

桑根酮 C 对博莱霉素诱导小鼠肺纤维化改善作用及机制研究

刘 杨¹, 罗振亮¹, 严福林², 潘 春¹, 吕冰清¹, 唐阿梅^{3*}, 杨长福^{1*}

1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州中医药大学第一附属医院 呼吸科, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 观察桑根酮 C 对博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化的影响, 并探讨其可能的作用机制。 **方法** C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 即假手术组、模型组和桑根酮 C (100、50 mg/kg) 组, 每组 20 只。假手术组小鼠气管内注射生理盐水, 模型组小鼠气管内注射博莱霉素诱导肺纤维化模型。术后第 4 天开始给药, 连续给药 28 d 后检测小鼠呼吸功能; 检测肺内羟脯氨酸含量; HE 染色观察肺内炎症表现; Masson 染色观察肺内胶原活性; 免疫组化法检测肺内转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 蛋白表达量; 免疫蛋白印迹法检测肺内 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、磷酸化的核转录因子- κ B p65 (p-NF- κ B p65)、I 型胶原和 III 型胶原表达量。 **结果** 与模型组比较, 桑根酮 C 能够改善经博莱霉素诱导形成肺纤维化后小鼠的呼吸功能, 能够明显降低肺内羟脯氨酸含量, 明显减轻肺内炎症和胶原沉积, 肺内 TGF- β 1、 α -SMA、NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65、I 型胶原和 III 型胶原蛋白表达量明显降低。 **结论** 桑根酮 C 能够明显改善博莱霉素诱导小鼠肺纤维化, 改善呼吸功能, 其机制可能与抑制 TGF- β 1 过表达和降低炎症转录因子 NF- κ B 及磷酸化表达有关。

关键词: 桑根酮 C; 肺部纤维化; 病理发展; 胶原; 呼吸功能

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4244-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.018

Effect of sanggenon C on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice and potential mechanisms implicated

LIU Yang¹, LUO Zhen-liang¹, YAN Fu-lin², PAN Chun¹, LV Bing-qing¹, TANG A-mei³, YANG Chang-fu¹

1. Basic Medical School, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. College of Pharmacy, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. Respiratory department of Guizhou Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To observe the effect of sanggenon C on pulmonary fibrosis induced by bleomycin and explore its possible mechanism. **Methods** C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: control group, model group, sanggenon C (100 and 50 mg/kg) group, 20 mice for each group. The control group and model group were induced by intratracheal injection of saline and bleomycin, respectively. The administration was started on day 4 after the operation, and the respiratory function of the mice was detected after 28 d of continuous administration. The content of hydroxyproline in lung was measured. Pulmonary inflammation and activity of collagen in lung were observed by HE staining and Masson staining. The expression of TGF- β 1 protein in lung was detected by immunohistochemistry and detection of the expression of α -SMA, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, type I collagen and type III collagen in lung was detected by Western-blotting. **Results** Compared with model group, sanggenon C improved the respiratory function in mice with pulmonary fibrosis induced by bleomycin. It significantly decreased the content of hydroxyproline, alleviated the degree of inflammation, and reduced the deposition of collagen in lung. The expression of TGF- β 1, α -SMA, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, type I collagen and type III collagen in lung was significantly reduced. **Conclusion** Sanggenon C can significantly improve the pulmonary

收稿日期: 2020-01-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660735); 贵州省教育厅资助项目 (黔教合 KY 字 [2016] 189); 贵州省科技厅联合基金 (黔科合 LH 字 [2016] 7503)

作者简介: 刘 杨 (1986—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为肺部纤维化研究。Tel: (0851)8506145 E-mail: www.liuyang1986@163.com

*通信作者 唐阿梅 (1983—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为肺部纤维化研究。Tel: (0851)85284822 E-mail: DDZQGZY@126.com

杨长福 (1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为肺部纤维化研究。Tel: (0851)8506145 E-mail: yangchangfu@126.com

fibrosis and respiratory function induced by bleomycin in mice. The mechanism may be related to the inhibition of TGF- β 1 overexpression and the decrease of the expression of inflammatory transcription factor NF- κ B and phosphorylation.

