

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.15.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 15-0007-05

依达拉奉对矽肺大鼠的干预治疗作用研究*

肖漪¹, 彭子荷¹, 孙悦¹, 刘嘉祺¹, 王路¹, 郭灵丽¹, 郝小惠¹, 刘和亮¹, 王宏丽²

(华北理工大学 1. 医学实验研究中心, 2. 公共卫生学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 观察自由基清除剂依达拉奉(edaravone)对矽肺大鼠造模后肺纤维化的影响, 探讨其对矽肺的治疗作用。**方法** SPF级Wistar大鼠54只随机等分为9组: 对照组, 模型组以及依达拉奉干预组, 后两组依采样时间分为7、14、21和28 d 4个亚组, 每组各6只大鼠。除对照组外, 其余各组大鼠采用非暴露法气管内一次性注射二氧化硅(SiO₂)悬液(250 mg/kg)复制矽肺动物模型; 依达拉奉组自注射SiO₂后每天腹腔注射依达拉奉(4 ml/kg), 对照组每天用生理盐水腹腔注射(4 ml/kg), 连续28 d。采用HE染色技术观察各组大鼠肺组织形态学变化, Western blot检测肺组织中转化生长因子β(TGF-β)蛋白的表达; 试剂盒检测肺组织中羟脯氨酸(HYP)、还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量。**结果** 依达拉奉可改善矽肺大鼠肺间质纤维化程度, 提高矽肺大鼠肺组织匀浆GSH活力, 降低HYP、TGF-β和MDA含量。**结论** 依达拉奉可降低大鼠体内自由基及TGF-β水平, 对矽肺大鼠有较好的治疗作用。

关键词: 矽肺; 依达拉奉; 自由基; 转化生长因子β

中图分类号: R563

文献标识码: A

Protective effect of Edaravone on rat of pneumosilicosis*

Yi Xiao¹, Zi-he Peng¹, Yue Sun¹, Jia-qi Liu¹, Lu Wang¹, Ling-li Guo¹,

Xiao-hui Hao¹, He-liang Liu¹, Hong-li Wang²

(1. Medical Research Center, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. China Public Health School, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Edaravone on pulmonary fibrosis in rat of pneumosilicosis. **Methods** Rat model of pneumosilicosis was established by daily intratracheal instillation of silica in suspension (250 mg/kg) for consecutive 28 days. Edaravone was intraperitoneally injected on a daily basis at 4 ml/kg. Saline was administrated in control group. Tissues as well as organs were harvested at 7 d, 14 d, 21 d and 28 d. Hematoxylin eosin staining was performed for histological changes of lung tissue. Level of TGF-β was identified by Western blot. Concentration of HYP, GSH and MDA was measured by commercial kits. **Results** Edaravone significantly ameliorated pulmonary fibrosis when compared with that in pneumosilicosis group, improving GSH activity and reducing the levels of HYP, TGF-β and MDA. **Conclusions** Edaravone exerts therapeutic effect for silicosis by reducing free radical and TGF-β expression.

Keywords: silicosis; Edaravone; free radical; TGF-β

依达拉奉是一种自由基清除剂, 临床上, 依达拉奉主要用于神经系统疾病, 对急性脑梗死、脑出血等疾

收稿日期: 2017-04-14

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81673119); 唐山市国际科技合作项目(No: 14160201B); 唐山市科技创新团队培养计划项目(No: 15130212C)

