

· 实验研究 ·

P β K/Akt通路在大鼠矽肺纤维化中的作用研究Roles of P β K/Akt Pathway in lung fibrosis of rat caused by silica

鞠莉, 贾振宇, 蒋兆强, 王晶, 陈日萍, 张幸, 周华仕

JU Li, JIA Zhenyu, JIANG Zhaoqiang, WANG Jing, CHEN RiPing, ZHANG Xing, ZHOU Hua shi

(浙江省医学科学院卫生学研究所, 浙江 杭州 310013)

摘要: 探讨 P β K/Akt通路在大鼠矽肺纤维化过程中的作用。将 SD雄性大鼠 75只均分成 3组, 矽肺组大鼠以非暴露式气管内注入 50 mg/ml 二氧化硅混悬液 1 ml 建立矽肺模型, 于染尘 3、7、14、21 和 28 d 分别股动脉放血处死各组 5 只大鼠, 取肺组织进行病理观察及总 RNA 和蛋白的提取, 分别采用 RT-PCR 及 WB 检测 P β K、Akt mRNA 及 P-Akt 的表达变化。染尘 3 d 后肺组织出现炎症反应, 7 d 后见细胞性结节并进行性加重。P β K、Akt mRNA 和 P-Akt 蛋白随着染尘时间延长有不同程度变化, 但统计学差异不显著。提示 P β K/Akt 通路可能在大鼠矽肺纤维化中发挥作用, 但发挥作用的时间段有待进一步探讨。

关键词: 矽肺; 肺纤维化; P β K/Akt mRNA; P-Akt

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)04-0282-03

矽肺是由于长期吸入大量游离二氧化硅 (SiO₂) 粉尘引起的以肺部纤维化为主的全身性疾病, 其发病机制仍存争议且尚无特效治疗药物。近年来研究表明, P β K/Akt 通路参与多种细胞因子致纤维化过程, 对细胞增殖、分化及凋亡等起重要作用。本研究通过建立大鼠矽肺纤维化模型, 探寻 P β K/Akt 通路在矽肺纤维化中的作用, 以期对矽肺发病及防治提供新的线索。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 SiO₂ 粉尘 由中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所提供, 游离 SiO₂ 含量 97.7%, 分散度 < 5 μ m 的占 98.9%。

1.1.2 实验动物 选用浙江省实验动物中心 SPF 级 SD 雄性大鼠 75 只, 体重 180~200 g。所有动物实验均在 SPF 级动物房进行。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及染尘 75 只大鼠均分成 3 组: 矽肺 (SiO₂) 组、阴性 (生理盐水) 组和空白对照组。矽肺组大鼠以非暴露式气管内注入粉尘 50 mg/只, 染尘后 3、7、14、21 和 28 d 股动脉放血处死各组 5 只大鼠, 取部分肺组织作病理

观察。

1.2.2 其他肺组织用于 P β K、Akt mRNA 及 P-Akt 蛋白的检测。RT-PCR 以 β -actin 作内参照。各引物序列如下: 大鼠 β -actin 上游: 5'-GCA TGT GCA AGG CCG GCT TC-3', 下游: 5'-GGC CTC GGT GAG CAG CAC AG-3'; 大鼠 P β K 上游: 5'-TGG TTC TIG CGA AGT GAG ATA G-3', 下游: 5'-CTG CTG CGT GAA GTC CTG TA-3'; 大鼠 Akt 上游: 5'-CCA CAG GTC GCT ACT ATG CC-3', 下游: 5'-ACA GCC CGA AGT CCG TTA TC-3'。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 61 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、45 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。WB 检测 P-Akt 蛋白并以 GAPDH 作内参。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件, 用方差分析对各组均数进行比较, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理形态学观察

2.1.1 大体观察 对照组及生理盐水组大鼠肺脏表面光滑, 质软, 弹性好; 矽肺组染尘 3 d 起肺组织表面粗糙, 弹性差。染尘 7 d 起肺组织表面见灰白色凹凸不平结节, 并进行性加重。

2.1.2 光镜观察 对照组大鼠未见明显组织形态学变化 (图 1)。矽肺组染尘 3 d 肺组织可见数个较小类圆形细胞性结节, 部分肺泡隔增厚 (图 2)。染尘 7 d 后见细胞性结节伴有胶原纤维出现, 随着时间延长, 部分细胞性结节和纤维性结节融合成片, 严重者结节中心呈玻璃样变, 伴肺气肿形成 (图 3、4)。

