双环醇改善大鼠肺纤维化的机制研究

周颖，何海栋，戚梦蝶(浙江省立同德医院呼吸科，杭州 310012)

摘要：目的 观察双环醇对博来霉素诱导大鼠肺纤维化的干预作用，并进一步探讨其可能的作用机制。**方法** 将♂SD 大鼠随机分为 5 组：对照组，模型组，双环醇低、中、高剂量组，每组 10 只。除对照组外，其他 4 组均用单次气管内注入博来霉素的方法复制大鼠肺纤维化模型，造模成功 24 h 后双环醇各剂量组分别给予不同剂量双环醇片溶解后灌胃，对照组和模型组相同条件下注入等体积生理盐水，观测 5 组大鼠一般情况，根据双环醇不同剂量组大鼠生存率情况，选择生存率最高组和对照组、模型组进行下一步实验。观测 3 组大鼠肺组织病理变化，行肺纤维化 Ashcroft 评分及肺泡间隔厚度测定，检测肺组织中 pro-caspase 3、cleaved caspase 3、Bcl-2 和 Bax 的表达。**结果** 各造模组中双环醇高剂量组生存率最高(P<0.05)，故选择双环醇高剂量组作为双环醇组继续实验。与模型组相比，双环醇组肺泡结构破坏及肺间质纤维化程度减轻，肺纤维化 Ashcroft 评分明显降低(P<0.01)，肺泡间隔厚度明显变薄(P<0.01)，Bax 和 cleaved caspase 3 表达水平均显著降低(P<0.01)，Bcl-2 升高(P<0.01)。**结论** 双环醇对博来霉素诱导大鼠肺纤维化具有明显的保护作用，而其作用机制可能与通过干预 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase 3 影响细胞凋亡改善肺纤维化有关。

关键词：肺纤维化；双环醇；Bcl-2；Bax；cleaved caspase 3

中图分类号：R965.2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2022)04-0461-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.005

引用本文：周颖，何海栋，戚梦蝶. 双环醇改善大鼠肺纤维化的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(4): 461-466.

Study on the Mechanism of Bicyclol for Improving Pulmonary Fibrosis in Rats

ZHOU Ying, HE Haidong, QI Mengdie(*Department of Respiratory, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the interventional effectiveness and the relevant mechanisms of bicyclol on bleomycin-induced pulmonary fibrosis(BPF) in rats. **METHODS** The male SD rats were randomly divided into 5 groups: control group, model group, low, medium and high dose of bicyclol groups, 10 rats per group. In addition to the control group, the other four groups were established to the pulmonary fibrosis model by bleomycin intra-tracheal injection. After 24 h of successful model, the different dose groups of bicyclol were intragastrically administered with different doses of dissolved bicyclol tablets, the control group and the model group were injected with equal volume of saline under the same conditions. All groups were observed the general condition, according to the survival rate of rats in different dose groups of bicyclol, the group with the highest survival rate, the control group and the model group were selected for the next experiment. The remaining 3 groups of rats continued to be tested lung tissue pathology, Ashcroft scores, alveolar septal thickening measurement and the expression of pro-caspase 3, cleaved caspase 3, Bcl-2 and Bax of lung tissue. **RESULTS** The high dose of bicyclol group had the highest survival rate in all model groups(P<0.05). So the experiment was continued in the high dose of bicyclol group(bicyclol group). Compared to the model group, the degree of alveolar structure destruction and pulmonary interstitial fibrosis, pulmonary fibrosis Ashcroft's scoring were significantly reduced in bicyclol group(P<0.01), and the alveolar septal thickening was significantly thinner(P<0.01) and the expression of the Bax and cleaved caspase 3 decreased significantly (P<0.01), but the Bcl-2 was increased(P<0.01). **CONCLUSION** Bicyclol have significant protect effcet on BPF rats, the potential mechanism may be related to interfere with Bcl-2, Bax and cleaved caspase 3 to influence cell apoptosis for improving pulmonary fibrosis.

