



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110208526 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201910434771.4

C12Q 1/6851(2018.01)

(22)申请日 2019.05.23

(71)申请人 宁夏医科大学

地址 750001 宁夏回族自治区银川市兴庆区胜利街1160号

(72)发明人 刘志宏 孙岳 姜怡邓 杨安宁
蔺文轩 王宇欣 德小明

(74)专利代理机构 北京盛凡智荣知识产权代理有限公司 11616

代理人 王勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

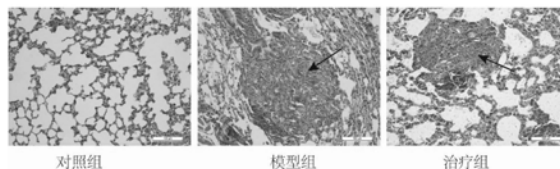
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用

(57)摘要

本发明公开了CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于,包括以下步骤:(1)设置对照组:选取SPF级6周龄雄性C57小鼠24只,体重20±2g,先适应性饲养一周后随机分为对照组、模型组、治疗组;模型组、治疗组采用气管内一次性滴注0.1mL SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型,对照组同法滴注等体积生理盐水;治疗组术后48h后每日给予0.1mL CoQ₁₀,灌胃,对照组、模型组自主进食。本发明具有如下优点:CoQ₁₀降低SiO₂诱导的矽肺纤维化,CoQ₁₀能够下调胶原蛋白、羟脯氨酸及α-SMA表达,其作用机制可能是反馈性调节内源性HMGCR表达,影响氧化呼吸链,为后续矽肺治疗的机制的研究提供了新视角。



对照组

模型组

治疗组

1. CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 设置参照组:选取SPF级6周龄雄性C57小鼠24只,体重 20 ± 2 g,先适应性饲养一周后随机分为对照组、模型组、治疗组;模型组、治疗组采用气管内一次性滴注0.1mL SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型,对照组同法滴注等体积生理盐水;治疗组术后48h后每日给予0.1mL CoQ₁₀,灌胃,对照组、模型组自主进食;

(2) 制备矽肺模型:将小鼠异氟烷麻醉后,暴露气管,分别于对照组滴注0.1mL生理盐水、模型组和治疗组分别气管内滴注0.1mL SiO₂悬液,然后缝合皮肤,观察小鼠生存状态;治疗组术后48h,每只小鼠每日给予0.1mL CoQ₁₀灌胃;60天后,用0.3mL 0.3%乌拉坦腹腔注射麻醉处死小鼠,取右肺中叶,再用生理盐水冲洗后用4%多聚甲醛固定,其余肺组织放入-80℃冰箱冻存;

(3) HE染色及天狼星红染色:当用4%多聚甲醛固定右肺中叶48h后,脱水,包埋,切片,切片厚度为8μm,在56℃条件下烤片6h后进行HE染色及天狼星红染色;

(4) 羟脯氨酸测定:用天平准确称取50mg冻存的小鼠肺组织,冰上剪碎,加入1mL水解液,在96℃条件下水浴,充分水解20min,流水冷却后,调节各管PH在6.0-6.8,加双蒸水至10mL混匀,加入适量活性炭,在3500rpm条件下离心10min,取上清1mL做检测;分别设空白管,标准管及检测管,依次滴加一、二、三号试剂,混匀后在60℃条件下水浴15min,冷却后在3500rpm条件下离心10min,取200μL上清于96孔板,利用酶标仪在波长550nm处检测各管吸光度值,计算各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量,并进行统计分析;

(5) 实时荧光定量PCR反应:称取各组小鼠肺组织,冰上剪碎,加入RZ裂解液,匀浆处理,提取各组小鼠肺组织总mRNA,使用微量分光光度计测量样品总RNA的浓度及纯度;将提取的mRNA逆转录为cDNA,cDNA产物浓度为0.5μg/10μL体系,逆转录条件为37℃,15min,85℃,5s;再进行实时荧光定量PCR反应,检测各组小鼠肺组织α-SMA,HMGCR在转录水平的表达差异,数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 对目的基因进行相对定量分析;

