

丹参酮对肺纤维化大鼠的干预作用及其机制研究

田淑霞 陈珺明 韩永龙 肖铁钢

(上海交通大学附属第六人民医院药剂科,上海,200233)

摘要 目的:观察丹参酮对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响及其作用机制。方法:SD 大鼠随机分为 5 组:空白对照组、模型组、地塞米松阳性对照组、丹参酮组、丹参酮加地塞米松组。大鼠气管内注射博来霉素复制肺纤维化模型后,各给药组腹腔注射相应药物,给药 1 次/d。28 d 后处死动物,取固定部位肺组织分别行 HE、Masson 染色及电镜进行病理组织学检查;RT-PCR 法检测丹参酮对大鼠肺组织中 uPA、PAI-1 mRNA 表达的影响。结果:与模型组相比,丹参酮组大鼠肺炎和肺纤维化程度明显减轻($P < 0.05, 0.01$);uPA 显著升高而 PAI-1 表达明显降低($P < 0.05, 0.01$);在与地塞米松联合时以上作用更加明显。结论:丹参酮对博来霉素所致大鼠肺纤维化具有一定的治疗作用且与地塞米松有协同作用,其机制可能与抑制炎症反应细胞的浸润活化、细胞外基质沉积及调控 UPA 及 PAI-1 之间平衡有关。

关键词 丹参酮;肺纤维化;UPA;PAI-1;博来霉素

Influence and Mechanism of Tanshinone on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Rats

Tian Shuxia, Chen Junming, Han Yonglong, Xiao Tiegang

(Department of Pharmacy Service, Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Tanshinone on urokinase-type plasminogen activator (uPA) and urokinase-type plasminogen activator-1 (PAI-1) in rats with pulmonary fibrosis and to explore the possible mechanism. **Methods:** Fifty Spague-Dawley rats were randomly divided into the control group, model group, Tanshinone group, dexamethasone group and Tanshinone add dexamethasone group. The rats of model group and the treatment group were induced pulmonary fibrosis with bleomycin (5 mg/kg) endotracheally, while the rats of other groups were given normal saline instead. After 28 days, rats with Tanshinone treatment by Intraperitoneal injection administration once a day were killed. The rat lung histopathology was examined with HE staining, masson staining and electron microscope. The influences of Tanshinone on the expression of uPA and PAI-1 mRNA in lung tissue of rats with Bleomycin-induced pulmonary fibrosis were assayed by RT-PCR. **Results:** Compared with the model group, the alveolitis and fibrosis extent were attenuated after Tanshinone treatment ($P < 0.05, 0.01$), and the expression levels of uPA was increased and PAI-1 mRNA was decreased ($P < 0.05, 0.01$) significantly. Compared with the dexamethasone group, therapeutic effect was more obviously when Tanshinone combine with dexamethasone ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tanshinone has a good action against experimental pulmonary fibrosis and has the synergetic effect with dexamethasone. The mechanisms might be related to the inhibition of activation of inflammatory cell infiltration, collagen deposition and regulation of equilibrium between the uPA and PAI-1.

Key Words Tanshinone; Pulmonary fibrosis; uPA; PAI-1; Bleomycin

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.12.023

肺纤维化(Pulmonary Fibrosis, PF)是由多种病因引起的肺泡间质性炎症反应及进行性细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)增多沉积的动态病理过程,进而导致肺远端有效换气面积减少,多数患者最终死于气道损伤和低氧性呼吸衰竭^[1-3]。尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase-type Plasminogen Activator, uPA)及其抑制物(Urokinase-type Plasminogen Activator-1, PAI-1)是调节 ECM 降解平衡的重要体系。丹参是常见的活血化瘀中药,丹参酮 IIA 磺酸钠是丹参提取物之一丹参酮 IIA 的水溶性衍生物。近年来许多研究表明,丹参酮 IIA 具有抗纤维化作用^[4-5]。本研究采用博来霉素复制大鼠肺纤维化模型,观察观察丹参酮 IIA 对

