

# 甘草查尔酮 A 通过调节 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路抑制小鼠肺纤维化

付钰<sup>1</sup>, 吴瑕<sup>2</sup>, 陈随清<sup>1\*</sup>

(1. 河南中医药大学 药学院, 呼吸病协同创新中心, 郑州 450046;  
2. 河南省人民医院, 郑州 450000)

**[摘要]** **目的:**探索甘草查尔酮 A 对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导小鼠肺纤维化的治疗作用,并探讨其相关的作用机制。**方法:**本研究将 30 只小鼠随机平均分为 5 组,分别为正常组、模型组、甘草查尔酮 A 高、低剂量组、吡非尼酮组。气管滴注 BLM 5 mg·kg<sup>-1</sup>建立小鼠肺纤维化模型,次日治疗组灌胃给予甘草查尔酮 A 15,30 mg·kg<sup>-1</sup>,吡非尼酮 300 mg·kg<sup>-1</sup>,其余组给予生理盐水灌胃,28 d 后处死小鼠。取肺组织称质量,进行肺组织苏木素-伊红(HE)染色和马松(Masson)染色、测定肺组织羟脯氨酸含量、通过蛋白免疫印迹法(Western blot)分析肺组织  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),I 型胶原蛋白(Collagen I),纤连蛋白(FN)以及 p-Smad2/3 与 Smad2/3 表达水平。并考察甘草查尔酮 A 对转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导成纤维细胞 MRC-5 细胞活化作用。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠可见肺泡结构有不同程度的破坏,肺间质增生,有炎细胞浸润和胶原纤维增生形成,肺组织中羟脯氨酸, $\alpha$ -SMA, Collagen I 蛋白表达水平明显增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,各治疗组小鼠的肺指数明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),肺损伤与纤维化程度显著改善;肺组织的羟脯氨酸含量, $\alpha$ -SMA, Collagen I 蛋白表达水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );肺组织的 Smad2/3 蛋白磷酸化水平显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );另外,甘草查尔酮 A 与吡非尼酮显著抑制 TGF- $\beta$  诱导 MRC-5 细胞转化,明显降低  $\alpha$ -SMA, FN 蛋白表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**甘草查尔酮 A 可能通过阻断 Smad 相关信号通路,抑制成纤维细胞转化等发挥抗纤维化作用。

**[关键词]** 甘草查尔酮 A; 肺纤维化; 成纤维细胞; 转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) /Smad

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)04-0094-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190402

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1751.025.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-05 15:02

## Licochalcone A in Inhibiting Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis Through TGF- $\beta$ /Smad Pathway

FU Yu<sup>1</sup>, WU Xia<sup>2</sup>, CHEN Sui-qing<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;  
2. Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the therapeutic effect of licochalcone A (Lico A) on pulmonary fibrosis (PF). **Method:** Thirty mice were divided into five group, namely sham, model, Lico A (15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>) and pirfenidone (300 mg·kg<sup>-1</sup>) groups. All of the groups except for sham group were intratracheally given bleomycin (BLM, 5 mg·kg<sup>-1</sup>). The sham group was given normal saline. On day 2, the mice were treated with Lico A and pirfenidone, respectively. On day 28, all of the mice were put to death. Then, lung tissues were collected and

**[收稿日期]** 20180716(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81703680);河南省基础与前沿技术研究计划项目(162300410104)

**[第一作者]** 付钰,博士,讲师,从事中药材质量控制研究,Tel: 0371-65676656,E-mail: fuyucpu@163.com

**[通信作者]** \* 陈随清,博士,教授,从事中药材质量控制研究,Tel:0371-65676686,E-mail: suiqingchen0371@163.com

weighted. Pathological changes in lung tissue were measured by htoxylin eosin (HE) and Masson staining. The  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), Collagen I, fibronectin p-Smad2/3 and Smad2/3 were analyzed by Western blot. Then, transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )-induced MRC-5 cells were employed for evaluating the inhibitory activity of Lico A *in vitro*. **Result:** Compared with normal group, several pathological changes, including alveolar space collapse, emphysema, infiltration of inflammatory cells, and collagen deposition were observed in the BLM-treated mice, and these pathological changes were markedly attenuated by subsequent treatment with Lico A. Lico A could significantly inhibit BLM-induced up-regulation of  $\alpha$ -SMA and Collagen I and phosphorylation of Smad2/3 in lung tissues of mice ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, Lico A could significantly suppressed TGF- $\beta$ -induced  $\alpha$ -SMA and fibronectin expression in MRC-5 cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The preliminary mechanisms of the anti-fibrosis effect of Lico A may inhibit TGF- $\beta$ /Smad pathway.

