

· 论 著 ·

甘草酸二铵对博莱霉素致肺纤维化大鼠的治疗作用

殷宗宝, 邓超, 李英, 李海军, 陈栩栩, 程启慧

(海南省海口市人民医院重症医学科 570208)

摘要:目的 探讨甘草酸二铵治疗博莱霉素致肺纤维化大鼠的作用及其机制。方法 将清洁级大鼠 40 只随机分成对照组、博莱霉素所致大鼠肺纤维化组(模型组)、甘草酸二铵组和地塞米松(DXM)组。DXM 组和甘草酸二铵组滴注博莱霉素致肺纤维化动物模型第 28 天开始,连续 14 d 腹腔内分别注射 DXM 注射液 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和甘草酸二铵 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;第 15 天取左肺下叶用于免疫组化检测转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、 γ 干扰素(IFN- γ)表达,右肺下叶经 HE 染色病理观察。用 ELISA 双抗体夹心法测定各组大鼠血清 TGF- β_1 、白细胞介素 4(IL-4)、IFN- γ 含量。结果 (1)甘草酸二铵组与 DXM 组大鼠肺纤维化程度均较轻微;(2)模型组大鼠肺组织 TGF- β_1 染色呈强阳性反应,IFN- γ 染色较淡,而甘草酸二铵组与 DXM 组 TGF- β_1 、IFN- γ 染色及定量表达则相反($P < 0.01$);且甘草酸二铵组与 DXM 组相比,TGF- β_1 定量表达有差异($P < 0.05$)。(3)模型组大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4 含量较高,IFN- γ 含量较低;而甘草酸二铵组和 DXM 组则相反($P < 0.01$)。结论 甘草酸二铵可以下调大鼠肺组织 TGF- β_1 、IL-4 的表达,降低其血清含量;上调肺组织 IFN- γ 的表达,增加其血清含量,从而减轻肺纤维化。

关键词:肺纤维化;干扰素 II;转化生长因子 β_1 ;白细胞介素 4;博莱霉素;甘草酸二铵

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.02.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)02-0122-03

The therapeutical effect of diammonium glycyrrhizinate in rat model of pulmonary fibrosis by bleomycin

Yin Zongbao, Deng Chao, Li Ying, Li Haijun, Chen Xuxu, Cheng Qihui

(Intensive Care Unit, People's Hospital of Haikou, Hainan 570208, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutical effect of diammonium glycyrrhizinate in rat model of pulmonary fibrosis by Bleomycin. **Methods** Rats were randomly divided into 4 groups: pulmonary fibrosis group, NS group, DXM treatment group, glycyrrhizin treatment group. All rats in the treatment groups were intraperitoneal injection after 28 days when rats were produced pulmonary fibrosis, which lasted for 14 days. The treatment dose was DXM $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, glycyrrhizin dose $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. After the 15th days, Lung tissues were obtained, and the left lung were measured by immunity class TGF- β_1 , IFN- γ ; the right lung was made into slice which cell apoptosis was detected. The blood was obtained to measure TGF- β_1 , IFN- γ and IL-4 by ELISA. **Results** (1) The pulmonary alveolitis and fibrosis of glycyrrhizin group and DXM group were significantly lighter; (2) Stronger TGF- β_1 protein expression was detected in bronchiolar epitheliums, poorer IFN- γ in BLM group. But the oppositions were in glycyrrhizin group and DXM group ($P < 0.01$). The difference of TGF- β_1 was obvious between DXM group and glycyrrhizin group ($P < 0.05$). (3) The TGF- β_1 and IL-4 levels of the serum in BLM group were higher than all the treatment groups ($P < 0.01$), but the IFN- γ level in BLM group was poorer than DXM group and glycyrrhizin group ($P < 0.01$). **Conclusion** The study shows glycyrrhizin can reduce TGF- β_1 and IL-4 protein expressions and the TGF- β_1 and IL-4 levels in BLM group. But IFN- γ protein expression and the IFN- γ level were stronger in glycyrrhizin group. Those evidences suggest that glycyrrhizin has strong ability to antifibrosis.

