

缬草提取物对大鼠实验性肺纤维化的干预作用

陈素美¹, 杨荣时¹, 曾玉兰¹, 薛存宽²

(华中科技大学同济医学院附属梨园医院 1. 呼吸内科; 2. 老年病研究所, 武汉 430076)

[摘要] 目的 探讨缬草提取物对博莱霉素所致大鼠肺间质纤维化的干预作用及其机制。方法 健康 Wistar 大鼠气管内一次性注入博莱霉素 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 制作肺纤维化模型, 取造模存活大鼠 65 只, 随机分为缬草低、高剂量组和秋水仙碱组各 16 只, 模型组 17 只。造模后第 2 天始分别灌胃给予缬草提取物 $100, 20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和秋水仙碱 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以及 0.9% 氯化钠溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次。各组于第 7 天处死大鼠 6 只, 第 28 天处死剩余大鼠。另取 8 只正常大鼠, 气管内一次性注入 0.9% 氯化钠溶液 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 灌胃给予 0.9% 氯化钠溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 作为健康对照组, 于第 28 天处死。大鼠处死后, 取右下肺叶做 HE 染色和 Masson 染色观察肺组织结构改变; 免疫组织化学法检测肺组织中的转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 表达改变; 取左下肺叶检测羟脯氨酸 (HYP) 含量。结果 模型组大鼠观察期内死亡 3 只 (18.75%), 7 d 肺组织呈现重度肺炎改变合并有 TGF- $\beta 1$ 表达显著升高, 28 d 肺组织胶原纤维重度增生并 HYP 水平显著升高; 缬草不同剂量组及秋水仙碱组第 7 天肺炎较模型组减轻, TGF- $\beta 1$ 表达较模型组弱 ($P < 0.05$), 第 28 天缬草不同剂量组及秋水仙碱组肺纤维化病变较模型组减轻, 羟脯氨酸含量较模型组低 ($P < 0.05$)。结论 缬草提取物可以有效防治博莱霉素诱导的大鼠肺炎及肺纤维化, 其机制可能是降低 TGF- $\beta 1$ 表达。

[关键词] 缬草提取物; 秋水仙碱; 肺纤维化; TGF- $\beta 1$; 博莱霉素; 羟脯氨酸

[中图分类号] R286; R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)11-1295-03

Effect of Valerian Extract on Experimental Pulmonary Fibrosis in Rats

CHEN Su-mei¹, YANG Rong-shi¹, ZENG Yu-lan¹, XUE Cun-kuan² (1. Department of Respiratory Medicine; 2. Institute of Geriatrics, Liyuan Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430076, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the effects and mechanism of valerian extract on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** Wistar rats (irrespective of sex) were given a single intratracheal instillation of bleomycin at a dose of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ to make a model of pulmonary fibrosis. 65 survival rats were randomly divided into four groups: high-dose, low-dose ($n = 16$, each) groups of Valerian, Colchicine group ($n = 16$) and Model group ($n = 17$). Each group was given the valerian extract at $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of colchicine and $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ of N. S. daily since the second day of model establishment. 6 rats were killed in each group on day 7, 10 rats were killed on day 28. Rats in control group ($n = 8$) were instilled with saline intratracheally at a dose of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ and treated with N. S. $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$. Rats in the control group were all killed on day 28. The right lower pulmonary lobes were harvested for HE-staining, and observed by Masson-staining. Expression of TGF- $\beta 1$ was examined by immunohistochemistry and HYP was measured. **Results** 3 rats (18.75%) were dead during experiment in the model group. Compared with the model, rats in valerian and colchicine groups showed attenuated alveolitis and lower expression of TGF- $\beta 1$ on 7 d ($P < 0.05$). The pulmonary fibrosis in valerian and colchicine groups was ameliorated on 28 d, and the contents of HYP was decreased as well, in comparison with those in the model group. **Conclusion** Valerian extract could reduce the degree of alveolitis and fibrosis induced by bleomycin which may be due to suppression of TGF- $\beta 1$.

