

- 学, 2011.
- [9] 上官海燕, 毕 艳, 李 平, 等. 口服葡萄糖耐量试验仪 1 小时高血糖人群的 β 细胞功能[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(1): 15-17.
- [10] 仝小林, 倪 青, 魏军平, 等. 糖尿病中医诊疗标准[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(6): 540-547.
- [11] 金 磊. 代谢综合征中医证候研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2013.
- [12] 张婷婷. 仝小林教授运用小陷胸汤治疗代谢综合征的用药规律分析及经验总结[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [13] 顾雨芳, 傅 强. 从痰、热、气滞论小陷胸汤治疗糖尿病[J]. 环球中医药, 2010, 3(2): 136-137.
- [14] 张卓茹, 吴范武, 梁斯同, 等. 小陷胸汤合四逆散加减方治疗痰热互结型 2 型糖尿病的经验总结[J]. 当代医药论丛, 2019, 17(3): 189-190.
- [15] 张利民, 冯德勇, 邹莲霞, 等. 小陷胸汤对糖尿病前期痰湿蕴热体质的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(4): 467-469.
- [16] 张利民, 邹莲霞, 巫祖强, 等. 小陷胸汤对糖尿病前期痰湿蕴热患者胰岛素抵抗指数及 β 细胞功能的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2018, 41(4): 52-55.

兰石草对小鼠肺纤维化的抑制作用

吴延龙, 崔轶霞, 刘宇宏, 张 弓*
(延安大学附属医院临床药理科, 陕西 延安 716000)

摘要: **目的** 探究兰石草对小鼠肺纤维化的抑制作用。**方法** 小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组及兰石草高、低剂量组, 每组 20 只, 模型组、阳性药组、兰石草组小鼠通过气管滴注 5 mg/kg 博来霉素溶液建立肺纤维化动物模型, 空白组小鼠气管内滴注等体积生理盐水, 7 d 后, 阳性药组小鼠灌胃 100 mg/kg 比菲尼酮, 兰石草组小鼠分别灌胃 800、500 mg/kg 兰石草水煎液, 其他 2 组小鼠灌胃等体积生理盐水, 持续 3 周。记录小鼠体质量、计算肺系数, 检测肺组织羟脯氨酸、血清炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β) 水平, HE、Masson、免疫荧光切片染色观察小鼠病理情况及 TGF- β 1、 α -SMA 表达。**结果** 高剂量兰石草可明显改善小鼠病理情况, 增加体质量, 降低肺系数, 减少羟脯氨酸表达, 抑制炎症因子水平及 TGF- β 1、 α -SMA 表达, 改善病理损伤程度。**结论** 兰石草可抑制小鼠肺纤维化, 其作用机制可能与抑制肺组织炎症、纤维化和减少胶原沉积有关。

关键词: 兰石草; 肺纤维化; 炎症; 胶原沉积

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)03-0976-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.03.055

随着我国经济快速发展, 以 PM_{2.5} 为主的空气颗粒物对环境产生的污染日趋严峻, 统计结果表明, 我国仅 2012 年大概有 100 万人因 PM_{2.5} 导致早死和 2 400 万人因此而致残, 其中肺纤维化是导致早死和伤残的主要病因^[1]。肺纤维化是一种严重危害人类健康的肺间质疾病, 是各种呼吸系统疾病发展至肺癌晚期的必经阶段, 特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是目前临床上公认的不治之症, 诊断出该病的患者平均寿命为 3 到 5 年^[2]。多种因素可以诱发肺纤维化的产生, 比如药物副作用、PM_{2.5}、病毒、化学试剂等^[3-4]。目前, 未有特异性治疗肺纤维化的特效药物, 有两款药物比菲尼酮和尼达尼布用于缓解肺纤维化病情, 无逆转纤维化作用, 并伴有严重的光敏和胃肠等毒副作用^[5]。因此, 探究新的治疗肺纤维化的药物具有重要的现实意义和实际价值。

藏药巴丫巴, 又名兰石草, 为玄参科兰石草属多年生矮小草本, 广泛分布于青海、西藏、甘肃等省区, 生于海拔 2 000~4 500 米的草地、疏林中或沟谷旁。据《藏药志》记载^[6], 兰石草性寒, 味甘、苦, 入肺经, 具有治疗肺炎、肺脓疡、肺脓肿等病症。以兰石草等二十五味藏药制成二十五味肺病丸, 临床上适用于各种肺病引起的咳嗽、胸痛、发烧等, 对陈旧性肺结核、慢性肺炎、肺气肿等热性肺病的疗效明显^[7], 但兰石草的抗肺纤维化活性却未见报道, 本研究对其抗肺纤维化活性进行研究, 为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠 100 只, 雌雄各半, 8~9 周龄, 体质量 19~26 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (京) 2015-0010。