(6) 免疫组织化学:各组小鼠肺组织的石蜡切片用二甲苯脱蜡,2次每次10min,梯度酒精脱水:用100%酒精、2次每次5min,用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精,各1次,5min;用枸橼酸钠(PH=6)抗原热修复15min,再用山羊血清封闭10min,将α-SMA/HMGCR一抗孵育过夜,HRP标记的山羊抗兔/抗鼠二抗孵育30min,DAB显色6min,苏木素染色20s,流水冲洗2min,脱水、透明、封片,普通光镜显微镜下10倍物镜取图,观察各组α-SMA及HMGCR蛋白表达情况,以Image-Pro Plus 6.0统计阳性区域,结果以阳性区域IOD值与图片面积的比值进行定量;

(7) 统计:采用SPSS 20.0软件统计学分析,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析进行,组间两两比较采用LSD法,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2. 根据权利要求1所述的CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于:所述适应性饲养的饲养条件为12h光照,12h黑暗,温度(23 ± 1)℃,相对湿度50%~65%,自主饮水及进食。

3. 根据权利要求1所述的CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于:所述SiO₂悬液的浓度为50mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于:所述CoQ₁₀的浓度为0.2mg/mL。

5. 根据权利要求1所述的CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于:所述HE染色步骤

为：(1) 脱蜡：石蜡切片经二甲苯脱蜡，2次每次10min；(2) 梯度酒精脱水，使用100%酒精，2次每次5min，使用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精，各1次每次5min；(3) 蒸馏水洗3min；(4) 苏木素染色6min；(5) 蒸馏水冲洗10s；(6) 盐酸乙醇分化5s；(7) 蒸馏水冲洗3min；(8) 伊红染色5min；(9) 蒸馏水冲洗5s；(10) 85%酒精1次15s、95%酒精1次15s、100%酒精2次每次3min；(11) 二甲苯2次每次3min；(12) 中性树胶封片，光学显微镜检。

6. 根据权利要求1所述的CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用，其特征在于：所述天狼星红染色步骤位：(1) 脱蜡：石蜡切片经二甲苯脱蜡，2次每次10min；(2) 天狼星红染色液滴染40min；(3) 蒸馏水冲洗2min，去除表面染液，常规脱水透明；(4) 中性树胶封片，观察小鼠肺组织纤维化改变。

CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医学工程技术领域,具体是指一种CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用。

背景技术

[0002] 目前,我国累计报告尘肺病超过85万余例,其中矽肺占比50%以上。其特征表现为SiO₂颗粒被吸入肺内,刺激肺组织启动自我修复机制,激活成纤维细胞产生胶原纤维。然而,当肺组织受到反复或过度刺激时,成纤维细胞异常增殖并分泌大量胶原纤维,导致肺间质胶原过度沉积,并使肺间质增厚出现纤维化。临床治疗主要集中于支气管肺泡灌洗术合并抗纤维化与并发症对症治疗,同时给予氧疗、心理辅导等综合治疗策略,但并无特效治疗方案,因此,是否能在现有药物宝库中挖掘更安全、更方便、同时兼得预防和治疗等多方面优势的新药,对于减轻患者症状,减轻社会负担具有重要意义。

[0003] CoQ₁₀由于具有抗氧化,抗纤维化,清除自由基,扩张血管,抗炎等作用,广泛用于降低血液粘度,改善冠状动脉血运重建缺血和再灌注损伤。研究发现CoQ₁₀能够通过抑制TGFβ-1表达并抑制肝纤维化,同时CoQ₁₀还能够缓解精氨酸诱导的胰腺纤维化,降低胰腺组织胶原沉积。

发明内容

[0004] 为解决上述关键问题,本发明提供的技术方案为CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用,其特征在于,包括以下步骤:

[0005] (1) 设置参照组:选取SPF级6周龄雄性C57小鼠24只,体重20±2g,先适应性饲养一周后随机分为对照组、模型组、治疗组;模型组、治疗组采用气管内一次性滴注0.1mL SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型,对照组同法滴注等体积生理盐水;治疗组术后48h后按照每日给予0.1mL CoQ₁₀ (0.2mg/mL),灌胃,对照组、模型组自主进食;

[0006] (2) 制备矽肺模型:将小鼠异氟烷麻醉后,暴露气管,分别于对照组滴注0.1mL生理盐水、模型组和治疗组分别气管内滴注0.1mL SiO₂悬液,然后缝合皮肤,观察小鼠生存状态;治疗组术后48h,每只小鼠每日给予0.1mL CoQ₁₀灌胃;60天后,用0.3mL 0.3%乌拉坦腹腔注射麻醉处死小鼠,取右肺中叶,再用生理盐水冲洗后用4%多聚甲醛固定,其余肺组织置于-80℃冰箱冻存;

