

石荠苎总黄酮对博来霉素致大鼠肺纤维化的治疗作用及其机制

吕昂^{1,2}, 王海红^{1,2}, 俞文英³, 张欢欢³, 方杰³, 金晓音³, 余陈欢³ (1.南京医科大学附属杭州医院药学部, 杭州 310006; 2.杭州市第一人民医院药学部, 杭州 310006; 3.浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 观察石荠苎总黄酮(MSF)对博来霉素致大鼠肺纤维化的干预作用, 并初步探讨其机制。方法 60只SD大鼠随机分为正常组, 模型组, 阳性对照组, MSF低、中、高剂量组, 气道注射博来霉素(5 mg·kg⁻¹)制备大鼠肺纤维化模型。造模14 d后, 阳性对照组给予2 mg·kg⁻¹醋酸泼尼松, MSF低、中、高剂量组分别给予40, 80, 160 mg·kg⁻¹, 正常组和模型组给予等量生理盐水, 每天1次, 连续28 d, 于造模42 d后检测血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、白细胞介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和透明质酸(HA)含量, Masson染色观察纤维化发展情况, 免疫组化检测 α -肌动蛋白(α -SMA)表达, 蛋白印迹检测核因子- κ B(NF- κ B)、TGF- β 1、TNF- α 、Smad2/3和pSmad2/3表达情况。结果 与模型组相比, MSF干预后大鼠血清SOD、GSH活性显著增加; IL-4、TNF- α 、TGF- β 1和HA含量显著降低($P < 0.01$); α -SMA表达明显下调, 纤维化程度减轻; NF- κ B、TNF- α 、TGF- β 1、Smad2/3和pSmad2/3表达显著降低($P < 0.01$)。结论 MSF对肺纤维化具有一定的治疗作用, 其机制可能与抑制NF- κ B和TGF- β 1通路信号转导有关。

关键词: 石荠苎总黄酮; 肺纤维化; 博来霉素; NF- κ B; TGF- β 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)04-0488-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.04.002

Effects of Total Flavonoids from *Mosla Scabra* on Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis of Rats and Its Mechanism

LYU Ang^{1,2}, WANG Haihong^{1,2}, YU Wenyong³, ZHANG Huanhuan³, FANG Jie³, JIN Xiaoyin³, YU Chenhuan³ (1.Department of Pharmacy, Affiliated Hangzhou Hospital, Nanjing Medical University, Hangzhou 310006, China; 2.Department of Pharmacy, First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China; 3.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate protective effects of total flavonoids from *Mosla scabra*(MSF) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis of rats, and explore its preliminary mechanism. **METHODS** Sixty SD rats were divided into six groups randomly: normal group, model group, positive control group, MSF high-dose, middle-dose and low-dose treatment group. Pulmonary fibrosis in rats was induced by intratracheal instillation of bleomycin (5 mg·kg⁻¹). After challenge of 14 d, the two treatment groups were given MSF at the doses of 40, 80 and 160 mg·kg⁻¹ respectively, while positive control group was treated with prednisone acetate (2 mg·kg⁻¹). Normal group and model group were treated with saline once a day for 28 d. The activities of SOD and GSH, the levels of IL-4, TNF- α , TGF- β 1 and HA in serum were detected after molding 42 d. The histological examination was performed with Masson stain. The expression of α -SMA was detected by immunohistochemistry analysis while the expression of NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Smad2/3 and pSmad2/3 proteins was detected by Western-blotting analysis. **RESULTS** Compared with the model group, the activities of SOD and GSH were increased significantly whereas levels of IL-4, TNF- α , TGF- β 1 and HA in serum were decreased significantly after MSF treatment ($P < 0.01$). The expression of α -SMA was down-regulated. The degree of fibrosis was reduced. The protein expressions of NF- κ B, TNF- α , TGF- β 1, Smad2/3 and pSmad2/3 were also significantly decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** MSF can ameliorate pulmonary fibrosis through inhibition of NF- κ B and TGF- β 1 signaling.