[通信作者] 王宏丽, E-mail: tsruoshui@163.com; Tel: 0315-8816231

病显示出了良好的脑保护作用, 由于其治疗谱广, 近年来已经将其扩展到心脏、肝脏或胃肠道等疾病的治疗^[1]。矽肺又称硅肺, 是由于长期吸入大量游离二氧化硅粉尘所引起的以肺部广泛的结节性纤维化为主的疾病^[2]。有文献报道自由基损伤可能是矽肺发病的一个重要环节^[3-6], 因此本研究拟观察依达拉奉对矽肺大鼠的治疗作用及对自由基的影响, 以期为临床应用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康无特定病原体级 (SPF) 级雄性 Wistar 大鼠 54 只, 体重 180 ~ 220 g。二氧化硅 (SiO_2) 粉尘 (由河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供, 纯度 99%, 粒子直径在 0.5 ~ 10.0 μm , 经研磨、烘烤后, 用生理盐水配成 50 mg/ml 浓度粉尘悬液, 高压灭菌后, 4℃ 储存备用), 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所), 兔抗 GAPDH (购自于美国 Cell Signaling 公司), 兔抗 TGF- β (购于英国 Abcam 公司), 依达拉奉 [购自辉南长龙生化药业股份公司 (国药准字号: H20080592)]。

1.2 方法

1.2.1 分组造模与标本制备 将 54 只大鼠称重、编号, 随机分为 3 组: 对照组、模型组及依达拉奉干预组, 对照组 6 只, 模型组和依达拉奉干预组各 24 只。适应性饲养 1 周后, 模型组和依达拉奉干预组大鼠采用非暴露法气管内一次性注射 SiO_2 悬液 (250 mg/kg) 复制矽肺模型^[3-6], 依达拉奉干预组在注射 SiO_2 悬液第 2 天后开始腹腔注射依达拉奉 4 ml / (kg · d)。对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 连续 28 d。模型与依达拉奉干预组大鼠分别在 7、14、21 及 28 d 后处死, 取右肺下叶组织进行 HE 染色, 左肺组织用于 GSH 和转化生长因子 β (transform growth factor -beta, TGF- β) 含量测定, 右肺上叶组织用于 HYP 测定, 右肺中叶用于 MDA 测定。

1.2.2 肺组织中 HYP、GSH、MDA 含量测定 样品制备后严格按照试剂盒说明书进行测定。HYP ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = (测定管吸光度值 - 空白管吸光度值) / (标准管吸光度值 - 空白管吸光度值) × 标准品含量 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) × 水解液总体积 (10 ml) / 组织湿重 (50 mg)。

1.2.3 Western blot 检测肺组织 TGF- β 蛋白表达 腹腔注射 28 d 后, 取各组大鼠肺组织, 经蛋白裂解液裂解组织后提取组织总蛋白, 二喹啉甲酸 (BCA) 法进行蛋白质浓度测定, 取 30 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺电泳 (SDS-PAGE) 约 1.5 h, 转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 4℃ 过夜, TBST 清洗, 抗兔单克隆抗体 anti-TGF- β (1 : 1 200), 室温摇床孵育 4 h, 稀释辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 1 000), 37℃ 孵育 2 h, 电化学发光 (ECL) 显色后用扫描仪进行扫描, 经 Alpha View 自动图像分析系统进行图像采集和定量分析 Tgf- β 蛋白的表达, 同时以内参 GAPDH (1 : 2 000) 进行对照。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织形态学观察结果

光镜下观察, 可见对照组大鼠肺组织结构清晰, 肺泡腔内未见炎症细胞, 肺泡间隔正常; 模型组大鼠染尘后 7 d 出现如肺泡壁水肿, 炎症细胞浸润, 肺泡间隔增宽增厚, 弥漫性胶原纤维沉积等病理改变; 随时间增加, 组织结构破坏程度更为严重, 证实大鼠矽肺模型复制成功。依达拉奉干预组病变特征与模型组相似, 但肺组织胶原沉积减少, 肺泡结构基本存在, 尤其是在给药 21 d 后改善较明显。见图 1。

2.2 肺组织 HYP、GSH 和 MDA 含量变化

对 9 组 HYP、GSH 和 MDA 的比较行方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 88.190$ 、 59.102 及 17.135 , 均 $P = 0.000$)。模型组和依达拉奉干预组的 HYP、GSH 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 依达拉奉干预组 HYP、GSH 含量与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样与对照组比较, 模型组 MDA 增高 ($P < 0.05$), 而依达拉奉干预组先升高后降低, 21 d 后与对照组比较, 差异无统计学意义, 同时各时间 MDA 含量均低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肺组织 TGF- β 蛋白表达

