

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.03.001  
文章编号: 1005-8982(2017)03-0001-06

基础研究·论著

## 莲子心提取物对博来霉素致小鼠肺纤维化的干预作用研究\*

李艳晓<sup>1</sup>, 高颖<sup>2</sup>, 王火<sup>2</sup>, 陈虹<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300110; 2. 中国人民武装警察部队后勤学院 生药与药剂教研室, 天津 300309)

**摘要:** **目的** 比较莲子心提取物 (LE) 水洗脱 (LEWW) 和醇洗脱 (LEAW) 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化 (PF) 的作用。 **方法** 经气管一次性滴注博来霉素复制 PF 小鼠模型, 给予 2 种 LE 灌胃 21 d 后, 解剖肺脏, 苏木精-伊红染色法观察小鼠肺组织炎症程度并进行炎症评分, Masson 染色观察 PF 程度, 计算肺系数, 检测血清还原型谷胱甘肽 (GSH)、一氧化氮 (NO)、逆转录聚合酶链反应检测转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )、 $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA)、胶原蛋白 I、胶原蛋白 III mRNA 表达水平, 酶联免疫吸附法检测肺组织匀浆 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 及羟脯氨酸 (HYP) 的蛋白表达水平。 **结果** 与模型组比较, LEWW 和 LEAW 组 GSH 在血清中含量均升高, NO 含量降低; 肺组织匀浆中 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA、HYP 含量降低 ( $P < 0.05$ )。 **结论** LE 对博来霉素所致 PF 小鼠有一定防治作用, 其机制可能与 LE 抗氧化、抑制胶原蛋白形成及下调 TGF- $\beta_1$  有关。

**关键词:** 莲子心提取物; 肺纤维化; 胶原纤维; 转化生长因子  $\beta_1$

**中图分类号:** R285.5

**文献标识码:** A

## Intervention of *Plumula Nelumbinis* extracts on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis of mice\*

Yan-xiao Li<sup>1</sup>, Ying Gao<sup>2</sup>, Huo Wang<sup>2</sup>, Hong Chen<sup>2</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300110, China; 2. Department of Pharmacy, Logistics College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of *Plumula Nelumbinis* extracts eluted with water (LEWW) or alcohol (LEAW) on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** The mouse model of pulmonary fibrosis was prepared by disposable intratracheal instillation of Bleomycin. The two kinds of *Plumula Nelumbinis* extracts were administrated orally for 21 days. After that, the lung tissues were obtained for HE staining and Masson staining; and inflammation score and the degree of pulmonary fibrosis, lung coefficient calculation, serum glutathione (GSH) and nitric oxide (NO) were evaluated. RT-PCR was used for detection of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ), smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen-I, collagen-III mRNA expression levels. TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA and hydroxyproline (HYP) protein expression levels in the lung tissues were measured using ELISA. **Results** Compared with the model group, the serum content of GSH increased, NO decreased; meanwhile the content of TGF- $\beta_1$ ,  $\alpha$ -SMA and HYP in the lung homogenate was lowered in the LEWW and LEAW groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** *Plumula Nelumbinis* extracts have anti-fibrotic effect to Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. The mechanism may be related to the anti-oxidant activity of *Plumula Nelumbinis* extracts, inhibition of collagen formation and down-regulation of TGF- $\beta_1$ .

**Keywords:** *Plumula Nelumbinis* extract; pulmonary fibrosis; collagen fiber; transforming growth factor- $\beta_1$

收稿日期: 2016-05-11

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81503233); 武警后勤学院院级课题 (No: WHJ201510)

[通信作者] 高颖, E-mail: gyling77@163.com; Tel: 15922098199

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是一种以弥漫性肺泡炎和成纤维细胞病理性增生所致细胞外基质沉积为特征的慢性进行性肺疾病,是多种肺疾病发展到晚期常见的病理过程<sup>[1]</sup>。本病致病因素复杂,病理机制不明确。目前学术界认为氧化-抗氧化机制失衡是纤维化主要发病机制之一,转化生长因子  $\beta_1$  (transforming growth factor, TGF- $\beta_1$ ) 及其下游  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 也在 PF 发病中起重要作用。