Key words: pulmonary fibrosis; interferon type II; transforming growth factor-beta1; interleukin-4; bleomycin; diammonium glycyrrhizinate

细胞因子网络在特发性肺纤维化(IPF)的发生中发挥重要作用,这些细胞因子能影响疾病过程中纤维化的进程,一些细胞因子在调节及维持肺纤维化过程中具有决定性作用^[1]。甘草酸二铵具有较强的非特异性的抗炎作用,其抗炎作用与皮质醇类似,可减少肝细胞的水肿、坏死,同时甘草酸二铵调节内源性类固醇水平,而无盐皮质激素样不良反应^[2]。本实验根据甘草酸二铵这一药理作用探讨其对肺纤维化的治疗作用及对细胞因子的影响,以期临床防治肺纤维化奠定良好的实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂 甘草酸二铵为江苏正大天晴药业股份有限公司产品,国药准字 H10940191,生产批号 2000011504;注射用盐酸博莱霉素为日本化药株式会社产品,进口许可证号 X20000349;地塞米松磷酸钠注射液为西南药业股份有限公司产品,国药准字 H50021463,生产批号 2000020604;浓缩型兔

抗大鼠转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 抗体和 γ 干扰素(IFN- γ) 抗体为 Santa Cruz 公司产品;即用型 SABC 试剂盒(兔 IgG)和 DAB 显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术有限公司产品;大鼠 TGF- β_1 、白细胞介素 4(IL-4)和 IFN- γ ELISA 试剂盒为美国 Rapid Bio 公司产品。

1.2 动物来源及分组 健康清洁级雄性大鼠 40 只(5 周龄),合格证号:SCXK0020158,体质量(180 ± 20)g,由温州医学院实验动物中心提供;随机分为对照组、博莱霉素致肺纤维化组(模型组)、地塞米松治疗组(DXM 组)和甘草酸二铵治疗组(甘草酸二铵组)共 4 组,每组 10 只,常规喂养。

1.3 造模方法 参照文献[3]的方法,对大鼠气道内滴注博莱霉素致肺纤维化模型的方法略作改进。对照组以等量的生理盐水代替博莱霉素气管内滴注。甘草酸二铵组和 DXM 组于造模后第 28 天开始,分别给已制成的肺纤维化动物模型连续 14 d 腹腔内注射甘草酸二铵 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和地塞米松

注射液 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (浓度 5 mg/mL), 第 43 天全部处死。
1.4 标本采集 大鼠血清采集: 2%戊巴比妥腹腔内注射麻醉, 仰卧位开腹腔, 取腹主动脉近心端断端全血 $6\sim 8\text{ mL}$, 室温静置 2 h 后, $3\,000\text{ r/min}$ 离心 15 min, 取上层血清保存 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。取大鼠左肺下叶和右肺下叶 $1\text{ cm}\times 1\text{ cm}\times 1\text{ cm}$ 大小的组织, 固定于 10%甲醛溶液中, 分别用于免疫组化检测和病理组织学观察。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 普通病理观察 肺组织常规 HE 染色。肺组织切片肺泡炎按 Khalin 等^[4]标准判断。-: 无肺纤维化; +: 轻度肺纤维化, 受累面积少于全肺 20%; ++: 中度肺纤维化, 受累面积占 20%~50%; +++: 重度肺纤维化, 受累面积大于 50%, 肺泡结构紊乱。

