

阻断白介素-17对博来霉素诱导小鼠肺纤维化及肺组织 Bax/Bcl-2 表达的影响

宋桂芹,徐志伟,王文栋,郝敏,黄勇,李向上,张效云*

河北北方学院医学检验学院生化教研室,河北 张家口 075000

[摘要] 目的:研究阻断白介素(interleukin, IL)-17对博来霉素诱导小鼠肺纤维化和肺组织 Bax/Bcl-2 表达的影响。方法:80只 C57BL/6 小鼠随机分为模型组、抗 IL-17 处理组、同型 IgG 处理组和 PBS 处理组。小鼠气管内一次性注入博来霉素诱导肺纤维化形成, PBS 处理组给予等量生理盐水。4 组小鼠分别从造模前 1 d 每隔 3 d 通过尾静脉给予抗鼠 IL-17 单克隆中和抗体或同型对照抗体或 PBS。在造模后 28 d, 取各组小鼠肺组织, 利用 Masson 染色及羟脯氨酸含量测定检测各组小鼠肺纤维化程度, 通过流式细胞术测定肺组织细胞凋亡情况, 采用免疫组织化学法检测肺组织 Bax 和 Bcl-2 的表达。结果:阻断 IL-17 后, 小鼠肺纤维化程度明显降低($P < 0.01$), 羟脯氨酸含量显著下降($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$), Bax 表达明显减弱($P < 0.01$), Bcl-2 表达虽无明显变化, 但 Bax/Bcl-2 比值显著下降($P < 0.01$)。结论:阻断内源性 IL-17 后, 能显著降低博来霉素诱导的肺纤维化, 显著降低肺组织细胞凋亡率和 Bax/Bcl-2 比值, 这些数据提示阻断内源性 IL-17 活性改善博来霉素诱导的小鼠纤维化程度, 可能与 Bax/Bcl-2 介导的线粒体细胞凋亡通路有关。

[关键词] 白介素-17;肺纤维化;Bax;Bcl-2

[中图分类号] R563.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)03-317-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180307

Influence of blocking of interleukin-17 on pulmonary fibrosis and expression of Bax/Bcl-2 in mice induced by bleomycin

Song Guiqin, Xu Zhiwei, Wang Wendong, Hao Min, Huang Yong, Li Xiangshang, Zhang Xiaoyun*

Department of Biochemistry, College of Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

[Abstract] **Objective:** To study the influence on pulmonary fibrosis and expression of Bax/Bcl-2 in the lung after blocking interleukin(IL)-17 activity in mice induced by bleomycin(BLM). **Methods:** A total of 80 C57BL/6 mice were randomly divided into the following 4 groups, including the model group treated with neutralizing IL-17 antibody, the model group treated with isotype-matched control antibody, the model group and the PBS group. The three model groups were received a single intratracheal instillation of 5 mg/kg body weight of BLM in 0.05 mL sterile saline, while the PBS group were administrated the equivalent sterile saline. All mice were injected from the caudal vein with neutralizing rat antimouse IL-17 mAb, or control rat IgG, or PBS alone every 3 d starting on d1 before making models. At 28 d after model establishment, lung tissues from all mice were removed and used to measure the extent of pulmonary fibrosis by Masson staining and hydroxyproline contents measurement. The apoptosis rate of pulmonary cells was detected by flow cytometry (FCM). Meanwhile, the expressions of Bax/Bcl-2 in mice were also evaluated by immunohistochemistry (IHC). **Results:** Compared with other groups, the pulmonary fibrosis degree, hydroxyproline contents and apoptosis rate were significantly decreased in mice blocked with anti-IL-17 mAb($P < 0.01$, respectively). Bax protein expression was decreased obviously($P < 0.01$), although the Bcl-2 protein expression had no obvious changes, but the ratio of Bax/Bcl-2 decreased significantly($P < 0.01$). **Conclusion:** Pulmonary fibrosis had been improved significantly after the endogenous IL-17 activity of mice blocked, the apoptosis rate and the ratio of Bax/Bcl-2 were all decreased in lung tissues. These data suggested that IL-17 improving the pulmonary fibrosis induced by BLM may be associated with Bax/Bcl-2 mediated mitochondrial apoptotic pathways.