收稿日期: 2020-07-02

作者简介: 吴延龙 (1981—), 男, 从事儿科学研究

* **通信作者:** 张 弓 (1985—), 男, 博士, 研究方向为临床药学、药理学。E-mail: zhanggong199090@163.com

1.2 仪器 HM525 冷冻切片机 [斯沃德 (北京) 仪器设备有限公司]; FM-200 倒置荧光显微镜 (上海普丹光学仪器有限公司); 电子天平 (德国 Sartorius 公司); 手动移液枪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.3 试剂 羧脯氨酸试剂盒 (南京建成生物工程研究所); HE 试剂盒、TNF- α 和 IL-1 β 检测试剂盒 (上海晶抗生物工程有限公司); Masson 试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术公司); 山羊抗小鼠 TGF- β 1 和 α -SMA 抗体、DAPI (美国 Santa Cruz 公司); FITC 标记二抗 (北京奥维亚生物技术有限公司)。

1.4 药物 兰石草购于青海省西宁市康乐药材市场。比菲尼酮胶囊剂 (北京康蒂尼药业有限公司, 批号 H20133376); 注射用博来霉素 (海正辉瑞制药有限公司, 批号 H20055883)。

1.5 药液制备 药材粉碎后配制成 40 mg/mL 水煎液, 比菲尼酮采用生理盐水配制成 50 mg/mL, 博来霉素采用生理盐水配制成 5 mg/kg。

1.6 分组、建模与给药 小鼠按体质量随机分为 5 组, 即空白组、模型组、阳性药组及兰石草高、低剂量组, 每组 20 只, 雌雄各半。采用 Szapiel 法^[8]建立肺纤维化模型, 小鼠麻醉 (10% 水合氯醛) 后固定, 颈部消毒, 沿颈中部剪开约 1 cm, 用钝性器件分离到气管部位, 模型组、阳性药组、兰石草组用微型注射器向气管内缓慢滴注 5 mg/kg 博来霉素, 而空白组滴注等体积生理盐水, 滴注结束后缝合切口。造模 7 d 后, 阳性药组小鼠每天灌胃 100 mg/kg 比菲尼酮, 空白组、模型组小鼠灌胃等量生理盐水, 连续 3 周。

1.7 指标检测

1.7.1 体质量和肺系数 建模 1 周后小鼠称定体质量, 给药 3 周后处死前再次称定体质量。脱颈处死小鼠, 摘取肺

组织称定质量, 以肺组织湿重与体质量之比为肺系数。

1.7.2 血清炎症因子水平 小鼠麻醉, 眼球取血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 离心 10 min, 取上部血清, 采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 水平。

1.7.3 HE、Masson 染色 小鼠肺组织称定质量后剪取右肺, 浸泡于 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 取一小叶, 用 OCT 将其包埋于样品托盘上, 在 -40 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 10 min, 切片 5 μm , 进行 HE、Masson 染色。

1.7.4 免疫荧光染色 5% BSA 封片 2 h, 小鼠肺组织切片滴加 100 μL 用 5% BSA 稀释的 TGF- β 1 和 α -SMA 一抗 (1 : 100), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 用 TBST 缓冲液于摇床上摇晃洗片 3 次, 每次 10 min, 在室温、避光条件下孵育 FITC 标记的二抗 (1 : 500) 2 h, DAPI 对细胞核染色 3 min, TBST 缓冲液摇晃洗片 4 次, 每次 10 min, 30%、50%、70% 乙醇及无水乙醇脱水后二甲苯透化, 封片, 在显微镜下观察 (先以低倍镜观察整个切片大体情况, 然后提高倍镜, 按从左到右、从上到下顺序依次仔细观察)。

