

百部生物碱对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的保护作用

向娟,余平,李明丹,张朝凤,许翔鸿,张勉*

(中国药科大学生药学研究室,南京 211198)

摘要 对叶百部总生物碱及其主要成分新对叶百部碱对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的保护作用进行研究,并采用细胞模型初步探讨其作用机制。实验分为假手术组、模型组、总碱组(60 mg/kg)和新对叶百部碱低、高($10, 20\text{ mg/kg}$)剂量组,泼尼松(6.67 mg/kg)为阳性对照药,以肺组织羟脯氨酸含量、TGF- $\beta 1$ 水平、炎性水平、胶原沉积和 α -SMA表达等为指标考察其抗肺纤维化效果。结果表明,总碱和新对叶百部碱均能显著改善模型小鼠的肺组织炎症和损伤,降低羟脯氨酸含量和胶原沉积;新对叶百部碱能显著降低模型小鼠肺组织 α -SMA表达和TGF- $\beta 1$ 水平。初步机制研究表明,新对叶百部碱能抑制TGF- $\beta 1$ 诱导的肺成纤维细胞中 α -SMA的升高,表明抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转化是其作用机制之一。

关键词 对叶百部;总生物碱;新对叶百部碱;肺纤维化;肺成纤维细胞

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)01-0076-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170112

引用本文 向娟,余平,李明丹,等. 百部生物碱对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的保护作用[J]. 中国药科大学学报,2017,48(1):76-81.
Cite this article as: XIANG Juan, YU Ping, LI Mingdan, et al. Protective effects of stemona alkaloids on mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(1): 76-81.

Protective effects of stemona alkaloids on mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis

XIANG Juan, YU Ping, LI Mingdan, ZHANG Chaofeng, XU Xianghong, ZHANG Mian*

Research Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract This study aimed to investigate the protective effect of total alkaloids (TA) and one of the active components, neotuberostemonine, of *Stemona tuberosa* on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and to explore the mechanism by fibroblasts model. The bleomycin-induced mice were orally administered with TA (60 mg/kg) and neotuberostemonine ($10, 20\text{ mg/kg}$), with prednisone (6.67 mg/kg) as a positive control. The anti-fibrotic effects were assessed by hydroxyproline content, TGF- $\beta 1$ level, inflammatory score, collagen deposition and the expression of α -SMA in the lung tissues. The results revealed that TA and neotuberostemonine could significantly ameliorate the inflammation and injury, and attenuate the hydroxyproline content and collagen deposition. Moreover, neotuberostemonine treatment markedly down-regulated the α -SMA level and TGF- $\beta 1$ content in bleomycin-injured mice lungs. The *in vitro* experiments showed that neotuberostemonine inhibited the expression of α -SMA induced by TGF- $\beta 1$ in a dose-dependent manner, indicating that suppression on differentiation of fibroblasts to myofibroblasts may be one of the mechanisms for neotuberostemonine against pulmonary fibrosis.

Key words *Stemona tuberosa*; total alkaloids; neotuberostemonine; pulmonary fibrosis; pulmonary fibroblasts

This work was funded by the National Science and Technology Major Project for New Drugs Development (No. 2011ZX09307-002-02)

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是最常见的弥漫性肺纤维化疾病,发病机制

尚未阐明,致死率高,患者的中位生存期仅有3年^[1]。目前,只有吡非尼酮(pirfenidone)和尼达尼

布(nintedanib)两种药物在2014年被FDA批准用于该疾病治疗^[2],但这两种药物的作用只是延缓该疾病的发展,并不能从根本上治疗该疾病,因此有效治疗肺纤维化的药物仍有待研发。肺纤维化的主要病理特征是肺组织中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度沉积,而ECM主要来源于肌成纤维细胞的分泌,因此肌成纤维细胞是肺纤维化的效应细胞^[3]。