KEY WORDS: total flavonoids from *Mosla scabra*; pulmonary fibrosis; bleomycin; NF- κ B; TGF- β 1

肺纤维化是一种严重的肺间质疾病, 主要病理特点是早期的弥漫性肺泡炎, 肺泡单位结构紊乱, 后期大量成纤维细胞病理性增殖转型, 细胞外基质进行性异常积聚, 最终导致肺脏结构和功能的严重破坏^[1]。随着年龄的增长, 其发病率逐渐

升高。目前肺纤维化在治疗上尚缺乏有效手段, 传统的激素加免疫抑制剂效果尚不理想, 确诊后平均生存时间为2~5年, 本病因不可预防、不易被早期发现、治疗效果不佳, 而被称为进行性损害的“绝症”。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673583, 81603368); 浙江省自然科学基金项目(LQ15H280007), 浙江省中医药科技计划项目(2016ZA042)
作者简介: 吕昂, 男, 主管药师 Tel: 13567176489 E-mail: 51832458@qq.com

石芥苧 *Mosla Scabra* (Thumb.) C. Y. Wu et H. W. Li 为江浙地区常用中草药, 省地方标准收录药材, 在我国分布广阔、资源丰富, 具有清热解毒、散瘀消肿的功效, 主治流行时疫、流行性感冒、肺炎和慢性支气管炎等症。项目组前期研究发现, 其药效物质主要为花椒油素、芹菜素、金合欢素、5-羟基-7-甲氧基黄酮、6-甲氧基汉黄芩素和 8-甲氧基汉黄芩素等黄酮类化合物。石芥苧总黄酮(total flavonoids from *Mosla scabra*, MSF)不仅能抑制 LPS 诱导的白细胞过度激活, 还能改善 LPS 或流感病毒造成的急性肺损伤, 改善肺组织病理状态, 可通过 MAPK 和 TLR7/RIG-1 等通路的信号转导而发挥作用^[2-3]。本研究旨在观察 MSF 对博来霉素所致大鼠肺纤维化模型的影响, 并探讨其可能的作用机制, 为临床治疗肺纤维化提供实验依据。

1 材料与试剂

1.1 动物

清洁级 SD 雄性大鼠 60 只, 平均体质量 (200±20)g, 由浙江省实验动物中心提供, 生产许可证: SCXK(浙)2014-0003。整个实验在 SPF 级屏障中进行, 使用许可证: SYXK(浙)2014-0001。

1.2 试剂

石芥苧药材于 2015 年 10 月, 采自浙江新昌镜岭镇沙山岗, 经杭州医学院吴晓宁教授鉴定为 *Mosla Scabra* (Thumb.) C. Y. Wu et H. W. Li 全草。MSF 由本实验室提取制备^[4], 经比色法检测其总黄酮含量为 87.5%; 盐酸博来霉素(日本化药株式会社, 批号: 820232,); 醋酸泼尼松(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 20140870); 超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程有限公司, 批号均为 20160518); 白细胞介素-4(IL-4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和透明质酸(HA)酶联免疫试剂盒(上海拜沃生物科技有限公司, 批号分别为 20160510, 20160510, 20160511, 20160511); α -肌动蛋白(α -SMA)、核因子- κ B(NF- κ B)、TNF- α 、TGF- β 1、Smad2/3、pSmad2/3、 β -actin 和辣根酶标记山羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 160615, 160617, 160420, 160528, 160521, 160521, 160617 和 160224)。

2 方法

2.1 肺纤维化模型制备

将大鼠用 10%水合氯醛腹腔注射麻醉

[0.4 mL·(100 g)⁻¹]后, 仰卧固定于鼠台上, 颈部解剖暴露气管后向气管内注射生理盐水配制的博来霉素(5 mg·kg⁻¹)^[4], 正常组注入等体积的生理盐水, 缝合伤口。注后立即将动物直立并左右旋转, 使药液在肺内均匀分布。

2.2 分组及给药

60 只 SD 大鼠分成 6 组, 分别为正常组、模型组、MSF 160, 80, 40 mg·kg⁻¹ 组以及阳性对照组(醋酸泼尼松)。正常组和模型组在造模结束后第 14 天开始予 8 g·kg⁻¹ 生理盐水灌胃。阳性对照组造模结束后第 14 天开始予醋酸泼尼松片 2.0 mg·kg⁻¹ 灌胃。MSF 40~160 mg·kg⁻¹ 组分别于造模结束后第 14 天开始予 MSF40, 80, 160 mg·kg⁻¹。各组在造模结束后第 42 天处死大鼠取标本。

2.3 血清细胞因子及抗氧化酶活性的测定

10%水合氯醛腹腔注射麻醉后, 腹主动脉取血, 离心获得血清。分光光度法测定样本血清 SOD、GSH 活性, 酶联免疫吸附法(ELISA)测定 IL-4、TNF- α 、TGF- β 1 和 HA 的含量。

2.4 病理形态学观察及免疫组化分析

大鼠取血后摘取肺脏, 各取相同部位的肺组织, 用生理盐水洗净, 置 10%福尔马林固定, 做常规石蜡切片, Masson 染色观察各组大鼠肺部纤维化情况, 剩余肺脏置于-40℃冻存备用。免疫组织化学染色法观察组织中 α -SMA 的表达情况。