[ **Key words** ] licochalcone A; pulmonary fibrosis; fibroblast; transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad

肺纤维化(PF)是由多种病因引起的肺泡间质性炎性反应及进行性细胞外基质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<sup>[1]</sup>。PF患病率呈逐年上升趋势,随着年龄的增加而增加,男性多于女性,确诊后的平均生存时间是2.8~4.2年<sup>[2]</sup>。PF的发病机制仍不清楚,但是胶原蛋白是细胞外基质的主要成分,其过量积聚是PF的特征性病理变化。肺内的胶原成分主要为I型胶原等,它们常作为反映PF的指标<sup>[3]</sup>。转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )被认为是最关键的致纤维化因子,参与PF发生发展的多个环节,而其功能发挥依赖于Smad蛋白的信号转导及调控<sup>[1-3]</sup>。目前PF的临床治疗药物包括皮质类固醇激素、免疫抑制剂以及新药如吡非尼酮等,但其疗效仍不理想,且副作用明显<sup>[2-4]</sup>。因此,急需寻找治疗PF的新手段。

中医提出从肺痿论治PF的思路<sup>[5]</sup>,《金匮要略》论治虚寒肺痿,温扶阳气用甘草干姜汤<sup>[6-8]</sup>。陆国辉等<sup>[9]</sup>发现甘草干姜汤能够减轻博来霉素导致的大鼠模型PF程度,可见肺痿论治的中药方剂具有一定抗PF效果。随着中药现代化进程,对单味中药的作用以及临床特征的研究逐渐深入,甘草以其疗效温和、作用显著,成为防治PF之药物之一<sup>[10]</sup>。

甘草为豆科甘草属植物乌拉尔甘草、光果甘草和胀果甘草的干燥根和根茎<sup>[11]</sup>,是《伤寒论》中使用频率最高的药物,主要功效主治包括甘以调之,如调和营卫的桂枝汤;甘以补之,如温中健脾的小建中汤、桂枝人参汤;益气复脉,如桂枝甘草汤、炙甘草汤;除热解毒,代表方如甘草汤、桔梗汤<sup>[12]</sup>。甘草查尔酮A(Lico A)是甘草的一种酚类查尔酮化合物,

被视为胀果甘草的种属特异性成分,甘草中分离鉴定出的查尔酮类化合物中Lico A的含量较高。目前研究证实Lico A具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗利什曼原虫病、抗肿瘤、免疫促进和雌激素样等多种生物活性,在食品和医药工业中有广泛的用途<sup>[13-14]</sup>。另外,许多学者发现Lico A具有改善肺部病变的功效,CHU等<sup>[15-16]</sup>发现Lico A可明显改善脂多糖诱导的急性肺损伤和过敏性气道炎症。任倩倩等<sup>[17]</sup>发现Lico A抑制细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)/核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)途径减轻吸烟诱导的小鼠急性肺损伤。但对于Lico A对于PF及TGF- $\beta$ /Smad的作用尚未有研究报道。本研究以博来霉素气管滴注诱导小鼠PF为模型,考察Lico A对PF小鼠的病理改变、胶原沉积以及Smad信号通路的作用;并探索Lico A对TGF- $\beta_1$ 诱导成纤维细胞MRC-5转化的初步机制,从而探究甘草活性成分Lico A对PF的治疗作用,为其临床开发应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** ICR小鼠30只,6~8周龄,体质量18~22g,清洁级,由河南省实验动物中心提供,合格证号SCXK(豫)2016-0012,予常规颗粒饲料喂养,自由饮水,动物实验部分均获得河南中医药大学动物伦理委员会的批准(批准编号DWL2016080004)。

