

# 柚皮素对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的改善作用及其作用机制

蒋怡芳<sup>1</sup>, 范晓杰<sup>2</sup>, 刘晓<sup>3</sup>, 耿楠<sup>1</sup>, 秦文文<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 探讨柚皮素(NAR)对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响及其可能作用机制。**方法** 将60只雄性ICR小鼠随机分成正常对照组(Control)、模型组(Model)、阳性对照地塞米松组(DXM, 3 mg/kg)、NAR低剂量组(L-NAR, 25 mg/kg)和NAR高剂量组(H-NAR, 100 mg/kg), 每组12只。采用气管内一次性滴注博来霉素(5 mg/kg)建立小鼠肺纤维化模型, 药物干预4周后处死小鼠。取肺组织称重, 计算肺指数; 碱水解法测定肺组织羟脯氨酸(HYP)含量; HE染色观察肺组织病理改变并评分; Masson染色观察肺纤维化程度并评分; ELISA法检测肺组织中白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素18(IL-18)和转化生长因子 $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)水平; RT-PCR检测肺组织中NLRP3、ASC和caspase-1 mRNA表达水平; Western blot检测肺组织中NLRP3、ASC、caspase-1、Collagen I、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin和Vimentin蛋白表达水平。**结果** 与Control组比较, Model组小鼠肺组织损伤明显, 纤维化程度较为严重, 肺指数和肺组织中HYP、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TGF- $\beta$ 1含量增加, NLRP3、ASC、caspase-1的mRNA和蛋白表达水平以及Collagen I、 $\alpha$ -SMA和Vimentin蛋白表达水平均上升, 而E-cadherin蛋白表达水平下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与Model组比较, DXM组和H-NAR组小鼠肺损伤与纤维化程度得到明显改善, 小鼠肺指数、肺组织中HYP、IL-1 $\beta$ 、IL-18、TGF- $\beta$ 1含量, NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA和蛋白表达水平以及Collagen I、 $\alpha$ -SMA和Vimentin蛋白表达水平均下降, E-cadherin蛋白表达水平上升, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而L-NAR组与Model组比较, 相关指标差异无统计学意义。**结论** NAR能有效抑制博来霉素诱导的小鼠肺纤维化过程, 其机制可能与抑制NLRP3炎症小体活化有关。

**关键词** 柚皮素; 肺纤维化; 博来霉素; NLRP3炎症小体

**中图分类号** R 932

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0202-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.007

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是由多原因引起的, 以弥漫性肺泡炎、肺间质炎症和间质纤维化为特征的慢性炎症反应性疾病, 其患病率呈逐年上升趋势, 5年生存率不到50%<sup>[1]</sup>。已有研究显示<sup>[2-3]</sup>, NLRP3炎症小体在PF的各个发病阶段都有参与, 包括早期的炎症反应和晚期成纤维细胞的分化以及胶原沉积等过程, 因此NLRP3炎症小体可能成为治疗PF的新靶点。柚皮素(naringenin, NAR)是一种广泛存在于柚子等柑橘类水果中的二氢黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗衰老、肝肾保护等多种活性<sup>[4]</sup>。目前已发现NAR对多种器官组织的纤维化过程具有抑制作用, 比如心肌纤维化<sup>[5]</sup>、肝纤维化<sup>[6]</sup>、肾纤维化<sup>[7]</sup>等, 但NAR能否对PF也有改善作用目前鲜有报道。该研究拟通过气管内注射博来霉素建立PF小鼠模型, 观察NAR对PF小鼠肺纤维化的影响及其与NLRP3炎症小体活化的关系, 为临床上治疗肺纤维化提供实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级雄性ICR小鼠60只, 6~8周龄, 体质量(20 $\pm$ 2)g, 由湖南省实验动物中心提供, 动物合格证编号: SCXK(湘)2019-0015。

