

黄芪甲苷对博来霉素诱导的小鼠特发性肺纤维化 自噬和焦亡的影响

王鹏飞, 林昶, 刘杨, 黄霖晗, 韩佳, 欧江琴, 丁倩, 徐昌君*, 杨长福*
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**探究黄芪甲苷对特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)小鼠自噬和焦亡的影响及其作用机制,为黄芪抗肺纤维化的研究治疗提供新思路。**方法:**C57bl/6小鼠随机分为4组,分别为假手术组、模型组、黄芪甲苷组和地塞米松组。小鼠模型行气管切开术,滴注博来霉素(BLM)诱导成模。黄芪甲苷组和地塞米松组每天分别灌胃黄芪甲苷($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和地塞米松($0.125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),假手术组和模型组每天予等量生理盐水。小鼠于14 d取材,通过组织病理学染色评估黄芪甲苷对IPF诱导的肺损伤的治疗作用,通过蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测肺组织中,LC3 II,白细胞介素- 1β (IL- 1β),IL-18和半胱氨酸天冬氨酸酶-1(Caspase-1)的水平以评估炎症反应程度和焦亡水平的表达水平。以苏木素-伊红(HE)和马松(Masson)三色染色观察肺组织形态和胶原纤维的表达水平。免疫组化(IHC)及Western blot分析自噬和焦亡标记蛋白表达水平。**结果:**与假手术组比较,模型组肺组织炎症反应明显、胶原蛋白显著增加($P < 0.05$),与模型组比较,黄芪甲苷组明显抑制肺组织炎症反应,下调胶原蛋白表达($P < 0.05$)。IHC和Western blot检测结果均显示,黄芪甲苷能显著提高LC3 II蛋白表达($P < 0.05$)同时抑制p62蛋白积累($P < 0.05$),降低Caspase-1,IL- 1β 和IL-18蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)的表达水平。**结论:**黄芪甲苷治疗显著改善了BLM诱导的小鼠肺纤维化,其作用机制可能与抑制焦亡并增强自噬有关。研究表明黄芪甲苷在抑制肺纤维化方面具有的治疗潜力。

[关键词] 黄芪甲苷; 特发性肺纤维化; 自噬; 焦亡

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)10-0144-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181036

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180308.1134.003.html>

[网络出版时间] 2018-03-08 12:35

Effect of Astragaloside IV on Autophagy and Pyroptosis in Mice Bleomycin-induced Idiopathic Pulmonary Fibrosis

WANG Peng-fei, LIN Chang, LIU Yang, HUANG Mu-han, HAN Jia, OU Jiang-qin,
DING Qian, XU Chang-jun*, YANG Chang-fu*
(Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the regulatory effect of astragaloside IV on autophagy and pyroptosis in mice lung tissue with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and its mechanism, in order to provide new ideas for the study of astragalus' effect against lung fibrosis. **Method:** C57bl/6 mice induced by intratracheal instillation of bleomycin (BLM) were randomly divided into 4 groups: sham-operated group, model group, astragaloside IV

[收稿日期] 20171218(027)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760817,81660735);贵州省联合基金项目(黔科合 LH字[2016]7119);贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY字[2016]189);贵州省普通高等学校中药民族药微生物发酵与生物转化工程研究中心项目(黔教合 KY字[2015]337);贵州省研究生科研基金立项课题(黔教研合 KYJ字[2016]015)

[第一作者] 王鹏飞,在读硕士,从事中医药防治肺纤维化的研究工作,Tel:0851-5652834,E-mail: ddjwbpf@163.com

[通信作者] *杨长福,博士,副教授,从事中西医结合基础研究,Tel: 0851-5652834,E-mail: yangchangfu@126.com;

