

· 基础研究 ·

AcSDKP 对硅肺纤维化大鼠胶原含量及 NF- κ B p65 表达的影响*

闫静波

(河北省邢台市人民医院病理科 054001)

摘要:目的 研究 N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸(AcSDKP)对硅肺纤维化大鼠肺内胶原合成及核转录因子 κ B(NF- κ B)p65 的影响。方法 将大鼠分为 3 组:对照组(每只大鼠支气管内灌注生理盐水 1 mL,8 周后处死)、硅肺模型组(每只大鼠支气管内灌注 SiO₂ 混悬液 1 mL,8 周后处死)、AcSDKP 治疗组(每只大鼠支气管内灌注 SiO₂ 混悬液 1 mL,并持续给予 AcSDKP 800 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,8 周后处死)。从 HE 染色、VG 染色和羟脯氨酸测定法检测各组大鼠肺纤维化程度及胶原含量,用免疫组化法和免疫印迹法检测 NF- κ B p65 蛋白的表达。结果 与对照组比较,硅肺模型组硅结节的数量、胶原含量和 NF- κ B p65 的表达增高。与硅肺模型组相比,AcSDKP 治疗组硅结节的数量、胶原含量和 NF- κ B p65 的表达降低。结论 AcSDKP 可能会通过增加 B 抑制蛋白(I- κ B)的稳定性来抑制 NF- κ B p65 的活性及表达,进而影响着肺炎与硅肺纤维化的进展。

关键词:矽肺;N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸,核转录因子 κ B p65

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.26.024

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)26-3139-03

Effect of AcSDKP on collagen content and expression of NF- κ B p65 in lung of rats with silicosis fibrosis*

Yan Jingbo

(Department of Pathology, Xingtai People's Hospital, Xingtai, Hebei 054001, China)

Abstract:Objective To investigate the effect of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP) on the synthesis of collagen and the expression of NF- κ B p65 in lung of rats with silicosis fibrosis. **Methods** Rats were divided into 3 groups randomly: the control group(each rat was intratracheally instilled with 1 mL normal saline and killed after 8 weeks, the silicotic model group(each rat was intratracheally instilled with 1 mL silica suspension and killed after 8 weeks, the AcSDKP treated group(each rat was intratracheally instilled with 1 mL silica suspension and AcSDKP(800 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹) was administered into every rat, then rats were killed after 8 weeks. Lung fibrosis in morphology and collagen content was observed by HE and vg staining and hydroxyproline assay. The expression of NF- κ B p65 was detected with the immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the control group, the quantity of silicon nodules, collagen content and the expression of NF- κ B p65 were increased in the silicotic model group. Compared with the silicotic model group, the quantity of silicon nodules, collagen content and the expression of NF- κ B p65 were decreased in the AcSDKP-treated group. **Conclusion** AcSDKP could inhibit the activity and expression of NF- κ B p65 by strengthening the stability of I- κ B, which may influence the progress of alveolar inflammation and silicosis fibrosis.

Key words: silicosis; N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline; NF- κ B p65

硅肺是一种常见的职业病,其病变以硅结节形成和广泛的肺纤维化为特征^[1]。N-乙酰基-丝氨酸-天门冬酰-赖氨酸-脯氨酸(AcSDKP)是一种生理性造血系统生长抑制因子^[2]。AcSDKP 对多器官内的多种类型细胞的增殖、细胞外基质代谢和血管形成等方面有重要的调节作用。它能抑制心脏和肾脏间质成纤维细胞及肾小球系膜细胞的增殖,减少胶原的沉积,对高血压及心肌梗死后心脏和肾脏纤维化有一定的抑制作用^[3-5]。核转录因子- κ B(NF- κ B)是 2 个亚单位 p50 和 p65 组成的异源二聚体,NF- κ B 参与许多前炎症介质分子转录水平的调控,促进细胞因子、黏附分子、趋化因子、炎症因子、氧化应激相关酶等大量释放^[6]。本研究观察了 AcSDKP 对硅肺纤维化大鼠胶原合成和 NF- κ B p65 的影响,借以探索 NF- κ B p65 在硅肺纤维化发病机制中的作用,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠,体质量 180 g,购于北京维通利华动物公司;AcSDKP 购于瑞士 Bachem AG 公司;标准 α 石英粉尘(微粒直径小于 5 μ m)购于中国预防医学科学院;药物释放泵购于美国 Alzet 公司;VG 试剂盒购于福州迈新生物工程公司;羟脯氨酸测试盒购于南京建成生物工程研

