

# 姜黄素对百草枯中毒致肺纤维化大鼠肺功能及 TGF-β1、NF-κB 表达的影响

唐艳 杨蓉佳 陈红纲 付晓燕 许筠 冯友繁 刘世杰 张世魁 侯丽君

**【摘要】目的** 观察姜黄素对百草枯中毒致肺纤维化大鼠肺功能及 TGF-β1、NF-κB 的影响, 为其临床应用提供理论依据。**方法** SPF 级 Wistar 大鼠 72 只随机 (随机数字法) 分为百草枯染毒组 (百草枯 50 mg/kg 一次性灌胃染毒)、姜黄素治疗组 (百草枯染毒后 30 min 给予姜黄素 200 mg/kg 一次性腹腔内注射), 空白对照组 (相同时间点注射等体积生理盐水)。常规饲养 14 d 后观察大鼠肺功能, 免疫组化法检测转化生长因子-β1 (TGF-β1)、核因子-κB (NF-κB) 蛋白的表达。**结果** 姜黄素干预组动物生存率 41.67%, 百草枯中毒组生存率 70.83%, 两组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与空白对照组相比, 百草枯染毒组 TE (呼气时间)、PIF (吸气峰流量)、PEF (呼气峰流量)、EF50 (呼出 50% 气量时的流速)、TV (潮气量)、F (呼吸频率) 等肺功能指标均下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 与百草枯染毒组比较, 姜黄素治疗组 Te、PEF、TV、F 均升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 大鼠肺组织中 TGF-β1、NF-κB 在空白对照组有少量表达, 与空白对照组比, 百草枯染毒组表达明显增强 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 姜黄素治疗组与百草枯染毒组比较, TGF-β1、NF-κB 表达显著减弱 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); **结论** 抑制肺组织中 TGF-β1、NF-κB 的过度表达, 是姜黄素减轻百草枯中毒肺纤维化程度的作用机制之一。

**【关键词】** 百草枯; 肺纤维化; 姜黄素; 肺功能; 转化生长因子-β1; 核因子-κB

## Effects of curcumin on pulmonary functions and the expression of TGF-β1 and NF-κB of paraquat-induced pulmonary fibrosis of rats

Tang Yan, Yang Rongjia, Chen Honggang, Fu Xiaoyan, Xu Jun, Feng Youfan, Liu Shijie, Zhang Shikui, Hou Lijun

Emergency Department, The Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730046, China (Tang Y, Xu J, Liu SJ, HouLJ); Emergency Department, The Gansu Province People's Hospital, Lanzhou 730000, China (Yang RJ, Chen HG, Feng YF, Zhang SK); Out-patient Department, The First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China (Fu XY)

Corresponding author: Yang Rongjia, Email: 13909447906@163.com

**【Abstract】 Objective** To discuss the effects and the possible mechanism of curcumin on pulmonary functions and expression of TGF-β1 and NF-κB in paraquat-induced pulmonary fibrosis of rats. **Methods** SPF Wistar rats were randomly (random number) divided into three groups: paraquat-poisoned group (PQ group, with PQ 50 mg/kg by gavage), Curcumin-treatment group (PC group after 30, with curcumin (200 mg/kg) by intraperitoneal injection), and Blank group (B group, with same volume of sterile saline at the same time). After 14 d, the lung function of rats was observed, and the expression of TGF-β1 and NF-κB protein were detected by immunohistochemistry. **Results** The survival rates of mice significant difference in the PC and PQ groups with (70.83% vs. 41.67%,  $P < 0.05$ ). Compared with the B group,

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.04.007

基金项目: 兰州市卫生科技发展项目 (LZWSKY2014-2-18)

作者单位: 730046 兰州, 兰州市第二人民医院急诊科 (唐艳、许筠、刘世杰、侯丽君); 730000 兰州, 甘肃省人民医院急诊科 (杨蓉佳、陈红纲、冯友繁、张世魁); 730000 兰州, 兰州大学第一医院门诊部 (付晓燕)

通信作者: 杨蓉佳, Email: 13909447906@163.com

lung function index (Te, PIF, PEF, EF50, TV, F) of PQ group significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the PQ group, lung function index (Te, PEF, TV, F) of PC group significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There are some expression of lung tissues of rats with TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B in B group. Compared with B group, PQ group significantly enhanced ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with the PQ, PC group significantly decreased ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Curcumin can relieve paraquat-induced pulmonary fibrosis by inhibiting the over expression of TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B in lung tissue of rats.

