

加味参附汤对肾阳虚肺纤维化大鼠凋亡相关因子 caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响

赵敏, 周艳艳, 陈会敏, 徐安莉

湖北中医药大学基础医学院, 湖北 武汉 430065

[摘要] 目的: 观察加味参附汤对肾阳虚肺纤维化大鼠模型的病变程度及 caspase-3 和 Bcl-2 在模型大鼠肺内表达的影响。方法: 大鼠 60 只随机分为正常组、模型组和干预组。模型组和干预组制作肾阳虚肺纤维化大鼠模型, 造模成功后干预组给予加味参附汤治疗, 常规石蜡切片, HE 染色, 观察肺泡炎及肺纤维化程度, 免疫组织化学技术检测 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白在各组大鼠肺组织中的表达。结果: caspase-3 和 Bcl-2 主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞及浸润的炎症细胞中表达, 第 28 天, 模型组、干预组 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白表达增强, 均高于正常组 ($P < 0.05$)。第 42 天, 干预组大鼠细胞 caspase-3 表达较模型组降低 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 表达在干预组中增强, 高于模型组 ($P < 0.05$)。结论: 在大鼠肾阳虚肺纤维化的发展过程中, 肺组织细胞凋亡起重要作用, 加味参附汤可通过调控 caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的表达而减少细胞凋亡, 从而减缓肾阳虚肺纤维化的进展。

[关键词] 肺纤维化; 肾阳虚; 加味参附汤; caspase-3; Bcl-2; 动物实验

[中图分类号] R285.5; R563 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0178-03

Effect of Modified *Shenfu* Decoction on Apoptosis-related Factors Caspase-3 and Bcl-2 Expression in Pulmonary Fibrosis Rats with Kidney-yang Deficiency

ZHAO Min, ZHOU Yanyan, CHEN Huimin, et al

Abstract: Objective: To observe the effect of modified *Shenfu* Decoction on the pulmonary fibrosis pathological changes and caspase-3 and Bcl-2 expression levels in the pulmonary fibrosis rats of kidney-yang deficiency, and to explore the possible mechanism. Methods: Sixty Wistar rats were randomly divided into normal group, model group and intervention group. Kidney-yang deficiency of pulmonary fibrosis was induced in the rats of the model group and intervention group, and then the intervention group was treated by *Shenfu* Decoction. After treatment, the rats of three groups were executed, and the lung was made into routine paraffin section. HE staining was performed for the observation of alveolitis and pulmonary fibrosis, and the expression of caspase-3 and Bcl-2 protein in rat lung tissue was detected by immunohistochemical method. Results: Obvious expression of caspase-3 and Bcl-2 was presented mainly in alveolar epithelial cells, pulmonary macrophages and infiltrated inflammatory cells. On day 28, model group and intervention group had higher expression of caspase-3 and Bcl-2 protein than that in the normal group ($P < 0.05$); on day 42, caspase-3 expression in rats of intervention group was significantly lower than the model group ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 in the intervention group was enhanced, higher than that of the model group ($P < 0.05$). Conclusion: During the development of pulmonary fibrosis in kidney yang deficiency rat, the apoptosis of lung tissue cells play an important role, and modi-

[收稿日期] 2013-06-14

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81102529)

[作者简介] 赵敏 (1980-), 女, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向: 五脏相关理论与实践。

[通讯作者] 周艳艳, E-mail: 847892443@qq.com.

fied *Shenfu* Decoction can slow down the progress by regulating caspase-3 and Bcl-2 protein expression to reduce apoptosis.

Keywords: Pulmonary fibrosis; Kidney yang deficiency; Modified *Shenfu* Decoction; Caspase-3; Bcl-2; Animal experiment

