

淫羊藿苷对肺纤维化大鼠模型的影响及其机制

安云霞 张晓菊 汪 铮 张群成 周英欣 李晓亮

摘要 目的 研究淫羊藿苷对肺纤维化模型大鼠病理损伤和炎症反应的影响及其机制。方法 采用博来霉素(BLM)诱导建立肺纤维化大鼠模型;动物随机分为5组:健康组(HC组)、模型组(BLM组)、BLM+淫羊藿苷(20 mg)组(BI20组)、BLM+淫羊藿苷(40 mg)组(BI40组)和BLM+淫羊藿苷(80 mg)组(BI80组);HE、TUNEL和Masson染色检测大鼠肺组织病理损伤和纤维化情况;Western blot检测凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax、Caspase-3和Caspase-9,纤维化标记分子转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),以及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体(VEGFR)蛋白表达情况;ELISA检测炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IL-10的含量。结果 淫羊藿苷能改善肺纤维化大鼠肺部组织结构完整性、降低肺泡上皮细胞凋亡率($P < 0.01$);上调Bcl-2/Bax比值($P < 0.01$)、下调Caspase-3、Caspase-9蛋白表达($P < 0.01$);上调促炎因子IL-6、TNF- α ($P < 0.01$),下调抗炎因子IL-10($P < 0.01$)表达;抑制胶原纤维沉积($P < 0.01$);抑制bFGF、VEGF和VEGFR高表达($P < 0.01$)。结论 淫羊藿苷能通过抑制bFGF/VEGF/VEGFR通路激活改善BLM诱导的肺纤维化大鼠肺组织损伤,减轻其炎症反应。

关键词 博来霉素; α -平滑肌肌动蛋白; Bcl-2/Bax比值; 碱性成纤维细胞生长因子

中图分类号 R 563.1+9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1840-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.005

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是由多种因素引起的慢性、进行性和纤维化性的不可逆型肺间质疾病,预后差、病死率高,发病率呈上升趋势^[1]。以弥漫性间质炎症、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积和呼吸功能障碍为特征。但发病机制尚不清楚,目前认为主要与

成纤维细胞向肌纤维细胞分化有关,后者分泌过量的ECM分子,最终导致肺结构的广泛破坏和重塑^[2]。目前IPF指南仅推荐吡非尼酮和尼达尼布在临床上使用,两者均具有抗纤维化和抗炎的作用,但因效果欠佳和昂贵的价格导致其应用受限^[3]。淫羊藿苷是淫羊藿的主要活性成分之一,对多种癌细胞表现出抗肿瘤作用^[4]。但淫羊藿苷能否对IPF存在潜在的治疗作用还需验证。该文研究淫羊藿苷对肺纤维化模型大鼠病理损伤和炎症反应的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂 雄性SD大鼠60只,清洁级8~10周龄,体质量250~300 g,购自北京维通利华公司,饲养温度26~28℃,湿度60%~80%,自由采食和饮水;博来霉素(bleomycin, BLM) A5购自天津太和制药有限公司;淫羊藿苷(纯度 $\geq 98\%$)购自中国国家药物和生物制品鉴定研究所;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司;HE染色试剂盒、Masson染色试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白测定试剂盒购自南京凯基生物有限公司;化学发光液、PVDF膜购自美国Invitrogen公司;抗体均购自美国Abcam公司;ELISA试剂盒均购自美国RD公司;甲醛购自南京化学有限公司;切片机购自德国Leica公司。

1.2 主要仪器 化学凝胶成像系统购自上海天能有限公司;倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司;多功能酶标仪购自瑞士TECAN公司;超低温冰箱购自美国THERMO公司;电子天平购自上海天平仪器厂;PCR仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司;Gel View 6000化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司;切片机购自德国Leica公司。

1.3 方法

1.3.1 肺纤维化大鼠模型的建立 大鼠适应性饲养1周,采用BLM诱导大鼠肺纤维化模型^[5]。即气管内给予模型组和模型加药组大鼠0.2 ml的5 mg/kg BLM(采用生理盐水溶解),连续给药28 d,

2020-06-11 接收

基金项目:河南省科技厅基础与前沿项目(编号:142300410383);河南省医学科技攻关计划省部共建项目(编号:SB201902028)

