

红芪黄酮在不同时间点 对肺间质纤维化模型大鼠微血管新生指标的影响

李娟, 苏韞, 张毅, 刘永琦, 舍雅莉, 程小丽, 李金田*

(甘肃中医学院敦煌医学与转化教育部重点实验室中药药理与毒理学省级重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**探讨红芪黄酮在不同时间点对肺间质纤维化模型大鼠微血管新生指标的影响。**方法:**SPF级Wistar大鼠144只,分为空白组、模型组、强的松组、红芪黄酮高、中、低剂量组,采用博来霉素气管滴入方法建立肺纤维化模型,从造模后第2天起,各药物组分别给予相应剂量药物,按时间点连续灌胃治疗14,28 d,免疫组化法观察微血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR2)表达。**结果:**14,28 d模型组大鼠肺组织VEGF、VEGFR2表达较空白组明显增强($P < 0.05$, $P < 0.01$),14 d红芪黄酮高剂量组大鼠肺组织VEGF、VEGFR2表达较14 d模型组减弱($P < 0.05$)。28 d红芪黄酮高剂量组VEGF、VEGFR2表达水平较28 d模型组减弱($P < 0.05$)。14,28 d红芪黄酮低剂量组VEGF、VEGFR2表达较28 d模型组相近。14,28 d红芪黄酮中剂量组VEGF、VEGFR2表达介于14,28 d高剂量组与低剂量组之间,但与14,28 d模型组相较无统计学意义。**结论:**红芪黄酮抗纤维化的作用机制可能是通过抑制微血管新生相关促进因子(VEGF及VEGFR2),进而抑制了病理性微血管的生成,而达到了延缓肺纤维化的作用。

[关键词] 肺纤维化; 红芪黄酮; 微血管新生; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0129-04

[doi] 10.11653/syfy2014030129

Effects of Hedysari Radix Flavonoids in Different Time Points on Angiogenesis Index in Pulmonary Interstitial Fibrosis Rat Model

LI Juan, SU Yun, ZHANG Yi, LIU Yong-qi, SHE Ya-li, CHENG Xiao-li, LI Jin-tian*

(Gansu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation of Ministry of Education, Provincial Key Laboratory of TCM Pharmacology and Toxicology, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Hedysari Radix flavonoids in different time points on angiogenesis index in the pulmonary interstitial fibrosis rat model. **Method:** Hundred and forty-four SPF Wistar rats were distributed to blank group, model group, prednisone group, Hedysari Radix flavonoids high, middle, low dose groups by bleomycin intratracheal instillation method to establish the model of pulmonary fibrosis. From the second day after modeling, the corresponding drugs were given to each group, ig for 14 days or 28 days. Immunohistochemistry method was used to observe the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR2). **Result:** Model groups 14, 28 days VEGF and VEGFR2 increased significantly when compared with the control group. Compared with 14 d model group, high dose flavonoids group in VEGF and VEGFR2 expression decreased ($P < 0.05$). Compared with 28 d model group, high dose flavonoids group in VEGF and VEGFR2 expression decreased significantly ($P < 0.05$). Fourteen, 28 d low dose groups had no

[收稿日期] 20130612(005)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(30960037/C020409);2004年教育部春晖计划项目(Z2004-1-620039);2010年度甘肃中医学院中青年基金(2010-2)

[第一作者] 李娟, 学士, 副教授, 从事中医方剂配伍规律及临床应用研究, Tel:0931-8765409, E-mail: gsljjuan@sina.com

[通讯作者] *李金田, 硕士, 教授, 博导, 从事中医临床基础研究和教学, Tel:0931-8765788, E-mail: ljt@gszy.edu.cn

significant difference with the 28 d model group, in VEGF and VEGFR2 expression. 14, 28 d middle dose groups in expression of VEGF and VEGFR2 were between 14, 28 d high dose group and low dose group, and had no statistical significance with 14 d, 28 d model group. **Conclusion:** The anti fibrosis mechanism of Hedysari Radix flavonoids was probably through inhibiting angiogenesis related factor VEGF and VEGFR2 to inhibit the formation of pathological angiogenesis resulting in the delayed pulmonary fibrosis.

