

甘利欣注射液对肺纤维化大鼠 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 的影响

殷宗宝, 李景辉, 曹玉芳, 侯宇, 计超(海口市人民医院暨中南大学湘雅医学院附属海口医院重症医学科, 海南 海口 571100)

摘要: **目的** 探讨甘利欣注射液对博莱霉素所致肺纤维化大鼠血清 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、II 型肺泡表面抗原-6(KL-6)和核因子 κ B(NF- κ B)的影响。**方法** 取健康 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为 5 组, 即正常组、模型组和甘利欣注射液低、中、高剂量组(25, 50, 100 mg·kg⁻¹)。除正常组外, 其余各组经气道注入博莱霉素复制肺纤维化动物模型, 正常组用等容量生理盐水经大鼠气道注入。模型复制后第 28 天开始, 腹腔注射甘利欣注射液, 连续 14 d。第 15 天处死大鼠, 取左肺下叶的组织, 用实时荧光 PCR 和免疫组化检测 α -SMA mRNA、NF- κ B mRNA 表达; 大鼠右肺下叶 HE 染色观察病理学切片。取大鼠血清用 ELISA 双抗体夹心法测定 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 的含量。**结果** 甘利欣各组大鼠肺纤维化程度均较轻微, 模型组大鼠肺组织成纤维细胞反应增强。正常组和甘利欣各组大鼠肺组织 α -SMA mRNA、NF- κ B mRNA 表达较低, α -SMA 和 NF- κ B 染色及定量表达减弱, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。正常组和甘利欣各组大鼠血清 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 含量与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甘利欣注射液能够减少肺组织 α -SMA、NF- κ B 的表达, 降低 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 含量, 进而减轻肺组织纤维化程度。

关键词: 甘利欣注射液; 肺纤维化; 博莱霉素; α -平滑肌肌动蛋白; II 型肺泡表面抗原-6; 核因子 κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)05-0586-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.05.016

Effect of Diammonium Glycyrrhizinate Injection on α -SMA, KL-6 and NF- κ B in Rat Model of Pulmonary Fibrosis

YIN Zongbao, LI Jinghui, CAO Yufang, HOU Yu, JI Chao(Intensive Care Unit of Haikou Municipal People's Hospital Affiliated to Xiangya Medical School of Central South University, Haikou 571100 Hainan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Diammonium Glycyrrhizinate Injection (DGI) on alpha smooth muscle actin(α -SMA), type II pulmonary alveolus surface antigen 6(KL-6) and nuclear factor kappa B(NF- κ B) in rat model of pulmonary fibrosis induced by Bleomycin. **Methods** Fifty rats were randomly divided into 5 groups, normal group, pulmonary fibrosis group(model group), and low-, middle- and high-dose DGI groups(in the dosage of 25, 50, 100 mg·kg⁻¹). Rats except for the normal group were given infusion of Bleomycin through the airway to induce pulmonary fibrosis, and the normal group was given the same volume of normal saline through the airway. On the modeling day 28, DGI was given to the model rats by intraperitoneal injection for 14 continuous days. On the medication day 15, rats were executed, left inferior lung tissues were taken out for the detection of α -SMA mRNA and NF- κ B mRNA expression by real time fluorescence PCR, and the right lung was made into slice for the pathological observation. Serum α -SMA, KL-6 and NF- κ B contents were measured by ELISA. **Results** The pulmonary alveolitis and fibrosis of DGI groups were significantly milder than pulmonary fibrosis group. Pulmonary α -SMA mRNA and NF- κ B mRNA and protein expression levels were lower in the normal group and DGI groups than the model group($P<0.05$). Serum α -SMA, KL-6 and NF- κ B contents in the normal group and DGI groups differed from those in the model group($P<0.05$). **Conclusion** DGI has certain effect on relieving rat pulmonary fibrosis through reducing pulmonary α -SMA and KL-6 expression, and by decreasing serum α -SMA, KL-6 and NF- κ B contents in rats

Keywords: Diammonium Glycyrrhizinate Injection; Pulmonary fibrosis; Bleomycin; Alpha smooth muscle actin (α -SMA); Type II pulmonary alveolus surface antigen 6(KL-6); Nuclear factor kappa B(NF- κ B)