1.8 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理, 计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 兰石草对小鼠体质量、肺系数的影响 如表 1 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠体质量降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 兰石草高剂量组小鼠体质量增加 ($P < 0.05$)。博来霉素可明显诱导小鼠产生水肿, 增加小鼠肺质量 ($P < 0.05$), 而高剂量兰石草可降低肺质量 ($P < 0.05$)。与空白组比较, 模型组小鼠肺系数升高 ($P < 0.05$), 高剂量兰石草可降低小鼠肺系数 ($P < 0.05$)。

表 1 兰石草对小鼠体质量、肺系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	体质量/g		肺质量/mg	肺系数
	给药前	给药后		
空白组	23.35 $\pm$ 1.21	28.85 $\pm$ 3.13	123.55 $\pm$ 3.31	4.35 $\pm$ 0.23
模型组	24.29 $\pm$ 2.13	19.76 $\pm$ 2.62 [*]	159.63 $\pm$ 5.62 [*]	8.08 $\pm$ 0.33 [*]
阳性药组	23.19 $\pm$ 2.34	26.66 $\pm$ 1.99 [#]	126.39 $\pm$ 2.78 [#]	4.21 $\pm$ 0.55 [#]
兰石草高剂量组	22.96 $\pm$ 3.32	24.59 $\pm$ 2.81 [#]	131.54 $\pm$ 4.32 [#]	5.35 $\pm$ 0.31 [#]
兰石草低剂量组	23.76 $\pm$ 2.37	20.32 $\pm$ 3.11	155.97 $\pm$ 3.99	7.69 $\pm$ 0.72

注: 与空白组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

2.2 兰石草对小鼠血清炎症因子水平的影响 如表 2 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 兰石草高剂量组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$)。

2.3 兰石草对小鼠肺组织病变和胶原沉积的影响 如图 1A 所示, 空白组小鼠肺组织肺泡结构正常, 无间质增生以及免疫细胞间质浸润等病理特征; 模型组小鼠肺组织肺泡结构出现明显的坍塌堆积, 并且有严重的间质增生病理特征, 组织间质可观察到有单核巨噬细胞和中性粒细胞的浸润; 与模型组比较, 兰石草高剂量组小鼠肺组织肺泡塌陷程度明显减轻, 免疫细胞浸润降低, 间质增生同样减弱,

表 2 兰石草对小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

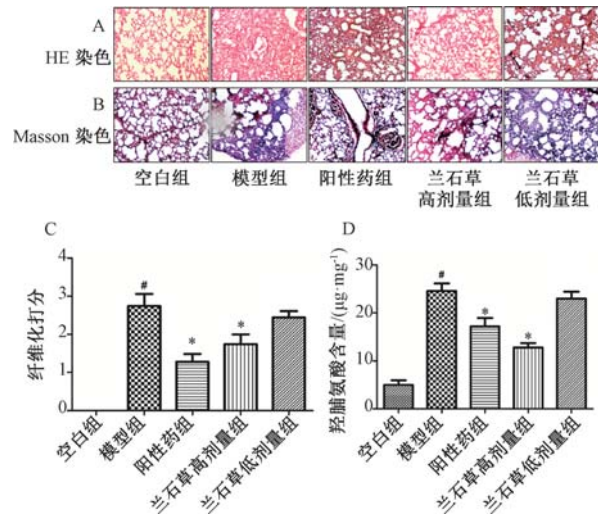
组别	水平/($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	TNF- α	IL-1 β
空白组	103.25 $\pm$ 4.11	38.43 $\pm$ 2.42
模型组	527.58 $\pm$ 6.27 ^{**}	119.43 $\pm$ 4.21 ^{**}
阳性药组	302.54 $\pm$ 9.11 [*]	62.33 $\pm$ 2.27 ^{**}
兰石草高剂量组	356.72 $\pm$ 8.87 [*]	84.72 $\pm$ 3.94 [*]
兰石草低剂量组	549.22 $\pm$ 7.37	124.12 $\pm$ 6.77

注: 与空白组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

但其改善作用明显弱于阳性药,而兰石草低剂量组具有一定的减缓作用,但不明显。如图 1B 所示,与空白组比较,模型组小鼠肺组织胶原蛋白沉积较严重,呈现较大面积和较深的蓝染效果,兰石草高剂量组、阳性药组可明显减少胶原蛋白的沉积,表现为较少和较浅的蓝染效果,但低剂量兰石草无明显作用。如图 1C 所示,高剂量兰石草可明显缓解小鼠肺纤维化病症。如图 1D 所示,模型组小鼠肺组织羟脯氨酸水平高于空白组 ($P<0.05$),而兰石草高剂量组其水平降低 ($P<0.05$),兰石草低剂量给药组无明显改善作用。

