

维生素 D3 对博来霉素诱发小鼠肺纤维化的影响

王 熹¹, 赵 卉¹, 徐德祥², 陈远华²

摘要 目的 探讨维生素 D3 (VitD3) 对博来霉素 (BLM) 诱发小鼠肺纤维化的保护作用及其机制。方法 96 只成年 C57BL/6J 雄性小鼠 (8 周, 24 ~ 26 g) 随机分为如下 8 组: 生理盐水对照组 (对照组), 单纯维生素 D3 组 (VitD3 组), 博来霉素组 (BLM 1 d、7 d 和 21 d 组), 维生素 D3 + 博来霉素组 (VitD3 + BLM 1 d、7 d 和 21 d 组)。BLM 组经气管单次给予 BLM, 剂量为 3 mg/kg, VitD3 + BLM 组: 在 BLM (3 mg/kg) 处理前 30 min 及处理后每 24 h 经腹腔给予一次 1, 25 (OH)₂D₃, 剂量为 1 μg/kg, 对照组和 VitD3 组给予等量的生理盐水或 1, 25 (OH)₂D₃, 小鼠分别于 BLM 或生理盐水处理后 1 d、7 d 和 21 d 剖杀并取肺组织。用 HE 染色法检测肺病理改变, 用免疫组化检测肺 3-硝基酪氨酸水平, RT-PCR 检测肺氧化及抗氧化酶 mRNA 水平。结果 HE 染色提示 BLM 处理引起肺组织破坏及间质纤维化, 1, 25 (OH)₂D₃ 显著减轻 BLM 诱导的肺组织破坏及间质纤维化。RT-PCR 提示 BLM 引起肺组织氧化酶基因表达上调 ($P < 0.05$), 抗氧化酶基因表达下调 ($P < 0.05$)。1, 25 (OH)₂D₃ 处理显著抑制 BLM 引起的肺组织氧化酶基因表达上调及抗氧化酶基因下调 ($P < 0.05$)。免疫组化结果提示 1, 25 (OH)₂D₃ 明显减少 BLM 所致肺 3-硝基酪氨酸残留。结论 维生素 D3 可能通过抗肺氧化应激作用减轻 BLM 诱发的肺组织破坏及间质纤维化。

关键词 博来霉素; 维生素 D3; 肺纤维化; 氧化应激

中图分类号 R 332; R 563.13

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0918-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.019

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一类慢性间质性肺疾病, 以肺泡上皮细胞损伤、成纤维细胞增生和细胞外基质聚集增多为病理特征^[1]。IPF 是最常见的肺部疾病之一, 其发病机

制复杂, 早期诊断较为困难, 预后极差。博来霉素 (bleomycin, BLM) 是一种广泛应用的抗肿瘤药物, 常在实验中用于诱导小鼠肺纤维化, BLM 诱导的肺纤维化与人类的特发性肺纤维化相类似, 是最常用的研究特发性肺纤维化的模型^[2]。由于尚无有效方法治疗特发性肺纤维化, 急需尝试新的预防和治疗性干预措施以预防特发性肺纤维化。越来越多研究^[3-4]证明, 活性氧可能在 BLM 诱导的肺纤维化中起关键作用, 活性氮也参与其中, 同时, 大量研究^[5]表明, 抗氧化治疗具有一定的抗肺纤维化作用。维生素 D (Vitamin D, VitD) 是脂溶性开环类固醇激素。人体维生素 D 主要通过光照由皮肤合成, 少量由食物摄入^[6]。传统观点认为, 维生素 D 在钙吸收和骨骼代谢中发挥关键作用^[7]。最近研究^[8]表明, 维生素 D 也具有抗氧化剂作用。维生素 D 本身缺乏生物活性。维生素 D 在肝脏细胞色素 P450 (CYP) 2R1 作用下首先转化为 25-(OH)-D₃, 25-(OH)-D₃ 在肾脏 CYP27B1 作用下进一步转化成活性型 1, 25-(OH)₂-D₃ (即骨化三醇)^[9]。该研究旨在探讨维生素 D3 对 BLM 诱发小鼠肺纤维化的影响。

