

虫草素制剂对百草枯致大鼠肺纤维化的作用研究

马淑梅¹, 余伯成², 唐亮², 王娟¹, 陈秀华^{1*}

1. 上海医药工业研究院药理评价研究中心, 上海医药工业研究院创新药物与制药工艺国家重点实验室, 上海市生物物质成药性评价专业技术服务平台, 上海 200437
2. 上海国宝企业发展中心, 上海 200001

摘要: **目的** 研究虫草素制剂对百草枯致大鼠肺纤维化的治疗作用。**方法** 90只健康雄性SD大鼠随机分为: 对照组、模型组, 地塞米松(阳性药, 1 mg/kg)组, 虫草素制剂低、中、高剂量(125、250、500 mg/kg)组, 虫草活力素A(500 mg/kg)组, 虫草活力素B(500 mg/kg)组。除对照组外, 其余各组于实验第1天ip百草枯溶液17 mg/kg, 1次染毒, 并开始给药30 d, 期间称量动物体质量, 记录动物大体状况及死亡情况。给药结束, 取肺观察动物肺脏大体情况, 检测肺组织中羟脯氨酸(HYP)水平, 并进行Masson染色观察肺纤维化病理变化。**结果** 虫草素制剂可改善肺纤维化大鼠状态, 促进大鼠体质量恢复; 虫草素制剂各个剂量组均能降低肺组织中HYP水平, 其中高剂量组、虫草活力素A和B组与模型组比较差异显著($P < 0.01$); 地塞米松组和虫草素制剂高剂量组以及虫草活力素A、B组均不同程度的减少了纤维化组织, 与模型组比较, 纤维化程度较轻。**结论** 虫草素制剂能有效降低肺纤维化大鼠肺组织中HYP水平, 改善肺的组织结构和纤维化病理变化。

关键词: 虫草素制剂; 百草枯; 地塞米松; 大鼠; 肺纤维化; 羟脯氨酸

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2016)05-0753-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.009

Effects of cordycepin preparation on gramoxone-induced pulmonary fibrosis in rats

MA Shu-mei¹, YU Bo-cheng², TANG Liang², WANG Juan¹, CHEN Xiu-hua¹

1. Center for Pharmacological Evaluation & Research, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China
2. Shanghai GuoBao Enterprise Development Center, Shanghai 200001, China

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of cordycepin preparation on gramoxone-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** Totally 90 Wistar rats were divided into eight groups: control group; model group; dexamethasone (positive drug, 1 mg/kg) group; cordycepin preparation low, medium, and high dose groups (125, 250, 500 mg/kg); Cordy Max A (500 mg/kg) group, and CordyMax B (500 mg/kg) group. Pulmonary fibrosis was induced by ip injection of gramoxone (17 mg/kg). Then the rats were treated for 30 d and the body weight, general situation, and death of the animals were recorded. After treatment, lung tissues were examined for hydroxyproline (HYP) levels and lung pathological changes. **Results** Cordycepin preparation could improve the status of the rats with pulmonary fibrosis induced by bleomycin; All the three doses of cordycepin preparation could reduce animal HYP content in lung tissue, the high dose group and CordyMax A or CordyMax B group compared with the model group were significantly different ($P < 0.01$); Compared with model group, the degree of fibrosis of prednisone acetate group, cordycepin preparation high dose group, CordyMax A and CordyMax B group eased a little. **Conclusion** Cordycepin preparation can effectively reduce the HYP content in lung tissue of the rats with pulmonary fibrosis induced by gramoxone, improve the organization structure and the pathological changes of lung.

Key words: cordycepin preparation; gramoxone; dexamethasone; rats; pulmonary fibrosis; hydroxyproline

肺纤维化是多种肺部病变导致肺泡持续性损伤 交换氧气进入血液的能力逐步丧失的一种疾病^[1-2]。及细胞外基质反复破坏, 肺组织变硬、变厚, 肺脏 临床诊断明确后5年生存率不足50%, 而且近10

收稿日期: 2016-03-17

作者简介: 马淑梅, 助理研究员, 硕士, 研究方向为抗肿瘤药物研究。Tel: 15216713132 E-mail: jnmashumei@163.com

*通信作者 陈秀华, 研究员, 硕士生导师, 从事抗肿瘤药物临床前研究工作30多年。Tel: 13042149766 E-mail: helen200217@yahoo.com.cn

