

柴胡皂甙 D 对肺纤维化小鼠上皮-间质转化的干预作用及机制研究*

管淑红,王智刚,朱煜明,徐乾乾,周 军[△]

(江苏省常州市第一人民医院呼吸内科 213000)

[摘要] **目的** 观察柴胡皂甙 D(SSD)对肺纤维化小鼠上皮-间质转化(EMT)的影响及其机制。**方法** 将 60 只雄性昆明小鼠分为对照组、博来霉素(BLM)组和 SSD 组,BLM 组和 SSD 组通过气管内注入浓度为 5 mg/kg 的 BLM 溶液制备肺纤维化模型,对照组给予相同体积的 0.9%氯化钠。SSD 组每日腹腔内注入 SSD 溶液(2.0 mg/kg),BLM 组和对照组每日同等条件下腹腔内注入 0.2 mL 生理盐水+DMSO(3 mL DMSO 溶于 97 mL 生理盐水)。分别在第 14 天和第 28 天,处死小鼠取肺组织行病理苏木素-伊红(HE)染色,观察肺泡炎和肺纤维化程度,并通过 Western blot 检测肺组织 E 钙黏蛋白、纤维连接蛋白、Wnt 蛋白和 β -actenin 蛋白的表达水平。**结果** SSD 组和 BLM 组肺泡炎及肺纤维化程度评分均高于同期对照组,且 SSD 组低于同期 BLM 组;SSD 组和 BLM 组纤维连接蛋白、Wnt 蛋白和 β -actenin 蛋白表达均高于同期对照组,且 SSD 组低于同期 BLM 组;SSD 组和 BLM 组 E 钙黏蛋白表达均低于对照组,且 SSD 组高于同期 BLM 组。**结论** SSD 对肺纤维化有一定治疗价值,SSD 抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导通路负向调节 EMT 过程可能是其治疗机制之一。

[关键词] 柴胡皂甙 D;肺纤维化;上皮-间质转化**[中图分类号]** R563**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)22-2913-04

Intervention effect and mechanism of saikosaponin D on epithelium-mesenchymal transformation in mouse with pulmonary fibrosis*

GUAN Shuhong, WANG Zhigang, ZHU Yuming, XU Qianqian, ZHOU Jun[△]

(Department of Respiration, Changzhou Municipal First People's Hospital, Changzhou, Jiangsu 213000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect and mechanism of saikosaponin D (SSD) on epithelium mesenchymal transformation (EMT) in the mouse with pulmonary fibrosis. **Methods** Sixty male Kunming mice were divided into the control group, bleomycin (BLM) group and SSD group. The pulmonary fibrosis model in the BLM group and SSD group was prepared by intratracheal instillation of 5 mg/kg BLM solution and the control group received the same volume of 0.9% sodium chloride solution. The SSD group was daily intraperitoneally injected by 2.0 mg/kg SSD solution, and 0.2 mL normal saline plus DMSO (3 mL DMSO was dissolved in 97 mL normal saline) were daily intraperitoneally injected on the equal conditions in the control and BLM group. The mice were executed on 14, 28 d respectively for taking the pulmonary tissues. Then the HE staining was performed to observe alveolitis and fibrosis degree in lung tissues. Western blot was performed to determine the expression level of E-cadherin, fibronectin, Wnt protein and β -actenin protein in lung tissues. **Results** The scores of alveolitis and pulmonary fibrosis in the SSD group and BLM group were higher than those in the control group at the corresponding periods, moreover the SSD group was lower than the BLM group at the corresponding periods. The relative gray values of fibronectin, Wnt protein and β -actenin protein expression in the SSD group and BLM group were higher than those in the control group at the corresponding periods, moreover the SSD group was lower than the BLM group at the corresponding periods; the relative gray value of the expression of E-cadherin in the SSD group and BLM group was lower than that in the control group at the corresponding periods, moreover the SSD group was higher than the BLM group at the corresponding periods. **Conclusion** SSD has a certain treatment value for pulmonary fibrosis, and SSD inhibiting the Wnt/ β -catenin signal transduction pathway for negatively regulating EMT process may be one of its treatment mechanisms.