1 材料与方法

1.1 化学试剂 博来霉素和维生素 D3 购自美国 Sigma Chemical 公司; 3-硝基酪氨酸抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnologies 公司; TRIzol 总 RNA 提取试剂购自美国分子研究中心; DNA 酶和实时 PCR 扩增试剂盒购自美国 Promega 公司; 化学发光 (ECL) 检测设备购自皮尔斯生物技术公司; 引物由美国 Life Technologies 公司合成。

1.2 实验动物 成年的 C57BL/6J 雄性小鼠 (8 周大小, 24 ~ 26 g) 购自北京维通利华公司, 实验前动物适应性喂养 1 周, 自由饮食, 昼夜节律, 环境温度 20 ~ 25 °C, 湿度 (50 ± 5) %。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、处理 96 只成年 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为如下 8 组: 生理盐水对照组 (对照组), 单纯维生素 D3 组 (VitD3 组), 博来霉素组 (BLM 1 d 组、BLM 7 d 组和 BLM 21 d 组), 维生素

2018-02-31 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1508085MH192)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院呼吸内科, 合肥 230601

² 安徽医科大学卫生毒理学系, 合肥 230032

作者简介: 王 熹, 男, 硕士研究生;

赵 卉, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhao-huichenxi@126.com;

徐德祥, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xudex@mail.hf.ah.cn

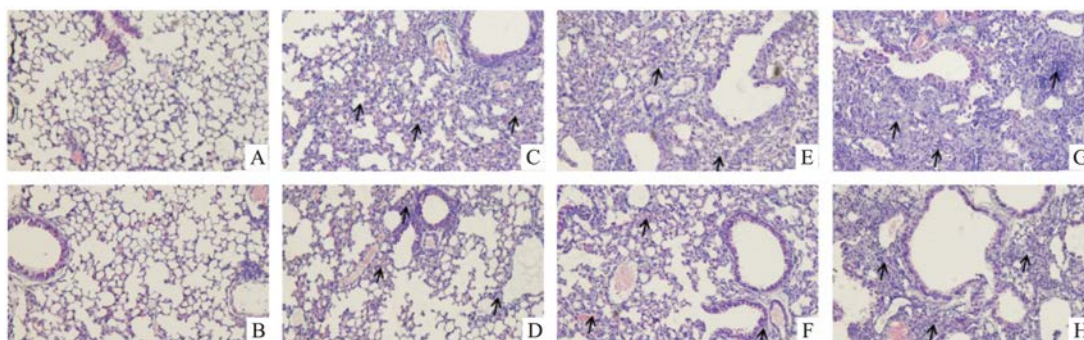


图1 肺脏的 HE 染色 ×100

A: 对照组; B: VitD3 组; C: BLM 1 d 组; D: VitD3 + BLM 1 d 组; E: BLM 7 d 组; F: VitD3 + BLM 7 d 组; G: BLM 21 d 组; H: VitD3 + BLM 21 d 组

D3 + 博来霉素组(VitD3 + BLM 1 d 组、VitD3 + BLM 7d 组和 VitD3 + BLM 21 d 组)。BLM 组和 VitD3 + BLM 组小鼠经气管内注射给予单次博来霉素(3.0 mg/kg) 对照组和 VitD3 小鼠经气管内注射给予等量生理盐水。VitD3 + BLM 组小鼠在 BLM 处理前 30 min 以及处理后每天经腹腔给予 1 次 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (活性维生素 D3) 对照组、BLM 组和 VitD3 组给予等量的生理盐水或 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 剂量参照文献^[10]。对照组、VitD3 组于气管内生理盐水注射后 21 d 剖杀,余组分别于 BLM 处理后 1 d、7 d、21 d 剖杀,取左肺组织做石蜡切片和 HE 染色,取右肺放置在 -80°C 冰箱内用于 RT-PCR。