究所;兔抗大鼠 NF- κ B p65 抗体购于武汉博士德生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 选用非暴露式气管插管灌注法制作大鼠硅肺模型,并给予 AcSDKP 治疗。60 只清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠分为 3 组,(1)对照组:每只支气管内灌注生理盐水 1.0 mL,8 周后处死;(2)硅肺模型组:每只大鼠支气管内灌注 SiO₂ 50 mg/mL,8 周后处死;(3)治疗组:每只大鼠支气管内灌注 SiO₂ 50 mg/mL,持续给予 AcSDKP 800 μ g \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 治疗,8 周后处死。各组大鼠分别于处理后相应时间点处死。取右下叶肺组织 4%多聚甲醛固定,脱水后常规石蜡包埋,4 μ m 连续切片,做 HE 染色、胶原 VG 染色和 NF- κ B p65 免疫组化,取右中叶肺组织做胶原羟脯氨酸测定,取右上叶肺组织采用蛋白免疫印迹法检测 NF- κ B p65 蛋白表达。

1.2.2 HE 染色 HE 染色后观察各组大鼠肺组织内硅结节的形成与大小。用图像分析仪系统测定每只大鼠每张切片随机选择 5 个 200 倍视野下,硅结节切面总面积占该视野总面积的百分比来半定量硅结节的大小。

* 基金项目:邢台市科学技术研究与发展计划项目(2012ZC181)。

作者简介:闫静波(1980~),主治医师,硕士,主要从事肺纤维化的研究。

1.2.3 胶原 VG 染色 观察各组大鼠肺组织内胶原纤维的形成及变化特点,进行胶原半定量分析。染色严格按照试剂盒操作说明进行。用图像分析仪系统测定每只大鼠每张切片 5 个 200 倍视野下 VG 阳性染色的积分光密度值(integral optical density, IOD)来半定量肺内胶原的含量。

1.2.4 胶原羟脯氨酸测定 测定组织羟脯氨酸的含量,可换算成胶原蛋白的含量,以反映实验各组纤维化程度。采用对二甲氨基苯甲醛显色法检测肺组织羟脯氨酸含量,实验步骤严格按照羟脯氨酸测试盒说明书进行操作。

1.2.5 NF- κ B p65 免疫组化染色 一抗为兔抗大鼠 NF- κ B p65 抗体,工作浓度 1:100,二抗为羊抗兔,采用 SABC 法 DAB 显色。实验严格按照试剂盒操作说明进行。每张切片随机选择 5 个视野,在高倍光镜下($\times 400$)用图像分析仪测定大鼠肺组织阳性细胞的平均百分数。

1.2.6 NF- κ B p65 蛋白迹印法 提取大鼠肺组织蛋白,参照蛋白标准曲线进行蛋白含量测定,行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移把凝胶内的样品蛋白转移到硝酸纤维膜上,5% BSA 常温振荡封闭 1 h,一抗体(NF- κ B 抗体),4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗,室温 1 h,加入碱性磷酸酶显色剂显色约 20 min,将 NC 膜用扫描仪对蛋白表达条带进行灰度扫描,经自动图像分析系统进行半定量分析,以对照组的平均光密度值(OD 值)为 1,其他各组与对照组相比取值。

1.3 统计学处理 用 SPSS12.0 进行统计分析,各组间采用完全随机设计的单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大体观察 (1)对照组双肺粉红,弹性良好,表面光滑。(2)硅肺模型组双肺苍白,表面可见散在灰白色结节,触之略有砂粒感。(3)治疗组双肺颜色浅红,弹性尚好,表面的灰白色的结节比硅肺模型组减少。

