

凋亡诱导因子在姜黄素诱导的大鼠肺成纤维细胞凋亡中的作用

陈玲玲 张德平[△]

(南京医科大学医学院鼓楼临床医学院 江苏 南京 210008)

摘要 目的 研究姜黄素对肺纤维化大鼠肺成纤维细胞增殖、凋亡的影响,探讨凋亡诱导因子(AIF)在肺成纤维细胞凋亡中的作用。方法 将体外培养的肺纤维化大鼠成纤维细胞,分别于不同浓度的姜黄素(5、10、20、40 μM)和 caspase-3 抑制剂 Z-DEVD-fmk (20 μM) 孵育,观测细胞生长状态变化。MTT 检测成纤维细胞增殖抑制率,流式细胞仪检测细胞凋亡率,Western-Blot 测定凋亡诱导因子(AIF)蛋白表达及核转位。结果 流式细胞术检测细胞凋亡,5~40 μM 姜黄素处理 12 h,其凋亡率呈浓度依赖,对照组相比,差异显著,而抑制 caspase-3 并不能完全阻止细胞凋亡。Western-Blot 结果显示,姜黄素处理组出现凋亡诱导因子(AIF)蛋白表达与核转位,抑制 caspase-3 活性后未检测出 AIF 表达。结论 姜黄素可抑制肺成纤维细胞增殖,其诱导大鼠肺成纤维细胞凋亡,可能与线粒体释放 AIF 有关。

关键词 肺成纤维细胞 姜黄素 细胞凋亡 凋亡诱导因子

中图分类号 Q95-3, R563 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)14-2654-04

Expression and Significance of Annexin I in Granulosa Cells of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome

CHEN Ling-ling, ZHANG De-ping[△]

(Department of Pulmonary Medicine, Affiliated Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT Objective: To the effect of curcumin on proliferation and apoptosis and the mechanism of apoptosis-inducing factor (AIF) on rat pulmonary fibroblasts. **Methods:** Fibroblasts derived from lung tissue of rat were cultured in vitro. Cultured cells were exposed to curcumin with different final concentration (5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM) and Z-DEVD-fmk with final concentration (20 μM). MTT assay was used to determine the inhibitory rate of curcumin on the proliferation of cells. Flow cytometry identified the apoptosis. Western-blot was used to determine the expression and nuclear translocation of AIF protein. **Results:** Curcumin inhibited proliferation of pulmonary fibroblasts in a dose-dependent manner (5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM), which was detected by Flow cytometry. But the proliferation inhibitory and the apoptosis induced by curcumin were not inhibited by Z-DEVD-fmk. In curcumin treated groups, AIF was observed associated with the nuclear translocation. **Conclusion:** Curcumin inhibited proliferation of pulmonary fibroblasts. The curcumin-induced apoptosis may be associated with the releasing of AIF from mitochondria.

Key words: Pulmonary fibroblast; Curcumin; Apoptosis; Apoptosis-inducing factor

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R563 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2654-04

前言

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种原因不明的慢性炎症性间质性肺疾病,以普通型间质性肺炎(UIP)为特征性病理改变。IPF 患者存活率很低,确诊后中位生存期 2-5 年^[1-2]。前期研究结果表明,姜黄素可以通过激活 caspase-3,诱导肺成纤维细胞凋亡^[3]。但除了经典的 caspase 途径外,姜黄素诱导肺成纤维细胞凋亡是否还存在不依赖于 caspase 的凋亡途径目前还不清楚。本研究旨在通过对细胞凋亡的检测,探讨凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)在这一途径中的作用,进一步了解姜黄素诱导肺成纤维细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

姜黄素(美国 Sigma 公司)以 DMSO 稀释为 40 mM,避光保存,用前以培养液稀释,使 DMSO 终浓度 < 0.1 %。DMSO(美国 Sigma 公司) Z-DEVD-fmk(美国 BD 公司) RPMI-1640 培养基及胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司) 胎牛血清(FBS) (杭州四季青生物工程有限公司) α -SMA 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、二部法免 / 鼠通用型免疫组化试剂盒(丹麦 DAKO 公司) AIF 单克隆抗体 (Cell Signaling) MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、caspase-3 分光光度法检测试剂盒、ANNEXIN-V-FITC 凋亡检测试剂盒(凯基生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 肺纤维化动物模型的建立及原代培养 SPF 级 6 周龄雄性 SD 大鼠,气管内一次性注射盐酸博来霉素 (5 mg / kg) 建立肺纤维化动物模型,所有大鼠于注药后第 28 天处死。无菌条件下取大鼠肺组织(部分右肺上叶做 HE 染色),胰蛋白酶消化法