Western blot 检测结果 (见图 2 和表 2) 显示, 对 9 组 TGF- β 进行方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 49.766$, $P = 0.000$)。模型组和依达拉奉干预

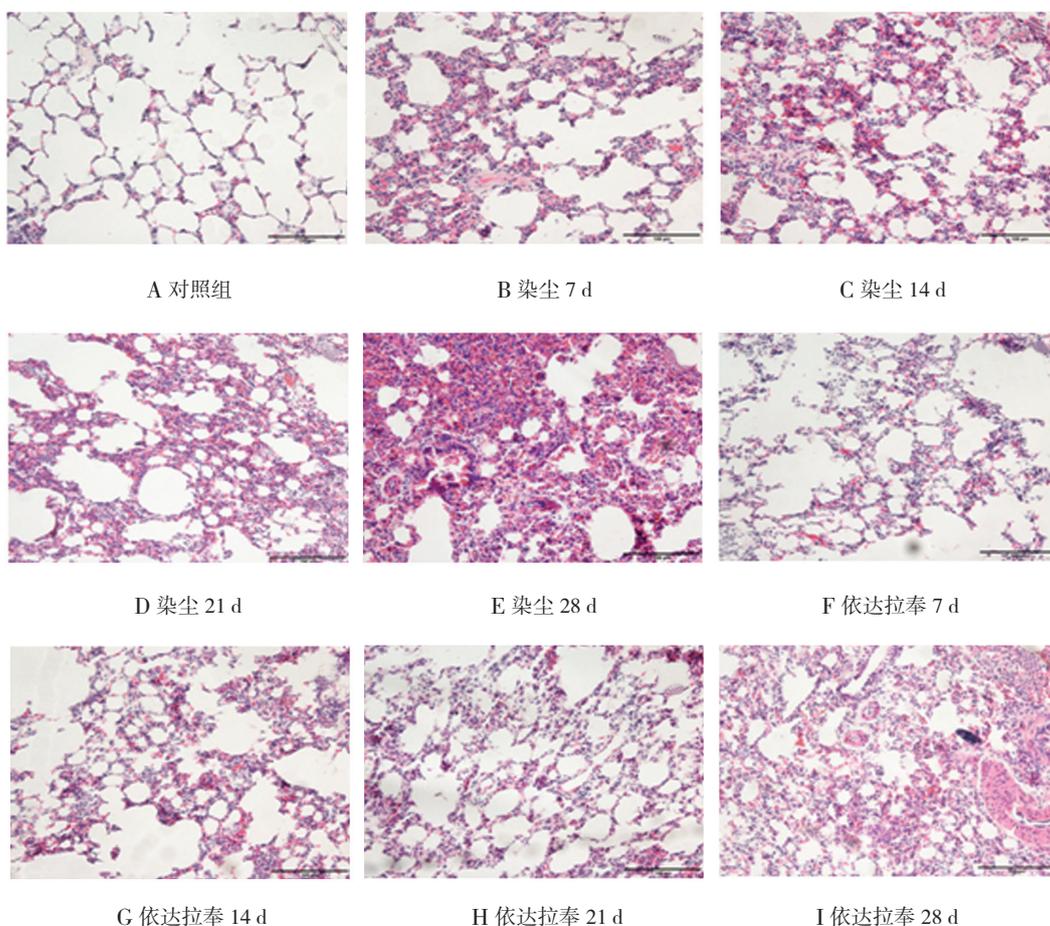


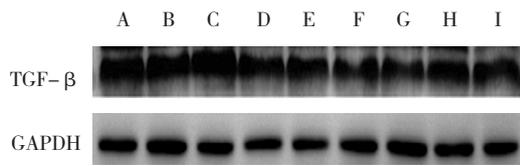
图 1 各组大鼠肺组织形态学变化 (HE × 200)