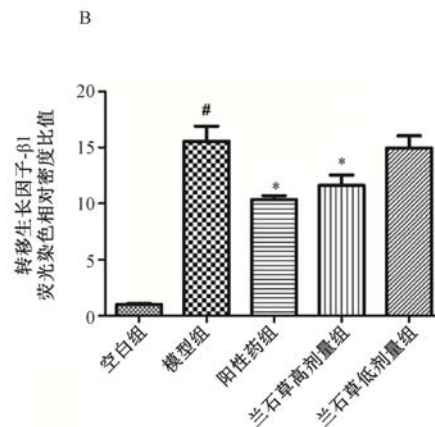
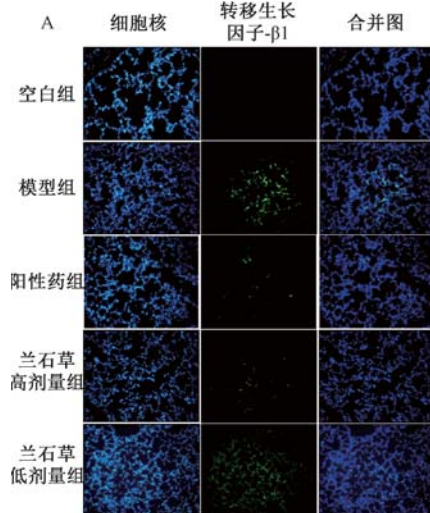
2.4 兰石草对小鼠肺组织 TGF- β 1 表达的影响 如图 2 所示,模型组小鼠肺组织 TGF- β 1 表达高于空白组 ($P<0.05$),而兰石草高剂量组其表达降低 ($P<0.05$)。

2.5 兰石草对小鼠肺组织 α -SMA 表达的影响 如图 3 所示,与空白组比较,模型组小鼠肺组织 α -SMA 表达升高 ($P<0.05$),而兰石草高剂量组其表达降低 ($P<0.05$)。



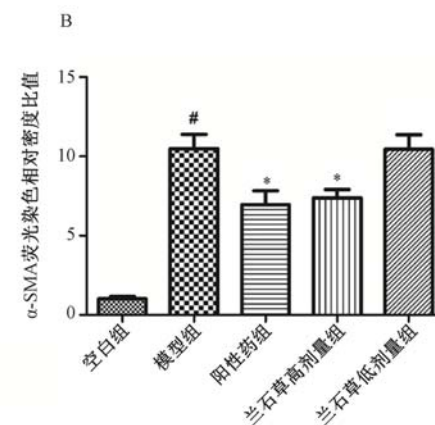
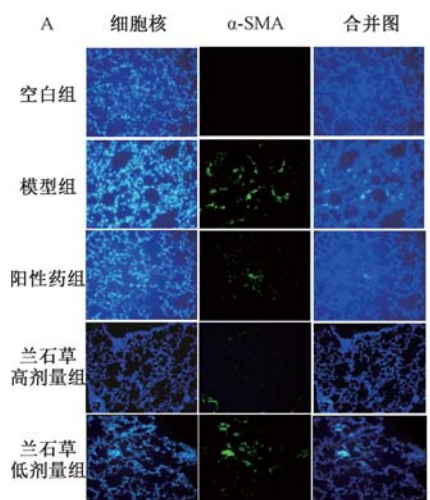
注:与空白组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图 1 兰石草对小鼠病理组织改善作用和羟脯氨酸含量的抑制作用



注: A 为 TGF- β 1 免疫荧光病理组织切片, B 为 TGF- β 1 相对表达量。与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图 2 兰石草对小鼠肺组织 TGF- β 1 表达的影响



注: A 为 α -SMA 免疫荧光病理组织切片, B 为 α -SMA 相对表达量。与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

图 3 兰石草对小鼠肺组织 α -SMA 表达的影响

3 讨论

肺纤维化可使小鼠体质量明显减轻,合理地增加肺纤维化小鼠体质量对于评价药物的抗肺纤维化活性具有一定的参考意义^[9]。高剂量兰石草可增加肺纤维化小鼠体质量,但是增加趋势弱于空白组小鼠,说明高剂量兰石草具有一定的抗纤维化潜力;模型组小鼠肺组织质量高于空白组,说明出现肺水肿病症,高剂量给药组小鼠肺质量降低,缓解肺水肿情况;肺纤维化小鼠的肺系数明显增大,高剂量兰石草可以通过提高肺纤维化小鼠体质量同时减轻肺纤维化小鼠的肺水肿从而降低肺系数,减缓肺纤维化作用。

