

黄芪糖蛋白对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化的治疗作用及机制

栾智华 任晋宏 薛慧清 柴智 魏砚明 陈薛静 陈晨 刘新洁

(山西中医药大学实验中心, 晋中, 030619)

摘要 目的:观察黄芪糖蛋白(Huang Qi Glycoprotein, HQGP)对肺纤维化小鼠的治疗作用,并初步探讨其作用机制。方法:选取60只健康ICR小鼠,随机分为对照组、模型组及观察组,每组20只。采用鼻腔滴入博莱霉素建立小鼠肺纤维化模型,造模次日起观察组每天每只小鼠腹腔注射HQGP,连续14 d,模型组及对照组腹腔注射等体积的生理盐水;给药后第7、28天每组分别处死5只动物,取肺组织,评价HQGP对肺组织病理形态、肺系数、肺组织羟脯氨酸(Hyp)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响。结果:与模型组比较,第7、28天HQGP观察组小鼠的肺纤维化程度减轻,肺组织的TGF- β_1 、Hyp、MDA水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),肺组织SOD水平及肺系数显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:HQGP可能通过降低胶原合成,提高机体的抗氧化能力,对肺纤维化的发生发展起到治疗作用。

关键词 黄芪糖蛋白;肺纤维化;抗氧化;病理学;转化生长因子- β_1 ;羟脯氨酸;超氧化物歧化酶;丙二醛

Efficacy and Mechanism of HQGP for Pulmonary Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice

Luan Zhihua, Ren Jinhong, Xue Huiqing, Chai Zhi, Wei Yanming, Chen Xuejing, Chen Chen, Liu Xinjie

(Experiment Center, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

Abstract Objective To observe the therapeutic effect of Huang Qi Glycoprotein (HQGP) on pulmonary fibrosis mice and discuss the mechanism of action. **Methods:** A total of 60 healthy ICR mice were randomly divided into the control group, the model group and the treatment group, with 20 mice in each group. The mouse pulmonary fibrosis model was established by intranasal instillation of bleomycin. From the next day, the treatment group was intraperitoneally injected with HQGP for 14 days. The model group and the control group were injected with equal volume of normal saline intraperitoneally; 7, 28 days after giving the drug, each group were sacrificed at 5 animal lung tissue. The effect of HQGP on the changes of the lung pathology, pulmonary index, the content of hydroxyproline (Hyp), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and transforming growth factor beta (TGF- β_1) were observed. **Results:** Compared with the model group, the levels of pulmonary fibrosis in mice treated with HQGP were reduced in the 7th and 28th day. The levels of TGF- β_1 , Hyp, and MDA in lung tissue were significantly lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and lung tissue SOD and pulmonary index increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** HQGP may play an important role in the development of pulmonary fibrosis by reducing the synthesis of collagen and enhancing the antioxidant capacity of the body.

Key Words Huangqi glycoprotein; Pulmonary fibrosis; Antioxidant; Pathology; TGF- β_1 ; Hyp; SOD; MDA

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.09.044

特发性肺纤维化(Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF)是呼吸系统最严重的疾病之一,广泛累及肺间质、肺泡和(或)细支气管,由于各种刺激因子介导肺内炎症反应细胞渗出,出现大量成纤维细胞增殖和细胞外基质过量沉积,病程一般呈进行性发展,最终导致呼吸功能衰竭而死亡^[1]。随着污染、环境恶

化等因素,肺纤维化已成为当今严峻的健康问题。因西医治疗手段有限,从中药及天然植物中提取不良反应低的有效单体成分已成为纤维化疾病治疗的新途径。

黄芪糖蛋白(Huang Qi Glycoprotein, HQGP)从传统中药膜荚黄芪中提取纯化,体外实验表明其具

基金项目:国际科技合作专项(2013DFA30700);山西省黄芪资源产业化及产业国际化协同创新中心项目(HQXTCXZX2016-027);山西省卫计委科研项目(201601104);山西中医药大学博士科研启动金项目(2015BK15)

作者简介:栾智华(1979.09—),女,博士,高级实验师,研究方向:中药治疗肺纤维化,E-mail:314538928@qq.com

通信作者:薛慧清(1962.04—),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中药及天然药物化学成分的提取分离,E-mail:xuehuiqing@si-

na.com;柴智(1979.07—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:方药药效及其作用机制,E-mail:chaizhi008@126.com