肺纤维化大鼠肺组织尿激酶型纤溶酶系统表达及肺组织超微结构改变的影响。

1 材料

1.1 药品与试剂 丹参酮 IIA 磺酸钠(第一生化药业有限公司,国药准字:H31022558);博来霉素 A₅,(日本化药株式会社,批号:640110);醋酸泼尼松龙片,(上海信谊药厂有限公司,批号:120122);逆转录及 PCR 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);SYBR Green Supermix(日本东洋公司);兔抗大鼠 UPA 单克隆抗体试剂盒、羊抗大鼠 PAI-1 单克隆抗体试剂盒(Santa Cruz Biotechnology INC)。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,SPF 级,体质量(260

±20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,许可证号为 SCXK(沪)2009-0005。

2 方法

2.1 肺纤维化大鼠模型制备、分组与给药 将实验大鼠 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉后,无菌操作下行颈部正中切口,分离气管。模型组与治疗组大鼠气管内注入 0.2~0.3 mL 含博莱霉素 A₅ (5 mg/kg) 的生理盐水,对照组注入等体积生理盐水,缝合切口并消毒处理,将大鼠直立旋转 3 min,使药液在肺中分布均匀。大鼠随机分为 5 组(每组 10 只),分别为空白对照组(A 组)、模型组(B 组)、丹参酮治疗组(C 组)、泼尼松阳性对照组(D 组)、泼尼松联合丹参酮治疗组(E 组)。于成模后第 2 日,C 组和 D 组大鼠每天分别按 10 mg/kg 和 0.4 mg/kg 体质量腹腔注射丹参酮 II A 磺酸钠或泼尼松,E 组给药为 C、D 组相加。其余 2 组每日给予等体积蒸馏水腹腔注射,实验周期为 28 d。

2.2 病理学观察 迅速取右肺下叶 4%多聚甲醛固定 48 h,制备石蜡切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,Masson 三色染色,参照文献^[6-7]将肺泡炎和肺纤维化程度分级:无肺泡炎和肺纤维化;轻度肺泡炎和肺纤维化,受累面积小于 20%;中度肺泡炎或肺纤维化,受累面积 20%~50%;重度肺泡炎或肺纤维化,受累面积 >50%。一起经 25 g/L 戊二醛中固定,按电镜常规进行标本制备。半薄切片后做超薄切片,日本 JEM-1230 型投射电镜观察。

2.3 肺纤维化大鼠 uPA 及 PAI-1 基因表达 提取大鼠左下肺组织总 RNA。用分光光度法测定其总 RNA 含量及纯度。用 RT 试剂盒对总 mRNA 进行逆转录,合成 cDNA,进行实时 PCR 反应。反应体系共 25 μL: cDNA 和上下游引物各 0.5 μL,SYBS green supermix 12.5 μL,去离子水 11 μL。循环条件:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,62 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 45 s,60 次循环,55 ℃ 10 min。实时收集荧光信号,数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析,计算出 UPA、PAI-1 mRNA 的相对表达量。引物由上海英骏生物科技有限公司合成,序列见表 1。

表 1 UPA、PAI-1 和 GAPDH 引物序列

Target gene	primer subsequence
uPA	Forward5'-AAGGTCTGGGATACTAGAGCC-3'
	Reverse5'-CAGGATATCCTCAGTCTCCACC-3'
PAI-1	Forward5'-AGTCTTTCCGACCAAGAGCA-3'
	Reverse5'-GTCCCAAAGGAAAGGCTTCT-3'
GAPDH	Forward5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTC-3'
	Reverse5'-ATGAGCCCCCAGCCTTCTCCA-3'

