

• 实验研究 •

姜黄素对矽肺大鼠肺组织 PDGF 及 ERK1/2 表达的影响

Effect of curcumin on expression of PDGF and ERK1/2 in lung tissue of silicotic rats

郝小惠¹, 李娟², 郭志义¹, 刘和亮¹, 张丽娟¹

(1. 河北联合大学医学实验研究中心; 2. 河北联合大学基础医学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 将雄性 Wistar 大鼠 40 只, 随机分为正常对照组、生理氯化钠溶液组、模型组、溶剂对照组、姜黄素组。采用免疫印迹法、实时荧光定量聚合酶链反应法检测各组大鼠肺组织的血小板源性生长因子 (PDGF) 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2) 蛋白及 mRNA 表达。结果显示, 矽肺模型组、溶剂对照组大鼠肺组织中 PDGF、p-ERK1/2 蛋白及 mRNA 表达较正常对照组和生理氯化钠溶液组增高 ($P < 0.05$), 姜黄素组大鼠肺组织 PDGF、p-ERK1/2 蛋白及 mRNA 表达较模型组降低 ($P < 0.05$)。提示姜黄素可降低矽肺模型组大鼠肺组织中 PDGF、p-ERK1/2 蛋白及 mRNA 表达, 并可能通过影响 PDGF、p-ERK1/2 的表达在矽肺发病中起到一定的保护作用。

关键词: 姜黄素; 矽肺; 血小板源性生长因子; 细胞外信号调节激酶

中图分类号: R994 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)03-0196-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.03.016

矽肺纤维化作为危害较大的职业病之一, 目前尚无有效的治疗手段, 因此能否找到有效的逆转纤维化的方法意义重大。血小板源性生长因子 (plate-derived growth factor, PDGF) 是矽肺纤维化形成过程中重要的致纤维化因子之一^[1], 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 的激活也可促进纤维化的形成^[2]。近年来姜黄素在防治纤维化疾病方面的作用受到更多学者的关注^[3]。因此本实验旨在研究姜黄素对实验性矽肺纤维化大鼠肺组织 PDGF 和 ERK1/2 蛋白及 mRNA 表达的影响, 探讨姜黄素对矽肺纤维化的影响机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 无特定病原体 (SPF) 级雄性 Wistar 大鼠 40 只 [天津山川红实验动物科技有限公司, 许可证编号: SCXK (津) 2009-0001], 体质量 180~200 g。

1.1.2 试剂和仪器 矽尘 (河北省煤矿卫生与安全重点实验室提供, 纯度 99%, 粒子直径 0.5~10.0 μm , 80% 粒子在 1.0~5.0 μm), 用生理氯化钠溶液配制成 50 g/L 混悬液, 经高压蒸气灭菌后备用; 兔抗大鼠 PDGF-BB 抗体 (bioworld 生物技术有限公司, BS-4290), 鼠抗大鼠磷酸化-ERK1/2 抗体

(美国 Santa Cruz 生物技术有限公司, SC-7383); 羊抗兔 IgG-HRP 二抗、羊抗鼠 IgG-HRP 二抗、增强型化学发光 (enhanced chemiluminescent, ECL) 底物试剂盒 (江苏碧云天生物技术有限公司); 总 RNA 提取 Trizol Reagent 试剂、聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 反应试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (Roter Gene 3000 型)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型的建立 按体质量将大鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。矽肺模型组、溶剂组、姜黄素组大鼠气管内均一次性注入 50 g/L 的矽尘混悬液 1 ml 建立染矽尘大鼠模型^[4]; 生理氯化钠溶液组大鼠注入等体积质量分数为 0.9% 氯化钠溶液; 正常对照组不做气管注入处理。姜黄素组于染尘第 2 天开始, 按 300 mg/kg 灌胃给予姜黄素每日 1 次 (姜黄素按 20 mg/ml 溶解于质量分数为 0.5% 羧甲基纤维素钠中), 共 28 d; 溶剂组于染尘第 2 天给予 15 ml/kg 的质量分数为 0.5% 羧甲基纤维素钠溶剂灌胃每日 1 次, 共 28 天。造模第 29 天处死全部动物, 取大鼠右上肺叶甲醛固定做石蜡切片, 其余肺组织于 -70℃ 保存备用。

