

蜂毒素抑制博来霉素诱导小鼠肺纤维化的机制研究

李 莉 危 蕾 王众福 张秀莲 钱叶长

(1 上海中医药大学附属曙光医院宝山分院, 上海, 201900; 2 上海市宝山区中西医结合医院, 上海, 201900)

摘要 目的: 观察蜂毒素对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的干预作用。方法: 70 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠被随机分为正常组 10 只和模型组、地塞米松组、蜂毒素低剂量组、蜂毒素中剂量组、蜂毒素高剂量组各 12 只。除正常组外, 均采用气管穿刺注入博来霉素(BLM)制备肺纤维化小鼠模型。从术后第 1 天开始, 地塞米松组按 3 mg/kg 的剂量腹腔注射, 蜂毒素低、中、高剂量组分别给予 5 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、10 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、20 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃, 连续 2 周。分别于第 7、第 14 天处死动物, 收集小鼠外周血样本, 通过 ELISA 方法检测血清转化生长因子(TGF- β 1)、胶原蛋白 I (Collagen I)、胶原蛋白 III (Collagen III)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的水平。取肺组织进行苏木精-伊红 (HE) 分析, Masson 染色和羟脯氨酸 (HYP) 评估以观察组织病理学变化和胶原沉积。采用实时荧光定量 (Real-time PCR) 法和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 观察各组大鼠肺组织 TGF- β 1、Smad2、Smad3 等蛋白和基因的表达变化。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠肺纤维化明显, HYP、TGF- β 1、Collagen I、Collagen I 的含量升高 ($P < 0.05$), 肺组织 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白和基因表达升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 蜂毒素中高剂量组血清 HYP、TGF- β 1、Collagen I、Collagen I 的含量下降 ($P < 0.05$), 肺组织 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白和基因表达降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 蜂毒素可以减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的程度, 其机制可能与抑制 TGF- β 1/Smads 通路有关。

关键词 蜂毒素; 抑制; 博来霉素; 小鼠; 肺纤维化; 机制; TGF- β 1/Smads 通路; 羟脯氨酸

Study on the Mechanism of Melittin Inhibiting Pulmonary Fibrosis Induced by Bleomycin in Rats

Li Li, Wei Lei, Wang Zhongfu, Zhang Xiulian, Qian Yechang

(1 Baoshan Branch, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201900, China)

Abstract Objective: To observe the effects of melittin on inhibiting pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats. **Methods:** Seventy SPF grade C57BL/6 rats were randomly divided into the normal group ($n = 10$) and the model group, dexamethasone group and melittin low dose group, melittin middle dose group and melittin high dose group ($n = 12$). In addition to the normal group, a rat model of pulmonary fibrosis was prepared by injecting bleomycin (BLM) into the trachea. From the first day after surgery, the dexamethasone group was intraperitoneally injected at a dose of 3 mg/kg, while the low, medium and high doses of melittin were administered to 5, 10, and 20 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ respectively. The control group and the model group were given an equal volume of saline for 2 weeks. The animals were sacrificed on the 7th and 14th day, respectively, peripheral blood samples of which were collected. ELISA was used to detect serum transforming growth factor (TGF- β 1), collagen I (Collagen I), collagen III (Collagen III), and matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the level of matrix metalloproteinase 9 (MMP9). Lung tissue was taken for hematoxylin-eosin (HE) analysis, Masson staining and hydroxyproline (HYP) evaluation to observe histopathological changes and collagen deposition. The expressions of TGF- β 1, Smad2, Smad3 and other proteins and genes in lung tissue of each group were observed by Real-time PCR and Western blot. **Results:** Compared with the control group, the pulmonary fibrosis was significantly increased in the model group. The contents of HYP, TGF- β 1, Collagen I and Collagen I were increased ($P < 0.05$), and the expression of TGF- β 1, Smad2, Smad3 protein and gene in lung tissue was increased ($P < 0.05$); Compared with the model group, the levels of serum HYP, TGF- β 1, Collagen I, Collagen I in the high dose group of melittin decreased ($P < 0.05$), and TGF- β 1, Smad2, Smad3 protein in lung tissue and gene expression was decreased ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in the low-dose group. **Conclusion:** Melittin can effectively reduce the degeneration of pulmonary fibrosis induced by bleomycin, and its mechanism may be related to the regulation of TGF- β 1/Smads pathway.

