

薛兰,毛春迎,王慧,等. 槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(7): 94-100, 117.

Xue L, Mao CY, Wang H, et al. Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(7): 94-100, 117.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.07.013

槲皮素治疗大鼠肺纤维化的作用及相关机制研究

薛 兰¹,毛春迎²,王 慧¹,王守福¹,张争辉¹,郭新庆^{1*}

(1.菏泽医学专科学校基础医学部,山东 菏泽 274000;2.菏泽医学专科学校医学技术系,山东 菏泽 274000)

【摘要】 目的 探讨槲皮素对肺纤维化大鼠肺组织细胞间质转化、炎症及对 NOX4-P62 信号途径的影响,为进一步阐明槲皮素对肺纤维化的作用机制提供实验依据。**方法** 将实验大鼠分为对照组、博来霉素组(BLM 组)和博来霉素+槲皮素组(BLM+QUE 组),分别于造模后第 7、14、28 天观察各组肺组织外观,利用苏木素-伊红染色法(HE 染色)评价肺纤维化情况,蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测各组肺组织还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4)、自噬蛋白 P62、核因子 κ B(NF- κ B)的蛋白表达情况,反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测人肺腺癌细胞株 A549 细胞血管平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和钙粘附蛋白 E(E-cadherin)的 mRNA 表达水平,酶联免疫吸附法(ELISA 法)检测转化生长因子- β 1(TGF- β 1)、白介素-1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平。**结果** BLM 组随时间增加大鼠肺纤维化呈进行性加重,BLM+QUE 组在第 7 天时症状较 BLM 组轻,在第 28 天时症状明显减轻。BLM 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达,较对照组明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$),BLM+QUE 组在第 7 天时较 BLM 组低,但无显著差异($P>0.05$),但在第 14、28 天时较 BLM 组明显下降,差异显著($P<0.05$)。与对照组比较,加入 TGF- β 1 的 A549 细胞 E-cadherin、 α -SMA mRNA 的表达分别明显降低和升高($P<0.05$);给予槲皮素后,E-cadherin、 α -SMA mRNA 的表达较 TGF- β 1 组分别明显升高和降低($P<0.05$)。**结论** 槲皮素能够抑制 TGF- β 1 对人肺腺癌细胞株 A549 细胞诱导的间质转化的转变,减轻肺纤维化大鼠的炎症反应,缓解博来霉素所致的大鼠肺纤维化,自噬活性在博来霉素诱导大鼠发生肺纤维化的过程中受到抑制;槲皮素可能通过抑制 NOX4-P62 信号途径,激活自噬,减轻大鼠肺纤维化。

【关键词】 肺纤维化;槲皮素;炎症细胞因子;间质转化;NOX4;P62

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 07-0094-07

Effects of quercetin on pulmonary fibrosis in rats and its related mechanism

XUE Lan¹, MAO Chunying², WANG Hui¹, WANG Shoufu¹, ZHANG Zhenghui¹, GUO Xinqing^{1*}

(1. Department of basic Medicine, Heze Medical College, Heze 274000, China.

2. Department of Medical Technology, Heze Medical College, Heze 274000)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of quercetin on interstitial transformation, inflammation, and the NOX4-P62 signaling pathway in lung tissue of rats with pulmonary fibrosis to provide an experimental basis for further elucidating the mechanism of quercetin in pulmonary fibrosis. **Methods** Rats were divided into control, BLM and BLM+QUE groups. The appearance of lung tissue in each group was observed on days 10, 20 and 30 after modeling. Pulmonary fibrosis was evaluated by HE staining. NOX4 and P62 in lung tissue, and α -SMA and E-cadherin in A549 cells were detected by western blotting. TGF- β 1, IL-1 β and TNF- α were measured by ELISA. **Results** Symptoms in the BLM+QUE group were milder than those in the BLM group on day 7, and significantly relieved on day 28. TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α ,

[作者简介]薛兰(1989—),女,硕士研究生,讲师,研究方向:应用解剖学。E-mail:dengzh71@126.com

[通信作者]郭新庆(1976—),男,硕士,教授,研究方向:解剖学。E-mail:852532823@qq.com

NOX4 and P62 expression in the BLM+QUE group was lower than that in the BLM group on day 10 ($P>0.05$), but it was much expression lower than that in the BLM group on days 14 and 28 ($P<0.05$). Compared with the control group, E-cadherin and α -SMA expression in the TGF- β 1 group was significantly decreased and increased, respectively ($P<0.05$). Compared with the TGF- β 1 group, E-cadherin and α -SMA expression in the TGF- β 1+QUE group were significantly increased and decreased, respectively ($P<0.05$). **Conclusions** Quercetin inhibits TGF- β 1. EMT of A549 cells alleviates the inflammatory reaction and pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats. Autophagy is inhibited by bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. Quercetin inhibits the NOX4-P62 signaling pathway, activates autophagy, and reduces pulmonary fibrosis in rats.