[Key words] saikosaponin D; pulmonary fibrosis; epithelium-mesenchymal transformation

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)本质为原因不清楚的间质性肺炎,主要表现为肺

* 基金项目:江苏省常州市科学技术局应用基础研究(CJ20130028)。 作者简介:管淑红(1978-),副主任医师,博士,主要从事间质性肺

病的研究。 [△] 通信作者, E-mail: Zhouyfan@126.com。

间质的纤维化,以往研究认为该病尚无特效药物治疗和改善预后^[1]。随着对该病的重视,越来越多的新药涌现出来,2015 版 IPF 治疗指南依据一些新药研究证据,对吡非尼酮和尼达尼布这两种药物进行了有条件推荐^[2]。鉴于我国的国情,IPF 患者通常面临经济成本、依从性等挑战,从这两种药物中获益甚少。

柴胡皂甙具有抗病毒、抗炎、抗肝肾等器官纤维化、抗肿瘤、调节内分泌、治疗肾炎等作用,其中最具有活性的成分是柴胡皂甙 D(SSD)。本课题组致力于研究 SSD 对肺纤维化的干预作用及机制,早期部分动物体内实验已证实 SSD 能通过保护肺泡上皮细胞免于过度凋亡、抑制成纤维细胞增殖等机制缓解肺纤维化病情^[3],本文将系列报道 SSD 对肺纤维化小鼠上皮-间质转化(EMT)的干预作用及机制研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

所有实验小鼠均购自扬州大学实验动物中心,均为清洁级 6 周,体质量为 18~22 g,雄性昆明种,总共 60 只。采用随机数字表法将 60 只小鼠分为 3 组:对照组、博来霉素(BLM)组及 SSD 组,各 20 只。BLM 组和 SSD 组通过文献^[4]方法制备肺纤维化模型,均给予气管内注入浓度为 5 mg/kg 的 BLM 溶液,并通过旋转的方式保证药物充分分布在肺内,术后常规喂养。而对照组则给予相同体积 0.9%的氯化钠。配置 SSD 溶液方法如下:将 SSD 20 mg 溶于二甲亚砜(DMSO)3 mL 中,用生理盐水稀释至 100 mL,避光保存,SSD 组每日腹腔内注入 SSD 溶液(2.0 mg/kg),BLM 组和对照组每日同等条件下腹腔内注入 0.2 mL 生理盐水+DMSO(3 mL DMSO 溶于 97 mL 生理盐水),连续 28 d。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

在用药后的第 14、28 天,各组随机选取 10 只实验小鼠,均取出其肺组织,右肺组织保存于-70℃冰箱,用于检测 E 钙黏蛋白、抗纤维连接蛋白、Wnt 蛋白和 β -actenin 蛋白的表达;左肺完整置于 4%多聚甲醛溶液中固定,用于 HE 染色。

1.2.2 病理切片观察

将多聚甲醛固定后的左肺组织用石蜡包埋,切片后给予苏木素-伊红(HE)染色,然后通过光镜下观察肺组织的损伤程度和胶原纤维的变化,采用 SZAPIEL 等^[5]研究分级。肺泡炎:0 级为无肺泡炎症;I 级为轻度肺泡炎,有少量炎症细胞浸润;II 级为

中度肺泡炎;III 级为重度肺泡炎,病变弥漫。肺纤维化:0 级为无或少量胶原纤维;I 级为胶原纤维轻度增多;II 级为胶原纤维中度增多,可伴有肺泡结构紊乱;III 级为胶原纤维明显增多,肺泡塌陷、融合、结构紊乱。肺泡炎及肺纤维化等级资料分别记为 1~4 分。