Key Words Melittin; Inhibition; Bleomycin; Pulmonary fibrosis; Mechanism; TGF- β 1/Smads pathway; Hydroxyproline

中图分类号: R563; R256 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.03.018

基金项目: 2016 年上海市卫生和计划生育委员会基金项目 (20164Y0241) —— CXCL14 通过 TGF- β /Smads 通路影响肺纤维化的机制研究

作者简介: 李莉 (1982.01—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 肺间质疾病, E-mail: yefan718@163.com

通信作者: 钱叶长 (1962.10—), 男, 主任医师, 研究方向: 肺间质疾病及慢性阻塞性肺疾病, E-mail: Qianyechang2@163.com

肺纤维化 (Pulmonary Fibrosis, PF) 是一种进行性加重的肺间质疾病,以限制性通气功能障碍、进行性弥漫性肺间质纤维化为特征,最终可导致呼吸衰竭,预后极差^[1]。目前治疗手段有限^[2-3]。在参与肺损伤纤维化的细胞因子网络中,转化生长因子 (Transforming Growth Factor-, TGF- β 1) 是最重要的细胞因子^[4-6],也是 PF 发生中重要的刺激信号^[7]。TGF- β 1 可使肺成纤维细胞发生过度增殖和分化^[8],也是目前已知最强的细胞外基质 (Extracellular Matrix, ECM) 沉积促进剂^[9]。TGF- β /Smads 是研究 PF 最多的一条通路,通过 Smad3 信号过度表达引起纤维增生性疾病和纤维化^[10],而 PF 的形成与 Smad2、Smad3 蛋白表达有紧密联系^[11]。间质型胶原 (collagen I 型、III 型) 在肺内广泛分布,在 PE 的形成过程中也占有重要地位^[12]。基质金属蛋白 (Matrix metallo Proteinases, MMPs) 属于蛋白酶家族,是降解细胞外基质最重要的家族,研究发现 MMP2 和 MMP9 可参与 TGF- β 1 的激活, TGF- β 1 也可调节 MMPs、TIMPs 的表达^[13]。

中医学对 PF 并无特定病名,但根据其致病因素、临床表现,多归属于“肺痿”“肺痹”等病证范畴。本病责之肺肾气虚,邪气入中,久留肺络,气血因瘀而滞,肺络因痹而痿,故气虚血瘀是 PF 的主要病机,益气活血法是治其之基本大法。蜂毒是工蜂毒腺分泌的一种成分复杂的化合物,主要成分包括蜂毒肽、蜂毒明肽、肥大细胞脱粒肽、磷脂酶 A2、透明质酸酶等多种活性物质,均具有广泛的药理学作用。蜂毒肽 (melittin) 是蜂毒中的主要功能物质,是由 26 个氨基酸残基组成的多肽,约占蜂毒干重的 50%,可以抗血小板聚集,延长小鼠体外凝血时间,有很强的抗凝作用,因而具有活血化瘀之显著功效^[14]。同时作为一种细胞毒类的药物,因其分子小、稳定性高,而具有消炎镇痛、改善微循环、免疫调节以及促进肾上腺皮质激素分泌等多种功效^[15]。本研究通过博莱霉素构造小鼠 PF 模型,分别予以蜂毒素及地塞米松进行干预,旨在观察蜂毒素对 PF 的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4~5 周龄的健康 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠共 72 只,每只体质量 20 g 左右,购买于上海西普尔-必凯实验动物有限公司,实验动物质量合格证号: 20130016005315, 许可证号: SCXK (沪) 2013-0016。实验时间: 2017 年 7 月至 2018 年 12 月,实验动物饲养条件为: 温度 21~24℃, 湿度约为

50%, 光照与否循环时间为 12 h, 灭菌饲料和饮用水由动物中心统一提供并由饲养者自行取用。

1.1.2 药物 博莱霉素 (日本, 日本化药株式会社, 生产批号: H20055883); 蜂毒素 (阿拉丁生物公司, 生产批号: Lot#: H1801124)。

1.1.3 试剂与仪器 RNA 试剂盒 (日本, Takara bio inc 公司, 批号: RR420A)、HYP 试剂盒 (美国, Sigma-Aldrich 公司, 批号: MAK008-1KT); 兔抗 GAPDH 多克隆抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司, 批号: 5174S), 兔抗 TGF- β 1 单克隆抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司, 批号: 3711S); 兔抗 Smad2 多克隆抗体 (美国, Cell Signaling Technology 公司, 批号: 8685S), 兔抗 Smad3 单克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bsm-52224R), 兔抗 p-Smad2 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-2224R), 兔抗 p-Smad3 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-3425R)。PCR 扩增仪 (美国, 伯乐, 批号: MSMZ120004); 酶标 (美国, 宝特, 批号: EXL-808); 低温离心机 (德国, 艾本德, 批号: SIGMA 3-30KS); 凝胶数码成像系统 (上海天能, 批号: Tanon 4100)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 小鼠适应环境 7 d 后, 随机分为 6 组: 正常组 (NS) 10 只; 模型组、地塞米松组、蜂毒素低剂量组、蜂毒素中剂量组、蜂毒素高剂量组各 12 只, 每组分别在术后第 7 天、第 14 天进行检测。每个时间点 6 只。除 NS 组外, 余各组以 1.5% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定, 将小鼠仰卧固定于实验台, 固定头和四肢, 常规消毒, 沿颈部正中中线作一切口, 钝性分离各层组织, 暴露气管, 经气管软骨环间隙向气管内缓慢注入博莱霉素生理盐水溶液 (5 mg/kg) 0.2~0.3 mL, 注射后迅速将小鼠直立并旋转, 使药液在肺内均匀分布^[16]。将动物置于干燥、温暖条件下喂养, 定期对喂养场所消毒。