年来发病率及病死率皆有升高^[3], 肺纤维化严重影响病人的工作、生活。临床上对肺纤维化的治疗以糖皮质激素和免疫抑制剂药物为主, 作用有限且多存在严重的副作用^[4-5]。积极探索新的治疗途径或新的药物已成为肺纤维化治疗亟待解决的问题。

冬虫夏草具有预防肺纤维化的作用, 其主要通过抑制炎症细胞浸润活化及抗氧化来抑制肺纤维化进程^[6]。冬虫夏草资源严重匮乏, 价格极其昂贵, 难以进行大量应用^[7]。北冬虫夏草已实现人工大规模栽培, 解决了原料的问题。虫草素是虫草中特有的活性成分, 北冬虫夏草中其质量分数为 2.4%, 具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节以及抗支气管哮喘等多种药理作用, 近年来, 其潜在开发应用价值已引起世界的高度重视。本课题组对虫草素制剂抗百草枯致大鼠肺纤维化作用进行了研究, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

虫草素制剂 (批号 140911, 虫草素质量分数 $\geq 99\%$, 散剂, 100 g/袋)、虫草活力素 A、B (批号 140911, 虫草素质量分数为 2.4%, 散剂, 100 g/袋), 均购于上海国宝企业发展中心; 地塞米松磷酸钠注射液 (国药集团容生制药有限公司, 生产批号 13102851); 百草枯 (山东省潍坊鸿汇化工有限公司, 生产批号 20140630); 大鼠羧脯氨酸 (HYP) 酶联免疫检测试剂盒、快速 Masson 染液 (南京建成科技有限公司)。

1.2 仪器

T10 basic 匀浆机 (德国 IKA 公司); Centrifuge EPPENDORF 5810R 离心机 (德国 EPPENDORF 公司); Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪 (中国 Thermo scientific 公司); Eclipse Ti 显微镜及拍摄软件 (日本 Nikon 公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~200 g, 购自上海普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号 SCXK (沪) 2012-0002。

1.4 模型的制备及分组给药

90 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 8 组: 对照组, 模型组, 地塞米松 (阳性药, 1 mg/kg) 组, 虫草素制剂低、中、高剂量 (125、250、500 mg/kg, 500 mg/kg 为临床等效剂量) 组, 虫草活力素 A (500 mg/kg) 组, 虫草活力素 B (500 mg/kg) 组, 模型组 20 只,

其余各组每组 10 只。除对照组外, 其余各组于实验第 1 天 ip 给予百草枯溶液 17 mg/kg, 给药体积为 2 mL/kg, 1 次染毒。于第 1 天开始给药, 地塞米松为 ip 给药, 虫草制剂和虫草活力素为 ig 给药, 对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水, 连续给药 30 d。

1.5 指标检测

于实验第 1、2、3、4、6、8、10、12、16、19、23、26、30 天 (记为 d1~d30) 称体质量, 记录动物一般状况、死亡情况。

于实验第 31 天, 麻醉后处死动物, 解剖, 观察动物肺脏大体情况, 将右肺下页结扎后取下。称质量, 按 0.1 g/mL 的比例加入生理盐水, 冰浴下匀浆, 4 °C、2 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 分装冻存。ELISA 法检测 HYP 水平, 具体操作方法按照试剂盒说明书进行。

剩下的肺组织, 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, 进行 Masson 染色。显微镜下观察组织病理学变化并拍照。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学处理, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对肺纤维化大鼠存活及体质量的影响

从第 2 天开始, 给予百草枯的各组动物均开始出现死亡, 各组死亡数不同, 模型组死亡动物出现最早, 且死亡动物数最多, 死亡率为 45%; 至第 12 天不再出现动物死亡, 实验结束时, 地塞米松组、虫草素制剂低剂量组、虫草活力素 A 存活动物 6 只, 死亡率为 40%; 虫草素制剂中、高剂量组, 虫草活力素 A 存活动物 8 只, 死亡率为 20%。结果见表 1。

对照组动物体质量增加明显, 而给药组和模型组在给予百草枯后, 所有动物体质量均出现了不同程度下降。d4~d10, 模型组和虫草素制剂及虫草活力素 A、B 组动物体质量达到了最低值; 特别是第 d6~d8, 模型组、虫草素制剂及虫草活力素 A、B 组与对照组比较, 体质量差异显著 ($P < 0.01$), 且部分动物口鼻处见血性分泌物, 状态萎靡, 毛发略有竖立; 随着给药时间的延长, 从 d12 开始, 动物体质量开始恢复增长, 增长幅度略小于对照组, 各组动物体质量增长幅度相似。