Key words: sanggenon C; pulmonary fibrosis; pathological development; collagen; respiratory function

肺部纤维化 (PF) 作为临床常见病, 治疗棘手。不同程度呼吸困难是 PF 最常见的症状, 并伴有干咳、乏力, 部分患者有杵状指和发绀, 严重后果可致正常肺组织结构改变, 功能丧失; 病理改变以普遍型间质性肺炎、广泛肺内纤维化和瘢痕化、肺内成纤维细胞和肌成纤维细胞异常增殖及大量细胞外基质聚集于肺泡细胞周围并伴炎症损伤、组织结构破坏, 正常的肺泡组织被损坏后异常修复导致肺内疤痕形成^[1]。肺泡上皮损伤是启动 PF 的重要步骤, 而转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 作为驱动此步骤的细胞因子之一, 可募集单核细胞释放核转录因子- κ B (NF- κ B) 等炎症因子激发炎症和诱导肺内成纤维细胞向肌成纤维细胞转化, 并促进 I 型胶原蛋白 (Col I)、III 型胶原蛋白 (Col III) 等细胞外基质产生, 促进胶原异常增殖。根据前期研究, 桑白皮 *Morus alba* L. 已被证实具有一定的抗炎镇痛和抗肿瘤作用, 桑白皮提取物也具有一定的抑制 PF 发生发展的作用, 但具体药效成分未明^[2]。而桑根酮 C 作为桑白皮内重要成分对于 PF 是否具有干预或治疗作用未有报道^[3-6], 本研究初步考察桑根酮 C 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化改善作用及潜在机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只, 雌雄各半, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 购自长沙天勤生物技术有限公司, 许可证号为 SCXK (湘) 2019-0014。

1.2 药物与试剂

桑根酮 C (批号 10234624, 质量分数 98%, 成都德思特生物技术有限公司); 博来霉素 (批号 20190013, 上海蓝木化工有限公司); 二甲苯和无水乙醇 (分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 载玻片和盖玻片 (江苏世泰实验器材有限公司); β -actin、TGF- β 1、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、核转录因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、Col I、Col III 抗体 (Abcam 公司); 磷酸化核转录因子 NF- κ B p65 (p-NF- κ B p65) 抗体 (CST 公司); 生物素标记山羊抗兔抗体、ECL 发光液和苏木素伊红染色液 (上海碧云天生物技术有限公司); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、Masson 染色试剂盒、SDS、Tris、甘氨酸、

PBS 和羧甲基纤维素钠 (北京索莱宝生物科技有限公司); MinuteTM 动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒 (北京英文特生物技术有限公司); 微量 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪生物科技有限公司); PVDF 膜 (0.2 μ m, Millipore 公司); PV-9000 免疫组化试剂盒和 DBA 显影液 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 脱脂奶粉 (BD 公司); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司); 生理盐水 (山东齐鲁制药集团有限公司); 纯净水 (江山娃哈哈宏振饮用水有限公司); 羟脯氨酸试剂盒 (碱水解法, 南京建成生物工程研究所)。

1.3 仪器

WBP 动物无创肺功能呼吸检测系统 (上海塔望智能科技有限公司); PowerPAC Basic 电泳仪和 ChemiDoc XRS 凝胶成像自动分析仪 (Bio-Rad 公司); 免疫组化成像系统 (Olympus 公司); 免疫组化专业图像分析软件 (Media Cybernetics 公司)。

2 方法

2.1 模型制备及分组

SPF 级 C57BL/6 小鼠随机数字表法分为假手术组 20 只和模型组 60 只, ip 4%水合氯醛 (生理盐水溶解调配) 麻醉, 碘伏酒精消毒颈部皮肤, 剪开颈部皮肤, 仔细剥离颈前组织避免出血并仔细分离出气管。模型组 60 只 C57BL/6 小鼠全部气管内注射 0.1 mL 生理盐水溶解的博来霉素 5 mg/kg; 假手术组 20 只小鼠全部气管内注射 0.1 mL 生理盐水。注射后小鼠快速倒立旋转, 使博来霉素注射液或生理盐水混匀于肺组织内。术后小鼠保温苏醒后正常喂食喂水连续饲养 3 d, 将模型小鼠 60 只随机分为模型组和桑根酮 C 100、50 mg/kg 组, 每组 20 只。第 4 天开始假手术组和模型组小鼠 ig 给予纯净水, 桑根酮 C 各剂量组 ig 给予 0.1%羧甲基纤维素钠溶解混悬的桑根酮 C 溶液, 连续给药 28 d, 给药期间小鼠正常饮水饮食, 符合贵州中医药大学动物伦理规范。末次给药 1 h 后将每组小鼠随机抽取 10 只检测呼吸功能, 随后脱颈处死并摘取左肺, 用羟脯氨酸试剂盒检测羟脯氨酸含量, 右肺用于免疫蛋白印迹法检测 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达, 剩余 10 只小鼠快速脱颈椎处死摘