1.2.2 给药方法 模型建立 24 h 后腹腔注射干预药物, 1 次/d, 依据小鼠与人药物剂量折算方法^[17], 计算蜂毒素低、中、高剂量组分别给予 5 μ g/kg、10 μ g/kg、20 μ g/kg, 地塞米松组为地塞米松 3 mg/kg, 模型组和假手术 (NS) 组在相同条件下向气管内注入等容量生理盐水; 蜂毒素处理组分别腹腔注射 5 μ g/(kg·d)、10 μ g/(kg·d)、20 μ g/(kg·d) 的蜂毒素干预处理; 地塞米松处理组腹腔注射 3 mg/(kg·d) 的地塞米松。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 在第 14 天,收集所有小鼠的肺组织 4% 多聚甲醛内固定 12 h,梯度乙醇脱水,包埋切片,采用苏木精伊红染色法(HE)光镜下观察肺组织病理形态改变。此外,进行 Masson 三色染色以测量胶原纤维的密度。通过炎性细胞的浸润,肺泡壁的厚度以及胶原沉积的严重程度来评估 PF 的程度。

1.2.3.2 羟脯氨酸(Hydroxyproline, HYP)含量测定 右肺组织液氮保存,取肺组织匀浆进行羟脯氨酸含量测定,以检测肺组织胶原沉积情况,操作严格按照说明书进行。

1.2.3.3 ELISA 检测 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9 含量 留取小鼠血清,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9,抗小鼠 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9 单克隆抗体(单抗)包被于酶标板上,标准品及肺组织中的 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9 与其单抗结合,室温孵育 2 h 后洗涤 5 次,洗去未结合物;加入辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9,与结合在单抗上的 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9 形成免疫复合物,室温孵育 2 h 后洗涤 5 次;加入显色剂,室温避光 30 min,若反应孔中有上述细胞因子存在(呈蓝色),则加入反应终止液后变为黄色。在波长 450 nm 处测定吸光度(A)值,通过绘制标准曲线求出肺组织中 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ、MMP2/9 的浓度。

1.2.3.4 实时荧光定量(Real-time PCR)法检测 TGF-β1、Smad2/3 mRNA 的表达 按照以下^[18]的方法提取肺组织总 RNA,用匀浆机把肺组织研成悬液,加入 0.2 mL 氯仿,离心 12 000 r/min,4 ℃,15 min,取上清,再加入异丙醇,混匀、离心,弃上清,用无水乙醇清洗,再加入 DEPC 水测 RNA 浓度(ng/μL),再进行反转录,按照说明书进行 PCR。

表 1 引物序列		
名称	序列 5'3'	长度(bp)
TGF-β1	上游 CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC	298
	下游 CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC	
Smad2	上游 ATGAGCTCAAGCGCATCGAG	104
	下游 CAAGACTGGTGTCTCCACCC	
Smad3	上游 CAACTGCAGTGCCGCTATCC	70
	下游 GCCCGAACTTCGCTTTTAACT	
GAPDH	上游 CAGGAAATGATGACCTCCTGAAC	80
	下游 TGTTTTGTGAAGTATCTTGCTGCC	

1.2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中 TGF-β1、Smad2、Smad3 蛋白表达情况 取大约

