

· 基础研究 ·

三七总皂苷对肺纤维化小鼠细胞凋亡及 Bax/Bcl-2 表达的影响*

孙晓芳¹, 段 斐^{1△}, 牛建昭², 党志勇³, 杨慧慈⁴

(1. 河北大学基础医学院组胚教研室 071000; 2. 北京中医药大学基础医学院组胚教研室 100029;

3. 河北大学基础医学院办公室 071000; 4. 河北省保定市第二医院儿科 071000)

摘要:目的 研究三七总皂苷(PNS)对小鼠肺纤维化肺组织细胞凋亡及凋亡调控因子 Bax/Bcl-2 的影响。方法 将 90 只 C57BL/6 雄性小鼠分为假手术组、模型组和 PNS 组, 每组 30 只。除假手术组外其余各组小鼠气管内一次性滴入盐酸博莱霉素(BLM), 假手术组小鼠气管内一次性滴入等体积的生理盐水。各组动物于 7、14、28 d 随机处死 10 只, 取肺组织, 检测肺组织细胞凋亡及 Bax/Bcl-2 的蛋白及基因表达水平。结果 与相同时间点模型组相比, 肺组织气道上皮细胞的凋亡明显减轻($P < 0.01$), Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白、Bax mRNA 及 Bcl-2 mRNA 的表达明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 肺纤维化时肺实质细胞凋亡增多, PNS 通过调节 Bax/Bcl-2 的表达来抑制肺组织气道上皮细胞的凋亡可能是其防治肺纤维化的作用机制之一。

关键词:肺纤维化; 细胞凋亡; 三七总皂苷; Bax/Bcl-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.10.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)10-1125-03

Effect of panax notoginseng saponins on the cell apoptosis and the expression of Bax/Bcl-2 in pulmonary fibrosis mice*

Sun Xiaofang¹, Duan Fei^{1△}, Niu Jianzhao², Dang Zhiyong³, Yang Huici⁴

(1. the Cell and Biochemistry Laboratory, Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. the Cell and Biochemistry Laboratory, Beijing TCM University, Beijing 100029, China; 3. the Basic Medical College, Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 4. Department of Paediatrics, the Second Hospital of Baoding, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of PNS on the cell apoptosis and apoptotic regulators Bax/Bcl-2 in mice pulmonary fibrosis. Methods 90 C57BL/6 male mice were divided into sham operation group, model group and PNS group ($n=30$). In addition to the sham operation group, the remaining mice were conducted with a single intratracheal instillation of bleomycin hydrochloride; the mice in the sham operation group were conducted with a single intratracheal instillation with saline. 10 mice were randomly chose and killed each time at 7 d, 14 d and 28 d; extract the lung tissues to measure the apoptosis, Bax/Bcl-2 and gene expression. Results Compared with model group, apoptosis in the lungs of mice in model group were significantly higher than that in sham operation group ($P < 0.01$); compared with model group, the Bax/Bcl-2 protein, expression of Bax mRNA and Bcl-2 mRNA in the PNS group were significantly lower ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion Cell apoptosis would increase in pulmonary parenchymal, and one of the working mechanism for PNS to prevent and treat pulmonary fibrosis would be to inhibit cell apoptosis by regulating the expression of Bax/Bcl-2.

Key words: pulmonary fibrosis; apoptosis; PNS; Bax/Bcl-2

肺纤维化是以上皮细胞损伤、基膜脱落、成纤维细胞增殖、间质炎症、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积为主要特点的肺部疾病, 近年来大量研究显示成纤维细胞增殖与纤维化形成可以独立于炎症而发生, 因此提示肺纤维化肯定存在细胞凋亡与增殖的失衡^[1]。在细胞凋亡发生过程中受许多因子的参与调控, 其中 Bax/Bcl-2 是细胞凋亡的重要调控因子, 他们的表达与肺纤维化肺组织细胞凋亡的发生、发展密切相关^[2-3]。

前期研究表明, PNS 可降低肺纤维化小鼠血清中 III-C、IV-C 型胶原、层粘连蛋白(laminin, LN)及透明质酸(hyaluronan, HA)的含量, 降低肺纤维化小鼠肺组织羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)的含量, 减轻肺组织胶原的增生, 对 BLM 诱导的肺纤维化起到一定的防治作用^[4-5]。本研究在上述实验的基础上, 观察三七总皂苷(PNS)对肺纤维化小鼠肺组织细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 表达的影响, 进一步探讨其防治肺纤

维化的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料 选取健康清洁级 C57BL/6 雄性小鼠 90 只, 体重为 (20 ± 2) g, 购自北京维通利华公司[动物合格证号: SCXK(京)2006-0009]。