[Key words] interleukin-17; pulmonary fibrosis; Bax; Bcl-2

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(03):317-321]

[基金项目] 张家口市科技局自然科学基金(12110046D-1);河北省高等学校科学研究重点项目(ZD2017206)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xzonly928@163.com

Th17细胞主要通过分泌白介素(interleukin, IL)-17在自身免疫性疾病、感染等多种疾病中发挥重要作用^[1]。目前国内外文献表明IL-17在肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)形成中扮演着特殊角色^[2-3],能够通过诱导转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 1产生^[4],促进胶原合成和分泌,促使上皮细胞发生上皮间质转化。有关IL-17与细胞凋亡通路的研究国内外均鲜见报道。本研究利用博来霉素(bleomycin, BLM)诱导小鼠PF模型,观察Bax/Bcl-2在肺组织的表达情况,探讨IL-17对PF小鼠肺组织Bax/Bcl-2的影响,为PF寻求有效治疗方法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

主要试剂:小鼠IL-17抗体(克隆号50104.11)、同型对照抗体(克隆号54447.11, R&D systems公司,美国), Masson三色染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司), 羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)测定试剂盒(江苏南京建成生物有限公司), BLM(640110, 化药株式会社, 日本), AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司), 免疫组化Bax抗体(ZS-526, BA0484)、Bcl-2抗体(SC-783, Santa Cruz公司, 美国), 抗兔免疫组化试剂盒SP-9001、DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

SPF级C57BL/6小鼠雄性80只, 体重18~20 g, 购自军事医学科学院实验动物中心。动物标记后, 分笼饲养, 温度控制在18~24℃, 光暗周期为12 h。无菌水及饲料自由食用。

1.2 方法

1.2.1 PF模型建立及处理

小鼠随机分为4组:模型组、抗IL-17处理组、同型IgG处理组和PBS处理组, 每组20只。用3.5%水合氯醛注射液(0.1 mL/10 g体重)腹腔麻醉后, 仰卧于小鼠固定台上, 消毒后钝性剥离气管, 向气管内注入BLM(5 mg/kg) 0.05 mL, 其中PBS处理组小鼠注入等量生理盐水, 动物清醒后常规饲养。抗IL-17处理组、同型IgG处理组从造模前1 d每间隔3 d由尾静脉分别给予抗鼠IL-17单克隆中和抗体(400 μ g/kg)、同型对照抗体(400 μ g/kg)各0.2 mL, 模型组和PBS处理组则给予等体积PBS。造模28 d后处死各组小鼠。

1.2.2 PF病理评价

取右肺下叶经4%多聚甲醛固定24 h后石蜡包

埋, 切片5 μ m, 行Masson染色, 按Szapiel等^[5]的方法光镜下观察并评价肺组织纤维化程度。0级:无纤维化;1级:轻度纤维化, 病变区域少于全肺的20%, 肺泡结构正常;2级:中度肺纤维化, 受累面积占全肺的>20%~50%;3级:弥漫性肺纤维化, 病变范围>50%。采用HMIAS-2000W病理图文分析软件计算纤维化在切片中所占的比例。

1.2.3 肺组织HYP含量测定

按照碱水解法试剂盒说明书测定HYP含量。具体操作如下:将右肺上叶精确称重后加入1 mL水解液沸水浴充分水解20 min, 调水解液pH至6.0~6.8, 定容至10 mL, 经活性炭处理, 离心后取上清进行检测。

1.2.4 细胞凋亡检测

将新鲜肺组织用冷生理盐水冲洗剪成1 mm小块, 经胰蛋白酶和胶原酶I消化后, 加入适量含10%胎牛血清的DMEM终止反应, 200目网筛过滤后, 800 r/min离心2次, 每次5 min, DMEM重悬细胞后接种入已包被小鼠IgG的培养皿中, 在37℃、5% CO₂培养箱中放置40 min, 吸出含未黏附细胞的液体接种于另一包被小鼠IgG的培养皿中继续孵育40 min, 吸出未黏附细胞, 800 r/min离心5 min去掉上清, 用含10%胎牛血清的DMEM重悬细胞, 此时主要为肺泡I型、II型上皮细胞和支气管上皮细胞。细胞凋亡检测按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 Bax/Bcl-2免疫组化染色