500 mg 肺组织,加 1 mL RIPA 裂解液使其组织充分裂解。充分裂解组织后,4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液体,测蛋白浓度测定,根据测得的各样品蛋白浓度,从不同样品中分别取 40 μg 蛋白,用 PBS 补足体积至 20 μL,再加入 4 μL 的 5 × 上样缓冲液,混匀,离心 4 ℃,12 000 r/min,30 s,100 ℃ 水浴锅变性 10 min,冷却,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 s。进行电泳、转膜,再进行封闭,加入足量的封闭液(5% BSA 溶液:1 g BSA:20 mL PBST)封闭,室温缓慢平摇 1 ~ 2 h。孵育一抗(1:250),缓慢平摇孵育,4 ℃ 过夜。次日以 1 × PBST 液漂洗,再加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),室温振摇 1 h 1 × PBST 液漂洗,DAB 显色,然后用蒸馏水洗膜。每组取 5 个样本纳入统计。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件对研究数据进行统计分析,实验数据用均数 + 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较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 蜂毒素能有效减轻 BLM 诱导的小鼠肺组织病理学变化 通过 HE 和 Masson 染色分析小鼠肺组织病理学改变。模型组小鼠第 7 天表现为肺泡间隔增宽,肺泡腔、肺间质内有大量的多核及单核细胞浸润,第 14 天时肺泡炎性反应较前有所减轻,但成纤维细胞增生明显,胶原蛋白沉积在新生的毛细血管周围,肺泡间隔增宽,肺泡结构萎陷,肺泡腔被胶原蛋白及成纤维细胞填充。蜂毒低剂量组干预后与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。单纯的地塞米松组和蜂毒素中剂量组分别干预后,肺泡炎性反应和胶原蛋白沉积程度均较同一时间点的模型组有所减轻。而蜂毒素高剂量组能够明显减轻 BLM 诱导的小鼠肺组织纤维化程度。见图 1、2。

2.2 蜂毒素组可有效减少胶原沉积和羟脯氨酸含量 单纯地塞米松组和蜂毒中剂量组分别干预后,第 14 天测定肺组织羟脯氨酸含量有所降低,这与 Masson 染色结果相对应。蜂毒高剂量组 HYP 含量在第 14 天降低更为明显,基本达到与正常对照组相接近的水平。见图 3。

2.3 蜂毒素可有效降低纤维发生相关细胞因子的水平 在第 7 天、第 14 天用 ELISA 评估小鼠血清中 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ和 MMP2/9 的含量。我们发现模型组各时间点 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ和 MMP2/9 的含量明显升高。蜂毒低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而地塞米松组、蜂毒中、高剂量组同一时间点各细胞因子含量均明显降低。见图 4。

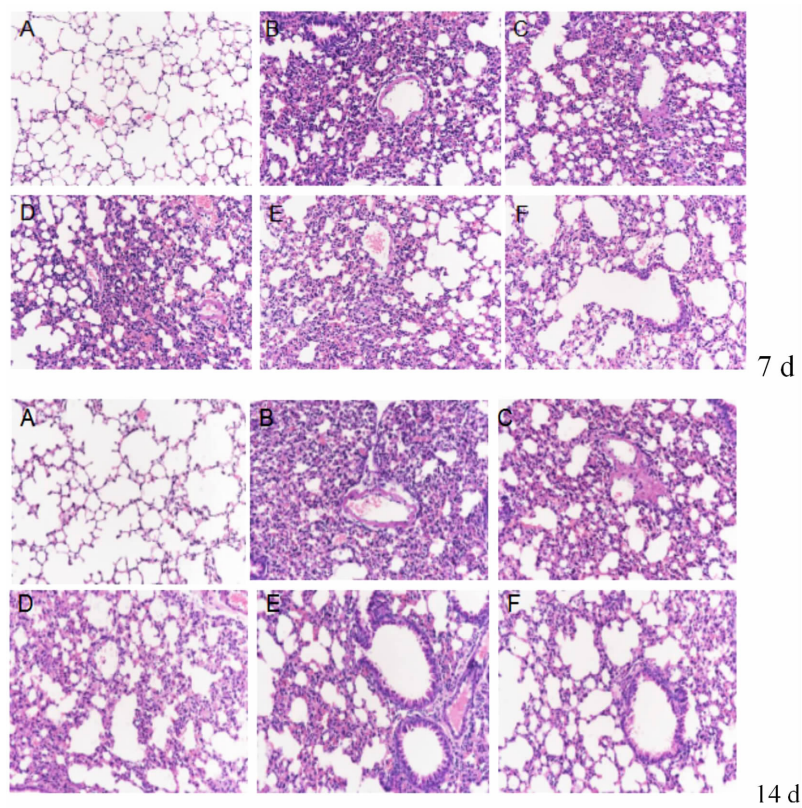


图 1 组织学评价 (HE 染色, ×200)

注: A 对照组显示正常肺组织; B 模型组; C 蜂毒低剂量组均显示肺泡间隙明显增厚变宽, 有较多炎性渗出物; D 地塞米松组; E 蜂毒中剂量组, 分别具有较少的炎细胞浸润和较轻的肺泡间隔增厚; F 蜂毒高剂量组能够明显减轻肺组织纤维化程度, 基本达到与正常对照组相接近的水平

