

原花青素对矽尘致大鼠肺组织转化生长因子 β_1 和热休克蛋白 47表达的抑制作用

曹福源^{1,2}, 闫立成², 李清钊², 张艳淑², 王广增², 姚林^{1,2}

(1. 华北煤炭医学院医学实验动物中心; 2. 华北煤炭医学院预防医学系, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 探讨原花青素 (Proanthocyanidins PC) 对染尘大鼠肺纤维化进程的具体作用。方法 SPF级 SD大鼠 96只, 随机分为对照组、矽肺组、PC低剂量组、PC高剂量组 每组 24只; 采用气管内注射 SiO_2 悬液方法复制大鼠矽肺模型。染尘后第 2天 PC低剂量组按 50 mg/(kg·d) 灌胃给予 PC PC高剂量组按 500 mg/(kg·d) 灌胃给予 PC 矽肺组和对照组则给予等容生理盐水。给药开始后第 14 28 60天时每组随机处死 8只大鼠; 应用免疫组化法观察肺组织 $\text{TGF}\beta_1$ 、HSP47的表达, 并检测大鼠血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活力。结果 与对照组比较, 大鼠在染尘 14 28和 60 d时, 血清中 SOD的活力明显下降, 60 d时尤为显著; 此外, 肺组织中 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47的表达增加, 且随染尘时间增加呈现上升趋势。应用高剂量 PC干预后, 血清中 SOD活力增加 ($P < 0.05$) 在染尘 60 d时, 上升到 251.36 U/ml (矽肺组为 181.32 U/ml); PC干预组肺组织中 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47表达的升高趋势 ($P < 0.05$) 亦见恢复, 染尘 60 d时, PC高剂量组肺组织中 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47的表达分别为 24.45和 13.54 (矽肺组为 33.27和 18.70)。结论 原花青素可增强 SOD活力, 减少 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47的表达, 提示可在一定程度上缓解染尘大鼠肺纤维化进程。

关键词: 原花青素; 组织转化生长因子 β_1 ($\text{TGF}\beta_1$); 热休克蛋白 47 (HSP47); 肺纤维化; 矽肺

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2011)01-0006-04

Depression effect of proanthocyanidins on expression of pulmonary
 $\text{TGF}\beta_1$ and HSP47 in silica exposed rats

CAO Fuyuan¹, YAN Licheng², LI Qingzhao², ZHANG Yanshu², WANG Guangzeng², YAO Lin¹

(*: Animal Center for Medical Experiment North China Coal Medical College Tangshan 063000 China)

Abstract: Objective To explore the effect of proanthocyanidins (PC) on the pulmonary fibrosis in silica-exposed rats. Methods Niney-six SD rats were randomly divided into four groups: control group, silicosis group, low dose and high dose PC groups, 24 rats in each group. Silica (50 mg/ml) was given by direct tracheal instillation; PC groups were administered with PC by gastric lavage at dose of 50 mg/(kg·d) (low dose group) and 500 mg/(kg·d) (high dose group) respectively at the second day of exposure to silica. rats in control and silicosis group were administered with saline solution at the same time. Eight rats for each group were killed at the 14, 28 and 60 days after silica instillation, take the blood and lung tissue samples rapidly. The expressions of $\text{TGF}\beta_1$ and HSP47 in lung tissues were detected by immunohistochemical analysis; the activity of SOD in serum was also measured. Results Compared with that of control group, activity of SOD was decreased significantly at 28 th and 60 th days after silica exposure; the expressions of $\text{TGF}\beta_1$ and HSP47 were increased significantly with the time, while activity of SOD in high dose PC group was increased significantly ($P < 0.05$), and expressions of $\text{TGF}\beta_1$ and HSP47 in both low and high dose PC groups were decreased significantly ($P < 0.05$) compared with that in silica exposed group at the 60 th day after silica exposure. Conclusion PC administration could increase activity of serum SOD and reduce expression of $\text{TGF}\beta_1$ and HSP47 in lungs, which suggested that PC might have the effect of relieving pulmonary fibrosis caused by silica.