作者简介 陈玲玲(1984),女,硕士研究生,主要研究方向 药物诱导的肺成纤维细胞凋亡及作用机制。

E-mail: chenlingling2011@yahoo.com.cn. 电话 15804513603

△通讯作者 张德平,电话 025-83304616,

E-mail: dpzhang207@yahoo.com

(收稿日期 2011-05-12 接受日期 2011-05-31)

做原代细胞培养,培养箱内培养 1 h,去除未贴壁细胞,贴壁细胞即为成纤维细胞,肺成纤维细胞可通过传代自然纯化。

1.2.2 肺成纤维细胞免疫组化鉴定 将传代培养的细胞制成单个细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 / \text{ml}$,接种于六孔板内(孔内预先置有多聚赖氨酸包被的盖玻片),当细胞铺满盖玻片 60 % 时,丙酮固定 30 min,二部法免疫组化检测肺成纤维细胞 α -SMA 的表达。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 细胞以 $8 \times 10^4 / \text{ml}$ 接种于 96 孔板,待细胞铺满 60 %,换用无血清培养基培养 24 h,使细胞同步于 G0 期,按如下分组予不同浓度姜黄素干预。A 组 (1) A1 空白组(只给培养液,无细胞);(2) A2 Control 组(只给培养液);(3) A3 $5 \mu\text{M}$ 姜黄素组;(4) A4 $10 \mu\text{M}$ 姜黄素组;(5) A5 $20 \mu\text{M}$ 姜黄素组;(6) A6 $40 \mu\text{M}$ 姜黄素组。每组设 5 个复孔。B 组:分组同上,每组加入 Z-DEVD-fmk ($20 \mu\text{M}$) 预处理 30 min 后,分别加入 $5 \sim 40 \mu\text{M}$ 姜黄素。培养箱培养 12 h,每孔加 $1 \times \text{MTT } 50 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 4 h,吸出上清,每孔加入 DMSO $150 \mu\text{L}$,振荡充分溶解,酶标仪检测 OD 值(测量波长 490nm)。

1.2.4 ANNEXIN-V-FITC 检测细胞凋亡 收集 A、B 两组培养 12 h 后的细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 / \text{mL}$; 1% PBS 洗涤细胞两次,以 $500 \mu\text{L}$ Binding Buffer 重悬细胞,加入 $5 \mu\text{L}$ ANNEXIN-V-FITC 混匀,再加入 $5 \mu\text{L}$ PI 避光反应 15 min; 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.2.5 酶标仪检测 caspase-3 的表达 收集 Z-DEVD-fmk + 姜黄素处理的细胞,向细胞沉淀中加入 $50 \mu\text{L}$ Lysis Buffer (用前加入 $0.5 \mu\text{L}$ DTT),冰上裂解 45 min 离心, 4°C 、 10000rpm 、1 min; 吸取上清,酶标仪测定 OD 值,测量波长 405nm 。

1.2.6 Western-Blot 检测 AIF 蛋白表达 按说明书提取细胞全蛋白,SDS-PAGE、Western-Blot 法检测 AIF 表达及核转位。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0,Prism 统计软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色评估肺纤维化程度

接受气管内性注射盐酸博来霉素的大鼠正常肺泡结构破坏,肺泡间隔增宽,内见炎性细胞浸润及大量胶原纤维增生,可见多灶性、大小不等的纤维化区域(图 1)。表明肺纤维化大鼠模型制备成功。