根据生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒说明进行操作, 具体如下:肺组织经4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切片, 常规脱蜡至水, 经抗原修复后, 用3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶活性, 血清封闭, 滴加一抗4℃过夜, PBS冲洗3次, 加入二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 用DAB显色, 再经苏木素复染, 最后脱水、透明、封片。镜下观察棕色颗粒为阳性表达。每张玻片随机计数10个视野, 免疫组化结果通过软件Image-Pro plus 5.1半定量分析。

1.3 统计学方法

用统计软件SPSS 19.0进行数据处理。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较用方差分析, SNK-*q*检验进行组间多重比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

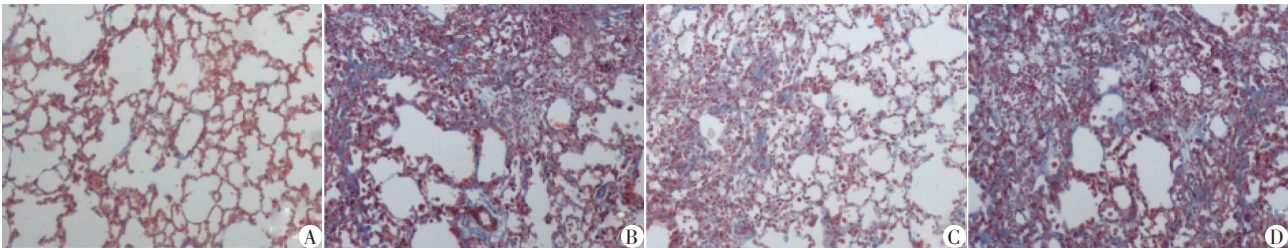
2 结果

2.1 阻断IL-17活性对小鼠PF的影响

模型组小鼠第10天死亡1只, 同型IgG处理组

第11天死亡1只,抗IL-17处理组和PBS处理组没有死亡。PBS处理组小鼠肺组织表面光滑,呈粉红色,切片观察肺泡及肺泡间质仅有极少量胶原纤维,无纤维化发生;模型组和同型IgG处理组小鼠肺组织表面有灰白色斑点,质地较硬,切片观察肺泡及肺泡间质有大量胶原纤维沉积,呈中重度纤维化;抗IL-17处理组小鼠肺组织部分呈现暗红色,弹性较好,切片观察肺泡及肺泡间质虽有胶原纤维沉积,与模型组和同型IgG处理组相比纤维化程度明显减

轻(图1和表1)。
2.2 阻断IL-17活性对肺组织HYP含量的影响
各组右肺上叶精确称重后进行HYP含量测定,经多组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),模型组和同型IgG处理组HYP含量明显升高,采用中和抗体阻断内源性IL-17活性后发现,抗IL-17处理组HYP含量下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),同型IgG处理组与模型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。



A:PBS处理组;B:模型组;C:抗IL-17处理组;D:同型IgG处理组。
图1 各组小鼠肺组织Masson染色(×100)
Figure 1 Masson staining of mice lung for each group(×100)

表1 阻断IL-17活性对小鼠肺组织纤维化、HYP含量的影响 Table 1 Influence on lung fibrosis and HYP content in mice lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x} \pm s$)		
组别	纤维化(%)	HYP($\mu\text{g/g}$)
PBS处理组($n=20$)	3.45 ± 0.61	393.69 ± 48.54
模型组($n=19$)	$50.26 \pm 4.45^{**}$	$776.71 \pm 42.59^{**}$
抗IL-17处理组($n=20$)	$18.55 \pm 2.98^{* \Delta}$	$522.96 \pm 46.62^{* \Delta}$
同型IgG处理组($n=19$)	$49.58 \pm 3.89^{**}$	$756.59 \pm 40.54^{**}$
F值	975.50	336.58
P值	<0.01	<0.01

与PBS处理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与同型IgG处理组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