百部为百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq.) Miq.、蔓生百部 *S. japonica* (Bl.) Miq. 和对叶百部 *S. tuberosa* Lour. 的干燥块根^[4],其主要活性成分为百部生物碱。本课题组的前期研究^[5]表明,目前市场上百部的主流品种是对叶百部,对叶百部的化学成分研究发现,新对叶百部碱在对叶百部中含量较高。有研究^[6]表明:新对叶百部碱的止咳活性与可待因相当,且无成瘾性;口服对叶百部药材水提物后,新对叶百部碱在大鼠肺部的分布明显高于其他组织^[7]。但是,关于百部及百部生物碱对肺纤维化的作用尚未见报道。本文研究了对叶百部总生物碱(total alkaloids, TA)和其主要成分新对叶百部碱(neotuberostemonine, NTS)对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的保护作用;并通过小鼠原代肺成纤维细胞模型,对新对叶百部碱的抗肺纤维化作用机制进行了初步的探讨。

1 材料

1.1 对叶百部药材

对叶百部药材于2010年购于安徽亳州,经本文作者鉴定为百部属植物对叶百部(*S. tuberosa*)的块根(批号:20100120)。

1.2 药品及试剂

新对叶百部碱由本课题组制备,经HPLC分析含量大于98%^[5];注射用盐酸博来霉素(日本化药株式会社);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司);水合氯醛(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所);TGF-β1试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司);DMEM培养基(美国Gibco公司);重组TGF-β1(美国Peprotech公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所);MTT、青霉素、链霉素、胰酶(合肥Biosharp公司);一抗GAPDH、α-SMA及二抗(南京巴傲得生物科技有限公司)。其他试

剂均为市售化学或分析纯。

1.3 仪器

酶标仪(美国BioTek公司);CO₂培养箱(美国Thermo公司);电泳及转膜系统(美国Bio-Rad公司);低温高速离心机、旋转蒸发仪、冷冻干燥机(日本EYELA公司)。

1.4 动物

清洁级ICR小鼠,雄性,体重(20±2)g,由扬州大学比较医学中心提供,合格证号:SCXK(苏)2012-0004。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 百部总生物碱的制备

称取百部药材1kg,用95%乙醇加热回流提取,提取液用5%盐酸调pH到1~2,过滤,滤液用氨水调pH到10,用氯仿萃取至无色,合并氯仿萃取液,旋干,用甲醇溶出,挥去溶剂,干燥,即得浸膏。

2.2 小鼠肺纤维化模型的建立及给药方案

百部总碱抗肺纤维化研究中,小鼠按体重随机分为假手术组、模型组、总碱组和阳性药组,每组10只。新对叶百部碱抗肺纤维化研究中,小鼠分为假手术组(11只),模型组(13只),新对叶百部碱10、20 mg/kg组及泼尼松组(各12只)。小鼠腹腔注射4%水合氯醛(10 mL/kg)麻醉,通过气管滴注博来霉素(5 U/kg)制备小鼠肺纤维化模型,于造模后第1天开始给予百部总生物碱浸膏(60 mg/kg),新对叶百部碱(10、20 mg/kg),阳性药醋酸泼尼松(6.67 mg/kg)。假手术组及模型组给空白溶剂(0.5% CMC-Na),连续给药至第28天。用水合氯醛麻醉后处死动物,取出肺组织并称重,取左小叶肺固定于10%福尔马林中用于组织病理分析,其余部分保存于-80℃。