1.3.2 肺组织病理学 将留取的肺组织标本固定在 4% 福尔马林中并按照标准的程序嵌入石蜡中包埋,用石蜡包埋的肺组织行连续切片,至少将 5 张连续的切片行 HE 染色。

1.3.3 实时定量逆转录-聚合酶链反应 运用 TRIzol 总 RNA 提取试剂提取肺脏组织总 RNA,在 280 nm 及 260 nm 波长下运用分光光度计测样品的吸光度值,进行 RNA 完整性验证及其浓度计算。稀释总 RNA 样品定量成 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$,进行 DNA 的消化、逆转录成 cDNA。将 cDNA $1 \mu\text{l}$, MIX $10 \mu\text{g}$,模板链和随从链引物各 $1 \mu\text{l}$,无酶水 $7 \mu\text{l}$,置入 RT-PCR 扩增仪,通过变性、退火、延伸 3 个步骤进行扩增,运用专用软件计算目标基因的相对值。各基因引物序列见表 1。

1.3.4 肺组织免疫组化检测 随机从每组肺脏组织切片中选取 5 张,烤箱烤片后二甲苯脱蜡,依次梯度浓度乙醇水化,然后滴加 TritonX-100 通透细胞,再滴加 10% 过氧化氢进行封闭,后枸橼酸钠缓冲液中微波修复抗原 3 次,每次 5 min,间隔 10 min。冷却至室温后滴入 5% 的羊血清湿盒内静置 20

min,然后在组织表面滴注 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine 3-NT)一抗孵育,放置 4°C 冰箱孵育过夜。然后相应进行二抗孵育,SP 反应,最后用 DAB 显色,在光镜下进行观察显色,显色充分后进行复染、脱水、透明、封片。每张片子随机取 5 个高倍镜视野在光学显微镜下观察,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件半定量分析各个视野下棕黄色区域占整个该视野面积的比例。

表1 各基因引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	长度
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCCATTT R: CCATCCAATCGGTACTAGCG	151
p47phox	F: CCAGGGCACTCTCACTGAATA R: ATCAGGCCGCACTTTGAAGAA	100
p67phox	F: GCTGCGTGAACACTATCCTGG R: AGGTGCTACTTCTCCATTCTGTA	136
sod-1	F: GCGATGAAAGCGGTGTGCGTG R: TGGACGTGGAACCCATGCTGG	143
sod-2	F: AGCGAACGGCCGTGTTCTGAG R: AGCGCGCCATAGTCGTAAGGC	162
gshpx	F: GGTGCTGCTCGGTTTCCCGT R: AATTGGGCTCGAACCCGCCAC	113
gshrd	F: GGGATGCCTATGTGAGCCGCC R: TGACTTCCACCGTGGGCCGA	107

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,统计学分析选用两样本 t 检验分析,所有定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 维生素 D3 对博来霉素所致小鼠肺纤维化的影响 肺组织 HE 染色结果提示,与对照组对比, BLM 组小鼠给药 7 d、21 d 后肺泡正常结构破坏严重,7 d 开始出现肺泡间隔增厚,21 d 肺间隔明显增宽、成纤维细胞增生、胶原沉积。VitD3 显著减轻 BLM 引起的肺泡正常结构破坏、肺间隔增宽和肺纤维化。见图 1。