取左肺,用于 HE 染色观察炎症反应和 Masson 胶原染色检测胶原增殖情况,右肺免疫组化法检测 TGF- β 1 蛋白表达。

2.2 肺纤维化小鼠呼吸功能检测和脏器系数分析

将小鼠放入 WBP 动物无创肺功能呼吸检测系统附带的密闭容器内,调整参数设定,适应 10 min 后监测记录潮气量(tidal volume, TVB)、吸气时间(inspiration time, Ti)和呼气时间(expiration time, Te)并统计分析。脱颈处死小鼠,摘取肺脏,称定质量后统计并计算脏器指数。

脏器指数=肺脏质量/体质量

2.3 碱水解法测定羟脯氨酸含量

取每组小鼠左肺采用碱水解法,根据试剂盒要求将组织放入试管中并加入水解液 1 mL,沸水浴水解 20 min,加指示剂 10 μ L,调整 pH 值至 6.0 左右,加纯净水至 10 mL 并混匀稀释,取 3 mL 稀释后的水解液加入活性炭 20 mg, 3 500 r/min 离心 10 min 后,取上清液于 550 nm 处做吸光度(A)值检测。

2.4 免疫蛋白印迹法检测 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达

每组小鼠右肺采用柱状离心法提取总蛋白,BCA 法蛋白定量试剂盒微板检测法进行总蛋白定量,根据 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒说明制作浓度为 12%分离胶和 5%浓缩胶,浓缩胶 80 V 电泳约 30 min,分离胶 120 V 电泳约 1 h,甲醇浸泡 PVDF 膜 5 min,60 V 电转膜 2 h,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(内参一抗 1:8 000、其他一抗 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 冲洗 3 次,加入二抗(1:10 000),TBST 冲洗 3 次,ECL 显影液显影后,分析结果灰度值,实验重复 3 次。

2.5 HE 染色和 Masson 染色

取每组小鼠左肺,用 4%多聚甲醛固定 24 h 后,自来水冲洗,由低浓度到高浓度酒精梯度分别脱水 1 h,二甲苯透明 20 min,浸蜡包埋组织,蜡块室温冷却后以 4 μ m 厚度切片,37 $^{\circ}$ C 烘干切片后,二甲

苯脱蜡,高浓度到低浓度酒精脱水,苏木素染色 10 min,自来水返蓝 5 min $\times$ 3 次,伊红染色 30 s,低浓度到高浓度酒精脱水后二甲苯浸泡 5 min,中性树胶封片镜检观察并评测肺组织炎症程度变化。根据 Szapiel 病理评价方法:0 分为无肺泡炎症;1 分为轻度肺泡炎症,病变范围 $\leq$ 全肺 20%;2 分为中度肺泡炎症,病变范围占全肺 20%~50%;3 分为重度肺泡炎症,病变范围 $\geq$ 全肺 50%,且结构改变。切片二甲苯脱蜡,高浓度到低浓度酒精脱水,Masson 胶原染色试剂染色,高浓度酒精脱水后二甲苯浸泡 5 min,中性树胶封片并镜检观察并评测肺组织胶原增殖程度变化。根据 Szapiel 病理评价方法:0 分为无纤维化;1 分为轻度纤维化,病变范围 $\leq$ 全肺 20%;2 分为中度纤维化,病变范围占全肺 20%~50%;3 分为重度纤维化,病变范围 $\geq$ 全肺 50%,且结构改变。

