

网络出版时间: 2017-10-16 9:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20171016.0920.018.html>

## β-葡聚糖抑制大鼠硅肺纤维化损伤的机制研究

王 路, 孙 悦, 刘嘉祺, 彭子荷, 郝小惠, 徐 洪, 刘和亮

**摘要** 目的 探讨 β-葡聚糖通过对氧化应激的调节, 抑制大鼠硅肺纤维化的作用及其机制。方法 采用动式染尘法制作大鼠硅肺模型, 实验分组为: 对照组、模型组、β-葡聚糖前处理组、β-葡聚糖后处理组。HE 染色观察肺组织病理形态, 检测各组大鼠肺组织及血清的丙二醛 (MDA) 表达、过氧化氢酶 (CAT) 以及还原型谷胱甘肽 (GSH) 表达; 采用 Western blot 法检测肺组织内 I 型胶原、α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA)、硫氧还蛋白-1 (TRX-1) 的表达。结果 与对照组相比, 模型组有典型的矽结节形成, α-SMA 阳性染色明显, 而 β-葡聚糖前、后处理组均能够显著抑制大鼠肺纤维化程度。与对照组相比, 模型组肺组织、血清中 MDA 含量明显上调, 而血清中 CAT 及肺组织中 GSH 含量增高, 同时伴有 I 型胶原、α-SMA 蛋白水平的上调和 TRX-1 蛋白水平的下调 ( $P < 0.05$ ); 而予以 β-葡聚糖前处理和后处理, 均能够显著抑制二氧化硅引起的上述病变, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 β-葡聚糖可能通过上调 TRX-1 表达, 拮抗氧化应激损伤, 从而抑制硅肺纤维化的发生与发展。

**关键词** β-葡聚糖; 氧化应激; 硫氧还蛋白-1; 硅肺

**中图分类号** R 135.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)12-1829-04  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.12.018

2017-08-16 接收

**基金项目**: 国家自然科学基金 (编号: 81673119); 唐山市科技计划项目 (编号: 14160201B); 河北省卫计委医学科学研究项目 (编号: 20160717); 华北理工大学大学生创新项目 (编号: X2016215)

**作者单位**: 华北理工大学医学实验研究中心、老年医学国际科技合作基地, 唐山 063000

**作者简介**: 王 路, 女, 在读本科生;

刘和亮, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 2498022497@qq.com

硅肺病是我国最严重的职业病, 其发病机制复杂。近来研究<sup>[1-2]</sup>显示, 氧化应激损伤在硅肺纤维化发生、发展中起到了重要的调控作用, 可能是治疗硅肺纤维化的一个潜在靶向。β-葡聚糖是许多植物、细菌和真菌细胞壁的主要多糖成分, 具有抗氧化应激损伤、降血脂、降血糖、提高机体免疫力等多种生物活性作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明, β-葡聚糖能有效抑制博来霉素诱导的早期肺纤维化病变, 而对硅肺纤维化是否具有抑制作用还未见报道。该研究拟通过动式染尘构建硅肺大鼠模型, 观察 β-葡聚糖通过对氧化应激损伤的调控, 抑制硅肺大鼠肌成纤维细胞转化和胶原沉积的作用, 为将 β-葡聚糖开发为一种新的抗硅肺纤维化的药物提供一定的理论和实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** SiO<sub>2</sub> (99% 粒径  $< 5 \mu\text{m}$ )、β-葡聚糖 (β-1,3-Glucan)、硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX)-1 一抗 (美国 Sigma 公司); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒、还原型谷胱甘肽 (reduced glutathione, GSH) 试剂盒 (南京建成生物有限公司); α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, SMA) 一抗 (美国 abcam 公司); I 型胶原、GAPDH (武汉博士德生物有限公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物及模型制作** SPF 成年雄性 Wistar 大鼠 40 只, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 (SCXK 京 2009-0004), 180 ~ 220 g, 于华北理工大学动物实验中心屏障实验室 (SYXK 冀 2010-0038)

ALT, triglyceride, total cholesterol, highdensity lipoprotein and the content of MDA in liver tissue were significantly increased ( $P < 0.01$ ), T-SOD and GSH-Px were decreased ( $P < 0.01$ ). Liver pathological injury was obvious and the protein expression levels of IRS-2, PI3K, p-AKT, GLUT4 in liver tissue were decreased. Compared with the model group, AS-IV (20, 40, 80 mg/kg) group significantly improved the above indexes, reduced the injury of liver tissue and increased the protein expression levels of IRS-2, PI3K, p-AKT and GLUT4. **Conclusion** AS-IV has protective effect on liver injury in diabetic rats and the mechanism underlying. And the mechanism underlying may be related to anti-oxidative and up-regulation of PI3K / AKT signal pathway in liver.