KEY WORDS Valerian extract; Colchicine; Pulmonary fibrosis; TGF- $\beta 1$; Bleomycin; HYP

有研究表明, 缬草可减少大鼠肾组织内转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 和肝组织中肿瘤坏死因子 (TNF) 及白细胞介素 1 (IL-1) 的表达, 并使细胞外基质成分 IV 型胶原表达下调^[1,2]。为观察缬草对肺纤维化的影响, 笔者进行了如下实验。

[收稿日期] 2008-01-24

[作者简介] 陈素美 (1975 -), 女, 安徽怀远人, 在读硕士, 研究方向: COPD 的防治。电话: (0) 15071838001, E-mail: yinuo1234@126.com。

[通讯作者] 杨荣时, 主要从事呼吸内科疾病研究。电话: 027-86773985, E-mail: yangrsllyi@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料 博莱霉素 A₅ (bleomycin, BLM, 日本化药株式会社, 批号: 360410); 秋水仙碱 (colchicine, CLC, 上海蓝季科技发展有限公司进口分装, 批号: 061008); 缬草提取物是缬草环烯醚萜酯 (valepotriates) 类提取物和缬草挥发油中含氧衍生物的 1:1 混合物 (湖北省老年医学研究所提供); 羟脯氨酸碱水解法试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号: 20070714); TGF- $\beta 1$ 兔抗人多克隆抗体 (购自北京中杉金桥生物技术有限公司, Santa Cruz 产品); Masson 染色试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司, 批号:

703198004);多聚甲醛(Sigma公司产品);721分光光度计(上海第三分析仪器厂);HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统。

1.2 模型的制备 取Wistar健康大鼠,体重200~240g,雌雄不拘,乙醚麻醉,经环甲膜气管内注药0.5%BLM(5mg·kg⁻¹)。注药后立即将大鼠直立旋转,继而水平翻滚使药液在肺内分布均匀。

1.3 动物分组 取造模成功大鼠65只,随机分成4组:缬草提取物低、高剂量组和秋水仙碱组各16只,模型组17只。造模次日开始分别灌胃给予缬草提取物20,100mg·kg⁻¹和秋水仙碱100μg·kg⁻¹及0.9%氯化钠溶液10mL·kg⁻¹,每天一次。第7天每组各处死6只,第28天处死剩余大鼠,检测肺组织变化。另取8只大鼠作正常对照组,气管内造模注射和灌胃给药都采用0.9%氯化钠溶液,第28天处死检测。

1.4 观察指标

1.4.1 肺组织学观察 大鼠水合氯醛全麻后开胸,取左下肺放入-80℃冰箱保存,右下肺叶中部组织中性甲醛固定,脱水、石蜡包埋、切片,分别进行苏木精-伊红(HE)染色或Masson染色(按Masson染色试剂盒说明书执行)。病理学改变按SZAPIEL法^[3]将肺炎和肺纤维化分4级,即0~Ⅲ级。肺炎及纤维化等级资料按0级计1分,I级计2分,Ⅱ级计3分,Ⅲ级计4分转换为计量资料。

1.4.2 肺组织TGF-β1免疫组化检测 每个肺组织蜡块做连续切片,隔三取一,取两张做免疫组化检查,每张切片在镜下取5个视野,用HMIAS-2000高清晰度彩色医学图文分析系统分析,取平均灰度值进行统计分析。

1.4.3 肺组织中羟脯氨酸含量测定 冰冻组织按羟脯氨酸碱水解法说明书操作,测得吸光度值,据所给公式算出羟脯氨酸含量。

1.5 统计学方法 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS12.0软件进行方差分析,以LSD-t检验进行不同组间均数两两比较,如方差不齐就用Dunnett T3检验,P<0.05表示差异有显著性。

2 结果

2.1 一般状况 缬草提取物各剂量组、秋水仙碱组及模型组大鼠活动及摄食明显减少,体重减轻,发绀,尤以模型组突出;模型组3只大鼠因重度发绀、呼吸困难死亡;秋水仙碱组大鼠实验中后期1只出现腹泻、瘦弱,死亡;缬草提取物各剂量组病情明显较轻微,高剂量组灌胃时因误入气管窒息死亡1只。

2.2 组织学检查 正常对照组各时期肺组织未见明显

病变。HE染色:模型组第7天肺泡间隔显著增宽,肺泡腔及间隔内有大量以淋巴细胞为主的炎症细胞渗出,可见大量巨噬细胞浸润,第28天肺泡结构严重破坏、胶原纤维大量增生;缬草提取物组,尤其是高剂量组和秋水仙碱组鼠第7天炎症细胞浸润,巨噬细胞和肺泡间隔增宽等病变明显轻于模型组,第28天肺泡结构破坏和胶原纤维增生程度与模型组相比有所减轻。Masson染色:第28天模型组可见大量被染成蓝色的增生胶原纤维;而缬草提取物各剂量组和秋水仙碱组纤维化程度均较模型组减轻。其分级计分的定量分析结果见表1。