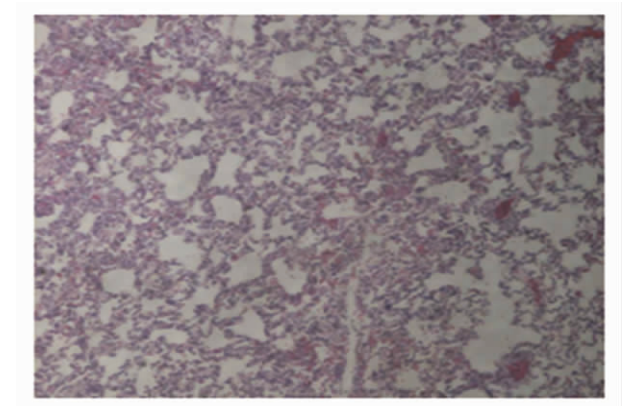


图 1 纤维化大鼠肺组织 HE 染色 ($200 \times$)

Fig.1 The lungs of rats with pulmonary fibrosis. HE ($200 \times$)

2.2 肺成纤维细胞鉴定

原代培养的大鼠肺成纤维细胞传 4 ~ 5 代后自然纯化,成纤维细胞呈长梭形,免疫组化 α -SMA 染色呈现定位于胞浆的棕黄色颗粒,表明肺成纤维细胞已转化成肌成纤维细胞(myofibroblast, MFb) (图 2)。

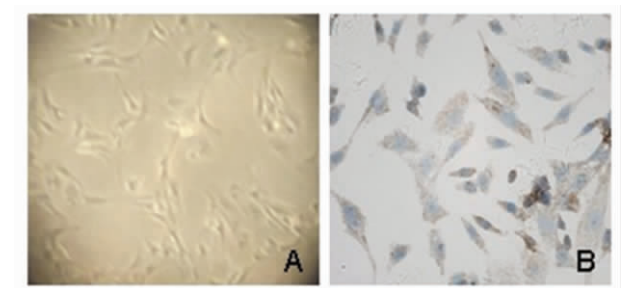


图 2 肺成纤维细胞照片 ($200 \times$) : A 正常生长的肺成纤维细胞 B 肺成纤维细胞 α -SMA 免疫组化染色

Fig.2 SEM OF pulmonary fibroblast ($200 \times$): A Normal pulmonary fibroblast; B :Immunohistochemistry of α -SMA in pulmonary fibroblast

2.3 Z-DEVD-fmk 抑制 caspase-3 的表达

Z-DEVD-fmk ($20 \mu\text{M}$) 预处理细胞 30 min,分别加入 $5 \sim 40 \mu\text{M}$ 姜黄素培养 12 h,各组 caspase-3 活化值与 control 组比较,差异无统计学意义,表明各处理组细胞 caspase-3 表达被阻断(图 3)。

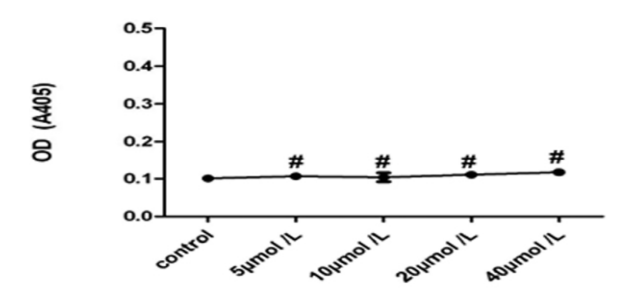


图 3 加入 Z-DEVD-fmk($20 \mu\text{M}$)后 caspase-3 表达受抑制 # $P > 0.05$ vs control

Fig.3 Caspase-3 was inhibited after Z-DEVD-fmk($20 \mu\text{M}$) treatment # $P > 0.05$ vs control

2.4 姜黄素对成纤维细胞增殖的抑制

$5 \sim 40 \mu\text{M}$ 姜黄素作用于细胞 12 h 后,姜黄素能显著抑制细胞增殖,并呈浓度依赖。加入 Z-DEVD-fmk 阻断 caspase-3 的表达,不能完全抑制肺成纤维细胞增殖(图 4)。