2.2 P β K、Akt 的 mRNA 水平变化

RT-PCR 结果表明, 大鼠染尘后不同时段大部分肺组织中 P β K、Akt mRNA 水平与对照组、生理盐水组比较有所差异, 但除 P β K mRNA 的 21 d 组外, 其他均无统计学意义, 见图 5、6。

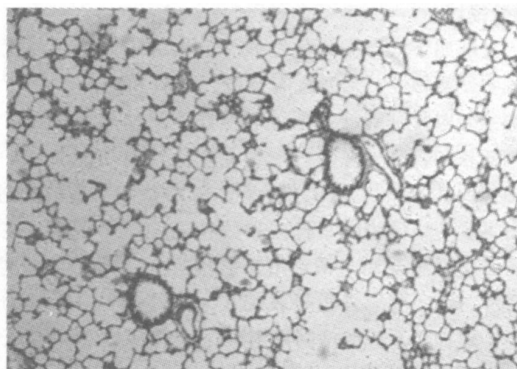


图 1 对照组大鼠肺组织细支气管及肺泡 (HE, 100 \times)

收稿日期: 2010-12-23 修回日期: 2011-03-08

基金项目: 浙江省自然科学基金 (Y206563)

作者简介: 鞠莉 (1982-), 女, 助理研究员, 主要从事职业病机制研究。

通讯作者: 周华仕, E-mail: hzzjia@yahoo.com.cn

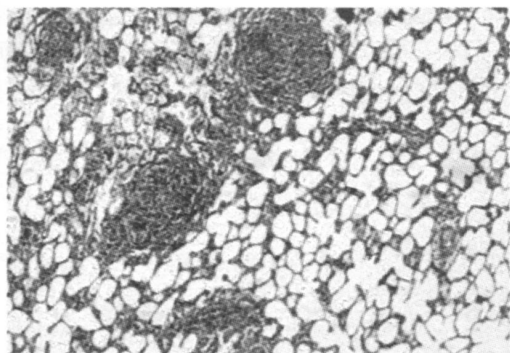


图2 SiO₂ 染尘 3 d 时大鼠肺组织可见细胞性结节形成 (HE, 100 ×)

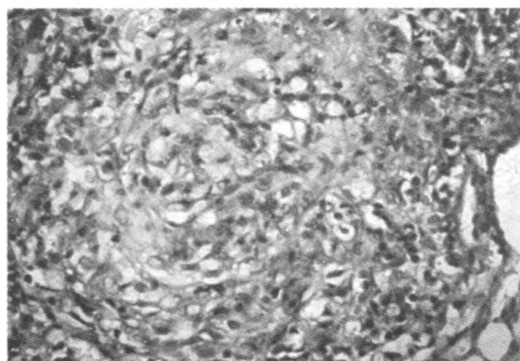


图3 SiO₂ 染尘 ≥7 d 时大鼠肺组织形成纤维性结节 (HE, 400 ×)

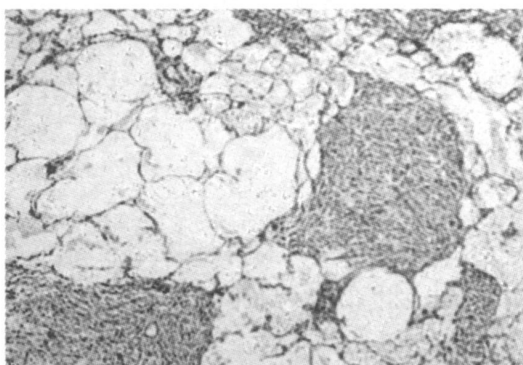
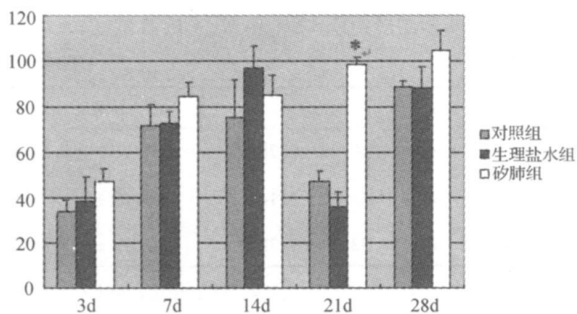


图4 SiO₂ 染尘 28 d 大鼠肺组织可见纤维性结节合并肺气肿 (HE, 100 ×)