1.2.2 免疫印迹 (Western blot) 法检测肺组织 PDGF-BB 蛋白、p-ERK1/2 蛋白表达 常规提取肺组织蛋白, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法进行总蛋白定量, 取总蛋白 60 μg 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将 PDGF-BB 多克隆抗体 1:500 稀释、p-ERK1/2 多克隆抗体 1:1 000 稀释, 4℃ 过夜, 采用辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1 000 稀释), 室温孵育 120 min, ECL 液显影, X 感光胶片感光。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 [(Glyceraldehyde-3 phosphate, GAPDH) 作内参蛋白] 检测 PDGF-BB、p-ERK1/2 蛋白的表达, 用 Image4.0 软件扫描蛋白条带, 用每个被检测蛋白条带的灰度值与同样本 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值作为 Western blot 结果的定量值进行统计分析。

1.2.3 Real-time PCR 法检测肺组织 ERK1/2 mRNA 表达 取 -70℃ 中冷冻保存的肺组织采用 Trizol Reagent 试剂提取组织总 RNA, 测定 RNA 的浓度; 以 RNA 为模板, 应用逆转录 PCR 试剂盒进行逆转录合成 cDNA 之后进行 Real-time PCR 反应, GAPDH 作内参照。根据 PDGF、ERK1/2 及 GAPDH 基因序列设计引物为: PDGF 上游 5'-CACTCCATCCGCTCCTTTGA-3', PDGF 下游 3'-CTTTCCGACTCGACTCCAGAA-5', 扩增产物为 101 bp; ERK1 上游 5'-GCTTATCAACACCACCTGCG-3', ERK1 下游 3'-GCCACATACTCGGTCAGAAAG-5', 扩增产物为 102 bp; ERK2 上游 5'-CCTGCTGAACACCACTTGTGA-3',

收稿日期: 2013-05-15; 修回日期: 2013-07-06

基金项目: 河北省科技厅科技支撑项目 (10276116D), 河北省教育厅课题 (Z2009136)

作者简介: 郝小惠 (1971—), 女, 硕士生导师, 副教授, 主要从事肺纤维化疾病方向研究。

ERK-2 下游 3'-TGCAGCCACAGACCAAAT-5', 扩增产物为 185 bp; GAPDH 上游 5'-GCAAGTTCAACGGCAGTCA-3', GAPDH 下游 3'-CGCCAGTAGACTCCACGACATA-5', 扩增产物为 141 bp。Real-time PCR 扩增反应条件: 95 ℃、15 s, 59 ℃、20 s, 进行 40 个循环。目的基因 PCR 产物相对量应用 $\Delta\Delta Ct$ 进行分析比较, 分别以正常对照组的 PDGF、ERK1、ERK2 为基准 1, 比较各组之间的差异。

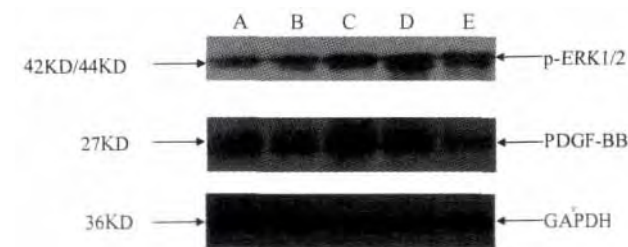
1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 法检测大鼠肺组织 PDGF、p-ERK1/2 蛋白的表达