收稿日期: 2014-04-12

作者简介: 殷宗宝, 男, 副主任医师, 研究方向: 重症医学呼吸监护的临床研究。Email: chaobao851024@sohu.com。

基金项目: 海南省卫生厅科研课题(2011-SWK-06-132/ 琼卫 2011-61)。

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性进行性发展的致死性疾病,该病的患病率和病死率逐年增加,预后极差,中位生存时间为2~3年,由于糖皮质激素和(或)免疫抑制剂等常规治疗措施的有效率不足30%,因此,目前对于IPF缺乏有效的药物治疗,而早期干预对于改善IPF患者的预后具有重要的意义。甘利欣注射液有效成分为甘草酸二铵,具有抗炎、免疫调节、抗氧化、影响内源性类固醇激素和保护细胞膜结构等广泛的药理学作用,是临床治疗肝纤维化的常用药物,具有较强的非特异性抗炎作用,其抗炎作用与皮质醇类似,可减少肝细胞的水肿、坏死,同时甘利欣注射液调节内源性类固醇水平,而无盐皮质激素样副作用^[1]。本实验根据甘利欣的这一药理作用,着重于探讨该药对肺间质纤维化的治疗作用和机制研究,为肺间质纤维化的治疗提供新的临床治疗手段,增加其实用价值。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠,雄性,5 周龄,体质量(180±20)g,由温州医学院实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(浙)0020158。

1.2 药品与试剂 甘利欣注射液(甘草酸二铵氯化钠),江苏正大天晴药业股份有限公司(50 mg),批号:2000011504;注射用盐酸博莱霉素(15 mg),日本化药株式会社,批号:712050;大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、II 型肺泡表面抗原-6(KL-6)和核因子 κ B(NF- κ B)ELISA 试剂盒,美国 Rapid Bio 公司;浓缩型兔抗大鼠 α -SMA 和 NF- κ B 抗体,即用型 SABC 试剂盒(兔 IgG)和 DAB 显色试剂盒(棕黄色),北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 SP-9001 和 ZLI-9018;Trizol RNA 试剂盒,美国 Invitrogen 公司,批号:15596-026;2%戊巴比妥钠,中国医药集团上海化学试剂公司,批号:F20020915。

1.3 主要仪器 光学显微镜,日本 Olympus 公司;酶标仪,奥地利 TECAN 公司;台式普通离心机,上海安亨科学仪器厂;医用深低温冰箱,美国 Forma 公司;超净工作台,北京伟达净化技术研究所;Finnpipette 可调式移液器,热电(上海)仪器有限公司;Real time PCR 仪,Corbett Research,澳大利亚。

1.4 分组、模型复制^[2]及给药 取 Wistar 大鼠 50 只,随机分为正常组、模型组和甘利欣注射液低、中、高剂量组,共 5 组,每组 10 只,常规喂养。除正常

组外,其余各组以 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,用鼠灌胃器插入气道并回抽出有大量气体后证明确实已经在气管内,缓慢注入含博莱霉素的生理盐水 5 mg·kg⁻¹(浓度 4 mg·mL⁻¹),注入后立即旋转动物,使药液在肺内分布均匀。正常组以等量生理盐水代替博莱霉素注入气管内。甘利欣注射液各治疗组自模型复制后第 28 天开始,按照甘利欣注射液低、中、高剂量组各 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ 剂量,腹腔内注射,连续 2 周,第 15 天全部处死。

1.5 大鼠血清采集 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,大鼠仰卧位开腹,取腹主动脉近心端全血 8 mL,室温静置 2 h 后,3000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上层血清保存于 -70℃ 冰箱中备用。

1.6 肺组织病理学观察 实验结束后,取右肺下叶肺组织,用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肺组织病理情况。

1.7 左肺下叶肺组织 α -SMA mRNA、NF- κ B mRNA 检测 实验结束后,左下肺置于 -80℃ 液氮内保存,取液氮内各组大鼠左下肺组织,用 Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录反应按照试剂盒说明书操作。引物设计软件,Primer 5.0 Rotor-gene 6.0, Corbett Research 生产。

引物 Ppia 上游引物:5'GGGGAGAAAGGATTTGGCTAT3'