*徐昌君,博士,讲师,从事中西医结合基础研究,Tel: 0851-5652048,E-mail: xcj1016@163.com

group and dexamethasone group. astragaloside IV and dexamethasone groups were given respectively astragaloside IV ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and dexamethasone ($0.125 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) each day, while physiological saline was given in sham surgery and model groups each day. At the 14th day, lung tissues were collected for the analysis of the effect of astragaloside IV on morphology, collagen, autophagy and pyroptosis protein expression by hematoxylin-eosin (HE), Masson, immunohistochemistry (IHC) and Western blot. **Result:** Astragaloside IV significantly inhibited the inflammatory reaction of lung tissues and down-regulated the expression of collagen ($P < 0.01$). The results of IHC and Western blot showed that astragaloside IV significantly increased the expression of LC3 II/ β -actin ($P < 0.05$), inhibited the accumulation of p62 ($P < 0.05$), and decreased the expression of Caspase-1 ($P < 0.01$), IL-1 β ($P < 0.05$) and IL-18 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Astragaloside IV group shows alleviation of pulmonary fibrosis. The mechanism may be related to the inhibition of pyroptosis and the increase of autophagy. The study shows the therapeutic potential of Astragaloside IV in inhibiting pulmonary fibrosis.

[**Key words**] astragaloside IV; idiopathic pulmonary fibrosis; autophagy; pyroptosis

特发性肺纤维化 (IPF) 是肺部炎症导致肺泡持续损伤及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 反复破坏、修复、重建和过度沉积, 临床表现为进行性呼吸困难并伴有刺激性干咳, 肺功能为限制性通气障碍, 病情一般持续恶化, 最终因呼吸衰竭而死亡^[1-2]。流行病学研究显示, IPF 约占所有间质性肺病 (interstitial lung disease, ILD) 的 65% 左右, 其发病率呈不断上升趋势, 目前每 10 万人患病率估计在 14.0 至 42.7, 且 3 年内急性恶化发生率约为 20.7%^[3]。鉴于其致命的预后, IPF 已经成为最受研究界关注的问题之一。现阶段 IPF 临床药物治疗主要有糖皮质激素、抗氧化药物 (N-乙酰半胱氨酸)、免疫抑制剂、抗纤维化药物 (秋水仙碱、吡非尼酮吡非尼酮, γ 型干扰素) 以及以上几种药物的联合应用, 但仍存在效价不足和多重副作用等弊端^[4]。由于发病机制不明, 至今也缺乏针对 IPF 的特效药物, 因此明确 IPF 的发病机制对于寻找有效的治疗靶点十分重要。

肺纤维化早期, 肺部炎症表现为大量中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润, 肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 活化, 毛细血管内皮细胞 (alveolar epithelial cell, AEC) 和肺泡上皮细胞损伤^[5]。组织病理上, 炎性细胞和细胞因子介导, 胶原纤维大量生成, 成纤维细胞病灶增加, 肺泡数量减少、变形、闭锁或残留裂隙状不规则形态, 细支气管代偿、扩张呈蜂窝肺, 正常肺组织结构被破坏, 功能丧失, 肺毛细血管数量减少甚至闭锁是引起肺纤维化的重要原因^[6-7]。

焦亡又称半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 依赖的细胞死亡, 最初意为在巨噬细胞细菌感染期间表示促炎症程序性细胞死亡^[8], 现在是指通过依赖于

Caspase-1 炎症小体激活介导的细胞死亡形式, 主要表现为 Caspase-1 活化导致膜孔快速形成, 使胞膜破裂和细胞膨胀, 同时激活白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和 IL-18, 迅速释放炎症细胞内容物而死亡^[9-10]。细胞焦亡是近期发现的一种新的细胞死亡方式, 同时也是炎症反应的重要途径之一。细胞焦亡与临床各种疾病的关系建立在 Caspase-1 与临床各种疾病的研究之上, 例如痛风, II 型糖尿病 (T2D), 阿尔茨海默症, 动脉粥样硬化等疾病均证实与 Caspase-1 激活的细胞焦亡导致的 IL-1 β 和 IL-18 释放有关^[11-12], 因此它激发组织炎症反应, 但细胞焦亡是否与肺纤维化过程中过度的炎症反应有关, 这并没有明确的研究证据, 这有赖于仔细的实验研究。自噬作为一种降解受损细胞器和蛋白质的细胞死亡机制, 在人类肺部疾病中越来越重要, 它既是发病机制的调节者又是潜在的治疗靶点。在这一过程中, 细胞溶质被隔离到自噬体, 随后被转运至溶酶体酶促降解, 作为代谢前体再循环^[12]。