1.5.2 肺免疫组化检测 IFN- γ 、TGF- β_1 检测按免疫组化试剂盒(SABC 法)说明书进行。TGF- β_1 在博莱霉素致肺纤维化大鼠肺组织中的不同部位表达情况定量分析, 据 IHC 染色程度分为 4 级: 不显色为阴性(-); 显色稍深于背景, 浅棕色为弱阳性(+); 显色部位与背景明显区别, 棕色为阳性(++); 显色部位深度着色, 深棕色为强阳性(+++)。肺组织 TGF- β_1 的 IHC 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, 用 Image-Pro Plus6.0 版专业图像分析软件处理结果, 以累积光密度值(OD)表示 TGF- β_1 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。IFN- γ 在博莱霉素致肺纤维化大鼠肺组织中的不同部位表达情况定量分析方法与 TGF- β_1 的定量分析方法相同。

1.5.3 大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4、IFN- γ 的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法, 按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 资料采用 SPSS11.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 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。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理变化 普通病理观察: 对照组未出现明显的病理变化(封 3 图 1)。模型组肺泡壁增厚, 肺纤维化程度重, 肺泡结构破坏, 肺泡腔消失(封 3 图 2)。甘草酸二铵组肺泡腔内残留少量炎性细胞, 肺组织结构比较完整, 无肺纤维化形成(封 3 图 3)。DXM 组肺组织病理变化基本同甘草酸二铵组。对照组大鼠几乎无肺炎及肺纤维化发生。模型组造模后第 43 天肺纤维化广泛形成; 甘草酸二铵组和 DXM 组比模型组大鼠肺纤维化发生率, 且程度轻, 见表 1。

表 1 各组大鼠肺纤维化分级

组别	<i>n</i>	肺纤维化分级(<i>n</i>)			
		-	+	++	+++
对照组	10	0	0	0	0
模型组	10	0	0	4	6
DXM 组	10	5	4	1	0
甘草酸二铵组	10	6	4	0	0

2.2 肺组织 TGF- β_1 和 IFN- γ 的表达 对照组只有较大血管、支气管壁的平滑肌细胞 TGF- β_1 呈中度阳性反应, 其余细胞均为弱阳性反应。模型组病变区有少许炎症细胞, 肺泡间质中 TGF- β_1 阳性反应的成纤维细胞、肌纤维母细胞等间质细胞

明显, 阳性反应增强, 并可见沉积的细胞外间质呈片块状、粗条索状阳性着色(封 3 图 4); 甘草酸二铵组和 DXM 组 TGF- β_1 阳性反应细胞较少, 基本为弱阳性反应(封 3 图 5)。模型组细胞间质 IFN- γ 阳性反应较弱, 而甘草酸二铵组和 DXM 组 IFN- γ 阳性反应较强(封 3 图 6), 见表 2。

表 2 肺内间质 TGF- β_1 和 IFN- γ 的定量表达(OD, $\bar{x}\pm s$)

组别	TGF- β_1	IFN- γ
对照组	$13.47\pm 6.86^{\bullet}$	$11.99\pm 6.92^{\bullet}$
模型组	18.07 ± 5.81	9.42 ± 3.67
DXM 组	$10.50\pm 5.15^{\bullet}$	$13.85\pm 7.48^{\bullet}$
甘草酸二铵组	$13.60\pm 5.90^{\bullet\star}$	$14.49\pm 5.79^{\bullet}$
<i>F</i>	11.24	3.45
<i>P</i>	0.000	0.018

$^{\bullet}$: $P<0.01$, 与模型组比较; * : $P<0.05$, 与 DXM 组比较。

2.3 大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4 和 IFN- γ 含量 各组大鼠血清标本 TGF- β_1 、IL-4 和 IFN- γ 含量见表 3。模型组大鼠血清 IL-4 和 TGF- β_1 含量高于其他组, DXM 组与甘草酸二铵组血清 TGF- β_1 含量相比, 差异无统计学意义($P=0.169$)。DXM 组、甘草酸二铵组血清 IL-4 含量两两相比差异也无统计学意义($P>0.05$)。甘草酸二铵组血清 IFN- γ 含量最高, 但与 DXM 组相比差异无统计学意义($P=0.389$), 两组与模型组相比差异有统计学意义, P 值分别为 0.000、0.001。