作者单位:河南省人民医院呼吸与危重症学科、郑州大学人民医院、河南大学人民医院 郑州 450000

作者简介:安云霞,女,硕士研究生,主治医师,责任作者, E-mail: 23706216@qq.com

非模型动物以相同给药方式给予 0.2 ml 生理盐水。

1.3.2 实验分组与给药 选取上述模型大鼠 40 只大鼠随机分为 4 组,模型组(BLM 组)和模型加药组:BLM + 淫羊藿苷(20 mg)组(BI20 组)、BLM + 淫羊藿苷(40 mg)组(BI40 组)和 BLM + 淫羊藿苷(80 mg)组(BI80 组);另选取上述健康大鼠 10 只组成健康组(HC 组)。3 个模型加药组分别腹腔给予对应浓度的淫羊藿苷药液,每天给药 1 次,连续给药 4 周;HC 组和 BLM 组均腹腔给予等量基质液。

1.3.3 HE、TUNEL 和 Masson 染色 取左肺用生理盐水充分冲洗,再用 10% 中性福尔马林固定,经脱水、透明、浸蜡和包埋,最后切片。后行 HE、TUNEL 和 Masson 染色。在光学显微镜下观察肺组织病理学改变。

1.3.4 Western blot 在冰上用含蛋白抑制剂的裂解液从右肺组织样本中裂解提取总蛋白,将裂解液 12 000 r/min 离心 10 min,上清液 100℃ 下变性 10 min。用 BCA 蛋白测定试剂盒测定总蛋白浓度。取适量蛋白上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜上,再用 5% 的脱脂牛奶封闭 1 h 后加入 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、纤维化标记分子转化生长因子-β1(transforming growth factor-β, TGF-β1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 VEGFR-1 抗(1:1 000) 4℃ 孵育过夜。次日再加入辣根过氧化物酶标记的相对应的二抗(1:10 000)室温孵育 2 h。最后滴加 ECL 溶液曝光。以 GAPDH 为内参。

1.3.5 ELISA 检测 股动脉采血,自然凝固后,于 4℃、3 000 r/min 条件下离心,收集血清分装保存。严格按试剂盒说明书测定白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和

IL-10 的含量。

1.4 统计学处理 用 SPSS 19.0 统计软件对实验数据进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠组织病理学改变的影响 HE 染色和 TUNEL 染色检测肺纤维化大鼠组织病理学改变,结果如图 1 所示,HC 组大鼠肺部组织结构完整,未见炎性细胞浸润或间质增厚现象;而与 HC 组相比,BLM 组则表现出显著的组织病理学改变,包括肺泡腔塌陷、间质明显增厚、炎性细胞浸润和成纤维细胞间质浸润等,细胞凋亡率也显著上升($F = 18.663, P < 0.01$);同时,与 BLM 组相比,3 个模型加药组大鼠的肺部组织病理学改变得到了淫羊藿苷剂量依赖性的改善,细胞凋亡率也对淫羊藿苷浓度增大而明显降低($F = 10.254, P < 0.01$)。

2.2 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠凋亡相关蛋白表达的影响 Western blot 检测各组大鼠凋亡相关蛋白表达情况,结果如图 2 所示,与 HC 组相比,BLM 组大鼠肺组织中促凋亡蛋白 Bax 表达增加,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少,同时 Bcl-2/Bax 比值也显著降低($F = 45.631, P < 0.01$);而经淫羊藿苷处理后,与 BLM 组相比,3 个模型加药组大鼠肺组织中 Bax 表达逐渐减少,Bcl-2 表达逐渐增加,与此同时,Bcl-2/Bax 比值也随淫羊藿苷浓度的增大而增加($F = 26.153, P < 0.01$)。另外,Caspase-3、Caspase-9 表达情况如图 2 所示,与 HC 组相比,BLM 组大鼠肺组织中凋亡执行蛋白 Caspase-3、Caspase-9 表达明显增加($F = 12.451, 11.521, P < 0.01$);而经淫羊藿苷处理后,与 BLM 组相比,各模型加药组 Caspase-3、Caspase-9 表达水平随淫羊藿苷浓度的增加而下调