地塞米松组动物体质量最低, 且恢复最缓慢, d19 是动物体质量最低值, 至实验结束, 地塞米松组动物体质量与对照组比较仍差异显著 ($P < 0.01$)。

虫草素制剂、虫草活力素 A 及虫草活力素 B 组给药后, 动物状态均有改善, 口鼻处有血性分泌物的动物明显减少。虫草活力素 A 组动物体质量下降

较晚, 至实验结束, 恢复程度最好。虫草素制剂组动物体质量较地塞米松组稍高, 实验结束时高、低剂量与模型组比较, 差异不显著, 结果见表 2。

表 1 虫草素对百草枯致肺纤维化大鼠存活动物数的影响

Table 1 Effect of cordycepin preparation on survival number of rats with pulmonary fibrosis induced by gramoxone

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	存活动物数/只												
		d1	d2	d3	d4	d6	d8	d10	d12	d16	d19	d23	d26	d30
对照	—	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
模型	—	20	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
地塞米松	1	10	10	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6
虫草素制剂	125	10	10	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	250	10	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	500	10	10	10	10	8	8	8	8	8	8	8	8	8
虫草活力素 A	500	10	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
虫草活力素 B	500	10	10	10	8	7	7	7	6	6	6	6	6	6

表 2 虫草素对百草枯致大鼠肺纤维化动物体质量的影响

Table 2 Effect of cordycepin preparation on weight of rats with pulmonary fibrosis induced by gramoxone

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g							
		d1	d2	d3	d4	d6	d8	d10	
对照	—	304.6±7.5	312.6±10.6	322.9±14.5	336.6±15.2	345.9±14.0	357.2±15.3	355.3±16.7	
模型	—	325.3±20.0	294.9±24.3*	298.3±31.6*	297.8±33.5**	288.4±42.3**	299.4±49.0**	307.8±57.5*	
地塞米松	1	322.4±11.8	294.4±12.1**	277.7±11.8**	266.0±12.7**#	246.5±18.8***	252.3±19.0**#	243.1±17.8***	
虫草素制剂	125	315.9±22.4	292.4±22.3*	290.7±27.4**	283.9±29.0**	285.8±33.8**	298.8±41.3**	306.0±38.1**	
	250	317.0±15.2	291.9±17.3**	278.4±17.3**	271.6±18.4**	261.1±19.3**	270.3±26.5**	272.9±33.8**	
	500	320.2±16.0	293.8±19.1*	284.9±24.7**	279.9±29.5**	281.7±35.0**	296.7±30.6**	296.0±26.4**	
虫草活力素 A	500	347.8±39.8	320.4±34.4#	312.0±33.9	305.2±32.1*	287.4±31.4**	302.7±45.1**	311.3±48.9*	
虫草活力素 B	500	321.3±25.6	292.1±30.0	274.7±27.5**	275.2±24.1**	271.2±31.2**	283.4±38.5**	288.0±38.9**	

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g						
		d12	d16	d19	d23	d26	d30	
正常	—	370.5±16.0	387.7±17.0	395.0±18.7	408.6±20.1	424.5±20.5	434.5±22.6	
模型	—	319.9±56.8*	350.2±46.3*	376.3±41.8	398.9±38.9	415.6±40.5	431.4±43.02	
地塞米松	1	236.8±25.4***	230.5±22.1***	219.0±20.1***	224.5±30.9***	233.0±42.0***	248.9±59.7***	
虫草素制剂	125	329.6±36.1**	353.9±39.9*	365.6±35.0*	388.8±41.2	402.4±47.9	410.2±40.0	
	250	289.3±29.2**	316.8±24.6**	334.2±28.2**#	362.8±24.5**#	379.8±19.2**#	399.0±13.4**	
	500	314.7±33.3**	345.4±29.3**	362.3±26.9**	385.3±21.5*	403.2±19.4*	418.3±16.3	
虫草活力素 A	500	321.9±50.2*	347.2±47.6*	372.0±41.8	394.8±43.0	408.0±43.0	422.7±43.9	
虫草活力素 B	500	302.6±43.6**	328.1±31.9**	343.8±27.5**	363.2±31.9**	382.8±28.5**	400.6±28.4*	

与对照组比较: *P<0.05 **P<0.01; 与模型组比较: #P<0.05 ##P<0.01, 下同
*P<0.05 **P<0.01 vs control group; #P<0.05 ##P<0.01 vs model group, same as below