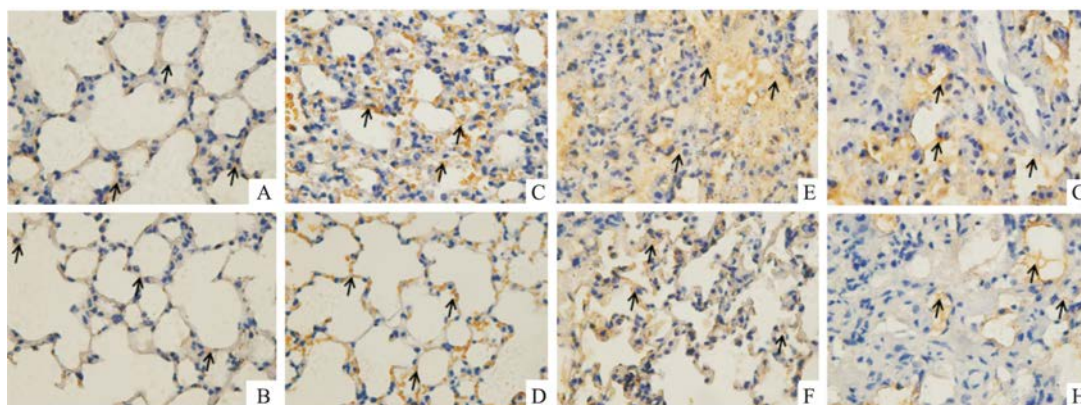
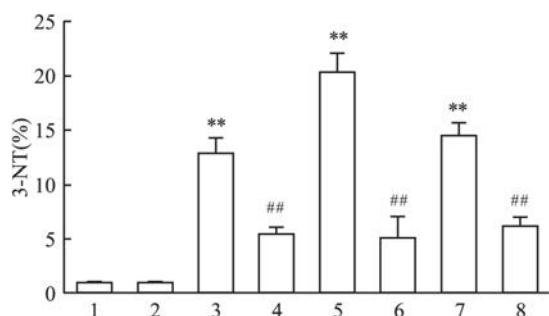


图2 肺脏的3-NT免疫组化染色 SP×400

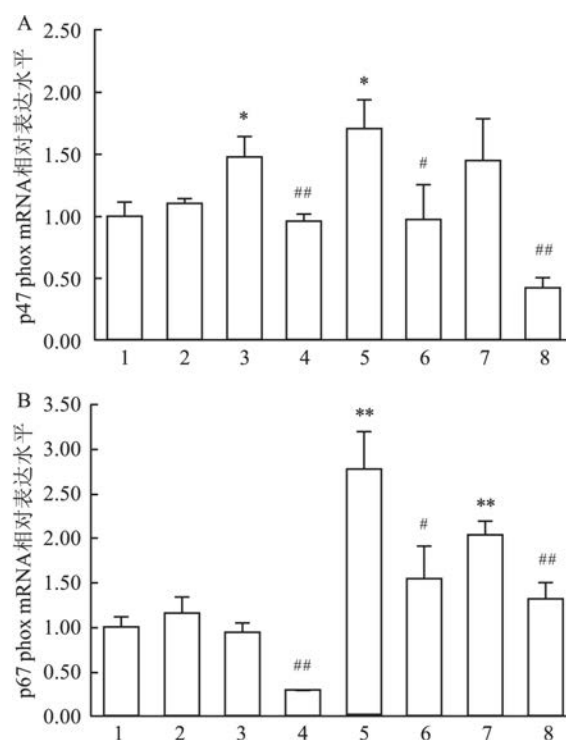
A: 对照组; B: VitD3 组; C: BLM 1 d 组; D: VitD3 + BLM 1 d 组; E: BLM 7 d 组; F: VitD3 + BLM 7 d 组; G: BLM 21 d 组; H: VitD3 + BLM 21 d 组

2.2 维生素 D3 对博莱霉素所致肺蛋白质硝化的影响 BLM 组小鼠肺组织中棕黄色显色区域定量较对照组明显增多 ($P < 0.01$), 蛋白质硝化随时间延长而增加, 其中 7 d 达到峰值, 21 d 时有所下降, 而 VitD3 + BLM 组小鼠肺组织中棕黄色区域定量与 BLM 组对比明显减少 ($P < 0.01$), 说明维生素 D3 抑制了 BLM 所致的蛋白硝化反应。见图 2、3。