**1.2 主要试剂与仪器** 柚皮素标准品(纯度 $\geq$ 98%, 批号: N107346)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 注射用盐酸博来霉素(批号: 650472)购自日本化药株式会社; 地塞米松磷酸钠注射液(批号: 1706091)购自天津金耀集团湖北天药药业股份有限公司; 白细胞介素1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素18(interleukin 18, IL-18)和转化生长因子 $\beta$ 1(transforming growth factor  $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)ELISA试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司; 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测试盒购自南京建成生物工程研究所; E-cadherin、Collagen I、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、NLRP3、ASC、caspase-1和 $\beta$ -actin抗体购于美国Cell Signaling Technology公司; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液购自上海碧云天生物公司;

2020-09-10 接收

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划(编号: 20150744)

作者单位: 河北医科大学第四医院<sup>1</sup> 呼吸内科、<sup>2</sup> 骨科、<sup>3</sup> 院感科, 石家庄 050011

作者简介: 蒋怡芳, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: jianghongkun5918@163.com

Masson 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒、扩增试剂盒购于日本 Takara 公司。Tanon 1600/1600R 全自动数码凝胶图像分析系统购于上海天能科技有限公司; T100 实时荧光定量 PCR 仪购于美国 BIO-RAD 公司; FC 全自动酶标仪购自美国 Thermo 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 动物造模及分组处理** 将 60 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分成正常对照组 (Control)、模型组 (Model)、阳性对照地塞米松组 (DXM, 3 mg/kg), NAR 低剂量组 (L-NAR, 25 mg/kg) 和 NAR 高剂量组 (H-NAR, 100 mg/kg), 每组 12 只。3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠后固定于操作板上, 采用微量注射器于气管内一次性滴注博莱霉素 (5 mg/kg) 建立小鼠 PF 模型<sup>[8]</sup>, 注入过程中将鼠板直立并旋转抖动, 使药液在肺内均匀分布, Control 组小鼠注入等量生理盐水。造模第 2 天开始灌胃给药, L-NAR 和 H-NAR 组小鼠分别给予 25 mg/kg 和 100 mg/kg NAR 灌胃, DXM 组小鼠给予 3 mg/kg 地塞米松灌胃, Control 组和 Model 组给予等量生理盐水灌胃, 每天 1 次, 连续 4 周。

**1.3.2 肺组织病理学观察** 收集各组小鼠部分肺组织, 经生理盐水洗净后于 4% 多聚甲醛溶液固定 48 h, 常规石蜡包埋, 制作 5  $\mu$ m 石蜡切片, HE 染色观察肺组织病理改变, Masson 染色评估肺纤维化程度, 并参照 Szapiel et al<sup>[9]</sup> 的方法对肺组织的肺泡炎及肺纤维化程度进行评分。

**1.3.3 肺指数测定** 各组小鼠处死前先称重, 取肺组织用生理盐水洗净, 吸干表面生理盐水并称重, 肺指数 (mg/g) = 肺湿质量/小鼠体质量。

**1.3.4 碱水解法测定肺组织 HYP 水平** 取适量肺组织匀浆, 根据试剂盒说明书以碱水法测定肺组织中 HYP 含量。

**1.3.5 ELISA 法检测肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TGF- $\beta$ 1 表达水平** 取适量肺组织剪碎后加入生理盐水, 冰浴下用玻璃匀浆器研磨制成组织匀浆, 4  $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 按照试剂盒说明书进行操作, 采用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值, 根据标准曲线计算肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TGF- $\beta$ 1 含量。

**1.3.6 RT-PCR 检测肺组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 水平** 收集各组肺组织匀浆, Trizol 法提取总 RNA, 核酸分析仪检测各样本 RNA 浓度,

用逆转录试剂盒将得到的 RNA 合成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 以  $\beta$ -actin 为内参, 在荧光 PCR 扩增仪上进行各基因的 mRNA 扩增, 引物序列: NL-RP3 上游: 5'-ATTACCCGCCCCGAGAAAGG-3', 下游: 5'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-3'; ASC 上游: 5'-GACAGTGCAACTGCGAGAAG-3', 下游: 5'-CGACTC CAGATA GTAGCTGACAA-3'; caspase-1 上游: 5'-AA TACAACCACTCGTACACGTC-3'; 下游: 5'-AGCTCC AACCCTCGGAGAAA-3';  $\beta$ -actin 上游: 5'-GTGACGT-GACATCCGTAAGA-3'; 下游: 5'-GCCGGACT CATC-GTACTCC-3'。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 NLRP3、ASC 和 caspase-1 等基因 mRNA 相对表达水平。