1.2 试剂与仪器 PNS, 四川金郁金科技有限公司(批号: 050302); 注射用盐酸博莱霉素(BLM), 浙江海正药业股份有限公司(批号: H20055883); 原位细胞凋亡检测试剂盒, 罗氏公司(批号: mk1020); 免疫组化 Bax 抗体, Santa Cruz 公司(批号: sc-526); 免疫组化 Bcl-2 抗体, Santa Cruz 公司(批号: sc-492); 免疫组化超敏兔二抗及 DAB 显色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司; RNA 提取试剂盒, 北京美莱博医学科技有限公司; 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒, Fermentas 公司; Bax、Bcl-2 及 DAPDH 引物, 北京擎科生物工程有限公司; Takara TP600 型梯度 PCR 仪, 日本 Takara 公司; H1650-W 台

式微量高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;超净工作台,北京鑫宏程洁净工程技术有限公司;电泳仪,上海申能博彩生物科技有限公司;电泳槽(JY-SP-B型),北京君意东方电泳设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模型制备、分组及给药方法 90只C57BL/6雄性小鼠随机分为3组,每组30只。分别为假手术组、模型组和PNS组。用4%水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧固定于鼠台上,颈部乙醇消毒后逐层分离并暴露气管,注射器经气管软骨环间隙朝向心端刺入气管,然后缓慢滴入BLM(5 mg/kg),注后立即将动物直立并左右旋转,使药液在肺内均匀分布。其中假手术组小鼠肺部滴入等体积的生理盐水(造模后存活良好)。术后第2天开始灌胃给药,PNS组给药剂量为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,假手术组及模型组给予等体积生理盐水。实验期间,小鼠自由饮水和进食。

1.3.2 标本采集及指标测定 小鼠在造模7、14、28 d后分3次取材,每次各组随机处死10只,共30只。取肺组织标本,一部分用10%中性甲醛固定,石蜡包埋切片用于TUNEL染色和免疫组织化学测定;一部分加入triton-100放置于液氮后,再放入低温冰箱中保存以备提取总RNA,用于RT-PCR检测。

1.3.3 TUNEL染色 按细胞凋亡检测试剂盒提供的操作步骤进行,DAB显色,细胞核呈棕褐色为阳性凋亡细胞。凋亡细胞的半定量分析:在 10×40 倍视野下,每张切片计数5个视野,计算每个视野下凋亡细胞的数量,取平均数作为该组织切片凋亡细胞数,凋亡指数(AI)=凋亡细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ [6]。

1.3.4 免疫组织化学染色 按链霉素活素-生物素-过氧化物酶(SABC)法试剂盒提供的操作步骤进行,Bax一抗以1:150稀释,Bcl-2一抗以1:200稀释。肺组织切片常规二甲苯、梯度乙醇脱蜡、抗原修复,血清封闭,滴加一抗,4℃冰箱过夜,滴加二抗,DAB显色,苏木素复染,脱水,透明,封片。显微镜下见棕黄色颗粒为阳性表达。每组标本切片随机选取10个高倍视野,采用NIS-ELEMENTS BR2.3专业图像分析软件对免疫组织化学染色结果进行分析。

1.4.3 半定量 RT-PCR 法检测 按照总RNA抽提试剂盒推荐的操作步骤抽提总RNA。按照RT-PCR试剂盒说明书推荐的操作步骤合成cDNA:取1.6 μg RNA,以Oligo(dT)18为引物,组成10 μL的逆转录反应体系,42℃水浴60 min后,70℃水浴10 min灭活逆转录酶,产物保存于-20℃备用。

各引物序列:Bax(209 bp)上游引物,5'-GGC GAA TTG GAG ATG AAC TG-3'。下游引物,5'-GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG-3'。Bcl-2(225 bp):上游引物,5'-GCG TCA ACA GGG AGA TGT CA-3'。下游引物,5'-GGT ATG CAC CCA GAG TGA TG-3'。内参对照DAPDH(231 bp)。PCR反应条件:94℃5 min,95℃20 s,58℃20 s,72℃20 s,35个循环;72℃7 min,然后4℃终止。取上述PCR产物6 μL,100 V电压,电泳40 min。取出凝胶,紫外灯下观察,拍照。用Image J图像分析软件分析,结果用灰度值表示,以目的条带与GAPDH的灰度值比值,作为目的基因表达的相对水平。

1.4 统计学处理 采用SPSS11.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL染色结果 模型组可见TUNEL染色阳性的凋亡细胞主要表达于支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和部分炎性细胞,广泛分布于肺实质,与假手术组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。假手术组阳性染色的细胞少。与相同时间点模型组相比,PNS组肺组织气道上皮细胞的凋亡明显减轻,差异有统计学意义($P < 0.01$),结果见表1。

