

肺纤维化鼠细胞凋亡及 Fas/Bcl-2 动态变化

陈 伟¹, 欧阳劭¹, 唐双阳², 谭小武¹

(1. 南华大学附属第二医院呼吸内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学病原生物学研究所)

摘 要: **目的** 探讨细胞凋亡及 Fas/Bcl-2 在肺纤维化发病中的作用。 **方法** 选取 SD 大鼠 48 只, 随机分为对照组、模型组, 每组各 24 只, 应用博来霉素(5 mg/kg) 气管内注入建立实验性大鼠肺纤维化模型, 对照组注入等量生理盐水, 各组动物于 7、14、28 天随机处死 8 只, 取肺组织采用 HE 染色观察病理变化, TUNEL 法检测肺组织细胞凋亡、RT-PCR 和免疫组织化学法分别检测肺组织 Fas/Bcl-2 mRNA 以及蛋白的表达。 **结果** 实验性大鼠肺纤维化发病过程中, 呈现典型的肺肺炎(7 天)、肺肺炎与纤维化并存(14 天)及稳定的肺纤维化(28 天)等表现; 同时间段模型组肺组织细胞凋亡指数、Fas mRNA 及蛋白表达均显著高于对照组($P < 0.01$)。 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达显著低于对照组($P < 0.01$); 模型组细胞凋亡从 7 天开始逐步升高, 第 28 天达最高峰, Fas 蛋白与 Fas mRNA 表达趋势与细胞凋亡相同; 模型组 Bcl-2 蛋白与 Bcl-2 mRNA 表达在第 7 天开始下降, 第 14 天达最低峰, 第 28 天略有回升($P < 0.05$), 但仍低于对照组($P < 0.01$)。 **结论** 肺泡及支气管上皮细胞凋亡与肺纤维化的形成有关, 可能是肺纤维化的发病机制之一; 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。

关键词: 肺纤维化; 细胞凋亡; Fas; Bcl-2; 大鼠

中图分类号: R563 **文献标识码:** A

The Expression of Fas/Bcl-2 and Apoptosis in the Epithelial Cells of Pulmonary Fibrosis Rats

CHEN Wei, OU YANG Shao, TAN Xiaowu, et al

(The Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of apoptosis and Fas / Bcl-2 in the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

Methods Forty-eight Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups: normal control group (A group), model control group (B group). The model group were induced to produce pulmonary fibrosis with bleomycin endotracheally while the control group was given with normal saline instead in the same condition. Eight rats in model group were sacrificed on 7, 14, and 28 days respectively after intratracheal instillation. Pathological changes in the lungs were evaluated by HE stain. The mRNA expression of Fas and Bcl-2 was evaluated by RT-PCR quantitative analysis, and the immunohistochemical method was used to investigate the change of Fas and Bcl-2 protein. TUNEL was used to detect the change of cell apoptosis.

Results The percentage of cell apoptosis detected by TUNEL in alveolar and bronchial epithelial cells of pulmonary fibrosis rats was higher than the normal control groups. The result of immunohistochemistry and RT-PCR suggested that the expression of Fas mRNA and Fas protein in model groups was higher than the normal control groups. The expression of Bcl-2 mRNA and Bcl-2 protein in model groups was lower than the normal control groups. The difference was significant ($P < 0.01$). The result of immunohistochemistry and RT-PCR suggested that the expression of Fas protein and mRNA in alveolar and bronchial epithelial cells of pulmonary fibrosis rats also increased after 7 days by treating with bleomycin, increased on the 14th day and

further increased on the 28th day; the expression of Bcl-2 protein and mRNA also decreased after 7 days by treating with bleomycin, reaches the trough on the 14th day. **Conclusions** Higher expression of apoptosis in alveolar epithelial cells and Bronchial cells of pulmonary fibrosis rats can contribute to fibrogenesis; the

apoptosis index of lung cells, Fas gene and protein up-regulated and Bcl-2 gene and protein down-regulated in lung tissue of pulmonary fibrosis, which may play an important role in the development of pulmonary fibrosis.