2.3 阻断IL-17活性对小鼠肺组织细胞凋亡率的影响
4组小鼠肺组织细胞凋亡率间差异有显著性,抗IL-17处理组细胞凋亡率与模型组和同型IgG处理组相比均下降($P < 0.01$),有显著诱导细胞凋亡的作用,同型IgG处理组与模型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,表2)。
2.4 阻断IL-17活性对小鼠肺组织Bax/Bcl-2比值的影响

免疫组化结果显示,呈棕黄色颗粒表达的细胞即为Bax和Bcl-2表达阳性细胞,主要表达在肺泡和支气管上皮细胞,炎性细胞和血管内皮细胞也有表达。与PBS处理组比较,模型组和同型IgG处理组Bcl-2蛋白表达虽略有增高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),Bax蛋白表达增多($P < 0.01$),Bax/Bcl-2

表2 阻断IL-17活性对小鼠肺组织细胞凋亡率的影响 Table 2 Influence on apoptotic rate in mice lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x} \pm s$)	
组别	凋亡率(%)
PBS处理组($n=20$)	3.69 ± 0.47
模型组($n=19$)	$22.08 \pm 5.82^{**}$
抗IL-17处理组($n=20$)	$7.65 \pm 2.03^{* \Delta}$
同型IgG处理组($n=19$)	$22.41 \pm 7.05^{**}$

4组比较, $F=86.68, P < 0.01$;与PBS处理组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与同型IgG处理组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

比值明显升高($P < 0.01$),而抗IL-17处理组Bax蛋白表达减弱($P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达虽无明显改变,但Bax/Bcl-2比值明显降低($P < 0.01$,表3,图2)。

表3 阻断IL-17活性对小鼠肺组织Bax/Bcl-2比值的影响 Table 3 Influence on Bax/Bcl-2 rate in mice lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x} \pm s$)			
组别	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
PBS处理组	4.70 ± 0.48	6.50 ± 0.59	0.73 ± 0.12
模型组	$8.93 \pm 0.66^{*}$	6.94 ± 0.86	$1.31 \pm 0.18^{*}$
抗IL-17处理组	$5.76 \pm 1.08^{* \Delta}$	6.53 ± 0.74	$0.90 \pm 0.24^{* \Delta}$
同型IgG处理组	$8.92 \pm 0.60^{*}$	6.97 ± 0.67	$1.29 \pm 0.16^{*}$
F值	171.69	2.45	51.52
P值	<0.01	0.07	<0.01

与PBS处理组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$;与同型IgG处理组比较, $\Delta P < 0.01$ 。