Key words: Proanthocyanidins (PC); transforming growth factor β_1 ($\text{TGF}\beta_1$); heat shock protein 47 (HSP47); pulmonary fibrosis; silicosis

SiO_2 粉尘引起的肺泡巨噬细胞膜和肺组织的脂质过氧化反应是导致矽肺发病的始动因素和重要原因之一。PC是植物中广泛存在的一大类多酚化合物的总称, 近年研究证实 PC具有清除自由基、抗氧化、抗突变、抗癌、抗辐射和促进细胞增殖等多方面的生物学

活性, 其种类繁多, 其中葡萄籽原花青素 (grape seed proanthocyanidin extracts GSPE) 是葡萄籽的提取物, 最具代表性。本文拟应用 GSPE进一步探讨 PC的抗纤维化作用, 以 SD大鼠为对象复制矽肺模型, 研究 PC对染尘大鼠肺组织转化生长因子 β_1 (transforming growth factor beta, $\text{TGF}\beta_1$)、热休克蛋白 47 (heat shock protein 47, HSP47) 蛋白表达及血清 SOD活力的影响, 探讨抗氧化剂在矽肺防治中的可能作用。

收稿日期: 2010-08-12 修回日期: 2010-11-04

作者简介: 曹福源 (1980-) 男, 硕士, 主要从事分子毒理学研究。

通讯作者: 姚林, yaolin766@sohu.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级 SD大鼠 96只, 雄性, 体重 200~240 g 由中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所动物资源中心提供, 实验动物质量合格证明书编号: 0117018

1.1.2 试剂 SiO_2 纯度 99%, 粒子大小范围 0.5~10 μm 80%的粒子直径 1~5 μm 用生理盐水配成 50 g/L混悬液, 经高压蒸气灭菌后备用; 葡萄籽原花青素 (批号: 0801006-10) 购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司; SOD测试盒购于南京建成生物工程研究所; TGF β_1 抗体、SABC试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司; HSP47 抗体为美国 Santa Cruz产品, 购于北京赛诺科为生物科技有限公司。

1.2 方法

96只大鼠随机分为对照组、矽肺组、PC低剂量组和高剂量组。经乙醚麻醉后, 于无菌条件下采用非暴露式气管内注入法染尘 (对照组不染尘), 实验组每只大鼠注入 1 ml SiO_2 (纯度 $\geq 99\%$, $\geq 80\%$ 的颗粒直径 1~5 μm) 混悬液 (用无菌生理盐水配制成 50 mg/ml悬液, 每毫升加青霉素 2 000 U); PC低剂量组于染尘后第 2天按 50 mg/(kg·d) 灌胃给予 PC; PC高剂量组按 500 mg/(kg·d) 灌胃给予 PC; 对照组和矽肺模型组给予等容生理盐水。

给药开始后第 14、28和 60天时每组随机处死大鼠 8只。水合氯醛麻醉后, 开胸经心脏取血。全血离心后取血清, 按照试剂盒说明操作检测血清 SOD值。取左肺中段用 10%中性缓冲甲醛液固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 进行 HE染色, 光镜下观察每张切片的肺组织浸润、肺泡壁的破坏、肺组织纤维化等病理改变。

肺组织 TGF β_1 和 HSP47 蛋白的表达严格按照 SABC试剂盒说明书步骤进行免疫组织化学法检测, 结果用 ISS医学图像分析系统软件对各组肺组织切片进行分析, 每张切片随机选取 5个 400倍视野, 取其染色阳性区域的积分光密度 (integral optical density ID) 值来计算 TGF β_1 和 HSP47 蛋白的表达。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。采用 SAS8.1软件分析。

2 结果

2.1 PC对染尘大鼠血清中 SOD的影响

与对照组相比, 矽肺组 SOD明显降低, PC高剂量组 SOD活力高于矽肺组, 差异有统计学意义 ($P<$

0.05), 见表 1。

表 1 PC对染尘大鼠不同时间点血清 SOD活力的影响 U/ml

组别	n	第 14天	第 28天	第 60天
对照组	8	288.11 $\pm$ 24.32	288.00 $\pm$ 25.69	278.50 $\pm$ 23.14
矽肺组	8	211.50 $\pm$ 23.83	218.44 $\pm$ 20.48 ^a	181.32 $\pm$ 25.31 ^a
PC低剂量组	8	226.27 $\pm$ 17.82 ^{a,c}	229.15 $\pm$ 31.18 ^{a,c}	186.94 $\pm$ 27.47 ^{a,c}
PC高剂量组	8	254.35 $\pm$ 31.72 ^{a,b}	257.74 $\pm$ 29.16 ^{a,b}	251.36 $\pm$ 21.63 ^{a,b}