表1 各组小鼠肺组织中TUNEL染色细胞凋亡率分析结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	2.09±0.26	2.06±0.19	1.93±0.16
模型组	8.31±0.66 ^a	10.74±0.49 ^a	10.20±0.46 ^a
PNS组	5.45±0.69 ^{ab}	6.01±0.44 ^{ab}	5.67±0.45 ^{ab}

^a: $P < 0.01$,与假手术组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.2 免疫组织化学结果 模型组可见细胞质内棕黄色表达产物明显增多,Bax主要表达于肺损伤区细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、巨噬细胞的细胞质,有的已进入细胞核。Bcl-2在肺损伤区肺间质细胞的细胞质内棕黄色表达产物表达明显增多,模型组Bax/Bcl-2各时间点与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。Bax/Bcl-2在假手术组表达很少,在PNS组表达明显减少,与同时点模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),结果见表2、3。

表2 各组小鼠肺组织中Bax蛋白免疫组化图像积分光密度值(IOD)分析结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	4.06±0.84	3.98±0.59	4.15±0.75
模型组	8.61±0.95 ^a	9.94±0.68 ^a	10.75±1.27 ^a
PNS组	4.88±0.79 ^b	5.27±0.81 ^b	5.03±0.84 ^b

^a: $P < 0.01$,与假手术组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较。

表3 各组小鼠肺组织中Bcl-2蛋白免疫组化IOD分析结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	3.52±0.47	3.71±0.49	3.53±0.64
模型组	7.93±0.95 ^a	8.67±0.77 ^a	8.37±0.94 ^a
PNS组	4.27±0.81 ^b	4.68±0.62 ^b	4.81±0.73 ^b

^a: $P < 0.01$,与假手术组比较;^b: $P < 0.01$,与模型组比较。

2.3 RT-PCR结果 模型组在各时间点时Bax mRNA/Bcl-2 mRNA的含量均明显升高,与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较,PNS组降低了纤维化肺组织中Bax mRNA/Bcl-2 mRNA的含量,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表4、5。

表4 各组小鼠肺组织中Bax mRNA分析结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.367 0±0.089 0	0.314 2±0.019 7	0.339 7±0.069 1
模型组	0.761 3±0.100 1 ^a	0.821 0±0.195 2 ^b	0.910 0±0.230 0 ^b
PNS组	0.489 6±0.190 0 ^c	0.541 3±0.055 0 ^d	0.491 5±0.215 4 ^c

^a: $P < 0.05$,^b: $P < 0.01$,与假手术组比较;^c: $P < 0.05$,^d: $P < 0.01$ 与模型组比较。

表 5 各组小鼠肺组织中 Bcl-2 mRNA 图像分析结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	7 d	14 d	28 d
假手术组	0.263 2±0.066 5	0.282 6±0.060 4	0.313 5±0.028 2
模型组	0.599 6±0.058 2 ^a	0.809 7±0.106 5 ^a	0.793 3±0.245 0 ^a
PNS 组	0.328 7±0.036 6 ^b	0.402 5±0.110 1 ^b	0.371 8±0.085 1 ^c

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, ^c: $P < 0.01$, 与模型组比较。

3 讨 论

细胞凋亡是一种广泛存在于多细胞生物体内,对不需要的细胞和受损伤的细胞发生的由众多基因参与调控的细胞自主的有序死亡过程,在组织损伤修复过程中,通过细胞凋亡机制不仅可以限制炎症反应的发展,而且可防止炎症后纤维增生和瘢痕形成。有研究表明,上皮细胞过度凋亡,使其抑制成纤维细胞增殖的功能丧失,从而导致成纤维细胞过度增生,产生过多的胶原蛋白而发生器官纤维化^[7]。

肺纤维化是以细支气管和肺泡上皮细胞过度凋亡,导致肺泡结构完整性遭到破坏以及肺成纤维细胞凋亡受抑为特征。

TUNEL 染色结果显示,在 BLM 诱导的小鼠肺纤维化模型中,7、14、28 d 肺组织的细胞凋亡指数明显高于对照组 ($P < 0.01$)。凋亡第 7 天起明显增强,并持续至第 14、28 天时凋亡指数最高。凋亡的细胞主要为支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和巨噬细胞,还有少量肺间质细胞。与模型组比较,PNS 组能显著降低肺纤维化小鼠肺组织上皮细胞的凋亡 ($P < 0.01$)。