2.2 对肺纤维化大鼠肺组织中 HYP 水平的影响

模型组大鼠 HYP 水平显著高于对照组 (P<0.01), 给予药物治疗后, HYP 水平不同程度下降, 地塞米松组 HYP 水平为 71.23 nmol/L, 与模型组比

较, 差异显著 (P<0.05); 虫草素制剂各个剂量组 HYP 水平较模型组均有不同程度下降, 高剂量组与模型组比较差异显著 (P<0.01)。虫草活力素 A 和 B 组 HYP 水平显著低于模型组 (P<0.01)。结果见表 3。

表 3 虫草素对肺纤维化大鼠肺羟脯氨酸水平的影响
Table 3 Effect of cordycepin preparation on HYP content in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis induced by gramoxone

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/只	HYP/(nmol·L ⁻¹)
对照	—	10	62.77±18.99
模型	—	10	104.44±17.67**
地塞米松	1	6	71.23±37.62#
虫草素制剂	500	8	65.67±17.40##
	250	8	79.44±40.41
	125	6	90.87±10.25**
虫草活力素 A	500	8	65.96±22.84##
虫草活力素 B	500	6	65.45±29.40##

2.3 对肺纤维化大鼠肺部病理变化的影响

Masson 染色结果显示：正常肺组织染色呈红色，镜下很少见到着色深蓝的纤维化组织，肺泡结构正常；模型组大鼠肺部布满着深蓝色的纤维化组织，肺泡结构破坏严重，肺组织有部分实变；1 mg/kg 的地塞米松组和 500 mg/kg 虫草素制剂组以及虫草活力素 A、B 组均不同程度的减少了纤维化组织，与模型组比较，纤维化程度略有缓和。结果见图 1。