2.6 免疫组化法检测 TGF- β 1 蛋白表达

每组小鼠右肺石蜡切片常规脱蜡,水化组织切片,根据 PV-9000 试剂盒说明书进行操作,3%过氧化氢封闭 20 min,PBS 缓冲液冲洗 3 min $\times$ 3 次后滴加一抗(1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后 PBS 缓冲液冲洗 3 min $\times$ 3 次,滴加二抗并室温孵育 20 min,PBS 缓冲液冲洗 3 min $\times$ 3 次后,DAB 显影后,自来水冲洗,苏木素复染,脱水,透明并封片,镜下观察棕黄色颗粒为阳性表达,分析并统计平均 A 值。

2.7 数据处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据显著性分析,采用单因素方差分析进行数据分析。

3 结果

3.1 桑根酮 C 对博莱霉素诱导的 PF 小鼠呼吸功能的影响

表 1 结果表明,与假手术组比较,模型组小鼠呼吸功能明显受到限制,TVB 降低,Ti 和 Te 延长。与模型组比较,桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠呼吸功能表现较好,TVB 明显增加,Ti 缩短($P<0.05$ 、 0.01)。

表 1 桑根酮 C 对 PF 小鼠呼吸功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of sanggenon C on respiratory function in mice with PF ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg $\cdot$ kg $^{-1}$)	TVB/mL	Ti/ms	Te/ms
假手术	—	0.41 $\pm$ 0.14	67.00 $\pm$ 20.01	74.90 $\pm$ 15.46
模型	—	0.27 $\pm$ 0.08*	124.70 $\pm$ 34.20**	131.30 $\pm$ 54.35*
桑根酮 C	50	0.38 $\pm$ 0.11 [#]	90.30 $\pm$ 21.57* ^{##}	99.10 $\pm$ 57.84
	100	0.38 $\pm$ 0.12 [#]	90.40 $\pm$ 33.13* ^{##}	120.70 $\pm$ 32.43*

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$, 下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group, same as below

3.2 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺脏指数的影响

表 2 结果表明,与假手术组比较,模型组小鼠肺脏指数明显上升。与模型组比较,桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠肺脏指数明显下降 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺内羟脯氨酸含量的影响

表 3 结果表明,与假手术组比较,模型组小鼠肺内羟脯氨酸质量分数明显上升 ($P<0.01$)。与模型组比较,桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠肺内羟

表 2 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effect of sanggenon C on lung organ coefficient in mice with PF ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺脏指数
假手术	—	0.008±0.001
模型	—	0.015±0.003**
桑根酮 C	50	0.010±0.004 [#]
	100	0.011±0.005 [#]

表 4 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of sanggenon C on expression of α -SMA, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, Col I and Col III proteins in lung tissue of mice with PF ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		α -SMA	NF- κ B p65	p-NF- κ B p65	Col I	Col III
假手术	—	0.001±0.003	0.186±0.023	0.016±0.018	0.146±0.036	0.133±0.048
模型	—	0.313±0.086**	0.454±0.122**	0.111±0.023**	0.374±0.110**	0.344±0.101**
桑根酮 C	50	0.003±0.002 [#]	0.201±0.072 [#]	0.033±0.011 [#]	0.144±0.051 [#]	0.163±0.047 [#]
	100	0.006±0.001 [#]	0.167±0.087 [#]	0.020±0.006 [#]	0.151±0.060 [#]	0.121±0.035 [#]

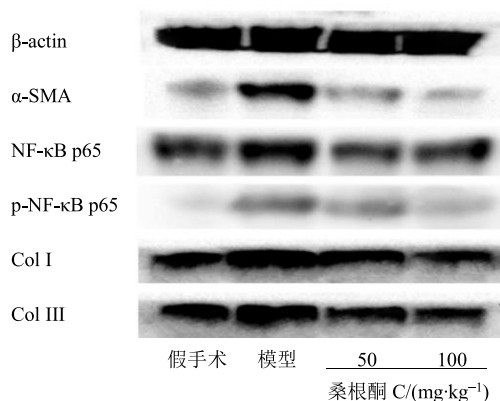


图 1 桑根酮 C 对肺纤维化小鼠肺组织 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of sanggenon C on protein expression of α -SMA, NF- κ B p65, p-NF- κ B p65, Col I and Col III in lung tissue of mice with pulmonary fibrosis