Western blot 检测各组大鼠肺组织 PDGF-BB 和 p-ERK1/2 蛋白表达的结果见图 1、表 1, 内参照物为 GAPDH, 各组样本的 GAPDH 蛋白表达均一。PDGF-BB 的 Western blot 检测结果显示, 正常对照组和生理氯化钠溶液组的 PDGF-BB 蛋白表达量基本一致, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 矽肺模型组、溶剂对照组的 PDGF-BB 蛋白表达量与前两组相比明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 姜黄素组的 PDGF-BB 蛋白与矽肺模型组和溶剂对照组相比表达量降低 ($P < 0.05$)。p-ERK1/2 蛋白的表达结果同样显示, 正常对照组和生理氯化钠溶液组的该蛋白表达量基本一致, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 矽肺模型组、溶剂对照组的 p-ERK1/2 蛋白表达量较前两组明显增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 姜黄素组的 p-ERK1/2 蛋白与矽肺模型组和溶剂对照组相比表达量明显降低 ($P < 0.01$)。上述结果提示矽肺纤维化发生时, PDGF-BB 和 p-ERK1/2 蛋白表达上调, 而姜黄素可下调矽肺纤维化时表达增高的 PDGF-BB 和 p-ERK1/2 蛋白。



A: 正常对照组; B: 生理氯化钠溶液组; C: 矽肺模型组;

D: 溶剂对照组; E: 姜黄素组

图 1 大鼠肺组织 PDGF-BB 和 p-ERK1/2 蛋白的表达

表 1 各组大鼠肺组织 PDGF-BB、p-ERK1/2 表达的 Western blot 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PDGF-BB	p-ERK1/2
正常对照组	8	0.675 ± 0.080	0.836 ± 0.113
生理氯化钠溶液组	8	0.704 ± 0.073	0.943 ± 0.134
矽肺模型组	8	1.242 ± 0.173 **	1.247 ± 0.125 **
溶剂对照组	8	1.370 ± 0.193 **	1.348 ± 0.185 **
姜黄素组	8	0.748 ± 0.113 Δ	1.079 ± 0.138 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与矽肺模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2 Real-time PCR 法检测大鼠肺组织 PDGF、ERK1、ERK2 mRNA 的表达

由表 2 可见, 正常对照组和生理氯化钠溶液组的 PDGF mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 二者与矽肺模型组和溶剂对照组比较, 后两者的表达量增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但姜黄素组的表达量与矽肺模型组和溶剂对照组相比表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 表明矽肺纤维化时姜黄素可使表达增高的 PDGF mRNA 水平下调。ERK1 的 mRNA 结果可见矽肺模型组和溶剂对照组的表达量均高于正常对照组和生理氯化钠溶液组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 姜黄素组 ERK1 的 mRNA 表达与矽肺模型组和溶剂对照组相比明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 与正常对照组水平相当。ERK2 的 mRNA 表达趋势与 ERK1 的相似, 即矽肺模型组和溶剂对照组明显高于正常对照组和生理氯化钠溶液组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 姜黄素组 ERK2 的 mRNA 表达明显降低, 但未降低至正常对照组水平, 上述差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。上述结果提示姜黄素可以降低矽肺模型大鼠肺组织升高的 PDGF、ERK1、ERK2 mRNA 的表达水平。

表 2 各组大鼠肺组织 PDGF、ERK1/2 mRNA 表达的 Real-time PCR 结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PDGF ($\Delta\Delta Ct$ 值)	ERK1 ($\Delta\Delta Ct$ 值)	ERK2 ($\Delta\Delta Ct$ 值)
正常对照组	8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
生理氯化钠溶液组	8	1.13 ± 0.17	1.01 ± 0.02	1.04 ± 0.05
矽肺模型组	8	2.33 ± 0.35 **	1.34 ± 0.18 **	2.16 ± 0.32 **
溶剂对照组	8	2.58 ± 0.34 **	1.23 ± 0.14 **	1.88 ± 0.37 **
姜黄素组	8	1.56 ± 0.27 $\Delta\Delta$	0.96 ± 0.13 $\Delta\Delta$	1.43 ± 0.26 $\Delta\Delta$