2.5 蛋白印迹分析

将取出的 100 mg 肺组织放置于冰上, 加入适量裂解液超声匀浆, 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液测蛋白浓度。取 30 mg 蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳, 电转移至 NC 膜上, 在 5% 脱脂奶粉-PBST 溶液 4℃封闭过夜, 洗膜后加入免抗大鼠 TGF- β 1(1:200)、Smad2/3(1:200)、pSmad2/3(1:200)、TNF- α (1:200)和 NF- κ B(1:200)和 β -actin(1:500), 4℃过夜, 用 HRP 标记的二抗(1:2 000)杂交, 37℃、1 h。在暗室中加 ECL 发光试剂, X 线片曝光 2 min 后显影、定影。杂交信号在 Image J (v 6.0)图象分析系统中进行光密度扫描。应用 β -actin 作为蛋白上样量参照, 其余组与其相比得到相对量, 取均值。

2.6 统计方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组实验数据先进行 χ^2 正态性检验和

方差分析, 若符合正态分布和方差齐性, 则采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法; 若方差不齐性, 则采用非参数秩和检验。取 $P < 0.05$ 作为显著性差异水平。

3 结果

3.1 血清生化指标的分析

与正常组相比, 模型组血清中 IL-4、TNF- α 、

TGF- β 1 和 HA 的含量均显著升高, 抗氧化酶 SOD 和 GSH 活性下降, 有显著性差异 ($P < 0.01$)。经给予 MSF 高剂量干预后, 可见相关炎症因子表达明显下调, 抗氧化酶 SOD 含量显著上升, 与模型组相比, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 见表 1。表明 MSF 对炎症因子、纤维化因子及抗氧化酶活性均具有较好的调节作用。

表 1 MSF 对肺纤维化大鼠血清炎症因子、纤维化因子及抗氧化酶活性的影响 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of MSF on serum inflammatory factor, fibrosis factor and anti-oxidase activity in pulmonary fibrosis of rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-4/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	TGF- β 1/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	HA/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
正常组	-	0.54 \pm 0.06 ²⁾	2.03 \pm 0.27 ²⁾	20.6 \pm 1.9 ²⁾	1.54 \pm 0.08 ²⁾	89.1 \pm 7.3 ²⁾	6.80 \pm 0.79 ²⁾
模型组	-	1.20 \pm 0.15	2.86 \pm 0.38	38.4 \pm 2.1	1.93 \pm 0.05	63.9 \pm 5.9	3.51 \pm 0.38
阳性对照组	2.0	0.88 \pm 0.14 ²⁾	2.36 \pm 0.34 ¹⁾	32.1 \pm 2.9 ²⁾	1.75 \pm 0.07 ¹⁾	77.3 \pm 6.5 ²⁾	4.76 \pm 0.54 ²⁾
MSF 低剂量组	40	1.02 \pm 0.07 ¹⁾	1.74 \pm 0.23 ²⁾	32.6 \pm 4.1 ²⁾	1.78 \pm 0.04	80.2 \pm 7.2 ²⁾	4.87 \pm 0.48 ²⁾
MSF 中剂量组	80	0.79 \pm 0.06 ¹⁾	1.63 \pm 0.24 ²⁾	31.7 \pm 4.1 ²⁾	1.76 \pm 0.03	82.2 \pm 5.7 ²⁾	5.91 \pm 0.50 ²⁾
MSF 高剂量组	160	0.62 \pm 0.08 ²⁾	1.59 \pm 0.21 ²⁾	30.1 \pm 4.3 ²⁾	1.71 \pm 0.05 ²⁾	85.8 \pm 6.9 ²⁾	6.46 \pm 0.76 ²⁾

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.2 组织病理学变化

Masson 染色光镜下可见正常组大鼠肺泡结构正常。模型组肺泡间隔明显增厚, 肺泡结构破坏, 部分肺泡腔消失; 肺泡中可见巨噬细胞、单核细胞等炎性细胞浸润; 在血管、大气道、肺泡隔可见大量蓝色、索条状和片状胶原纤维弥散分布, 形成严重纤维化。阳性对照组症状有所缓解, MSF 40~160 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肺纤维变化明显减轻。见图 1。