**Key words** astragaloside IV; diabetes mellitus; liver; PI3K/AKT signaling pathway

饲养。采用 HOPE-MED 8050 动式染毒控制系统(天津开发区合普工贸有限公司)进行动式染尘。染毒室容积  $0.3 \text{ m}^3$ , 柜内温度  $20 \sim 25^\circ\text{C}$ , 湿度  $70\% \sim 75\%$ , 压力  $-50 \text{ Pa} \sim +50 \text{ Pa}$ , 氧气浓度  $20\%$ ,  $\text{SiO}_2$  流动速  $3.0 \sim 3.5 \text{ ml/min}$ ,  $\text{SiO}_2$  浓度  $2000 \text{ mg/m}^3$  条件下染尘, 每天染尘  $2 \text{ h}$ 。实验分组为: ① 对照组: 不染尘,  $1 \text{ ml}$  生理盐水灌胃处理 6 个月; ② 模型组: 动式染尘,  $1 \text{ ml}$  生理盐水灌胃处理 6 个月; ③  $\beta$ -葡聚糖前处理组: 染尘前 72 h, 予以  $\beta$ -葡聚糖  $1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  ( $1 \text{ ml}$ ) 灌胃, 至染尘 6 个月; ④  $\beta$ -葡聚糖后处理组: 染尘 2 个月(期间生理盐水灌胃), 后给予  $\beta$ -葡聚糖灌胃处理至 6 个月结束。实验结束后, 腹主动脉取血, 右下肺固定、包埋切片, 行 HE 染色; 余组织  $-80^\circ\text{C}$  冻存。

**1.2.2 MDA、GSH、CAT 含量检测** 称取肺组织  $0.1 \text{ g}$ , 加入  $1 \text{ ml}$  制成  $10\%$  组织匀浆。取腹主动脉血, EDTA 抗凝  $2500 \text{ r/min}$  离心取上清液。采用硫代巴比妥法进行 MDA 含量检测, 微板法检测 GSH 含量, 可见光法检测 CAT 活力。实验方案按说明书进行。

**1.2.3 免疫组织化学染色法检测  $\alpha$ -SMA 的表达** 切片常规脱蜡至水, 高压修复,  $0.3\% \text{ H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶,  $\alpha$ -SMA ( $1:200$ )、TRX-1 ( $1:100$ )  $4^\circ\text{C}$  过夜, 二抗  $37^\circ\text{C}$ 、 $20 \text{ min}$ , DAB 显色, 镜下控制, 轻度复染, 常规脱水透明封片。

**1.2.4 Western blot 法检测 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 和 TRX-1 蛋白的表达** 提取肺组织蛋白, 考马斯亮蓝 (Bradford) 法测定蛋白浓度,  $10 \mu\text{g}/\text{泳道}$  聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转至 PVDF 膜,  $5\%$  牛血清白蛋白封闭  $1 \text{ h}$ , 一抗  $\alpha$ -SMA ( $1:500$ )、TRX-1 ( $1:1000$ )、I 型胶原 ( $1:500$ )、GAPDH ( $1:1000$ )  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜,  $1\% \text{ TBST}$  洗涤 3 次, 每次  $5 \text{ min}$ , 二抗 ( $1:5000$ )  $37^\circ\text{C}$  孵育  $1 \text{ h}$ ,  $1\% \text{ TBST}$  洗涤 3 次, 每次  $5 \text{ min}$ 。电化学发光显影(美国伯乐公司), 用 Image Lab 软件测定条带光密度值, 以目标蛋白与内参蛋白的比值作为蛋白的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 Levene 法行方差齐性检验, 氧化应激指标及各蛋白表达量的组间比较采用单因素方差分析。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠肺脏病理学改变和  $\alpha$ -SMA 表达** HE 染色结果显示, 对照组(图 1A)肺泡结构清晰,