2.3 组织病理学检查

福尔马林固定的肺组织经脱水、石蜡包埋、切片(切片厚约4~5 μm)。苏木精-伊红(HE)和Masson染色分析肺部炎症及胶原含量,免疫组化法(DAB染色)检测α-SMA的表达。由病理专业研究人员阅片,根据病变轻重程度,对HE染色切片结果进行炎性评分,共分为0~5级^[8]。Masson染色及免疫组化法分析胶原沉积和α-SMA的表达,由Image-Pro Plus统计积分光密度(integrated

optical density, IOD)。

2.4 TGF- β 1 及羟脯氨酸的含量测定

小鼠肺组织中 TGF- β 1 的含量参照 ELISA 试剂盒方法检测。羟脯氨酸含量测定方法参考文献 [9], 并参照试剂盒说明书进行。

2.5 原代肺成纤维细胞分离纯化和培养

参考文献方法^[10], 将雄性 ICR 小鼠麻醉并处死后, 快速取出肺组织, 去除气管和多余组织, 剪碎成小于 1 mm^3 的小块, 加 0.25% 胰酶消化 15 min, 洗净, 转移至培养瓶中培养。待贴壁后加含血清 DMEM 培养基, 细胞长满即可传代, 传代至第 4~10 代之间即可进行实验。

2.6 肺成纤维细胞药物处理方法

取对数生长期的原代肺成纤维细胞, 以每毫升 5×10^4 个的密度接入 96 孔板中, 贴壁后弃去原培养基, 加入含新对叶百部碱浓度为 1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的无血清培养基培养 48 h, MTT 法检测细胞的活性; 或取对数生长期的原代肺成纤维细胞, 以每毫升 1×10^5 个的密度接入 6 孔板中, 贴壁后弃去原培养基, 加入含新对叶百部碱的无血清培养基培养 1 h, 然后加入 10 ng/mL 的 TGF- β 1 刺激 48 h。

2.7 Western blot 检测蛋白含量

肺成纤维细胞经 TGF- β 1 刺激 48 h 后, 加裂解缓冲液提取细胞蛋白, 在沸水中变性 10 min 即得待测蛋白样品, 12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳, 湿法转膜至 PVDF 膜上, 10% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗

4 °C 孵育过夜, 二抗常温孵育 2 h, 化学发光反应, 显影, 定影。

2.8 统计分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析进行显著性比较, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 对叶百部总生物碱对博来霉素肺纤维化小鼠的影响

实验结果显示, 对叶百部总生物碱具有改善博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的作用。从小鼠存活率来看, 模型组为 70%, 总碱给药组略有提高(80%), 而阳性药组(醋酸泼尼松)最低(50%); 从肺系数来看, 与假手术组比, 模型小鼠的肺系数明显增高, 总碱和阳性药均能显著地降低小鼠肺系数(图 1-A)。羟脯氨酸是评价肺纤维化中胶原纤维的常规指标, 博来霉素造模后, 小鼠肺组织中的羟脯氨酸含量显著增高, 总碱能显著降低小鼠肺组织中羟脯氨酸的含量($P < 0.01$), 效果优于阳性药(图 1-B)。肺组织 HE 染色结果(图 1-C)显示, 模型小鼠的肺组织出现不同程度的病变, 包括炎细胞浸润、肺泡壁增厚、肺泡上皮增生和纤维结缔组织增生等, 总碱给药组小鼠肺部病变有明显的改善。肺组织 Masson 染色结果(图 1-C)显示, 模型小鼠肺组织胶原沉积明显(蓝色), 总碱能显著减少博来霉素引起的胶原沉积。

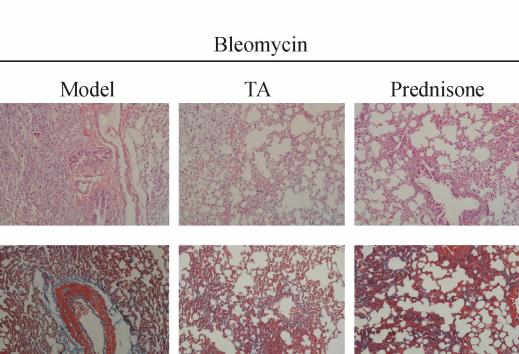
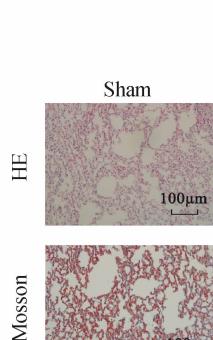
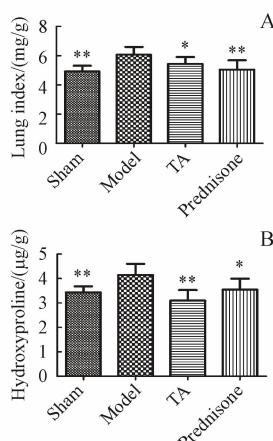