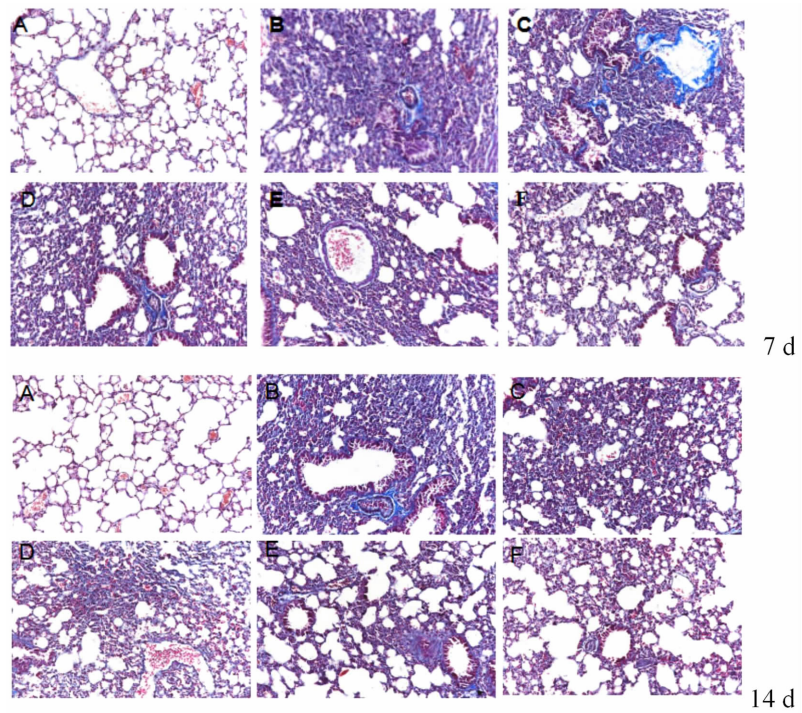


图 2 评估胶原含量 (Masson 染色, ×200)

注: A 对照组正常肺组织几乎没有胶原蛋白沉积; B 模型组; C 蜂毒低剂量组均表现出致密的胶原蛋白沉积; D 地塞米松组; E 蜂毒中剂量组分别显示出明显减少的胶原蛋白积聚; F 蜂毒高剂量组能够明显减轻肺组织胶原蛋白沉积程度, 基本达到与正常对照组相接近的水平

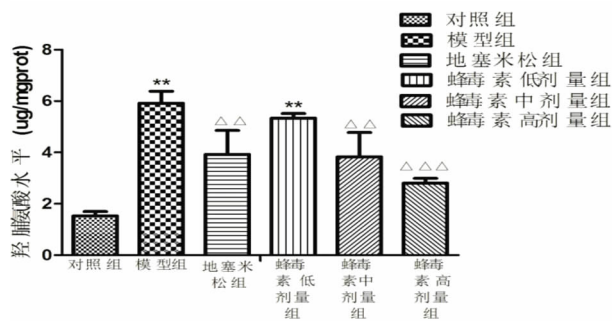


图3 测定肺组织中的羟脯氨酸(HYP)水平

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$

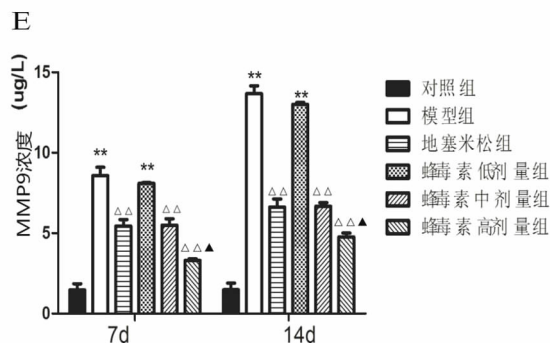
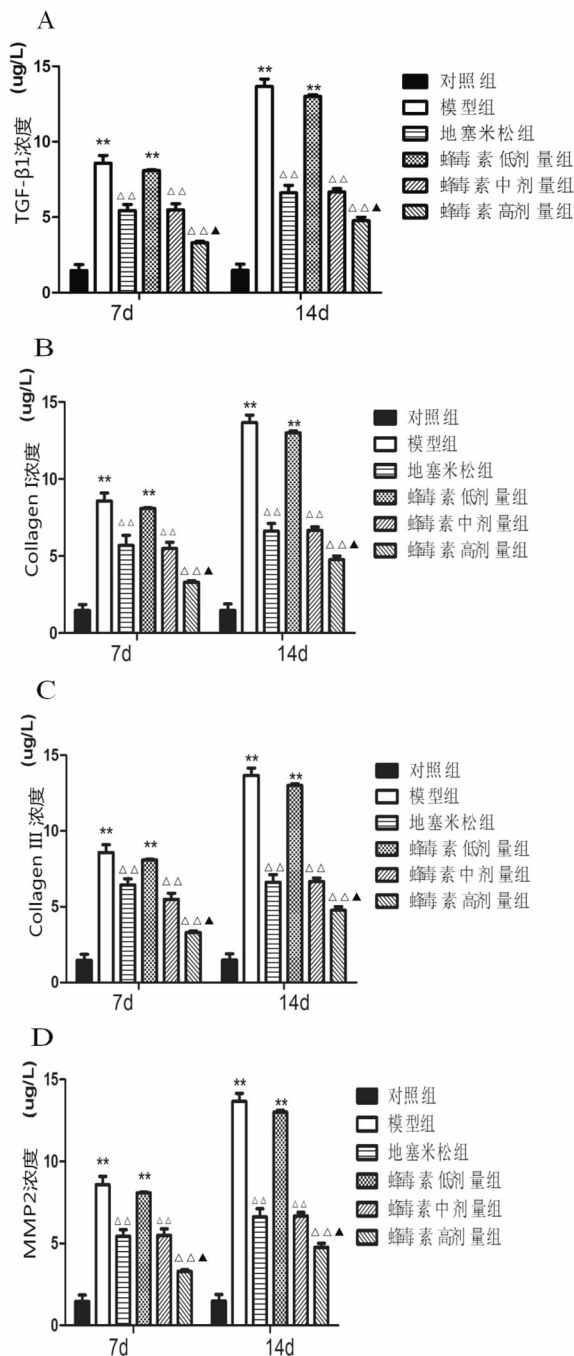