**[Key words]** Paraquat; Pulmonary fibrosis; Curcumin; Pulmonary functions; TGF- $\beta$ 1; NF- $\kappa$ B 懂

百草枯 (paraquat) 是目前广泛使用的除草剂。对人畜毒性较强, 可以引起肝、肾、肺等主要脏器损害。其中肺组织纤维化损害最为严重, 并呈现进行性发展过程<sup>[1]</sup>。百草枯对人体损害极大, 文献报道急性中毒病死率高达 75% ~ 80%<sup>[2]</sup>, 但目前缺乏特效解毒剂以及有效治疗手段。大剂量百草枯中毒者可在短期内出现多脏器功能障碍伴微循环障碍, 是百草枯中毒患者早期死亡的主要原因, 若能度过急性期, 患者晚期多死于肺间质纤维化所致的呼吸衰竭<sup>[3-5]</sup>。

姜黄素 (curcumin) 是从中药姜黄中提取的一种酚性色素, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用, 近期的研究发现它抗纤维化作用明显<sup>[6]</sup>。本实验研究应用 WPB PLT-UNR-RT-2 型动物肺功能检测系统检测百草枯致肺纤维化大鼠肺功能, 同时应用免疫组化法检测肺组织中 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 表达水平, 初步探讨姜黄素抗肺纤维化的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组

72 只 SPF 级 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体质量 (200 ± 20) g, 甘肃中医药大学科研实验中心提供, 动物质量合格证号: 62001000000165; 许可证号: SCXK (甘) 2011-0001。各组大鼠适应性喂养 3 d, 随机 (随机数字表法) 分为空白对照组, 百草枯染毒组, 姜黄素治疗组, 每组 24 只。

### 1.2 模型制备及给药

百草枯染毒组及姜黄素治疗组给予百草枯 (50 mg/kg) (北京华都生物科技) 一次性灌胃染毒复制百草枯中毒模型之后, 空白对照组大鼠给予蒸馏水灌胃; 灌胃 30 min 后, 姜黄素治疗组给予姜黄素 (Sigma 公司) 200 mg/kg 一次性腹腔注射, 空白对照组、百草枯染毒组注射等体积生理盐水。常规饲养 14 d。

### 1.3 肺功能检测

实验第 14 天, 运用 WPB PLT-UNR-RT-2 型动物肺功能检测系统 (法国 EMKA 公司) 检测各组大鼠肺功能, 启动 IOX 数据采集系统软件, 调试设备, 确保系统处于正常工作状态。将大鼠分批放入动物体积描记箱中, 等动物安静后, 记录肺功能数据, 包括 TI (吸气时间)、TE (呼气时间)、PIF (吸气峰流量)、PEF (呼气峰流量)、EF50 (呼出 50% 气量时的流速)、TV (潮气量)、F (呼吸频率), 统计数据。

### 1.4 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 表达的测定

各组大鼠于肺功能实验结束后, 处死大鼠, 剪开胸腔, 小心分离肺组织, 取右肺组织制备病理切片后免疫组化法检测 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B (北京博奥森生物技术有限公司) 的表达。蛋白表达阳性结果的判定标准: 细胞中未出现棕黄色颗粒, 则表达视为阴性。细胞内出现棕黄色颗粒, 颜色越深表达越强。在图像分析系统 (CX21 型生物显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; Mi E 图像处理系统, 山东易创电子有限公司; BI-2000 医学图像分析系统, 成都泰盟科技有限公司) 20 倍物镜下, 每张切片从四周和中间随机选取 5 个视野, 测定肺组织内 TGF- $\beta$ 1 及 NF- $\kappa$ B 表达颗粒的积分吸光度, 取其平均值作为该只大鼠的肺组织 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达量。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较行方差分析, 以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 实验动物一般情况观察结果