Key words: apoptosis; Fas; Bcl-2; pulmonary fibrosis

肺纤维化 (pulmonary fibrosis) 是许多肺间质性疾病的最终病理表现, 近年来发现, 肺泡上皮细胞凋亡在肺纤维化形成过程中起重要作用^[1]。细胞凋亡通过参与维持细胞群体数量的稳定, 影响肺组织损伤和修复的过程, 进而影响肺间质纤维化的形成^[2], 肺泡上皮细胞的凋亡过度, 则可以导致肺组织结构的破坏, 最终产生肺纤维化^[3]。细胞凋亡由相关基因调控, Bcl-2 是最早发现的抗凋亡基因, 目前国外学者认为 Fas/FasL 介导肺泡上皮细胞凋亡在肺纤维化的发病过程中起着重要的作用^[4]。在肺纤维化中, Bcl-2 及 Fas 两种基因是否均参与细胞凋亡的调控, 两者是否有相关关系目前未见报道, 本文对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Sprague- Dawley 大鼠, 来自南华大学动物实验部。共 48 只, 体重 180 ~ 200 g, SPF 级, 随机平均分成对照组及模型组。

1.2 主要试剂

博莱霉素, 15 mg/支, 日本化药朱氏会社; 兔抗鼠 Bcl-2 及 Fas 多克隆抗体, 武汉博士德公司; 总 RNA 提取试剂盒, 北京百泰克生物试剂有限公司; 引物设计及产品合成为上海生物技术有限公司。

1.3 肺纤维化动物模型的建立

按经典方法以博莱霉素复制肺纤维化模型。2% 戊巴比妥钠按 45 mg/kg 体重腹腔注射麻醉大鼠, 在无菌条件下作颈正中切口, 暴露气管, 肺纤维化组按 5 mg/kg 体重抽取博莱霉素 A5 液约 0.2 ~

0.3 mL (生理盐水溶解), 穿刺并注入气管内, 对照组注入 0.2 ~ 0.3 mL 等体积生理盐水。上述 2 组动物分别于第 7、14、28 天各处死 8 只, 右肺用 4% 多聚甲醛灌注固定, 石蜡包埋, 切片用于 HE 染色、免疫组织化学分析; 左肺迅速放入 - 196 °C 液氮中保存, 用于提取肺组织总 RNA。

1.4 病理学检查

在大鼠肺纤维化造模后第 7、14、28 天, 每组随机处死 8 只动物, 分离肺脏, 注入 10% (体积分数) 福尔马林液 115 mL 保持 30 min 后, 投入 Bouins 液固定 24 h, 常规脱水, 石蜡包埋后, 切片 (3 μm), 行苏木精—伊红 (HE) 染色。光镜下观察有无炎症反应及纤维化发生。

1.5 免疫组织化学法 (SABC 法) 分析 Fas 及 Bcl-2 的蛋白表达

采用免疫组织化学 SABC 法检测, 方法步骤严格按照试剂盒说明书进行 (皆 1: 150 稀释为工作液)。细胞胞浆内有棕黄色颗粒且着色明显高于背景者为阳性。免疫组织化学结果在 400 倍视野下, 每张玻片随机取 10 个视野, 用 PIPS-2020 高清晰度彩色病理图文分析系统分别测定阳性颗粒的平均吸光度值 (A), 进行分析处理。

1.6 肺组织 Fas 及 Bcl-2 mRNA 含量的测定

引物序列及扩增反应条件见表 1 及表 2, 提取肺组织总 RNA, cDNA 的合成严格按照试剂盒操作步骤进行。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后, 以 UVP 计算机图像扫描分析系统测定电泳条带 A 值, 以 β-actin 为内参照, 计算 Fas 及 Bcl-2 mRNA 相对水平, 结果以分别 Fas 及 Bcl-2 mRNA 条带与 β-actin 条带 A 的比值表示。

表 1 各基因引物序列及扩增产物长度
Table 1 Each gene primer sequence and length of PCR products

基因		引物序列	扩增产物
Fas	AF104034	上游引物 AAG GAC TGC ACA ACA AGT GGA GGT	235 bp
		下游引物 ACG AGG TGC AGT GAT AAC AGT GGT	
β-actin	V01217	上游引物 TCA TCA CTA TCG GCA ATG AGC GGT	345 bp
		下游引物 ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT	
Bcl-2	V01053	上游引物 GGC ATC TTC TCC TTC CAG C	439 bp
		下游引物 CCC AGC CTC CGT TAT CC	