【Keywords】 pulmonary fibrosis; quercetin; inflammatory cytokines; mesenchymal transition; NOX4; P62

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是临床上棘手的疾病,无有效治疗方法,致死率高,患者一般最终因呼吸衰竭而死亡。该病是多因素引起的严重的呼吸系统疾病,在西医上认为是细胞外基质在肺组织间质过度沉积,降解减少而引起的病理改变。在中医学上属于“肺痿”、“肺痹”范畴,认为可能与肺肾亏虚、气血凝滞、痰瘀痹阻肺络有关。目前中药对于肺纤维化的治疗具有一定的作用,能够有效缓解病情,减轻肺纤维化的程度,减少患者痛苦^[1]。槲皮素(quercetin, QUE)是一种广泛存在于自然界中的多羟基黄酮醇类化合物,不仅富含在柴胡、桑寄生、银杏叶等中药中,就连日常生活中的苹果、西兰花、卷心菜等也有。药理研究证明槲皮素具有抗氧化、清除自由基、抗肿瘤、抗炎症、抗菌等作用^[2],相关实验也说明了槲皮素抗肺纤维化的分子机制,有可能是通过调控 Smad7 信号,缓解 TGF- β 诱导的小鼠肺泡 II 型上皮细胞 NIH3T3 纤维化^[3],但槲皮素抗肺纤维化的分子机制尚未得到透彻研究,为了进一步阐明槲皮素对肺纤维化的作用机制,本研究在前期研究的基础上,进一步探讨槲皮素抗肺纤维化的分子机制,现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

健康成年 3~5 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,重量 190~210 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2020-0009],质量合格证号:11400700045968,饲养于本院屏障级动物室[SYXK(鲁)2020-0013]。所有实验操作遵守实验室相关管理规定,经菏泽医学专科学校进行伦理审批 HZY2019-0381),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

人肺腺癌细胞株 A549 细胞由中南大学遗传实验室赠送。

1.2 主要试剂与仪器

Click-iT[®] Plus TUNEL assay 试剂盒(货号:C10618)购自 Invitrogen 公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号:C0105)购自碧云天;Masson Stain Kit Masson 染色试剂盒(货号:60532ES58)购自上海翊圣生物科技有限公司;IL-1 β (货号:ab13847)、TNF- α (货号:ab202068)、TGF- β 1(货号:ab64715)、 α -SMA(货号:ab5694)、GAPDH(货号:1056)一抗购自美国 Abcam 公司;HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司;NOX4(货号:E-EL-R0015c)、NF- κ B(EEL-R0019)、P62(E-EL-R0016)和 ELISA 试剂盒购自 Elabscience;注射用盐酸博来霉素(每瓶 15 mg),日本化药株式会社生产(注册证号 H20090885);槲皮素购自上海西格玛(Sigma)公司。AniRes2005 动物肺功能分析系统购自北京贝兰博科技有限公司;PCR 仪、电泳仪及半干转膜仪均购自美国伯乐公司;Gel View 6000 化学发光凝胶成像系统购自广州云星仪器有限公司;Multiskan GO 酶标仪购自 Thermo。

1.3 实验方法

1.3.1 造模及槲皮素给药

实验动物采用随机数字表法分为 3 组,分别是对照组 10 只、博来霉素组(bleomycin, BLM)20 只、博来霉素+槲皮素组(BLM+QUE)20 只。大鼠腹腔注射 25%乌拉坦(4 mL/kg)麻醉后,BLM 组采取一次性给予大鼠气管内注射 BLM(5 mg/kg)以造成大鼠急性肺损伤,对照组采取一次性气管内注射同体积无菌生理盐水,BLM+QUE 组采取向气管内一次性注入 BLM(5 mg/kg)的当日给予腹腔注射槲皮素(3 mg/kg),其后每日一次腹腔注射槲皮素(3 mg/kg),直至大鼠被处死,期间所有大鼠均给予日常饮食。分别在建模后第 7、14、28 天,BLM 组和 BLM+QUE 组随机处死 6 只(剪断腹主动脉处死各组大鼠),并在第 28 天处死对照组 6 只,处死前所有动物