[0007] (3) HE染色及天狼星红染色:小鼠肺组织用4%多聚甲醛固定右肺中叶48h后,脱水,包埋,切片,切片厚度为8μm,在56℃条件下烤片6h后进行HE染色及天狼星红染色;

[0008] (4) 羟脯氨酸测定:用天平准确称取50mg冻存的小鼠肺组织,冰上剪碎,加入1mL水解液,在96℃条件下水浴,充分水解20min,流水冷却后,调节各管PH在6.0-6.8,加双蒸水至10mL混匀,加入适量活性炭,在3500rpm条件下离心10min,取上清1mL做检测;分别设空白管,标准管及检测管,依次滴加一、二、三号试剂,混匀后在60℃条件下水浴15min,冷却后在3500rpm条件下离心10min,取200μL上清于96孔板,利用酶标仪在波长550nm处检测各管吸光度值,计算各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量,并进行统计分析;

[0009] (5) 实时荧光定量PCR反应:称取各组小鼠肺组织,冰上剪碎,加入RZ裂解液,匀浆处理,提取各组小鼠肺组织总mRNA,使用微量分光光度计测量样品总RNA的浓度及纯度;将提取的mRNA逆转录为cDNA,cDNA产物浓度为0.5 μ g/10 μ L体系,逆转录条件为37 $^{\circ}$ C,15min,85 $^{\circ}$ C,5s;再进行实时荧光定量PCR反应,检测各组小鼠肺组织 α -SMA,HMGCR在转录水平的表达差异,数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对目的基因进行相对定量分析;

[0010] (6) 免疫组织化学:各组小鼠肺组织的石蜡切片用二甲苯脱蜡,2次每次10min,梯度酒精脱水:用100%酒精、2次每次5min,用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精,各1次,5min;用枸橼酸钠(PH=6)抗原热修复15min,再用山羊血清封闭10min,将 α -SMA/HMGCR一抗孵育过夜,HRP标记的山羊抗兔/抗鼠二抗孵育30min,DAB显色6min,苏木素染色20s,流水冲洗2min,脱水、透明、封片,普通光镜显微镜下10倍物镜取图,观察各组 α -SMA及HMGCR蛋白表达情况,以Image-Pro Plus6.0统计阳性区域,结果以阳性区域IOD值与图片面积的比值进行定量;

[0011] (7) 统计:采用SPSS20.0软件统计学分析,各组数据以均数 \pm 标准差($x \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析进行,组间两两比较采用LSD法,检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

[0012] 优选的,所述适应性饲养的饲养条件为12h光照,12h黑暗,温度(23 \pm 1) $^{\circ}$ C,相对湿度50%~65%,自主饮水及进食。

[0013] 优选的,所述SiO₂悬液的浓度为50mg/mL。

[0014] 优选的,所述CoQ₁₀的浓度为0.2mg/mL。

[0015] 优选的,所述HE染色步骤为:(1)脱蜡:石蜡切片经二甲苯脱蜡,2次每次10min;(2)梯度酒精脱水,使用100%酒精,2次每次5min,使用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精,各1次每次5min;(3)蒸馏水洗3min;(4)苏木素染色6min;(5)蒸馏水冲洗10s;(6)盐酸乙醇分化5s;(7)蒸馏水冲洗3min;(8)伊红染色5min;(9)蒸馏水冲洗5s;(10)85%酒精1次15s、95%酒精1次15s、100%酒精2次每次3min;(11)二甲苯2次每次3min;(12)中性树胶封片,光学显微镜检。

[0016] 优选的,所述天狼星红染色步骤位:(1)脱蜡:石蜡切片经二甲苯脱蜡,2次每次10min;(2)天狼星红染色液滴染40min;(3)蒸馏水冲洗2min,去除表面染液,常规脱水透明;(4)中性树胶封片,观察小鼠肺组织纤维化改变。