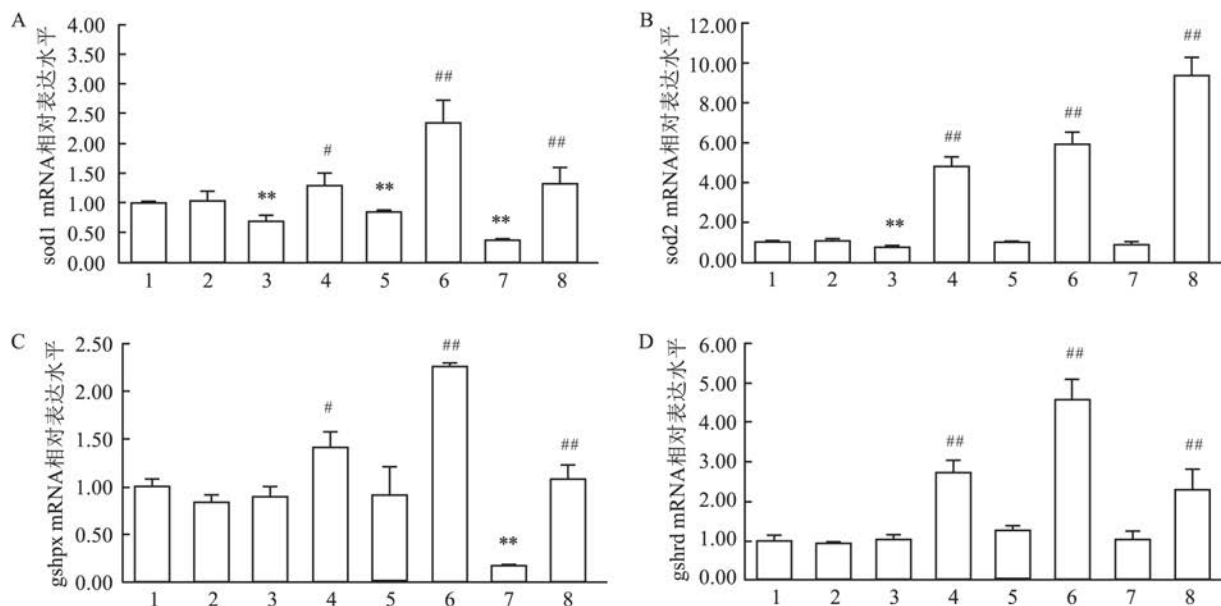
图3 3-NT免疫组织化学染色相对表达量($\bar{x} \pm s$ $n=6$)1: 对照组; 2: VitD3 组; 3: BLM 1 d 组; 4: VitD3 + BLM 1 d 组; 5: BLM 7 d 组; 6: VitD3 + BLM 7 d 组; 7: BLM 21 d 组; 8: VitD3 + BLM 21 d 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 BLM 组比较: ## $P < 0.01$

2.3 维生素 D3 对博莱霉素上调小鼠肺 NADPH 氧化酶基因的影响 与对照组对比, BLM 组小鼠肺 NADPH 氧化酶基因 p47phox 在给药后 1、7 d 上调 ($P < 0.05$), p67phox 在给药后 7、21 d 明显上调 ($P < 0.01$)。VitD3 显著减轻 BLM 引起的小鼠肺 p47phox 和 p67phox 基因的上调。单纯维生素 D3 组与对照组比较氧化酶基因表达无明显变化。见图 4。

2.4 维生素 D3 对博莱霉素下调小鼠肺抗氧化酶基因的影响 与对照组比较, BLM 组小鼠肺抗氧化酶基因超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, sod) 1

图4 各组小鼠肺脏 NADPH 氧化酶 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$ $n=6$)A: p47phox; B: p67phox; 1: 对照组; 2: VitD3 组; 3: BLM 1 d 组; 4: VitD3 + BLM 1 d 组; 5: BLM 7 d 组; 6: VitD3 + BLM 7 d 组; 7: BLM 21 d 组; 8: VitD3 + BLM 21 d 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 BLM 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

在给药后 1、7 和 21 d 明显下调 ($P < 0.01$), sod2 在 1d 明显下调 ($P < 0.01$), 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, gshpx) 在 21 d 明显下调 ($P < 0.01$), VitD3 显著对抗 BLM 引起的小鼠肺 sod1、sod2、gshpx 基因表达下调。BLM 对谷胱甘肽还原酶基因(glutathione reductase, gshrd) 表达影响很小, 然而 VitD3 + BLM 组 gshrd 基因表达明显升高 ($P <$