表1 5组大鼠肺炎与肺纤维化定量分析结果 $\bar{x} \pm s, n=6$,分

组别	第7天		第28天
	肺炎		肺炎
缬草提取物			肺纤维化
高剂量组	2.83 ± 0.75 ^{*1}	2.00 ± 0.63 ^{*1}	2.83 ± 0.75 ^{*2}
低剂量组	2.67 ± 0.52 ^{*2}	2.50 ± 0.55	3.00 ± 0.63 ^{*2}
秋水仙碱组	2.50 ± 0.55 ^{*2}	2.00 ± 0.63 ^{*1}	3.00 ± 0.63 ^{*2}
模型组	3.67 ± 0.52	2.67 ± 0.52	3.83 ± 0.41
正常对照组	1.17 ± 0.41 ^{*2}	1.17 ± 0.41 ^{*2}	1.00 ± 0.00 ^{*2}

与模型组比较,^{*1}P<0.05,^{*2}P<0.01

2.3 免疫组化 TGF-β1主要表达在支气管黏膜上皮细胞、肺泡巨噬细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞质里。正常对照组大鼠细支气管黏膜上皮细胞质有少量TGF-β1表达,肺泡间隔有少量TGF-β1阳性表达的巨噬细胞。第7天模型组支气管、细支气管黏膜上皮细胞TGF-β1表达明显增强,肺泡腔和间质中出现大量TGF-β1表达强阳性的肺泡巨噬细胞。缬草提取物各剂量组和秋水仙碱组大鼠肺TGF-β1表达较模型组减弱,差异有显著性或极显著性(P<0.05或P<0.01)。平均吸光度结果见表2。

表2 5组大鼠第7天免疫组化吸光度分析结果 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	平均吸光度
缬草提取物		
高剂量组	12	0.128 ± 0.007 ^{*1}
低剂量组	12	0.130 ± 0.009 ^{*1}
秋水仙碱组	12	0.122 ± 0.010 ^{*1}
模型组	12	0.150 ± 0.010
正常对照组	12	0.119 ± 0.004 ^{*1}

与模型组比较,^{*1}P<0.01

2.4 肺组织中羟脯氨酸的测定 各组第7天肺组织中羟脯氨酸含量差异无显著性。第28天时模型组羟脯氨酸含量显著升高,缬草提取物各剂量组、秋水仙碱组肺组织中羟脯氨酸含量明显低于模型组,差异有显著性或极显著性(P<0.05或P<0.01),结果见表3。

表 3 5 组大鼠羟脯氨酸测定结果 $\bar{x} \pm s$

组别	第 7 天		第 28 天	
	大鼠数/ 只	羟脯氨酸/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	大鼠数/ 只	羟脯氨酸/ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
缬草提取物				
高剂量组	6	958.18 ± 145.74	9	1 331.81 ± 130.25 ^{*1}
低剂量组	6	892.83 ± 111.51	10	1 358.50 ± 231.55 ^{*1}
秋水仙碱组	6	997.80 ± 167.68	9	1 295.94 ± 210.55 ^{*2}
模型组	6	943.88 ± 206.28	8	1 580.71 ± 300.59
正常对照组	8	939.68 ± 116.51	8	939.68 ± 116.51 ^{*2}