PQ 组动物在一次性灌胃染毒后 30 min 至 4 h 逐渐出现中毒反应, 出现呼吸急促、进食进量减少或不进食水、精神反应差、行为灵敏度降低、行动

协调性差、攻击性低、少动、毛蓬松、毛色污秽、鼠尾发绀、口鼻可见血性分泌物、腹泻等表现。中毒表现以 1~7 d 最明显。实验动物均出现体质量下降或不增,甚至部分动物在 1~14 d 可闻及较明显的干湿啰音。PC 组动物染毒后中毒反应较 PQ 组明显减轻,进食水较正常,体质量下降不明显,未见腹泻及口鼻出血,精神好,反应较灵敏,毛色较洁净,较少出现呼吸急促、鼠尾发绀等表现。

## 2.2 动物的生存率差异

14 d 后, PQ 组动物生存率为 41.67%, PC 组

生存率为 70.83%, 经  $\chi^2$  检验两组生存率的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.3 肺功能测定

与空白对照组相比,百草枯染毒组 Te、PIF、PEF、EF50、TV、F 等肺功能指标均下降,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Ti 指标变化不明显 ( $P > 0.05$ )。与百草枯染毒组比较,姜黄素治疗组的 Te、PEF、TV、F 均升高,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Ti、PIF、EF50 指标变化不明显 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 姜黄素对肺纤维化大鼠肺功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of curcumin on respiratory function of pulmonary fibrosis in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Ti (ms)	Te (ms)	PIF (mL/s)	PEF (mL/s)	EF50 (mL/s)	TV (mL)	F (次/min)
空白对照组	24	103.32 ± 21.67	149.21 ± 23.38	61.49 ± 12.83	78.45 ± 21.66	29.77 ± 11.03	2.81 ± 0.47	132.56 ± 31.21
百草枯染毒组	10	99.54 ± 19.80	115.73 ± 21.55 <sup>a</sup>	38.37 ± 15.28 <sup>b</sup>	51.76 ± 18.32 <sup>a</sup>	12.43 ± 9.87 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.33 <sup>b</sup>	186.45 ± 24.34 <sup>a</sup>
姜黄素治疗组	17	97.62 ± 15.44	138.89 ± 34.51 <sup>c</sup>	37.23 ± 13.66 <sup>d</sup>	65.39 ± 21.12 <sup>c</sup>	14.87 ± 10.81 <sup>d</sup>	2.34 ± 0.19 <sup>c</sup>	145.99 ± 20.17 <sup>d</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$

## 2.4 TGF- $\beta$ 1 蛋白含量的测定

镜下显示,空白对照组大鼠少数细支气管黏膜上皮细胞的胞浆可见 TGF- $\beta$ 1 蛋白少量表达;百草枯染毒组大鼠肺泡巨噬细胞、浸润的炎细胞、内皮细胞及肺泡上皮细胞均有 TGF- $\beta$ 1 表达,与空白对照组比较明显增强 ( $P < 0.01$ );姜黄素治疗组与百草枯染毒组比较, TGF- $\beta$ 1 表达显著减弱 ( $P < 0.01$ ); 见图 1, 表 2。

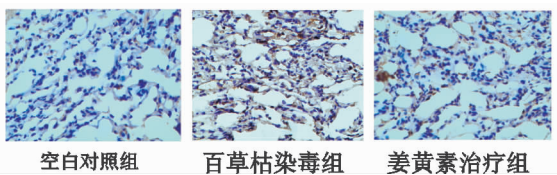


图 1 各组大鼠肺组织 TGF- $\beta$ 1 蛋白表达的免疫组化 (SABC × 400)

Fig 1 The expression of TGF- $\beta$ 1 in the lung of rats detected by immunohistochemistry (SABC × 400)