[**Key words**] pulmonary fibrosis; Hedysari Radix flavonoids; neovascularization; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor

微血管的损伤、新生及调控障碍在纤维化相关疾病的研究中越来越受到人们的重视,本文旨在研究红芪黄酮在不同时间点肺间质纤维化模型大鼠微血管新生指标内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR2)表达的影响,以期探讨红芪黄酮在肺间质纤维化治疗中的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 144 只,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,由甘肃中医学院科研实验中心提供。实验动物质量合格证编号 SCXK(甘)2011-0001-0000614;动物实验设施使用证编号 SCXK(甘)2011-0001-0000362。

1.2 试剂 注射用盐酸平阳霉素(哈尔滨博莱霉素有限公司,批号 120727);羧甲基纤维素钠(天津市大茂化学试剂厂,批号 110311);戊巴比妥钠(北京化学试剂公司,批号 101021)醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 110810)浓缩型 DAB 试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司, K1266071);VEGF 检测试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司, K2311);VEGFR2 检测试剂盒(南京巴傲得生物技术有限公司,360692)二抗 SP-9001 生物素标记山羊抗兔 IgG 检测试剂盒(中杉金桥生物技术有限公司,12122A11)。

1.3 药物 药材选用甘肃地道药材红芪,由甘肃中医学院科研实验中心药物制剂实验室提取、分离、鉴定(纯度达到 50% 以上)。配药浓度:红芪黄酮高、中、低质量浓度为 2.25,1.50,0.75 g·L⁻¹。

1.4 仪器 CX21 型生物显微镜(日本 OLYMPUS);山东易创 MiE 图像处理系统(山东易创电子有限公司);成都泰盟 BI-2000 医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 大鼠 144 只,雌雄各半,适应性喂养 3 d 后,按照随机数字表法分为空白组、模型组、强的松组、红芪黄酮高、中、低剂量组,每组 24 只,第 14,28 天 2 个时间点取材,每个时间点每组 12 只,SPF 常规

饲养。

2.2 动物模型制备 适应性饲养动物 3 d 后,参照文献方法^[1-3]一次性气管内注入等体积博来霉素生理盐水溶液 5 mL·kg⁻¹复制肺纤维化模型。

2.3 给药方案 从造模后第 2 天起,每日上午灌胃给药 1 次,按时间点分别连续灌胃治疗 14,28 d,持续到处死动物的前 1 d。各治疗组给药剂量按照临床公斤体重剂量倍数换算的理论,同时结合文献以及可比性原则确定本实验的给药剂量,红芪黄酮给药剂量高、中、低剂量(22.5,15,7.5 mg·kg⁻¹);红芪黄酮临用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制相应浓度的溶液,强的松组给予醋酸泼尼松片,给药剂量为 3 mg·kg⁻¹,临用前以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制。模型组和空白组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 1 mL·100 g⁻¹灌胃。

2.4 动物标本采集 各组大鼠于给药 14,28 d 分 2 次采集标本并进行相关指标检测,末次给药后,各组大鼠禁食不禁水 24 h,ip 麻醉,剪开大鼠胸腔,小心分离肺组织,剪取右肺中叶组织制备病理切片后,进行 Masson 染色,免疫组化法检测 VEGF、VEGFR2。

2.5 病变分级及图像处理 参照 Szapiel 等^[4]方法确定肺纤维化(0~3 级)的程度;血管内皮生长因子(VEGF)及 VEGFR2 表达计量方法:将免疫组化染色的切片置于 CX21 型 Olympus 正置显微镜和 Olympus 显微数码 CCD 下,每组动物选取 5 张切片,每张切片随机选取 5 个不重叠的视野,在 400 倍镜下,进行图像采集。然后采用成都泰盟 BI-2000 医学图像分析系统进行图像分析,大鼠肺组织切片微血管新生相关促进因子免疫组化染色阳性表达为棕黄色细颗粒状,测定各自阳性表达的累积光密度值的总和(IA)。

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,将实验数据所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 各组大鼠肺纤维化分级比较 空白组大鼠肺

组织无纤维化的表现;模型组肺纤维化程度逐渐加深,28 d时肺纤维化达到高峰,与空白组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);强的松组各肺纤维化分级与模型组相较均减少,但无统计学意义;红芪黄酮高剂量组14,28 d肺纤维化分级与模型组相较,差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠肺纤维化分级比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肺纤维化分级/级	
		14 d	28 d
空白	-	0	0.18 ± 0.40
模型	-	1.75 ± 0.75 ²⁾	2.17 ± 0.72 ²⁾
强的松	3.0	1.58 ± 0.79	2.09 ± 0.70
红芪黄酮	22.5	1.18 ± 0.40 ³⁾	1.40 ± 0.70 ⁴⁾
	15	1.60 ± 0.70	2.18 ± 0.60
	7.5	1.67 ± 0.65	2.27 ± 0.65