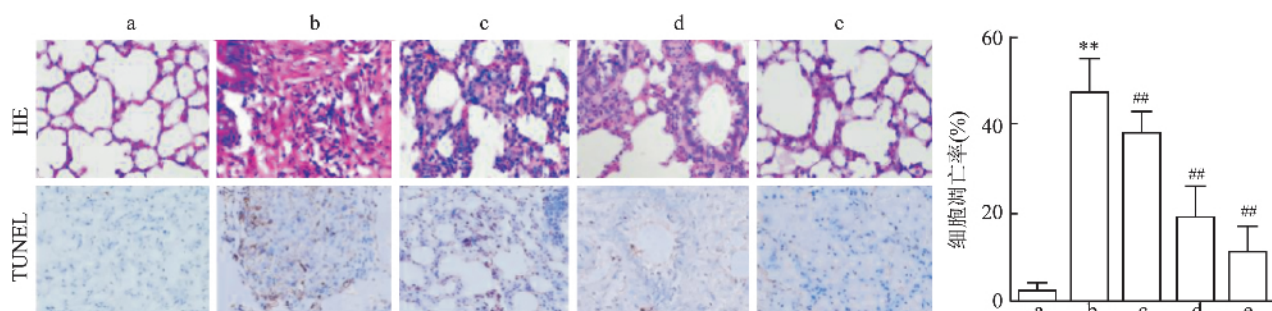


图 1 大鼠肺组织 HE 染色和 TUNEL 染色 ×200

a: HC 组; b: BLM 组; c: BI20 组; d: BI40 组; e: BI80 组; 与 HC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BLM 组比较: ## $P < 0.01$

($F = 8.157, 6.568, P < 0.01$)。

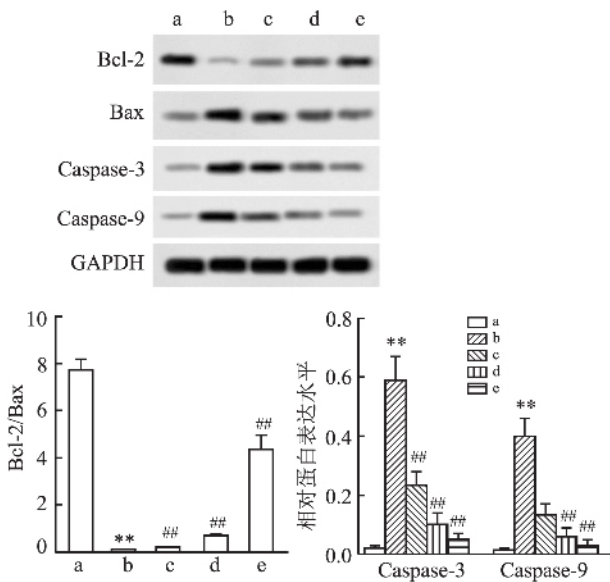


图2 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠凋亡相关蛋白表达的影响

a: HC组; b: BLM组; c: BI20组; d: BI40组; e: BI80组; 与HC组比较: ** $P < 0.01$; 与BLM组比较: ## $P < 0.01$

2.3 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠炎症反应的影响

ELISA方法检测淫羊藿苷对各组大鼠血清中炎症因子表达的影响。结果如图3所示,与HC组相比,BLM组大鼠血清中促炎因子IL-6和TNF- α 的表达量明显上调,抗炎因子IL-10表达量明显下调($F = 25.124, 37.224, 5.124, P < 0.01$);而经淫羊藿苷治疗后,与BLM组相比,BI20、BI40、BI80组促炎因子IL-6和TNF- α 明显下调($P < 0.01$),抗炎因子IL-10明显上调($F = 16.465, 19.267, 3.375, P < 0.01$),且

与淫羊藿苷浓度呈正比。

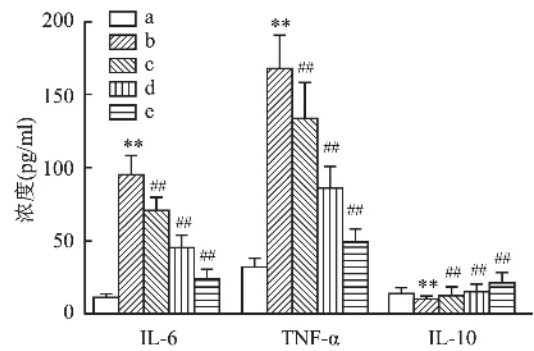


图3 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠炎症反应的影响

a: HC组; b: BLM组; c: BI20组; d: BI40组; e: BI80组; 与HC组比较: ** $P < 0.01$; 与BLM组比较: ## $P < 0.01$