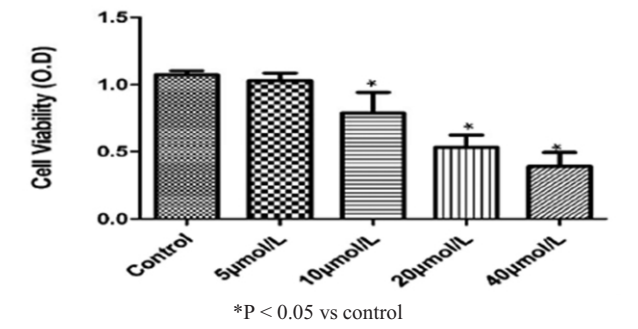


图 4 a 姜黄素($5 \sim 40 \mu\text{M}$)对肺成纤维细胞增殖的影响

Fig.4a Effect of curcumin ($5 \sim 40 \mu\text{M}$) on proliferation of pulmonary fibroblast

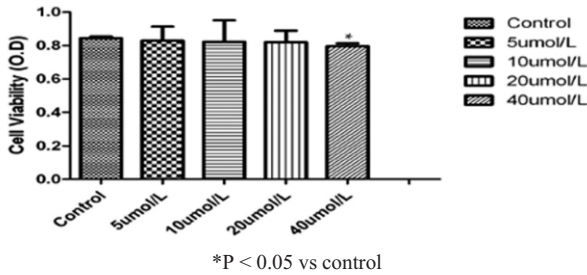


图4 b 阻断 caspase-3 后姜黄素(5~40 μM)对细胞增殖的影响

Fig.4b Effect of curcumin (5~40 μM) on cell proliferation after blocking of caspase-3

2.5 姜黄素对肺成纤维细胞凋亡的影响

5~40 μM 姜黄素作用于细胞 12 h 后细胞的凋亡率与 Control 组比较,差异显著,呈现浓度依赖性 加入 Z-DEVD-fmk 阻断 caspase-3 的表达,20、40 μM 姜黄素组仍然可以诱导肺成纤维细胞凋亡,但其凋亡率均低于姜黄素单独处理组 (图5)。

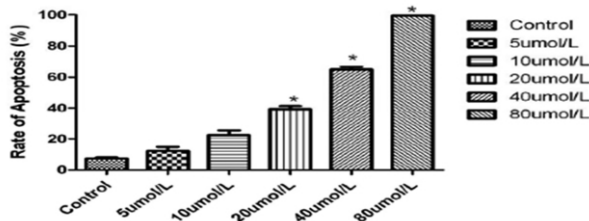


图5 a 姜黄素(5~80 μM)处理后细胞凋亡率 *P < 0.05 vs control

Fig.5a Apoptotic rate after treatment of curcumin (5~80 μM) *P < 0.05 vs control

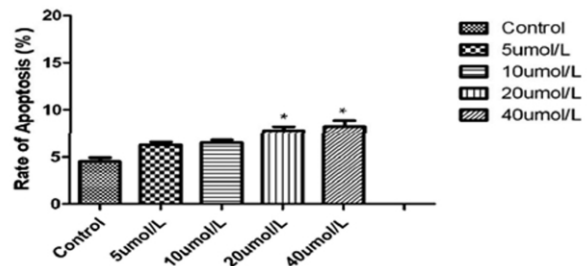


图5 b 阻断 caspase-3 后姜黄素诱导的细胞凋亡率 *P < 0.05 vs control

Fig.5b Apoptosis Induced by curcumin after blocking of caspase-3 (5~40μM) *P < 0.05 vs control

2.6 AIF 蛋白表达和核转位

姜黄素作用于 MLF 12 h 后,Western-Blot 分析显示肺成纤维细胞 AIF 蛋白表达,被剪切为 57KDa 并发生核转位 而 Z-DEVD-fmk 预处理的细胞并未出现 AIF 蛋白表达和核转位 (图6)。