[0017] 本发明与现有技术相比具有如下优点:CoQ₁₀缓解SiO₂诱导的矽肺纤维化,CoQ₁₀能够下调胶原蛋白、羟脯氨酸及 α -SMA表达,其作用机制可能是反馈性调节内源性HMGCR表达,影响氧化呼吸链,为后续矽肺治疗的机制的研究提供了新视角。

附图说明

[0018] 图1是本发明CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用的各组小鼠肺组织HE染色示意图。

[0019] 图2是本发明CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用的各组小鼠肺组织天狼星红染色示意图。

[0020] 图3是本发明CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用的各组小鼠肺组织 α -SMA表达示意图。

[0021] 图4是本发明CoQ₁₀在抗矽肺纤维化中的应用的各组小鼠肺组织HMGCR蛋白表达示意图。

具体实施方式

[0022] 本发明中所涉及的试剂如下:SiO₂(Sigma公司,批号14808-60-7);辅酶Q10(索莱宝公司,批号:303-98-0);玉米油(阿拉丁,批号8001-30-7);天狼星红试剂盒购于(LEAGENE,批号0402A19);HE染色试剂盒;羟脯氨酸试剂盒(碱水解法)(南京建成生物制品研究所,批号:A030-2); α -SMA兔源一抗(成都正能公司,货号:347277);HMGR鼠源一抗(SANTA公司,货号Sc-271595);小鼠二步法检测试剂盒(小鼠增强聚合物法检测系统)(中山金桥,货号:PV-9002);兔二步法检测试剂盒(兔增强聚合物法检测系统)(中山金桥,货号:PV-9001);小鼠山羊血清(中山金桥,ZLI-9022);DAB显色试剂盒(中山金桥,批号K195225A);逆转录试剂盒(TaRaKa,货号RR037A);qPCR试剂盒(TaRaKa,3200A)。

[0023] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明。

[0024] 结合附图,(1)设置对照组:选取SPF级6周龄雄性C57小鼠24只,体重 $20 \pm 2g$,先适应性饲养一周后随机分为对照组、模型组、治疗组;模型组、治疗组采用气管内一次性滴注0.1mL SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型,对照组同法滴注等体积生理盐水;治疗组术后48h后每日给予0.1mL CoQ₁₀,灌胃,对照组、模型组自主进食;

[0025] (2)制备矽肺模型:将小鼠异氟烷麻醉后,暴露气管,分别于对照组滴注0.1mL生理盐水、模型组和治疗组分别气管内滴注0.1mL SiO₂悬液,然后缝合皮肤,观察小鼠生存状态;治疗组术后48h,每只小鼠每日给予0.1mL CoQ₁₀灌胃;60天后,用0.3mL0.3%乌拉坦腹腔注射麻醉处死小鼠,取右肺中叶,生理盐水冲洗后用4%多聚甲醛固定,其余肺组织放入-80℃冰箱冻存;

[0026] (3)HE染色及天狼星红染色:小鼠肺组织用4%多聚甲醛固定右肺中叶48h后,脱水,包埋,切片,切片厚度为8 μ m,在56℃条件下烤片6h后进行HE染色及天狼星红染色;

[0027] (4)羟脯氨酸测定:用天平准确称取50mg冻存的小鼠肺组织,冰上剪碎,加入1mL水解液,在96℃条件下水浴,充分水解20min,流水冷却后,调节各管PH在6.0-6.8左右,加双蒸水至10mL混匀,加入适量活性炭3500rpm离心10min,取上清1mL做检测。设空白管,标准管及检测管,按照说明书依次滴加一、二、三号试剂,混匀后60℃水浴15min,冷却后3500rpm离心10min,取200 μ L上清于96孔板,利用酶标仪在波长550nm处检测各管吸光度值,根据如下计算公式计算各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量(ug/mg),并进行统计分析;计算公式如下:

$$[0028] \quad \text{羟脯氨酸含量} = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度}(5\text{ug/ml}) \times \frac{\text{水解液总体积}(10\text{ml})}{\text{组织湿重}(\text{mg})}$$

(ug/mg湿重)

[0029] (5)实时荧光定量PCR反应:称取各组小鼠肺组织,冰上剪碎,加入RZ裂解液,匀浆处理,按照天根试剂盒说明书提取各组小鼠肺组织总mRNA,使用微量分光光度计测量样品总RNA的浓度及纯度;按照TaKara逆转录操作说明书,将提取的mRNA逆转录为cDNA,cDNA产物浓度为0.5 μ g/10 μ L体系,逆转录条件为37℃,15min,85℃,5s;再进行实时荧光定量PCR反应,检测各组小鼠肺组织 α -SMA(α 平滑肌肌动蛋白),HMGR(3-羟基3-甲基戊二酰辅酶A还原酶)在转录水平的表达差异,数据处理采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对目的基因进行相对定量分析;