均禁食 10 h, 称重后注射 25% 乌拉坦 (4 mL/kg) 麻醉, 严格进行无菌消毒后留取同一位置适度大小的肺组织, 放入冻存管中, 置于 -80℃ 冰箱中, 用于制备肺组织匀浆和石蜡切片。

1.3.2 HE 染色

将取出的肺组织固定在 4% 多聚甲醛中 24 h, 除去多余多聚甲醛, 加入 PBS, 每隔 8 h 更换 1 次, 连续 3 d, 4℃ 冰箱保存, 然后切成 0.2 cm 厚的小块并标记好, 然后用乙醇进行梯度洗脱, 加入 50% 乙醇和 50% 二甲苯静置 30 min, 然后放入 100% 二甲苯, 观察组织块至透明。此时放入已经融好的 50% 石蜡和 50% 二甲苯溶液 30 min, 然后放入预融的 100% 石蜡两遍, 每次 2 h, 再放入 100% 石蜡纸盒内凝固, 置于 4℃ 冰箱存放, 取出, 使用切片机切成约 7 μm 厚的切片, 将其置于水面上伸展, 贴在已经处理好的载玻片上。将制备好的石蜡切片使用二甲苯进行脱蜡, 酒精梯度水化后用苏木精染液浸泡 8 min 后, 再用自来水冲洗, 加入 1% 盐酸乙醇 10 s 后自来水冲洗, 再加入 0.5% 伊红浸染 3 min 后自来水冲洗, 然后再用梯度乙醇脱水, 依次使用二甲苯 I 和 II 透明, 中性树胶封片待分析。

1.3.3 ELISA 法检测分析各细胞因子

使用双抗体夹心法检测转化生长因子 β1 (transforming growth factor-β1, TGF-β1)、白介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)。以 TNF-α 为例: 标准品按照说明书进行梯度稀释, 样本用样本稀释液进行稀释, 分别于标准品孔、样本孔、空白孔加入标准品、样本、标准品稀释液各 100 μL, 各孔分别加生物素标记的细胞因子抗体 50 μL, 经 37℃ 孵育后各孔加 350 μL 洗涤液, 静置 1 min 后弃去, 重复 4 次, 各孔加入标记的链霉亲和素工作液 100 μL, 经 37℃ 孵育 30 min 后弃去, 重复 4 次。各孔加入 100 μL 底物避光孵育, 30 min 取出酶标板, 各孔加入 100 μL 终止液, 450 nm 波长处检测 OD 值, 绘制标准曲线,

计算各细胞因子的浓度。

1.3.4 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测分析

利用 Western blot 技术检测在第 7、14、28 天时肺组织的 NOX4、P62、NF-κB 水平。Western blot 技术主要分以下步骤: 提前制备好聚丙烯酰胺凝胶, 上样后进行电泳, 当目的蛋白电泳至分离胶 2/3 处时停止电泳, 采用半干式转膜至出现清晰条带并冲洗至染色液褪去, 然后封闭、洗膜、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜, 进行显色反应后去除一抗和二抗, 然后再洗膜, 再次重复一抗孵育和二抗孵育的过程, 最后进行图像分析。

1.3.5 人肺腺癌细胞株 A549 细胞的培养与处理

采用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养人肺腺癌细胞株 A549 细胞。将液氮中冻存的 A549 细胞迅速取出后, 立即置于 37℃ 的水浴锅中快速复苏, 待冻存管内液体完全溶解后, 转移至离心管中, 加入 10% 胎牛血清的完全培养基, 轻轻吹打混匀后置于离心机中离心后倒去上清液, 再加入完全培养基将细胞重悬, 转移至培养瓶中并置于 37℃ CO₂ 培养箱中培养。倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 当细胞生长至 80% 汇合或即将汇合时进行细胞传代, 全部操作步骤在超净工作台内完成。将培养瓶中 A549 细胞用胰酶消化以制备单细胞悬液, 种于培养皿中, 置于 37℃ 细胞培养箱中, 培养 24 h 后, 弃去上清液, 用 PBS 清洗 2 次, 加入 2% 胎牛血清继续培养 24 h 后换液。对照组加入 PBS, TGF-β1 组加入终浓度为 5 ng/mL 的 TGF-β1, TGF-β1+QUE 组加入终浓度为 5 ng/mL 的 TGF-β1 和 100 μmol/L 的 QUE, 继续培养 48 h。