图4 ELISA 评估 TGF-β1、Collagen I/Ⅲ和 MMP2/9 含量

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle P < 0.01$;与地塞米松组比较, $\triangle P < 0.05$

2.4 蜂毒素对肺组织中 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 表达的影响 与对照组比较,模型组小鼠 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 在第 14 天时表达显著升高($P < 0.01$);蜂毒素低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与模型组比较蜂毒素中剂量组 Smad3 mRNA 表达降低($P < 0.01$),蜂毒素高剂量组 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 表达明显降低($P < 0.001$),地塞米松组 TGF-β1、Smad3 mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$)。见图 5。

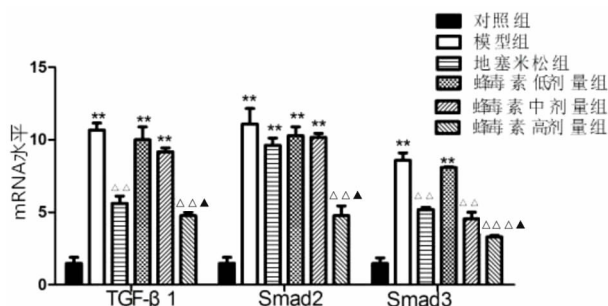


图5 RT-PCR 法检测分析 TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA 表达水平

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\triangle\triangle P < 0.01$, $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$;与地塞米松组比较, $\triangle P < 0.05$

2.5 蜂毒素对肺组织中 TGF-β1、Smad2/3、P-Smad2/3 蛋白表达的影响 在第 7 天、第 14 天与对照组比较,模型组小鼠 TGF-β1、Smad2/3、P-Smad2/3 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);蜂毒素低剂量组与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),蜂毒素中剂量组 P-Smad2/3 蛋白表达降低($P < 0.01$),蜂毒素高剂量组 TGF-β1、P-Smad2/3 蛋白表达明显降低($P < 0.001$);地塞米松组 TGF-β1、P-Smad2/3 蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。见图 6。

3 讨论

PF 的病理变化包括细胞外基质过度沉积、间质慢性炎性反应、成纤维细胞增殖和肺泡结构塌陷

等^[19-20]。国内外研究表明,细胞因子在纤维化疾病中扮演了至关重要的角色,特别是 TGF- β 1 作为关键的上游致纤维化因子,具有多种生物学功能,能使成纤维细胞活化,胶原合成增加、ECM 过度沉积而致纤维化^[21-22]。Smads 蛋白作为 TGF- β 家族的特异性细胞内信号转导分子,可以激活 TGF- β ,使 Smad2 和 Smad3 磷酸化^[23],其表达与 PF 的形成直接相关^[24]。Sriram^[25]等研究博来霉素诱导 PF 大鼠模型中发现,TGF- β 1 和 Smad3 在 PF 大鼠体内显著表达,ECM 沉积明显,给药后 TGF- β 1、Smad3 以及胶原表达均显著降低。积聚在肺间质中的胶原,主要以 I 型和 III 型胶原为主^[26]。纤维细胞分泌几种 MMP,包括 MMP-2, MMP-7, MMP-8 和 MMP-9^[27]。MMP-9 和 MMP-2 它们的主要结构和底物具有特异性^[28]。最近研究发现^[29]MMPS 具有多种生物学功能,其中 MMP-2 和 MMP-9 的抑制显著减弱了纤维细胞迁移和沉积。因此抑制胶原的合成与沉积,可以有效减轻 PF。