**1.2 药物和试剂** 注射用盐酸博来霉素(日本化药株式会社,批号650427);吡啡尼酮(PFD)胶囊(北京康蒂尼药业有限公司,批号150603);Lico A由国家药物和生物制品检定研究所(NICBPB)提供,纯度>98%,溶解于0.5%羧甲基纤维素钠后制成混悬液;苏木素-伊红(HE)染色试剂,马松(Masson)染色试剂盒,ECL超敏发光液,噻唑蓝(MTT,北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20150623,

20150624, 20160604, 20150825); 苯甲基磺酰氟 (PMSF), trizol, 逆转录试剂盒, SYBR Green Master Mix (美国 Thermo Scientific 公司, 批号分别为 1704532, 28321, 00567301, 1702041); TGF- $\beta_1$  抗体 (美国 Abcam 公司, 批号 ab92592); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GADPH) 抗体 (美国 CST 公司, 批号 230419);  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -SMA), I 型胶原 (Collagen I), 纤连蛋白 (FN), Smad2/3, p-Smad2, p-Smad3 抗体 (美国 Cell Signal 公司, 批号分别为 17023, 24069, 18037, 34079, 71092, 39012); 山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G-辣根过氧化物酶 (HRP) (美国 Santa Cruz 公司, 批号 01234901), 羧脯氨酸 (HYP) 试剂盒 (碱水解法, 南京建成生物工程研究所, 批号 20160302)。

**1.3 仪器** DP70 型显微镜及显微照相系统 (日本 Olympus 公司); Image-Pro<sup>®</sup> Plus 6.0 专业图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司); Primo R 型低温高速离心机 (德国 Heraeus 公司); NanoDrop2000 型紫外-可见分光光度计 (美国 Thermo Scientific 公司); GelDoc XR Biorad 型全能型凝胶成像分析仪, Mini-PROTEAN 型垂直电泳槽, TRANS-BLOT CELL 型湿转仪 (美国 Bio-Rad 公司); ELX800UV 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); TissueLyser II 样品破碎系统 (德国 Qiagen 公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备与分组给药** 将 30 只 ICR 小鼠随机分为正常组, 模型组, Lico A 低、高剂量组和吡非尼酮组。后 4 组小鼠通过腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后, 固定于操作板上, 采用微量注射器滴注博来霉素 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。为消除手术创伤及溶剂对实验结果的影响, 正常组小鼠麻醉后气管滴注同等量的生理盐水。然后将小鼠直立并旋转, 以使药液在肺内分布均匀<sup>[18]</sup>。次日, 正常组与模型组小鼠给予生理盐水灌胃, Lico A 干预组分别予  $15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Lico A 灌胃, 阳性药组给予  $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  吡非尼酮灌胃, 每天 1 次<sup>[19-20]</sup>。第 28 天, 开胸取肺组织称质量, 截取右肺组织, 液氮中冻存, 用于 HYP 含量和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测。左肺内灌注 10% 中性甲醛液后置于 10% 中性甲醇中固定 24 h 以上, 石蜡包埋。

**2.2 HE 染色和 Masson 染色观察肺组织病理变化**

肺组织石蜡切片行常规 HE 染色和 Masson 染色, 光镜下观察肺组织病理学改变。参照 Szapiel 等<sup>[21]</sup>的方法用 HE 染色评定肺组织肺泡炎症程度为

0 分, 无肺组织炎; 1 分, 轻度肺组织炎, 炎性细胞浸润仅限于局部或近胸膜部, 面积小于全肺 20%; 2 分, 中度肺组织炎, 受累面积占全肺的 20% ~ 50%; 3 分, 重度肺组织炎, 受累面积 > 50%。

**2.3 肺组织 HYP 含量的测定** 肺组织适量匀浆,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 提取上清液, 通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。然后, 采用试剂盒 (碱水解法) 检测肺组织 HYP 含量, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