KEYWORDS: pulmonary fibrosis; bicyclol; Bcl-2; Bax; cleaved caspase 3

肺纤维化是一种病因不明的慢性进行性肺间质性疾病，临床出现肺泡上皮细胞受损、肺成纤维细胞过度增殖和肺组织结构破坏，最终导致肺功能减退和呼吸衰竭[1]。近年来肺纤维化的发病率和病死率持续增高，大多数患者确诊后的中位生存期约为 3 年，目前尚无有效的治疗药物[2]。近年研究发现双环醇通过干预肝脏人转化生长因子 β1 的表达抑制肝细胞凋亡达到抗肝纤维化的效果[3]。肺纤维化与肝纤维化病理机制相似，但双环醇是否能同样作用于肺纤维化尚未见报道。

基金项目：浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY327)

作者简介：周颖，女，硕士，副主任医师　　E-mail: zhouyingxiehe2008@163.com

因此，本研究采用博来霉素诱导肺纤维化大鼠模型，通过双环醇干预，观察其对肺纤维化大鼠的影响，探讨其对肺纤维化模型大鼠的作用及可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠，♂，清洁级，10 周龄，体质量(200±20)g，50 只，由浙江省医学科学院动物所提供，动物生产许可证号：SCXK(浙)2014-0001。整个实验在具有 SPF 级的浙江省中医药研究院实验动物中心进行，动物使用许可证：SYXK(浙)2014-0003。

1.2 试剂

博来霉素针剂(日本化药株式会社，批号：210082；规格：每支 15 mg)；双环醇(上海羽朵生物科技有限公司，批号：118159-48-1；规格：每片 25 mg)；Bax 抗体(货号：ZS-526)、Bcl-2 抗体(货号：SC-783)、β-actin(货号：bs-0061R)、pro-caspase-3 抗体(货号：8G10)、cleaved-caspase-3 抗体(货号：AF835)均购自美国 Santa Cruz 公司；抗兔免疫组化试剂盒 SP-9001、二氨基联苯胺/ DAB 染色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司，批号分别为 20190623，20190633；生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒(北京杰辉博高生物技术有限公司，批号：20190725)；总 RNA 提取试剂盒(北京博凌科为生物科技有限公司，批号：R1200)；逆转录试剂盒(中国赛默飞世尔科技有限公司，批号：10777019)；实时定量 PCR 试剂盒(上海沪震实业有限公司，货号：200T)；其他常规试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

DSX500 光学显微镜(日本 Olympus 公司)；Nikon DXM1200F 数码相机(上海千欣仪器有限公司)；JD-801 型号图像采集和分析系统(厦门市宝能科技有限公司)；GL-22M 型高速冷冻离心机(上海沪粤明科学仪器有限公司)；Multiskan Mk3 多功能酶标仪、HEPA CLASS100 型细胞 CO_2 培养箱(美国 Thermo Scientific)；Guava easy Cyte 流式细胞仪(德国 Merck)；Mini-PRO TEAN165-8004 电泳仪、Biosen Digital Imaging System(上海山富科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组和大鼠肺纤维化模型建立

将 50 只 SD 大鼠按照周龄、体质量随机分为对照组，模型组，双环醇低、中、高剂量组，每组各 10 只。除对照组外，余 4 组均制备肺间质纤维化模型，模型构建方法参考文献[4]，且预试验已建模成功。以 3%戊巴比妥钠按照 5 $mg \cdot kg^{-1}$ 腹腔注射麻醉大鼠，将大鼠固定于操作台，消毒颈部皮肤，眼科剪剪开颈前皮肤，钝性分离组织暴露气管，以 1 mL 注射器气管内注入模型组、双环醇各剂量组大鼠博来霉素(5 $mg \cdot kg^{-1}$)及注入对照组大鼠等体积生理盐水，拔除注射器，迅速提起大鼠，将动物直立旋转，使药液在肺内均匀分布，缝合颈部皮肤后，在原饲养环境下继续饲养[5]。