炎症是引发肺纤维化的关键途径,炎症因子均可直接或间接的促进肺组织产生纤维化。TNF- α 具有非常强烈的促炎症作用,且在单核巨噬细胞中,TNF- α 可以直接促进促纤维化因子 TGF- β 1 的大量产生,从而引发肺纤维化^[10]。IL-1 β 主要通过调控 IL-17 的表达促进纤维化的产生^[11],也可直接促进肺纤维化的产生^[12]。高剂量兰石草对 TNF- α 和 IL-1 β 具有较强抑制作用,该药物可能是通过抑制炎症而发挥抗肺纤维化的活性。

高剂量兰石草可抑制肺组织羟脯氨酸的表达从而抑制肺组织的胶原蛋白沉积。表达胶原蛋白等的细胞外基质主要由肺肌成纤维细胞完成, α -SMA 是肺肌成纤维细胞的标志性蛋白。通过抑制肺肌成纤维细胞的增殖可以实现抑制肺纤维化的作用^[13],高剂量兰石草可明显抑制 α -SMA 的表达,提示兰石草可能通过抑制肺肌成纤维细胞的增殖而实现抑制肺纤维化的作用。

TGF- β 1 可通过激活 TGF- β 1/Smads 信号通路促使肺纤维化形成;TGF- β 1 还可激活上皮细胞、成纤维细胞向肺肌成纤维细胞转化,大量胶原蛋白表达于肺组织^[14]。高剂量兰石草可能通过抑制 TGF- β 1 的表达抑制肺肌成纤维细胞的增殖的活性,从而表现出抗肺纤维化的活性。结果表明高剂量兰石草在小鼠体内具有一定的抗肺纤维化活性,其机制可能与抑制炎症和肺肌成纤维细胞的增殖进而抑制纤维化和胶原沉积有关。

参考文献:

[1] Xu Z H, Li Z L, Liao Z Y, *et al.* PM_{2.5} induced pulmonary fibrosis *in vivo* and *in vitro*[J]. *Ecotox Environ Safe*, 2019, 171 (2): 112-121.

[2] Mojiri-Forushani H, Hemmati A A, Dehghani M A, *et al.* Effects of herbal extracts and compounds and pharmacological agents on pulmonary fibrosis in animal models: a review[J]. *J Chin Integ Med*, 2017, 15(6): 433-441.

[3] Li L C, Kan L D. Traditional Chinese medicine for pulmonary fibrosis therapy: Progress and future prospects [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 198(42): 45-63.

[4] Cheung O Y, Chan J W M, Ng C K, *et al.* The spectrum of pathological changes in severe acute respiratory syndrome (SARS) [J]. *Histopathology*, 2004, 45(2): 119-124.

[5] 耿艳艳,周植星,胡倩倩,等. 特发性肺纤维化治疗靶点及药物研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(1): 46-51.

[6] 中国科学院西北高原生物所. 藏药志[M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991, 185-186.

[7] 杜连平,王金霞,贺世娟,等. 藏药二十五味肺病胶囊质量标准研究[J]. 食品与药品, 2014, 16(6): 417-421.

[8] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, *et al.* Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.

[9] Cui Y L, Jiang L, Yu R T, *et al.* β -carboline alkaloids attenuate bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice through inhibiting NF- κ B/p65 phosphorylation and epithelial mesenchymal transition [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243 (13): 112096.

[10] Szondy Z, Pallai A. Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: Therapeutic implications [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115(3): 124-132.

[11] Wilson M S, Madala S K, Ramalingam T R, *et al.* Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent [J]. *J Exp Med*, 2010, 207(11): 535-552.

[12] Guo J, Gu N, Chen J. Neutralization of interleukin-1 beta attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in C57BL/6 mice[J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(9): 1963-1973.

[13] Hinz B, Phan S H, Thannickal V J, *et al.* The myofibroblast: one function, multiple origins [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170 (5): 1807-1816.

[14] Hu H H, Chen D Q, Wang Y N, *et al.* New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis [J]. *Chem Bio Interact*, 2018, 292(6): 76-83.