**1.3.7 Western blot 检测** 称取适量肺组织, 加入 RIPA 裂解液充分研磨后置于冰浴中匀浆 15 s, 然后在 4  $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, BCA 法测定上清液中蛋白含量。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 随后转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 90 min, 洗膜, 加入一抗稀释液 (E-cadherin、Collagen I、 $\alpha$ -SMA、Vimentin、NL-RP3、ASC、caspase-1、 $\beta$ -actin, 1 : 1 000), 4  $^{\circ}$ C 摇床过夜, 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 最后使用 ECL 显色。利用 Image J 图像分析软件进行分析, 结果用灰度值表示, 以目的条带与  $\beta$ -actin 的灰度值比值, 作为目的蛋白表达的相对水平。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行处理, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 NAR 对 PF 小鼠肺组织病理学的影响** 如图 1 所示, Control 组小鼠肺组织结构完整, 肺泡结构正常, 未见炎症细胞浸润; Model 组和 L-NAR 组小鼠肺组织结构严重破坏, 肺泡间隔明显增厚, 伴有大量炎症细胞浸润和出血; H-NAR 组和 DXM 组小鼠肺组织结构基本完整, 肺泡间隔稍有增厚, 炎症细胞浸润明显减少。与 Control 组比较, Model 组肺炎评分增加, 差异有统计学意义 ( $t = 23.462, P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组评分降低, 差异有统计学意义 ( $t = 17.942, 19.322$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 L-NAR 组差异无统计学意义 ( $t = 3.105, P > 0.05$ )。