细胞凋亡调控机制及信号转导系统的研究发现,多种基因及其表达产物如 Bax、Bcl-2 和 Bad 等参与细胞凋亡的调控,其中 Bcl-2 基因家族是最受重视的基因之一。Bcl-2 主要通过线粒体途径,来发挥其抗凋亡作用^[8]。Bax 主要作用是通过自身形成同源二聚体或与 Bcl-2 作用形成异源二聚体,来参与细胞凋亡的调节。Bax 同源二聚体促进细胞的凋亡,Bax/Bcl-2 异源二聚体则抑制细胞凋亡。因此细胞的凋亡与 Bax/Bcl-2 的比值有关,Bax 蛋白的表达量多于 Bcl-2 的表达量时促进细胞凋亡,反之则抑制细胞凋亡^[9]。

在 TUNEL 染色实验中作者已经看到支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞和部分炎性细胞的凋亡,说明这些细胞的凋亡参与肺纤维化的形成。免疫组化结果提示:(1)肺内实质细胞是 Bax 的主要来源之一,Bax 在肺纤维化实质细胞的过度凋亡中发挥重要作用;(2)增多的 Bcl-2 主要是由肺间质细胞分泌的,Bcl-2 在抑制成纤维细胞凋亡中发挥重要作用。综合以上研究说明,肺纤维化时,肺实质细胞的凋亡过度可能与局部 Bax 的表达升高、Bcl-2 表达下降使肺实质细胞 Bax/Bcl-2 比值升高有关,而肺间质细胞 Bcl-2 的过度表达,可能与成纤维细胞的凋亡受抑有关,从而使成纤维细胞的增殖多于凋亡,促进肺纤维化的进展。应用 RT-PCR 方法研究表明,模型组小鼠肺组织

Bax mRNA 和 Bcl-2 mRNA 的表达亦明显增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明 Bax 和 Bcl-2 对肺纤维小鼠肺组织细胞凋亡的调控至少是在蛋白转录或翻译水平进行的。

以上研究结果提示,通过选择性地调节细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达,抑制肺实质细胞的凋亡和成纤维细胞的增生,就有可能在治疗肺纤维化方面取得一定的进展。本实验发现,PNS 能在一定程度上抑制肺组织气道上皮细胞的凋亡,从蛋白转录和翻译水平调节肺纤维化小鼠肺组织中 Bax 和 Bcl-2 的表达。据此,作者初步认为 PNS 抗肺纤维的作用机制可能与 PNS 抑制肺组织气道上皮细胞的凋亡、调节 Bax/Bcl-2 的表达有关,更详细的机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孔璐,王继峰,牛建昭.特发性肺纤维化与细胞凋亡[J].中华结核和呼吸杂志,2004,27(6):368-371.
- [2] Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, et al. Expression of apoptosis regulatory genes in epithelial cells in pulmonary fibrosis mice[J]. Pathol, 2000, 190(2):221-229.
- [3] Kuwano K, Maeyama T, Inoshima I, et al. Increased circulating levels of soluble Fas ligand are correlated with disease activity in patients with fibrosing lung diseases[J]. Respirology, 2002, 7(1):15-21.
- [4] 孙晓芳,杨长福,黄春芳,等.三七总皂苷对肺纤维化小鼠肺组织胶原影响的实验研究[J]. 中医学报, 2010, 38(5):14-15.
- [5] 孙晓芳,黄春芳,杨长福,等.三七总皂苷对肺纤维化小鼠血清中 IV-C 型胶原透明质酸的干预作用[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(14):2609-2614.
- [6] Rongqi W, Olivia IS, Luba V, et al. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or a caspase inhibitor[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physio, 2000, 27(9):143-151.
- [7] Yang L, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2 release of cytochrome from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275(5303):1129-1132.
- [8] Almeida OF, Conde GL, Croehemore C, et al. Subtle shifts in the ratio between Pro and anti-apoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate[J]. FASEB J, 2000, 14(5):779-790.
- [9] Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death[J]. Toxicol Lett, 2004, 149(1/3):19-23.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2012-12-22)

(上接第 1124 页)

鼠局灶性脑缺血模型 (PMCAO) 的实验研究[J]. 吉林医学, 2004, 25(10):16-17.

- [6] 储照虎,吴家幕,刘富东,等.大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤神经细胞凋亡及其调控基因的表达[J]. 临床神经病学, 2000, 13(3):134.
- [7] 李英,段惠军. Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路在糖尿病肾病发生发展中的作用[J]. 国际内分泌代谢杂志,

- 2007, 27(4):269.
- [8] Hu BR, Liu CL, Park DJ. Alteration of MAP kinase pathways after transient forebrain ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2000, 20(7):1089-1095.
- [9] 付度关. ERK 对缺血缺氧性脑损伤后神经细胞凋亡的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2007, 14(6):346-349.

(收稿日期:2012-10-08 修回日期:2012-12-22)