1.3.6 Real-time PCR 检测 A549 细胞中 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 表达情况

采用 TRIzol 提取试剂盒提取各组 A549 细胞总 RNA, 经逆转录合成 cDNA 模板, 根据 SYBR Green 试剂盒中的有关说明对 E-cadherin 和 α-SMA mRNA 表达水平进行检测, 以 GAPDH 作为内参物。根据

表 1 qRT-PCR 各引物序列
Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

基因名称 Gene name	基因编码方向 Gene coding direction	引物序列 Primer sequence
GAPDH	F	5'-GATCGCGACTTACGGACT-3'
	R	5'-AGCTAGGCTAGCCACGCACATTA-3'
α-SMA	F	5'-GTCGTAGCTAGTAGGGTACACGG-3'
	R	5'-ACTGCTACTAGCTTATCGTAGGA-3'
E-cadherin	F	5'-GCTGTACCTAGACTGGACCACTAC-3'
	R	5'-GCTGACCAACGTAGTTACACAG-3'

Primer Premier 5.0 软件对引物进行设计,引物合成由上海生工生物科技有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应体系总体积为 20 μ L(其中逆转录产物 2 μ L、SYBR Green Mix 10 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、7 μ L 的 ddH₂O),PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因表达情况。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS 19.0 分析软件包以及 Excel 2010 进行统计分析,计量资料用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组之间比较使用单因素方差分析(one-way ANOVA),组内数据之间的比较采用 LSD-*t* 检验,所有数据经统计分析后以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织纤维化的形态学观察

建模后第 7、14、28 天观察,对照组肺表面光滑无结节无出血点,外观呈粉红色,轮廓清晰。BLM 组肺泡在第 7 天时明显肿胀并有点状红斑;第 14 天时呈灰白,有点状出血;第 28 天时质地较硬,体积明显缩小。BLM+QUE 组与 BLM 组比较,整体情况偏好,没有明显结节,偶见少许点状出血及斑块,具体见图 1。

2.2 HE 染色检测结果

HE 染色显示,建模后对照组各时间点内肺泡结构完整,肺泡壁较薄,肺泡内无明显炎症细胞浸润。BLM 组肺泡在第 7 天时有大量炎症细胞聚集,并有少量胶原纤维;第 14 天肺泡间隔显著增厚,胶原纤维增多;第 28 天时部分肺泡结构遭到破坏,大量肺泡塌陷,出现纤维化区域。BLM+QUE 组在第 7 天可见肺泡有炎症细胞浸润但较 BLM 组症状轻;第 14 天时炎症细胞浸润减轻,有少量胶原纤维沉积;第 28 天时肺组织炎症病变明显减轻,轻度肺纤维化得到明显改变,具体见图 2。

2.3 各组实验动物细胞因子检测结果

在第 7、14、28 天的样本检测中发现,BLM 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8,与对照组比较明显上升,差异具有统计学意义($P<0.05$),给药第 14、28 天的样本中,BLM+QUE 组的 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 和 IL-8,与 BLM 组比较显著下降,具有统计学差异($P<0.05$),提示槲皮素在一定程度上具有减轻肺组织纤维化大鼠的炎

症反应,见表 2。

2.4 槲皮素对 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞间质转化的影响

对照组中 A549 细胞的 E-cadherin 呈高表达, α -SMA 呈低表达,加入 TGF- β 1 诱导的 A549 细胞间质转化中,在第 7、14、28 天时,A549 细胞 E-cadherin 的表达明显降低,在第 28 天时达最低,差异具有统计学意义($P<0.05$),同时对应各时间点, α -SMA 的表达水平明显增高($P<0.05$)。给予槲皮素后,各时间点与 TGF- β 1 组比较,A549 细胞的 E-cadherin 的表达明显升高($P<0.05$),但低于正常对照组, α -SMA 的表达明显降低($P<0.05$)。该结果说明槲皮素能够抑制 TGF- β 1 对 A549 细胞诱导的 EMT 的转变,具体见图 3、表 3。