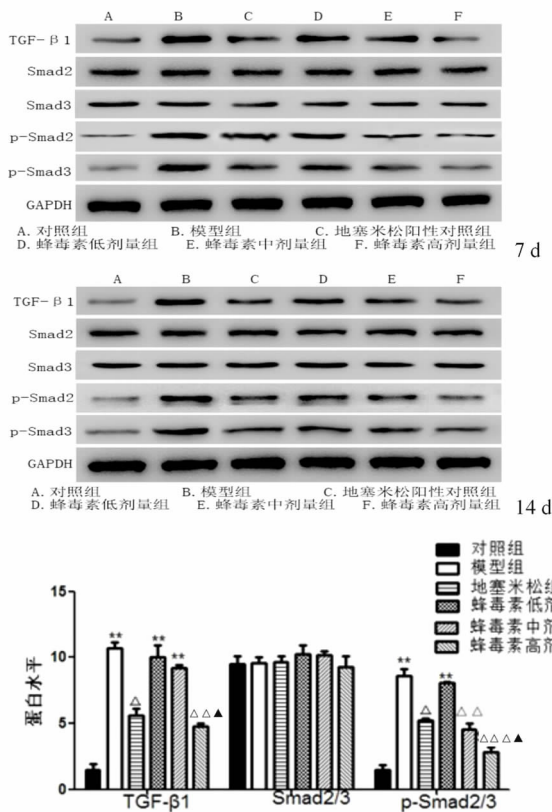


图6 WB检测TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白表达水平

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与地塞米松组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

纤维化可发生于各部位及多器官,引起组织器官内纤维结缔组织(硬结)增多,而研究^[30]蜂针能消

除纤维化结节。咖啡酸苯乙酯(Caffeic Acid Phenethyl Ester, CAPE)是一种天然的黄酮类化合物,是蜂胶中的主要成分。CAPE具有抗氧化、抗炎、抗癌,抗病毒和免疫调节的特性,已应用于多种疾病模型。刘瑞等^[31]研究蜂胶提取物CAPE对大鼠PF的干预作用,结果显示肺组织纤维化程度,与BLM组比较,地塞米松(DEX)与CAPE联合观察组PF程度最弱,并且羟脯氨酸含量明显减低。辛绍杰^[32]等观察蜂毒对144只大鼠实验性肝纤维化的疗效,结果表明观察组在肝纤维化完全形成后再给药,治疗3个月后发现,I-III级纤维化分别占54.5%和66.7%,明显轻于模型组。PARK等^[33]研究结果显示蜂毒肽对于抑制肝脏炎症反应和纤维化有一定的效果,并且进一步^[34]证明蜂毒肽是通过使caspase和基因蛋白bax的表达降低,以及体内细胞色素C的释放,使肝脏不受到损害。

我国拥有非常丰富的蜂毒资源,但对于蜂毒药理以及临床应用的研究、开发和利用目前还不够深入,故针对该方面的研究具有广阔的前景。本研究结果显示,小鼠在给予一次性气管穿刺注入博来霉素后,运用蜂毒素进行干预,经过7d和14d,通过HE和Masson染色所见肺组织纤维化及胶原沉积程度明显较模型组减轻,且羟脯氨酸(HYP)含量亦有明显降低,且与地塞米松组无明显差异,说明蜂毒素可以有效抑制BLM诱导的小鼠肺组织纤维化程度。通过地塞米松组或蜂毒素中、高剂量单独干预后发现血清中TGF- β 1、Collagen I/III和MMP2/9含量均有明显减少,同时小鼠肺组织中的TGF- β 1、Smad2、Smad3 mRNA的表达较模型组显著降低,说明蜂毒素可从基因和蛋白水平上减轻PF,其作用机制可能与抑制TGF- β /Smads信号传导通路有关。

参考文献

- [1] King, Talmadge E. Clinical Advances in the Diagnosis and Therapy of the Interstitial Lung Diseases [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005, 172(3): 268-279.
- [2] Raghu G, Rochwerf B, Zhang Y, et al. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline [J]. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2015, 192(2): e3-19.
- [3] Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med, 2001, 345(7): 517-25.
- [4] Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis [J]. The Journal of Pathology, 2010, 214(2): 199-210.
- [5] Strieter R M, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. Chest, 2009, 136(5): 1364-1370.