Ppia 下游引物:5'GCCAGGACCTGTATGCTTCA3', 长度 165 bp;

α -SMA 上游引物:5'CAGCTATTGCCGTCCAATTGA3'R: 5'CCAGGGCTTCATCATTGCA3', 长度 131 bp;

NF- κ B 上游引物:5'AGGTATTTGATGCTCGGGA CTG3'

NF- κ B 下游引物:5'CGAAGATTGCCTCGGTTTGT3', 长度 94 bp。

目的基因和管家基因 PCR 反应体系(宝生物工程(上海)有限公司):dNTP(2.5 mmol·L⁻¹ each)2.5 μ L, 10×PCR 缓冲液 2.5 μ L, MgCl₂ 溶液 1.5 μ L, Taq 聚合酶(1 units, Sybergreen I) 2 μ L, 10 μ mol·L⁻¹, PCR 特异引物上游引物和下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, 加水至总体积 25 μ L; PCR 反应条件:95℃ 变性 3 min; 40 个 PCR 循环(94℃, 20 s; 59℃, 20 s; 72℃, 30 s); 72℃ 延伸 5 min。将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释:设定 PCR 产物浓度为 1, 分别稀释为 1×10⁻¹, 1×10⁻², 1×10⁻³, 1×10⁻⁴, 1×10⁻⁵, 1×10⁻⁶,

1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} 。几个梯度稀释的 DNA 模板和所有 cDNA 样品分别配置 Real time PCR 反应体系。置 Real time PCR 仪上进行 PCR 反应; Ppia (ENF): 95 ℃, 5 min; 40 个 PCR 循环(95 ℃, 10 s; 59 ℃, 15 s; 72 ℃, 20 s; 81 ℃, 收集荧光, 5 s)。Ppia(BSR): 95 ℃, 5 min; 35 个 PCR 循环(95 ℃, 10 s; 59 ℃, 15 s; 72 ℃, 20 s; 80.5 ℃, 收集荧光, 5 s)。α-SMA: 95 ℃, 5 min; 40 个 PCR 循环(95 ℃, 10 s; 59 ℃, 15 s; 72 ℃, 20 s; 83 ℃, 收集荧光, 5 s)。NF-κB: 95 ℃, 5 min; 45 个 PCR 循环(95 ℃, 10 s; 59 ℃, 15 s; 72 ℃, 20 s; 78 ℃, 收集荧光, 5 s)。结束后从 72 ℃缓慢加热到 99 ℃建立 PCR 产物溶解曲线, 根据此曲线, 各样品目的基因和管家基因浓度由机器生成。每个样品目的基因浓度除以其管家基因浓度, 即为此样品此基因校正后的相对含量。

1.8 大鼠血清 α-SMA、KL-6 和 NF-κB 的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法, 按照试剂盒说明书要求进行。

1.9 肺组织 α-SMA 和 NF-κB 的测定 按照免疫组化试剂盒说明的 SABC 法进行。据肺组织的 α-SMA 和 NF-κBIHC 表达结果用 SPOT 及 IPP 图像采集分析系统处理, 40 × 10 视野下观察采集图像, Image-Pro Plus 6.0 版专业图像分析软件处理结果, 以累积吸光度值(IA)表示 α-SMA 和 NF-κB 表达的相对强度, 每张切片选 5 个免疫反应较强视野进行分析。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用多组间的方差分析(*F* 检验), 如差异有统计学意义, 再进行组间两两比较, 用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 对肺组织病理变化的影响 第 43 天时, 正常组未出现明显的病理变化, 见图 1A; 模型组肺泡壁增厚, 肺纤维化程度加重, 肺泡结构破坏, 肺泡腔消失, 见图 1B。甘利欣低、中和高剂量组肺泡腔内残留少量炎性细胞, 肺组织结构比较完整, 少许肺泡炎和肺纤维化形成, 见图 1C。

2.2 左肺下叶肺组织 α-SMAmRNA、NF-κBmRNA 的表达 与正常组比较, 模型组左肺下叶肺组织 α-SMA mRNA 和 NF-κB mRNA 表达明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 甘利欣组左肺下叶肺组织 α-SMA mRNA 和 NF-κB mRNA 表达均明显降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$);