注: 与对照组比较, P < 0.05。

图5 SiO₂ 染尘不同时段大鼠肺组织 PI3K mRNA 表达水平

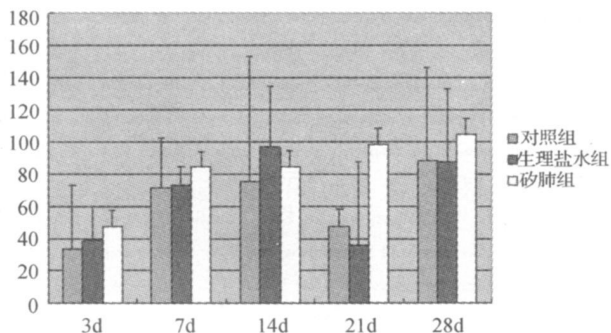


图6 SO₂ 染尘不同时段大鼠肺组织 Ak mRNA 表达水平

2.3 p-Ak 蛋白测定

WB结果表明, 在染尘不同时段, 矽肺组大鼠肺组织中 p-Ak 蛋白水平在各组间差异不具统计学意义, 见图 7。

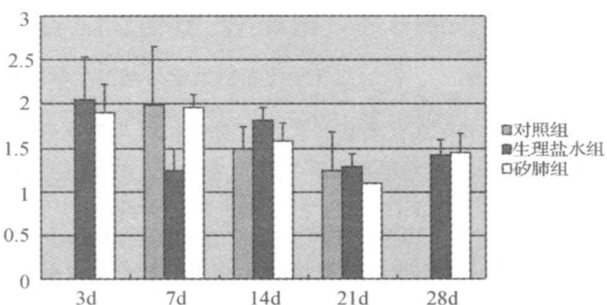


图7 SO₂ 染尘不同时段大鼠肺组织 p-Ak 蛋白质表达水平

3 讨论

矽肺纤维化包括肺组织炎症损伤、结构破坏及伴随的过度修复等过程。磷脂酰肌醇-3激酶 (PDK) 是生长因子受体超家族信号转导过程中的重要成员, 在体内可被多种细胞因子激活。丝氨酸/苏氨酸激酶 (Akt) 为 PKA 和 PKC 家族成员, 是 PDK 下游的直接靶蛋白。p-Akt 是 Akt 的活化状态, 只有 p-Akt 才可以发挥生物学功能^[1]。据报道肺纤维化生长因子 TGFβ₁、GF-1 等通过激活 PDK/Akt 通路促进肺成纤维细胞增殖和胶原蛋白合成^[2,3]。

Anonius^[4] 等发现特发性肺纤维化 (IPF) 病人肺组织中总 mRNA 与对照组不存在统计学差异, 与本文结果一致。X^[5,6] 等^[5,6] 研究发现 IPF 病人肺成纤维细胞表现为 PI3K 的低活性, PDK/Akt 通路异常活化, 进而促进成纤维细胞增殖。Lu^[7] 等^[7] 发现博来霉素致小鼠肺纤维化过程中, p-Akt 明显增加, 而总 Akt 蛋白未发生明显变化。

本研究中 PDK Akt mRNA 及 p-Akt 水平不具有统计学差异, 可能是由于该通路更早时间内被激活或激活过程短暂, p-Akt 即失去活性。染尘 21 d 组 PDK mRNA 差异有统计学意义, 可能因为该组可检测的大鼠较少。有关 PDK/Akt 通路在大鼠矽肺纤维化中的作用有待进一步研究明确。

参考文献:

[1] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts [J]. Genes Dev. 1999; 13 (22): 2905-2927.
 [2] Vitali R, Horowitz JC, Moore B, B... et al. Modulation of pro-survival

signaling in fibroblasts by a protein kinase inhibitor protects against fibrotic tissue injury [J]. Am J Pathol 2005 166 (2): 367-375.

[3] Runyan CE Schnaper HW Poncelet AC The Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway enhances smooth-muscle-mediated mesangial cell collagen expression in response to transforming growth factor-1 [J]. J Biol Chem 2004 279 (4): 2632-2639.

[4] Antonious KM Magariopoulos GA Soufla G et al Expression analysis of Akt and MAPK signaling pathways in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) [J]. J Recept Signal Transduct Res 2010 30 (4): 262-269.

[5] Xia H Diebold D Nho R et al Pathological integrin signaling enhances proliferation of primary lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. J Exp Med 2008 205 (7): 1659-1672

[6] 朱婉凌, 马希涛, 王思勤. P3K α -SMA蛋白在特发性肺纤维化肺组织的表达及意义 [J]. 中国实用医刊, 2008 6 (35): 27-30.