表 3 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织羟脯氨酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of sanggenon C on hydroxyproline content in lung tissue of mice with PF ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	羟脯氨酸/(μ g·mg ⁻¹)
假手术	—	0.99±0.58
模型	—	2.05±1.25**
桑根酮 C	50	0.78±0.44 [#]
	100	0.90±0.49 [#]

脯氨酸水平明显下降 ($P<0.01$)。

3.4 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达的影响

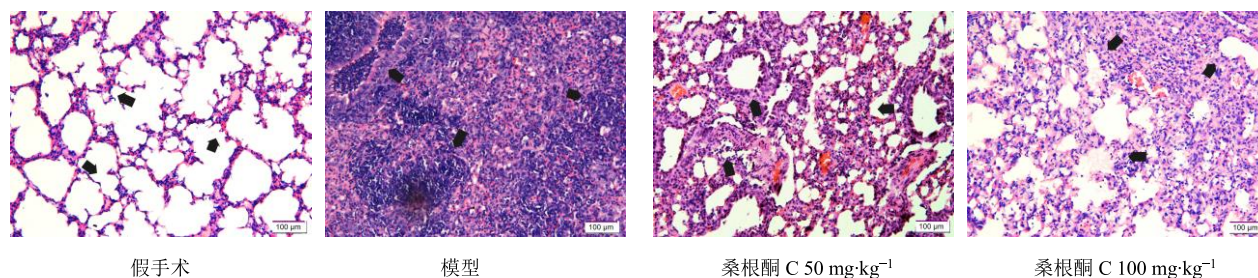
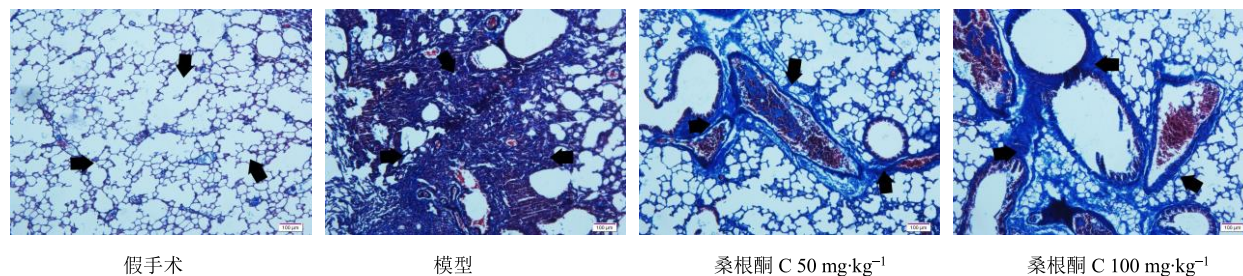
表 4、图 1 结果表明,与假手术组比较,模型组小鼠肺内 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达水平明显上升 ($P<0.01$)。与模型组比较,桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠肺内 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I、Col III 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。

3.5 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织炎症程度和胶原增殖的影响

图 2、3 和表 5 结果表明,假手术组小鼠肺泡和细支气管周围无炎症表现,仅有少量的胶原,肺泡结构完整,无肺泡内出血。与假手术组比较,模型组小鼠肺泡内肺泡结构消失,气管闭合,大量淋巴细胞侵袭,胶原蛋白围绕气管和肺泡大量增殖,导致正常肺泡结构消失或黏连。与模型组比较,桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠肺内肺泡结构较为完整,细支气管周围虽有部分淋巴细胞侵袭,胶原蛋白异常增殖,炎症程度和胶原增殖程度明显减弱。