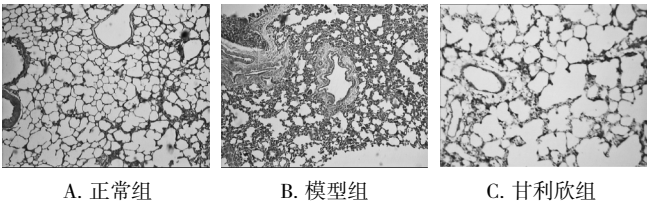


图 1 大鼠右肺下叶肺组织 HE 染色病理比较(100 ×)
Figure 1 Pathological staining of HE in rat right lower lobe lung

而甘利欣各组和正常组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组肺组织 α-SMAmRNA 和 NF-κBmRNA 的表达
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Expression of α-SMA mRNA and NF-κB mRNA in rat lung tissue

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	α-SMA mRNA	NF-κB mRNA
正常组	-	347 ± 216	589 ± 92
模型组	-	807 ± 181 [△]	1022 ± 67 [△]
甘利欣低剂量组	25	360 ± 190 [*]	604 ± 79 [*]
甘利欣中剂量组	50	353 ± 166 [*]	584 ± 87 [*]
甘利欣高剂量组	100	352 ± 154 [*]	601 ± 91 [*]

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化肺组织 α-SMA 和 NF-κB 的测定 模型组肺组织 α-SMA 和 NF-κB 阳性反应明显增强, 呈片块状或粗条索状, 与正常组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。甘利欣各剂量组为弱阳性, 定量表达减低, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠肺间质 α-SMA 和 NF-κB 的定量表达(IA)
($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Expression of α-SMA and NF-κB(IA) in rats pulmonary interstitial

组别	剂量 / mg·kg ⁻¹	α-SMA	NF-κB
正常组		6.47 ± 3.86	7.99 ± 6.92
模型组		18.07 ± 5.81 ^{△△}	11.71 ± 6.43 [△]
甘利欣低剂量组	25	11.35 ± 4.76 ^{**}	9.83 ± 12.47 [*]
甘利欣中剂量组	50	10.60 ± 5.90 ^{**}	8.05 ± 6.19 [*]
甘利欣高剂量组	100	9.30 ± 6.45 ^{**}	7.49 ± 5.79 [*]

注: 与正常组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.4 大鼠血清 α-SMA、KL-6 和 NF-κB 的含量 与正常组比较, 模型组大鼠血清 α-SMA、KL-6 和 NF-κB 含量均明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 治疗后, 甘利欣各剂量组大鼠血清 α-SMA、KL-6 和 NF-κB 含量均明显降低, 与模型组比较, 差

异有统计学意义($P<0.05$), 见表 3。

表 3 各组大鼠血清 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 含量($\bar{x}\pm s$, $n=10$, $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 3 The content of serum of α -SMA, KL-6 and NF- κ B in rats

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	α -SMA	KL-6	NF- κ B
正常组	-	3.71 ± 0.46	5.31 ± 0.60	7.19 ± 0.38
模型组	-	$9.05\pm 0.51^{\Delta}$	$11.07\pm 0.97^{\Delta}$	$12.33\pm 0.49^{\Delta}$
甘利欣低剂量组	25	$3.48\pm 0.44^{*}$	$6.13\pm 0.20^{*}$	$8.07\pm 0.43^{*}$
甘利欣中剂量组	50	$3.23\pm 0.14^{*}$	$6.01\pm 0.31^{*}$	$7.87\pm 0.21^{*}$
甘利欣高剂量组	100	$3.28\pm 0.58^{*}$	$5.88\pm 0.43^{*}$	$8.01\pm 0.73^{*}$