Figure 1 Effects of total alkaloids of *Stemona tuberosa* (TA) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice ($\bar{x} \pm s$)

A: Lung index ($n = 5\text{--}10$); B: Content of hydroxyproline ($n = 5\text{--}10$); C: Representative sections of lung tissue stained by hematoxylin-eosin (HE) staining and by Masson's trichrome staining (collagen was coloured in blue)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 新对叶百部碱对博来霉素肺纤维化小鼠的影响

新对叶百部碱为对叶百部中的主要止咳活性成分^[5],且在百部中含量较高。因此以新对叶百部碱为百部生物碱的代表性化合物,采用博来霉素模型小鼠,对其抗肺纤维化作用进行了研究。实验结果表明,新对叶百部碱对博来霉素模型小鼠的肺纤维化具有显著的改善作用。

从小鼠存活率(图2-A)、肺脏系数(图2-B)和肺组织羟脯氨酸(图2-C)含量来看,新对叶百部碱

低剂量组(10 mg/kg)能略降低博来霉素引起的小鼠死亡,而高剂量组(20 mg/kg)小鼠存活率高达100%;与模型组相比,新对叶百部碱低剂量和高剂量组均可显著降低小鼠的肺脏系数($P < 0.05$, $P < 0.01$)和小鼠肺组织中羟脯氨酸的含量($P < 0.01$, $P < 0.01$);肺组织HE染色及炎性评分结果(图2-D,E)显示,新对叶百部碱低、高剂量均能显著改善肺组织损伤,炎性评分明显下降,高剂量组效果极其显著。