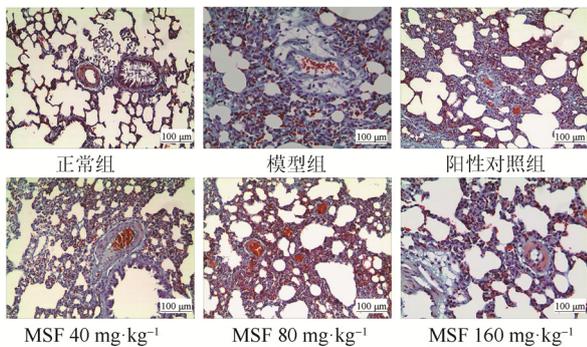


图 1 大鼠肺组织 Masson 染色结果 (100 \times)

Fig. 1 Masson stain of rats pulmonary (100 \times)

3.3 免疫组化分析

α -SMA 阳性物质呈棕黄色、颗粒状, 主要由肌成纤维细胞特异性分泌。光镜下可见正常组肺泡结构清晰, 支气管周围及肺泡间隙可见少量表达。模型组大鼠支气管周围, 血管周围及肺泡间隔中均高表达 α -SMA, 表明大量的肌成纤维细胞存在。经药物干预后, 可见 MSF 40~160 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和阳性对照组 α -SMA 表达均有不同程度的下

降, 肺泡数量增多, 结构明晰, 其中 MSF 高剂量组优于阳性对照组, 见图 2。表明 MSF 干预后胶原生成减少, 纤维化症状减轻。

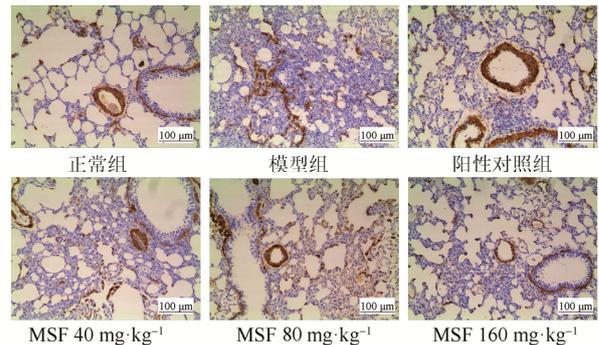


图 2 大鼠肺组织 α -SMA 染色结果 (100 \times)

Fig. 2 α -SMA stain of rats pulmonary (100 \times)

3.4 蛋白印迹分析

对各组肺组织进行 Western blot 检测肺纤维化相关蛋白, 以各待测条带与其相应内参 β -actin 的灰度值比值做统计分析, 结果发现, 模型组 TGF- β 1、Smad2/3、pSmad2/3、TNF- α 和 NF- κ B 的表达相对于正常组显著升高 ($P < 0.01$), 经 MSF 干预后这些蛋白的表达量均显著下调 ($P < 0.01$), 并呈一定的量效关系, 结果见图 3。表明 MSF 能有效降低肺纤维化大鼠肺组织 TGF- β 1/Smad2/3 和 NF- κ B 蛋白的表达。

4 讨论

肺纤维化发病原因众多, 如病原微生物、粉尘、药物等多种因素均可诱导肺纤维化^[5-6]。博来

霉素是多肽类抗肿瘤药，对人和动物可致剂量依赖性肺纤维化，大鼠气管内注射博来霉素诱导肺纤维化模型与人类的病变类似，被广泛应用于肺纤维化的研究。本实验利用博来霉素建立大鼠肺纤维化模型，观察了MSF对大鼠肺纤维化进程的影响，发现其能有效延缓肺纤维化进程，具有较好的治疗作用。

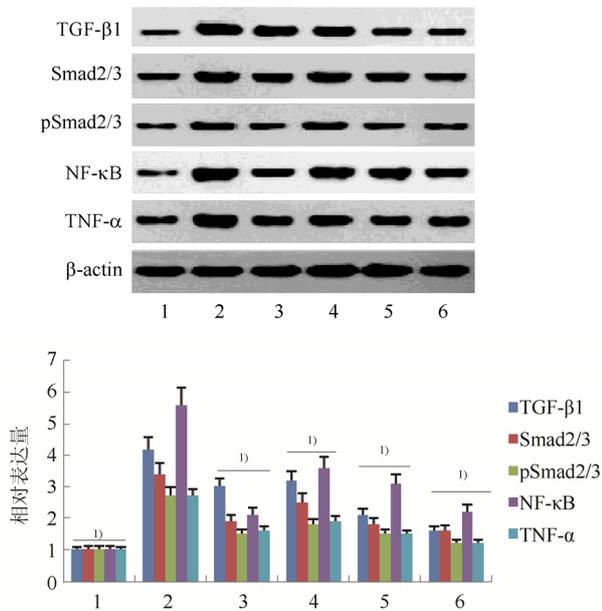


图3 各组大鼠肺组织相关蛋白的表达情况
1-正常组；2-模型组；3-阳性对照组；4-MSF 40 mg·kg⁻¹组；5-MSF 80 mg·kg⁻¹组；6-MSF 160 mg·kg⁻¹组。与模型组相比，¹⁾P<0.01。

Fig. 3 Expression of rat lung tissue associated protein
1-normal group; 2-model group; 3-positive control group; 4-MSF 40 mg·kg⁻¹ group; 5-MSF 80 mg·kg⁻¹ group; 6-MSF 160 mg·kg⁻¹ group. Compared with model group, ¹⁾P<0.01.