图5 各组小鼠肺脏抗氧化酶 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A: sod1; B: sod2; C: gshpx; D: gshrd; 1: 对照组; 2: VitD3 组; 3: BLM 1 d 组; 4: VitD3 + BLM 1 d 组; 5: BLM 7 d 组; 6: VitD3 + BLM 7 d 组; 7: BLM 21 d 组; 8: VitD3 + BLM 21 d 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 BLM 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

0.01)。单纯维生素 D3 组与对照组比较抗氧化酶基因表达无明显变化。见图 5。

3 讨论

肺纤维化是一种慢性肺部疾病,其病理机制仍不明确,目前暂无有效的治疗药物。目前研究肺纤维化多数运用 BLM 诱导的肺纤维化模型,本研究成功复制 BLM 肺纤维化模型,并给予 VitD3 进行干预。结果显示,维生素 D3 明显减轻了 BLM 处理后 7 d、21 d 肺泡正常结构破坏、肺间隔增厚、纤维细胞增生以及胶原沉积。上述结果提示:维生素 D3 明显减轻了 BLM 引起的肺纤维化,这与早前研究报道维生素 D3 能改善 BLM 诱发小鼠肺纤维化相一致^[11]。

随着氧化应激研究的深入,目前有研究^[3]表明氧化应激在肺纤维化过程中起重要作用。另有研究^[12]提示 VitD3 可以减轻 LPS 诱发的急性肾损伤中的氧化应激,其主要机制是调节氧化酶和抗氧化酶基因的表达。因此设想 VitD3 保护 BLM 诱发肺纤维化的机制与抗氧化应激相关。本研究结果显示 BLM 所致肺纤维化模型中小鼠肺 NADPH 氧化酶 p47phox 和 p67phox 基因分别在给药后 1 d、7 d 和 7 d、21 d 明显上调,同时抗氧化酶 sod1 在给药后 1 d、7 d 和 21 d 明显下调,sod2 基因在 1 d 明显下调,gshpx 基因在 21 d 明显下调,上述结果表明 BLM 所致肺纤维化中存在氧化酶基因上调和抗氧化酶基因

下调,各种酶基因表达调节时间及时限不同,抗氧化酶以 sod 为主。VitD3 处理显著减弱了 BLM 所致的肺 NADPH 氧化酶基因表达的上调和抗氧化酶基因表达的下调。此外,本研究免疫组化结果显示 BLM 所致肺纤维化模型中蛋白质硝化标志 3-NT 残留定量明显增多,而 VitD3 明显减少了 BLM 所致 3-NT 残留。综上所述:维生素 D3 抑制 BLM 所致肺纤维化过程中氧化应激,其可能的机制是下调氧化酶基因及上调抗氧化酶基因的表达。

目前,很多研究^[13-14]显示 BLM 诱发肺纤维化的机制可能与炎症、氧化应激、内质网应激等领域相关。而前期研究^[10,15]表明维生素 D3 抑制 BLM 诱导的肺部炎症以及内皮细胞中的内质网应激。本研究仅阐述维生素 D3 对 BLM 所致肺纤维化具有保护作用以及可能的机制是减轻其过程中的氧化应激,但维生素 D3 是直接影响氧化应激,还是通过改善炎症、内质网应激等间接影响氧化应激,抑或是作用三个机制共同起到保护作用,本研究暂未阐明,有待进一步的研究。总之,本研究结果表明维生素 D3 对肺纤维化起保护作用及部分机制,并对临床治疗提出新的方向。

参考文献

- [1] Sergew A. Advances in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2015, 20(4): 537-52.
- [2] Moore B B. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. Am J Physi-