注: 与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与矽肺模型组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3 讨论

在矽肺纤维化的发病机制中, 间质细胞的增生与一些致纤维化的细胞因子过度表达密切相关。这些因子中 PDGF 是较强的促成纤维细胞增殖因子。活化的成纤维细胞又能分泌 PDGF 进一步激活静息成纤维细胞, 产生放大效应^[5]。而 PDGF 的活化信号是通过 Ras/raf/ERK 级联通路进行转导的, Ras/raf/ERK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 众多途径中不可缺少的组成成分, 其中的 ERK1/2 是该信号转导系统的重要通路之一。ERK1/2 由非磷酸化活化成磷酸化型并向细胞核转位, 是该通路激活的重要环节^[6]。姜黄素的早期应用可降低博来霉素诱导的小鼠肺纤维组织胶原的含量以及 TGF- β 等细胞因子的表达, 有降低炎症反应和抑制纤维化进程的作用^[7]。其拮抗矽肺纤维化的作用机制, 尤其是对细胞因子介导的细胞信号转导系统调控的机制, 尚不完全清楚。因此, 研究与探讨姜黄素拮抗矽肺纤维化的作用及其机制对于矽肺病的防治, 具有重要的意义。

本实验采用矽尘气管内灌注制作矽肺模型, 同时应用较大剂量姜黄素 300 mg/(kg·d) 治疗 28 d 后, 应用 Western blot 和 Real-time PCR 的方法分别观察了各组大鼠肺组织中

PDGF 和 p-ERK1/2 的蛋白和 mRNA 表达, 目的是研究姜黄素对矽肺纤维化发生时致纤维化的细胞因子 PDGF 以及 ERK 信号通路有否影响, 结果显示大鼠矽肺模型中 PDGF 以及磷酸化 ERK1/2 的蛋白和 mRNA 的表达水平均增高, 而灌胃给予姜黄素的动物上述指标均有所下调, 无论是在蛋白水平还是在 mRNA 水平。本实验结果提示姜黄素可以抑制矽肺纤维化大鼠肺组织中重要的致纤维化因子的表达, 以及抑制 MAPK 信号通路中 ERK1/2 的活性形式的表达而起到抑制矽肺纤维化程度的作用, 尤其是在矽肺发生的较早阶段应用时。这有可能为矽肺的预防甚至早期治疗提供有益的帮助。

参考文献:

- [1] Karakiulakis G, Papakonstantino U E, Aletras A J, *et al.* Cell type-specific effect of hypoxia and platelet-derived growth factor-BB on extracellular matrix turnover and its consequences for lung remodeling [J]. *J Bio Chem*, 2007, 282 (2): 908-915.
- [2] Zheng S, Chen A. Curcumin suppresses the expression of extracellular matrix genes in activated hepatic stellate cells by inhibiting gene ex-

pression of connective tissue growth factor [J]. *Am J Physio Gastro-intest Liver Physio*, 2006, 290 (5): 883-893.

- [3] 吴春惠, 张斌. 姜黄素抗肝纤维化机制研究进展 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33 (1): 135-137.
- [4] 张丽, 郝小惠, 王宏丽, 等. 水通道蛋白 1 在矽肺大鼠肺组织中的表达及意义初探 [J]. *中国工业医学杂志*, 2012, 25 (2): 91-93, 161.
- [5] Li X, Eriksson U. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14 (2): 91-98.
- [6] Sarjeant J M, Lawrie A, Kinnear C, *et al.* Apolipoprotein D inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation by preventing translocation of phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2 to the nucleus [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, 2003, 23 (12): 2172-2177.
- [7] Zhang D, Huang C, Yang C, *et al.* Antifibrotic effects of curcumin are associated with overexpression of cathepsins K and L in bleomycin treated mice and human fibroblasts [J]. *Respir Res*, 2011, 12 (9): 154-165.