表 2 各基因 PCR 扩增反应条件

Table 2 The conditions of the PCR gene amplification reaction

基因	预变性	循环条件				末次延伸
		变性	退火	延伸	循环数	
Fas	94 ℃ 3 min	94 ℃ 30 s	51 ℃ 30 s	72 ℃ 1 min	30	72 ℃ 10 min
Bcl-2	94 ℃ 3 min	94 ℃ 30 s	54 ℃ 30 s	72 ℃ 1 min	30	72 ℃ 10 min
β-actin	94 ℃ 3 min	94 ℃ 30 s	51 ℃ 30 s	72 ℃ 1 min	30	72 ℃ 10 min

1.7 细胞凋亡 TUNEL 法检测上皮细胞凋亡

石蜡标本预处理后,每个标本滴加 TdT 酶反应液 50 μL 于样本区域上,覆盖盖玻片,以确保反应液分布均匀。在 37 ℃、潮湿环境中反应 60 min 后,去除盖玻片,在反应样本区域加入 Streptavidin-HRP 工作液 50 μL,盖上盖玻片;在 37 ℃、潮湿环境中反应 30 min,PBS 浸洗 3 次,于样本区域滴加 DAB 工作液 100 μL,室温显色 10 min,PBS 浸洗 3 次,中性树胶封片后置光学显微镜下观察。生物素标记的 TUNEL 阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色,主要为肺泡上皮细胞,阳性细胞核固缩呈圆形,有的呈不规则形,染色质凝集成团,分布在细胞核边缘。每只选择 5 个以上有代表性的高倍视野,计数 500 个肺细胞中的凋亡细胞数,计算细胞凋亡指数(AI)。

1.8 统计学处理

计量资料数据均用 $\bar{x} \pm s$,表示,用 SPSS13.0 统计软件处理,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOAY),两两比较方差齐者采用 SNK-Q 法,相关关系分析用 Pearson 积差相关系数表示,所有数据用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为有统计学意义。

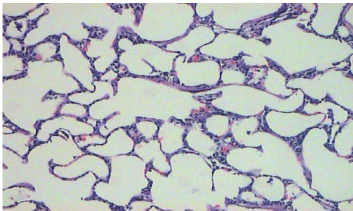
2 结 果

2.1 肺组织病理变化

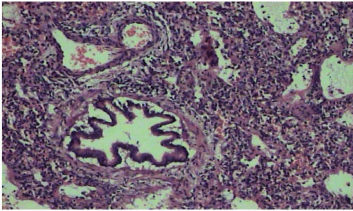
HE 染色:对照组第 7、14、28 天肺泡结构完整,肺泡壁无明显增厚,均无明显病变。模型组第 7 天肺泡结构破坏萎陷,肺泡腔增大,炎性细胞浸润明显,间质细胞增加,肺间隔增宽、增厚;第 14 天少数肺泡融合,出现小灶或多灶实变,肺间隔显著增宽;第 28 天肺泡炎轻微,肺组织结构破坏,部分肺泡塌陷融合,其间有炎性细胞浸润,可见大量宽带状及片状胶原纤维,呈弥漫性 PF(图 1)。

2.2 各组 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达的变化

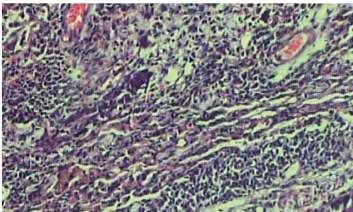
模型组各时间段 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达显著低于对照组($P < 0.01$)。模型组 Bcl-2 蛋白与 Bcl-2



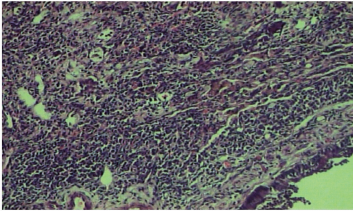
7天对照组



7天模型组



28天模型组



14天模型组

图 1 各组肺组织病理变化(HE ×100)
Fig.1 Different group of HE staining(HE ×100)

mRNA 表达在第 7 天开始下降,第 14 天达最低峰,第 28 天略有回升,但仍低于对照组(表 3)。模型组不同时间 Bcl-2 mRNA 电泳图见图 2。

2.3 各组 Fas 蛋白表达及 mRNA 表达的动态变化

模型组各时间段 Fas mRNA 及蛋白表达显著高于对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)模型组 Fas 从 7 天开始逐步升高,第 28 天达最高峰(表 4)。模型组不同时间 Fas mRNA 电泳图见图 3。