莲子心为常用中草药之一,为睡莲科植物莲种子中的青嫩胚芽,味苦、性寒。在其水提物与醇提物中主要有效成分为莲心碱、甲基莲心碱、异莲心碱及莲心碱高氯酸盐等<sup>[2]</sup>。据报道,异莲心碱对半乳糖致小鼠肺纤维化的氧化损伤有一定保护作用<sup>[3]</sup>,但对莲子心提取物水洗脱 (lotus extract washed with water, LEWW)、莲子心提取物醇洗脱 (lotus extract alcohol wash, LEAW) 的抗纤维化作用还未有文献报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 实验动物** 72 只健康昆明雄性小鼠,无特定病原体级,体重 18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证编号:SCXK(京)2013-0001。实验动物在洁净级动物房适应性喂养 1 周,饲料由中国医科学院动物研究所提供,饮用水为自来水,实验期间小鼠自由饮水和进食。

**1.1.2 药品及试剂** 莲心提取物 (lotus extract, LE) (中国人民武装警察部队后勤学院植物化学实验室提供),注射用盐酸博莱霉素 浙江海正药业股份有限公司, H20055883), 苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin, HE)、Masson 染色、一氧化氮合酶及还原性谷胱甘肽试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, Trizol Reagent 由美国 Invitrogen 公司生产,逆转录试剂盒购自北京天根技术有限公司,聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA、羟脯氨酸 (hydroxyproline acid, HYP) 试剂盒均购自北京方程生物科技有限公司。

**1.1.3 实验仪器** TS100 型倒置显微镜及其配套图像采集系统 (日本 Nikon 公司), Adventurer 万分之一电子天平和 TDL-5M 低温离心机 (上海卢湘仪器厂), 5417R 高速低温离心机和移液器 (德国 Eppendorf 公司), UV-260 型紫外可见分光光度计 (日本

Shimadzu 公司), BCD-77KD3 常温冰箱 (广东 TCL 公司), 置入 -80℃ 冰箱低温保存 (安徽美菱冰箱), SW-CJ-2FD 型无菌操作台 (苏州仪器净化厂), PTC-200 型 PCR 美国 MJ Research 公司), 电泳槽 (北京六一仪器厂)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 模型复制、分组及给药** 将 72 只小鼠随机分为正常组、模型组、维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组和 LEAW 组, 每组 12 只。除正常组外, 其他 5 组小鼠均经气管滴注博莱霉素 2 mg/kg, 正常组注入等量生理盐水。模型复制后第 2 天, LEWW 组和 LEAW 组分别灌服 LEWW、LEAW [100 mg/(kg·d)], 维生素 C 组经腹腔注射维生素 C 100 mg/(kg·d), 正常组和模型组给予等体积生理盐水, 1 次/d, 共给药 21 d, 地塞米松组经腹腔注射地塞米松 2 mg/(kg·d), 1 次/d, 共给药 3 d。

**1.2.2 实验动物的处理和标本收集** 小鼠在造模 21 d 称重后眼球摘除取血并脱颈处死, 分离肺组织, 称肺重。血液离心后取血清置于 -20℃ 冰箱冷冻保存, 1 周内用于检测一氧化氮 NO、谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 等氧化指标。左肺用 10% 福尔马林固定, 24 h 后进行。石蜡包埋并组织切片行 HE 染色及 Masson 染色, 右肺分置冻存管, 迅速置入液氮罐后转入 -80℃ 冰箱保存以用于 TGF- $\beta_1$ 、HYP 等浓度测定和 PCR 测定。