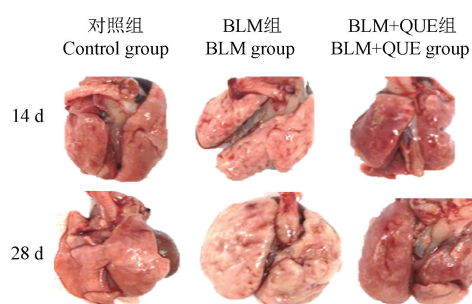


图 1 形态学观察不同组别大鼠第 14、28 天肺组织纤维化情况

Figure 1 Morphological observation of pulmonary fibrosis in different groups on the 14th and 28th days

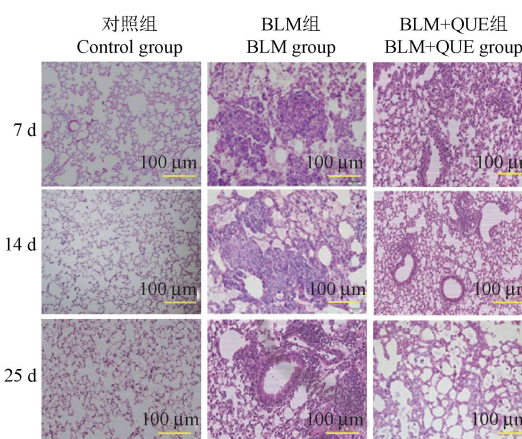


图 2 各组大鼠肺组织第 7、14、28 天的 HE 染色情况

Figure 2 HE staining of lung tissue of rats in each group on day 7, 14 and 28

表 2 各组细胞因子的检测结果
Table 2 Test results of cytokines in each group

组别 Group	时间点 Time	TGF-β1 (ng/L)	IL-1β (ng/L)	TNF-α (ng/L)	IL-8 (ng/L)	IL-6 (ng/L)
对照组 Control group	第 7 天 D7	310.3±68.9	58.4±11.7	63.6±12.7	543.26±69.41	664.33±59.24
	第 14 天 D14	307.5±70.3	60.2±9.6	59.8±10.3	548.57±72.06	659.24±67.03
	第 28 天 D28	312.7±66.4	59.8±10.4	60.2±11.5	541.08±80.53	663.52±63.48
BLM 组 BLM group	第 7 天 D7	822.6±87.8 [*]	99.6±20.6 [*]	100.3±19.4 [*]	642.54±55.67 [*]	786.35±89.20 [*]
	第 14 天 D14	1540.3±112.5 ^{*▲}	200.4±29.3 ^{*▲}	182.4±22.6 ^{*▲}	705.28±59.28 ^{*▲}	812.33±83.64 ^{*▲}
	第 28 天 D28	1800.7±106.4 ^{*▲}	240.7±18.6 ^{*▲}	286.3±27.2 ^{*▲}	731.93±67.08 ^{*▲}	800.26±80.14 ^{*▲}
BLM+QUE 组 BLM+QUE group	第 7 天 D7	813.3±79.6	97.9±18.8	95.5±15.6	653.57±59.41	776.61±80.06
	第 14 天 D14	1105.2±89.8 ^{#▲}	128.6±20.7 ^{#▲}	149.4±18.9 ^{#▲}	659.24±68.34 ^{#▲}	743.21±76.83 ^{#▲}
	第 28 天 D28	1211.3±82.6 ^{#▲}	122.5±14.9 ^{#▲}	142.1±14.7 ^{#▲}	604.23±72.97 ^{#▲}	702.31±71.29 ^{#▲}

注:同一时间内,与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与 BLM 组相比, [#] $P<0.05$;同一组别,与第 7 天相比, [▲] $P<0.05$ 。
Note. At the same time, compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the BLM group, [#] $P<0.05$. In the same group, compared with the 7th day, [▲] $P<0.05$.