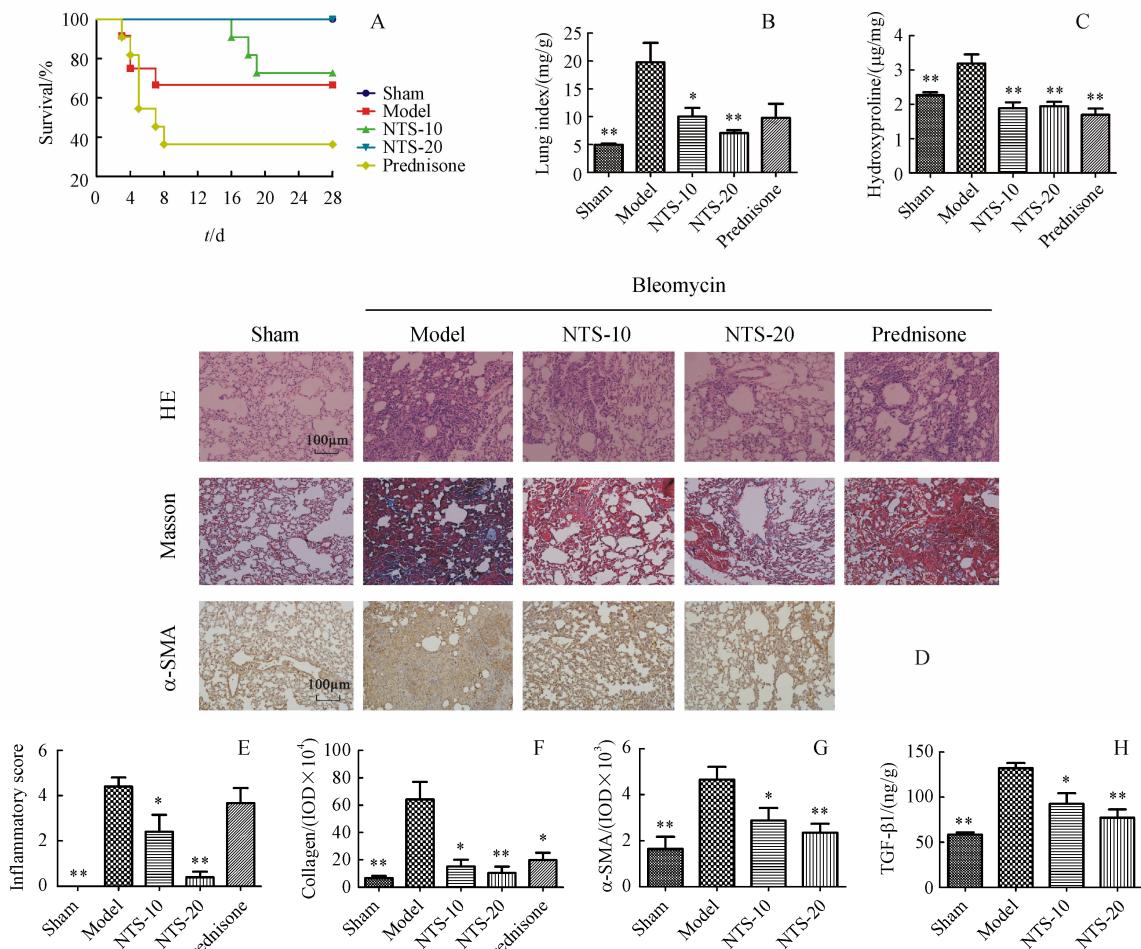


Figure 2 Effects of neotuberostemonine (NTS) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

A: Survival rate of mice ($n = 5-12$); B: Lung index ($n = 5-12$); C: Content of hydroxyproline ($n = 5-12$); D: Representative sections of lung tissue stained by HE staining, Masson's trichrome staining (collagen was coloured in blue) and α -SMA antibody (coloured in brown) ($n = 5$); E: Inflammatory score ($n = 5$); values of integrated optical density (IOD) for (F) absolute collagen ($n = 5$) and (G) α -SMA level ($n = 5$); (H) TGF- β 1 level ($n = 5$) in lung tissue was detected by ELISA

NTS-10: NTS (10 mg/kg); NTS-20: NTS (20 mg/kg)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the model group

肺组织的胶原沉积、 α -SMA 和 TGF- β 1 的表达是评价肺纤维化的重要指标。肺组织 Masson 染色

及胶原统计结果(图2-D、F)表明,博来霉素给药引起小鼠肺组织中胶原的大量沉积,新对叶百部碱

低、高剂量均可明显改善博来霉素引起的胶原沉积($P < 0.05, P < 0.01$)；小鼠肺组织 α -SMA免疫组化结果(图2-D、G)显示，模型组肺组织中 α -SMA表达明显增多，新对叶百部碱在10和20 mg/kg均能降低 α -SMA表达($P < 0.05, P < 0.01$)；小鼠肺组织中TGF- β 1含量测定结果(图2-H)表明，博来霉素组小鼠肺组织中TGF- β 1的水平明显升高，新对叶百部碱低剂量和高剂量均能下调TGF- β 1($P < 0.05, P < 0.01$)。综上所述，新对叶百部碱对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化具有显著的改善作用，且呈一定的剂量依赖性。

3.3 新对叶百部碱对肺成纤维细胞转化的影响

肺肌成纤维细胞是肺纤维化的效应细胞，而肺组织中成纤维细胞的活化和转化是肌成纤维细胞的主要来源^[3]。在肺泡上皮细胞损伤情况下，多种促纤维化细胞因子，如TGF- β 1、PDGF、TNF- α