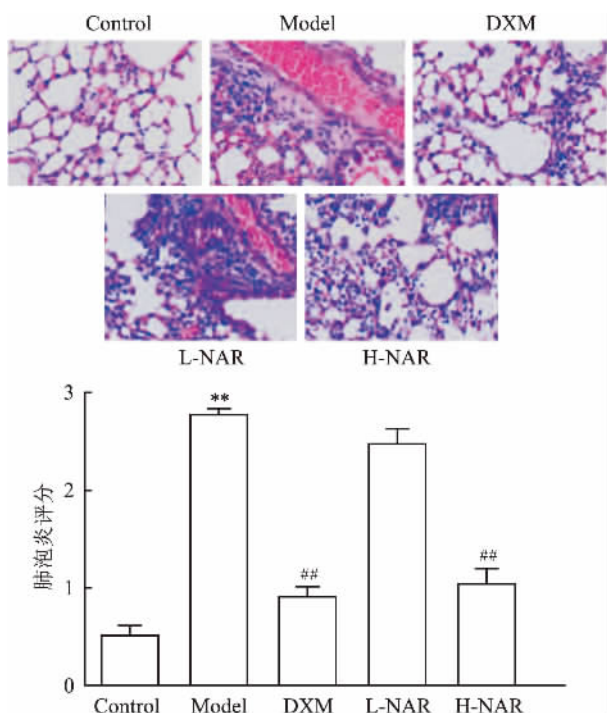


图1 各组小鼠肺组织病理学观察 HE × 200

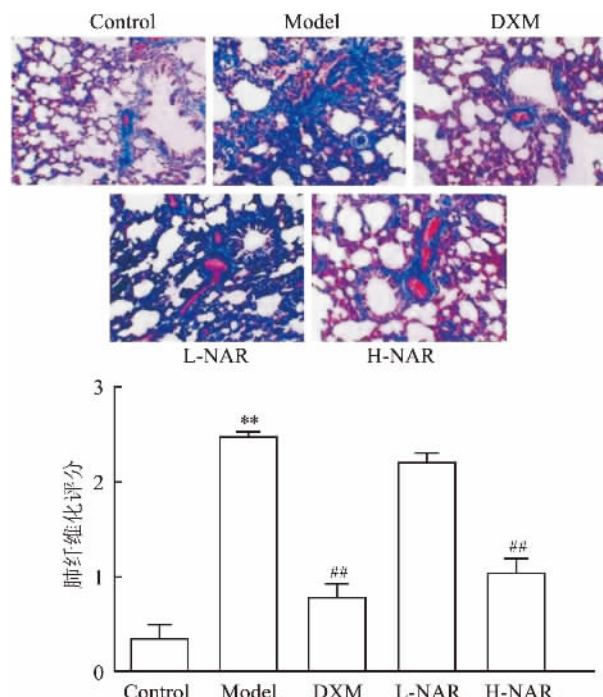
与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

图2 各组小鼠肺组织纤维化沉积观察 Masson × 200

与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

## 2.2 NAR 对 PF 小鼠肺组织纤维化程度的影响

如图2所示, Control 组小鼠肺泡结构正常, 间质未见纤维沉积; Model 组和 L-NAR 组小鼠肺泡结构被破坏, 间质可见大量纤维沉积; H-NAR 组和 DXM 组小鼠肺泡结构较为完整, 间质可见少量纤维沉积。与 Control 组比较, Model 组肺纤维化评分增加, 差异有统计学意义 ( $t = 20.239, P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组评分降低, 差异有统计学意义 ( $t = 13.598, 16.128$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 L-NAR 组差异无统计学意义 ( $t = 2.530, P > 0.05$ )。

**2.3 NAR 对 PF 小鼠肺指数和肺组织中 HYP 含量的影响** 如表1所示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠肺指数和肺组织中 HYP 含量增加, 差异有统计学意义 ( $t = 24.079, 64.912$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组小鼠肺指数和肺组织中 HYP 含量减少, 差异有统计学意义 ( $t_1 = 14.571, 20.643; t_2 = 35.518, 44.091$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 L-NAR 组差异无统计学意义 ( $t = 2.429, 2.450$ , 均  $P > 0.05$ )。

**2.4 NAR 对 PF 小鼠肺组织中相关因子含量的影响** 如图3所示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TGF- $\beta$ 1 含量增加, 差异有统计学意义 ( $t = 13.336, 23.037, 15.701$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组小鼠

表1 各组小鼠肺指数和肺组织中 HYP 含量比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别         | 肺指数 (mg/g)          | HYP 含量 ( $\mu$ g/mg) |
|------------|---------------------|----------------------|
| Control    | 4.651 $\pm$ 0.113   | 0.327 $\pm$ 0.007    |
| Model      | 6.604 $\pm$ 0.120** | 0.859 $\pm$ 0.010**  |
| DXM        | 4.958 $\pm$ 0.086## | 0.503 $\pm$ 0.005##  |
| L-NAR      | 6.391 $\pm$ 0.092   | 0.841 $\pm$ 0.008    |
| H-NAR      | 5.355 $\pm$ 0.069## | 0.576 $\pm$ 0.010##  |
| <i>P</i> 值 | 231.111             | 1552.500             |
| <i>F</i> 值 | 0.000               | 0.000                |

与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 和 TGF- $\beta$ 1 含量减少, 差异无统计学意义 ( $t_1 = 6.940, 9.634, 10.955; t_2 = 10.751, 16.545, 12.233$ , 均  $P < 0.05$ ), 而 L-NAR 组差异无统计学意义 ( $t = 2.721, 4.188, 3.469$ , 均  $P > 0.05$ )。

**2.5 NAR 对 PF 小鼠肺组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平的影响** 如图4所示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠肺组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 蛋白表达水平升高, E-cadherin 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ( $t = 30.600, 26.386, 62.342, 28.459$ , 均  $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组小鼠肺组织中 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 蛋白表达水平降低, E-cadherin 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ( $t_1 = 26.462, 22.200, 54.888, 22.361; t_2 = 28.771, 24.839, 60.084, 24.495$ , 均  $P < 0.05$ ), 而