[7] Lu Y, J Azad N, Wang L, Y et al Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt regulates bleomycin-induced fibroblast proliferation and collagen production [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2010 42 (4): 432-441.

茶多酚对汞致大鼠肝氧化损伤影响的实验研究

Experimental study on protective effect of tea polyphenols on hepatic oxidative injury caused by mercury in rats

邓宇, 徐兆发, 刘巍, 杨海波, 陈杰, 苏贤

DENG Yu XU Zhao-fa LIU Wei YANG Hai-bo CHEN Jie SU Xian

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究汞致大鼠肝氧化损伤的机制及茶多酚的防护作用, 将 30 只大鼠均分为对照、染汞和茶多酚组, 测定肝组织 MDA、GSH、SOD、GSH-Px、ROS 及细胞凋亡。结果表明, 染汞组 GSH、MDA、ROS 和凋亡升高, GSH-Px 和 SOD 活力降低。茶多酚对以上指标有拮抗作用。提示茶多酚可通过抑制氧化损伤拮抗汞所致的肝毒性。

关键词: 汞; 茶多酚; 肝脏; 氧化损伤

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)04-0284-02

研究发现氧化损伤可能是汞致肝毒性的主要诱发因素之一^[1]。茶多酚 (tea polyphenol, TP) 在茶叶中含量较高, 是一类含有多酚羟基的化学物质, 能清除人体内过多的活性自由基, 具有极强的抗氧化作用^[2]。本实验在给予大鼠染 Hg 和 TP 干预后, 检测大鼠肝脏丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及细胞凋亡的改变, 以探讨 Hg 致大鼠肝损伤的机制以及 TP 防护作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及染毒

由中国医科大学实验动物中心提供的实验用 Wistar 大鼠 30 只, 体重 (180±10) g, 雌雄各半。正式实验前饲养 7 d, 然后按体重随机分成 3 组。第 1 组为对照组, 第 2 组为染 Hg 组, 第 3 组为 TP 干预组。首先, 给予第 1、2 组大鼠色拉油灌胃, 第 3 组给予 1 μmol/kg TP, 2 h 后, 第 1 组大鼠均于皮

下注射 0.9% NaCl, 第 2、3 组大鼠皮下注射 8.8 μmol/kg HgCl₂。灌胃及注射容量均为 5 ml/kg。每天干预和染汞各 1 次, 共 2 d。

1.2 样品采集及测定指标

最后一次干预和染毒后, 各组 6 只大鼠麻醉处死, 切取肝组织制备成匀浆, 以硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量^[3], 以 DTNB 直接法检测 GSH 的含量^[4], 采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒测定 SOD 和 GSH-Px 活力, 蛋白含量测定用 Folin-Lowry 法^[5]。另取各组剩余 4 只大鼠的肝脏制备成单细胞悬液, 采用流式细胞仪 DCFH-DA 荧光法检测细胞内 ROS 水平^[6], 采用南京凯基生物科技有限公司 Annexin V-FITC/PI 试剂盒检测肝细胞凋亡。

1.3 统计分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 实验所得数据以平均值±标准差表示, 采用单因素方差分析进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 Q 检验 (Student-Newman-Keuls, SNK)。

2 结果

2.1 肝组织 GSH 和 MDA 含量

与对照组比较, 染 Hg 导致 GSH 和 MDA 含量升高; 与染 Hg 组相比, TP 导致两者降低。见表 1。

表 1 各实验组肝组织 GSH 和 MDA 的含量 (x±s)

组别	n	GSH	MDA
对照组	6	30.38±6.78	337.76±153.52
染 Hg 组	6	43.48±3.14**	763.52±96.47**
TP+染 Hg 组	6	33.19±3.78##	544.93±122.46##

注: 与对照组相比, ** P<0.01; 与染 Hg 组相比, ## P<0.01。

2.2 肝 GSH-Px 和 SOD 活力

与对照组比较, 染 Hg 导致 GSH-Px 和 SOD 活力降低; 与染 Hg 组相比, TP 导致两者明显增高。见表 2。

收稿日期: 2011-02-09 修回日期: 2011-03-30

作者简介: 邓宇 (1981-), 女, 讲师, 博士, 主要从事重金属毒理学研究。

通讯作者: 徐兆发, 教授, 博士生导师