黄芪性微温, 味甘, 归肺、脾二经, 具有补气升阳、固表止汗、托毒排脓、利水消肿等功效, 临床以黄芪为主的方药在抗肺纤维化的治疗中广泛应用。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分之一, 具有血管扩张、预防内皮功能障碍、改善心脏细胞能量代谢、抗炎作用和抗氧化等作用^[13], 前期研究显示, IPF 小鼠造模后 14 d 胶原蛋白以及羟脯氨酸的表达最为明显, 黄芪甲苷 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 抑制炎症反应的作用较强^[14], 其是否通过抑制焦亡和增强自噬来抑制博来霉素诱导的纤维化仍需进一步研究。因此, 本研究着重于探讨黄芪甲苷改善肺间质纤维, 自噬和焦亡之间可能存在的调控机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 C57bl/6 小鼠 80 只,雌雄各半,6 周龄,体质量 18 ~ 20 g,北京维通利华实验动物有限公司,实验动物生产质量合格证号 SCXK(京)2016-0001,自由饮食,适应性喂养 1 周。本动物实验经贵州医科大学动物伦理委员会批准进行,实验动物符合伦理委员会规定。

1.2 药物及试剂 黄芪甲苷(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-17022804,纯度 $\geq 98\%$),地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 131220),盐酸博来霉素(BLM)注射用粉末(日本化药株式会社,批号 730342)。一抗 LC3A/B(美国 CST 公司,批号 70548); β -肌动蛋白(β -actin),p62, Caspase-1, IL-1 β , IL-18 一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 GR70927-6, GR72113-5, ab1872, ab9722, ab71495);山羊抗兔 HRG,山羊抗小鼠 HRG 二抗(北京中杉金桥生物公司,批号分别为 109525, 109145);SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒, BeyoECL Moon 特超敏 ECL 化学发光试剂盒,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 091317170911, 101617171013, 110316170209);马松(Masson)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20170727);DAB 显色液(中杉金桥公司,批号 k1556158);总蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号 P1025);BCA 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物技术有限公司,批号 00121506)。

1.3 仪器 VARIOSKAN FLASH 型酶标仪, PLUS 新型 -80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo Scientific Revco 公司);DP73 + standard1.6 型显微镜摄像 CCD 照相系统(日本 Olympus 公司);Power PAC Basic 型电泳仪, chemidoc™ XRS + with imagelab™ software 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模取材 C57bl/6 小鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、黄芪甲组 and 地塞米松(阳性)组,每组 20 只。造模方法和药物剂量依据文献[7,14],适应性喂养 1 周后,腹腔注射 4% 水合氯醛(10 mL·kg⁻¹)麻醉,仰卧固定,碘伏酒精消毒颈部皮肤,剪开逐层分离暴露气管,模型组、黄芪甲组 and 地塞米松组经气管滴注 BLM (10 mg·kg⁻¹),地塞米松组予等量生理盐水。注射后提尾倒悬并快速旋转小鼠,保暖至苏醒。造模成功后黄芪甲组(50 mg·kg⁻¹)和阳性组(10 mg·kg⁻¹)灌胃给药,假手

术组和模型组给予等体积的生理盐水,于 14 d 取材。小鼠予麻醉后仰卧位固定,腹主动脉采血处死,快速取出左叶肺置于 4% 多聚甲醛固定做病理检查,右肺 -80 °C 冰箱冻存,进行相关分子检测。

2.2 肺组织病理检查 组织常规固定、脱水透明、石蜡包埋后以 5 μ m 厚度切片,37 °C 烘片过夜,二甲苯脱蜡 2 次,10 min/次,乙醇梯度入水(100%, 90%, 80%, 70%),5 min/次。HE 和 Masson 染色以试剂说明书依次操作,乙醇梯度入水(70%, 80%, 90%, 100%),3 min/次,二甲苯透明,10 min/次,中性树胶封片。HE 和 Masson 镜下按 Szapiel 方法进行积分统计^[15]。