2.2 给药方法

造模成功 24 h 后，双环醇各剂量组按照临床用量换算，用生理盐水分别配成双环醇片 50，100，150 $mg \cdot kg^{-1}$ 药液灌胃，每天 1 次，总共 28 d。对照组和模型组在相同条件下注入等体积生理盐水。

2.3 标本采集及检测

所有大鼠均在灌胃后 28 d 处死，剪下双侧肺叶，置于 4%多聚甲醛中固定，固定 24 h 后进行石蜡包埋切片。双侧肺叶分别送病理组织学检查，行 HE 染色和 Masson 染色，在光学显微镜下根据文献分别行肺组织纤维化 Ashcroft 评分[6]及肺泡间隔厚度测定[7-8]，Bcl-2 和 Bax 免疫组化染色，Western blotting 和 qRT-PCR 检测 pro-caspase 3、cleaved caspase 3、Bcl-2 及 Bax。

2.4 肺组织纤维化 Ashcroft 评分

肺组织纤维化 Ashcroft 评分标准见表 1，先将肺组织石蜡切片 HE 染色，10 倍目镜查看全片，评价每一连续视野中纤维化严重程度。在全面评价全片后取平均分，保留至小数点后 2 位。在每一视野中，记录主要的纤维化程度(占半个视野以上的病变)。

表 1 Ashcroft 评分系统

Tab. 1 Ashcroft scoring system

组织病理学特征	纤维化程度
正常肺组织	0
肺泡或细支气管壁轻度纤维性增厚	1，2
肺泡或细支气管壁中度增厚但是无明显肺结构破坏	3，4
纤维化加重并伴有肺结构破坏，形成纤维条带或团块	5，6
重度结构受损及大片纤维化区域；蜂窝肺归于此类	7
整个区域被纤维组织填塞	8

2.5 肺泡间隔厚度测定

HE 或 Masson 染色按照病理切片标准随机选

取≥5 个代表性视野(10×)，保存为数码图像来测定肺泡间隔厚度。而肺泡间隔增厚定义为间隔内巨噬细胞增殖并伴有成纤维细胞、巨细胞和细胞外基质增多，将该区域用红线勾勒。用 Image-Pro Plus 5.1 软件，进行细胞间隔厚度的半定量分析。

2.6 免疫组织化学染色

取右肺组织根据生物素-链霉卵白素免疫组化检测试剂盒说明进行操作，具体如下：Bax 和 Bcl-2 分别一抗以 1∶300 稀释。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% H_2O_2 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。

2.7 Western blotting 检测

取右肺新鲜组织，待组织块自行溶解，用滤纸吸去其表面水分，将组织放入玻璃匀浆器球状部位，用组织剪将其剪碎，将剪碎的肺组织放入玻璃匀浆器的杆状部，按照 1 mL RIPA+10 μL PMSF/100 mg 组织的比例先后加入 RIPA 和 PMSF，将玻璃匀浆器插入冰中约 30 min。将组织匀浆转移到离心管中，4 ℃ 12 000 ×*g* 离心 5 min，取上清液移入 1.5 mL 新管。取相同浓度蛋白质进行 SDS-PAGE，转移到硝酸纤维素膜上，加入一抗 β-actin(1∶10 000)、Bcl-2(1∶1 000)、Bax(1∶1 000)、pro-caspase 3(1∶1 000)、cleaved caspase 3(1∶21 000)孵育过夜。用相应的辣根过氧化物酶偶联二抗(1∶20 000)在室温下浸泡 3 h 后，清洗膜，ECL 发光，使用化学发光成像系统进行拍照。