注: ^a 与对照组比较 $P<0.05$ ^b 与矽肺组比较 $P<0.05$ ^c 与 PC高剂量组比较 $P<0.05$

2.2 PC对矽肺大鼠肺 TGF β_1 和 HSP47表达的影响
各时间点矽肺组大鼠肺 TGF β_1 和 HSP47表达高于对照组和 PC高剂量组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 2、3。

表 2 PC对染尘大鼠不同时间点组织 TGF β_1 积分光密度影响的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	第 14天	第 28天	第 60天
对照组	8	17.22 $\pm$ 1.21	16.89 $\pm$ 0.33	17.01 $\pm$ 0.54
矽肺组	8	29.72 $\pm$ 0.21 ^a	31.56 $\pm$ 0.27 ^a	33.27 $\pm$ 0.31 ^a
PC低剂量组	8	28.54 $\pm$ 0.36 ^{a,c}	31.21 $\pm$ 0.46 ^{a,c}	30.22 $\pm$ 0.27 ^{a,c}
PC高剂量组	8	21.25 $\pm$ 0.22 ^{a,b}	22.61 $\pm$ 0.13 ^{a,b}	24.45 $\pm$ 0.21 ^{a,b}

注: ^a 与对照组比较 $P<0.05$ ^b 与矽肺组比较 $P<0.05$ ^c 与 PC高剂量组比较 $P<0.05$

表 3 PC对染尘大鼠不同时间点组织 HSP47 积分光密度影响的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	第 14天	第 28天	第 60天
对照组	8	7.24 $\pm$ 1.21	8.08 $\pm$ 1.30	7.10 $\pm$ 1.54
矽肺组	8	15.70 $\pm$ 1.52 ^a	18.19 $\pm$ 1.55 ^a	18.70 $\pm$ 1.62 ^a
PC低剂量组	8	14.34 $\pm$ 1.95 ^{a,c}	14.23 $\pm$ 1.88 ^{a,c}	18.64 $\pm$ 2.41 ^{a,c}
PC高剂量组	8	10.54 $\pm$ 1.25 ^b	11.37 $\pm$ 2.31 ^{a,b}	13.54 $\pm$ 2.28 ^{a,b}

注: ^a 与对照组比较 $P<0.05$ ^b 与矽肺组比较 $P<0.05$ ^c 与 PC高剂量组比较 $P<0.05$

2.3 各组大鼠肺组织病理变化的观察结果

本实验分 14、28、60 d 3个时间点, 以观察在不同时期 PC对染尘大鼠肺纤维化进程的作用。与对照组相比, 矽肺组第 14天时, 肺泡隔有较多的淋巴细胞、巨噬细胞及少数中性粒细胞浸润, 伴有较多的成纤维细胞和平滑肌细胞增生并平行排列, 肺泡壁增厚, 可见胶原纤维积聚, 肺泡结构破坏, 出现斑片状纤维化, 细胞结节数量多, 体积大; 第 28天时, 肺泡壁显著增厚, 肺泡结构大部遭到破坏, 部分肺泡腔消失, 由胶原纤维和成纤维细胞占据, 肺组织广泛纤维化, 可见纤维性结节; 第 60天时纤维组织明显增生, 形成巨大的纤维性矽结节。PC低剂量组肺组织的变化与矽肺组基本相似, 症状有所减轻, 但差异不明显; PC高剂量组肺组织的变化与矽肺组相比症状明显改善, 纤维化进程较缓慢。各组大鼠肺组织病理改变见图 1 (封三)。

3 讨论

矽肺是因长期吸入游离 SiO_2 粉尘微粒所致的以肺间质纤维化为主的全身性病变。目前矽肺的自由基理论认为,当机体吸入大量 SiO_2 粉尘微粒时,肺泡巨噬细胞(AM)会因吞噬游离 SiO_2 粉尘而被激活,激活状态的AM一方面会合成并释放许多细胞因子,如 HDGF 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 、 $\text{TGF}\beta_1$ 等,另一方面会产生大量氧自由基,从而损害肺组织结构和细胞,导致矽肺的发生^[1~3]。本实验显示,矽尘吸入会导致大鼠肺内淋巴细胞、单核巨噬细胞浸润以及肉芽肿的形成直至大面积纤维化;PC组虽可见类似变化,但程度明显减轻提示PC能够减轻 SiO_2 诱导的大鼠肺纤维化。