- ol Lung Cell Mol Physiol ,2008 ,294(2) : L152 – 60.
- [3] Cheres P , Kim S J , Tulasiram S. Oxidative stress and pulmonary fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta* ,2013 ,1832(7) : 1028 – 40.
- [4] Hsu Y C , Wang L F. Nitric oxide in the pathogenesis of diffuse pulmonary fibrosis [J]. *Free Radic Biol Med* ,2007 ,42(5) : 599 – 607.
- [5] Day B J. Antioxidants as potential therapeutics for lung fibrosis [J]. *Antioxid Redox Signal* ,2008 ,10(2) : 355 – 70.
- [6] Łaczmański Ł , Jakubik M , Bednarek-Tupikowska G , et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in Alzheimer's disease patients [J]. *Exp Gerontol* ,2015 ,69: 142 – 7.
- [7] Holick M F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets [J]. *J Clin Invest* ,2006 ,116(8) : 2062 – 72.
- [8] Zhong W , Gu B , Gu Y , et al. Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* ,2014 ,140: 56 – 62.
- [9] Bikle D D. Vitamin D metabolism , mechanism of action , and clinical applications [J]. *Chem Biol* ,2014 ,21(3) : 319 – 29.
- [10] Tan Z X , Chen Y H , Xu S , et al. Calcitriol inhibits bleomycin-induced early pulmonary inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in mice [J]. *Toxicol Lett* ,2016 ,240(1) : 161 – 71.
- [11] Zhang Z , Yu X , Fang X , et al. Preventive effects of vitamin D treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Sci Rep* ,2015 ,5: 17638.
- [12] Xu S , Chen Y H , Tan Z X , et al. Vitamin D3 pretreatment alleviates renal oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* ,2015 ,152: 133 – 41.
- [13] Todd N W , Luzina I G. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair* ,2012 ,5(1) : 11.
- [14] Hotamisligil G S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease [J]. *Cell* ,2010 ,140(6) : 900 – 17.
- [15] Haas M J , Jafri M , Wehmeier K R , et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress by vitamin D in endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med* ,2016 ,99: 1 – 10.

Effects of vitamin D3 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Wang Xi¹ , Zhao Hui¹ , Xu Dexiang² , et al

(¹Dept of Respiratory ,The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230601;

²Dept of Toxicology , Anhui Medical University , Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of vitamin D3 on bleomycin (BLM) -induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** 96 adult male C57BL/6J mice (8 weeks ,24 ~ 26 g) were randomly divided into eight groups: Control group , vitamin D3 (VitD3) group , BLM 1 d , 7 d and 21 d groups , and VitD3 + BLM 1 d , 7 d and 21 d groups. In bleomycin group , mice were intratracheally injected with bleomycin (3 mg/kg) . In VitD3 + BLM group , mice were intraperitoneally injected with 1,25(OH)₂D₃ (1 μg/kg) daily , beginning at 30 min before BLM injection. VitD3 mice were injected with 1,25(OH)₂D₃ (1 μg/kg) daily. Control mice were injected with saline daily. Mice were euthanized at 1 d , 7 d , and 21 d after BLM , respectively. Some lungs were collected for real-time RT-PCR. Some lungs were excised for histopathologic examination and immunohistochemistry. **Results** As expected , BLM-induced damage of alveolar structure and pulmonary fibrosis in mice. Interestingly , 1,25(OH)₂D₃ attenuated BLM-induced damage of alveolar structure and pulmonary fibrosis in mice. Further study found that BLM up-regulated oxidant enzyme gene expression and down-regulated antioxidant enzyme gene expression. 1,25(OH)₂D₃ inhibited BLM-induced up-regulation of oxidant enzyme gene and down-regulation of antioxidant enzyme gene. Moreover , strong 3-nitrotyrosine immunoreactivity was observed in the lungs 1 d , 7 d and 21 d after BLM injection , and 1,25(OH)₂D₃ significantly attenuated BLM-induced protein nitration in the lungs. **Conclusion** Vitamin D3 may reduce BLM-induced pulmonary tissue destruction and interstitial fibrosis through anti-pulmonary oxidative stress.

Key words bleomycin; vitamin D3; pulmonary fibrosis; oxidative stress