注:GAPDH(磷酸甘油醛脱氢酶)。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行分析,各组计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析,两两比较用 *LSD-t* 法,等级资料采用 Kruskal-Wallis 法或 Mann-Whitney 法检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 对肺纤维化大鼠肺组织病理形态学的影响 HE 染色显示:A 组肺组织结构清晰,毛细血管正常,肺泡腔完整,无炎性反应细胞浸润。B 组较 A 组肺泡腔及肺间质内可见大量炎性细胞浸润,肺泡间隔明显增厚,毛细血管明显增生,病变部位广泛,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。C、D、E 组较 B 组肺泡间隔增宽,极个别肺组织中见到肺泡腔中有单核巨噬细胞浸润及出血,程度均较轻,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Masson 染色显示:A 组肺组织结构清晰,无明显纤维组织增生;B 组较 A 组肺组织结构破坏,重度炎性细胞浸润,大面积大量胶原纤维沉积呈束状而造成肺泡壁明显增厚及肺泡形态改变,支气管、血管周边广泛大量胶原沉积,有明显的间质纤维化,纤维化评分明显较正常组增高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组相比,C、D、E 组可见肺泡壁的增厚,炎性细胞浸润减少,肺组织损害减轻,有少量胶原纤维沉积,纤维化评分降低,差异具有统计学意义;C 组与 E 组和 D 组比较,炎性细胞浸润及纤维组织明显减少,纤维化评分降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。(见图 1,表 2)。

表 2 肺组织炎性反应及纤维化评分

组别	动物数	肺炎炎性反应			肺纤维化		
		+	++	+++	+	++	+++
A 组	10	2	0	0	1	0	0
B 组*	10	1	6	3	0	2	8
C 组 [△]	10	4	5	1	2	3	5
D 组 [△]	10	5	4	1	2	4	4
E 组 ^{△▲}	10	5	3	2	2	4	4

注:与空白对照(A)组比较,* $P < 0.05$;与模型(B)组比较,[△] $P < 0.05$;与地塞米松(D)组比较,[▲] $P < 0.05$ 。C 组:丹参酮治疗组、E 组:泼尼松联合丹参酮治疗组)。

病理标本电镜学观察:A 组:肺泡上皮结构完整,I 型上皮细胞胞质扁平,其基膜与毛细血管基膜贴敷紧密,呼吸膜连续、较厚,II 型细胞形态正常,表面具有绒毛,内含嗜钺性分泌颗粒,为板层状;细胞间连接比较紧密,间质中有少量纤维,排列松散而稀疏。B 组:肺组织整体结构比较疏松,呼吸膜出现分层、扭曲甚至破坏;II 型细胞绒毛减少甚至消失,板层小体大部分缺失呈空泡状;部分 I 型上皮细胞线粒体肿胀,嵴消失呈空泡。血管内皮细胞核变形,核膜皱折,腔内有大量红细胞、中性白细胞,部分胞质空泡变性。成纤维细胞增

多,肺间质大量纤维不规则堆积,排列紧密而凌乱。C、D、E 组呼吸膜偶见分层或扭曲,连续性良好;Ⅱ型细胞绒毛基本正常,板层小体有较多残留;肺间质存在少量纤维(见图 2)。