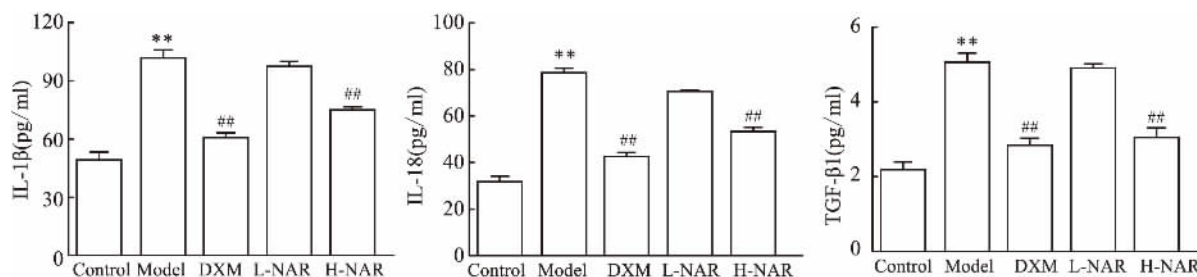


图3 各组小鼠肺组织中 IL-1β、IL-18 和 TGF-β1 表达水平比较

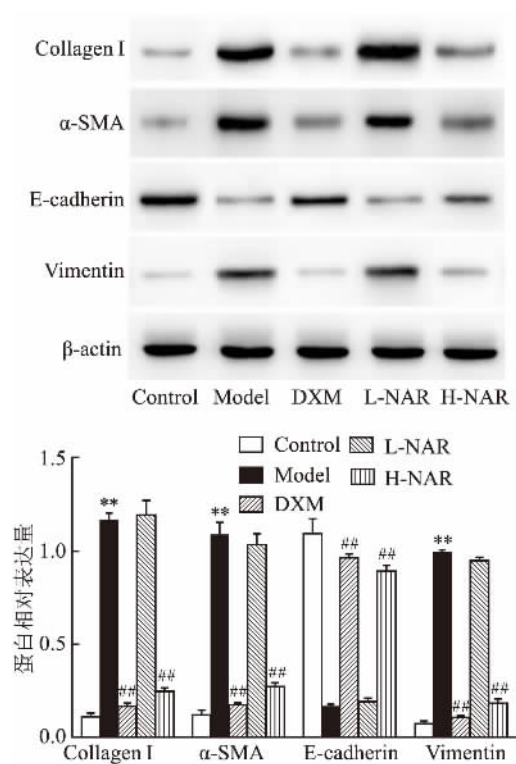
与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

图4 各组小鼠肺组织中 Collagen I、α-SMA、E-cadherin 和 Vimentin 表达水平比较

与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

L-NAR 组相关蛋白表达水平差异无统计学意义 ( $t = 0.770, 1.365, 2.936, 0.915$ , 均  $P > 0.05$ )。

**2.6 NAR 对 PF 小鼠肺组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 表达水平的影响** 如图 5 所示,与 Control 组比较, Model 组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平增加,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与 Model 组比较, H-NAR 组和 DXM 组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC、caspase-1 的 mRNA 和蛋白表达水平降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 L-NAR 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