2.4 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠胶原纤维沉积的影响

Masson染色检测各组大鼠肺纤维化情况,结果如图4A所示,HC组大鼠肺泡结构正常,未见明显病理变化;BLM组大鼠肺泡结构破坏严重,肺泡腔基本消失,蓝色胶原纤维呈弥漫性增生沉积;而淫羊藿苷3个治疗组大鼠仍有肺泡结构,胶原纤维沉积较BLM组均明显减轻,且与淫羊藿苷浓度存在对应关系。另外,Western blot检测分组大鼠肺组织中TGF- β 1和 α -SMA表达水平,结果如图4B所示,与HC组相比,BLM组大鼠肺组织中TGF- β 1和 α -SMA的表达均显著上调($F = 32.466, 15.428, P < 0.01$),淫羊藿苷3个治疗组大鼠肺组织中TGF- β 1和 α -SMA的表达水平显著下调($F = 18.159, 11.217, P < 0.01$)。

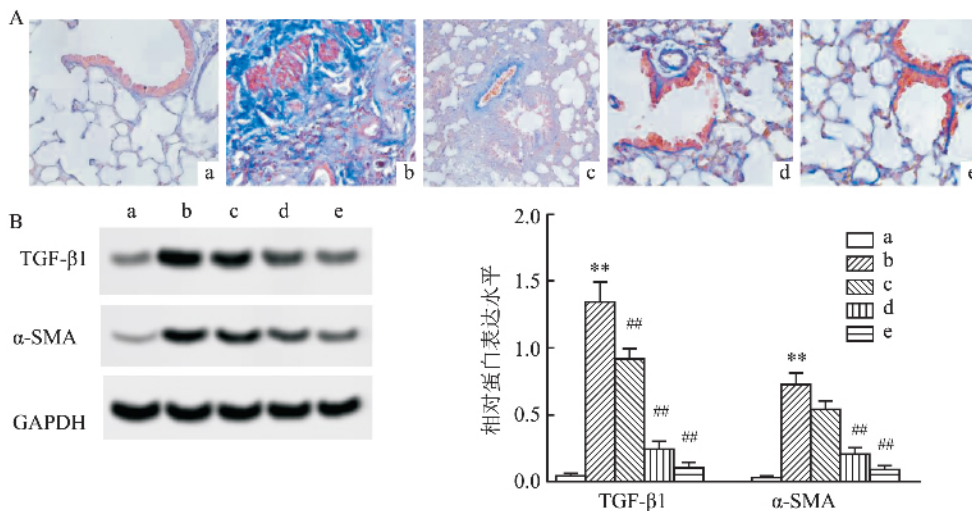


图4 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠胶原纤维沉积的影响

A: Masson染色 $\times 200$; B: TGF- β 1、 α -SMA蛋白表达水平; a: HC组; b: BLM组; c: BI20组; d: BI40组; e: BI80组; 与HC组比较: ** $P < 0.01$; 与BLM组比较: ## $P < 0.01$

2.5 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠 bFGF、VEGF 和 VEGFR 表达的影响 Western blot 检测各组大鼠肺组织中 bFGF、VEGF 和 VEGFR 的表达水平,结果如图 5 所示,与 HC 组相比,BLM 组大鼠肺组织中 3 者的表达均显著上调($F = 26.568, 32.482, 59.274, P < 0.01$),而给予淫羊藿苷后,各模型加药组大鼠肺组织中 3 者的表达水平受到淫羊藿苷剂量依赖性的下调($F = 12.251, 16.392, 23.528, P < 0.01$)。

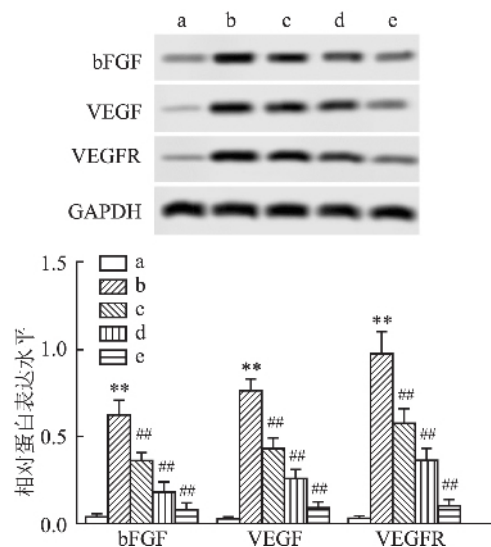


图 5 淫羊藿苷对肺纤维化大鼠 bFGF、VEGF 和 VEGFR 表达的影响

a: HC 组; b: BLM 组; c: BI20 组; d: BI40 组; e: BI80 组; 与 HC 组比较: ** $P < 0.01$; 与 BLM 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