3 讨论

吸烟、遗传、传染病及一些处方药均可导致肺纤维化，特别是随着环境污染的加剧，该病的发病率近年来显著增加^[8]。肺纤维化的治疗成为亟待解

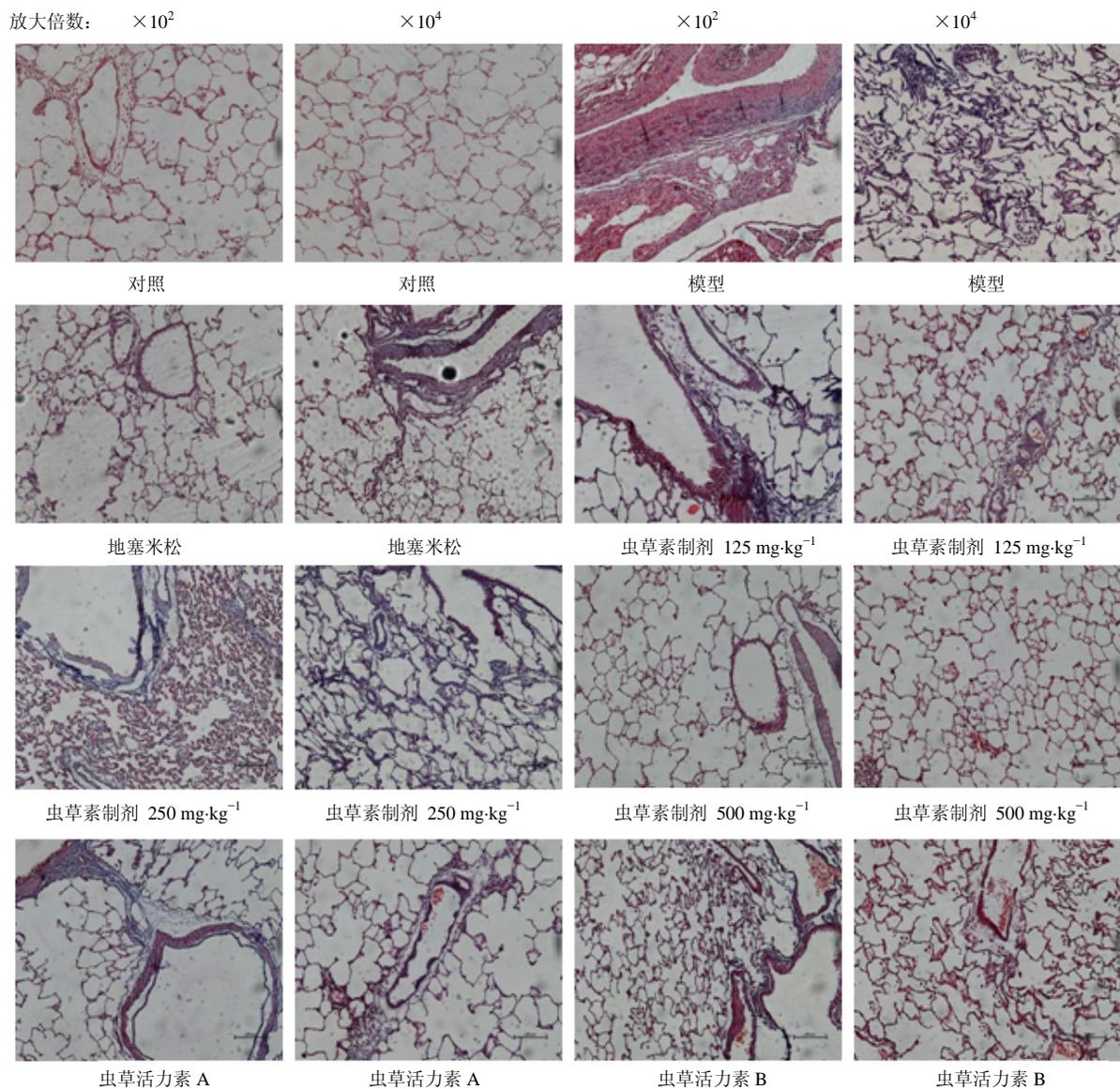


图 1 虫草素对百草枯致大鼠肺纤维化肺组织 masson 染色照片

Fig. 1 Masson staining photos of cordycepin preparation on lung tissue of rats with pulmonary fibrosis induced by gramoxone

决的问题。然而,肺纤维化治疗比较困难。特发性肺纤维化(IPF)是最难治的慢性纤维化肺部疾病,其死亡率甚至超过许多癌症^[9]。因此,近年来防治肺纤维化的研究已成为科学界关注的热点。

冬虫夏草是我国名贵中药材,具有多种功效,虫草素作为冬虫夏草的活性成分也具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、降血脂等多种药理活性^[11]。虫草素的化学名称为3'-脱氧腺苷(3'-deoxy-adenosine),溶于水、乙醇和甲醇,不溶于苯、丁醚和氯仿^[12]。本研究用百草枯诱导大鼠肺纤维化模型,测试样品虫草素制剂对百草枯致大鼠肺纤维化的治疗作用。结果发现,虫草素制剂能有效降低百草枯致大鼠肺纤维化动物肺组织中HYP水平,改善肺的组织结构和纤维化病理变化。为虫草素进一步开发为抗肺纤维化药物提供一定的理论基础。

高剂量虫草素制剂和虫草活力素A、B能降低百草枯ip给药导致的大鼠肺纤维化程度,降低肺匀浆中HYP水平,具有一定程度的抗大鼠肺纤维化作用。

参考文献

- [1] 贺凤群,秦光梅. 结缔组织生长因子在致肺纤维化过程作用机制的进展研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(20): 2092-2094.
- [2] 栾增强,曹文富. 黄芪防治肺纤维化的研究现状[J].

中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 275-277.

- [3] 高建,刘干,李俊. 肺成纤维细胞在肺纤维化进程中的作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1125-1128.
- [4] 邵文,崔艳丽,肖桂芝. Nintedanib: 抗癌、抗肺纤维化的三联血管激酶抑制剂[J]. 药物评价研究, 2015, 38(1): 105-109.
- [5] 张帅,邓家刚,黄思诗,等. 中药治疗肺纤维化的研究进展[J]. 医药导报, 2014, 33(9): 1208-1211.
- [6] 武丽斐,邢月,关亚兰,等. 冬虫夏草有效成分及其药理作用的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(10): 1254-1256.
- [7] 张姝,张永杰,徐建平,等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.
- [8] 王恺京,陆英,赵倩,等. 特发性肺纤维化的发病机制和临床治疗[J]. 中国医药导报, 2015, 12(12): 32-35.
- [9] 李帅,韦红梅,吕力学,等. 丹参酮IIA磺酸钠在治疗特发性肺纤维化疗效观察[J]. 临床研究, 2015(5): 192-193.
- [10] 胡贤达,黄雪,王彪,等. 冬虫夏草抗肿瘤及免疫调节作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 448-452.
- [11] 王征,武雪,刘建利,等. 虫草素抗肿瘤活性研究进展[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(16): 1365-1368.
- [12] 汪家春,徐军,李兆兰,等. HPLC测定冬虫夏草中的虫草素[J]. 食品与药品, 2015, 17(4): 263-266.