**2.4 细胞培养与诱导** MRC-5 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 完全培养基中, 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 当细胞密度达到 70% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化接种于 96 孔培养板内, 次日给予甘草查尔酮 A ( $2.5, 5, 10, 15, 20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h 后, 每孔加入 MTT  $20 \text{ } \mu\text{L}$  继续培养 4 h 后, 弃掉上清, 加入二甲亚砜  $150 \text{ } \mu\text{L}$ , 在 560 nm 处检测其吸光度  $A$ 。

细胞密度达到 70% ~ 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化接种至 6 孔内, 分为空白组、模型组、甘草查尔酮 A ( $5, 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组, 吡非尼酮组 ( $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 次日给予甘草查尔酮 A ( $5, 10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、吡非尼酮 ( $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与 TGF- $\beta_1$  ( $5 \text{ g} \cdot \mu\text{m} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[18]</sup> 处理 48 h, 提取细胞总蛋白。

**2.5 Western blot 检测  $\alpha$ -SMA, Collagen I, FN, Smad2/3, p-Smad2, p-Smad3 蛋白表达** 采用 RIPA 裂解液提取肺组织或 MRC-5 细胞总蛋白, 并用 BCA 法进行蛋白定量。取蛋白  $30 \text{ } \mu\text{g}$  加入上样缓冲液,  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 min, 常规制备 SDS-PAGE 胶, 上样,  $120 \text{ V}$  电压电泳 60 min, 转移蛋白至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 分别给予  $\alpha$ -SMA ( $1:1\ 000$ ), FN ( $1:1\ 000$ ), Collagen I ( $1:1\ 500$ ) 抗体, 在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下孵育过夜, 磷酸盐聚山梨酯缓冲液 (PBST) 洗膜 3 次,  $10 \text{ min}/\text{次}$ , 加入辣根过氧化物酶标记的 IgG, 室温孵育 1 h, PBST 洗膜 3 次,  $10 \text{ min}/\text{次}$ , ECL 显色、暗室曝光、扫描, 运用 Image J 软件得出灰度值。

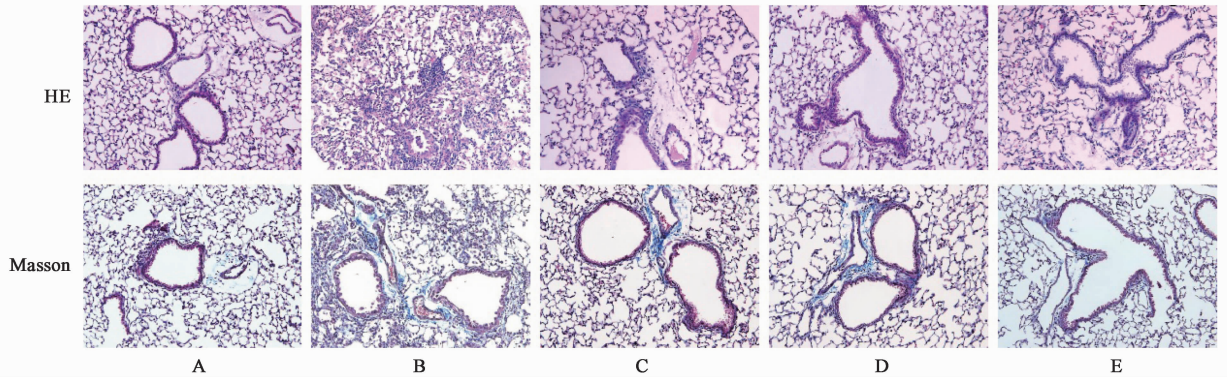
**2.6 统计学处理** 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行方差齐性检验, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析方法, 方差齐者采用最小显著差法, 方差不齐者采用 Dunnett's T3 法, 显著性水准取  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 PF 小鼠肺组织病理改变的影响** HE 染色结果显示, 正常组小鼠肺组织结构轮廓完整清晰, 肺泡壁薄且光滑, 未见炎性细胞浸润; 模型组