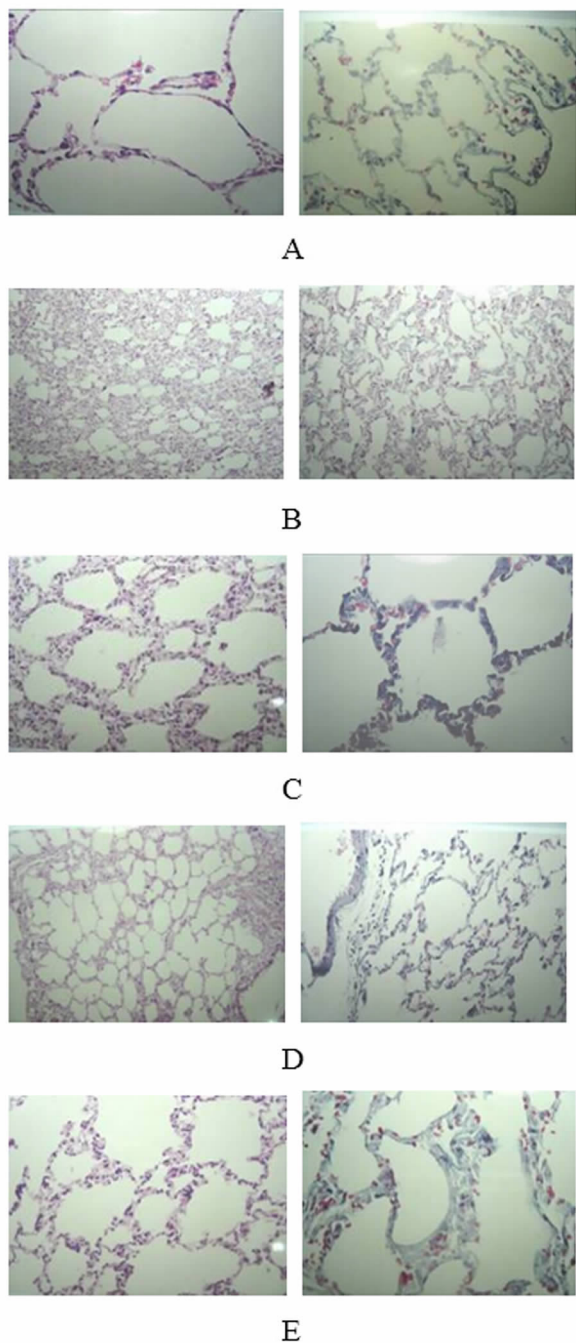


图 1 光镜下肺组织病理学改变
(每组左为 HE 染色,右为 Masson 染色)

3.2 对肺纤维化大鼠 uPA 与 PAI-1 基因表达的影响
B 组大鼠肺组织 UPA 及 PAI-1 较 A 组均明显增加,但以 PAI-1 增加更加明显,C、D、E 组大鼠 UPA 较 B 组明显增加而 PAI-1 明显降低 ($P < 0.05, 0.01$) (见图 3)。

