ¹⁾³⁾	3.085 7 $\pm$ 0.290 5 ⁴⁾	2.825 6 $\pm$ 1.352 4 ³⁾	0.456 2 $\pm$ 0.098 5 ¹⁾⁴⁾
ML-HB 低剂量组	30	0.944 9 $\pm$ 0.261 7 ¹⁾	3.439 7 $\pm$ 0.651 1 ³⁾	3.068 8 $\pm$ 1.066 0 ³⁾	0.580 1 $\pm$ 0.118 1 ²⁾³⁾

注: 与正常组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组相比, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the model group, ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$.

表3 HE 染色肺泡炎评分结果($n=10$)Tab. 3 Results of HE staining score of alveolar inflammation($n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	等级				Mann-Whitney 检验 P 值
		0	1	2	3	
正常组	—	10	0	0	0	0.000
模型组	—	0	2	6	2	1.000
阳性组	3	2	6	2	0	0.009
ML-HB 高剂量组	120	1	5	4	0	0.063
ML-HB 中剂量组	60	1	6	3	0	0.029
ML-HB 低剂量组	30	0	7	3	0	0.035

3.2.2 对 Masson 染色的影响 正常组肺泡结构正常, 只有少许着色, 没有纤维化组织。模型组肺泡结构异常, 肺实变部位胶原大量沉积, 胶原纤维聚集成束成团。阳性组肺纤维化程度减轻, 可见正常的肺泡结构, 同时胶原纤维着色浅、分布范围小, 由评分结果可知, 与模型组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。ML-HB 中、低剂量组胶原染色较浅, 肺实变受累面积小, 未见成团成束的

纤维性结节，与模型组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。ML-HB 高剂量组肺纤维化程度减轻，评分结果显示与模型组相比差异无统计学意义。Masson 染色结果见表 4 及图 2。

表 4 大鼠肺组织 Masson 染色评分结果($n=10$)

Tab. 4 Results of Masson staining score of lung tissue in rats ($n=10$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	等级				Mann-Whitney 检验 P 值
		0	1	2	3	
正常组	—	10	0	0	0	0.000
模型组	—	0	1	4	5	1.000
阳性组	3	1	5	3	1	0.029
ML-HB 高剂量组	120	0	6	2	2	0.075
ML-HB 中剂量组	60	1	6	2	1	0.015
ML-HB 低剂量组	30	0	4	6	0	0.043

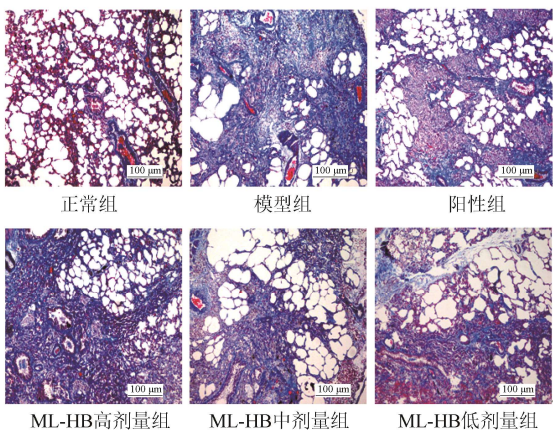


图 2 ML-HB 对大鼠肺组织 Masson 染色的影响($100\times$)

Fig. 2 Effect of ML-HB on Masson staining of rats' lung tissue($100\times$)

3.2.3 对 α -SMA 的影响 α -SMA 免疫组化结果表明，正常组肺泡结构正常，只有少量的 α -SMA 表达。模型组肺纤维化严重，在肺实变部位的细胞间隙液中、支气管、细支气管的管腔有大量的强阳性表达。与模型组相比，未见细胞间隙液有明显的阳性表达，其中 ML-HB 中剂量组对 α -SMA 表达的抑制作用最为明显，结果见图 3。

3.2.4 对 COL-I 的影响 COL-I 免疫组化结果显示，正常组肺泡结构正常，只有少量的 COL-I 表达。模型组肺间质及细胞外基质中呈阳性表达。与模型组相比，COL-I 在阳性组及 ML-HB 高、中、低剂量组肺组织中的表达均明显降低。其中阳性组及 ML-HB 中剂量组染色结果发现细胞外基质未见 COL-I 大量沉积，故阳性组及 ML-HB 中剂量对 COL-I 表达的抑制作用最为明显，结果见图 4。