肺泡壁薄, 无明显病变; 模型组(图 1B)可见肺泡间隔水肿、增宽, 肺泡腔和肺间质中大量炎症细胞浸润, 有典型的纤维细胞性矽结节的形成; 而  $\beta$ -葡聚糖前处理组(图 1C)和后处理组(图 1D)较模型组肺泡炎症反应程度减轻, 以细胞性矽结节形成为主, 且数量和大小显著低于模型组。免疫组织化学染色结果显示, 对照组(图 2A)无  $\alpha$ -SMA 阳性标记; 模型组(图 2B)  $\alpha$ -SMA 阳性标记的肌成纤维细胞主要位于矽结节, 尤以纤维细胞性矽结节为甚; 而  $\beta$ -葡聚糖前处理组(图 2C)和后处理组(图 2D)较模型组相比  $\alpha$ -SMA 阳性染色较弱且范围局限。

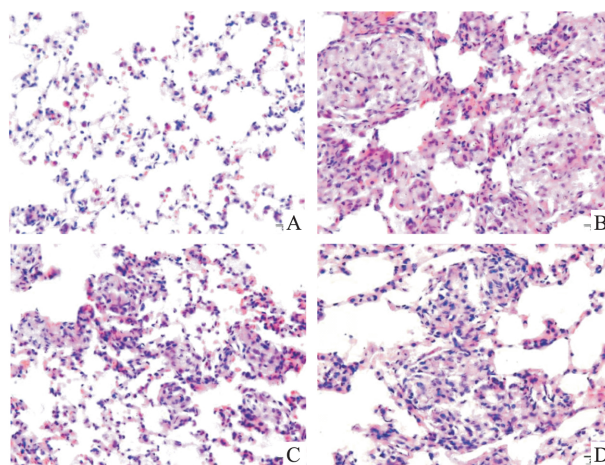


图1 各组大鼠肺脏组织病理学改变 HE  $\times 400$

A: 对照组; B: 模型组; C:  $\beta$ -葡聚糖前处理组; D:  $\beta$ -葡聚糖后处理组

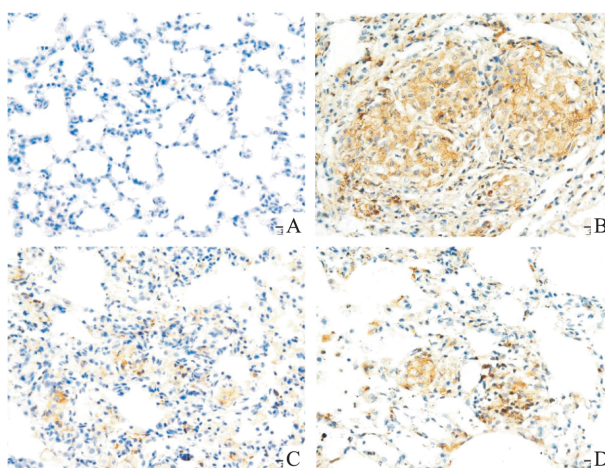


图2 各组大鼠肺脏组织  $\alpha$ -SMA 的表达 免疫组织化学染色  $\times 400$

A: 对照组; B: 模型组; C:  $\beta$ -葡聚糖前处理组; D:  $\beta$ -葡聚糖后处理组

## 2.2 各组大鼠肺组织及血清氧化应激指标变化

肺组织内模型组较对照组 MDA 含量增高, GSH 含量降低, 而  $\beta$ -葡聚糖前处理组和后处理组较模型组 MDA 含量下调, GSH 含量增高, 差异均有统计学意

义( $P < 0.05$ )。见表1。模型组血清MDA含量较对照组明显上调,而CAT活力降低, $\beta$ -葡聚糖前处理组和后处理组较模型组MDA含量显著下调,而CAT活力增高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );而 $\beta$ -葡聚糖前处理组与后处理组相比差异均无统计学意义。见表2。

表1 大鼠肺组织中MDA含量和GSH含量( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

组别	MDA含量 (nmol/mg prot)	GSH含量( $\mu$ mol/g prot)
对照	1.51 $\pm$ 0.12	8.47 $\pm$ 0.40
模型	2.39 $\pm$ 0.30*	4.34 $\pm$ 1.24*
$\beta$ -葡聚糖前处理	1.79 $\pm$ 0.15#	14.45 $\pm$ 3.75#
$\beta$ -葡聚糖后处理	1.74 $\pm$ 0.88#	13.10 $\pm$ 3.85#
F值	21.541	13.862
P值	0.000	0.000