**1.2.3 检测方法** 肺系数 = 肺重 (g) / 体重 (g) × 100%。血清中 NO、GSH 含量严格按照试剂盒说明书操作。酶联免疫吸法检测各组血清中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛、肺组织匀浆中 HYP、TGF- $\beta_1$  浓度, 所有操作严格按照试剂盒说明书进行。

**1.2.4 组织病理学观察** 参照 SZAPIEL 等<sup>[4]</sup>的方法评价肺泡炎及肺纤维化程度, HE 染色评定肺泡炎分级: 评 0 分, 无肺泡炎; 评 1 分, 轻度肺泡炎, 评 2 分, 中度肺泡炎, 评 3 分, 重度肺泡炎。Masson 染色评定肺纤维化分级: 评 1 分, 无纤维化; 评 2 分, 轻度纤维化, 肺泡的结构发生紊乱; 评 3 分, 中度纤维化, 病变范围约占全肺的 20%~50%; 评 4 分, 重度纤维化, 病变范围 >50%。

**1.2.5 莲子心提取物对小鼠相关基因的表达** Trizol 法提取总 mRNA, 逆转录为 cDNA 后行 PCR 反应。凝胶自动成像系统观察电泳结果, Quantity One 软件分析目的片段与内参的光密度值, 将两者比值作为目的

基因的相对表达量,每个样本重复3次。目的基因引物序列、片段长度及退火温度见表1。

表1 逆转录PCR的引物序列、产物大小及退火温度

引物名称	引物序列	产物大小/bp	退火温度/℃
TGF- $\beta$ <sub>1</sub>	正向:TCCTGCTTCTCATGGCCA	405	55
	反向:CCTCAGCTGCACTTGTAG		
Ccl1engen I	正向:GGGCGAGTTCTGTGCTTT	388	62
	反向:GGGACCCATTGGACCTGAA		
Ccl1engen III	正向:TCAAGTCTGGAGTGGGAGG	97	58
	反向:AGGATGTCCAGAAGAACCA		
$\alpha$ -SMA	正向:GGCCGAGATCTCACTGACTAC	95	58
	反向:TTCATGGATGCCAGCAGA		

### 1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组比较用单因素方差分析,组间多重比较用LSD-*t*法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

正常组:小鼠身体健壮,活泼好动,皮毛光滑,进食量多,体重增加明显,唇及爪色泽淡红。模型组:模型复制后,小鼠很快出现精神不振,皮毛干枯无光泽,少动,进食少,体重减轻,唇及爪轻度紫绀,约1周后食欲与体重有改善。维生素C组、地塞米松组、LEWW组及LEAW组:精神状态、进食、活动、体重均较模型组较好,唇及爪轻度紫绀未见明显。

### 2.2 LE对博来霉素致小鼠肺纤维化的影响

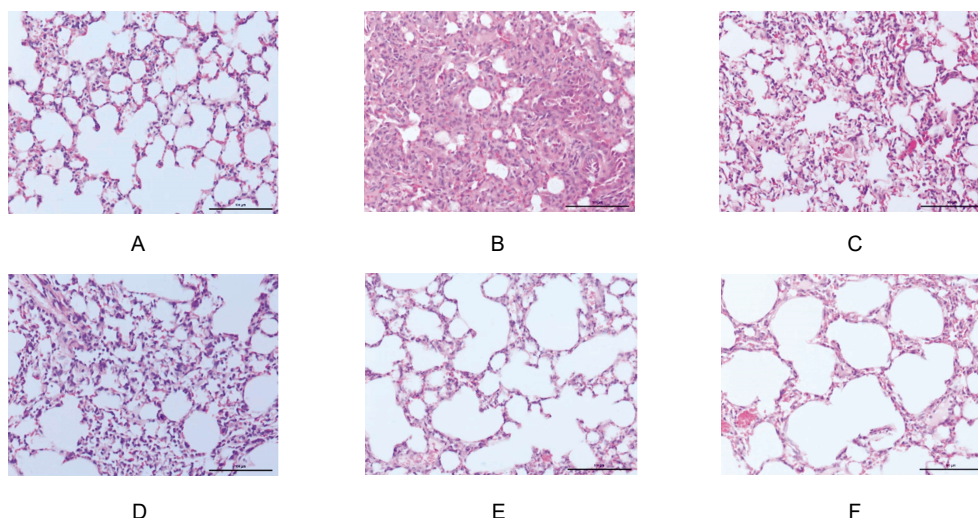
**2.2.1 病理改变** 除正常组外,其余各组小鼠肺组织结构完整性均受到不同程度破坏,肺泡壁加厚,出现不同程度充血及炎症细胞浸润,且尤以模型组小鼠上述指标改变最为显著(见图1)。与正常组比较,模型组Masson染色见肺泡间隔明显增宽,胶原纤维增多,肺泡结构改变,成纤维细胞大量聚集,大量胶原纤维成束状或者片状沉积,肺泡壁变厚,肺泡结构紊乱。维生素C组、地塞米松组与LEWW、LEAW组表现出基本一致的变化规律,但肺炎和纤维化的程度减轻(见图2)。