2.8 qRT-PCR 检测

提取右肺部组织块，加入 500 mL TRIZOL 用匀浆器碾磨成浆液状，提取 0.5 mL 的浆液到 1.5 mL 的 EP 管中，加入 TRIZOL 定量到 1 mL。冰上敷育 5 min，12 000 ×*g* 4 ℃离心 5 min，取上清液移入 1.5 mL 新管；总 RNA 提取试剂提取 RNA、逆转录试剂盒合成 cDNA 和实时定量 PCR 试剂盒检测 Bcl-2、Bax、pro-caspase 3 和 cleaved caspase 3 mRNA 的表达，以 β-actin 为内参。反应体系：2×Master Mix 10 μL、0.3 μL 正向引物(10 μmol·L^{-1})、0.3 μL 反向引物(10 μmol·L^{-1})、Template1ng、RNase free ddH_2O 至 20 μL。反应程序：第一步，95 ℃预变性 10 min，1 个循环。第二步，95 ℃变性 10 s，退火/延伸/采集荧光信号 60 ℃ 30 s，40 个循环。RT-qPCR 仪自动生成熔解曲线。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行相对定量分析。

2.9 统计学处理

实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义；多个样本均数间的比较用 T 检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义，$P<0.01$ 为差异显著。

3 结果

3.1 一般情况观察

对照组大鼠整个实验中均双眼明亮有神，动作反应灵敏，呼吸平稳，被毛紧密贴身，皮毛光泽发亮，口唇及爪甲颜色淡红，食量及体质量逐渐增加，大小便均正常。模型组、双环醇低剂量组和中剂量组大鼠第 3 天起，出现懒动、进食减少及肢端紫绀情况，毛发失去光泽；第 7 天起开始出现双眼目光无神，活动反应迟钝，呼吸稍促，多见倒竖现象，饮食排便均减少，体质量持续减轻，肢端紫绀情况有加重；第 14 天起出现呆滞，精神萎靡，体质量明显减轻，站立困难；第 21 天起出现不活动，拱背蜷缩，呼吸急促，被毛松散蓬乱，肢端紫绀情况加重；第 28 天，大鼠出现双眼目光呆滞，不活动，呼吸困难，毛发脱落，消瘦明显，蜷缩微微颤抖。双环醇高剂量组大鼠第 3 天起出现懒动、进食减少及肢端紫绀情况，毛发失去光泽，体质量逐渐减轻；第 7 天起出现活动反应稍迟钝，呼吸稍促，毛发失去光泽，饮食、排便减少，肢端紫绀情况较前加重；第 14 天起出现不活动减少，呼吸急促，被毛松散蓬乱，饮食、排便减少，体质量明显减轻，肢端紫绀较前加重；第 21 天起大鼠稍有活动反应，呼吸急促，毛发有脱落，饮食、排便、体质量情况基本同前；第 28 天，大鼠动作反应迟钝、呼吸急促、肢端紫绀等情况较前有减轻，进食较前有增加。在整个观察期内，对照组无一死亡；模型组、双环醇低剂量和中剂量组分别死亡 7，9，8 只；双环醇高剂量组共计死亡 4 只。由于双环醇低剂量组和中剂量组生存率低，与模型组相比无明显差异，开展后续的研究意义不大。而高剂量组和模型组生存率相比有明显差异($P<0.05$)，故采用对照组、模型组和双环醇高剂量组(双环醇组)继续下一步实验。体质