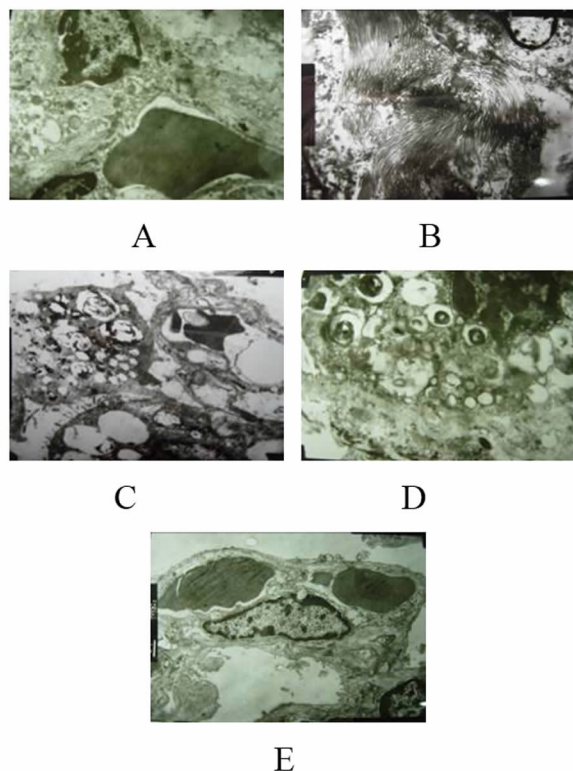


图 2 电镜下肺组织病理学改变

注:A 组:空白对照组、B 组:模型组、C 组:丹参酮治疗组、D 组:泼尼松阳性对照组、E 组:泼尼松联合丹参酮治疗组。

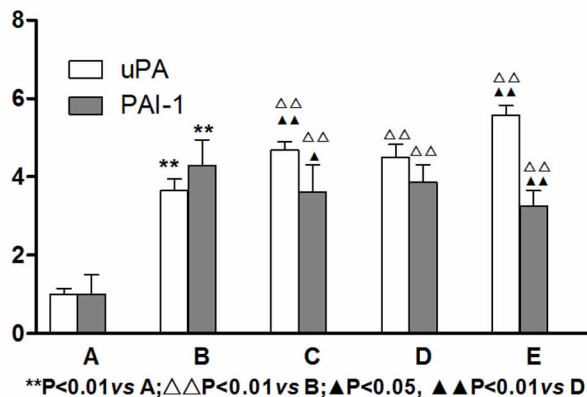


图 3 丹参酮对肺纤维化大鼠肺组织中 uPA、PAI-1 mRNA 表达的影响

注:A 组:空白对照组、B 组:模型组、C 组:丹参酮治疗组、D 组:泼尼松阳性对照组、E 组:泼尼松联合丹参酮治疗组。

4 讨论

博莱霉素是一种抗肿瘤药,其不良反应之一是引起肺纤维化。用博莱霉素复制肺纤维化动物模型,已成为国内外公认的肺纤维化造模方法^[8-9]。可用于研究肺纤维化的发病机制及药物筛选。本研究采用博来霉素复制大鼠肺纤维化模型,对照组大鼠的肺组织结构正常,未见炎症反应及纤维化病灶,而模型组大鼠的肺组织则出现不同程度的肺泡炎性反应变化,肺泡间隔增厚,肺泡腔破坏变窄或消失,成纤维细胞增生,肺

间质胶原沉积,与文献报道的肺纤维化病变一致^[10-11]。经过丹参酮治疗后,博来霉素诱导的肺纤维化模型大鼠肺泡炎及肺纤维化程度明显减轻,表明丹参酮能减轻肺纤维化过程中的炎性反应及纤维化程度。ECM 过度沉积是各种器官纤维化的共同表现^[12-13],肺纤维化也不例外^[14]。ECM 的过度沉积既是 ECM 合成过多,更大程度上是由于降解的减少引起的^[15]。uPA 主要参与血管新生、基质重构、肿瘤浸润及转移等过程,尤其是 ECM 的降解,因而与肺纤维化关系密切^[16]。一方面,uPAR 与 pro-uPA 特异结合后通过自分泌或旁分泌机制使 uPA 活化,另一方面,它还与活化的 uPA 高效结合,将 uPA 浓集于细胞表面,同时纤溶酶原通过其赖氨酸结合位点与细胞表面的纤溶酶原受体结合,两个系统在细胞膜上相伴作用,形成一高效的纤溶活化系统,活化的 uPA 将催化纤溶酶原转变为纤溶酶,介导 ECM 蛋白的水解。同时激活的纤溶酶也可作用于 pro-uPA,使之变成有活性的 uPA,形成一种正反馈现象。PAI 是丝氨酸蛋白酶抑制物超家族的成员,包括 PAI-1、PAI-2 及 PAI-3。其中,PAI-1 是 uPA 的主要抑制物^[17]。PAI 与 uPA 结合后被 uPA 降解,释放出 PAI 的羧基端,新产生的 C 末端精氨酸的羧基与 uPA 活性中心的丝氨酸的羧基生成酯键,从而抑制精氨酸-丝氨酸蛋白酶。PAI-1 对 uPA 的抑制作用及 uPA 自身对 uPAR 的降解,共同参与 uPA 活性的负向调节^[18]。一旦有各种致病因子打破这种统一,则使两者失衡,从而导致肺纤维化的发生、发展^[19]。

正如本实验显示,与空白组相比,模型组 uPA 和 PAI-1 的表达明显增强,且 PAI-1 的增加更加明显,从而增加了胶原纤维的积累并促进肺纤维化的发展。与模型组相比,丹参酮显著升高了肺组织中 PAI-1 的表达,降低 PAI-1 的表达,从而证明丹参酮通过提高 PAI-1 抑制 PAI-1 而产生抗纤维化的作用。与地塞米松组相比,丹参酮组未表现出明显差异,而丹参酮与地塞米松联合显示出明显优势。