等，启动肺成纤维细胞增殖和转化为肌成纤维细胞，其中TGF- β 1是公认的最重要的促纤维化因子^[9]。因此，本文研究了新对叶百部碱对小鼠原代肺成纤维细胞增殖和活化的影响。

MTT实验结果表明，新对叶百部碱1、10、100 μ mol/L对肺成纤维细胞均无细胞毒作用(图3-A)。TGF- β 1刺激48 h后，肺成纤维细胞的增殖明显高于空白组，但新对叶百部碱并不能抑制TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞增殖(图3-B)。Western blot分析结果表明，TGF- β 1诱导的肺成纤维细胞中 α -SMA蛋白水平明显升高，而1、10、100 μ mol/L的新对叶百部碱均能明显降低 α -SMA的表达，且呈一定的剂量依赖性($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$)，说明新对叶百部碱能直接抑制肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化。

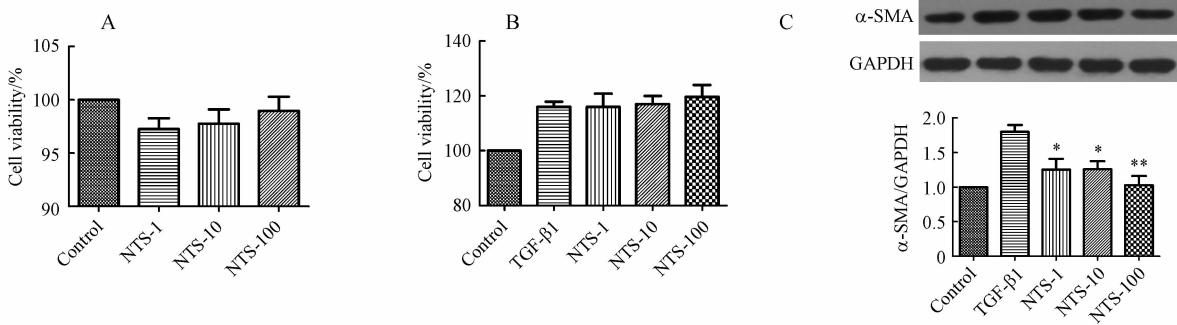


Figure 3 Effects of NTS on the TGF- β 1-induced primary pulmonary fibroblasts ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Cells incubated with 1, 10, 100 μ mol/L of NTS (NTS-1, NTS-10, NTS-100) for 48 h and detected by MTT; B: Cells pretreated with 1, 10, 100 μ mol/L of NTS for 1 h and then stimulated with 10 ng/mL of TGF- β 1 for 48 h, detected by MTT; C: Expression of α -SMA evaluated by Western blot

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TGF- β 1-induced group

4 讨论

百部是常用的润肺止咳中药，用于新久咳嗽、肺痨咳嗽、百日咳等呼吸系统疾病，也是治疗肺纤维化的制剂、复方常用的组方中药之一^[11–12]。近期有研究表明，百部总碱能保护烟熏诱导的小鼠肺损伤^[13]。但迄今为止尚未有关于百部生物碱抗肺纤维化的报道。本文研究了对叶百部总生物碱和其主要活性成分新对叶百部碱对博来霉素肺纤维化小鼠的保护作用，结果显示百部总碱及新对叶百部碱均具有显著的抗肺纤维化作用。

IPF的发病机制尚未阐明，目前认为与肺泡上

皮损伤的异常修复、ECM的大量沉积等有关^[14]。本研究发现百部总碱和新对叶百部碱能改善博来霉素诱导小鼠肺部ECM的沉积，减少肺组织中羟脯氨酸的含量，羟脯氨酸是胶原中的主要成分，新对叶百部碱能减少肌成纤维细胞的主要标志 α -SMA的表达^[15]。ECM的主要来源为肌成纤维细胞，而肌成纤维细胞一般由肺成纤维细胞、循环成纤维细胞和上皮细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)而来^[3]，其中肺成纤维细胞的转化是肌成纤维细胞的主要来源。TGF- β 1是成纤维细胞转化为肌成纤维细胞的主要刺激因子，在博来霉素诱导的肺纤维化模型小鼠的肺组织