研究表明,细胞因子在肺纤维化发展过程中起着重要的作用,它们构成一个复杂的细胞外信号转导分子的网络系统及链式反应关系^[4];越来越多的研究表明抗氧化剂能通过细胞因子网络调节肺纤维化,其中 $\text{TGF}\beta_1$ 是一类重要的生长调节细胞因子,在细胞的生长、分化、免疫调节及细胞外基质合成调节中具有重要作用^[5~9]。它的过度表达可加快肺间质纤维化,导致广泛的细胞外基质蛋白如胶原、纤维黏连蛋白和弹性蛋白的蓄积和肌成纤维细胞集聚等。在培养的人胚肺成纤维细胞中, $\text{TGF}\beta_1$ 是通过诱导热休克基因转录因子 1 (heat shock transcription factor 1) 三聚体的形成以及与其诱导 HSP47 的热激元件 (heat shock element) 的结合促进 HSP47 合成增加,作为胶原特异性分子伴侣的 HSP47 可能是控制组织器官纤维化最好的分子靶点之一^[7~9]。

本实验结果显示,矽肺组中 SOD 活力明显低于对照组,而 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47 的表达都明显高于对照组,提示 SiO_2 可使大鼠体内抗氧化能力下降,造成氧化损伤,加速促纤维化因子的表达,从而加快肺纤维化进程,此与自由基理论基本相符。PC 是从天然

植物中提取的生物类黄酮,在抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗肿瘤、抗炎症、抗过敏等许多功能上均显示了一定效果,由于来源于自然,使用时几乎无副作用,已成为目前抗氧化剂研究和开发的一大热点。本实验发现,PC 能有效提高染尘大鼠血清 SOD 活力,能有效减少 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47 在肺组织中的表达,抑制和延缓肺纤维化的进展。提示 PC 可能通过氧化抗氧化机制提高机体抗氧化能力,减少氧化损伤所导致的促纤维化细胞因子的表达,达到延缓肺纤维化的作用,但 PC 如何通过细胞因子网络来达到延缓肺纤维化的作用机制还有待进一步的探讨和研究。

参考文献:

- [1] 高衍新,王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2008 21 (1): 31-35
- [2] 靳清汉,李庆海,万恩广,等. 矽肺发病机理研究进展 [J]. 济宁医学院学报, 2008 34 (4): 332-334
- [3] 蔡后荣,郑培德,戴令娟,等. 肺间质纤维化前胶原和肿瘤坏死因子 α 基因表达 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998 21 (12): 753-755
- [4] Smentz G, Adam F, Maschio N, et al. Immune mechanisms in interstitial lung disease [J]. Allergy, 2000 55: 1103-1120
- [5] 郝长付,姚武,吴逸明. $\text{TGF}\beta_1$ 在实验性矽肺大鼠肺组织中的表达及其意义 [J]. 医学论坛杂志, 2006 27 (7): 42-43
- [6] 徐志勇,焦洁,姚武,等. CIGF 和 $\text{TGF-}\beta_1$ 在实验性矽肺肺组织中的表达及其意义 [J]. 环境与职业医学, 2008 35 (10): 1830-1832
- [7] Sasaki H, Sato T, Yamauchi N, et al. Induction of heat shock protein 47 synthesis by $\text{TGF-}\beta$ and $\text{IL-1}\beta$ via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor [J]. J Immunol, 2002 168: 5178-5183
- [8] Amenomori M, Mukae H, Sakamoto N, et al. HSP47 in lung fibroblasts is a predictor of survival in fibrotic nonspecific interstitial pneumonia [J]. Respir Med, 2010 104 (6): 895-901
- [9] Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in $\text{TGF-}\beta$ 1-stimulated human lung fibroblasts [J]. Life Sci, 2008 82 (3-4): 210-217
- [10] 中国地方病学杂志, 2008 27 (2): 121-123
- [6] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteopontin and osteopontin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. J Bone Miner Res, 2000 15 (1): 2-12
- [7] Chabre M. Aluminum fluoride and beryllium fluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology [J]. Trends Biochem Sci, 1990 15 (1): 6-10
- [8] Aubin JE, Bonnelly E. Osteopontin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption [J]. Osteoporos Int, 2000 11 (11): 905-913
- [9] 曹进,赵燕,刘箭卫,等. 砖茶型氟中毒成人的氟骨症 [J]. 卫生研究, 2003 32 (2): 141-143