表 3 各组大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4 和 IFN- γ 含量($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=10$)

组别	TGF- β_1	IL-4	IFN- γ
对照组	$0.71\pm 0.26^{\bullet}$	$11.31\pm 3.60^{\bullet}$	$53.89\pm 28.38^{\bullet}$
模型组	1.55 ± 1.06	27.27 ± 15.97	11.33 ± 10.49
DXM 组	$0.95\pm 0.50^{\bullet}$	$16.08\pm 5.59^{\bullet}$	$54.48\pm 23.83^{\bullet}$
甘草酸二铵组	$0.48\pm 0.14^{\bullet\star}$	$8.73\pm 4.20^{\bullet\star}$	$63.47\pm 19.93^{\bullet\star}$
<i>F</i>	3.99	4.52	7.85
<i>P</i>	0.017	0.014	0.001

$^{\bullet}$: $P<0.01$, 与模型组比较; * : $P>0.05$, 与 DXM 组比较。

3 讨 论

TGF- β_1 是一种调节细胞活动的多功能调节肽, 在纤维化大鼠肺内主要由肺泡巨噬细胞分泌, 它能够从周围组织中募集成纤维细胞并能刺激未成熟成纤维细胞增生和分化^[4-5]。还能刺激成纤维细胞大量合成胶原蛋白 I、III、IV 型, 尤其是 IV 型胶原蛋白, 以增加肺间质的胶原成分, 同时还可抑制胶原蛋白酶及纤溶酶原激活物的合成, 增加蛋白酶抑制物的形成, 以减少肺间质细胞外基质的降解, 造成细胞外基质调控失衡, 引起肺纤维化。

IL-4 一方面激活 T 淋巴细胞分化为 Th2 并促使其产生 IL-4、IL-5, 这些细胞因子再次作用于 T 淋巴细胞, 并抑制 Th1 细胞形成和分泌 IL-2、IFN- γ 和 TNF- β 等细胞因子; 另一方面诱导成纤维细胞合成胶原, 刺激细胞外基质蛋白的表达, 调节细胞的增殖和分化, 并在调节炎症反应和细胞介导的免疫应答方面发挥重要作用^[6]。

IFN- γ 可抑制 Th0 细胞向 Th2 细胞转化, 同时抑制 Th2 细胞合成和分泌细胞因子如 IL-4、IL-5 等, 削弱 IL-4 使成纤维

细胞活化为具有纤维化活性的肌成纤维细胞这一效应,从而拮抗其致纤维化活性。它对细胞外基质蛋白,如胶原、纤维连接蛋白等的生成也有显著的抑制作用。有实验证明 IFN- γ 可以下调小鼠巨噬细胞中 TGF- β_1 的过度表达,从而下调前胶原的表达,使间质中胶原积聚减少^[7]。因此,细胞因子网络能影响 IPF 疾病过程中成纤维细胞的活化、增殖及胶原的沉积^[3]。

甘草酸二铵是从药用植物甘草根、茎中提取的一种有效的活性成分,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^[8]。有研究表明甘草酸二铵可以抑制活化的巨噬细胞分泌炎症因子,如 IL-4、TGF- β_1 等^[9];还可以抑制嗜酸性粒细胞活化趋化因子的分泌,而嗜酸性粒细胞活化趋化因子可以募集嗜酸性粒细胞并促进其分泌其他的炎症因子,如 IL-4、IL-5、TGF- β_1 等^[10]。本实验结果显示,甘草酸二铵组大鼠 HE 染色显示细胞基膜完好,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小于模型组;免疫组化检测表明肺组织内 TGF- β_1 阳性反应细胞较少,基本为弱阳性反应,强度和范围显著小于模型组,这与叶进燕等^[2]报道类似;而 IFN- γ 阳性反应细胞较多,较模型组表达明显。甘草酸二铵组大鼠血清中 TGF- β_1 、IL-4 含量明显较模型组低,而 IFN- γ 则相反。因此本实验结果表明甘草酸二铵可以促进大鼠肺组织分泌 IFN- γ ,抑制 IL-4、TGF- β_1 的生成,具有较强的抗肺纤维化作用。虽然甘草酸二铵组与 DXM 组相比在以上因子的表达方面差异无统计学意义,但甘草酸二铵无盐皮质激素样不良反应。

参考文献:

[1] Lukacs NW, Hogaboam C, Chensue SW, et al. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis[J]. Chest,2007,120(1 Suppl):S5-8.
[2] 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.