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 对肺组织微血管内皮 VEGF 及其受体 VEGFR2 表达的影响 14 d 模型组大鼠肺组织 VEGF, VEGFR2 表达较 14 d 空白组增强($P < 0.05$, $P < 0.01$); 14 d 强的松组大鼠肺组织 VEGF, VEGFR2 表达与 14 d 模型组相近; 14 d 红芪黄酮高剂量组大鼠肺组织 VEGF, VEGFR2 表达较 14 d 模型组减弱($P < 0.05$)。28 d 模型组 VEGF, VEGFR2 仍维持较高表达水平,与 28 d 空白组比较显著增强($P < 0.01$, $P < 0.05$); 28 d 强的松组 VEGF, VEGFR2 表达较 28 d 模型组相近。28 d 红芪黄酮高剂量组 VEGF, VEGFR2 表达水平较 28 d 模型组减弱($P < 0.05$)。见表2~3。

表2 14 d 各组大鼠 VEGF, VEGFR2 (IA) 比较

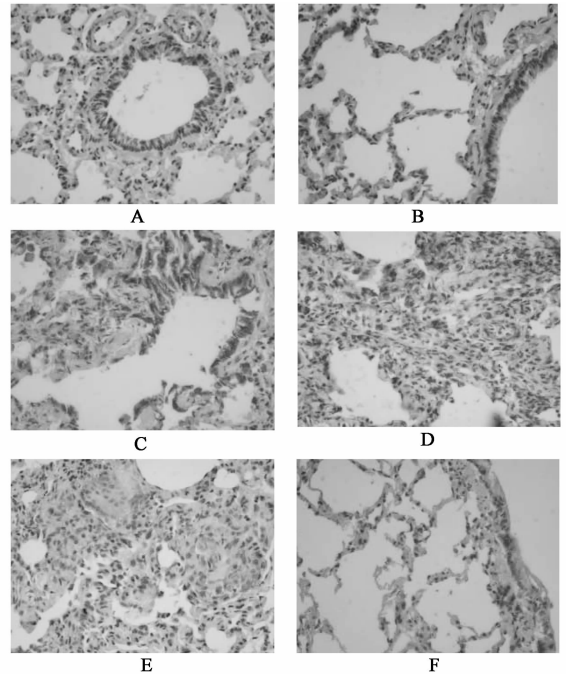
组别	剂量/mg·kg ⁻¹	VEGF, VEGFR2 (IA) 比较	
		VEGF	VEGFR2
空白	-	8.600 ± 0.083	13.04 ± 0.426
模型	-	27.34 ± 1.663 ¹⁾	22.45 ± 0.7912 ²⁾
强的松	3.0	19.47 ± 1.146	17.70 ± 0.393
红芪黄酮	22.5	11.98 ± 0.760 ³⁾	16.82 ± 0.584 ³⁾
	15	18.18 ± 1.0467	17.99 ± 0.123
	7.5	22.83 ± 1.579	17.91 ± 0.550

空白组大鼠肺组织 VEGF, VEGFR2 呈弱表达,细胞着色浅;模型组大鼠肺组织 VEGF, VEGFR2 表达较强,细胞着色较深,且随着纤维化形成过程中细胞数目的增加,VEGF, VEGFR2 表达亦相应增强;强的松组 VEGF 表达与模型组接近;红芪黄酮高剂量

表3 28 d 各组大鼠 VEGF, VEGFR2 (IA) 比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	VEGF, VEGFR2 (IA) 比较	
		VEGF	VEGFR2
空白	-	10.85 ± 0.342	11.56 ± 0.347
模型	-	27.22 ± 0.915 ¹⁾	24.31 ± 0.657 ¹⁾
强的松	3.0	22.35 ± 0.726	18.07 ± 0.799
红芪黄酮	22.5	17.79 ± 1.180 ²⁾	14.47 ± 0.298 ²⁾
	15	19.16 ± 0.543	17.56 ± 0.994
	7.5	22.74 ± 0.791	19.00 ± 0.660

组 VEGF, VEGFR2 表达强度与空白组接近;红芪黄酮中剂量组 VEGF, VEGFR2 表达介于红芪黄酮高剂量与低剂量之间;红芪黄酮低剂量组 VEGF, VEGFR2 表达与模型组相近(见图1)。



A, B. 空白组; C, D. 模型组; E, F. 红芪黄酮 22.5 mg·kg⁻¹ 组
图1 红芪黄酮给药28 d对肺间质纤维化大鼠 VEGF(A, C, E) VEGFR2(B, D, F) 蛋白表达的影响(免疫组化染色, ×40)