有一定的免疫抑制作用^[2]。HQGP除了具有已知的免疫抑制作用,可能还有直接的抗纤维化的作用,但目前其用于肺纤维化的治疗及作用机制尚未见报道。本研究采用博莱霉素诱导小鼠建立肺纤维化模型,观察HQGP是否对肺纤维化有干预作用,并初步探讨其作用机制,为拓展其临床应用范围提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级雌性ICR小鼠,体重16~18g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物使用许可证号:SCXK(京)2016-0011。

1.1.2 药物 黄芪糖蛋白(HQGP),由山西中医药大学实验中心薛慧清教授惠赠。注射用盐酸博莱霉素,浙江海正辉瑞制药有限公司生产,批号16033811。

1.1.3 试剂与仪器 转化生长因子(TGF)- β_1 (小鼠)ELISA试剂盒,上海研吉生物科技有限公司;羟脯氨酸(Hyp),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),考马斯亮蓝蛋白试剂盒,无毒环保苏木精染液,均购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为国产分析纯。

721型分光光度计(上海第三分析仪器厂);YD-1508RⅢ型石蜡切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);5415D型低温高速多功能离心机(德国Eppendorf公司);DHG-9243BS-Ⅲ型电热恒温鼓风干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司);BX51T-32F01型全自动显微摄像系统(日本Olympus公司);Varioskan型全波长多功能酶标仪(美国Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制备 适应性饲养1周后,将小鼠分为对照组、模型组及HQGP观察组。模型组小鼠参照栾智华等^[3]的方法,鼻腔滴注博莱霉素造模。

1.2.2 给药方法 建模后第2天起,对照组、模型组腹腔注射0.9%生理盐水,每只小鼠0.2mL;观察组腹腔注射HQGP,剂量按照1mg/kg,用0.9%生理盐水稀释,每只0.2mL,连续注射14d。

1.2.3 检测指标

1.2.3.1 一般状况观察 每天观察动物活动、精神状态、摄食等状况。分别于给药后第7、14、21、28天,测定每组小鼠的体重变化。分别于给药后第7、28天,每次每组取5只小鼠,眼球采血处死。取肺脏,用滤纸吸干血迹,称取并记录肺质量,根据公式计算肺系数:肺系数=肺质量(mg)/体重(g)。

1.2.3.2 苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织形态变化 分别于给药后第7、28天取材,每次每组处死5只小鼠。取左肺4%多聚甲醛固定,按常规病理学方法包埋,病理切片进行HE染色,光镜下观察肺泡炎、肺纤维化程度。

1.2.3.3 分光光度法检测肺组织中Hyp、SOD、MDA表达 取右肺用冰盐水冲洗,滤纸吸干水分,冷冻保存备检,肺组织中Hyp、SOD、MDA水平检测均按照试剂盒说明书操作。

1.2.3.4 酶联免疫吸附试验检测肺组织中TGF- β_1 表达 取右肺冷冻保存备检,肺组织中TGF- β_1 检测按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学方法 全部资料用SPSS 17.0统计软件进行实验数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况比较 观察期间对照组小鼠活泼好动,皮毛光亮,摄食正常,体重逐渐增加。模型组小鼠精神萎靡,呼吸急促,反应灵敏度变差,毛发干燥晦暗,严重者脱毛,进食下降,体重逐渐减轻。观察组小鼠精神状态略好于模型组。

每组小鼠在造模后第7、28天肺系数的变化情况,与对照组比较,模型组小鼠的肺系数明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,观察组小鼠的肺系数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、图1。

2.2 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织病理形态的影响 光镜下对照组小鼠的肺组织结构清晰,肺泡壁完整,肺泡间隔未见增厚及炎性反应细胞细浸润。模型组小鼠第7天可见明显急性肺炎,肺泡间隔增

表1 HQGP对肺纤维化小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, g, n = 10$)