4 讨论

胶原纤维主要是由成纤维细胞分泌的胶原蛋

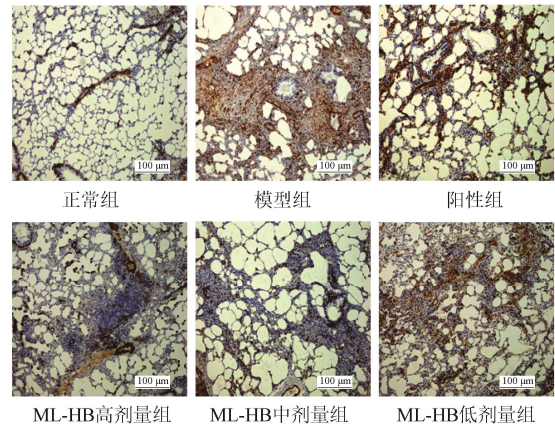


图 3 ML-HB 对大鼠肺组织 α -SMA 免疫组化染色的影响($100\times$)

Fig. 3 Effect of ML-HB on immunohistochemical staining of α -SMA in rats' lung tissue($100\times$)

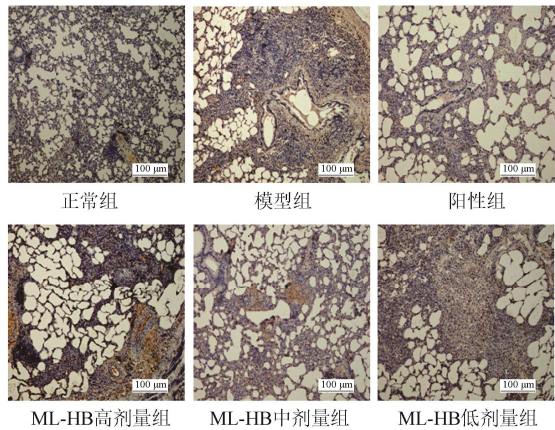


图 4 ML-HB 对大鼠肺组织 COL-I 免疫组化染色的影响($100\times$)

Fig. 4 Effect of ML-HB on immunohistochemical staining of COL-I in rats' lung tissue($100\times$)

白于细胞外聚集黏合而成，而胶原蛋白中含量最多的就是 HYP，测定肺组织中 HYP 的含量可更直观地反映大鼠肺组织胶原代谢情况^[9]。细胞外基质在肺间质异常沉积是导致肺纤维化最直接的原因^[10]，TGF- β 1 是一种细胞外基质的沉积促进剂，是参与组织修复和发生器官纤维化的因子，有调节多种细胞的增殖、分化和移行及功能，其含量与肺纤维化严重程度相关^[11]。TNF- α 是一种前炎症细胞因子，能刺激中性粒细胞及嗜酸性细胞产生超氧化物，释放溶酶体酶，对于周围细胞产生不良反应，并能产生胶原及细胞外基质成分，促进纤维化进程^[12]。同时介导其他细胞因子和炎症因子的表达，增强损伤肺炎症细胞浸润，介导肺泡炎症反应，并刺激成纤维细胞增殖，促进胶原合成^[13]，肌成纤维细胞的表达是肺纤维化的重要标志，能特异性表达 α -SMA，促进细胞外基质的沉积，并

形成成纤维细胞灶^[14]，肌成纤维细胞大量增生和长期存在都能加重纤维化，而细胞外基质结构变化及沉积均能调控多种炎症细胞的表达，加速纤维化的进程^[15]。故可以通过观察 α -SMA 的表达情况来判断肌成纤维细胞在肺组织中的活化情况，据此判断肺纤维化形成情况。而由肌成纤维细胞分泌的 I、III 型胶原蛋白在肺纤维化的形成过程中在细胞外基质中占主导地位，能促进细胞外基质沉积，加快肺纤维化。免疫组化是以免疫学的抗原抗体反应为原理，常用于临床上一些恶性肿瘤的诊断、鉴别及发病机制的研究^[16]，免疫组化不仅能观察到组织病变与该抗原的关系，还有助于了解疾病的发病机制和病理过程。本实验利用免疫组化技术研究 α -SMA 及 COL-I 在肺纤维化大鼠肺组织中的表达情况，以期探索 ML-HB 对 BLM 致纤维化大鼠肺组织中 α -SMA 及 COL-I 表达的影响。