表 3 各组 Bcl-2 蛋白及 mRNA 表达的动态变化 (n=8)

Table 3 Dynamic change of each group of Bcl-2 protein expression and the expression of mRNA (n=8)

组别	时间	Bcl-2 蛋白	Bcl-2 mRNA
对照组		0.31 ± 0.01	0.601 ± 0.051
模型组	7 d	0.21 ± 0.01 ^a	0.425 ± 0.035 ^a
	14 d	0.15 ± 0.02 ^a	0.285 ± 0.031 ^a
	28 d	0.17 ± 0.05 ^a	0.372 ± 0.028 ^a

a: 与对照组比较, P < 0.01

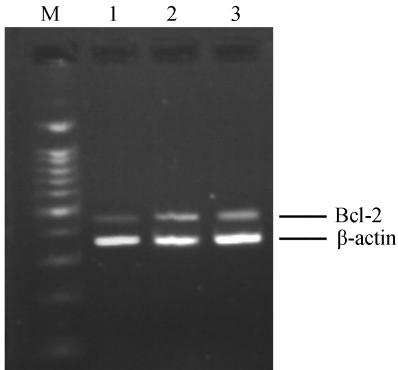


图 2 模型组不同时间 Bcl-2 mRNA 电泳图。 M: Marker; 1: 14 天; 2: 28 天; 3: 7 天

Fig. 2 the mRNA expression of Bcl-2 of Model group at different time mRNA

表 4 各组 Fas 蛋白表达及 mRNA 表达的动态变化 (n=8)

Table 4 Dynamic change of each group of Fas protein expression and the expression of mRNA (n=8)

组别	时间	Fas 吸光度值	Fas mRNA
对照组		0.09 ± 0.02	0.352 ± 0.100
模型组	7 d	0.53 ± 0.02 ^a	1.022 ± 0.080 ^b
	14 d	0.67 ± 0.03 ^a	1.132 ± 0.131 ^b
	28 d	0.87 ± 0.034 ^a	1.352 ± 0.110 ^b

a: 与对照组比较, P < 0.01; a: 与对照组比较, P < 0.05

2.4 各组细胞凋亡的动态变化

模型组细胞凋亡指数 (AI) 表达显著高于对照组 (P < 0.01), 模型组 AI 从第 7 天开始逐步升高, 第 28 天达最高峰 (表 5)。

表 5 各组细胞凋亡的动态变化 (n=8)

组别	7 d	14 d	28 d
对照组	1.89 ± 0.53	2.53 ± 0.35	2.55 ± 0.37
模型组	7.32 ± 0.65 ^a	8.92 ± 0.52 ^a	10.32 ± 0.47 ^a

a: 与对照组比较, P < 0.01

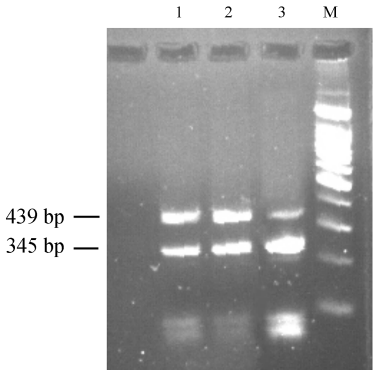


图 3 模型组不同时间 Fas mRNA 电泳图。 M: Marker; 1: 28 天; 2: 14 天; 3: 7 天

Fig. 3 the mRNA expression of Fas of Model group at different time mRNA

3 讨 论

肺泡上皮细胞凋亡过度导致肺组织结构破坏, 产生肺纤维化^[2]。细胞过度凋亡, 引起转化因子 β 生成失调, 亦致肺纤维化的发生^[5-6]。本实验应用 TUNEL 法检测博来霉素诱导的肺纤维化模型的细胞凋亡, 结果显示: 模型组肺泡/支气管上皮细胞凋亡指数明显高于对照组, 两者比较差异有显著性 (P < 0.01)。提示细胞凋亡在肺纤维化发病机制中起重要作用。