2.2 HE 染色观察 (1)对照组大鼠双肺结构清晰,肺泡壁薄,间质无明显炎细胞浸润。(2)硅肺模型组大鼠肺组织内可见局灶性间质性炎症,以巨噬细胞和淋巴细胞渗出浸润为主。肺泡间隔水肿增宽,肺组织内见纤维细胞性结节,并出现结节的融合。结果表明:大鼠硅肺模型制作成功。(3)治疗组肺组织内纤维细胞结节体积及数量均比硅肺模型组减少,巨噬细胞和淋巴细胞等炎症细胞浸润减少。用硅结节切面面积占整个视野面积的百分比半定量分析硅结节的大小,结果显示:治疗组的硅结节面积比硅肺模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 胶原 VG 染色结果 VG 染色胶原呈鲜红色。(1)对照组胶原主要分布于肺泡间隔及血管壁,其他部位胶原少见。(2)硅肺模型组(图 1A)可见胶原纤维呈条纹状分布于结节内部及其周围。(3)治疗组(图 1B)胶原分布较硅肺模型组减少,胶原变细稀少。图像分析仪结果显示:硅肺模型组胶原含量比对照组增高,是对照组的 5.29 倍,治疗组的胶原含量比对照组降低,是对照组的 45.58%,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.4 羟脯氨酸测定结果 羟脯氨酸测定结果显示:硅肺模型组胶原含量比相应对照组增高,是对照组的 1.86 倍。治疗组的胶原含量比硅肺模型组降低,是硅肺模型组的 60.27%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.5 免疫组化检测 NF- κ B p65 结果 NF- κ B p65 定位于胞核或胞质,可表达于肺间质细胞、巨噬细胞和中性粒细胞,呈棕色

颗粒。(1)对照组阳性细胞较少,主要表达于胞质,胞核未见明显表达,肺间质细胞少有表达。(2)硅肺模型组(图 2A)阳性细胞较多,阳性颗粒的表达多位于胞核,阳性细胞主要分布硅结节内部及周围,肺间质细胞和巨噬细胞表达较多。(3)治疗组(图 2B)阳性细胞数量比硅肺模型组减少,阳性颗粒的表达部分转向胞浆,肺间质细胞和巨噬细胞表达减弱。图像分析仪结果显示:硅肺模型组 NF- κ B p65 阳性率比对照组升高,是对照组的 2.36 倍,治疗组的 NF- κ B p65 阳性率比硅肺模型组降低,是硅肺模型组的 64.55%,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 AcSDKP 对硅肺大鼠硅结节面积及胶原含量表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

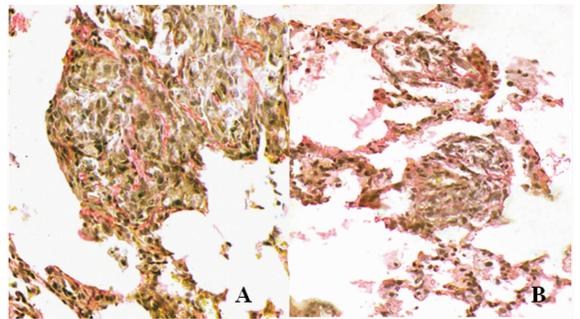
组别	硅结节面积 (HE 染色)	胶原的 IOD (VG 染色)	羟脯氨酸含量 (μ g/mg)
对照组	0	1 039 \pm 291	0.821 \pm 0.049
硅肺模型组	41.19 \pm 8.09 ∇	5 496 \pm 835 ∇	1.528 \pm 0.116 ∇
治疗组	25.18 \pm 5.66 $\#$	2 505 \pm 539 $\#$	0.921 \pm 0.100 $\#$

∇ : $P < 0.05$, 与对照组比较; $\#$: $P < 0.05$, 与硅肺模型组比较。

表 2 AcSDKP 对硅肺大鼠 NF- κ B p65 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