由实验结果可知，模型组大鼠肺指数远大于正常组，解剖发现其肺表面呈浅灰白色，有明显的肥大变形，手触之较硬且有异物感，部分出现淤血，呈明显的炎性肺水肿。用药后肺指数减小，水肿程度降低，HPY、TGF- β 1、TNF- α 的表达也较正常组高，表明造模成功。与模型组相比，ML-HB 高、中、低剂量组的肺指数和 HPY、TGF- β 1、TNF- α 的表达均有一定程度的降低，呈“U”分布，且中剂量组治疗效果最好，低剂量组次之，高剂量组较差。ML-HB 高剂量组对大鼠的治疗效果相对较差，可能是由于腹腔注射给药剂量过大，增加了大鼠的吸收、代谢负担，而低剂量组用药量太少，治疗作用不理想，因此，最佳给药剂量范围有待进一步研究。HE、Masson 染色及其评分结果以及 α -SMA 和 COL-I 免疫组化结果亦显示，ML-HB 高、中、低剂量组肺组织中的阳性表达均明显降低。但 HE、Masson 染色结果为高剂量组治疗效果最佳，免疫组化染色为中剂量组最佳，这可能与染色方法之间存在差异有关。国外研究表明^[17]，免疫染色法更为可靠，具有可重复性，易操作，更能直观显示阳性结果。而 HE、Masson 染色需要熟练的技术，过染和染色不足均会影响结果的判断，特别是肺组织只有少量包囊时，操作或阅片失误均会影响实验结果，因此，认为中剂量组的治疗效果优于高剂量组。

ML-HB 能通过抑制 HYP、TGF- β 1、TNF- α 、 α -SMA、COL-I 的表达，其作用机制可能是抑制了炎症细胞浸润及巨噬细胞在肺泡附近的增殖和聚

集，降低肌成纤维细胞的增殖及细胞外基质沉积，从而达到减缓肺纤维化的作用。肺纤维化的形成是一个复杂的过程，其对 HYP、TGF- β 1、TNF- α 、 α -SMA、COL-I 等相关因子的调控作用有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] 牛建昭, 黄长恩. 器官纤维化基础及中医药防治[M]. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 271-319.
- [2] 范龙梅. 氨基胍和厄多司坦对博来霉素致大鼠肺纤维化的干预作用及机制[D]. 河北: 河北医科大学, 2008.
- [3] 孙星衍. 神农本草经[M]. 北京: 商务印书馆, 1955: 90.
- [4] TANG X G, ZHANG C M, LIU J, et al. Research of the effect of *Periplaneta Americana* different extracts on scavenging free radical and anti-lipid peroxidation [J]. Sci Technol Food Indust(食品工业科技), 2016, 37(13): 83-91.
- [5] 焦春香, 张成桂, 刘光明, 等. 美洲大蠊提取物中抗衰老活性部位抗氧化活性的初步分析[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(6): 1389-1391.
- [6] 满红霞. 美洲大蠊抗肺纤维化活性部位筛选及作用机制初步研究[D]. 云南: 大理大学, 2016: 35-60.
- [7] MAN H X, YANG Y S, XIAO P Y. The effects of *Periplaneta americana* on the human embryonic lung fibroblast and preliminary mechanism research [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2018, 29(9): 2150-2153.
- [8] 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): 893-899.
- [9] GAO Y J, LI L C, XU L, et al. Advances of active components in traditional Chinese medicine for treating pulmonary fibrosis and the preventive mechanisms [J]. Clin J Tradit Chin Med(中医临床杂志), 2018, 30(2): 183-190.
- [10] LEKKERKERKER A N, AARBIOU J, VAN ES T, et al. Cellular players in lung fibrosis [J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(27): 4093-4102.
- [11] YOU X Y, XUE Q, FANG Y, et al. Preventive effects of *Ecliptae Herba* extract and its component, ecliptasaponin A, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2015(175): 172-180.
- [12] YU L, LIU Y J. TNF alpha and TGF- β 1 and the research progress of pulmonary fibrosis [J]. J Clin Med Pract(实用医院临床杂志), 2012, 9(3): 163-165.
- [13] HE X Q, LIU X J. Dynamic expression and significance of TNF- α in mice with pulmonary fibrosis [J]. Pro Clin Med(临床医药实践), 2010, 19(5A): 330-333.
- [14] LI F, LI L, REN F Y, et al. Effects of different degrees of intermittent hypoxia on the activation and the extracellular matrix secretion of mouse lung fibroblast cells [J]. Tianjin Med J(天津医药), 2017, 45(1): 9-12.
- [15] CHEN Q, XIONG X D. Progress of immunocyte in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(10): 1586-1590.
- [16] ZHANG W Q. The application of immunohistochemistry in pathological diagnosis [J]. Anhui Pharm Med J(安徽医药), 2012, 16(1): 1700-1702.
- [17] ELVIN K, LINDER E. Application and staining patterns of commercial anti-pneumocystis carinii monoclonal antibodies [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8): 2222-2224.

收稿日期: 2019-01-22

(本文责编: 李艳芳)