## 2.5 NF- $\kappa$ B 蛋白含量的测定

空白对照组大鼠肺组织中仅有少数细胞胞浆被染成浅黄色,而模型组大鼠肺组织细胞的阳性表达呈棕黄色,支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞和肺泡上皮细胞及肺间质中均有表达,与空白对照组比较表达明显增强 ( $P < 0.05$ );姜黄素治疗组与百草枯染毒组比较, NF- $\kappa$ B 表达显著减弱 ( $P < 0.05$ ); 见图 2, 表 2。

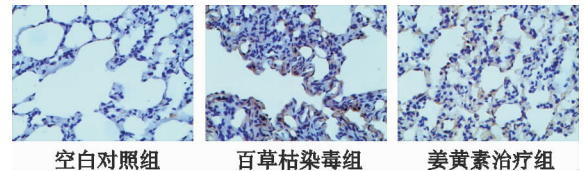


图 2 各组大鼠肺组织 NF- $\kappa$ B 蛋白表达的免疫组化 (SABC × 400)

Fig 2 The expression of NF- $\kappa$ B in the lung of rats detected by immunohistochemistry (SABC × 400)

表 2 各组大鼠肺组织 TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 的平均吸光度值 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 MOD of TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B in the lung of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TGF- $\beta$ 1 (MOD 值)	NF- $\kappa$ B (MOD 值)
空白对照组	12	4.15 ± 0.52	0.54 ± 0.06
百草枯染毒组	9	29.72 ± 4.27 <sup>b</sup>	1.35 ± 0.04 <sup>a</sup>
姜黄素治疗组	10	15.46 ± 2.89 <sup>d</sup>	0.78 ± 0.06 <sup>c</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$

## 3 讨论

百草枯中毒的主要靶器官是肺脏,中毒特征改变是急性肺损伤,主要是由于 I 型和 II 型上皮细胞早期的破坏和肺炎、肺水肿、炎症细胞浸润所致,并最终引起肺纤维化<sup>[7]</sup>。肺纤维化是细胞外基质的过度沉积的过程,涉及到细胞、细胞因子、细胞外基质等因素间的相互作用。是多种因素、多个环节参与的缓慢的错综复杂的过程<sup>[8]</sup>。转化生长因子  $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF-

$\beta 1$ ) 可以诱导胶原合成和基质改变, 在多种类型的肺间质纤维化中具有关键作用<sup>[9-10]</sup>。研究表明, 在肺间质纤维化过程中, 完全分化的上皮细胞在 TGF- $\beta 1$  作用下, 可发生表型改变, 转化成为成纤维细胞和肌成纤维细胞。在 PQ 中毒肺纤维化发生过程中, TGF- $\beta 1$  能显著增加 ECM 的合成, 减少其降解, 从而破坏 ECM 合成降解的动态平衡, 最终导致肺纤维化的形成<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B 是调控炎症反应的重要核转录因子, 可在多种细胞中被激活, 通过调节多种前炎性因子/趋化因子、粘附分子、生长因子的表达, 在应激反应、炎症和免疫反应等过程中发挥重要甚至中心作用<sup>[12]</sup>。是参与急性肺损伤和肺纤维化的重要因子<sup>[13]</sup>。姜黄素是从姜科姜黄属植物的根茎中提取的一种植物多酚。众多动物实验表明, 它有广泛的药理作用如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、降血脂等。Singh 等<sup>[14]</sup> 已证实姜黄素是 NF- $\kappa$ B 活化的高效抑制剂, 通过抑制 NF- $\kappa$ B 在多种急、慢性炎症疾病中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。