组别	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	21.92 \pm 1.11	22.73 \pm 1.74	23.67 \pm 1.81	25.82 \pm 1.84	26.73 \pm 1.65
模型组	21.80 \pm 1.49	17.26 \pm 2.68*	18.98 \pm 2.74*	21.25 \pm 2.38*	22.71 \pm 1.93
观察组	21.70 \pm 1.43	18.25 \pm 2.56	19.89 \pm 1.77	21.68 \pm 2.02	22.33 \pm 1.93

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

宽,可见大量炎症反应细胞浸润,同时伴有大量出血(图2B);模型组小鼠第28天可见肺泡结构紊乱,肺泡炎性反应明显,肺泡间隔成纤维细胞大量增殖及细胞外基质大量沉积,呈现典型的肺纤维化病变(图2E)。与模型组比较,HQGP 给药组小鼠第7、28天肺组织结构明显改善,炎性反应细胞浸润程度减轻,成纤维细胞增殖和细胞外基质沉积均减少,肺组织纤维化程度明显减轻(图2C、F)。见图2。

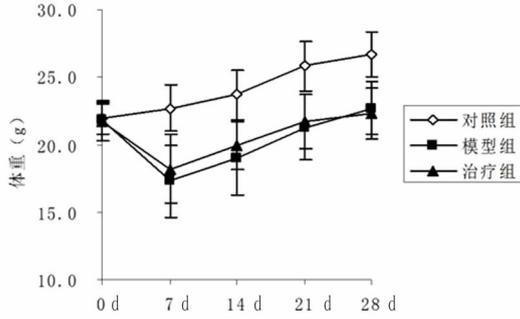


图1.a HQGP对肺纤维化小鼠体重的影响

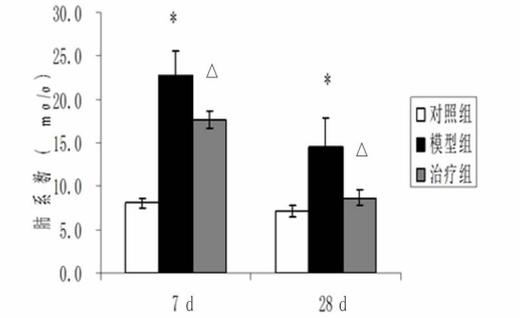


图1.b HQGP对肺纤维化小鼠肺系数的影响

图1 HQGP对肺纤维化小鼠体重及肺系数的影响

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织 Hyp 的影响
模型组小鼠肺组织中 Hyp 水平第7、28天明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,HQGP 观察组第7、28天有明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3。

2.4 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织 TGF- β_1 水平的
与对照组比较,模型组小鼠肺组织中 TGF- β_1 表达第7、28天显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,观察组第7、28天明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图4。

2.5 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织 SOD,MDA 水平的
模型组小鼠肺组织中 MDA 表达第7、28天显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,观察组第28天 MDA 表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图5.a。

模型组肺组织中 SOD 表达水平第7、28天显著

低于对照组($P < 0.05$)。与模型组比较,观察组第28天 SOD 表达明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图5.b。