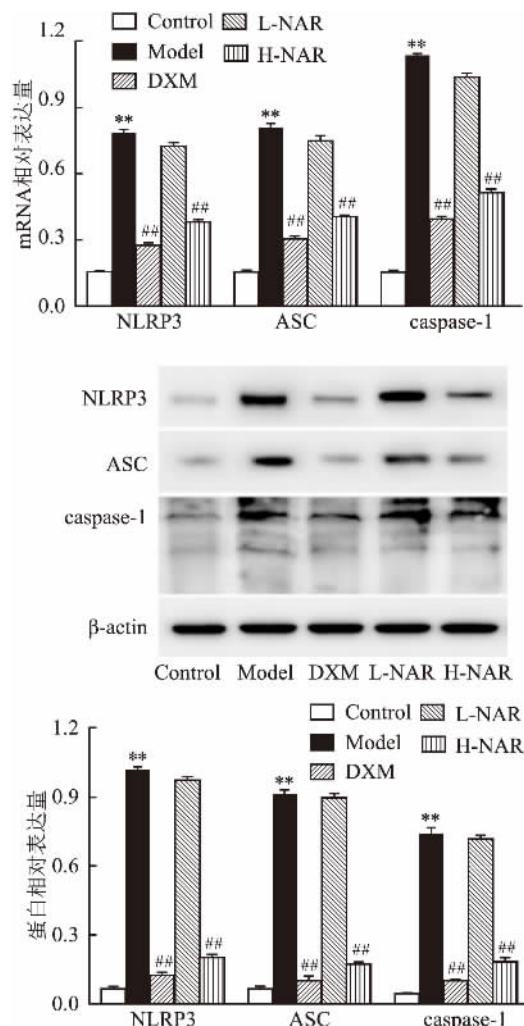


图5 各组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 mRNA 和蛋白表达水平比较

与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较: ##  $P < 0.01$ 

### 3 讨论

PF 是一种慢性呼吸系统疾病,患病后治愈率较低,肺的呼吸功能严重受损,最终会因呼吸衰竭而死亡。临床上用于治疗 PF 的药物主要有免疫抑制

剂、皮质类固醇激素以及新药如尼达尼布和吡非尼酮,但是由于其病因复杂,发病机制尚不明确,现有的这些治疗方法疗效仍不理想,因此寻找有效治疗 PF 的新药物成为当下的热点与难点。近年研究发现,NLRP3 炎症小体的激活是肺损伤和 PF 形成的关键分子机制<sup>[10]</sup>,掌握 NLRP3 炎症小体与 PF 的关系,并选择性抑制 NLRP3 炎症小体的活化将有助于降低该疾病的发生率与病死率。中医药防治器官纤维化近些年取得了突破性进展,并日益受到重视。有研究报道<sup>[11]</sup>,NAR 对 PF 具有一定的治疗效果;同时也有研究报道<sup>[12]</sup>,NAR 可以通过抑制小胶质细胞中 NLRP3 炎症小体的激活,对 LPS 诱导神经元损伤产生保护作用。但 NAR 对 PF 的改善作用是否与 NLRP3 炎症小体的活化存在关联,国内外未见报道。本研究结果显示,NAR 能有效抑制博来霉素诱导的小鼠 PF 过程,其作用机制可能是通过抑制 NLRP3 炎症小体活化,减轻肺组织炎性损伤及减少细胞外基质(extracellular matrix,ECM)合成,从而发挥对 PF 的治疗作用。

PF 的主要病理改变为肺组织结构破坏、炎症细胞浸润、成纤维细胞的活化增生及胶原沉积,本研究采用博来霉素诱导小鼠建立 PF 模型,HE 染色观察到 Model 组小鼠肺组织出现弥漫性肺泡炎,且肺泡腔内有大量炎症细胞浸润;Masson 染色观察到肺间质内 ECM 大量沉积,蓝色胶原纤维形成,与前人研究结果一致<sup>[13]</sup>,符合 PF 的表现,提示 PF 小鼠模型复制成功。采用高剂量 NAR 干预后,小鼠肺组织损伤程度明显减轻,胶原纤维沉积显著减少,初步证实 NAR 可改善肺组织病理变化,延缓 PF 进展。肺指数是反映肺组织炎症和 PF 程度的指标之一,HYP 是组织中胶原纤维的特有成分,其含量能反映组织中胶原纤维的变化情况,是衡量其胶原组织代谢的重要指标<sup>[14]</sup>。本研究结果显示,Model 组小鼠的肺指数和肺组织中 HYP 含量均显著上升,与胡侃等<sup>[15]</sup>研究一致,而给与高剂量 NAR 治疗后,肺指数和 HYP 含量明显下降,说明 NAR 可以降低肺组织 HYP 含量,修复肺组织损伤,进而缓解肺组织纤维化进程。