本实验检测的肺功能指标主要包括呼吸时间、呼吸速度指标、肺容量指标及呼吸频率等。上述指标可判断肺间质纤维化疾病中气道通畅性、通气功能、肺组织弹性和储存能力。实验结果表明, 百草枯染毒组 Te、PIF、PEF、EF50、TV、F 等肺功能指标均下降, 说明肺纤维化发生过程中, 大鼠的整体肺功能明显减弱。大鼠肺组织中 TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa$ B 在空白对照组有少量表达, 与空白对照组比, 百草枯染毒组表达明显增强, 说明 TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa$ B 均参与了百草枯中毒致肺纤维化的形成, 姜黄素治疗组的 Te、PEF、TV、F 均升高, 对大鼠肺的呼吸时间、呼吸速度指标、肺容量指标及呼吸频率等均有不同程度的改善作用; 姜黄素治疗组的 TGF- $\beta 1$ 、NF- $\kappa$ B 蛋白与百草枯染毒组比较, 含量亦显著减少。

综上所述, 抑制核因子  $\kappa$ B 活性, 减少 TGF- $\beta 1$  蛋白表达, 使炎症及纤维化病变减轻, 是姜黄素治疗百草枯中毒致肺纤维化的机制之一。

### 参 考 文 献

- [1] 王伯良, 涂艳阳, 钟霞, 等. 百草枯致大鼠多脏器损害的观察 [J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19 (12): 1296-1299. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2010. 12. 017.
- [2] 田英平, 石汉文, 佟飞, 等. 百草枯中毒的规范治疗 [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16 (5): 559-560.
- [3] 蒋丽, 张彧. 姜黄素对百草枯致肺纤维化的干预治疗临床研究 [J]. 医学综述, 2015, 21 (5): 883-885. DOI: 10. 3969/j. issn. 1006-2084. 2015. 05. 044.
- [4] Hong SY, Yang JO, Lee EY, et al. Effects of N-acetyl-L-cysteine and glutathione on antioxidant status of human serum and 3T3 fibroblasts [J]. J Korea Med Sci, 2003, 18 (5): 649-654.
- [5] 刘明伟, 苏美仙, 秦兰芳, 等. 阿托伐他汀对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响及机制研究 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28 (10): 862-866.
- [6] 方诗容, 李明伟, 覃仕鹤, 等. 姜黄素抗肺纤维化作用及机制研究进展 [J]. 临床医学工程, 2012, 19 (12): 2271-2272. DOI: 10. 3969/j. issn. 1674-4659. 2012. 12. 2271.
- [7] 孙健波, 顾鹏毅, 李刚, 等. 孟鲁司特对百草枯所致大鼠肺损伤的治疗作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21 (11): 1198-1204. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2012. 11. 003.
- [8] 李才. 器官纤维化基础与临床 [M]. 北京人民卫生出版社, 2003: 188-189.
- [9] Bartram U, Speer CP. The role of transforming growth factor- $\beta 1$  in lung development and disease [J]. Chest, 2004, 125 (2): 754-765.
- [10] Tarantal AF, Chen H, Shi TT, et al. Overexpression of TGF- $\beta 1$  in foetal monkey lung results in prenatal pulmonary fibrosis [J]. Eur Respir J, 2010, 29 (4): 186-207. DOI: 10. 1183/09031936. 00011810.
- [11] 董雪松, 刘盛业, 刘伟, 等. 百草枯致小鼠肺间质肺纤维化过程中转化生长因子- $\beta 1$  的表达 [J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20 (8): 828-829. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1671-0282. 2011. 08. 011
- [12] Lu L, Chen SS, Zhang JQ, et al. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B and its proinflammatory mediator cascade in the infarcted rat heart [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321 (4): 879-885. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2004. 07. 048.
- [13] Sadikot RT, Christman JW, Blackwell TS. Molecular targets for modulating lung inflammation and injury [J]. Curr Drug Targets, 2004, 5 (6): 581-588.
- [14] Singh SBA. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected] [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (42): 4995-5000.
- [15] Strimpakos A, Sharma R. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials [J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10 (3): 511-545. DOI: 10. 1089/ars. 2007. 1769.
- [16] Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF- $\kappa$ B, cyclooxygenase-2 lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases [J]. J Parenter Enteral Nutr, 2006, 30 (1): 45-51.

(收稿日期: 2016-09-24)

(本文编辑: 何小军)