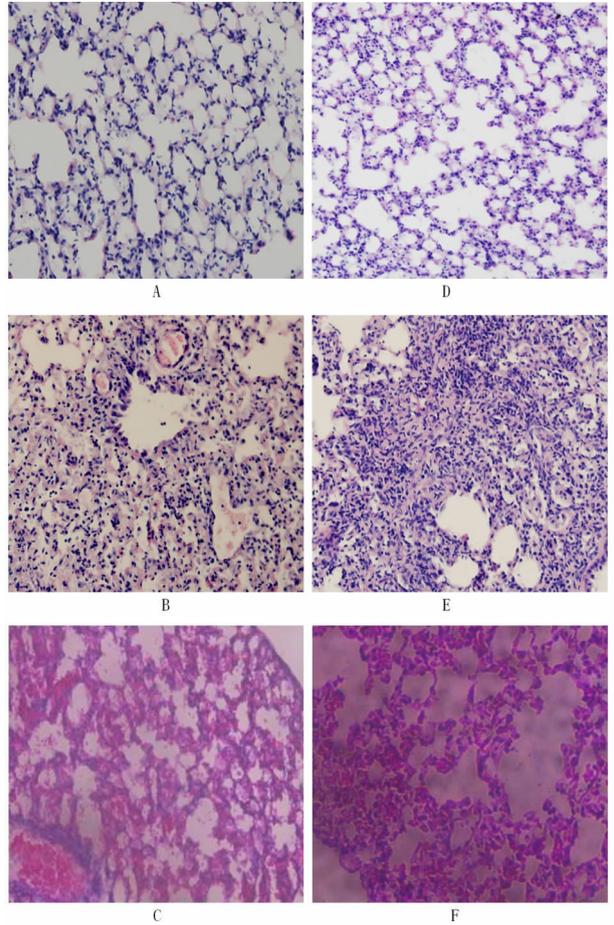


图2 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织病理学的影响(HE, $\times 200$)

注:A. 对照组第7天;B. 模型组第7天;C. 观察组第7天;D. 对照组第28天;E. 模型组第28天;F. 观察组第28天

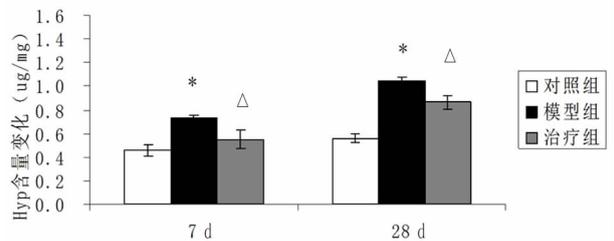


图3 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织 Hyp 水平的影响

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

肺纤维化是以弥漫性肺泡炎和肺泡结构紊乱,最终形成肺间质纤维化为特征病变的慢性进展性疾病。目前临床上用于治疗肺纤维化的药物主要是糖皮质激素和免疫抑制剂,但其严重不良反应影响了广泛使用,调查显示,肺纤维化的发病率和死亡率正