2.3 免疫组化(IHC)检测肺组织 Caspase-1, IL-18 和 IL-1 β 阳性表达 石蜡切片常规脱蜡,乙醇梯度入水后,枸橼酸钠溶液(0.01 mol·L⁻¹, pH 6.0)微波炉高火抗原修复,3% H₂O₂ 室温孵育 20 min,一抗 Caspase-1(1:50), IL-18(1:50) 和 IL-1 β (1:60) 过夜, PBS 洗涤,二抗(1:200) 37 °C, 30 min, PBS 洗涤, DAB 显色,苏木素复染,常规透明封片。采用软件 Image J 进行图像分析。

2.4 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 LC3A/B, p62, Caspase-1, IL-18 和 IL-1 β 蛋白的表达 按每固体组织 100 mg 剪碎后加入裂解液 0.5 mL,震荡混匀,4 °C 静置 10 min,再加抽提试剂 1 mL,震荡混匀,4 °C 静置 10 min,10 000 $\times g$ 4 °C 离心 10 min,溶液分为上下两相,中间为蛋白膜。吸除上下层液体,4 °C 干燥蛋白膜。以 2% SDS 溶解,BCA 法蛋白定量。蛋白溶液和上样缓冲液以 3:1 混匀后 95 °C 水浴变性 10 min。上样量 30 μ g/孔,80 V 进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳 2 h,70 V 转膜 2 h,5% 脱脂牛奶/TBST 封闭 1 h,一抗 LC3A/B, p62, Caspase-1, IL-18 和 IL-1 β (1:500),4 °C 孵育过夜,二抗(1:5 000) 室温摇床孵育 1 h。BeyoECL Star 特超敏 ECL 化学发光试剂盒显影, Bio-Rad 凝胶成像仪拍照。采用软件 Image Lab 5.0 进行图像分析。

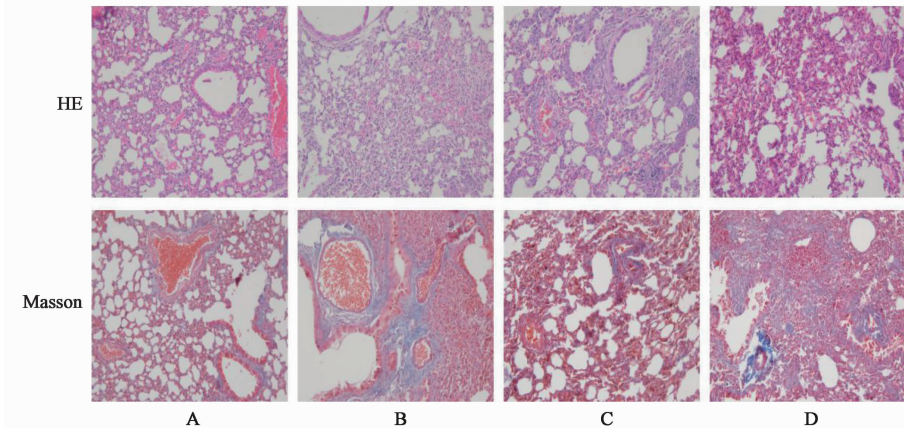
2.5 统计学分析 数据结果采用 SPSS 22.0 进行统计分析,所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验正态和方差齐,各组间比较以单因素方差分析(one-way-ANOVA),多组定量资料之间的比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 IPF 小鼠肺组织炎症反应及胶原蛋白表达的影响 假手术组显示正常结构,无炎症、水肿或纤维化病变;模型组肺组织结构严重受损,肺间质明显

增厚,肺泡塌陷,肺实变严重;黄芪甲苷能显著抑制肺纤维化病变,保护肺正常形态结构,使病变结构得以改善。地塞米松组肺组织结构模糊,仅残存少量正常肺组织。假手术组胶原蛋白评分表达较少,而

模型组胶原蛋白评分表达明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,黄芪甲苷组显著降低肺组织胶原蛋白表达,胶原蛋白评分明显降低($P < 0.05$)。地塞米松组与模型组比较无显著性差异。见图 1,表 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 黄芪甲苷组; D. 地塞米松(图 2,3 同)

图 1 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织形态和胶原表达的影响($\times 200$)

Fig. 1 Effect of astragaloside IV on morphology and collagen expression in lung tissue of IPF mice($\times 200$)