BLM 是一种强效致纤维化的抗肿瘤药物,被广泛应用于建立 IPF 动物模型^[6]。近年来,中药越来越受到医学界的重视,很多中草药均被开发运用与临床治疗/辅助治疗,然而具有多种生物学功能的淫羊藿苷能否成为治疗 IPF 的潜在药物还有待研究。

IPF 的发生必定伴随着肺组织完整性、细胞及细胞间质等肺部病理学改变。损伤的上皮细胞能吸引聚集纤维细胞,在肺泡上皮细胞凋亡和纤维细胞过度增殖的共同作用下实现肺纤维化形成^[7]。研究^[8-9]表明,诱导机体产生抗氧化酶、清除自由基、调节细胞凋亡和自噬途径、抑制肺成纤维细胞增殖、促进其凋亡均能减少模型动物肺纤维化。本研究也得出类似结果,淫羊藿苷能抑制肺泡上皮细胞发生凋亡,从而改善 BLM 诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理学改变。

肺泡上皮细胞反复微损伤异常激活机体免疫细

胞,分泌各种细胞因子和趋化因子促使间质细胞的增殖,是 IPF 发生发展公认的过程。其中,炎症因子在该过程中起到很关键的作用。研究^[10-11]显示,在肺纤维化动物模型体内 TNF- α 表达明显增加,下调 TNF- α 和可溶性受体的表达能有效抑制炎症和纤维化,阻断 IL-6 传导通路可以延缓肺纤维化的进程^[12]。如桃叶珊瑚苷能降低 BLM 诱导的肺纤维化小鼠肺组织炎症因子表达水平,从而减轻小鼠肺纤维化程度^[7]。本研究也证明,淫羊藿苷改善 BLM 诱导的肺纤维化进程与降低大鼠体内炎症因子水平有关。

IPF 的致病途径被认为是由 TGF- β 1 等促纤维化介质诱导的肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的非控制性分化,同时过多的 ECM 沉积在间质空间导致实质结构和肺功能的丧失。因此,抑制肺成纤维细胞异常分化可能对 IPF 产生潜在的治疗作用。研究^[1, 6, 13-14]表明,冬凌草甲素和桃叶珊瑚苷抑制纤维化标记分子 α -SMA、TGF- β 1 和 Collagen I 等的表达水平,即通过调节 TGF- β 1/Smad 途径抑制肌成纤维细胞分化和 BLM 诱导的肺纤维化发生。本研究显示,淫羊藿苷能抑制 BLM 诱导的肺纤维化大鼠 α -SMA、TGF- β 1 的表达水平,进而减少胶原纤维的大量沉积,从而延缓大鼠肺纤维化进程。

IPF 发生过程中,肺部纤维化是其最终的形态归宿。成纤维细胞生长因子(FGF)是一个同源性多肽家族,参与调节细胞的增殖和分化,bFGF 与肺纤维化关系密切。机体在病理状态下,bFGF/VEGF/VEGFR 通路被激活,促进血管内皮细胞增殖、分化,增加血管通透性,从而刺激肺纤维化血管新生。研究^[15]表明,抑制 bFGF 的表达能使胶原和弹力纤维的合成减少,减慢肺纤维化的发展进程,即阻断 bFGF 通路可以缓解肺纤维化程度。本研究得出,淫羊藿苷有效抑制 bFGF/VEGF/VEGFR 通路表达,这可能与减缓 BLM 诱导的肺纤维化大鼠肺纤维化发展进程有关,但淫羊藿苷对肺纤维化的调节作用是否存在其他信号通路的参与还有待进一步深入研究。

综上所述,淫羊藿苷能改善模型大鼠肺部组织结构完整性,降低肺泡细胞凋亡率;上调 Bcl-2/Bax 比值,下调 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达;上调表达促炎因子 IL-6、TNF- α , 下调抗炎因子表达 IL-10;抑制胶原纤维沉积;抑制 bFGF、VEGF 和 VEGFR 高表达。淫羊藿苷能改善 BLM 诱导的肺纤维化大鼠肺组织病理损伤,减轻肺部炎症反应,其机制与抑制 bFGF/VEGF/VEGFR 通路激活有关。