3.6 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织 TGF- β 1 蛋白表达的影响

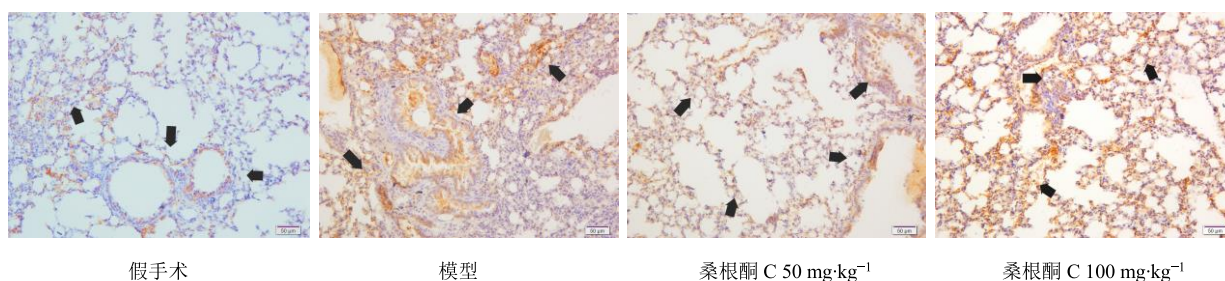
表 6、图 4 结果表明,假手术组小鼠肺组织 TGF- β 1 蛋白表达水平较低,与假手术组比较,模型

图 2 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织内炎症程度的影响 (HE 染色, $\times 100$)Fig. 2 Effect of sanggenon C on degree of inflammation in lung tissue of mice with PF (HE staining, $\times 100$)图 3 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织内胶原增殖程度影响 (Masson 染色, $\times 100$)Fig. 3 Effect of sanggenon C on collagen increment in lung tissue of mice with PF (Masson staining, $\times 100$)表 5 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织内炎症程度和胶原增殖程度影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 5 Effect of sanggenon C on inflammation and collagen proliferation in lung tissue of mice with PF ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	炎症程度得分	胶原增殖程度 得分
假手术	—	0.10 ± 0.32	0.1 ± 0.32
模型	—	$2.50 \pm 0.53^{**}$	$2.4 \pm 0.52^{**}$
桑根酮 C	50	$1.50 \pm 0.85^{**\#\#}$	$1.4 \pm 0.84^{**\#\#}$
	100	$1.50 \pm 0.85^{**\#\#}$	$1.4 \pm 0.84^{**\#\#}$

表 6 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺组织内 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 6 Effect of sanggenon C on protein expression of TGF- $\beta 1$ in lung tissue of mice with PF ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	A 值
假手术	—	0.09 ± 0.11
模型	—	$0.30 \pm 0.17^{**}$
桑根酮 C	50	$0.16 \pm 0.10^{\#}$
	100	$0.14 \pm 0.13^{\#}$

图 4 桑根酮 C 对 PF 小鼠肺内 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达的影响 (免疫组化染色, $\times 200$)Fig. 4 Effect of sanggenon C on protein expression of TGF- $\beta 1$ in lung tissue of mice with PF (immunohistochemical staining, $\times 200$)

组小鼠肺组织 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 桑根酮 C 50、100 mg/kg 组小鼠肺组织 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达明显被抑制 ($P < 0.05$)。

4 讨论

PF 是指以炎症致肺泡组织损伤, 细胞外基质过

度沉积于肺泡间隙, 成纤维细胞过度增值, 形成肺实质不可逆的瘢痕, 可为多种肺间质性疾病的最终结果。PF 是呼吸系统疾病中较难治愈的一类疾病, 由于有效的气体交换依赖于氧气和二氧化碳分子通过肺泡上皮的转运, 这种炎症和纤维化会导致气体交换受损, 肺功能和肺容积减少、低氧血症、呼吸

困难、咳嗽，当病情恶化时诱发呼吸衰竭^[7]。

桑根酮 C 为桑白皮所含成分，其功效为泻肺平喘、利水消肿，据文献报道桑根酮 C 可作为质控标准对中药桑白皮进行质量控制^[8]，本课题组前期研究已证实桑白皮提取物有一定的改善因博莱霉素诱发小鼠 PF 病理表现，但具体药效物质成分未明^[2]。采用博莱霉素诱导小鼠 PF 后，小鼠肺内 TVB 明显降低，吸气时间和呼气时间延长，经高纯度桑根酮 C 干预后发现，桑根酮 C 能够明显改善小鼠气管内滴注博莱霉素引发 PF 后的呼吸功能，增强小鼠肺内 TVB，缩短 Ti。HE 染色和 Masson 染色镜下病理观察发现，PF 小鼠肺内大量淋巴细胞浸润，胶原蛋白水平普遍升高，肺组织结构病理性改变，正常的肺泡结构被大量异常增殖的胶原组织替代，肺泡间气体交换功能损害，经桑根酮 C 干预后，淋巴细胞浸润减少，胶原蛋白水平整体下降，残留的肺泡结构较多，有利于小鼠进行肺泡间的气体交换，改善其通气功能。而羟脯氨酸作为一种必需氨基酸，是胶原蛋白合成的主要氨基酸，经碱水法进一步检测小鼠肺内羟脯氨酸水平后证实，模型组小鼠肺内羟脯氨酸水平普遍较高，给予桑根酮 C 干预后，小鼠肺内羟脯氨酸水平明显下降，表明桑根酮 C 具有明显的拮抗博莱霉素诱导小鼠肺纤维化胶原形成的作用，整理归纳 PF 小鼠呼吸功能改善情况和病理胶原成分检测可得出，桑根酮 C 具有潜在抑制博莱霉素诱导小鼠 PF 的药效作用。