4 讨论

肺组织病理形态学改变是最直观的疗效衡量标准,本次实验通过对各组大鼠肺组织 Masson 染色,镜下观察显示博莱霉素所致肺纤维化大鼠随时间推移,肺泡间质、小支气管、细小支气管及其周围胶原纤维明显增多;14 d 模型组胶原纤维分布于小支气管、小血管周围,肺泡间质胶原纤维呈小片状或束状分布;28 d 模型组大量胶原纤维环绕于支气管、小血管周围,胶原增生,延伸向肺间质,于间质沉积,呈片状分布,肺组织正常结构破坏。红芪黄酮高剂量组随时间推移,胶原纤维呈逐渐增多趋势,胶原纤维

沉积于支气管壁、肺间质、小血管壁和肺间隔等处,呈散在分布,少数呈小片状分布,但胶原纤维分布比模型组明显减少。显示此次造模是成功的,而红芪黄酮高剂量具有一定的治疗效果。

相关的国内外研究及本次实验已证实,微血管新生在肺纤维化过程中起重要作用^[5]。血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR2)是血管新生的促进因子。目前认为,VEGF对血管内皮细胞的分裂、增殖有特异性作用^[6-7]。本次实验检测肺纤维化大鼠VEGF及VEGFR2均不同程度的广泛表达于大鼠肺组织肺泡、细支气管上皮细胞、血管内皮细胞、支气管腺细胞、肺泡巨噬细胞及肺泡间质细胞;这与相关文献报道相一致^[8-9]。各期模型组大鼠肺组织VEGF及VEGFR2表达与同期空白组大鼠肺组织VEGF及VEGFR2表达相较明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明在肺纤维化过程中,促微血管生成的相关因子亦呈相关性表达,VEGF通过作用于血管内皮细胞上的受体(VEGFR2)生成大量血管,并且提高了血管的通透性,导致蛋白质渗出,促进纤维化发展^[10-11],因此抑制微血管新生过程中的相关因子表达可能会缓肺纤维化的发生。各治疗组结果显示,各期强的松组肺纤维化大鼠VEGF及VEGFR2表达与同期空白组相较无明显变化,说明强的松对大鼠肺纤维化过程中VEGF及VEGFR2的表达可能无下调作用。各期红芪黄酮高剂量组肺纤维化大鼠VEGF及VEGFR2表达与同期模型组相较显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。从趋势看表现为红芪黄酮高剂量效果最佳,中剂量组略优于强的松及红芪黄酮低剂量组,可见红芪黄酮对血管新生相关因子表达的影响亦可能与剂量相关。

综上所述,红芪黄酮抗纤维化的作用机制可能是通过抑制微血管新生相关促进因子(VEGF及VEGFR2),进而抑制了病理性微血管的生成,从而达到了延缓肺纤维化的作用。

[参考文献]

- [1] 刘永琦,李金田,李娟,等. 黄芪对肺纤维化大鼠Th1/Th2型细胞因子平衡及自由基代谢的影响[J]. 免疫学杂志,2009,25(3):290.
- [2] 李金田,魏舒畅,刘永琦,等. 黄芪多糖对肺纤维化大鼠肺上皮细胞超微结构及自由基代谢的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(10):2360.
- [3] 李娟,张毅,刘永琦,等. 黄芪多糖对肺纤维化大鼠细胞因子及肺组织病理结构的影响[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1684.
- [4] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis,1979,0120:893
- [5] 潘海英. 博莱霉素诱发大鼠肺间质纤维化VEGF及其受体的表达及意义[J]. 青海医药杂志,2004,34(3):4.
- [6] Bosari S, Lee A K, Delellis R A, et al. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma[J]. Hum Pathol,1992,23(7):755.
- [7] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell,1996,86(3):353.
- [8] Fehrenbach H, KasPer M, Haase M, et al. Differential immunolocalization of VEGF in rat and human adult lung, and in experimental rat lung fibrosis: light, fluorescence, and electron microscopy[J]. Anat Rec, 1999,254(1):61.
- [9] 徐佳波. 肺纤维化和新生血管[J]. 国外医学:分册,2006,33(3):102.
- [10] Frankel S K, Cosgrove G P, Cha S I, et al. Riches DW: TNF- α sensitizes normal and fibrotic human lung fibroblasts to fas-induced apoptosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2006,34(3):293.
- [11] 郑金旭,许清管,淑红,等. 柴胡皂甙d干预肺纤维化VEGF/PEDF表达的实验研究[J]. 天津医药,2012,49(8):796.

[责任编辑 聂淑琴]