**2.2.2 肺泡炎症、纤维化等级评分** 与正常组比较,模型组小鼠肺组织炎症及纤维化程度均增高,各组小鼠肺泡炎症程度评分及纤维化程度评分比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义( $F=107.113$ 和

$87.230, P=0.013$ 和 $0.025$ )。维生素C组、地塞米松组与模型组肺泡炎症程度及纤维化程度比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=7.126$ 和 $3.523, P=0.000$ )。维生素C组、地塞米松组、LEWW组和LEAW组与模型组肺泡炎症程度比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=4.762, 3.561, 3.142$ 和 $3.827, P=0.000$ )。LEWW组与维生素C组和LEAW组肺泡炎症程度比较,经LSD-*t*检验,差异无统计学意义( $t=0.031$ 和 $0.061, P=0.057$ 和 $0.112$ )。LEWW组与地塞米松组肺泡炎症程度比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=0.412, P=0.031$ );维生素C组、地塞米松组、LEWW组及LEAW组与模型组纤维化程度比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=2.768, 6.235, 4.162$ 和 $3.251, P=0.000$ )。LEWW组与维生素C组纤维化程度比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=5.142, P=0.022$ ),LEWW组与地塞米松组、LEAW组纤维化程度比较,经LSD-*t*检验,差异无统计学意义( $t=0.361$ 和 $0.823, P=0.712$ 和 $0.634$ )。上述结果表明,模型组肺泡炎症程度及纤维化程度均高于维生素C组、地塞米松组、LEAW组及LEWW组,其中LEAW组与LEWW组抗炎和抗纤维化比较,差异无统计学意义,但优于维生素C组。见表2。