量和生存率结果见图 1 和表 2。

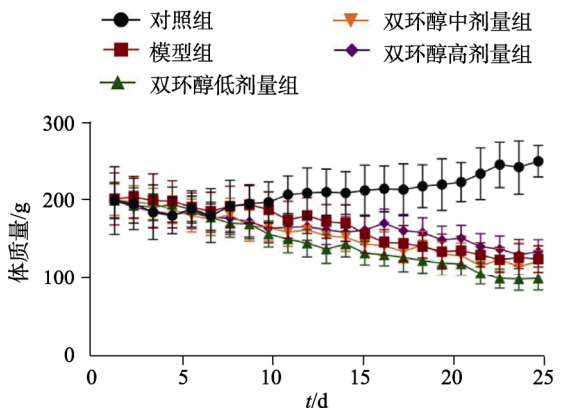

图 1 5 组大鼠体质量变化结果

Fig. 1 Changes of body mass of rats in five groups

表 2 5 组大鼠生存率

Tab. 2 Survival rate of rats in five groups

组别	生存率/%			
	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	100	100	100	100
模型组	50	50	30	30[1)]
双环醇低剂量组	90	50	30	10[1)3)]
双环醇中剂量组	80	60	40	20[1)3)]
双环醇高剂量组	80	60	60	60[1)2)]

注：与对照组相比，[1)]P<0.01；与模型组相比，[2)]P<0.05；与双环醇高剂量组相比，[3)]P<0.05。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.05; compared with the high dose of bicyclol group, [3)]P<0.05.

3.2 大鼠肺组织病理变化

3 组大鼠均在灌胃后 28 d 取肺组织行 HE 染色和 Masson 三联染色，肺组织染色结果显示：对照组大鼠肺组织结构清晰，肺泡腔透亮，肺泡结构完整，肺泡壁未见明显增厚，无水肿及炎性细胞浸润，未见蓝色胶原沉积；模型组大鼠肺组织可见少量炎症细胞浸润，肺泡结构破坏、萎缩或消失，纤维组织呈斑片状分布，肺间质出现大量的蓝色胶原沉积；双环醇高剂量组(双环醇组)大鼠肺泡腔和肺间质有炎性细胞浸润，肺泡间隔增厚，有纤维结缔组织增生，肺泡腔变窄，肺间质有少量蓝色胶原沉积，结果见图 2。

3.3 大鼠肺纤维化 Ashcroft 评分及肺泡间隔厚度测定

3 组大鼠分别行肺组织纤维化 Ashcroft 评分和肺泡间隔厚度测定，将双环醇高剂量组(双环醇组)分别与对照组、模型组相比较，大鼠肺纤维化 Ashcroft 评分及肺泡间隔厚度测定均有显著性差异(P<0.01)。结果见表 3。

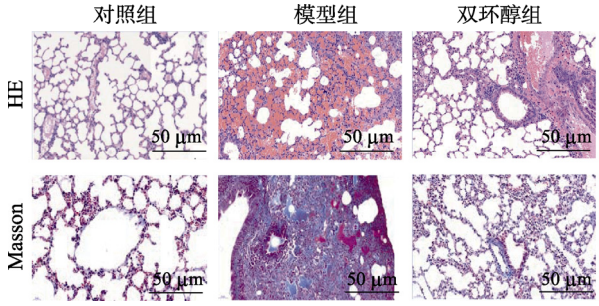

图 2 3 组大鼠肺组织病理(200×)

Fig. 2 Lung tissue pathology of rats in three groups(200×)

表 3 肺纤维化 Ashcroft 评分及肺泡间隔厚度评分($\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 3 Pulmonary fibrosis ashcroft scoring and alveolar septal thickening measurement($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	肺纤维化 Ashcroft 评分	肺泡间隔程度评分
对照组	0.38±0.07	0.77±0.11
模型组	5.52±0.21[1)]	56.13±2.33[1)]
双环醇组	4.25±0.08[1)2)]	45.60±1.70[1)2)]

注：与对照组相比，[1)]P<0.01；与模型组相比，[2)]P<0.01。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with the model group, [2)]P<0.01.