1.2.3 Western blot 检测肺组织 E 钙黏蛋白、纤维连接蛋白、Wnt 蛋白、 β -actenin 蛋白表达

100 mg 组织加 1 mL RIPA 裂解液于玻璃匀浆器中研磨、裂解。离心后加入 2×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,煮沸后于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中恒压 90 V 电泳 2 h,采用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 2 h,二抗 1 h,用显色剂 ECL-plus 染色最后在 Typhoon 扫描仪中成像,采用 Imagequant TL 软件分析光密度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学观察

光镜下观察,对照组肺结构正常,未见炎性细胞浸润(图 1A)。BLM 组第 14 天炎性细胞明显浸润,肺泡间隔明显增宽(图 1B);第 28 天肺组织结构破坏,部分肺泡塌陷融合,其间可见炎性细胞浸润,见大量宽带状及片状胶原纤维,呈弥漫性肺纤维化(图 1C)。SSD 组肺泡炎及肺纤维化程度较同期 BLM 组均明显减轻(图 1D 和 1E)。各组小鼠肺泡炎和肺纤维化程度的定量分析结果见表 1。对照组第 14 和 28 天肺泡炎和肺纤维化程度评分比较无明显差异,其余各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。其中,SSD 组和 BLM 组肺泡炎及肺纤维化程度评分均高于同期对照组($P < 0.05$),且 SSD 组低于同期 BLM 组($P < 0.05$)。