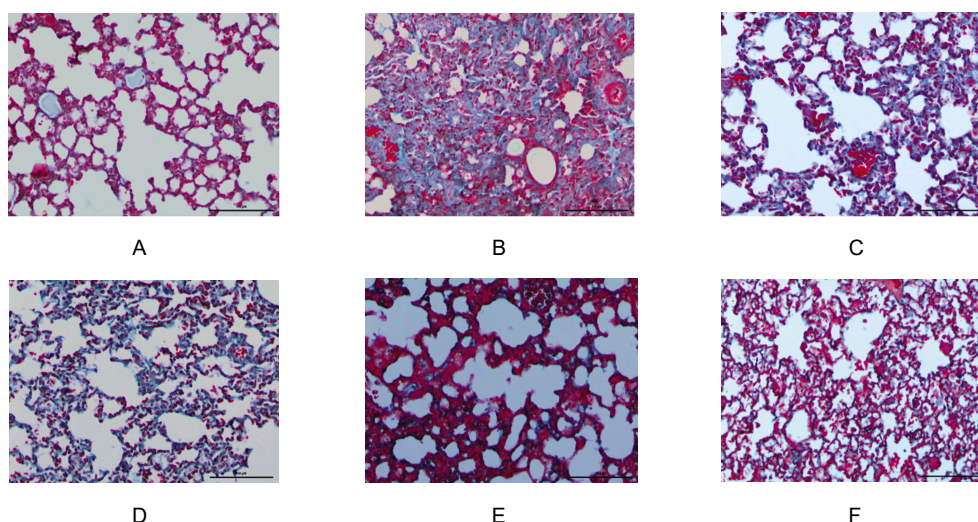
### 2.3 LE对肺纤维化小鼠体重、肺湿重及肺系数的影响

与正常组比较,模型组小鼠体重减轻,肺湿重和肺系数增大,经单因素方差分析,差异有统计学意义。正常组小鼠体重、肺湿重及肺系数与模型组比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=6.126, 8.231$ 和 $3.242, P=0.000$ )。LEAW组小鼠体重、肺湿重及肺系数与模型组比较,差异有统计学意义( $t=3.728, 7.912$ 和 $14.232, P=0.012, 0.032$ 和 $0.041$ )。LEWW组小鼠体重、肺湿重及肺系数与模型组比较,经LSD-*t*检验,差异有统计学意义( $t=1.612, 2.078$ 和 $4.292, P=0.014, 0.033$ 和 $0.021$ )。维生素C组、地塞米松组与LEAW组肺系数比较,差异有统计学意义( $t=2.913$ 和 $7.123; P=0.012$ 和 $0.031$ )。LEWW组与LEAW组小鼠肺湿重、肺系数比较,差异有统计学意义( $t=1.231$ 和 $2.812, P=0.013$ 和 $0.314$ )。LEWW组与LEAW组小鼠体重比较,经LSD-*t*检验,差异无统计学意义( $t=3.121, P=0.512$ )。上述结果表明,LEAW、LEWW可使小鼠体重增长,降低肺湿重和肺系数,且效果与地塞米松相当,但两者对体重的改变差异无统计学意义。见表3。



A: 正常组; B: 模型组; C: 维生素 C 组; D: 地塞米松组; E: LEWW 组; F: LEAW 组

图 1 各组小鼠肺组织病理改变 (HE× 200)



A: 正常组; B: 模型组; C: 维生素 C 组; D: 地塞米松组; E: LEWW 组; F: LEAW 组

图 2 各组小鼠肺组织病理改变 (Masson× 200)

#### 2.4 LE 对博来霉素致肺纤维化小鼠血清 GSH、NO 的影响

各组小鼠血清中 GSH、NO 含量比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义。维生素 C 组、地塞米松组与模型组 GSH、NO 含量比较,经 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义 ( $t=6.182$  和  $12.124, P=0.000$ ); 维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组及 LEAW 组与模型组 GSH 比较,差异有统计学意义 ( $t=4.912, 3.626, 3.935$  和  $3.867, P=0.000$ ); LEWW 组与维生素 C 组、地塞米松组及 LEAW 组 GSH 比较,差异有统计学意义 ( $t=5.231, 6.243$  和  $3.563, P=0.021, 0.032$  和  $0.041$ )。维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组及 LEAW 组与模型组 NO 含量比较,差异有统计学意义 ( $t=2.192, 5.122$

和  $4.143, P=0.031, 0.021$  和  $0.022$ ); LEWW 组与维生素 C 组、地塞米松组 NO 含量比较,差异有统计学意义 ( $t=9.322$  和  $4.243, P=0.210$  和  $0.042$ ); LEWW 组

表 2 各组小鼠炎症及纤维化程度评分 (n=7, 分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肺泡炎症评分	纤维化程度评分
正常组	0.45± 0.05	1.62± 0.07
模型组	2.47± 0.18	3.24± 0.35
维生素 C 组	1.72± 0.21	2.71± 0.22
地塞米松组	1.30± 0.17	2.36± 0.14
LEWW 组	1.55± 0.16	2.47± 0.21
LEAW 组	1.32± 0.08	2.55± 0.19
F 值	107.113	87.230
P 值	0.013	0.025