表 1 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织胶原蛋白评分的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 1 Effect of astragaloside IV on Collagen score IPF mice of lung tissue($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	评分/分
假手术	-	$0.020 0 \pm 0.005 1$
模型	-	$0.047 9 \pm 0.010 1^{1)}$
黄芪甲苷	50	$0.016 1 \pm 0.003 6^{3)}$
地塞米松	0.125	$0.037 8 \pm 0.008 0$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.2 对 IPF 小鼠肺组织 Caspase-1, IL-18 和 IL-1 β 表达影响 经典焦亡通路中 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达,与假手术组比较,模型组在间质和肺泡腔隙中 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达均明显增高($P < 0.05$);与模型组比较,黄芪甲苷组具有明显的抑制 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达的作用($P < 0.05$, $P < 0.01$),地塞米松组除 IL-1 β 外无明显改善作用。见图 2,表 2。

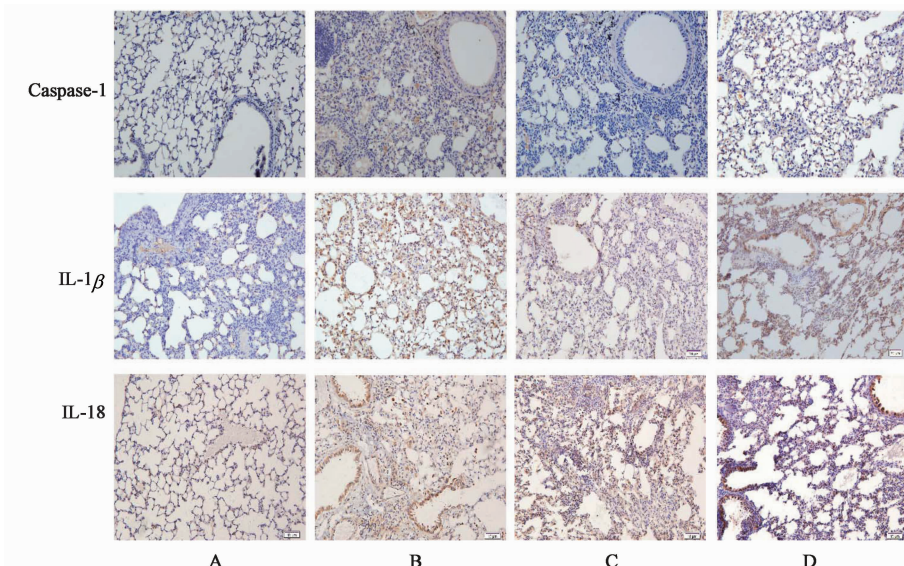


图 2 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of astragaloside IV on Caspase-1, IL-1 β and IL-18 expression in IPF mice of lung tissue(IHC, $\times 200$)

表 2 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of astragaloside IV on expression of Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in IPF mice of lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-1	IL-1 β	IL-18
假手术	-	0.048 7 \pm 0.002 5	0.018 0 \pm 0.005 1	0.059 4 \pm 0.008 2
模型	-	0.068 0 \pm 0.004 1 ¹⁾	0.045 2 \pm 0.010 6 ¹⁾	0.079 0 \pm 0.007 0 ¹⁾
黄芪甲苷	50	0.052 2 \pm 0.004 1 ⁴⁾	0.023 3 \pm 0.007 1 ³⁾	0.062 8 \pm 0.006 1 ³⁾
地塞米松	0.125	0.066 0 \pm 0.006 3	0.023 0 \pm 0.002 8 ³⁾	0.071 7 \pm 0.009 7

3.3 对 IPF 小鼠肺组织 LC3, p62, IL-18, IL-1 β 和 Caspase-1 蛋白表达的影响 经典焦亡通路中 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达,与假手术组比较,模型组 p62, IL-18, IL-1 β 和 Caspase-1 蛋白表达均明显升高,LC3 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷组抑制 p62, IL-18, IL-1 β 和 Caspase-1 蛋白表达,升高 LC3 蛋白表达 ($P < 0.05, P < 0.01$),地塞米松组除 IL-1 β 外无明显改善作用。见图 3,表 3。