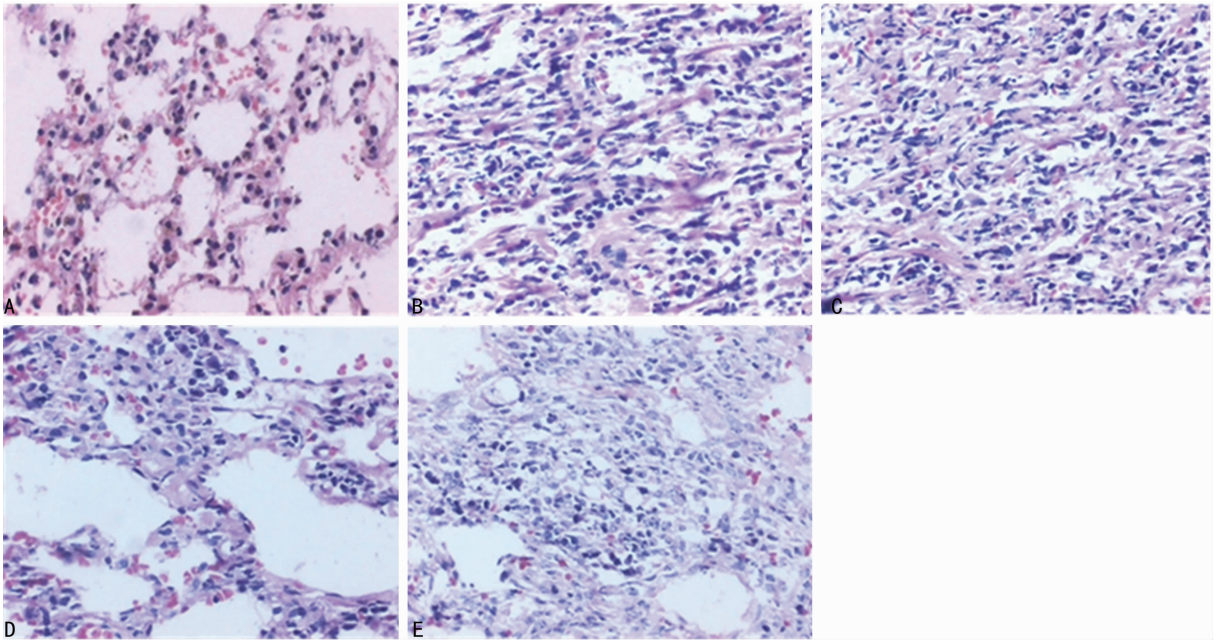
2.2 Western blot 检测肺组织 E 钙黏蛋白、纤维连接蛋白表达

在造模第 14 和 28 天,Western blot 检测肺组织 E 钙黏蛋白表达显著下调($P < 0.05$),而纤维连接蛋白表达则显著上调($P < 0.05$)。同期相比,SSD 组和 BLM 组 E 钙黏蛋白的表达均低于对照组($P < 0.05$),且 SSD 组高于 BLM 组($P < 0.05$);同期相比,SSD 组和 BLM 组纤维连接蛋白的表达均高于对照组($P < 0.05$),且 SSD 组低于 BLM 组($P < 0.05$),见图 2~4。

表 1 各组小鼠给药后肺泡炎和肺纤维化程度评分比较($\bar{x} \pm s$,分)

组别	n	第 14 天		第 28 天	
		肺泡炎	肺纤维化	肺泡炎	肺纤维化
对照组	10	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
BLM 组	10	3.84±0.81 ^b	3.12±0.24 ^b	3.27±0.57 ^b	3.79±0.45 ^b
SSD 组	10	2.76±0.69 ^{bd}	2.20±0.84 ^{ac}	2.39±0.45 ^{bd}	3.16±0.63 ^{bd}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 BLM 组比较



A: 对照组第 28 天; B: BLM 组第 14 天; C: BLM 组第 28 天; D: SSD 组第 14 天; E: SSD 组第 28 天
图 1 各组小鼠给药后不同时间肺组织病理形态变化(HE, ×200)

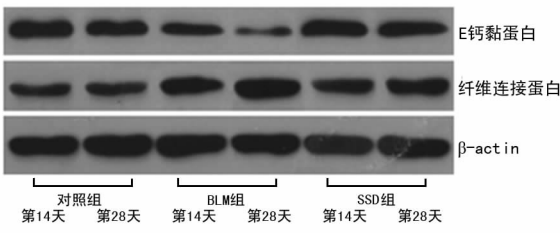


图 2 E 钙黏蛋白和纤维连接蛋白的 Western blot 电泳图

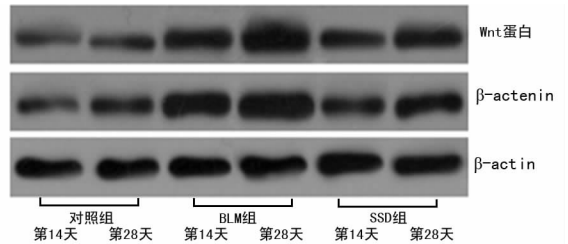
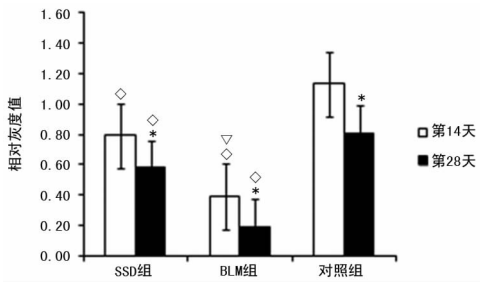
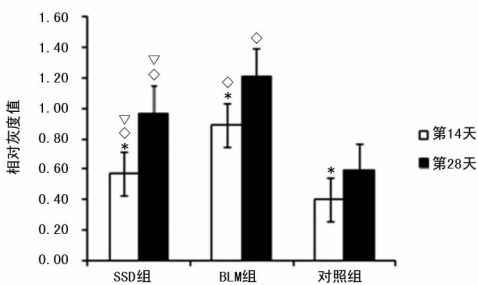