注: 与正常组比较, $^{\Delta}P<0.05$; 与模型组比较, $^{*}P<0.05$ 。

3 讨论

肺纤维化实质上就是肺间质的成纤维细胞受到各种病理伤害时, 分泌胶原纤维进行肺间质修复的过程, 其结果是造成肺间质的重塑。本实验表明, 肺纤维化后期以纤维化为主。NF- κ B 调控的多种细胞因子基因, 介导了肺泡炎和肺纤维化。主要作用表现在以下几个方面: ①肺泡炎是肺纤维化的中心环节, 肺泡巨噬细胞活化后释放大细胞因子, 这些细胞因子在肺纤维化过程中起到了关键性作用。而这些细胞因子的基因转录启动区或增强子上均有 NF- κ B 的 DNA 结合位点, NF- κ B 活化后促进这些因子的基因转录, 提示肺泡巨噬细胞的 NF- κ B 活性增强与肺纤维化关系密切。②TGF- β_1 可促进成纤维细胞 I 和 III 型胶原的表达, 且与浓度呈正相关。在 TGF- β_1 致纤维化过程中, 虽然 NF- κ B 不能控制 TGF- β_1 的基因启动子, 但 NF- κ B 能活化转谷氨酰胺酶的启动子, 而在组织中此酶是潜活性 TGF- β_1 的激活物^[2-4]。③ α -SMA 是肌成纤维细胞的标志蛋白, 是造成细胞外基质异常沉积的主要因素, 抑制肺组织中 NF- κ B 的表达可以抑制 TGF- β_1 的表达, 进而抑制肺成纤维细胞 α -SMA 表达^[5-6]。NF- κ B 在调节活化的成纤维细胞转化为肌成纤维细胞的增殖方面起着关键性作用, 是肺间质纤维化发病机制中的中心环节。本实验显示博来霉素致肺纤维化模型大鼠肺泡腔消失, 肺泡结构破坏, 肺泡壁增厚, 肺纤维化程度加重, 肺组织 NF- κ B mRNA 表达增强, 血清中 α -SMA、NF- κ B 含量较高。而甘利欣各剂量组情况明显得到改善, 表明甘利欣可以减少肺纤维化大鼠

α -SMA 和 NF- κ B 的分泌。KL-6 是诊断肺纤维化的标志物, IPF 急性加重患者血液中的 KL-6 明显增高。大量研究证实^[7-9]高浓度的 KL-6 可以预测 IPF 生存率。本实验显示, 甘利欣各剂量组大鼠血清 KL-6 水平明显降低, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$)。甘利欣各治疗组大鼠 HE 染色病理切片显示, 细胞基膜完好, 成纤维细胞的增生及间质胶原纤维的沉积范围及程度显著轻于模型组。肺组织内 α -SMA mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达较少, 甘利欣各剂量组血清中 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 含量明显较模型组低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明, 甘利欣可以抑制 α -SMA mRNA 和 NF- κ B mRNA 蛋白的表达, 减少 α -SMA、KL-6 和 NF- κ B 分泌而起抗肺纤维化的作用。

参考文献:

[1] 叶进燕, 陈少贤, 徐红蕾, 等. 甘草甜素对大鼠肺纤维化的治疗作用及对转化生长因子表达的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 9 (29): 636-637.

[2] Flanders KC. Smad 3 as a mediator of the fibrotic response[J]. Int j Exp Pathol, 2010, 85(2): 47-64.

[3] Zhao Y, Gevert DA. Regulation of Smad3 expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a negative feedback loop of TGF- β signaling[J]. Biochem biophys Res Commun, 2012, 294(2): 319-323.

[4] Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K, et al. C-C chemokine receptor22 (CCR2) deficiency improves bleomycin2induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metallopro-teinasen [J]. Pathol, 2012, 204: 594-604.

[5] Ahn JY, Kim MH, Lim MJ, et al. The inhibitory effect of ginsan on TGF- β mediated fibrotic process[J]. J Cell Physiol, 2011, 226: 1241-1247.

[6] Hu Y, Peng J, Feng D, et al. Role of extracellular signalregulated kinase, p38 kinase and activator protein-1 in transfoeming growth factor- β -induced alpha smooth muscle actin expression in human fetal lung fibroblasts in vitro[J]. Lung, 2006, 184: 33-42.

[7] Vij R, Noth I. Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Transl Res, 2012, 159: 218-227.

[8] Collard HR, Calfee CS, Wolters PJ, et al. Plasma biomarker profiles in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299: 3-7.

[9] Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, et al. Utility of KL-6/MUC1 in the clinical management of interstitial lung diseases[J]. Respir Investig, 2012, 50: 3-13.

(编辑: 宋威)