中含量明显上升,与文献中报道一致^[16],新对叶百部碱可显著降低肺组织中TGF-β1的含量。

小鼠原代肺成纤维细胞实验结果表明,在TGF-β1的刺激下,小鼠肺成纤维细胞明显增殖,α-SMA蛋白表达也显著增加,显示了TGF-β1促进成纤维细胞增殖、促进成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的作用;新对叶百部碱不能抑制TGF-β1引起的成纤维细胞增殖,但能降低α-SMA蛋白的表达,表明直接抑制肺成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化可能是新对叶百部碱抗肺纤维化的机制之一。

本研究首次发现了对叶百部总碱和其中主要活性成分新对叶百部碱的抗肺纤维化作用。总体而言,新对叶百部碱的抗纤维化作用优于总碱,具有开发成为抗肺纤维化药物的潜质,其作用机制有待深入研究。

参考文献

- [1] Wolters PJ, Collard HR, Jones KD. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, **9**:157–179.
- [2] Karimi-Shah BA, Chowdhury BA. Forced vital capacity in idiopathic pulmonary fibrosis—FDA review of pirfenidone and nintedanib [J]. *N Engl J Med*, 2015, **372**(13):1189–1191.
- [3] Lekkerkerker AN, Aarbiou J, van Es T, et al. Cellular players in lung fibrosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, **18**(27):4093–4102.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 1(中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:132.
- [5] Gao Y, Wang J, Zhang CF, et al. Seven new alkaloids from the roots of *Stemona tuberosa* [J]. *Tetrahedron*, 2014, **70**(4):967–974.
- [6] Chung HS, Hon PM, Lin G, et al. Antitussive activity of *Stemona* alkaloids from *Stemona tuberosa* [J]. *Planta Med*, 2003, **69**(10):914–920.
- [7] Sun H, Dong W, Zhang A, et al. Ultra-performance liquid-chromatography with tandem mass spectrometry performing pharmacokinetic and biodistribution studies of croomine, neotuberostemonine and tuberostemonine alkaloids absorbed in the rat plasma after oral administration of *Stemona Radix* [J]. *Fitoterapia*, 2012, **83**(8):1699–1705.
- [8] Lv XX, Wang XX, Li K, et al. Rupatidine protects against pulmonary fibrosis by attenuating PAF-mediated senescence in rodents [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**(7):e68631.
- [9] You XY, Xue Q, Fang Y, et al. Preventive effects of *Ecliptae Herba* extract and its component, ecliptasaponin A, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, **175**:172–180.
- [10] Seluanov A, Vaidya A, Gorbunova V. Establishing primary adult fibroblast cultures from rodents [J]. *J Vis Exp*, 2010(44):2033.
- [11] Jung KH, Choi HL, Park S, et al. The effects of the standardized herbal formula PM014 on pulmonary inflammation and airway responsiveness in a murine model of cockroach allergen-induced asthma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **155**(1):113–122.
- [12] Wei JS, Li JY, Mei RH, et al. Influence of the extract of Compound Formula Rosin and *Bletilla* Table in bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *China Med Her* (中国医药导报), 2012, **9**(28):24–26.
- [13] Lim D, Lee E, Jeong E, et al. *Stemona tuberosa* prevented inflammation by suppressing the recruitment and the activation of macrophages *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, **160**:41–51.
- [14] Raghu G, Collard HR, Egan JJ, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, **183**(6):788–824.
- [15] Roy SG, Nozaki Y, Phan SH. Regulation of alpha-smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, **33**(7):723–734.
- [16] Della Latta V, Cecchettini A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions [J]. *Pharmacol Res*, 2015, **97**:122–130.