[0030] 引物序列详见下表:

[0031] 实时荧光定量PCR所用引物

基因名称	序列 (5'-3')	长度 /bp
[0032] α -SMA	上游 CCTTCGTGACTACTGCCGAG	338
	下游 GTCAGCAATGCCTGGGTACAT	
HMGR	上游 AGAGCGAGTGCATTAGCAAAG	84
	下游 GATTGCCATTCCACGAGCTAT	
MM-ACTB	上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG	174
	下游 ATGCCACAGGATTCCATACC	

[0033] (6) 免疫组织化学: 各组小鼠肺组织的石蜡切片用二甲苯脱蜡, 2次每次10min, 梯度酒精脱水: 用100%酒精、2次每次5min, 用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精, 各1次, 5min; 用枸橼酸钠 (PH=6) 抗原热修复15min, 再用山羊血清封闭10min, 将 α -SMA/HMGR一抗孵育过夜, HRP标记的山羊抗兔/抗鼠二抗孵育30min, DAB显色6min, 苏木素染色20s, 流水冲洗2min, 脱水、透明、封片 (同HE染色), 普通光镜显微镜下10倍物镜取图, 观察各组 α -SMA及HMGR蛋白表达情况, 以Image-ProPlus6.0统计阳性区域, 结果以阳性区域IOD值与图片面积的比值进行定量;

[0034] (7) 统计: 采用SPSS20.0软件统计学分析, 各组数据以均数 \pm 标准差 ($x \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析进行, 组间两两比较采用LSD法, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

[0035] 所述适应性饲养的饲养条件为12h光照, 12h黑暗, 温度 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度50%~65%, 自主饮水及进食。

[0036] 所述 SiO_2 悬液的浓度为50mg/mL。

[0037] 所述 CoQ_{10} 的浓度为0.2mg/mL。

[0038] 所述HE染色步骤为: (1) 脱蜡: 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 2次每次10min; (2) 梯度酒精脱水, 使用100%酒精, 2次每次5min, 使用95%酒精、85%酒精、75%酒精、50%酒精, 各1次每次5min; (3) 蒸馏水洗3min; (4) 苏木素染色6min; (5) 蒸馏水冲洗10s; (6) 盐酸乙醇分化5s; (7) 蒸馏水冲洗3min; (8) 伊红染色5min; (9) 蒸馏水冲洗5s; (10) 85%酒精1次15s、95%酒精1次15s、100%酒精2次每次3min; (11) 二甲苯2次每次3min; (12) 中性树胶封片, 光学显微镜检。

[0039] 所述天狼星红染色步骤位: (1) 脱蜡: 石蜡切片经二甲苯脱蜡, 2次每次10min; (步骤同HE染色) (2) 天狼星红染色液滴染40min; (3) 蒸馏水冲洗2min, 去除表面染液, 常规脱水透明 (同HE染色); (4) 中性树胶封片, 观察小鼠肺组织纤维化改变。

[0040] 如图1所示, 对照组小鼠肺组织肺泡结构基本完整, 肺泡壁无明显增厚, 炎症细胞未出现明显聚集; 模型组肺组织结构破坏明显, 肺间质及肺泡腔内炎症细胞大量聚集, 矽结节形成且直径较大; 治疗组有炎症细胞的聚集, 但肺泡壁结构尚可, 矽结节出现, 但结节较少且直径小。

[0041] 如图2所示, 对照组小鼠肺泡结构正常, 间质无胶原沉积; 模型组小鼠肺组织胶原含量明显增多, 肺泡间质胶原沉积增厚明显, 肺泡结构破坏; 治疗组小鼠肺间质亦出现胶原

沉积,但较模型组相比纤维化缓解,肺泡结构尚可。

[0042] 为了验证各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量差异,本发明采用碱水解法进行了检测,三组之间方差分析结果 $F=5.280$, $P=0.030$,结果如下表所示:模型组羟脯氨酸含量显著高于对照组($P=0.041$),治疗组羟脯氨酸含量明显低于模型组($P=0.013$)。