- [6] Oyama Y, Enomoto N, Suzuki Y, et al. Evaluation of urinary desmosines as a noninvasive diagnostic biomarker in patients with idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE) [J]. *Respiratory Medicine*, 2017, 123: 63-70.
- [7] Sambataro G, Sambataro D. Letter to editor: "Interstitial pneumonia with autoimmune features: Clinical, radiologic and histological characteristics and outcome in a series of 57 patients" [J]. *Respiratory Medicine*, 2017, 127: 65-66.
- [8] Hirano C, Ohshimo S, Horimasu Y, et al. FAM13A polymorphism as a prognostic factor in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respiratory Medicine*, 2017, 123: 105-109.
- [9] 赵存刚, 黄文海, 王尊元, 等. 转化生长因子- $\beta 1$ 在特发性肺纤维化中的研究新进展 [J]. *中国药理学杂志*, 2016, 51(5): 341-345.
- [10] Bomhard E M. Particle-induced Pulmonary Alveolar Proteinosis and Subsequent Inflammation and Fibrosis [J]. *Toxicologic Pathology*, 2017, 45(3): 389-401.
- [11] 姜岩, 于功昌, 张兴国. 转化生长因子 $\beta 1$ 及其介导的信号通路在百草枯致肺上皮间质转化中的作用 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34(8): 729-733.
- [12] Madri J A, Furthmayr H. Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis [J]. *Human Pathology*, 1980, 11(4): 353-366.
- [13] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 163-76.
- [14] 张冰清, 刘晓波. 蜂毒的主要成分及药理作用的研究进展 [J]. *药理学研究*, 2016, 35(3): 172-174.
- [15] Glättli A, Chandrasekhar I, van Gunsteren WF. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer [J]. *Eur Biophys J*, 2006, 35(3): 255-267.
- [16] Kolb M, Margetts PJ, Galt T, et al. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3 Pt 1): 770-777.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 33.
- [18] Untergasser G, Gander R, Lilg C, et al. Profiling molecular targets of TGF-beta1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation [J]. *Mech Ageing Dev*, 2005, 126(1): 59-69.
- [19] Inomata M, Kamio K, Azuma A, et al. Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2014, 15: 16.
- [20] Xiong S, Guo R, Yang Z, et al. Treg depletion attenuates irradiation-induced pulmonary fibrosis by reducing fibrocyte accumulation, inducing Th17 response, and shifting IFN- γ , IL-12/IL-4, IL-5 balance [J]. *Immunobiology*, 2015, 220(11): 1284-1291.
- [21] 陈宝, 李惠萍, 范峰, 等. 三氧化二砷对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响及其作用机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(1): 65-66.
- [22] Ahn J Y, Kim M H, Lim M J, et al. The inhibitory effect of ginsan on TGF- β mediated fibrotic process [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2011, 226(5): 1241-1247.
- [23] Li L, Huang W, Li K, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- β signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(41): 43605-43619.
- [24] Yu W, Liu D, Liang C, et al. Sulfur Dioxide Protects Against Collagen Accumulation in Pulmonary Artery in Association With Downregulation of the Transforming Growth Factor $\beta 1$ /Smad Pathway in Pulmonary Hypertensive Rats [J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(10): e003910.
- [25] Sriram N, Kalayarasan S, Manikandan R, et al. Epigallocatechin gallate attenuates fibroblast proliferation and excessive collagen production by effectively intervening TGF- $\beta 1$ signalling [J]. *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology*, 2015, 42(8): 849-859.
- [26] 蔡后荣, 郑培德. 肺间质纤维化前胶原和肿瘤坏死因子 α 基因表达 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21(12): 753-755.
- [27] García-de-Alba C, Becerril C, Ruiz V, et al. Expression of matrix metalloproteases by fibrocytes: possible role in migration and homing [J]. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 2010, 182(9): 1144.
- [28] Allan J A, Docherty A J P, Barker P J, et al. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components [J]. *Biochemical Journal*, 1995, 309(1): 299-306.
- [29] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 163-176.
- [30] 柯善英. 蜂针治疗纤维化结节 [J]. *蜜蜂杂志*, 2010, 30(8): 34-35.
- [31] 刘瑞, 陈宏莉, 柏桦, 等. 蜂胶提取物 CAPE 对大鼠肺纤维化的干预作用研究 [J]. *生物物理学报*, 2009(s1): 433-434.
- [32] 辛绍杰, 李惠敏. 蜂毒对大鼠实验性肝纤维化的疗效观察 [J]. *中华肝脏病杂志*, 1997, 5(4): 242-243.
- [33] Kim S K, Park K Y, Yoon W C, et al. Melittin enhances apoptosis through suppression of IL-6 /s IL-6R complex-induced NF- κ B and STAT3 activation and Bcl-2 expression for human fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Joint Bone Spine*, 2011, 78(5): 471-477.
- [34] Park J H, Kum Y S, Lee T I, et al. Melittin attenuates liver injury in thioacetamide-treated mice through modulating inflammation and fibrogenesis [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(11): 1306-1313.

(2018-12-26 收稿 责任编辑: 王杨)