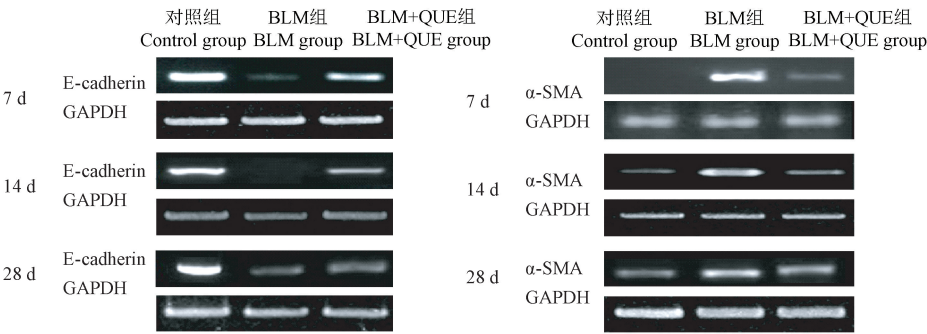


图 3 qRT-PCR 检测各组不同时间点 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 的电泳图

Figure 3 Electrophoresis of E-cadherin mRNA and α-SMA mRNA detected by qRT-PCR at different time points in each group

表 3 不同组别不同时间点 E-cadherin mRNA、α-SMA mRNA 的表达

Table 3 Expression of E-cadherin mRNA and α-SMA mRNA in different groups at different time points

组别 Group	基因名称 Gene name	第 7 天 D7	第 14 天 D14	第 28 天 D28
对照组 Control group	E-cadherin mRNA	0.953±0.074	0.887±0.083	0.902±0.075
TGF-β1 组 TGF-β1 group		0.271±0.064 [*]	0.232±0.055 [*]	0.384±0.072 [*]
TGF-β1+QUE 组 TGF-β1+QUE group		0.732±0.045 [#]	0.574±0.072 [#]	0.593±0.054 [#]
对照组 Control group	α-SMA mRNA	0.139±0.022	0.173±0.026	0.211±0.013
TGF-β1 组 TGF-β1 group		0.992±0.089 [*]	0.947±0.081 [*]	0.732±0.055 [*]
TGF-β1+QUE 组 TGF-β1+QUE group		0.336±0.043 [#]	0.343±0.029 [#]	0.409±0.057 [#]

注:同一时间内,与对照组相比, ^{*} $P<0.05$;与 TGF-β1 组相比, [#] $P<0.05$ 。
Note. At the same time, compared with the control group, ^{*} $P<0.05$. Compared with the TGF-β1 group, [#] $P<0.05$.

2.5 NOX4 和 P62 蛋白的表达

在第 7、14、28 天的样本检测中发现, BLM 组 NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量显著高于正常对照组。在第 7 天检测的样本, BLM+QUE 组与 BLM 组比较, NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量有所降低, 但差异不显著 ($P>0.05$), 但在第 14、28 天的检测结果中, BLM+QUE 组与 BLM 组比较, NOX4、P62、NF- κ B 蛋白表达量显著降低 ($P<0.05$), 见图 4、表 4。

3 讨论

肺纤维化的致病因素至今没有明确阐释清楚, 可能与不断恶化的空气质量、环境粉尘污染以及不明原因的物理化学污染等有关。目前临床上没有根治的办法, 患者常会出现渐进性加重, 最终出现

呼吸衰竭而死亡。研究证明中药能够通过调节 TGF- β 信号通路发挥抑制肺纤维化的作用^[4-5]。槲皮素在柴胡等中药中含量较高, 具有多种生物学活性, 既往的研究发现槲皮素对肺部疾病具有一定效果^[6-7]。明确槲皮素在抗肺纤维化过程中的机制有助于开发有针对性的治疗药物。博来霉素在 Fe^{2+} 和 O_2^- 存在下诱导产生氧自由基, 诱发细胞膜发生 DNA 解链和脂质过氧化, 导致细胞受损, 启动纤维化前炎症反应^[8]。本次研究采用博来霉素诱导大鼠发生肺纤维化, 在造模后第 7、14、28 天观察各组肺组织外观情况并经 HE 染色结果分析, 证明博来霉素可以导致大鼠肺组织发生纤维化。本次研究进一步探讨槲皮素对大鼠肺纤维化炎症反应的影响。