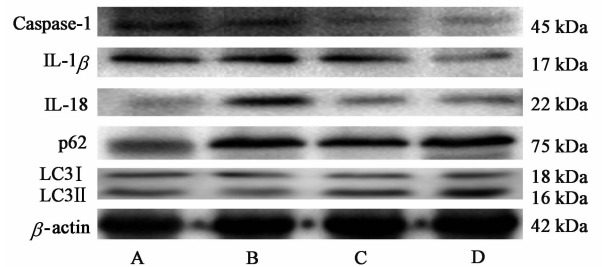


图 3 各组小鼠肺组织 Caspase-1, IL-1 β , IL-18, p62, LC3 蛋白的表达
Fig. 3 Expression of Caspase-1, IL-1 β , IL-18, p62, LC3 protein in each groups

表 3 黄芪甲苷对 IPF 小鼠肺组织 Caspase-1, IL-1 β , IL-18, p62, LC3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of astragaloside IV on expression of Caspase-1, IL-1 β , IL-18, p62, LC3 protein in IPF mice of lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-1/ β -actin	IL-1 β / β -actin	IL-18/ β -actin	p62/ β -actin	LC3 II / β -actin	LC3 II /LC3 I
假手术	-	0.048 7 \pm 0.002 5	0.018 0 \pm 0.005 1	0.059 4 \pm 0.008 2	0.449 3 \pm 0.168 4	0.965 4 \pm 0.037 0	5.043 2 \pm 0.412 5
模型	-	0.068 0 \pm 0.004 1 ¹⁾	0.045 2 \pm 0.010 6 ¹⁾	0.079 0 \pm 0.007 0 ¹⁾	1.020 7 \pm 0.059 0 ²⁾	0.616 7 \pm 0.071 8 ¹⁾	2.658 2 \pm 0.143 8 ¹⁾
黄芪甲苷	50	0.052 2 \pm 0.004 1 ⁴⁾	0.023 3 \pm 0.007 1 ³⁾	0.062 8 \pm 0.006 1 ³⁾	0.800 4 \pm 0.069 2 ³⁾	1.143 7 \pm 0.150 3 ³⁾	4.350 0 \pm 0.518 1 ³⁾
地塞米松	0.125	0.066 0 \pm 0.006 3	0.023 0 \pm 0.002 8 ⁴⁾	0.071 7 \pm 0.009 7	1.025 2 \pm 0.266 4	1.195 6 \pm 0.296 9	2.896 6 \pm 0.193 6

4 讨论

IPF 是以气体交换受损为特征的进行性间质性肺病,其特征在于炎性细胞的浸润,成纤维细胞的活化和增殖以及 ECM 异常沉积导致广泛的肺重塑^[16]。IPF 早期肺部炎症反应明显。细胞焦亡是炎症性的细胞死亡,其生物学特征是细胞死亡依赖于 Caspase-1 的激活,伴随着细胞内容物释放及大量促炎因子的产生^[10]。炎性因子(如 IL-1 β , IL-18 等)在肺纤维化早期发具有重要促进作用,IL-1 β 通过转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 诱导早期炎症,促进纤维化途径的活化,触发肌成纤维细胞聚集并最终形成纤维化病灶^[17],IL-18 不仅参与 IPF 的炎症过程,还参与肺组织损伤后的重建过程如肺间质纤维化、血管壁增厚和上皮细胞再生^[18]。IPF 中存在 IL-1 β 和 IL-18 高水平表达,其早期炎症反应可能与 Caspase-1 激活的细胞焦亡存在某种关联。

前期研究显示,模型组肺组织胶原蛋白表达水

平与炎症反应具有显著相关性^[14],本实验中,HE 和 Masson 染色模型组胶原纤维表达最为明显,IHC 和 Western blot 结果同样证实,IPF 模型组焦亡水平高表达,这说明焦亡的发生可能是早期 IPF 发生发展的重要原因之一。自噬是溶酶体自我降解的过程,维持着细胞蛋白质和细胞器的合成,降解和再循环之间的稳态平衡,同时也是综合应激反应的核心组成部分,负责调节先天免疫和适应性免疫^[19]。有文献显示来自 IPF 患者的肺组织匀浆中的 LC3II 表达水平降低,同时 p62 表达增高,自噬通量的减少,自噬不足可能是 IPF 中加速上皮细胞衰老和肌成纤维细胞分化的潜在机制^[20]。