图 5 Wnt 蛋白和 β-actin 蛋白的 Western blot 电泳图



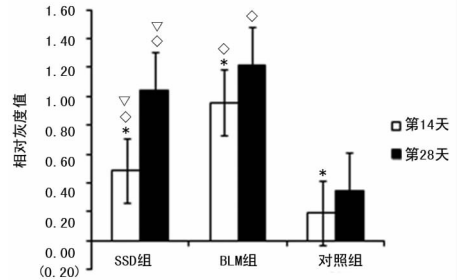
*: $P < 0.05$, 与第 14 天比较; \diamond : $P < 0.05$, 与同期对照组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与同期 SSD 组比较

图 3 E 钙黏蛋白表达的相对灰度值比较



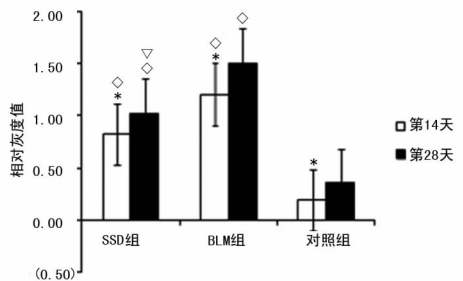
*: $P < 0.05$, 与第 28 天比较; \diamond : $P < 0.05$, 与同期对照组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与同期 BLM 组比较

图 4 纤维连接蛋白表达的相对灰度值比较



*: $P < 0.05$, 与第 28 天比较; \diamond : $P < 0.05$, 与同期对照组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与同期 BLM 组比较

图 6 Wnt 蛋白表达的相对灰度值比较



*: $P < 0.05$, 与第 28 天比较; \diamond : $P < 0.05$, 与同期对照组比较; ∇ : $P < 0.05$, 与同期 BLM 组比较

图 7 β-actin 蛋白表达的相对灰度值比较

2.3 Western blot 检测肺组织 Wnt 蛋白、β-actin

蛋白表达 在造模第 14 和 28 天, Western blot 检测肺组织 Wnt 蛋白、 β -actenin 蛋白表达均显著上调 ($P < 0.05$)。同期相比, SSD 组和 BLM 组 Wnt 蛋白、 β -actenin 蛋白的表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 且 SSD 组低于 BLM 组 ($P < 0.05$), 见图 5~7。

3 讨论

IPF 的发病受多种因素影响, 主要包括炎症导致的组织损失和组织损伤后的修复叠加等。CHINLOSI 等^[6]通过免疫组织化学染色研究了 20 例 IPF 患者的肺活检标本, 其中在 18 例患者的增殖性细支气管损害局灶发现了胞核内 Wnt 途径靶基因产物 cyclinD1、 β -catenin 和基质金属蛋白酶等的表达, 表明 IPF 的发病与 Wnt 途径的活化有关; 同时, 该研究在其他类型的间质性肺病 (interstitial lung disease, ILD) 患者的标本中均没有检测到胞核内 Wnt 途径相关分子表达的改变, 表明 Wnt 途径的活化仅限于 IPF。此外, 研究还显示 Wnt 途径的活化在 EMT 中具有重要的作用, 导入 Wnt-1 基因可以增高 MDCK 和 HCE 等上皮细胞系细胞胞质内 β -catenin 的表达, 促使淋巴样增强因子 1 (LEF1) 转入胞核内, 进而引发轻微的 EMT; DLD-1 上皮肿瘤细胞导入 LEF-1 基因后, 其胞核内 β -catenin 呈现稳定的高表达, 导致显著 EMT 的发生, 因此 EMT 过程具有可逆性^[7]。但是, Wnt 途径的活化在 EMT 过程中的作用及其在 IPF 发病中对肺内细胞和分子的影响需要进行更进一步的研究^[8]。