肺纤维化是许多肺系疾病发病的共同结局,发病机制尚不完全明确,且发病率日趋上升,但目前对肺纤维化临床上尚无有效的治疗方法。近年来临床报道显示,中医辨证与辨病结合组方用药能提高疗效且副作用小,因此寻求有效的中药治疗某一特殊证型的肺纤维化对中药治疗肺纤维化具有重要意义^[1]。辨证论治是中医治疗疾病的重要原则,肺纤维化基本病机为肺肾虚损,痰瘀阻络^[2],笔者选用临床常见证型肾阳虚^[3],以“温补肾肺、活血化瘀”为治则组成的加味参附汤,对模型进行干预,从而研究该方对肾虚肺纤维化大鼠的影响作用和机制。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠,60 只体重 180~220 g,由华中科技大学医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 加味参附汤由附子、人参、蛤蚧、地龙、水蛭、法半夏组成,所用中药为浓缩液,购于湖北省中医院,水浴浓缩成含生药 2.0 g/mL 的水煎剂,作为灌胃药液,然后分装,4℃ 保存待用。BLMA5(8 mg/支,天津太和制药有限公司,商品名注射用盐酸平阳霉素),制成 5 mg/mL 的生理盐水溶液,大鼠用量 1 mL/kg。氢化可的松(50 mg/支),由天津市生物化学制药厂生产。腺嘌呤,Amersco 公司分装产品,北京欣经科生物技术有限公司。caspase-3 和 Bcl-2 及 SP 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 模型建立 雄性 Wistar 大鼠经乙醚麻醉,气管内插管一次性注入博莱霉素 A5(5 mg/kg 体重),从当天开始予腺嘌呤(300 mg/kg·d)灌胃,共 28 天,建立肾虚肺纤维化模型。

1.4 试验分组 大鼠自由饮水、摄食,饲养于 20~24℃,湿度 40%~60%、明暗各 12 h 的动物实验室内,正常喂养 1 周后,随机分为 3 组:①正常组不造模,28 天后生理盐水继续灌胃,5 mg/kg·d,共 14 天;②模型组造模后生理盐水灌胃,5 mg/kg·d,

共 14 天;③干预组造模后加味参附汤水煎剂灌胃,5 mL/kg·d,共 14 天。

1.5 标本的采集及处理 第 28 天及 42 天各组分别处死大鼠 10 只,切取肺组织,常规石蜡切片,HE 染色镜下观察,SP 免疫组织化学法检测肺内 caspase-3 和 Bcl-2 的表达。PBS 代替一抗作为阴性对照。染色结果采取半定量分析:高倍镜下($\times 400$)每张切片随机选择 5 个视野,采用同济 HMIA-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统检测吸光度值,计算平均值。

1.6 统计学方法 采用 SPSS19.0 软件,进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肺的形态学检查 第 28 天,正常组肉眼可见肺呈粉红色,表面光滑,弹性良好,镜下显示肺组织结构清晰,肺泡壁完整,肺泡上皮细胞形态正常,均未见明显病变。模型组和干预组肉眼可见双肺暗红,可见少量苍白部分、表面凸凹不平、体积缩小、弹性较差,镜下肺组织明显破坏,肺泡腔大量消失,被成纤维细胞、增生的胶原纤维所取代,已呈现肺纤维化改变。第 42 天,模型组和干预组肉眼可见双肺苍白、表面凸凹不平、体积缩小、弹性较差、硬度增加,镜下可见模型组大鼠肺内见大量成纤维细胞,正常组织被大量胶原纤维取代,干预组镜下可见成纤维细胞增加,胶原纤维增加较明显。

2.2 各组大鼠肺组织内 caspase-3 表达比较 见表 1。caspase-3 蛋白为胞浆性表达,正常组的大鼠肺组织细胞大多数为阴性。第 28 天的模型组和干预组表达明显,与正常组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞及浸润的炎症细胞中表达增强。第 42 天干预组中 caspase-3 蛋白表达强度低于模型组($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠肺内细胞 Bcl-2 表达比较 见表 2。Bcl-2 阳性信号为核浆型,第 28 天,Bcl-2 在模型组和干预组中表达明显,与正常组比较,差异均有显

著性意义($P < 0.05$), 主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞及浸润的炎症细胞中表达增强; 正常组的大鼠肺组织细胞大多数为阴性。第 42 天, 干预组和模型组中 Bcl-2 蛋白表达强度仍高于正常组($P < 0.05$), 干预组中表达强度高于模型组($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠肺组织内 caspase-3 表达比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	28 天	42 天
正常组	10	0.198± 0.430	0.196± 0.045
模型组	10	0.560± 0.134 ^①	0.826± 0.235 ^①
干预组	10	0.486± 0.113 ^①	0.715± 0.135 ^{②③}