[0043] CoQ10对小鼠肺组织HYP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

[0044]

组别	HYP含量(ug/mg)
对照组	0.544200±0.02775
模型组	0.64575±0.028026
治疗组	0.547375±0.025605

[0045] 本发明采用qRT-PCR法,检测了各组小鼠肺组织中 α -SMA的mRNA表达差异,三组之间方差分析结果为 $F=4.823$, $P=0.015$ 。结果下表所示:模型组 α -SMA的mRNA表达水平显著高于对照组($P=0.048$);治疗组 α -SMA的mRNA表达显著低于模型组($P=0.004$)。

[0046] CoQ10对小鼠肺组织 α -SMAmRNA和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

[0047]

组别	α -SMA	
	mRNA	蛋白(光密度值)
对照组	24381.85±1044.01	0.0088498±0.0026553

[0048]

模型组	31812.66±2778.61	0.0225843±0.0037967
治疗组	21587.55±2450.19	0.0106723±0.0017244

[0049] 免疫组织化学法检测各组 α -SMA蛋白表达,棕色代表阳性区域,显微镜下观察:模型组 α -SMA表达水平明显高于对照组,而治疗组 α -SMA表达量明显低于模型组。采用IPP软件进一步统计后发现:模型组小鼠肺组织 α -SMA表达量明显高于对照组($P=0.008$),而治疗组小鼠肺组织 α -SMA表达量高于生理盐水组,无统计学意义($P=0.683$),但较模型组小鼠肺组织 α -SMA表达量显著下降($P=0.005$),结果如图3所示。

[0050] 如图4所示,免疫组织化学法检测各组HMGCR蛋白表达,棕色代表阳性区域,肉眼观察到模型组HMGCR表达明显高于对照组,治疗组 α -SMA表达明显低于模型组而高于对照组,使用IPP软件进一步统计各组阳性区域后进行方差分析组间差异显著, $F=9.575$, $P=0.002$;模型组小鼠肺组织HMGCR表达明显高于对照组($P=0.000$),治疗组小鼠肺组织HMGCR表达较模型组显著下降($P=0.041$),但表达显著高于对照组($P=0.022$)。

[0051] 本发明提出了矽肺小鼠若给与CoQ10治疗,60天后,HE染色结果显示模型组肺泡结构严重破坏,炎性细胞聚集,而治疗组与模型组相比炎性细胞聚集少,肺泡结构尚可。天狼星红染料是强酸性阴离子染料,可与呈碱性的胶原反应,使胶原纤维呈现红色,广泛用于检测纤维化组织中胶原分布,本研究结果显示模型组小鼠纤维化胶原分布显著高于对照组,

治疗组胶原分布水平低于模型组但高于对照组。羟脯氨酸是胶原蛋白所特有的非必须氨基酸,可用来评价成纤维细胞活化程度,本发明利用碱水解法实验检测各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量,结果发现模型组显著高于对照组,治疗组显著低于对照组且高于对照组,这与天狼星红染色结果一致。为了进一步检测纤维化过程中是否形成纤维灶,免疫组织化学法检测肌成纤维细胞的标记物 α -SMA,发现模型组 α -SMA表达量明显高于对照组,而治疗组 α -SMA蛋白表达显著低于模型组,以上结果均说明CoQ₁₀具有一定的抗矽肺纤维化的作用。

[0052] CoQ₁₀是线粒体内膜上递氢复合体的重要组成成分,对细胞能量代谢产生起至关重要的作用。HMGCR是生物体内自主合成CoQ₁₀的限速酶。研究发现,在肾脏异位脂肪沉积(EFD)中检测到collagenI及纤连蛋白表达异常,同时他们还发现HMGCoA (p-HMGCR)也表达异常,间接表明HMGCR与collagenI存在联系;本发明通过免疫组织化学法发现,模型组HMGCR蛋白表达显著且稳定地高于对照组,而CoQ₁₀治疗组HMGCR表达低于模型组但高于对照组,这可能是由于SiO₂吸入肺组织内导致肺组织细胞损伤,破坏组织细胞内氧化呼吸链,降低ATP合成。机体调节HMGCR代偿性升高促进内源性CoQ₁₀合成,加强自身氧化呼吸水平,但是当外界给予一定量CoQ₁₀可能反馈性降低HMGCR表达,恢复受损呼吸链,维持组织细胞内能量代谢平衡,进一步发挥抗纤维化的作用。