在逐年攀升^[4],但早期诊断和有效的治疗手段仍较缺乏,因此寻找合适的中药治疗肺纤维化已成为目前的研究热点。

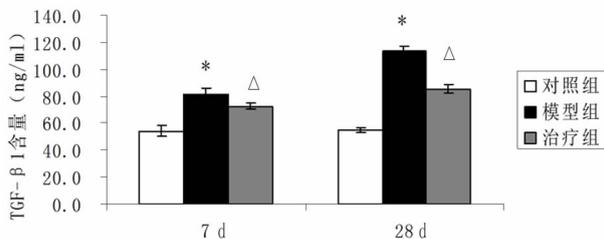


图4 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织TGF-β₁水平的影响

注:与对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,Δ*P*<0.05

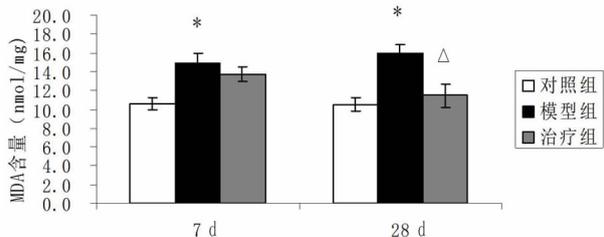


图5.a HQGP对肺纤维化小鼠丙二醛含量的影响

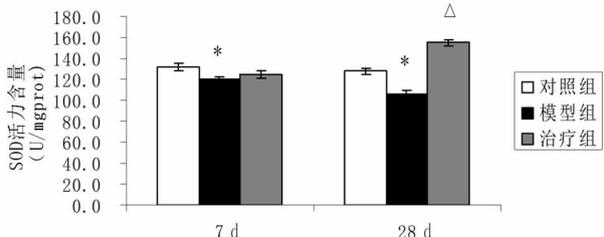


图5.b HQGP对肺纤维化小鼠SOD活性的影响

图5 HQGP对肺纤维化小鼠肺组织SOD、MDA的影响

注:与对照组比较,**P*<0.05;与模型组比较,Δ*P*<0.05

糖蛋白是一类由糖类同多肽或蛋白质以共价键连接而形成的结合蛋白,广泛存在于动物、植物和某些微生物中,且存在形式各不相同。山西中医药大学实验中心从中药黄芪中提取到一种具有免疫抑制活性的物质-黄芪糖蛋白(HQGP),并已申请专利。近年来,关于黄芪糖蛋白的研究越来越多,杨向竹等^[5]发现黄芪糖蛋白的抑制作用主要表现为对T细胞增殖的抑制,而对B细胞增殖的抑制只有在高剂量时有作用;在佐剂性关节炎(Adjuvan Arthritis, AA)大鼠模型治疗实验中,HQGP对模型鼠的关节炎性反应有显著的改善作用^[6]。赵俊云等^[7]采用TUNEL法观察到HQGP可有效诱导AA大鼠膝关节滑膜组织的细胞凋亡。章培军等^[8]利用HQGP治疗实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE),推测其治疗EAE的可能机制是抑制了炎症反应。章培军等^[9]还发现HQGP通过调节T细胞亚群比例,抑制炎症反应

介质释放,从而减轻EAE炎症反应。张娜等^[10]研究表明HQGP对胶原诱导性关节炎(Collagen-induced Arthritis, CIA)小鼠的治疗作用,可能是与降低特异性转录因子T-bet、GATA-3表达,调整Th1/Th2功能失衡有关。但目前还没有关于黄芪糖蛋白与小鼠肺纤维化的关系研究,本研究结果表明HQGP对小鼠的肺纤维化具有一定的治疗作用。

本研究HE染色结果表明,HQGP可明显减轻肺纤维化小鼠肺泡结构受损及肺泡间隔增厚的程度,减少炎症反应细胞浸润,表明HQGP对小鼠PF的发生发展具有抑制作用。肺系数作为反映PF程度的指标之一,在PF的发病过程中,由于炎症反应细胞浸润、血管充血淤血等因素造成肺重增加,导致肺系数升高。本研究结果显示,HQGP可显著降低模型小鼠的肺系数,进一步证明HQGP可改善小鼠PF的发病程度。

Hyp作为胶原纤维蛋白中主要的组成成分,可准确地间接反映胶原纤维蛋白的水平。研究表明TGF-β₁是细胞外基质沉积最强的促进剂,还能抑制胶原的降解,在肺纤维化发病机制中的作用显著^[11]。本实验结果表明,HQGP能显著降低肺纤维化小鼠肺组织中Hyp、TGF-β₁的表达,提示HQGP可减轻胶原在肺间质得沉积,从而起到减轻PF的作用。

肺纤维化是一个复杂的病理生理过程,尽管发病机制尚未完全阐明,但氧化应激在其发生发展中起重要作用^[12]。SOD是体内重要的清除氧自由基的酶,肺组织中SOD的水平可以间接反映机体肺清除氧自由基的能力^[13]。MDA是脂质过氧化的终产物,可以反映机体过氧化程度,也可以破坏细胞膜结构,进而导致细胞肿胀坏死^[14]。本研究发现,HQGP可降低肺纤维化小鼠肺组织内MDA水平,上调SOD的水平,表明HQGP可能通过调节氧化/抗氧化失衡、降低氧化应激损伤达到减轻PF的目的。

综上所述,HQGP可能通过降低HYP、TGF-β₁的表达,升高肺组织SOD和降低MDA表达,提高机体抗氧化能力,减轻肺组织炎症反应损伤和改善纤维化程度,抑制ECM的沉积,保持肺组织结构的完整,从而起到防治PF的作用,这些作用机制的揭示为指导HQGP的开发及临床用药提供了可靠的药理学依据。

参考文献

[1] Richeldi L, du Bois RM, Raghu G et al. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 2014, 370