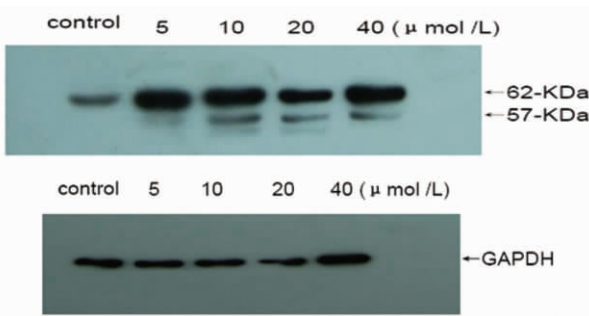


图6 姜黄素处理细胞后 AIF 由线粒体释放

Fig. 6 The releasing of AIF from mitochondria

3 讨论

研究表明在 IPF 的发病最初就有成纤维细胞灶的形成,最终形成肺纤维化^[3]。成纤维细胞灶主要由表达 α-SMA 的肌成纤维细胞构成,是纤维化发生的主要作用细胞。在肺纤维化的发病过程中,MFb 的凋亡受到抑制,其持续表达导致肺纤维化进行性发展^[4-5]。α-SMA 是 MFb 的标志蛋白,是成纤维细胞转化为 MFb 的关键标志。本研究的肺纤维化动物模型的成纤维细胞高度表达 α-SMA,表明他们已转化为 MFb。

姜黄素是从中药姜黄中提取的一种酚类色素,具有广泛的生物活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗纤维化等^[6]。研究证实,早期应用姜黄素可以减轻肺纤维化程度,对肺纤维化具有预防作用^[7]。Tourkina E 研究发现,姜黄素能引起硬皮病患者肺成纤维细胞(多数具有 MFb 表型)凋亡^[8]。本研究小组前期研究表明,在博来霉素诱导的大鼠肺纤维化形成阶段应用姜黄素干预,可以通过抑制肺组织 TGF-β1 的合成,有效减轻肺纤维化程度;在体外,姜黄素可能通过激活 caspase-3,诱导 IPF 患者肺成纤维细胞凋亡^[9-12]。Caspase 家族在细胞凋亡过程中发挥着重要作用,caspase-3 最为重要,处于蛋白酶级联反应的核心位置,是线粒体途径和死亡受体途径两条信号途径的共同通道。但除 caspase 途径外,姜黄素可能还存在不依赖于 caspase 的凋亡途径,如通过凋亡诱导因子(AIF)发挥作用,但具体信号转导途径尚不明确。

AIF 是一类存在于线粒体内外膜间隙的保守黄素蛋白,分子量为 62-KDa,具有双重功能 在细胞正常的生理状态下,AIF 作为线粒体氧化还原酶,能催化细胞色素 c (Cyt-c) 和 NAD 之间的电子传递 当细胞受到凋亡的刺激时,线粒体膜通透性改变,AIF 被剪切为 57-KDa 的 tAIF,成熟的 AIF 从线粒体释放至胞浆,并转位到细胞核内,与线粒体蛋白质 Endonuclease G (Endo G) 一起引起细胞染色体的凝聚和 DNA 的大片段化^[13-14]。有学者认为,AIF 是线粒体凋亡途径的关键分子,被认为在调控 caspase 非依赖性细胞凋亡中起中心作用^[15]。

本研究结果表明,姜黄素可以抑制 MLF 的增殖,诱导 MLF 凋亡,并呈剂量依赖型 抑制 caspase-3 的活性,可明显抑制但不能完全阻止姜黄素诱导的 MLF 凋亡,提示姜黄素还可能通过 caspase 非依赖性途径诱导 MLF 凋亡,但其诱导凋亡仍主要通过 caspase 途径。应用姜黄素干预大鼠肺成纤维细胞,可以检测到 AIF 蛋白表达及核转位,而提前阻断 caspase-3 的活性,再应用姜黄素处理细胞,未能检测到 AIF 蛋白表达。虽然大部分研究认为 AIF 介导的细胞凋亡不依赖于 caspase 的活性,但也有研究认为 AIF 的致凋亡作用是依赖于 caspase 的,Damien A 等证实加入 caspase 广谱抑制剂对线粒体释放 Cyt-c 无影响,但是可以阻止 AIF 的释放.只有在细胞内的 caspase 被激活后,AIF 才能释放和发挥作用^[16-17]。Z-DEVD-fmk 虽然不能抑制 AIF 活性,但若使 Z-DEVD-fmk 在线粒体释放 AIF 之前就抑制 caspase-3 活性,则 AIF 就不能发挥作用。出现上述两种相反结论的原因,可能是细胞类型不同和受到的刺激不同的原因。本实验中,Z-DEVD-fmk 可能在 MLF 线粒体释放 AIF 之前就抑制了 caspase-3 活性,使得 AIF 不能从线粒体释放,故而未能检测到 AIF 蛋白的表达。