总之,本实验结果表明,丹参酮抑制博来霉素诱导的大鼠肺纤维化过程,提高机体的抗炎、抗损伤能力,其作用机制可能与通过调控 UPA 与 PAI-1 之间的平衡,减少细胞外基质蛋白沉积有关。并且这一作用在与地塞米松联合时显示协同效应。

参考文献

[1] Feng Y Z, Zhang Y S, Cao Z F, et al. Prevention of combination of *Hirsutella sinensis* and *Panax notoginseng* extracts on Bleomycin-induced

- pulmonary fibrosis in mice[J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 118 - 124.
- [2] Montes E, Ruiz V, Checa M, et al. Renin is an angiotensin-independent profibrotic mediator; role in pulmonary fibrosis[J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(1): 141 - 148.
- [3] Santos-Silva MA, Pires KM, Trajano ET, et al. Redox imbalance and pulmonary function in bleomycin-induced fibrosis in C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice[J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(5): 731 - 741.
- [4] Wu H, Li Y, Wang Y, et al. Tanshinone IIA attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via modulating angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7) axis in rats[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(6): 578 - 586.
- [5] Xu M, Cao F, Liu L, et al. Tanshinone IIA-induced attenuation of lung injury in endotoxemic mice is associated with reduction of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 5(5): 1028 - 1035.
- [6] 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: 893 - 899.
- [7] Hubner R H, Gitter W, Mokhtari N E E, et al. Standardized quantification of pulmonary fibrosis in histological samples[J]. *Biotechniques*, 2008, 44(4): 507 - 517.
- [8] Gharraee K M, Ullenbruch M, Phan S H. Animal models of pulmonary fibrosis[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 117(3): 251 - 259.
- [9] 张永胜, 冯一中, 曹志飞, 等. 复方虫草对博来霉素致大鼠肺纤维化的作用及其机制[J]. *中草药*, 2011, 42(9): 1766 - 1772.
- [10] Talmadge E King, Annie Pardo, Moisés Selman. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Lancet*, 2011, 378(9807): 1949 - 1961.
- [11] 王斌胜, 刘孟安. 肺络通合剂对肺纤维化大鼠肺组织病理形态学和纤维连接蛋白含量的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 16(17): 195 - 198.
- [12] 穆恩, 陈松, 李鑫, 等. VII 因子活化蛋白酶对肺纤维母细胞增殖和胶原合成的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 11(23): 653 - 657.
- [13] 肖霞, 何振华. 转化生长因子-β 和肝细胞生长因子在肺纤维化中的研究进展[J]. *中国实用医药*, 2010, 2(5): 239 - 241.
- [14] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Annu Rev Med*, 2013, 64: 265 - 276.
- [15] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. TGFβ signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300(6): 887 - 897.
- [16] 张纾难, 贾明月, 于洋. 近 5 年中医呼吸病学学术发展述评[J]. *世界中医药*, 2014, 9(8): 969 - 973.
- [17] 张彦萍, 王卫丽, 刘建, 等. 纤溶酶原激活物抑制剂-1 对大鼠肺成纤维细胞凋亡的影响[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 12(35): 931 - 933.
- [18] H Ishibashi, Y Nariai, T Kanno, et al. Effects of transforming growth factor beta 1 on the plasminogen activation system, collagen and integrin synthesis, and proliferation of rabbit mandibular condylar chondrocytes[J]. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 2014, 43(4): 470 - 475.
- [19] Dubis, Joanna Zuk, Natalia, et al. Activity of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in the plasma of patients with abdominal aortic aneurysm[J]. *Blood coagulation & fibrinolysis*, 2014, 25(3): 226 - 231.

(2014-04-15 收稿 责任编辑: 王明)