表 1 大鼠不同时间段肺组织 HYP、GSH 和 MDA 的含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HYP/ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	GSH/ μ	MDA/ ($\text{nmol}/\text{mg prot}$)
对照组	6	0.498 ± 0.058	5.436 ± 0.981	0.461 ± 0.234
模型组				
7 d	6	0.914 ± 0.104 ¹⁾	1.519 ± 0.208 ¹⁾	2.736 ± 0.636 ¹⁾
14 d	6	1.060 ± 0.115 ¹⁾	1.844 ± 0.284 ¹⁾	2.256 ± 0.326 ¹⁾
21 d	6	1.533 ± 0.170 ¹⁾	1.486 ± 0.424 ¹⁾	2.038 ± 0.553 ¹⁾
28 d	6	1.889 ± 0.146 ¹⁾	1.663 ± 0.345 ¹⁾	1.752 ± 0.216 ¹⁾
依达拉奉干预组				
7 d	6	0.681 ± 0.140 ¹⁾²⁾	2.222 ± 0.127 ¹⁾²⁾	1.798 ± 0.488 ¹⁾²⁾
14 d	6	0.825 ± 0.048 ¹⁾²⁾	3.273 ± 0.421 ¹⁾²⁾	1.295 ± 0.351 ¹⁾²⁾
21 d	6	0.845 ± 0.102 ¹⁾²⁾	3.685 ± 0.463 ¹⁾²⁾	0.926 ± 0.357 ²⁾
28 d	6	0.921 ± 0.071 ¹⁾²⁾	4.550 ± 0.370 ¹⁾²⁾	0.871 ± 0.406 ²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

组大鼠肺组织中 TGF- β 蛋白表达量均高于对照组 ($P < 0.05$), 而依达拉奉干预组各时间比模型组 TGF- β 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: 染尘 7 d; C: 染尘 14 d; D: 染尘 21 d; E: 染尘 28 d; F: 依达拉奉 7 d; G: 依达拉奉 14 d; H: 依达拉奉 21 d; I: 依达拉奉 28 d

图 2 肺组织 TGF-β 蛋白表达

表 2 肺组织 TGF-β 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TGF-β
对照组	6	0.360 ± 0.167
模型组		
7 d	6	2.824 ± 0.232 ¹⁾
14 d	6	4.240 ± 0.460 ¹⁾
21 d	6	3.733 ± 0.629 ¹⁾
28 d	6	3.254 ± 0.555 ¹⁾
依达拉奉组		
7 d	6	1.328 ± 0.081 ¹⁾²⁾
14 d	6	1.686 ± 0.740 ¹⁾²⁾
21 d	6	1.583 ± 0.378 ¹⁾²⁾
28 d	6	1.218 ± 0.413 ¹⁾²⁾

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

3 讨论

近年来的研究证实, 自由基在 SiO₂ 引起的肺纤维化方面起着关键性的作用^[7]。石英等颗粒在粉碎过程中自身可产生自由基, 当肺巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 吞噬石英和游走时引起呼吸爆发可产生大量自由基, 髓单核细胞在肺中转化为 AM 后被活化时还可产生氮氧自由基, 导致氧化和抗氧化系统失衡。自由基作用于 AM, 产生脂质过氧化导致质膜损伤, 进而分泌多种细胞因子, 诱导纤维细胞增生和胶原合成, 造成肺纤维化。自由基还可以作用于肺内其他生物基质和对免疫功能发生影响, 促进肺纤维化过程^[8]。

依达拉奉是目前广泛被认可的自由基清除剂^[9], 于 2001 年 4 月在日本首次上市。有相关研究显示, 其对自由基毒性损伤具有强大的抑制作用^[10-11]。本研究探索应用依达拉奉治疗矽肺大鼠, 结果发现应用依达拉奉后矽肺大鼠体内反映自由基生成程度的 MDA 降低, 而反映体内抗氧化系统的重要因子 GSH 活力提