可见肺泡结构破坏,肺泡间隔明显增厚,实变组织内可见炎性细胞浸润;与模型组比较,Lico A 可显著改善其病理变化,肺泡结构较为完整,肺泡间隔增厚不明显,炎症明显减轻,且显著降低肺病理评分( $P < 0.01$ );吡非尼酮也可显著改善 PF 病理变化。Masson 染色结果显示,正常组肺泡腔透亮,肺泡壁未见增厚,肺泡上皮细胞结构完整,间质未见

纤维蛋白沉积;模型组肺泡隔成纤维细胞增生及胶原沉积;与模型组比较,Lico A 组肺组织结构明显完整,肺纤维蛋白显著减少;吡非尼酮也可显著抑制胶原沉积,改善病理变化。与正常组比较,模型组肺指数显著升高( $P < 0.01$ ),而 Lico A ( $15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )与吡非尼酮可明显降低肺指数( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 1,表 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. Lico A  $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;D. Lico A  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;E. 吡非尼酮组(图 2,3 同)

图 1 Lico A 对博来霉素诱导的 PF 小鼠的影响( $\times 200$ )

Fig. 1 Effects of Lico A on pulmonary fibrosis (PF) in bleomycin-exposed mice( $\times 200$ )

表 1 Lico A 对博来霉素诱导肺纤维大鼠肺病理评分,肺指数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of Lico A on pathologic score, pulmonary index of bleomycin-treated mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	病理评分/分	肺指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
正常	-	$0.167 \pm 0.043$	$4.475 \pm 0.132$
模型	-	$1.917 \pm 0.285^1)$	$6.300 \pm 0.091^2)$
Lico A	15	$0.917 \pm 0.200^4)$	$5.400 \pm 0.075^3)$
	30	$0.800 \pm 0.151^4)$	$4.925 \pm 0.077^4)$
吡非尼酮	300	$0.375 \pm 0.079^4)$	$4.650 \pm 0.159^4)$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

### 3.2 对 PF 小鼠肺组织胶原含量影响 与正常组

表 2 Lico A 对博来霉素诱导小鼠肺组织中 HYP 含量, $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Lico A on HYP content,  $\alpha$ -SMA and Collagen I expression in lung tissue of bleomycin-treated mouse( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HYP 含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	$\alpha$ -SMA/GAPDH	Collagen I/GAPDH
正常	-	$0.458 \pm 0.006$	1.000	1.000
模型	-	$0.695 \pm 0.011^2)$	$3.190 \pm 0.335^2)$	$4.634 \pm 0.489^2)$
Lico A	15	$0.564 \pm 0.013^3)$	$1.219 \pm 0.231^4)$	$2.441 \pm 0.349^3)$
	30	$0.506 \pm 0.010^4)$	$1.173 \pm 0.359^4)$	$1.861 \pm 0.164^4)$
吡非尼酮	300	$0.628 \pm 0.011^3)$	$0.861 \pm 0.169^4)$	$1.512 \pm 0.208^4)$

比较,模型组小鼠肺组织中 HYP, Collagen I 与  $\alpha$ -SMA 含量显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,Lico A ( $15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组明显降低 PF 小鼠肺组织的 HYP 水平,明显减少 PF 小鼠肺组织的 Collagen I 与  $\alpha$ -SMA 表达( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2,表 2。

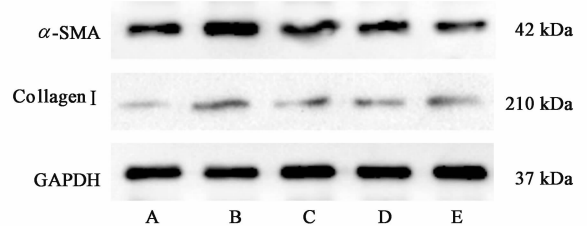


图 2 小鼠肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of  $\alpha$ -SMA and Collagen I expression in mice

**3.3 对 PF 小鼠肺组织 Smad 信号影响** 与正常组比较,模型组小鼠肺组织中 p-Smad2 及 p-Smad3 含量显著增加( $P < 0.01$ ),而 Smad2/3 无显著变化。与模型组比较,Lico A( $15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )明显抑制 PF 小鼠肺组织的 p-Smad 2/3 水平( $P < 0.05, P < 0.01$ ),而对 Smad2/3 则无显著作用。见图 3 和表 3。