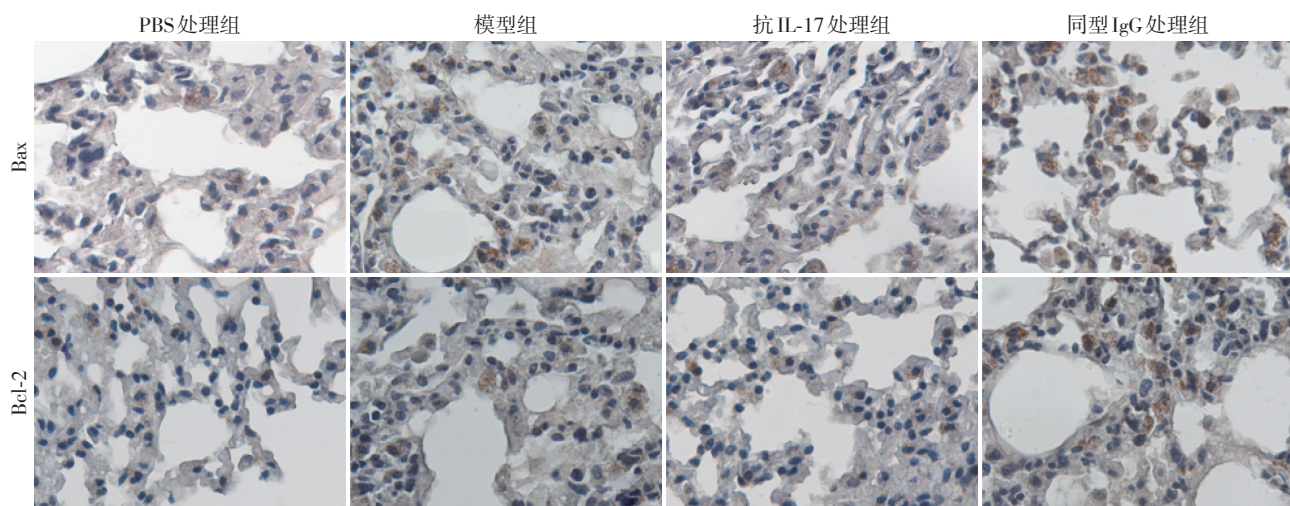


图2 各组小鼠肺组织 Bax/Bcl-2 免疫组织化学染色($\times 100$)

Figure 2 Immunohistochemistry staining for Bax/Bcl-2 of mice lung in each group($\times 100$)

3 讨论

BLM所致小鼠PF模型与特发性肺纤维化相似,其可直接作用致各级细支气管、肺泡上皮细胞发生肺炎,继而出现成纤维细胞异常增生,细胞外基质反复破坏、修复和重建,最后引起胶原沉积,导致纤维化发生。肺损伤发生后,适度的细胞凋亡可以限制炎症反应发展,抑制成纤维细胞的过度增殖,帮助肺组织恢复正常结构^[6]。

Bcl-2 蛋白家族被认为是线粒体凋亡信号通路中关键的调节因子。分为抗凋亡 Bcl-2 亚家族,主要包括 Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL;促凋亡 Bax 亚家族,主要包括 Bax、Bak 和仅含 BH3 结构域的 BH3-only 亚家族(包括 Bid、Bim、Bik、Noxa 等)^[7]。Bcl-2 家族蛋白可通过彼此之间的相互作用促进或抑制细胞凋亡,其中 Bcl-2 蛋白可通过与 Bax 形成稳定的化合物抑制后者的促凋亡功能,影响线粒体凋亡通路介导的细胞凋亡,而且 Bcl-2 蛋白还可以抑制或阻断 Fas 和 Fas-L 所介导的死亡受体凋亡通路^[8-9],从而达到抑制或阻断细胞凋亡的作用。

IL-17 是一种主要由 Th17 细胞产生的炎症因子。研究发现 IL-17 与肺炎、慢性阻塞性肺疾病和囊性纤维化等发生有关,通过促进 IL-8、IL-6 和 MIP-2 等导致肺内中性粒细胞募集及活化^[10]。Wilson 等^[11]研究发现 BLM 诱导的肺损伤可以检测到 IL-17 的表达并最终导致 PF 的发生,并且 IL-17A 诱导的 PF 依赖于 TGF- β 1 的分泌。Gasse 等^[12]进一步研究发现,BLM 或 IL-1 β 诱导的肺损伤通过启动早期 IL-1 β —IL-23—IL-17A 轴的表达刺激 TGF- β 1 的产生、促进

胶原分泌和沉积、促使上皮细胞发生上皮间质转化,最终进展为 PF。另外,IL-17 还可通过 NF- κ B 途径直接促进肺成纤维细胞的增生、转化和胶原沉积^[13]。Francois 等^[14]最近发现单独使用重组 IL-17A 作用于小鼠气道,可导致肺组织胶原大量产生和 TGF- β 1 表达升高,最终导致 PF,且此过程与 B 细胞激活因子(B-cell activating factor, BAFF)密切相关。

本研究利用 BLM 通过气管给药诱导小鼠 PF 的发生,结果发现,与 PBS 处理组相比,模型组小鼠 PF 程度严重,HYP 含量增加,肺组织中 Bax/Bcl-2 表达明显增加,差异均有统计学意义。免疫组化结果提示:Bcl-2 在 BLM 诱导的 PF 肺组织细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞中表达并无明显改变,Bax 在 BLM 诱导的 PF 肺组织细支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞中表达增强。由此可见,PF 时肺细支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞等的过度凋亡与促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达失衡相关,表明 Bcl-2 和 Bax 参与了 BLM 诱导的 PF。另外研究发现,Bax/Bcl-2 比值的高低决定了细胞凋亡的敏感性。Bcl-2 通过 BH3 结构域还可与自噬蛋白 Beclin1 发生作用,抑制自噬的活化^[15]。当细胞受到饥饿等刺激时,Jun 氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase-1, JNK-1)被激活,磷酸化 Bcl-2 氨基末端的丝/苏氨酸残基导致其与 Beclin 1 解离,从而激活自噬的发生。而激活自噬能显著改善 BLM 诱导的 PF,并改善纤维化组织局部炎症状况,自噬不足则引起细胞衰老和肌成纤维细胞分化继而促进 PF 的发生^[16]。