本次实验再次证实姜黄素可以诱导肌成纤维细胞凋亡,同时发现肺成纤维细胞出现 AIF 蛋白表达及核转位。提示细胞接收到凋亡信号,引起 caspase 的活化,而活化的 caspase 促使使线粒体释放 AIF 因子,共同引发细胞凋亡。而抑制 caspase 的活性,并不能完全阻止肺成纤维细胞的凋亡,可能与 AIF 介导的非 caspase 依赖的凋亡通路有关,但具体的凋亡信号通路转导,尚待进一步分子生物学实验证实。

参考文献 (References)

- [1] Mio T, Nagai S, Kitaki M, et al. Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP) [J]. Chest, 1992,102:832-837
- [2] Fries KM, Blieden T, Looney RJ, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. Clin Immunol Immunopathol, 1994,72(3):283-292
- [3] Selman M, Thannickal VJ, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and therapeutic Approaches [J]. Drugs, 2004, 4: 405-430
- [4] Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis [J].Chest, 2002, 122(6 Suppl):286-289
- [5] 张德平,庄谊,殷凯生.肌成纤维细胞凋亡与肺纤维化 [J].国际呼吸杂志,2007,27:298-301
Zhang De-ping, Zhuang Yi, Yin Kai-sheng. Myofibroblast apoptosis and pulmonary fibrosis [J]. International journal of respiration, 2007, 27: 298-301(In Chinese)
- [6] Araujo CC, Leon LL. Biological activities of Curcuma longa L [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz,2001,96:723-728
- [7] Punithavathi D, Venkatesan N, Babu M. Protective effects of curcumin against amiodarone-induced pulmonary fibrosis in rats [J].Br J Pharmacol, 2003,139(7):1342-1350
- [8] Tourkina E, Gooz P, Oates JC, et al. Curcumin-induced apoptosis in scleroderma lung fibroblasts:role of protein kinase cepsilon [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004,31:28-35
- [9] 张德平,邱慧,庄谊,等.姜黄素干预对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化的影响 [J].中华结核和呼吸杂志,2007,10:197-201
Zhang De-ping, Qiu Hui, Zhuang Yi, et al. The effect of curcumin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases, 2007,10:197-201(In Chinese)
- [10] 陈碧,张德平.姜黄素干预对实验性肺间质纤维化的影响.中国呼吸与危重监护杂志,2007,6:208-212
Chen Bi, Zhang De-ping. Effect of curcumin on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats [J]. Chinese journal of respiratory and critical care medicine, 2007,6:208-212(In Chinese)
- [11] 高蔚,张德平,陈碧.姜黄素诱导人肺成纤维细胞凋亡的相关分子机制的初步研究 [J].中国呼吸与危重监护杂志,2009,8:208-212
Gao Wei, Zhang De-ping, Chen Bi. Mechanism of Pulmonary Fibroblasts Apoptosis Induced by Curcumin [J]. Chinese journal of respiratory and critical care medicine, 2009,8:208-212(In Chinese)
- [12] 高蔚,张德平,华云峰.姜黄素对大鼠肺成纤维细胞增殖和凋亡的影响 [J].实用医学杂志,2008,24:2393-2396
Gao Wei, Zhang De-ping, Hua Yun-feng. Effect of Curcumin on proliferation and apoptosis of pulmonary fibroblasts [J]. The journal of practical medicine, 2008,24:2393-2396(In Chinese)
- [13] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J].Nature,1999,397-446
- [14] Daugas E. Mitochondrial-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis [J].FASEB J,2002,14:729-739
- [15] Sean PC, Valina LD, Ruth SS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death [J]. Oncogene, 2004,23:2785-2796
- [16] Damien A, Philippe P, Martinou JC, et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of Cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli [J]. The Journal of Cell Biology, 2002, 159: 923-929
- [17] Damien A,Brigitte G, Mariusz K, et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization [J]. The EMBO Journal, 2003,22:4385-4399