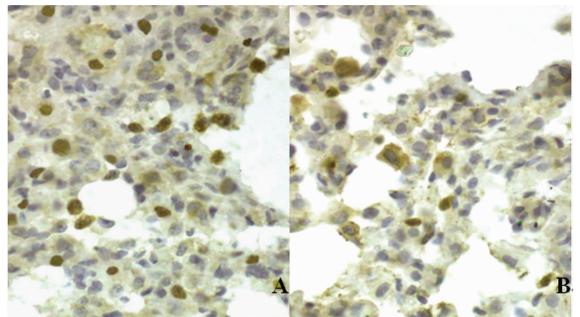
组别	NF- κ B 阳性率 (免疫组化法)	NF- κ B OD (免疫印迹法)
对照组	9.00 \pm 4.69	1
硅肺模型组	21.24 \pm 4.92 ∇	2.97 ∇
治疗组	13.71 \pm 3.92 $\#$	1.43 $\#$

∇ : $P < 0.05$, 与对照组比较; $\#$: $P < 0.05$, 与硅肺模型组比较。



A: 硅肺模型组; B: AcSDKP 治疗组。

图 1 AcSDKP 对硅肺纤维化大鼠肺内胶原纤维形成的影响 (VG 染色 $\times 200$)



A: 硅肺模型组; B: AcSDKP 治疗组。

图 2 AcSDKP 对硅肺纤维化大鼠肺内 NF- κ B p65 表达的影响 (免疫组化 $\times 400$)

2.6 免疫印迹法检测 NF- κ B p65 表达结果 硅肺模型组 NF-

κ B p65 蛋白表达比对照组升高, 是对照组的 2.97 倍, 治疗组的 NF- κ B p65 蛋白表达比硅肺模型组降低, 是硅肺模型组的 48.15%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

3 讨 论

硅肺是由于长期吸入大量游离二氧化硅 (SiO_2) 粉尘沉积于肺部引起的一种常见职业病, 以硅结节的形成和广泛的肺纤维化为特征。硅结节形成的初始阶段是由吞噬硅尘的巨噬细胞聚集组成, 继而成纤维细胞增生, 结节内的胶原不断沉积, 使之发生纤维化, 形成纤维性硅结节, 同时肺内还有不同程度的弥漫性间质纤维化^[7]。

AcSDKP 是一种生理性造血系统的生长抑制因子, 对大鼠肾脏、心脏间质成纤维细胞及人肾小球系膜细胞的增殖与胶原的合成沉积有抑制作用^[8]。AcSDKP 能够减轻糖尿病小鼠肾小球硬化程度, 改善小鼠肾脏功能^[9]。在大鼠心肌梗死心衰模型中, AcSDKP 能够减轻炎症, 拮抗心脏间质纤维化^[10]。在两肾一夹高血压大鼠和血管紧张素 II 型高血压大鼠模型中, AcSDKP 同样能减轻心、肾纤维化的程度^[11-12]。

在本研究中, 通过硅结节面积测定、大染色测胶原 OD 值及羟脯氨酸测定胶原含量, 均发现治疗组肺组织硅结节面积及胶原含量比硅肺模型组减少, 证明 AcSDKP 能够抑制大鼠硅肺纤维化。

近年来, NF- κ B 与器官纤维化之间的关系日益受到人们的关注。NF- κ B 是一类能与多种基因启动子或增强子部位 κ B 位点发生特异性结合并促进其转录的蛋白质, 是一种重要的核转录因子, 在各种因子的相互影响和相互作用的复杂网络中作为转录调节核因子而起中心调控作用, 参与免疫反应、细胞分化、生长调控、细胞内信号转导等^[13]。通常 NF- κ B 是 2 个亚单位 p50 和 p65 组成的异源二聚体, 细胞处于未激活的静息状态时, p65 亚单位与 B 抑制蛋白 (I- κ B) 单体结合, 覆盖 p50 蛋白的核定位信号, 以失活状态存在于细胞质中。当机体受到外界因素刺激时, NF- κ B 被诱导活化, 从胞质转向胞核, 与 DNA 链上特异部位结合, 诱导和增强其基因表达, 导致促炎细胞因子、氧自由基、一氧化氮及前列腺素等炎性介质大量产生, 引发炎症免疫反应, 从而促进器官纤维化^[14-15]。