[0053] 综上所述,CoQ₁₀抑制SiO₂诱导的矽肺纤维化,CoQ₁₀能够下调胶原蛋白、羟脯氨酸及 α -SMA表达,其作用机制可能是反馈性调节内源性HMGCR表达,影响氧化呼吸链。本发明阐明了CoQ₁₀对矽肺纤维化中HMGCR的影响,为后续矽肺治疗的机制的研究提供了新视角。

[0054] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均包含在本发明的保护范围之内。

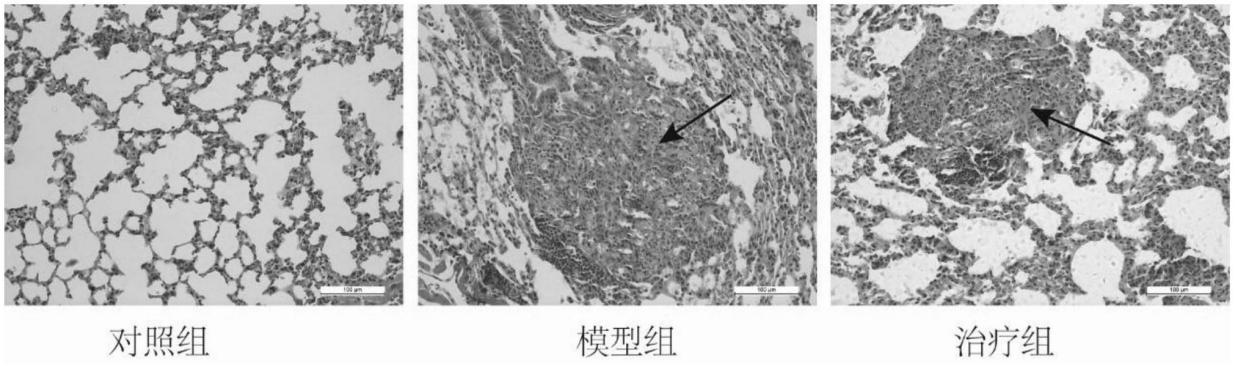


图1

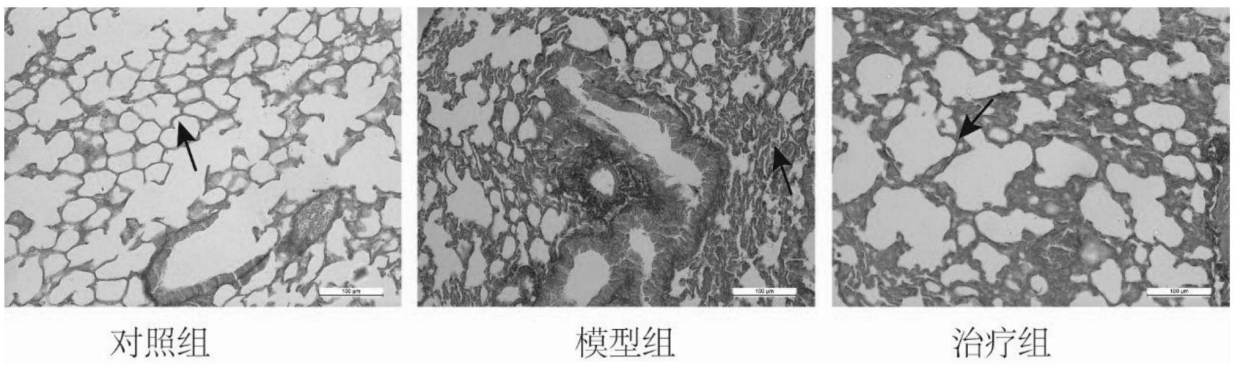


图2

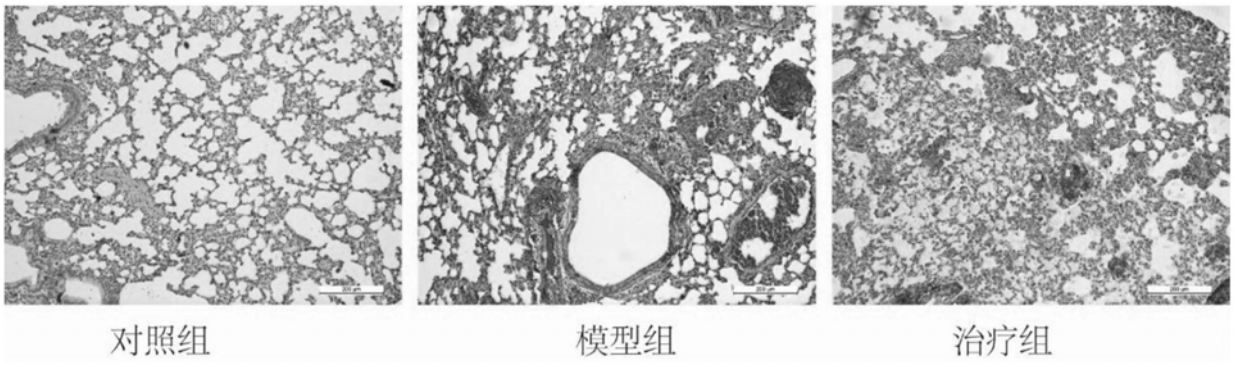


图3

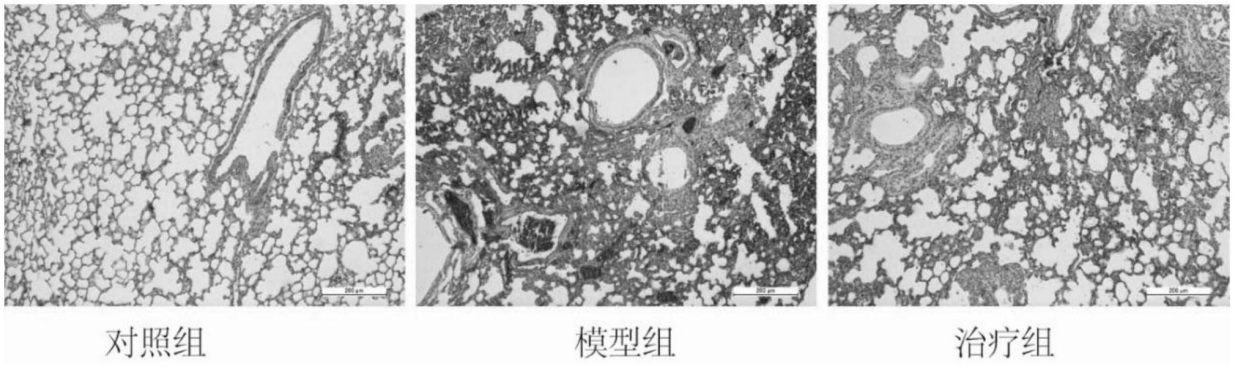


图4

专利名称(译)	CoQ10在抗矽肺纤维化中的应用		
公开(公告)号	CN110208526A	公开(公告)日	2019-09-06
申请号	CN201910434771.4	申请日	2019-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	宁夏医科大学		
[标]发明人	刘志宏 孙岳 姜怡邓 杨安宁 王宇欣 德小明		
发明人	刘志宏 孙岳 姜怡邓 杨安宁 藺文轩 王宇欣 德小明		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N33/531 G01N21/31 C12Q1/6851		
CPC分类号	C12Q1/6851 G01N21/31 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/543 C12Q2531/113 C12Q2563/107 C12Q2521/107		
代理人(译)	王勇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了CoQ10在抗矽肺纤维化中的应用，其特征在于，包括以下步骤：(1)设置对照组：选取SPF级6周龄雄性C57小鼠24只，体重 $20\pm 2g$ ，先适应性饲养一周后随机分为对照组、模型组、治疗组；模型组、治疗组采用气管内一次性滴注0.1mL SiO₂悬液构建小鼠矽肺模型，对照组同法滴注等体积生理盐水；治疗组术后48h后每日给予0.1mL CoQ10，灌胃，对照组、模型组自主进食。本发明具有如下优点：CoQ10降低SiO₂诱导的矽肺纤维化，CoQ10能够下调胶原蛋白、羟脯氨酸及 α -SMA表达，其作用机制可能是反馈性调节内源性HMGCR表达，影响氧化呼吸链，为后续矽肺治疗的机制的研究提供了新视角。