NLRP3 炎症小体活化后产生 IL-1 $\beta$  和 IL-18,而 IL-1 $\beta$  可以促进 TGF- $\beta$ 1 的分泌,进一步刺激肺上皮细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT),加剧 PF 的形成<sup>[16]</sup>。E-cadherin 和 Vimentin 是 EMT 过程中的标志性蛋白,EMT 在 PF 的发病过程中主要表现为 E-cadherin 表达下调,Vim-

entin 表达上调<sup>[2]</sup>。ECM 在肺间质异常沉积是导致 PF 最直接的原因,TGF- $\beta$ 1 升高除了能促进 ECM 形成,还会诱导成纤维细胞分化成肌成纤维细胞,而肌成纤维细胞能特异性表达  $\alpha$ -SMA,促进 ECM 的沉积,故可以通过观察  $\alpha$ -SMA 的表达来判断 PF 形成情况,此外肌成纤维细胞分泌的 Collagen I 也能促进 ECM 沉积,加快 PF<sup>[17]</sup>。为进一步明确 NAR 改善 PF 的可能机制,本研究从多个方面对纤维化相关因子的表达进行检测,包括肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18、TGF- $\beta$ 1 含量,Collagen I、 $\alpha$ -SMA、E-cadherin 和 Vimentin 蛋白以及 NLRP3 炎症小体相关蛋白表达水平,研究结果显示,高剂量 NAR 可显著降低 Model 组小鼠肺组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-18、TGF- $\beta$ 1 含量,降低 Collagen I、 $\alpha$ -SMA 和 Vimentin 蛋白表达,增加 E-cadherin 蛋白表达,同时抑制 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的 mRNA 及蛋白表达。说明 NAR 能抑制 NLRP3 炎症小体活化,降低肺部炎性反应,减少胶原蛋白沉积,从而达到延缓 PF 的作用。

综上所述,NAR 对博来霉素致 PF 具有一定的改善效果,其作用机制可能与抑制肺组织炎性反应和 NLRP3 炎症小体活化有关,本研究可为 NAR 开发成抗 PF 药物提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] 孙佳,张广平,李晗,等.肺纤维化发病机制的研究进展[J].国际呼吸杂志,2019,39(13):1004-8.
- [2] Tian R,Zhu Y,Yao J,et al. NLRP3 participates in the regulation of EMT in bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Exp Cell Res, 2017,357(2):328-4.
- [3] Li Y,Li H,Liu S,et al. Pirfenidone ameliorates lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation[J]. Mol Immunol,2018,99(6):134-44.
- [4] 季鹏,赵文明,于桐.柚皮素的最新研究进展[J].中国新药杂志,2015,5(12):67-1.
- [5] 谢发江,邓莉,李燕,等.柚皮素下调 RhoA/ROCK 信号通路改善糖尿病小鼠心肌纤维化机制探讨[J].中药新药与临床药理,2019,30(6):671-7.
- [6] Hernández-Aquino E,Quezada-Ramírez M A,Silva-Olivares A,et al. Naringenin attenuates the progression of liver fibrosis via inactivation of hepatic stellate cells and profibrogenic pathways[J]. Eur J Pharmacol,2019,8(6):172-8.
- [7] Meng X M,Zhang Y,Huang X R,et al. Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- $\beta$ /Smad signaling with the combination of asiatic acid and naringenin[J]. Oncotarget,2015,6(35):36984-97.
- [8] 谢小丽,李俊.5,7,3'-三乙酰橙皮素对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响及作用机制[J].安徽医科大学学报,2018,53