表 3 各组小鼠体重、肺湿重及肺系数比较 (n=7,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / (mg/kg)	体重 / g	肺湿重 / g	肺系数
正常组	100	28.58± 1.36	0.1989± 0.012	0.5339± 0.0376
模型组	100	21.12± 0.92	0.2514± 0.019	0.8165± 0.0565
维生素 C 组	100	24.25± 0.77	0.2158± 0.017	0.7135± 0.0469
地塞米松组	2	25.45± 1.26	0.2280± 0.022	0.6434± 0.0826
LEWW 组	100	24.65± 1.21	0.2182± 0.015	0.6683± 0.0188
LEAW 组	100	25.13± 0.88	0.2193± 0.020	0.6631± 0.1682
F 值		15.162	10.318	54.126
P 值		0.025	0.039	0.027

与 LEAW 组 NO 含量比较,差异无统计学意义 ( $t = 2.535, P=0.712$ )。上述结果表明,模型组 GSH 含量低于维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组及 LEAW 组,但其 NO 含量高于维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组及 LEAW 组。LEWW 组和 LEAW 组对抑制 GSH 含量降低的效果弱于维生素 C 组、地塞米松组。见表 4。

表 4 各组小鼠血清中 GSH、NO 浓度比较 (n=7,  $\mu\text{mol/L}, \bar{x} \pm s$ )

组别	GSH	NO
正常组	33.56± 7.74	2.71± 0.72
模型组	28.99± 4.81	8.36± 0.25
维生素 C 组	39.95± 8.02	6.03± 0.68
地塞米松组	44.06± 10.64	4.22± 0.33
LEWW 组	43.15± 11.18	4.07± 0.51
LEAW 组	34.47± 6.96	3.16± 0.27
F 值	132.104	42.172
P 值	0.041	0.016

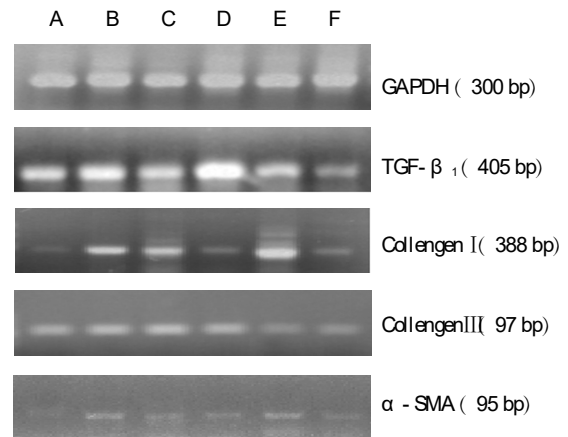
### 2.5 LE 对肺纤维化小鼠 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达的影响

各组小鼠 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达,经单因素方差分析,差异有统计学意义。与对照组比较,模型组 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达量比较,经 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义 ( $t = 3.028, 3.927, 8.927$  和  $5.928, P=0.000$ ),模型组升高;与模型组比较,维生素 C 组、地塞米松组、LEWW 组及 LEAW 组可下调 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 及 Collagen III mRNA 表达量,LEAW 可同时下调 Collagen I mRNA 的表达水平;LEAW 组与 LEWW 组 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I mRNA 水平比较,差异有统计学意义 ( $t =$

$3.291, 4.928$  和  $7.283, P = 0.023, 0.029$  和  $0.041$ ), LEAW 组下调 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I mRNA 表达的能力优于 LEWW 组。见表 5 和图 3。