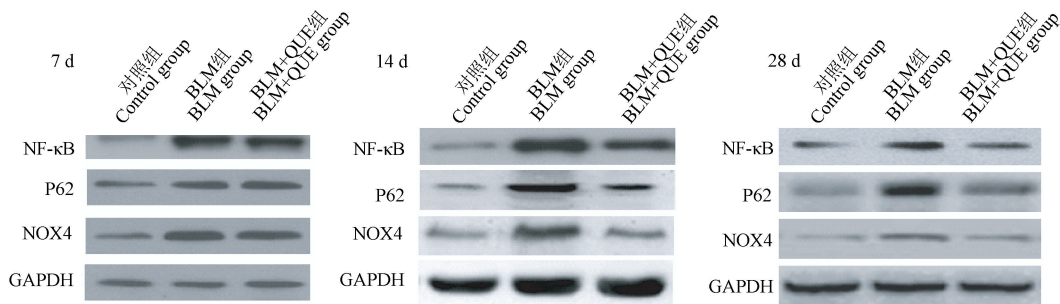


图 4 Western blot 检测各组大鼠肺组织不同时间点 NOX4、P62 及 NF- κ B 蛋白表达电泳图

Figure 4 Western blot detection of NOX4, P62 and NF- κ B in lung tissue of rats in each group at different time points

表 4 不同组别不同时间点 NOX4、P62 及 NF- κ B 的蛋白表达

Table 4 Protein expression of NOX4, P62 and NF- κ B at different time points in different groups

组别 Group	基因名称 Gene name	第 7 天 D7	第 14 天 D14	第 28 天 D28
对照组 Control group	NF- κ B	0.233 $\pm$ 0.024	0.269 $\pm$ 0.033	0.302 $\pm$ 0.037
BLM 组 BLM group		0.876 $\pm$ 0.072	1.282 $\pm$ 0.061 *	0.882 $\pm$ 0.064 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.852 $\pm$ 0.065	0.674 $\pm$ 0.092 [#]	0.597 $\pm$ 0.054 [#]
对照组 Control group	P62	0.139 $\pm$ 0.022	0.173 $\pm$ 0.026	0.211 $\pm$ 0.013
BLM 组 BLM group		0.495 $\pm$ 0.056	0.869 $\pm$ 0.061 *	0.875 $\pm$ 0.069 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.506 $\pm$ 0.049	0.402 $\pm$ 0.038 [#]	0.423 $\pm$ 0.059 [#]
对照组 Control group	NOX4	0.139 $\pm$ 0.022	0.173 $\pm$ 0.026	0.131 $\pm$ 0.018
BLM 组 BLM group		0.764 $\pm$ 0.089	0.901 $\pm$ 0.093 *	0.420 $\pm$ 0.039 *
BLM+QUE 组 BLM+QUE group		0.768 $\pm$ 0.043	0.435 $\pm$ 0.042 [#]	0.289 $\pm$ 0.034 [#]

注:同一时间内,与对照组相比, * $P<0.05$;与 BLM 组相比, [#] $P<0.05$ 。

Note. At the same time, compared with the control group, * $P<0.05$. Compared with the BLM group, [#] $P<0.05$.

炎症反应在肺的纤维化过程中发挥重要作用,由于炎症细胞的聚集导致肺泡壁和气道的受损,继而出现的纤维化使肺发生不可逆重建^[9-10]。TGF- β 1 是肺纤维化形成的关键因子,它能够促进肺泡上皮细胞发生上皮细胞间质转化,促进成纤维细胞的形成。TNF- α 可促进炎症反应和间质细胞增殖分化。IL-1 β 是一种前炎性因子,能够诱导其它炎性因子的合成。肺纤维化的发生与多种细胞因子如 TGF- β 1、IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 、NF- κ B 等的异常表达有一定关系,已有研究证明 TGF- β 1、IL-1 β 和 TNF- α 对于促进成纤维细胞的增生和肺纤维化发挥重要作用^[11]。本次研究结果与既往的研究结果一致^[12],发现在肺纤维化形成过程中,TGF- β 1、IL-1 β 和 TNF- α 的表达明显上升,给予槲皮素后,3 者水平又明显下降,说明槲皮素能够减轻肺纤维化的炎症反应。