本研究为进一步探讨 IL-17 在 PF 进程中与细胞凋亡的关系,在利用 BLM 诱导小鼠 PF 发生的同时,通

过尾静脉注射抗 IL-17 单克隆抗体中和内源性 IL-17 活性。结果表明,给予抗 IL-17 单克隆抗体后,小鼠 PF 程度减轻,HYP 含量下降,支气管上皮细胞和肺泡上皮 Bcl-2 蛋白表达虽无明显变化,Bax 蛋白表达明显减少,Bax/Bcl-2 比值亦明显减少,说明阻断 IL-17 可通过显著下调 Bax 基因表达,抑制肺组织细胞凋亡从而显著改善 BLM 诱导的小鼠 PF,其作用机制可能与调节 Bax/Bcl-2 介导的线粒体细胞凋亡通路有关。

综上所述,BLM 诱导的 PF 因内源性 IL-17 活性被阻断在一定程度上抑制了肺组织实质细胞的凋亡,改善了 PF,其作用机制可能与调节 Bax / Bcl-2 的表达有关。IL-17 有可能会成为预防和治疗 PF 的新靶点。阐明 IL-17 在 BLM 诱导的 PF 中调控细胞凋亡的作用机制,对 PF 的早期诊断、治疗及药物开发具有重要意义。

【参考文献】

- [1] Bălănescu P, Lădaru A, Bălănescu E, et al. IL-17, IL-6 and IFN- γ in systemic sclerosis patients[J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(1): 44-49
- [2] Thakur C, Wolfarth M, Sun J, et al. Oncoprotein mdig contributes to silica-induced pulmonary fibrosis by altering balance between Th17 and Treg T cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(6): 3722-3736
- [3] 董昭兴, 邵文琳, 雷 雯, 等. IL-17A 在博来霉素致小鼠肺纤维化形成中的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2012, 33(2): 199-202
- [4] Al-Muhsen S, Letuve S, Vazquez-Tello A, et al. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils[J]. Respir Res, 2013, 14: 34
- [5] Szapiel SV, Elson N, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899
- [6] Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN. TH17 cells in autoimmunity and immunodeficiency: protective or pathogenic?[J]. Front Immunol, 2012, 3(2): 9-15
- [7] Li CX, Zhang GF, Zhao L, et al. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer[J]. World J Surg Oncol, 2016, 14(1): 15
- [8] Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies[J]. Semin Hematol, 2014, 51(3): 219-227
- [9] Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, et al. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(6): 2129-2144
- [10] 张效云, 李 琦, 张颖骞. 中和白细胞介素-17加重小鼠衣原体呼吸道感染[J]. 北京大学学报(医学版), 2013, 45(4): 613-618
- [11] Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, et al. Bleomycin and IL-1 β -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent[J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 535-552
- [12] Gasse P, Riteau N, Vacher R, et al. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23185
- [13] Dong ZX, Yang YN, Zhang T, et al. siRNA-Act1 inhibits the function of IL-17 on lung fibroblasts via the NF- κ B pathway[J]. Respiration, 2013, 86(4): 332-340
- [14] Francois A, Gombault A, Villeret B, et al. B cell activating factor is central to bleomycin- and IL-17-mediated experimental pulmonary fibrosis [J]. J Autoimmun, 2015, 56: 1-11
- [15] Erlich S, Mizrachy L, Segev O, et al. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members[J]. Autophagy, 2007, 3(6): 561-568
- [16] Araya J, Kojima J, Takasaka N, et al. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 304(1): L56-L69

【收稿日期】 2016-10-12