- (8): 1245–51.
- [9] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Resp Dis*, 1979, 120(4): 893–9.
- [10] Lasithiotaki I, Giannarakis I, Tsitoura E, et al. NLRP3 inflammatory expression in idiopathic pulmonary fibrosis and rheumatoid lung [J]. *Eur Respir J*, 2016, 47(3): 910–8.
- [11] Lin Y, Tan D, Kan Q, et al. The protective effect of naringenin on airway remodeling after mycoplasma pneumoniae infection by inhibiting autophagy-mediated lung inflammation and fibrosis [J]. *Mediat Inflamm*, 2018(3): 875–9.
- [12] Chen C, Wei Y Z, He X M, et al. Naringenin produces neuroprotection against LPS-induced dopamine neurotoxicity via the inhibition of microglial NLRP3 inflammasome activation [J]. *Front Immunol*, 2019, 10(1): 936–42.
- [13] 付 钰, 吴 瑕, 陈随清. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 94–9.
- [14] Gao Y, Li L, Xu L, et al. Advances of active components in traditional Chinese medicine for treating pulmonary fibrosis and the preventive mechanisms [J]. *Clin J Tradit Chin Med*, 2018, 30(2): 183–90.
- [15] 胡 侃, 杨永寿, 何正春. 美洲大蠊提取物对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的疗效研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(2): 129–33.
- [16] Masola V, Carraro A, Granata S, et al. *In vitro* effects of interleukin (IL)-1 $\beta$  inhibition on the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular and hepatic stellate cells [J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 12–9.
- [17] Liu X, Long X, Liu W, et al. Type I collagen induces mesenchymal cell differentiation into myofibroblasts through YAP-induced TGF- $\beta$ 1 activation [J]. *Biochimie*, 2018, 150(2): 110–30.

## Effect of naringin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and its mechanism

Jiang Yifang<sup>1</sup>, Fan Xiaojie<sup>2</sup>, Liu Xiao<sup>3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Respiratory medicine, <sup>2</sup>Dept of Orthopaedic, <sup>3</sup>Dept of Infection-Control, Aspiration Medicine of The Fourth Hospital of Hebei Medical University Hebei Cancer Hospital, Shijiazhuang 050011)

**Abstract Objective** To investigate the effect of Naringin (NAR) on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice and its possible mechanism. **Methods** Sixty male ICR mice were randomly divided into Control group, Model group, dexamethasone group (DXM, 3 mg/kg), low-dose naringin group (L-NAR, 25 mg/kg) and high-dose naringin group (H-NAR, 100 mg/kg), with 12 mice in each group. Mouse pulmonary fibrosis model was established by intratracheal one-time infusion of bleomycin (5 mg/kg), and mice were sacrificed after 4 weeks of drug intervention. Lung mass was taken and lung index was calculated. Levels of hydroxyproline (HYP) in lung tissue were detected by alkaline hydrolysis. The pathological changes of lung tissues were observed and scored by HE staining. The degree of pulmonary fibrosis was observed and scored by Masson staining. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-18, TGF- $\beta$ 1 in lung tissue were detected by ELISA. The expression levels of NLRP3, ASC and caspase-1 mRNA in lung tissues were detected by RT-PCR. The protein expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, Collagen I,  $\alpha$ -SMA, E-cadherin and Vimentin in lung tissues were detected by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the Model group showed significant lung tissue damage and severe degree of fibrosis, the lung index and lung tissue contents of HYP, IL-1 $\beta$ , IL-18 and TGF- $\beta$ 1 increased. The mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, as the well as the protein expression levels of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and Vimentin increased, while the expression levels of E-cadherin significantly decreased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the Model group, the degree of lung injury and fibrosis were significantly improved in the DXM group and the H-NAR group. The lung index and lung tissue contents of HYP, IL-1 $\beta$ , IL-18 and TGF- $\beta$ 1 decreased. The mRNA and protein expression levels of NLRP3, ASC, caspase-1, as the well as the protein expression levels of Collagen I,  $\alpha$ -SMA and Vimentin decreased, while the expression levels of E-cadherin increased, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). However, there was no significant difference in relevant indicators between the L-NAR group and the Model group. **Conclusion** NAR can effectively inhibit bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, and the mechanism may be related to the inhibition of NLRP3 inflammatory corpuscles activation.

**Key words** naringenin; pulmonary fibrosis; bleomycin; NLRP3 inflammatory corpuscles