表 5 各组小鼠肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达水平比较 (n=7,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGF-β <sub>1</sub> mRNA	α-SMA mRNA	Collagen I mRNA	Collagen III mRNA
正常组	0.74± 0.06	0.58± 0.03	0.60± 0.012	1.01± 0.09
模型组	1.15± 0.12	1.24± 0.11	1.29± 0.11	1.12± 0.15
维生素 C 组	0.77± 0.07	0.86± 0.06	1.23± 0.17	1.19± 0.14
地塞米松组	1.20± 0.16	0.82± 0.09	0.71± 0.1	1.03± 0.08
LEWW 组	0.79± 0.11	1.05± 0.12	1.38± 0.15	0.78± 0.07
LEAW 组	0.64± 0.08	0.77± 0.58	0.76± 0.02	0.79± 0.16
F 值	23.142	45.834	76.164	42.186
P 值	0.019	0.036	0.012	0.002



A: 正常组; B: 模型组; C: 维生素 C 组; D: 地塞米松组; E: LEWW 组; F: LEAW 组

图 3 各组小鼠肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达情况

### 2.6 LE 对博来霉素致肺纤维化小鼠肺组织中 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 及 HYP 含量的影响

各组小鼠肺组织中 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 及 HYP 含量表达,经单因素方差分析,差异有统计学意义。与模型组比较,对照组中 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 及 HYP 含量比较,经 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义 ( $t = 6.203, 9.382$  和  $3.827, P=0.000$ ),对照组含量升高;与模型组相比,给药组小鼠肺组织中 TGF-β<sub>1</sub>、α-SMA 及 HYP 含量均有不同程度的降低,LEAW 组与维生素 C 组、地塞米松组及 LEAW 组 TGF-β<sub>1</sub> 和 HYP 含量比较,经 LSD-*t* 检验,差异有统计学意义 ( $t = 7.292$  和  $3.927, P=0.012$  和  $=0.024$ ),LEAW 组最低。见表 6。

表 6 各组小鼠肺组织 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA 及 HYP 浓度比较 (  $n=7, \bar{x} \pm s$  )

组别	TGF- $\beta_1$ / ( ng/L )	$\alpha$ -SMA / ( ng/L )	HYP / ( $\mu$ g/L )
正常组	16.11 $\pm$ 2.14	12.91 $\pm$ 0.24	6.46 $\pm$ 0.71
模型组	98.76 $\pm$ 13.78	28.24 $\pm$ 0.42	16.45 $\pm$ 2.41
维生素 C 组	67.92 $\pm$ 9.24	17.44 $\pm$ 0.13	13.62 $\pm$ 1.14
地塞米松组	45.43 $\pm$ 5.10	16.58 $\pm$ 0.23	13.57 $\pm$ 1.52
LEWW 组	48.72 $\pm$ 4.82	17.12 $\pm$ 0.21	12.84 $\pm$ 1.23
LEAW 组	36.00 $\pm$ 4.38	16.76 $\pm$ 0.24	12.13 $\pm$ 1.41
F 值	75.142	56.823	46.712
P 值	0.004	0.014	0.007

### 3 讨论

PF 是一种进行性、不可逆的慢性肺间质纤维化疾病,且 5 年存活率低<sup>[9]</sup>。PF 疾病早期可出现氧化应激,引发炎症反应。正常机体抗氧化系统中主要包括酶类抗氧化系统如 SOD、髓过氧化物酶、GSH 等和费酶类抗氧化系统如维生素 C、E 等<sup>[9]</sup>。GSH 是一种低分子自由基清除剂,可防止血红蛋白及其他辅因子受氧化损伤。在复杂的纤维化病理过程中 NO 不仅可与氧自由基产生氧化物,而且可作为细胞信号分子介导肺泡巨噬细胞及肺泡上皮细胞等细胞的增殖或凋亡来参与肺间质纤维化的形成。莲子心作为一种传统中药材,具有很明显的抗炎、抗氧化等多种药理学活性。在本实验中给予 LE 干预性治疗后,与模型组相比其氧化生成产物 GSH 升高,NO 含量降低,表明 LE 具有对博来霉素诱导肺纤维化抗氧化应激的作用。肺纤维化后期主要表现为肺间质增宽、细胞外基质沉积及胶原纤维(Collagen I 及 Collagen III)大量生成<sup>[7]</sup>,形成广泛纤维化。HYP 作为胶原纤维蛋白中主要的组成成分,可准确地间接反映胶原纤维蛋白的含量<sup>[8]</sup>。近年来有研究证实,TGF- $\beta_1$  为关键的致肺纤维化的细胞因子,可以促进肺成纤维细胞向肌成纤维细胞分化,上调其下游的  $\alpha$ -SMA 表达<sup>[9]</sup>,并促进细胞外基质的生成与沉积,进一步促进肺纤维化的发展<sup>[10]</sup>。细胞外基质主要由成纤维细胞病灶转型的肌成纤维细胞组成,其主要表达产物为  $\alpha$ -SMA<sup>[11]</sup>。本实验研究发现,LE 可降低对博来霉素致小鼠肺纤维化模型肺组织 TGF- $\beta_1$ 、 $\alpha$ -SMA、Collagen I 及 Collagen III mRNA 表达;酶联免疫吸附法检测显示,LE 给药组 HYP 表达降低。另外从 Masson 染色的病理切片