高^[12], 提示依达拉奉在矽肺发病过程中起到抗自由基作用。

在矽肺纤维化过程中, TGF-β 是最重要的促纤维化因子^[13]。本研究结果显示, 随着时间的进展, 模型组 TGF-β 蛋白含量先增高后降低, 符合相关文献中的趋势^[14]; HYP 能反映胶原增加及胶原代谢的状况^[15], 测定肺组织中 HYP 的水平, 可直接反映肺成纤维细胞合成胶原的能力。本研究结果发现, 应用依达拉奉后 TGF-β 和 HYP 相对矽肺模型组减少, 提示依达拉奉可以有效降低矽肺纤维化程度。

综上所述, 依达拉奉可有效降低矽肺大鼠体内的自由基水平, 同时可使自身的抗氧化系统得到一定的恢复, 因而降低矽肺纤维化程度, 使矽肺大鼠的症状得到改善从而起到治疗作用。但其降低自由基水平干预矽肺纤维化进程的具体机制还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] ZHAO H Q. Protective effect of edaravone on corneal nerve of rats with experimental diabetic corneal neuropathy[D]. Chongqing: ChongQing Medical University, 2012.
- [2] LI D H, HE F S. Pneumoconiosis[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 1-202.
- [3] PENG H B, CHU J X, CAO F Y, et al. Antioxidation effect of ursolic acid on early silicosis in rats[J]. J Environ Occup Med, 2015, 32(5): 476-480.
- [4] TIAN L Y, YU W C. The therapeutic study of edaravone and NAC on rats fibrosis induced by bleomycin[C]. The 14th National Conference on Breathing Epidemiology, 2013: 227-228.
- [5] XIA S N. The research advance of pathogenesis of silicosis[J]. China Foreign Medical Treatment, 2009, 10(2): 167-168.
- [6] LI YIN, LIU X L, LIU X C. Role of free radical in pathogenesis of silicosis[J]. Occup Health & Emerg Rescue, 2005, 23(1): 35-37.
- [7] GAO Y X, WANG R. Mechanism of pulmonary fibrosis due to silica and role of cytokine in silicotic fibrosis[J]. Chinese J Ind Med, 2008, 21(1): 31-33.
- [8] BRINGARDNER B D, BARAN C P, EUBANK T D, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(2): 287-301.
- [9] WATANABE T, TAHARA M, TODO S. The novel antioxidant edaravone: from bench to bedside[J]. Cardio-vasc Ther, 2008, 26(2): 101-114.
- [10] KIYOSHI KIKUCHI, SALUNYA TANCHAROEN, et al. The efficacy of Edaravone (Radicut), a free radical scavenger, for cardiovascular disease[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(7): 13909-13904.
- [11] KIKUCHI K, TANCHAROEN S, MATSUDA F, et al. Edaravone attenuates cerebral ischemic injury by suppressing aquaporin-4[J].

- Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009, 390(4): 1121-1125.
- [12] S OKTAY, B ALEV, et al. Edaravone ameliorates the adverse effects of valproic acid toxicity in small intestine[J]. Human and Experimental Toxicology, 2015, 34(6): 654-661.
- [13] HU Y B, ZENG Q F. Research progress of cellular and molecular mechanisms in silicosis fibrosis[J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2003, 21(3): 219-221.
- [14] HAO C F, YAO W, WU Y M. Expression of TGF- β 1 in lung of experimental pneumoconiosis in rats[J]. Journal of Medical Forum, 2007, 27(7): 42-43.
- [15] PENG H B, WANG J X, LIU Y, et al. Effect of oleanolic acid on expression of TNF- α and collagen in silicotic rats in vivo[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2015, 31(6): 1081-1086.

(王荣兵 编辑)