3.4 免疫组化结果分析

免疫组化分析结果显示，模型组 Bax 水平较对照组明显升高(48.85±9.86，P<0.01)，经双环醇处理后 Bax 较模型组对照明显降低(15.38±1.74，P<0.01)。模型组 Bcl-2 较对照组水平降低(0.49±0.04，P<0.01)，经双环醇处理后 Bcl-2 较模型组升高(0.95±0.04，P<0.01)。结果见图 3~4。

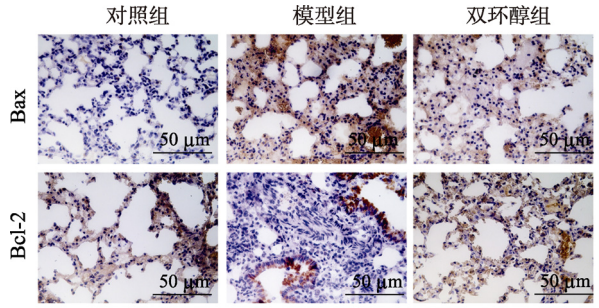

图 3 3 组大鼠肺组织 Bcl-2、Bax 的表达(Envision 二步法，200×)

Fig. 3 Expression of Bcl-2 and Bax in lung tissue of rats in three groups(Envision two-step method, 200×)

3.5 Western blotting 检测结果分析

模型组 Bax、cleaved caspase 3 水平较对照组升高(1.79±0.10 和 1.75±0.11，P<0.01)，经双环醇

处理后 Bax、cleaved caspase 3 水平较模型组明显降低(0.94±0.10 和 0.62±0.06，$P<0.01$)；模型组 Bcl-2 较对照组水平降低(0.34±0.03，$P<0.01$)，经双环醇组处理后较模型组明显升高(0.98±0.08，$P<0.01$)。结果见图 5。

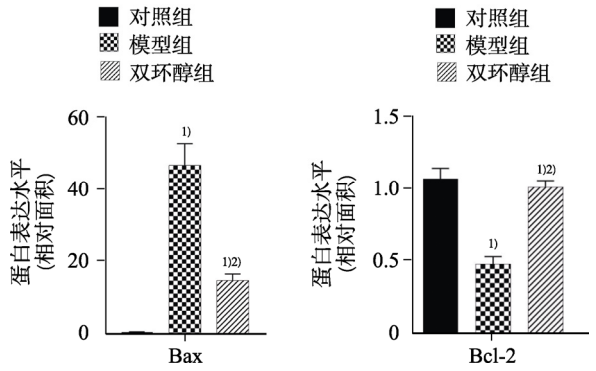

图 4 3 组大鼠肺组织 Bcl-2 和 Bax 的半定量分析($\bar{x}\pm s$，n=3)

与对照组相比，[1]$P<0.01$；与模型组相比，[2]$P<0.01$。

Fig. 4 Semi-quantitative analysis of Bcl-2 and Bax in lung tissue of rats in three groups($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the control group, [1]$P<0.01$; compared with the model group, [2]$P<0.01$.

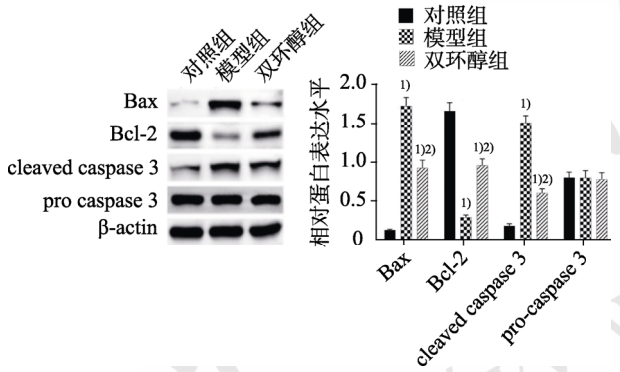

图 5 Western blotting 检测 3 组 Bcl-2、Bax、pro-caspase 3 和 cleaved caspase 3 的表达($\bar{x}\pm s$，n=3)

与对照组相比，[1]$P<0.01$；与模型组相比，[2]$P<0.01$。

Fig. 5 Expression of Bcl-2, Bax, pro-caspase 3 and cleaved caspase 3 of three groups detected by Western blotting($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the control group, [1]$P<0.01$; compared with the model group, [2]$P<0.01$.