中见其可有效抑制胶原纤维形成,降低肺纤维化程度。实验证明,LE 能抗博来霉素之小鼠肺纤维化,且 LEAW 组效果明显优于维生素 C 组。

综上所述,莲子心提取物可通过抗氧化、抑制胶原纤维形成及下调 TGF- $\beta_1$ , 进而抑制成纤维细胞的活化、增殖,下调  $\alpha$ -SMA 的表达,减少细胞外基质的大量沉积,发挥其抗纤维化作用。

### 参 考 文 献:

- [1] CALABRESE F, KIPAR A, LUNARDI F, et al. Herpes virus infection is associated with vascular remodeling and pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. PLoS One, 2013, 8(2): 1-11.
- [2] ZHOU M, JIANG M, YING X, et al. Identification and comparison of anti-inflammatory ingredients from different organs of Lotus nelumbo by UPLC/Q-TOF and PCA coupled with a NF- $\kappa$ B reporter gene assay[J]. PLoS One, 2013, 8(11): 1-12.
- [3] LIAO C H, LIN J Y. Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) plumule polysaccharide ameliorates pancreatic islets loss and serum lipid profiles in non-obese diabetic mice[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58: 416-422.
- [4] 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.
- [5] TRAJANO L A, TRAJANO E T, LANZETTI M, et al. Elastase modifies bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Acta Histochem, 2016, 118(3): 203-212.
- [6] 谢汝佳, 韩冰, 何小飞, 等. 丹芍化纤方对大鼠肺纤维化 NF- $\kappa$ B 与氧化应激的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(7): 471-474.
- [7] 苏焜, 张毅, 李娟, 等. 红芪有效部位对肺间质纤维化模型大鼠肺组织胶原面积、透明质酸及层粘连蛋白的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(4): 72-76.
- [8] 李丽君, 李丽娜, 李根茂, 等. 不同配比与剂量黄芪当归对药对肺纤维化小鼠肺形态学及羟脯氨酸含量影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015(3): 30-33.
- [9] SOUSA A M, LIU T, GUEVARA O, et al. Smooth muscle  $\alpha$ -actin expression and myofibroblast differentiation by TGF $\beta$  are dependent upon MK2[J]. J Cell Biochem, 2007, 100(6): 1581-1592.
- [10] KURUNDKAR A R, KURUNDKAR D, RANGARAJAN S, et al. The matricellular protein CCN1 enhances TGF- $\beta_1$ /SMAD3-dependent profibrotic signaling in fibroblasts and contributes to fibrogenic responses to lung injury[J]. FASEB J. 2016, 30(6): 2135-2150.
- [11] XIE L, ZHOU D, XIONG J, et al. Paraquat induce pulmonary epithelial-mesenchymal transition through transforming growth factor- $\beta_1$ -dependent mechanism[J]. Exp Toxicol Pathol, 2016, 68(1): 69-76.