但现阶段临床尚无有效药物能够逆转 PF，对于 PF 的临床治疗目标多集中于早期干预，抑制炎症渗出期向纤维化期转化，改善肺功能。TGF- β 现已证实在 PF 发展中全程过表达，是目前已开发 PF 治疗药物针对的关键靶点之一，如吡非尼酮^[9-12]。TGF- β 参与胚胎发育、器官发生、细胞命运决定、免疫调节、应激反应和干细胞功能。由于其广泛的功能多样性，TGF- β 信号的异常与多种人类疾病有关，包括癌症、纤维化疾病、系统性巩膜病和遗传性疾病^[13-15]。 α -SMA 作为细胞骨架蛋白，是成纤维细胞表达的重要标志之一，当 PF 活动期时， α -SMA 蛋白表达增强，反之则减弱。Col I 和 Col III 作为细胞外基质中的一种结构性蛋白，是细胞外基质的重要组成，PF 后期，细胞外基质过量沉积于肺间质，导致肺组织结构消失，正常肺功能受损，肺泡结构消失，气体交换功能丧失，最后可引发呼吸衰竭^[16-17]。NF- κ B 多以无活性状态集中于细胞质内，当被炎症刺激时

会释放入细胞核进行催化，产生生物学活性。引起 NF- κ B 激活的诱因很多，如生长因子、内源性或外源性毒素、炎症小体或因子等，NF- κ B 存在于几乎所有细胞中，参与调节基因表达、免疫反应等^[17]。对博莱霉素诱导 PF 小鼠肺内 TGF- β 1、 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I 和 Col III 检测后发现，PF 小鼠肺内 TGF- β 1、 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I 和 Col III 表达明显升高，经桑根酮 C 干预后，几种蛋白表达水平显著下降，表明桑根酮 C 能够减轻博莱霉素诱发小鼠 PF 时肺内炎症的激活和细胞外基质的过度沉积或过表达。

本研究结果表明，桑根酮 C 能够明显改善因博莱霉素引发小鼠 PF 病理改变，这种改变可能与拮抗 TGF- β 1、 α -SMA、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Col I 和 Col III 的过表达有关，具体作用机制更待进一步考察。

参考文献

- [1] Meyer K C. Pulmonary fibrosis, part I: epidemiology, pathogenesis, and diagnosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(5): 343-359.
- [2] 杨长福, 刘 杨, 徐昌君, 等. 药对桑白皮、百部提取物对小鼠肺纤维化的干预作用 [J]. *中药材*, 2017, 40(6): 1448-1452.
- [3] 俸婷婷, 谢体波, 林 冰, 等. 桑白皮总黄酮的镇痛抗炎药理作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(11): 2580-2582.
- [4] 党院霞, 梁丹灵, 周欣欣, 等. 基于分子对接技术的桑白皮总黄酮对高脂血症并高尿酸血症大鼠肾保护作用研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1175-1181.
- [5] 袁 婷, 郑甜碧, 谢鲁灵枫, 等. HPLC 法同时测定桑白皮中 5 种成分 [J]. *中成药*, 2019, 41(7): 1606-1011.
- [6] 周 萍, 董晓先, 汤 平. 桑根酮 C 通过激活 caspase 3 及 caspase 9 诱导前列腺癌 PC3 细胞凋亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2017, 37(9): 1206-1210.
- [7] Sundarakrishnan A, Chen Y, Black L D, *et al*. Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 129(1): 78-94.
- [8] 段志涛, 高 英, 周 刚. 桑白皮药材的质量标准研究 [J]. *中药材*, 2013, 36(4): 553-557.
- [9] 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.
- [10] Froese A R, Shimbori C, Bellaye P S, *et al*. Stretch-induced activation of transforming growth factor- β 1 in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care*