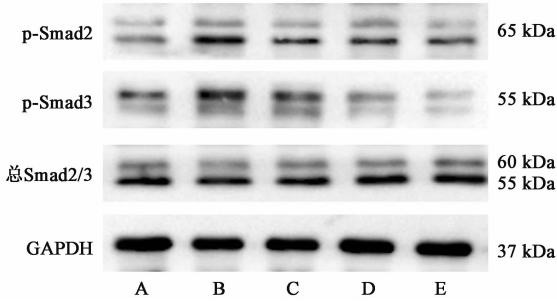


图 3 小鼠肺组织中 Smad 信号通路蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Smad signalling pathway in pulmonary fibrosis mice

**3.4 对 TGF- $\beta$  诱导成纤维细胞活化的影响** 与

正常组比较,Lico A( $2.5, 5, 10, 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )作用 48 h 后,MRC-5 细胞活力无显著改变。与正常组比较,模型组  $\alpha$ -SMA 和 FN 蛋白表达显著增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各 Lico A( $5, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组  $\alpha$ -SMA 和 FN 蛋白表达降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),说明 Lico A 可显著抑制 TGF- $\beta_1$  ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )诱导肌成纤维细胞的形成。见图 4,表 4,5。

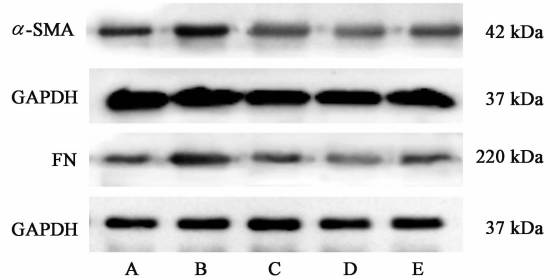


图 4 MRC-5 细胞  $\alpha$ -SMA 和 FN 蛋白表达电泳  
A. 空白组; B. 模型组; C. Lico A  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组; D. Lico A  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. 吡非尼酮组

图 4 MRC-5 细胞  $\alpha$ -SMA 和 FN 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of  $\alpha$ -SMA and FN expression in MRC-5 cells

表 3 Lico A 对博来霉素诱导小鼠肺组织中 p-Smad2/3 和 Smad2/3 蛋白表达影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Lico A on p-Smad2/3 and Smad2/3 expression in lung tissue of bleomycin-treated mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-Smad2/GAPDH	p-Smad3/GAPDH	Smad2/3/GAPDH
正常	-	1.000	1.000	1.000
模型	-	$2.991 \pm 0.198^{2)}$	$2.219 \pm 0.284^{2)}$	$0.966 \pm 0.126$
Lico A	15	$1.164 \pm 0.216^{4)}$	$1.651 \pm 0.261^{3)}$	$1.096 \pm 0.251$
	30	$1.069 \pm 0.127^{4)}$	$1.096 \pm 0.125^{4)}$	$1.209 \pm 0.306$
吡非尼酮	300	$0.971 \pm 0.141^{4)}$	$0.867 \pm 0.201^{4)}$	$0.984 \pm 0.196$

表 4 Lico A 对 MCR-5 细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Lico A on cell viability of MRC-5 cell( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力
空白	-	1.000
Lico A	2.5	$0.969 \pm 0.008$
	5	$1.010 \pm 0.032$
	10	$0.923 \pm 0.010$
	15	$0.872 \pm 0.022$
	20	$0.747 \pm 0.015^{2)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ 。

表 5 Lico A 对 TGF- $\beta_1$  诱导的 MRC-5 细胞中  $\alpha$ -SMA 和 FN 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Lico A on  $\alpha$ -SMA and FN expression in TGF- $\beta_1$ -induced MRC5 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\alpha$ -SMA/GAPDH	FN/GAPDH
空白	-	1.000	1.000
模型	-	$2.05 \pm 0.105^{2)}$	$2.367 \pm 0.138^{2)}$
Lico A	5	$1.183 \pm 0.128^{4)}$	$1.237 \pm 0.092^{3)}$
	10	$0.813 \pm 0.049^{4)}$	$0.873 \pm 0.097^{4)}$
吡非尼酮	3 000	$0.997 \pm 0.072^{4)}$	$1.173 \pm 0.152^{4)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