在本研究中, 通过免疫组化和免疫印迹法检测发现硅肺模型组 NF- κ B p65 表达比对照组明显增高, 并且对照组 NF- κ B p65 阳性颗粒主要为胞浆表达, 而硅肺模型组中阳性的部位多在胞核, 以肺间质细胞和巨噬细胞阳性表达居多。这与 Baroni 等^[16]在硅肺大鼠肺组织中观察到的 NF- κ B 表达情况基本一致。反映了硅肺大鼠纤维化形成发展过程中 NF- κ B 被激活, 由胞质移向胞核, 表达增强, 促进细胞因子、黏附分子、趋化因子、炎症因子、氧化应激相关酶大量释放, 他们可引起中性粒细胞及巨噬细胞的活化, 增强中性粒细胞及单核细胞趋化功能, 刺激成纤维细胞的增殖, 导致肺纤维化。在本研究中, 治疗组肺间质细胞和巨噬细胞的 NF- κ B p65 表达比硅肺模型组降低, 并且 NF- κ B p65 的阳性颗粒的表达部分位于胞浆, 提示在治疗组中, AcSDKP 可能会通过增加 I- κ B 的稳定性来抑制 NF- κ B p65 的活性, 进而影响着肺泡炎与硅肺纤维化的进展。

参考文献:

[1] 李玉林, 唐建武, 文剑明, 等. 病理学[M]. 6 版. 北京: 人民

卫生出版社, 2003: 173-175.

- [2] Cavasin MA, Rhaleb NE, Yang XP, et al. Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide AcSDKP[J]. *Hypertension*, 2004, 43(5): 1140-1145.
- [3] Pokharel S, Rasoul S, Roks AT, et al. N-Acetyl-Asp-Lys-Pro inhibits phosphorylation of Smad2 in cardiac fibroblast[J]. *Hypertension*, 2002, 40(2): 155-161.
- [4] Rhaleb NE, Peng H, Harding P, et al. Effect of N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline on DNA and collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts[J]. *Hypertension*, 2001, 39(8): 827-832.
- [5] Peng H, Carretero OA, Raji L, et al. Antifibrotic effects of N-acetyl-seryl-aspartyl-Lysyl-proline on the heart and kidney in aldosterone-salt hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2001, 39(2): 794-800.
- [6] Tergaonkar V. NF kappa B pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target[J]. *Int J Biochem cell Biol*, 2006, 38(10): 1647-1653.
- [7] Rimala B, Greenberga AK, Roma WN, et al. Basic pathogenetic mechanisms in silicosis: current understanding[J]. *Curr Opin Pulmon Med*, 2005, 11(2): 169-173.
- [8] Sato T, Takeno M, Honma K, et al. Heme Oxygenase-1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(8): 906-914.
- [9] 高春芳, 陆伦根. 纤维化疾病的基础与临床[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 212-213.
- [10] 叶进燕, 陈少贤. 核因子 κ B 与肺部疾病[J]. 国外医学内科学分册, 2004, 31(1): 29-33.
- [11] 牛海艳, 初令, 曾庆富. 大鼠硅肺纤维化中 NF- κ B 和 MMP-9 的表达[J]. 临床与实验病理学杂志, 2003, 19(3): 296-299.
- [12] 赵静, 王献华, 吴秀珍. 核因子- κ B 与肺纤维化[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2006, 9(6): 540-542.
- [13] Natoli G, Constanzo A, Ianni A, et al. Tuning up inflammation: How DNA sequence and chromatin organization control the induction of inflammatory genes by NF- κ B[J]. *Febs Lett*, 2006, 580(12): 2843-2849.
- [14] Leonard H, Sigal MD. Basic science for the clinician 39: NF- κ B-function, activation, control, and consequences[J]. *J Clin Rheumatol*, 2006, 12(4): 207-211.
- [15] Campbell KJ, Perkins ND. Regulation of NF-kappaB function[J]. *Biochem Soc Symp*, 2006, 73(3): 165-180.
- [16] Baroni T, Bodo M, Alessandro A, et al. Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor- β lung fibroblast extracellular matrix production [J]. *J Invest Med*, 2001, 49(2): 146-156.

(收稿日期: 2013-03-10 修回日期: 2013-05-22)