与正常组同期比较, ① $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ② $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肺内细胞 Bcl-2 表达比较($\bar{x} \pm s$) %

组别	n	28 天	42 天
正常组	10	4.70± 0.74	4.50± 0.37
模型组	10	14.56± 1.34 ^①	13.24± 0.96 ^①
干预组	10	13.36± 0.79 ^①	16.70± 0.83 ^{②③}

与正常组同期比较, ① $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

肺纤维化是多种肺系疾病的共同结局, 环境污染日益严重, 肺系职业病发病率明显增加, 深入研究其发生机制以及发现新的治疗靶点具有重要的意义。近年来, 越来越多研究发现其病变的发生与细胞凋亡的关系密切, caspase-3 和 Bcl-2 是细胞凋亡过程中的重要因子^[4]。曹小飞等^[5]研究提示细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的不平衡表达在放射性肺损伤的发病过程中可能起了重要作用。有研究发现, caspase-3 基因转染昆虫 Sf9 细胞后引起细胞凋亡, 这个过程可以被 Bcl-2 阻断; 在发生凋亡的细胞提取液中除去 caspase-3 后, 这些提取液就失去了诱导细胞凋亡的能力; 再加入纯化的 caspase-3 它就恢复了致凋亡的功能, 本试验研究发现肾阳虚肺纤维化大鼠肺内凋亡蛋白明显增加, 而干预组 caspase-3 表达下降, 提示加味参附汤可能抑制 caspase-3 的表达从而发挥抗纤维化的作用。

Bcl-2 是一种膜整合蛋白, 主要存在于线粒体膜、核膜和内质网膜上, 控制线粒体内外膜的通透性, 可抑制细胞色素 C 等从线粒体释放, 从而抑制

下游 caspase-3 的活性, 具有拮抗凋亡的作用。陈伟等^[6]研究显示肺纤维化大鼠 Fas mRNA 及蛋白表达上调和 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达下调, 可能引起肺上皮细胞的凋亡从而导致肺纤维化增生。倪世容等^[7]研究显示人硫氧还蛋白可以通过下调 ASK1 的表达, 提高 Bcl-2/Bax 的比值减少肺组织细胞凋亡, 从而减轻肺缺血再灌注损伤。柯宏刚等^[8]研究肺气肿发现在肺气肿形成初期, 使用 caspase-3 抑制剂 z-VAD-fmk 可显著上调肺组织中 Bcl-2 蛋白表达, 抑制 Bax 蛋白的表达, 使肺泡隔细胞凋亡减少, 明显减轻肺气肿的病理改变。本实验结果显示活化的 Bcl-2 主要在肺泡上皮细胞、肺泡巨噬细胞及浸润的炎症细胞中表达增强, 且表达强度明显高于正常组, 与文献报道一致。

本研究结果提示, 加味参附汤可以通过抑制 caspase-3 的表达, 增加 Bcl-2 的表达, 减少肺内凋亡细胞的数目, 及减轻肺内炎性病变和肺纤维化的程度。

[参考文献]

- [1] 潘芳, 王彤. 特发性肺纤维化的中西药物治疗进展[J]. 北京中医药, 2009, 28(2): 150-154.
- [2] 王海彤. 肺纤维化的病因病机调查和中药干预临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [3] 王铮. 68 例肺间质纤维化中医证候学临床研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [4] 孔勤, 陈民利. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2012(8): 74-80.
- [5] 曹小飞, 官健, 陈龙华, 等. 放射性肺损伤大鼠肺组织 Bcl-2 和 Bax 表达变化及其意义的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(16): 1249-1252.
- [6] 陈伟, 欧阳劭, 唐双阳, 等. 肺纤维化鼠细胞凋亡及 Fas/Bcl-2 动态变化[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(2): 139-143.
- [7] 倪世容, 王万铁, 王鑫, 等. 人硫氧还蛋白对肺缺血再灌注损伤时细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(5): 871-875.
- [8] 柯宏刚, 丁海兵, 董宣宣. Caspase 抑制剂早期干预对吸烟型肺气肿大鼠肺泡结构保护的实验研究[J]. 南通大学学报: 医学版, 2011, 31(2): 113-114.

(责任编辑: 马力)