本实验通过免疫组化定位比较和免疫蛋白印迹法对焦亡蛋白 IL-18, IL-1 β 和 Caspase-1 和自噬相关蛋白 p62 与 LC3 含量测定,确定自噬与细胞焦亡的关联性以及黄芪甲苷的干预作用。结果显示模型组肺组织 LC3 II /LC3 I 下调,而 p62 的表达升高,自噬

被抑制,这与临床报导相一致^[20],同时焦亡蛋白 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达上调明显,说明在模型组中自噬活性下降,焦亡的活性增强。而在黄芪甲苷治疗组中, LC3 II/LC3 I 的表达明显增强, p62 的表达明显减弱。同时 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 的表达显著降低,因此,黄芪甲苷可能通过增强自噬并抑制焦亡蛋白的表达,抑制肺纤维化的发生发展。

综上,黄芪甲苷可通过增强自噬活性,降低 Caspase-1, IL-1 β 和 IL-18 等焦亡蛋白表达,削弱肺组织的炎症反应以拮抗肺纤维化的发展。

[参考文献]

[1] King T E, Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Lancet, 2011, 378(9807):1949-1961.

[2] Martinez F J, Collard H R, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3:17074.

[3] 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.

[4] 杜毅. 治疗特发性肺纤维化药物的药理研究及临床应用进展[J]. 天津药学, 2015, 27(2):60-64.

[5] Williamson J D, Sadofsky L R, Hart S P. The pathogenesis of bleomycin-induced lung injury in animals and its applicability to human idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Exp Lung Res, 2015, 41(2):57-73.

[6] Robbie H, Daccord C, Chua F, et al. Evaluating disease severity in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Eur Respir Rev, 2017, doi: 10.1183/16000617.

[7] Ruscitti F, Ravanetti F, Essers J, et al. Longitudinal assessment of bleomycin-induced lung fibrosis by micro-CT correlates with histological evaluation in mice[J]. Multidiscip Respir M, 2017, doi: 10.1186/s40248-017-0089-0.

[8] Brennan M A, Cookson B T. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis[J]. Mol Microbiol, 2000, 38(1):31-40.

[9] Crowley S M, Knodler L A, Vallance B A. Salmonella and the inflammasome: battle for intracellular dominance

[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2016, 397:43-67.

[10] Rayamajhi M, ZHANG Y, MIAO E A. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1040:85-90.

[11] Duwell P, Kono H, Rayner K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Cah Rev The, 2010, 464(7293):1357-1361.

[12] Ryter S W, Choi A M. Autophagy in lung disease pathogenesis and therapeutics[J]. Redox Biol, 2015, 4:215-225.

[13] HUANG P, LU X, YUAN B, et al. Astragaloside IV alleviates E. coli-caused peritonitis via upregulation of neutrophil influx to the site of infection [J]. Int Immunopharmacol, 2016, 39:377-382.

[14] 徐昌君, 王鹏飞, 刘杨, 等. 黄芪甲苷对特发性肺纤维化自噬活性作用及 PI3K/Akt/mTOR 信号调控的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(18):75-82.

[15] 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(4):893-899.

[16] Young A, Brockbank S, Hansen N U B, et al. Assessment of clinically relevant extracellular matrix markers in a bleomycin-induced model of lung fibrosis in the mouse[J]. Am Thoracic Soc, 2016: A2437.

[17] Bellaye PS, Kolb M. Why do patients get idiopathic pulmonary fibrosis? Current concepts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis [J]. BMC Med, 2015, doi: 10.1186/s12916-015-0412-6.

[18] Abdel F E, Bhattacharya A, Herron A, et al. Critical role for IL-18 in spontaneous lung inflammation caused by autophagy deficiency [J]. J Immunol, 2015, 194(11):5407-5416.

[19] Kuwano K, Araya J, Hara H, et al. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. Respir Investig, 2016, 54(6):397-406.

[20] Patel A S, Ling L, Geyer A, et al. Autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41394.

[责任编辑 周冰冰]