成纤维细胞大量聚集是肺纤维化的重要病理特征,而成纤维细胞的产生主要有 3 个途径,除了肺固有的成纤维细胞发生增殖和外周血游离的成纤维细胞迁移至肺以外,最主要的就是肺上皮细胞的间质转化^[13]。因此,以间质转化为研究靶点可能会抑制肺纤维化的进程。E-cadherin 是上皮细胞的主要标志物之一,在维持细胞间的正常链接中起到重要作用,它的表达减少会释放 β -cadherin 转移至细胞核进而诱导间质转化基因的表达。 α -SMA 是平滑肌肌动蛋白的一种异构形式,主要控制细胞的收缩,它的表达是纤维化的标志,当上皮细胞发生间质转化时, α -SMA 的表达明显增加,TGF- β 1 能够促进 α -SMA 的表达^[14]。本次研究结果提示:槲皮素能够逆转 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞对 E-cadherin 表达的抑制,同时能够下调发生间质转化后 α -SMA 的表达,说明槲皮素能够抑制 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞发生间质转化。

氧化抗氧化平衡失调可能是肺组织纤维化的机制之一。还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶(NOX)在生理状态下呈低表达、低活性状态,当机体发生疾病时,NOX 被激活后通过产生活性氧簇介导的氧化应激反应参与疾病的发生发展。在肝纤维化初始阶段,NOX 参与调控 TGF- β 等促纤维化因子作用下细胞的活化^[15]。NOX4 是 NOX 的一个重要亚基,NOX4 诱导老年小鼠 NrF2 应答的能力损伤,导致肺组织更容易发生纤

维化^[16]。自噬是真核生物中长周期蛋白降解的重要途径,在细胞的整个生命周期中扮演重要角色。自噬蛋白 P62(也称为 SQSTM1 蛋白)是检测自噬水平的标志物,当细胞自噬活性受到抑制时,P62 蛋白在细胞内大量聚集,引发一系列生理病理结果。本研究结果发现 NOX4 的蛋白表达随着肺纤维化的严重程度增加而呈进行性升高,证明 NOX4 的促纤维化效应,同时说明 NOX4 不仅参与早期肺细胞损伤,而且在肺纤维化的形成阶段可能发挥非常重要的作用。研究结果中,BLM 组 P62 蛋白表达明显高于正常对照组,BLM+QUE 组 P62 蛋白表达较 BLM 组明显降低,说明自噬不足参与了肺纤维化的过程,同时也证明槲皮素能够下调自噬抑制肺纤维化大鼠的 P62 蛋白表达,通过抑制 NOX4-P62 信号途径,激活自噬,干预肺纤维化,减轻肺纤维化的症状。

综上所述,博来霉素能够诱导大鼠发生肺纤维化,槲皮素能够减轻肺纤维化的炎症反应,能够抑制 TGF- β 1 诱导的人肺腺癌细胞株 A549 细胞发生间质转化,同时也能通过抑制 NOX4-P62 信号途径,激活自噬,干预肺纤维化,减轻肺纤维化的症状。但是我们的研究对象是实验大鼠,对于人体肺纤维化的实际疗效到底如何,槲皮素的适宜剂量等方面的情况还需要做进一步的研究才能确定。

参考文献:

- [1] 刘杨,朱星,徐昌君,等.补肺汤对肺纤维化小鼠肺组织中自噬相关蛋白的影响[J].中药材,2017,40(1):192-197.
- [2] David AVA, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid [J]. Pharmacognosy Rev, 2016, 10(20): 84-89.
- [3] 陈将,章小敏,叶爱菊,等.槲皮素抗肺纤维化的分子机制研究[J].中国中医药科技,2018,25(5):666-669.
- [4] 雷啟芬,张恂,赵奇慧,等.中药在 TGF- β 信号通路抑制肺纤维化中的作用研究进展[J].中国药物评价,2018,35(3):190-194.
- [5] Ji Y, Dou YN, Zhao QW, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37: 794-804.
- [6] Chuang CH, Yeh CL, Yeh SL, et al. Quercetin metabolites inhibit MMP-2 expression in A549 lung cancer cells by PPAR- γ associated mechanisms [J]. J Nutr Biochem, 2016, 33: 45-53.
- [7] Lim EJ, Heo J, Kim YH. Quercetin induces cell death by caspase-dependent and p38 MAPK pathway in EGFR mutant lung cancer cells [J]. Kosin Med J, 2016, 31(1): 30-40.

(下转第 117 页)