- (22):2071-2082.
- [2] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠脾细胞增殖与凋亡的影响研究[J]. 中医学报, 2014, 42(1): 61-64.
- [3] 栾智华, 魏砚明, 刘必旺, 等. 鼻腔滴注博来霉素诱导 ICR 小鼠肺纤维化模型的建立[J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(2): 18-21.
- [4] Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, et al. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review[J]. *Eur Respir J*, 2015, 46(3): 795-806.
- [5] 杨向竹, 赵俊云, 崔向青, 等. 黄芪糖蛋白、雷公藤甲素、雷帕霉素和氢化考的松体外免疫抑制作用的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2411-2414.
- [6] 赵俊云, 刘亚明, 冯前进, 等. 黄芪糖蛋白对佐剂性关节炎大鼠外周血细胞因子及关节滑膜组织形态学的影响[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 78-80.
- [7] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白诱导佐剂性关节炎大鼠体内细胞凋亡的研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1204-1207.
- [8] 章培军, 郭敏芳, 张丽红, 等. 黄芪糖蛋白抑制小鼠 EAE 的作用研究[J]. 山西大同大学学报: 自然科学版, 2012, 28(5): 42-44.
- [9] 章培军, 郭敏芳, 邢雁霞, 等. 黄芪糖蛋白对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠的免疫调节作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(1): 54-58.
- [10] 张娜, 赵俊云, 薛慧清, 等. 黄芪糖蛋白对胶原诱导性关节炎小鼠脾组织 T-bet 及 GATA-3 表达的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(5): 1109-1113.
- [11] 陈静, 赵文娟, 李玉卿, 等. TGF- β_1 、MMP-9 在哮喘大鼠气道重建模型中的表达及丹参的干预作用[J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 479-482.
- [12] Lee AS, Mira-Avendano I, Ryu JH, et al. The burden of idiopathic pulmonary fibrosis: an unmet public health need[J]. *Respir Med*, 2014, 108(7): 955-967.
- [13] 郑金旭, 卢坤琴, 夏德刚, 等. 柴胡皂甙 d 对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的治疗作用及机制研究[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(12): 808-812.
- [14] Pirinccioglu AG, Gokalp D, Pirinccioglu M, et al. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(15): 1220-1224.

(2017-07-02 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 2275 页)

- [10] 刘敏, 闫军堂, 郭少英. 王庆国运用麻黄细辛附子汤经验[J]. 中医杂志, 2012, 53(9): 790-791.
- [11] 刘春红, 裴云芳, 侯媛媛. 麻黄附子细辛汤研究进展[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(3): 270-272.
- [12] 蔡芳燕, 温晓梨, 罗静. 麻黄附子细辛汤抗过敏性鼻炎的研究进展[J]. 江西中医药, 2016, 47(2): 75-77.
- [13] Webb DC, Cai Y, Matthaai KI, et al. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4R α in dendritic cell maturation and CD4⁺ Th2 cell function[J]. *J Immunol*, 2007, 178(1): 219-227.
- [14] Hupfer T, Schick J, Jozefowski K, et al. Stat6-Dependent Inhibition of Mincle Expression in Mouse and Human Antigen-Presenting Cells by the Th2 Cytokine IL-4[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 423.
- [15] Papadaki G, Kambas K, Choulaki C, et al. Neutrophil extracellular traps exacerbate Th1-mediated autoimmune responses in rheumatoid arthritis by promoting DC maturation[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(11): 2542-2554.
- [16] Swain SL, Weinberg AD, English M, et al. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors[J]. *J Immunol*, 1990, 145(11): 3796-806.
- [17] Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, et al. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease[J]. *J Immunol*, 2015, 194(1): 21-27.
- [18] O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, et al. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66(1): 311-328.
- [19] Takeda K, Tanaka T, Shi W, et al. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling[J]. *Nature*, 1996, 380(6575): 627-630.
- [20] Vento-Tormo R, Company C, Rodríguez-Ubrea J, et al. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation[J]. *Genome Biol*, 2016, 17: 4.
- [21] Krishnamurthy P, Kaplan MH. STAT6 and PARP Family Members in the Development of T Cell-dependent Allergic Inflammation[J]. *Immune Netw*, 2016, 16(4): 201-210.
- [22] 孙洋, 闵冬雨. 补肺平喘汤对支气管哮喘大鼠 Th1/Th2 失衡及 JAK/STAT 信号通路影响[J]. 吉林中医药, 2016, 36(10): 1039-1041.
- [23] Zheng WP, Flavell RA. Pillars Article: The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4⁺ T Cells[J]. *J Immunol*, 2016, 196(11): 4426-4435.
- [24] Liu Z, Liu X, Sang L, et al. Boswellic acid attenuates asthma phenotypes by downregulation of GATA3 via pSTAT6 inhibition in a murine model of asthma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 236-243.

(2017-07-03 收稿 责任编辑: 王明)