本文对上皮标志 E-钙黏蛋白及间叶标志纤维连接蛋白表达进行检测, 结果表明, 予以 SSD 干预后, 无论是复制肺纤维化模型的中期还是后期, E-钙黏蛋白的表达下调均受到保护, 而纤维连接蛋白的表达上调却被抑制, 这与德国 COSTABEL 等^[9]提出的 IPF 的 EMT 学说结果一致, WOLTERS 等^[10-11]的研究也证实了这一结果。有研究^[12-14]显示, BLM 组小鼠肺组织表达 Wnt 蛋白及 β -catenin 蛋白有明显上调, 这可能与 IPF 患者的肺组织内 Wnt/ β -catenin 信号传导通路异常激活, β -catenin 是 Wnt/ β -Catenin 信号转导通路的核心因子有关^[15]。SSD 组中小鼠肺组织表达 Wnt 蛋白及 β -catenin 蛋白显著低于 BLM 组, 这可能是由于 SSD 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号传导通路介入 EMT 病理过程从而减缓肺组织纤维化进展。

依据 IPF 发病机制观点的改变, 治疗 IPF 理念也发生相应变化, 目前推荐及早的给予抗纤维化, 加上小剂量抗炎, 在于预防而不是逆转已存在的肺纤维化。2012 年, Panther-IPF 临床实验证实波尼松、硫唑嘌呤、N-乙酰半胱氨酸联合治疗 IPF 未有疗效, 反而增加病死率和住院风险^[16]。因此, 在 IPF 治疗中, 干预 Wnt/ β -catenin 通路中的一个或几个环节, 阻断信号传导链、抑制 EMT 进程, 可以达到预防和控制病情的疗效。

参考文献

[1] RAGHU G, COLLARD H R, EGAN J J, et al. An official

ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(6): 788-824.

- [2] RAGHU G, ROCHWERG B, ZHANG Y, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(2): 3-19.
- [3] 管淑红, 徐乾乾, 柴胡皂甙 D 治疗特发性肺纤维化及影响肺泡上皮细胞凋亡的研究 [J]. *西部医学*, 2014, 26(1): 23-26.
- [4] IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS CLINICAL RESEARCH NETWORK, RAGHU G, ANSTROM K J, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(21): 1968-1977.
- [5] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979(120): 893-899.
- [6] CHINLOSI M, POLETTI V, ZAMO A, et al. Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pat Hol*, 2003, 162(5): 1495-1502.
- [7] KIM K, LU Z, HAY E D. Direct evidence for a role of β -catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT [J]. *Cell Biol Int*, 2002, 26(5): 463-476.
- [8] PONGRAEZ J E, STOKLEY R A. Wnt signaling in lung development and disease[J]. *Respir Res*, 2006, 1(7): 15.
- [9] COSTABEL U, GUZMAN J. Pulmonary fibrosis. Classification, diagnosis, therapy [J]. *Internist (Berl)*, 2003, 44(1): 35-43.
- [10] WOLTERS P J, COLLARD H R, JONES K D. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2014(9): 157-179.
- [11] VANCHERI C. Common pathway in idiopathic pulmonary fibrosis and cancer [J]. *Eur Respir Rev*, 2013, 22(129): 265-272.
- [12] PASQUIER J, ABU-KAOUD N, THANI H A, et al. Epithelial to mesenchymal transition in a clinical perspective [J]. *J Oncol*, 2015, 2015: 792182.
- [13] MEUTEN T, HICKEY A, FRANKLIN K, et al. WNT7B in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2012, 13: 62.
- [14] GUO Y, XIAO L, SUN L, et al. Wnt/ β -catenin signaling: a promising new largest for fibrosis diseases [J]. *Physiol Res*, 2012, 61(4): 337-346.
- [15] SONG P, ZHENG J X, XU J, et al. β -catenin induces A549 alveolar epithelial cell mesenchymal transition during pulmonary fibrosis[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2703-2710.
- [16] RAGHU G, ANSTROM K J, KING T E, et al. Prednisone, azathioprine, and N-acetylcysteine for pulmonary fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(21): 1968-1977.

(收稿日期: 2018-01-22 修回日期: 2018-04-10)