- Med*, 2016, 194(1): 84-96.
- [11] Wei Y, Kim T J, Peng D H, *et al.* Fibroblast-specific inhibition of TGF- β 1 signaling attenuates lung and tumor fibrosis [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10): 3675-3688.
- [12] 甘文华, 黄 凯, 吕紫薇, 等. 吡非尼酮和尼达尼布体外抗肺纤维化作用 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1370-1375.
- [13] Shimbori C, Upagupta C, Bellaye P S, *et al.* Mechanical stress-induced mast cell degranulation activates TGF- β 1 signalling pathway in pulmonary fibrosis [J]. *Thorax*, 2019, 74(5): 455-465.
- [14] Angelov S N, Hu J H, Wei H, *et al.* TGF- β (transforming growth factor- β) signaling protects the thoracic and abdominal aorta from angiotensin ii-induced pathology by distinct mechanisms [J]. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2102-2113.
- [15] Vivekanandhan S, Mukhopadhyay D. Genetic status of KRAS influences transforming growth factor-beta (tgf- β) signaling: An insight into neuropilin-1 (NRP1) mediated tumorigenesis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 54(1): 72-79.
- [16] Koo H Y, El-Baz L M, House S, *et al.* Fibroblast growth factor 2 decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis and inhibits fibroblast collagen production and myofibroblast differentiation [J]. *J Pathol*, 2018, 246(1): 54-66.
- [17] Karsdal M A, Genovese F, Madsen E A, *et al.* Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1): 103-109.
- [18] Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NF- κ B system [J]. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016, 8(3): 227-241.
-
- (上接第 4222 页)
- [8] 薛 景, 王英爱, 贾献慧, 等. 苯乙醇苷类化合物的分类及研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(5): 282-290.
- [9] 宋光西, 马玲云, 魏 锋, 等. 苯乙醇苷的分布及药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(4): 169-171.
- [10] Ye L, Mao S, Fang S R, *et al.* Increased serum Romol was correlated with lung function, inflammation, and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1555-1560.
- [11] 刘 博. 小鼠巨噬细胞 TLR2、TLR4 及 RP105 在金黄色葡萄球菌感染中的天然免疫应答机制 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] 周 平, 罗 云, 邢 娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 介导动脉粥样硬化发生机制的研究进展 [J]. 世界中医药, 2015, 10(8): 1163-1168.
- [13] 程海燕, 陈先国, 徐元宏. 白细胞介素 6 与自身免疫性疾病关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(9): 1285-1287.
- [14] 张伟洁, 郑 宏. IL-6 介导免疫炎症反应作用及其与疾病关系的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(5): 699-703.
- [15] 王筱婧, 左艳敏, 王东兴, 等. 一氧化氮介导的中药及其活性成分的抗炎作用研究进展 [J]. 免疫学杂志, 2015, 31(5): 435-440.
- [16] 赵洪伟, 车 楠, 黄 超, 等. Notch1 信号激活核因子 κ B (NF- κ B) 参与小鼠 RAW264.7 巨噬细胞炎症介质释放 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(10): 1310-1315.
- [17] 毛近隆, 李晓宇, 孙 蓉. 环氧化酶(COX-2)抑制剂提高心血管安全性的抗炎机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 4054-4059.
- [18] 李 航, 熊 璟, 周全荣. 中药调控核因子- κ B 活化的研究进展 [J]. 中医药学报, 2007, 35(2): 54-56.
- [19] Yuan R, Huang L T, Du L J, *et al.* Dihydroartemisinin exhibits an anti-inflammatory effect *in vitro* and *in vivo* through blocking TLR4 dimerization [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 102-114.
- [20] 王 青, 刘正兴, 赵永明. TNF- α 干预内皮细胞后 MAPK 与 NF- κ B 之间关系的研究 [J]. 大理学院学报: 综合版, 2010(6): 22-25.