与模型组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*2} $P < 0.01$

3 讨论

肺纤维化是由多种原因引起的弥漫性肺部炎症性疾病,病变主要累及肺间质,也可累及肺泡上皮细胞及肺血管,是以大量成纤维细胞聚集、细胞外基质沉积并伴有炎症和损伤所致肺组织结构破坏为特征。CRAIG 等^[4]的研究表明,细胞因子介导纤维化是特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)发病机制的中心。在所有细胞因子中,TGF- β 与肺纤维化的关系是研究最多的。肺 TGF- β 不仅是活化成纤维细胞的关键调节分子,而且调节几乎每一个细胞外基质(ECM)分子,包括胶原、纤维结合素、粘多糖等。TGF- β 促进胶原基因转录的分子机制与 Smad 家族的信号转导有关。激活剂蛋白-1(activator protein, 1, AP-1)是 TGF- β 的主要激活物。AP-1 被激活后,TGF- β 与其细胞膜上的受体结合,将活化的信号传递至细胞内,细胞内的 Smad 家族将信号进一步传递到细胞核内,激活核内转录蛋白,启动胶原蛋白 mRNA 的转录,合成胶原蛋白。TGF- β 有 5 个亚型,在哺乳动物细胞中表达 3 种,即 TGF- β 1, 2, 3。TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 都可刺激 ECM 的生成,提高成纤维细胞合成纤维结合素和胶原,而其中最重要的是 TGF- β 1。TGF- β 1 在其发挥作用过程中要经过激活、通过受体(T β RI, T β RII)作用于成纤维细胞、炎症细胞、免疫细胞和结构细胞。肺部 TGF- β 1 主要来源于巨噬细胞,静止巨噬细胞保持较高浓度的 TGF- β 1 mRNA 水平,而且在受到刺激后分泌 TGF- β 1。而 TGF- β 1 不仅对巨噬细胞及成纤维细胞有趋化作用,而且促进一系列细胞外基质蛋白的合成与分泌和抑制结缔组织蛋白酶产生的作用^[5]。可见 TGF- β 1 是致肺纤维化的重要递质。

本实验结果显示,在博莱霉素诱导大鼠肺纤维化的过程中,早期(第 7 天)缬草提取物各剂量组与秋水仙碱组大鼠肺炎程度远较模型组轻;后期(第 28 天)缬草提取物各剂量组和秋水仙碱组鼠肺胶原纤维增生程度明显低于模型组,提示缬草提取物可有效减轻博莱霉素诱导的肺纤维化。免疫组化检查显示,模

型组肺组织中 TGF- β 1 表达明显升高,尤以第 7 天突出,这符合有关文献报道^[6,7];缬草提取物各剂量组、秋水仙碱组肺组织中 TGF- β 1 的表达显著低于模型组,提示缬草提取物抗肺纤维化作用可能是通过降低 TGF- β 1 的过度表达来实现。肺组织中 HYP 含量检查结果显示,第 7 天各组之间差异无显著性,说明此时胶原纤维还没有明显增生;第 28 天缬草组和秋水仙碱组 HYP 含量异常上升的程度明显低于模型组,这与组织学改变相符。提示缬草提取物和秋水仙碱可以减轻博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化的程度。

秋水仙碱是治疗肺纤维化的传统药物,在本实验中缬草高低剂量组和秋水仙碱组间比较差异无显著性。表明早期应用缬草能在一定程度上抑制博莱霉素大鼠肺纤维化的进展。实验也提示在第 7 天缬草可以降低 TGF- β 1 的表达。有理由考虑其减轻肺纤维化的机制可能是降低了 TGF- β 1 表达。具体通过什么途径降低 TGF- β 1,有待进一步的探讨。大量文献说明缬草的不良反应该轻微^[8],因其具有较高的安全性,可能为治疗肺纤维化提供一个新药物。

[参考文献]

- [1] 叶建明,薛存宽,钱俊方,等. 缬草提取物对胆囊结石治疗作用与肝、胆囊组织内 TNF 及 IL-1 水平的关系[J]. 临床消化病杂志,2001,13(1):6-8.
- [2] 司晓芸,贾汝汉,黄从新,等. 宽叶缬草对高胆固醇血症大鼠肾组织内 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2003,28(9):845-848.
- [3] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120:893.
- [4] CRAIG E, DANIELS M C, WILKES M E. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF- β and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(9):1308-1316.
- [5] WANG Q, WANG Y, HYDE D M, et al. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor β soluble receptor in hamsters[J]. *Thorax*, 2000, 54(9):805-812.
- [6] 蔡后荣,戴令娟,郑培德,等. 博莱霉素致肺纤维化中 TGF- β 1 表达[J]. 上海免疫学杂志,2001,21(2):95-97.
- [7] GURUJEYALAKSHMI G, GIRI S N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis[J]. *Exp Lung Res*, 1995, 21:791-808.
- [8] YAO M, RITCHIE H E, BROWN-WOODMAN P D. A developmental toxicity-screening test of valerian[J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 113(2):204-209.