本研究采用博来霉素诱导小鼠 PF 模型,博来霉素是一种抗肿瘤药,具有致 PF 的副作用。用博来霉素复制 PF 动物模型,是国内外公认的 PF 造模常用方法<sup>[22-24]</sup>。结果发现 Lico A 可显著改善博来

霉素诱导的纤维化。HYP 在胶原组织中占 13.4%,弹性蛋白中含量极少,其他蛋白中均不存在,因此检测肺组织 HYP 含量常用来反映胶原沉积情况。Lico A 可显著降低纤维化肺组织中 HYP 水平,同时

抑制 Collagen I 表达。说明 Lico A 对 PF 小鼠具有明确疗效。

PF 以细胞外基质的沉积、肺组织结构的破坏为主要特点。其中,成纤维细胞的活化增殖与成纤维细胞灶的形成成为 PF 的主要病理特征,而 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在 PF 这一病理过程中发挥关键作用<sup>[25]</sup>。TGF- $\beta$  可激活 Smads 蛋白 (Smad2/3) 磷酸化,后者可与介质 Smad4 蛋白结合形成三聚体进入细胞核内,调控一系列基因表达,促进肺成纤维细胞会发生转化,成为大量表达收缩性蛋白  $\alpha$ -SMA 的肺肌成纤维细胞<sup>[22-23]</sup>。本研究结果显示 Lico A 可显著抑制 PF 小鼠肺组织中  $\alpha$ -SMA 和 CollagenI 的表达,表明其可有效抑制小鼠 PF 进展,可能抑制了成纤维细胞的活化;另外,Lico A 可明显抑制 Smad2/3 的磷酸化,对总 Smad2/3 蛋白无显著作用,说明 Lico A 可调控 TGF- $\beta$ /Smad 相关信号通路,表明其可能抑制了 TGF- $\beta$  诱导小鼠成纤维细胞活化。

肺成纤维细胞在维持肺脏的正常形态和高效气体交换中发挥重要作用,在致 PF 因素如 TGF- $\beta$  刺激下,肺成纤维细胞不断增殖并向肌纤维母细胞转分化,致使肺部结构异常重塑,导致 PF 形成<sup>[22, 25-30]</sup>。因此,以 TGF- $\beta$  诱导到人胚肺成纤维细胞 MRC-5 的肌成纤维细胞活化模型成为研究抗纤维化药物作用的关键细胞模型。本研究采用 TGF- $\beta$  诱导 MRC-5 成功高表达  $\alpha$ -SMA 和 FN,说明 MRC-5 可活化为肌成纤维细胞;给予 Lico A 处理后可显著降低  $\alpha$ -SMA 和 FN 表达,说明 Lico A 可明显抑制 TGF- $\beta$  诱导的成纤维细胞活化。

综上所述,本研究结果表明 Lico A 可通过抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路阻止成纤维细胞活化,下调细胞外基质如 Collagen I 等表达,从而发挥其治疗 PF 小鼠作用,其作用与机制仍有待进一步深入探讨。

#### [参考文献]

[1] Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, doi:10.1038/nrdp.2017.74.  
[2] Wollin L, Wex E, Pautsch A, et al. Mode of action of nintedanib in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J, 2015,45(5):1434-1445.  
[3] Leask A, Abraham D J. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response [J]. FASEB J, 2004, 18 (7): 816-827.  
[4] Kurita Y, Araya J, Minagawa S, et al. Pirfenidone inhibits myofibroblast differentiation and lung fibrosis