细胞凋亡是由凋亡诱导因素触发细胞内预存的死亡程序, 而导致的细胞死亡过程, 是一个受基因调控的过程。Bcl-2 蛋白分布在线粒体外膜的浆膜面、核膜和内质网表面。Bcl-2 与 Bax、钙调蛋白磷酸酶、p53 结合蛋白等结合, 可阻止 p53 介导的细胞凋亡以及调节 caspase-3 途径, 发挥其抗凋亡的作用^[7]。Bcl-2 蛋白对于稳定线粒体膜有着重要的作用, 维持线粒体的跨膜电位^[8]。本研究结果显示, Bcl-2 蛋白及 Bcl-2 mRNA 在模型组表达较对照组减少 (P < 0.01), 模型组 Bcl-2 的变化趋势为从第 7 天后逐步减低, 在第 14 天达最低峰, 28 天表达略有回升, 但仍低于对照组。Bcl-2 mRNA、Bcl-2 蛋白在第 14 天模型组达最低峰, 可能与 Bcl-2 的激活诱因有关, ROS (活性氧组分) 是引起 Bcl-2 表达抑制的重要诱因^[9]。早期氧自由基较多, 抑制抗凋亡基因的表达, 使 Bcl-2 蛋白表达明显下降, 在后期的纤维化阶段炎症和氧化应激已经不明显, 因而 Bcl-2 蛋白及 Bcl-2 mRNA 表达下降幅度较前减少。大鼠吸入抗 Fas 抗体导致了与 Fas/FasL 途径类似的过度凋

亡及继发的纤维化^[10]。李今朝等^[11]经大鼠气管给予 BLM 诱导肺间质纤维化模型时,发现肺泡上皮 Fas 基因上调,同时出现了上皮细胞凋亡。本实验结果表明模型组肺泡/支气管上皮细胞 Fas 蛋白及 Fas mRNA 表达明显高于对照组($P < 0.01$),且从第 7 天开始逐步升高,到第 28 天达最大值,与肺泡/支气管上皮细胞凋亡指数变化一致。

肺纤维化的形成机制尚不十分明确,细胞凋亡在肺纤维化形成中起着重要的作用,细胞的信号转导不是一个一对一的关系,而是一个巨大而复杂的信号网络系统,和其它信号途径之间存在交叉对话(cross-talk)现象,共同调节细胞的各种活动。一个信号途径在一种疾病发生中究竟有多大程度的影响,还需大量的体内及体外实验去验证。随着人们对 PF 这一疾病的不断深入了解,Fas 和 Bcl-2 在其发病机制中所起的作用也将进一步被论证,最终将为 PF 这一疾病的诊断和治疗提供新的手段,为攻克这一困扰人类健康和生命的难题作出重要贡献。

参考文献:

- [1] Hsu SY, Hsueh AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm[J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(2): 593-614.
- [2] Danial NN. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7254-7263.
- [3] Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(1): 59-69.
- [4] Pratt MA, Niu MY. Bcl-2 controls caspase activation following a p53-dependent cyclin D1-induced death signal [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 14219-14229.
- [5] Williams K, Malarkey D, Cohn L, et al. Identification of spontaneous feline idiopathic pulmonary fibrosis: morphology and ultrastructural evidence for a type II pneumocyte defect[J]. *Chest*, 2004, 125(6): 2278-2288.
- [6] Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, et al. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions[J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(9): 4310-4320.
- [7] Bowen JM, Gibson RJ, Stringer AM, et al. Role of p53 in irinotecan-induced intestinal cell death and mucosal damage[J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(2): 197-210.
- [8] Ekoff M, Kaufmann T, Engstrom M, et al. The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation induced apoptosis of mast cells[J]. *Blood*, 2007, 110(9): 3209-3217.
- [9] Panduri V, Surapureddi S, Soberanes S, et al. P53 mediates amosite asbestos-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(4): 443-452.
- [10] Barlow CA, Shukla A, Mossman BT, et al. Oxidant-mediated cAMP response element binding protein activation: calcium regulation and role in apoptosis of lung epithelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(1): 7-14.
- [11] 李今朝, 李艳杰, 李振华, 等. 实验性肺纤维化细胞凋亡及 Fas/FasL 基因变化[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2005, 28: 184-187.