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$

表2 大鼠血清中MDA含量和CAT活力( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

组别	MDA含量(nmol/ml)	CAT活力(U/ml)
对照	1.64 $\pm$ 0.33	12.46 $\pm$ 0.30
模型	4.09 $\pm$ 0.49*	6.17 $\pm$ 0.60*
$\beta$ -葡聚糖前处理	2.00 $\pm$ 0.43#	13.57 $\pm$ 2.19#
$\beta$ -葡聚糖后处理	2.09 $\pm$ 0.46#	13.21 $\pm$ 1.87#
F值	32.431	27.827
P值	0.000	0.000

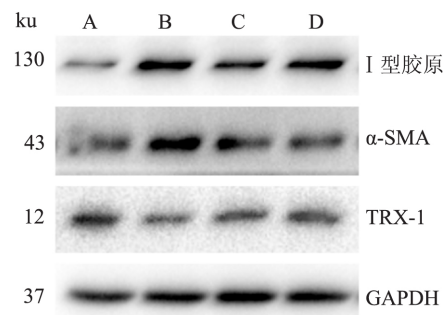
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$

**2.3 Western blot 法检测 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 和 TRX-1 蛋白表达** Western blot 结果显示,与对照组相比,模型组大鼠肺组织 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 蛋白表达明显上调,而 TRX-1 蛋白含量表达显著降低,而 $\beta$ -葡聚糖前处理组和后处理组与对照组相比,能够显著抑制 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 蛋白水平的上调,同时促进 TRX-1 蛋白含量表达上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); $\beta$ -葡聚糖前处理组与后处理组相比差异无统计学意义。见表3、图3。

表3 肺组织中 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 和 TRX-1 蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

组别	I 型胶原	$\alpha$ -SMA	TRX-1
对照	0.21 $\pm$ 0.10	0.24 $\pm$ 0.06	0.66 $\pm$ 0.24
模型	1.57 $\pm$ 0.33*	1.56 $\pm$ 0.33*	0.16 $\pm$ 0.04
$\beta$ -葡聚糖前处理	0.53 $\pm$ 0.08#	0.39 $\pm$ 0.12#	0.56 $\pm$ 0.16
$\beta$ -葡聚糖后处理	0.82 $\pm$ 0.46#	0.39 $\pm$ 0.13#	0.53 $\pm$ 0.10
F值	24.496	31.341	5.93
P值	0.000	0.000	0.000

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较: #  $P < 0.05$

图3 各组大鼠肺脏 I 型胶原、 $\alpha$ -SMA 和 TRX-1 蛋白表达

A:对照组;B:模型组;C: $\beta$ -葡聚糖前处理组;D: $\beta$ -葡聚糖后处理组

### 3 讨论

$\beta$ -葡聚糖具有抗氧化应激损伤的作用,对多种纤维化疾病具有较为明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。在大鼠压疮模型中,予以 $\beta$ -葡聚糖外敷能够显著抑制MDA和髓过氧化物酶含量的增加,促进GSH含量的增高,有效减轻皮损;而口服 $\beta$ -葡聚糖能够显著改善肝功能,抑制缺血再灌注损伤导致全身的和局部的病变<sup>[5]</sup>。在缘虫导致的肝纤维化模型中, $\beta$ -葡聚糖与吡嗪酮联用能够显著改善肝功能,发挥保护肝细胞和抑制肝纤维化的作用<sup>[6]</sup>。 $\beta$ -葡聚糖还能够显著抑制博来霉素诱导的肺纤维化病变程度和胶原沉积(羟脯氨酸)、MDA含量,并促进GSH活性的上调<sup>[4]</sup>。在本研究中,实验结果显示 $\beta$ -葡聚糖前、后处理组纤维化程度较模型组显著降低,同时肺组织、血清中MDA含量明显下降,肺组织GSH和血清中CAT含量明显增加,差异有统计学意义。提示 $\beta$ -葡聚糖能够通过氧化应激损伤的抑制,从而发挥抗硅肺纤维化的作用。

此外,本研究还显示 $\beta$ -葡聚糖还能够通过上调TRX-1蛋白发挥拮抗氧化应激损伤的作用。已有研究<sup>[7]</sup>显示,在博来霉素大鼠纤维化模型中,TRX-1硝基化修饰水平明显上调,提示TRX-1的失活与纤维化进程关系密切。亦有研究<sup>[8]</sup>显示硫化氢能够通过调节TRX-1蛋白的调节,抑制吸烟介导的氧化应激损伤,减轻大鼠肺部炎症和纤维化病变。而外源性予以血清白蛋白TRX-1融合蛋白,则能够抑制肺部炎症,降低转化生长因子水平和氧化应激相关指标,从而拮抗博来霉素所致的大鼠肺纤维化<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,TRX-1在动式染尘大鼠模型中表达显著下调,同时伴随着肌成纤维细胞分化指标 $\alpha$ -SMA