development during insufficient mitophagy [J]. Respir Res, 2017,18 (1):114.  
[5] 宋建平. 特发性肺纤维化的中医论治[J]. 浙江中医学院学报,1997,21(2):4-5.  
[6] 吴传清. 学习《金匱》肺痿证治的体会[J]. 泸州医学院学报,1984,6(3):13-16.  
[7] 康荻,李彧,朱曼,唐磊,等. 肺痿论治干预肺纤维化大鼠肺功能的实验研究[J]. 世界中医药,2017,12(2):390-393,397.  
[8] 李健,卢朋,张瑞贤,信富荣,等.《中医方剂大辞典》中治疗肺痿方剂的用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):1-5.  
[9] 陆国辉,李艳茹,高健美. 甘草干姜汤对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化 SIRT1 和 TGF- $\beta_1$  蛋白表达的影响[J]. 中药药理与临床,2014,30(6):25-28.  
[10] 黄云鉴,龚婕宁. 中医治疗肺纤维化方药规律的文献分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(15):206-210.  
[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86.  
[12] 李杰.《伤寒论》中甘草功效与配伍应用的规律研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013.  
[13] 赵虹,蒋江涛,郑秋生. 甘草查耳酮 A 药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(22):3814-3818.  
[14] Karkanis A, Martins N, Petropoulos S A, et al. Phytochemical composition, health effects, and crop management of liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.): a medicinal plant [J]. Food Rev Int, 2013, 34 (2): 182-203.  
[15] CHU X, CI X, WEI M, et al. Licochalcone a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. J Agric Food Chem, 2012, 60 (15):3947-3954.  
[16] CHU X, JIANG L, WEI M, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in a murine model of asthma by Licochalcone A [J]. Immunopharm Immunot,2013, 35(6):653-661.  
[17] 任倩倩,汪雨佩,赵炜,等. 甘草查耳酮 A 抑制 ERK1/2/NF- $\kappa$ B 途径减轻吸烟诱导的小鼠急性肺损伤[J]. 中国药理学通报,2016,32(5):643-651.  
[18] JI Y, DOU Y, ZHAO Q, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- $\beta$  mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway [J]. Acta Pharmacol Sini,2016,37(6):794-804.  
[19] LIU D, HUO X, GAO L, et al. NF- $\kappa$ B and Nrf2 pathways contribute to the protective effect of Licochalcone A on dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice [J]. Biomed Pharmacother,

- 2018,102:922-929.
- [20] HU J, LIU J. Licochalcone A attenuates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting NF- $\kappa$ B activation [J]. *Inflammation*,2016,39(2):569-574.
- [21] 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(4):893-899.
- [22] Cho H Y, Reddy S P, Yamamoto M, et al. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis [J]. *FASEB J*,2004,18(11):1258-1260.
- [23] 唐磊,申萌萌,朱曼,等. 右归饮对肺纤维化大鼠的疗效评价及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*,2018,24(13):93-99.
- [24] 王鹏飞,林昶,刘杨,等. 黄芪甲苷对博来霉素诱导的小鼠特发性肺纤维化自噬和焦亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2018,24(10):144-149.
- [25] HAN G, ZHOU Y F, ZHANG M S, et al. *Angelica sinensis* down-regulates hydroxyproline and Tgfb1 and provides protection in mice with radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *Radiat Res*, 2006, 165(5):546-552.
- [26] Willis B C, Borok Z. TGF- $\beta$ -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease [J]. *Am J of Physiol Lung C*, 2007, 293(3):L525-L534.
- [27] Leask A, Abraham D J. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response [J]. *FASEB J*,2004,18(7):816-827.
- [28] El Agha E, Kramann R, Schneider R K, et al. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease [J]. *Cell Stem Cell*,2017,21(2):166-177.
- [29] El Agha E, Moiseenko A, Kheirollahi V, et al. Two-way conversion between lipogenic and myogenic fibroblastic phenotypes marks the progression and resolution of lung fibrosis[J]. *Cell Stem Cell*,2017,20(2):261-273.
- [30] 庞立健,吕晓东,袁佺,等. 益气养阴活血通络法干预肺成纤维细胞 TGF- $\beta_1$ /Smads 信号传导通路的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*,2017,23(22):125-131.

[责任编辑 周冰冰]