抑制性寡脱氧核苷酸对染矽尘小鼠肺炎症的影响

Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on silica-induced pulmonary inflammation in mice

宋富军¹, 雷鹏², 王世鑫³

(1. 天津市滨海新区大港卫生防病站, 天津 300270; 2. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016; 3. 天津市东丽医院, 天津 300300)

摘要: 将 Balb/c 小鼠 60 只随机分为 4 组, 分别为正常组、矽尘组、抑制性寡脱氧核苷酸 (Sup ODN) 组、对照寡脱氧核苷酸 (Con ODN) 组。7 d 后处死动物, 检测血清 IFN- γ 、TNF- α 水平; 瑞氏染色作白细胞分类计数; HE 染色观察肺组织的病理改变。结果 Sup ODN 组与矽尘组、Con ODN 组相比, IFN- γ 水平明显降低 ($P < 0.01$), Sup ODN 可明显减轻肺组织炎症反应, 炎性细胞浸润减少。提示 Sup ODN 对染矽尘小鼠肺部炎症有明显的保护作用。

关键词: 抑制性寡脱氧核苷酸; 矽尘; 矽肺炎症

中图分类号: R994 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2014)03-0198-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.03.017

抑制性寡脱氧核苷酸 (suppressive oligodeoxynucleotides, Sup ODN) 是一类富含多聚 G 结构的具有广泛免疫抑制活性的核苷酸序列。研究表明, Sup ODN 具有下调 Th1 型细胞因子和抑制炎症介质产生的作用^[1]。矽肺肺炎是由吸入大量游离二氧化硅引起的肺部早期病变。在此过程中, 巨噬细胞、中性粒细胞等分泌大量炎症介质, 同时伴有初始 T 淋巴细胞转化为 Th1 型细胞, 并分泌大量 Th1 型细胞因子^[2,3]。为探讨

Sup ODN 对矽肺炎症的抑制效应, 特观察 Sup ODN 对染矽尘小鼠肺内炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

60 只雌性 Balb/c 小鼠 (SPF 级), 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 (许可证号: SCXK 京 2009-0004, 质量合格证明书编号: 0278174)。结晶型 SiO₂ 标准品购自 Sigma 公司 (99% 直径 1~10 μ m, 80% 直径 <5 μ m, 经 200℃ 灭活内毒素); Sup ODN 序列 TTAGGG TTAGGG TTAGGG; 对照 ODN (Con ODN) 序列为 TTCAAA TTCAAA TTCAAA TTCAAA, 以上 2 个 ODN 序列均由上海生工生物工程有限公司合成并纯化。INF- γ 、TNF- α ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 矽肺动物模型的建立 雌性 Balb/c 小鼠 60 只, 随机分为正常组、矽尘组、Sup ODN 组、Con ODN 组。实验动物腹腔注射戊巴比妥钠 (60 mg/kg), 消毒小鼠颈部皮肤并沿中线剪开约 1 cm 长切口, 暴露气管。除正常组经气管一次性注入等量生理盐水外, 其余各组经气管软骨间隙一次性注入 0.1 ml SiO₂ 悬液 (5 g/L) 到气管内, 肌肉及其它组织复位, 缝合皮肤。Sup ODN 和 Con ODN 组在造模前 3 h 分别腹腔注射 Sup ODN、Con ODN 各 0.3 ml (1 mg/ml)。

1.2.2 标本的处理 造模 7 d 后, 各组小鼠摘眼球放血, 4℃, 3000 r/min, 离心 10 min 取血清备用; 同时取一滴血液

收稿日期: 2013-09-23; 修回日期: 2014-03-12

作者简介: 宋富军 (1972—) 男, 副主任医师, 从事职业卫生工作。

通讯作者: 王世鑫, E-mail: wshx-001@163.com。