和 I 型胶原蛋白表达的上调,而  $\beta$ -葡聚糖前处理和后处理均能够显著抑制染尘大鼠肌成纤维细胞分化和胶原沉积,同时促进了 TRX-1 蛋白表达的上调。

综上所述,在硅肺发生、发展中,氧化应激损伤可能是重要的调控机制之一,伴随了 TRX-1 这一抗氧化应激损伤蛋白水平的下调。而  $\beta$ -葡聚糖能够通过调节氧化应激损伤,抑制肌成纤维细胞分化和胶原沉积,从而发挥了拮抗硅肺大鼠纤维化的作用。

### 参考文献

- [1] Harijith A, Ebenezer D L, Natarajan V. Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation [J]. *Front Physiol*, 2014, 5:352.
- [2] Gulumian M, Borm P J, Vallyathan V, et al. Mechanistically identified suitable biomarkers of exposure, effect, and susceptibility for silicosis and coal-worker's pneumoconiosis: a comprehensive review [J]. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2006, 9(5): 357-95.
- [3] Vetvicka V. Effects of  $\beta$ -glucan on some environmental toxins: an overview [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2014, 158(1):1-4.
- [4] Iraz M, Bilgic S, Samdanci E, et al. Preventive and early therapeutic effects of  $\beta$ -glucan on the bleomycin-induced lung fibrosis in rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 39(8):1505-16.
- [5] Sener G, Sert G, Ozer Sehirli A, et al. Pressure ulcer-induced oxidative organ injury is ameliorated by beta-glucan treatment in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(5):724-32.
- [6] Velebný S, Hreckova G, Kogan G. Impact of treatment with praziquantel, silymarin and/or beta-glucan on pathophysiological markers of liver damage and fibrosis in mice infected with *Mesocostoides vogae* (Cestoda) tetrathyridia [J]. *J Helminthol*, 2008, 82(3):211-9.
- [7] Wang L, Song Y, Li X, et al. Role of thioredoxin nitration in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(1):59-64.
- [8] Zhou X, An G, Chen J. Inhibitory effects of hydrogen sulphide on pulmonary fibrosis in smoking rats *via* attenuation of oxidative stress and inflammation [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(6):1098-103.
- [9] Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, et al. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 345(2):271-83.

## The mechanism study of $\beta$ -glucan on inhibiting lung fibrosis in rats induced by $\text{SiO}_2$

Wang Lu, Sun Yue, Liu Jiaqi, et al

(Medical Research Center, Geriatric International Scientific and Technological Cooperation Base, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

**Abstract Objective** To investigate the effect of  $\beta$ -glucan on the inhibition of pulmonary fibrosis in rats and potential oxidative stress mechanism. **Methods** Silicotic model was made by inhaled  $\text{SiO}_2$  in a dynamic manner. Rats were divided into four groups: control group, silicosis group,  $\beta$ -glucan pre-treatment and post-treatment group. The pathological morphology of lung was observed by HE staining. The levels of MDA, CAT and GSH in lung tissue or in serum were measured for evaluating the degree of oxidative stress. The expression of collagen type I,  $\alpha$ -SMA and TRX-1 were detected by Western blot. **Results** Compared with control group, the silicotic lesions were observed in rats exposed to silica with positive expression of  $\alpha$ -SMA. Pre-treatment and post-treatment with  $\beta$ -glucan could alleviate the pathologic changes in silicotic group. The level of MDA in lung and serum were increased accompanied with down-regulation of CAT in serum and GSH in lung tissue of silicotic group. Moreover, the expression of collagen type I and  $\alpha$ -SMA in silicotic group were higher than those in control group with down-regulation of TRX-1 ( $P < 0.05$ ). Pre-treatment and post-treatment with  $\beta$ -glucan could alleviate all these changes in rats exposed to  $\text{SiO}_2$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion**  $\beta$ -glucan may inhibit the development and progression of pulmonary fibrosis by up-regulating TRX-1 expression and anti-oxidative stress injury.

**Key words**  $\beta$ -glucan; oxidative stress; thioredoxin; silicosis