[3] Luppi F, Cerri S, Beghe B, et al. Corticosteorid and immunomodulatory agents in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Res Pir Med,2004,98(11):1035-1044.
[4] Khalin N, Berezay O, Sporn M, et al. Macrophage production of transforming growth factor β_1 and collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation [J]. J Exp Med, 2005,170(3):723-737.
[5] Denis M, Ghadirian E. Transforming growth factor- β generated in the course of hypersensitivity pneumonitis: contribution to collagen sythesis[J]. Am J Respir Cell Biol, 2004,7(2):156-160.
[6] Paul WE. Interleukin-4; a prototypic immunoregulatory-lymphokine[J]. Blood,2001,77(9):1859-1870.
[7] Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, et al. Molecular mechanisms of TGF(beta) antagonism by interferon- γ and cycloporine A in lung fibrosis[J]. Chest,2001,15(3):797-806.
[8] 丁旭春,王新华,王真. 复方甘草甜素治疗博来霉素致肺纤维化大鼠的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2008,17(27):4237-4238.
[9] Kato T, Horie N, Hashimoto K, et al. Bimodal effect of glycyrrhizin on macrophage nitric oxide and prostaglandin E2 production[J]. In Vivo,2008,22(5):583-586.
[10] Javaprakasam B, Duddaqa S, Wang R, et al. Licorice flavonoids inhibit evtaxin-1 secretion by human fetal lung fibroblasts in vitro[J]. J Agric Food Chem,2009,57(3):820-825.

(收稿日期:2010-01-25 修回日期:2010-07-01)

(上接第 121 页)

参考文献:

[1] 仲召阳,刘宏鸣,王东,等. Bayes 法前列腺癌多肿瘤标志物诊断模式建立及临床意义[J]. 重庆医学,2010,39(5):527-529,532.
[2] Alvarez SM, Gómez NN, Scardapane L, et al. Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium [J]. Toxicology Letters,2004,153(3):365-376.
[3] Zeini Jahromi E, Biadri A, Assadi Y, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples[J]. Analytica Chimica Acta, 2007,585(2):305-311.
[4] 罗子国,许舸,李堆信. 镉对大鼠前列腺基细胞损伤及锌保护的超微结构观察[J]. 重庆医学,2000,29(5):407-408.
[5] Shi L, Xue DF, Xu HG, et al. Determination of Pb, Cd, Hg

and As in three sorts of chinese traditional medicine treating tumor by ICP-MS [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis,2007,27(5):1036-1037.
[6] 王洛夫,张尧,兰卫华,等. RNA 干扰沉默雄激素受体基因对前列腺癌细胞生长的抑制作用研究[J]. 重庆医学,2010,39(1):28-30.
[7] 刘崇华,黄理纳,余奕东. 微波消解电感耦合等离子体发射光谱法测定塑料中铅和镉[J]. 分析试验室,2005,24(2):66-69.
[8] Vilar-Farinas M, Barciela-Garcia J, García-Martin S, et al. Direct determination of cadmium in orujo spirit samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: comparative study of different chemical modifiers [J]. Analytica Chimica Acta,2007,591(2):231-238.
[9] 马旭,丁永生,庞艳华,等. 石墨炉原子吸收加基体改进剂测定海水中镉[J]. 分析化学,2005,33(3):343-346.

(收稿日期:2009-01-28 修回日期:2010-06-28)