参考文献

- [1] Fu Y, Zhao P, Xie Z S, et al. Oridonin inhibits myofibroblast differentiation and bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating transforming growth factor β (TGF β)/smad pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 7548–55.
- [2] Sontake V, Gajjala P R, Kasam R K, et al. New therapeutics based on emerging concepts in pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(1): 69–81.
- [3] Lynch D A, Sverzellati N, Travis W D, et al. Diagnostic criteria for idiopathic pulmonary fibrosis: a Fleischner Society White Paper [J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(2): 138–53.
- [4] Chen M X, Wu J F, Luo Q L, et al. The anticancer properties of Herba Epimedii and its main bioactive Components icariin and Icariside II [J]. *Nutrients*, 2016, 8(9): 563–3.
- [5] 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.
- [6] Zhou Y, Li P, Duan J X, et al. Aucubin alleviates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a mouse model [J]. *Inflammation*, 2017, 40(6): 2062–73.
- [7] Pedroza M, Schneider D J, Karmouty-Quintana H, et al. Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine-mediated lung injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22667.
- [8] Hosseinzadeh A, Javad-Moosavi S A, Reiter R J, et al. Oxidative/nitrosative stress, autophagy and apoptosis as therapeutic targets of melatonin in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22(12): 1049–61.
- [9] Li B, Huang X, Liu Z, et al. Ouabain ameliorates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting proliferation and promoting apoptosis of lung fibroblasts [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(9): 2967–74.
- [10] Kalayarasan S, Sriram N, Sudhandiran G. Diallyl sulfide attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis: critical role of iNOS, NF- κ B, TNF- α and IL-1 β [J]. *Life Sci*, 2008, 82(23–24): 1142–53.
- [11] Cu A, Ye Q, Sarria R, et al. N-acetylcysteine inhibits TNF- α , sTNFR, and TGF- β 1 release by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis *in vitro* [J]. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2009, 26(2): 147–54.
- [12] Le T T, Karmouty-Quintana H, Melicoff E, et al. Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis [J]. *J Immunol*, 2014, 193(7): 3755–68.
- [13] Pan R Y, Zhang Y D, Zang B X, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibits TGF- β 1-induced activation of human fetal lung fibroblasts *in vitro* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(10): 1320–30.
- [14] Chatak S, Hascall V C, Markwald R R, et al. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1)-induced CD44V6-NOX4 signaling in pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(25): 10490–519.
- [15] Chaudhary N I, Roth G J, Hilberg F, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis [J]. *Eur Respir J*, 2007, 29(5): 976–85.

Effect of icariin on rats with pulmonary fibrosis and its mechanism

An Yunxia, Zhang Xiaojun, Wang Zheng, et al

(Dept of Respiration and Crisis Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University; People's Hospital of Henan University, Zhengzhou 450000)

Abstract Objective To investigate the effects and mechanism of Icariin on pathological damage and inflammatory response of lung tissue in rats with pulmonary fibrosis. **Methods** The pulmonary fibrosis model was established with bleomycin (BLM). Rats were randomly divided into healthy control (HC) group, BLM + Icariin (20 mg) group (BI20), BLM + Icariin (40 mg) group (BI40) and BLM + Icariin (80 mg) group (BI80); HE, TUNEL and Masson staining were used to detect pulmonary pathological injury and fibrosis in rats. Protein expression of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, transforming growth factor- β (TGF- β 1), α -smooth muscle actin (α -SMA), basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGFR was detected by Western blot. Elisa was used to detect the levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-10. **Results** Icariin could improve the integrity of pulmonary tissue structure and reduce the apoptosis rate ($P < 0.01$), up-regulate Bcl-2/Bax ratio ($P < 0.01$), down-regulate Caspase-3 and Caspase-9 protein expression ($P < 0.01$), up-regulate expression of IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$), down-regulate expression of IL-10, inhibit collagen deposition ($P < 0.01$) and the overexpression of bFGF, VEGF and VEGFR. **Conclusion** Icariin can improve damage of lung tissue and alleviate inflammation in BLM-induced pulmonary fibrosis rats by activating bFGF/VEGF/VEGFR pathway.

Key words bleomycin; α -smooth muscle actin; Bcl-2/Bax ratio; basic fibroblast growth factor