TGF-β1被认为是迄今为止最强有力的促纤维化生长因子，其主要是通过趋化刺激成纤维细胞和巨噬细胞产生TNF-α、IL-4等生长因子，促使成纤维细胞增殖，刺激其向肌成纤维细胞表型转化，并抑制肌成纤维细胞凋亡^[7-8]。Smad蛋白是TGF-β1下游的信号转导和调节分子。TGF-β1可使其下游信号分子Smad2及Smad3发生磷酸化，形成p-Smad2和p-Smad3，负责将TGF-β1刺激信号由细胞膜向细胞核传导，并进一步促进肺成纤维细胞I型胶原蛋白的表达。另外，在肺纤维化过程中，NF-κB可通过促进TNF-α、IL-4和TGF-β1等细胞因子的表达而介导肺泡炎和肺纤维化^[9-11]。血清HA是反映纤维化程度的一个常用的生化检测指标^[12]，血清SOD、GSH的活性反映机体抗氧化能力的大小。本实验通过博来霉素气管滴注诱

导大鼠形成肺纤维化，再进行药物干预，结果发现MSF可显著降低模型大鼠肺组织TGF-β1、Smad2/3、pSmad2/3、TNF-α和NF-κB的表达，降低血清中相关炎症因子TNF-α、IL-4和HA含量，并能显著升高SOD和GSH活性，从而减少肌成纤维细胞的生成以及α-SMA的表达，对于纤维化的形成具有较好的抑制作用，提示MSF可通过抑制TGF-β1/Smad2/3和NF-κB信号通路的活化，减少肺成纤维细胞I型胶原蛋白的合成。MSF可作为潜在的肺纤维化治疗药物，值得进一步研究开发。

REFERENCES

- [1] WILLIAMSON J D, SADOFSKY L R, HART S P. The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Exp Lung Res*, 2015, 41(2): 57-73.
- [2] YU C H, YU W Y, DAI X Y, et al. Phytochemical and ethnopharmacological review on *Mosla* species [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2013, 31(8): 1700-1704.
- [3] YU C H, YU W Y, FANG J, et al. *Mosla scabra* flavonoids ameliorate the influenza A virus-induced lung injury and water transport abnormality via the inhibition of PRR and AQP signaling pathways in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 146-155.
- [4] ZHOU X M, CAO Z D, XIAO N, et al. Inhibitory effects of amines from *Citrus reticulata* on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(2): 339-346.
- [5] SMITH M L. Update on Pulmonary Fibrosis: Not all fibrosis is created equally [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 140(3): 221-229.
- [6] MAN H X, XIAO P Y, YANG Y S, et al. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and its advances in cytokine treatment [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2015, 32(8): 1024-1028.
- [7] KOLAHIAN S, FERNANDEZ I E, EICKELBERG O, et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55(3): 309-322.
- [8] SHEPPARD D. Epithelial-mesenchymal interactions in fibrosis and repair. Transforming growth factor-β activation by epithelial cells and fibroblasts [J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(Suppl 1): S21-S23.
- [9] DADRICH M, NICOLAY N H, FLECHSIG P, et al. Combined inhibition of TGFβ and PDGF signaling attenuates radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Oncoimmunology*, 2015, 5(5): e1123366.
- [10] ZHANG X L, XING R G, CHEN L, et al. PI3K/Akt signaling is involved in the pathogenesis of bleomycin induced pulmonary fibrosis via regulation of epithelial mesenchymal transition [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5699-5706.
- [11] ZHAO M, CHEN X Y, CHEN Z F. Influence of qingfei huatan tongluo decoction on pulmonary fibrosis and TGF-β1 expression in rats [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2012, 30(4): 869-871.
- [12] CUI W, LI L, LI D, et al. Total glycosides of *Yupingfeng* protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats associated with reduced high mobility group box 1 activation and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Inflamm Res*, 2015, 64(12): 953-961.

收稿日期: 2016-08-15

(本文责编: 曹粤锋)