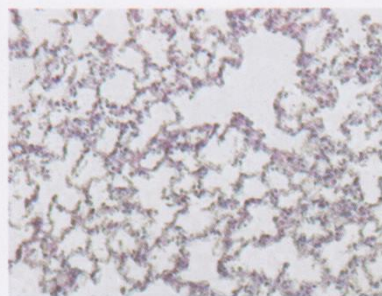
(上接第 5 页)

参考文献:

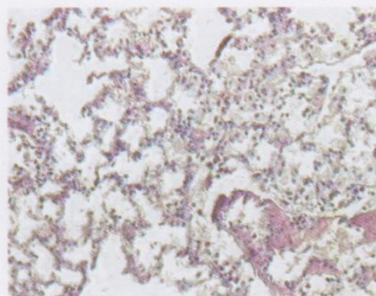
- [1] 李福成. 高岭土拌煤烘烤玉米引起疾病的报告 [J]. 中华预防医学杂志, 1988 22 (4): 225-227
- [2] 白学信,杨兴太,梁代华,等. 饮茶型氟中毒——四川省阿坝藏族自治州壤塘县氟病调查 [J]. 中国地方病学杂志, 1986 5 (2): 110-113
- [3] 刘庆斌,王五一,刘学慧,等. 内蒙古陈巴尔旗饮茶型氟铝联合中毒调查 [J]. 中国地方病学杂志, 2005 24 (1): 50-52
- [4] 李福成,吴非,张华,等. 高氟促进铝蓄积与过量铝危害的实验研究 [J]. 微量元素与健康研究, 1999 16 (2): 15-18
- [5] 孙殿军,高彦辉,于光前,等. 饮茶型氟中毒流行特征的研究

原花青素对矽尘致大鼠肺组织转化生长因子- β 1和 热休克蛋白 47 表达的抑制作用

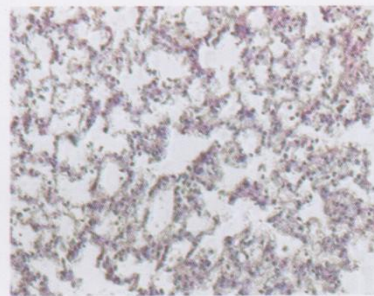
(正文见 6~8 页)



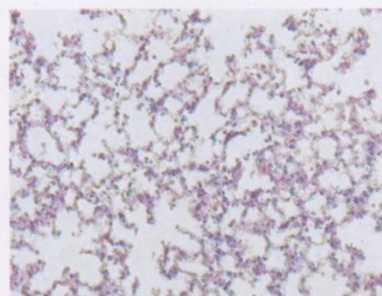
对照组第 14 天



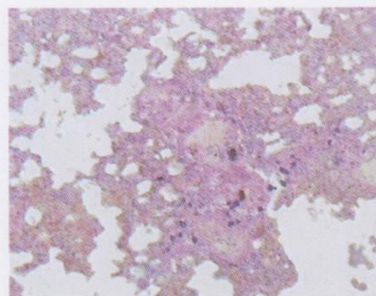
矽肺组第 14 天



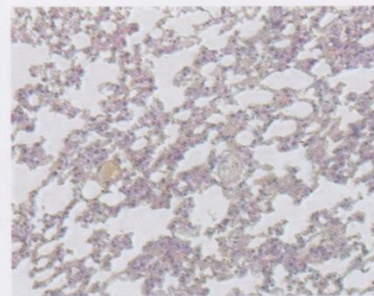
PC 高剂量组第 14 天



对照组第 28 天



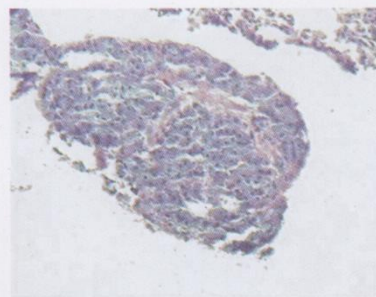
矽肺组第 28 天



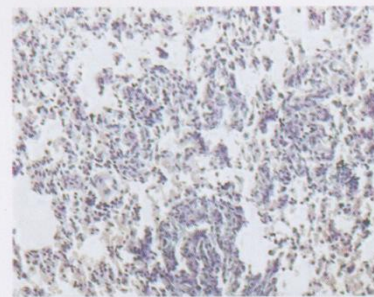
PC 高剂量组第 28 天



对照组第 60 天



矽肺组第 60 天



PC 高剂量组第 60 天

图 1 光镜下各组大鼠肺组织病理变化 (HE, 100 $\times$)