3.6 qRT-PCR 检测结果分析

模型组 Bax、cleaved caspase 3 水平较对照组明显升高(6.05±0.52 和 4.39±0.36，$P<0.01$)，经双环醇处理后 Bax、cleaved caspase 3 水平较模型组明显降低(2.61±0.55 和 1.32±0.13，$P<0.01$)；模型组 Bcl-2 水平较对照组明显降低(0.38±0.02，$P<0.01$)，经双环醇组处理后较模型组明显升高(0.61±0.04，$P<0.01$)。结果见图 6。

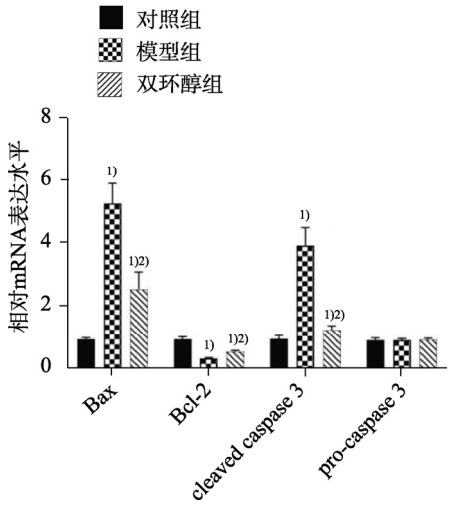

图 6 qRT-PCR 检测各组大鼠肺组织中 Bcl-2、Bax、pro-caspase 3 和 cleaved caspase 3 的表达($\bar{x}\pm s$，n=3)

与对照组相比，[1]$P<0.01$；与模型组相比，[2]$P<0.01$。

Fig. 6 Expression of Bcl-2, Bax, pro-caspase 3 and cleaved caspase 3 in rats' lung tissue of three groups deteted by qRT-PCR($\bar{x}\pm s$, n=3)

Compared with the control group, [1]$P<0.01$; compared with the model group, [2]$P<0.01$.

4 讨论

博来霉素诱导肺纤维化是目前应用最为广泛的动物模型[9]，无论在病理学及肺功能改变方面，均与肺纤维化类似。本实验模型组大鼠肺组织病理切片 HE 染色及 Masson 染色显示肺泡炎及肺泡结构破坏，纤维组织呈斑片状分布，同时伴有肺间质显著的胶原纤维沉积，与肺纤维化的病理特征相一致[10]，显示造模成功。

双环醇是在联苯双酯的基础上，经结构改造和筛选得到的国家 I 类抗肝炎新药[11]。近年来，临床应用发现慢性肝炎患者在长期服用双环醇的过程中具有预防或治疗肝纤维化的作用[12]。进一步研究发现，双环醇具有清除氧自由基、抑制肝细胞凋亡、保护线粒体、促进肝脏解毒等药理作用，对多种类型的肝损伤具有保护作用[13]。研究发现，肺纤维化与细胞凋亡关系密切，提示干预细胞凋亡是治疗肺纤维化的重要措施之一[14]。因此，通过借鉴双环醇的作用机制，本实验采用了双环醇干预大鼠肺纤维化的治疗方法。其次，对于双环醇的给药剂量，课题组根据其临床用量换算及预实验结果，分别对造模成功的肺纤维化大鼠灌胃不同浓度的双环醇(50，100，150 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)，每天 1 次，总共 28 d，观察 5 组大鼠的一般情况及死亡率，并做了相关生存率分析，发现 150 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 的双环醇大鼠一般情况较好，生存率最高，而

50 mg·kg^{-1}·d^{-1} 和 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} 的双环醇大鼠死亡率较高，与模型组相比无明显差异。因此推测 150 mg·kg^{-1}·d^{-1} 为肺纤维化大鼠使用双环醇的最佳剂量，并于双环醇高剂量组开展后续实验。实验结果显示双环醇高剂量组大鼠肺泡结构的破坏以及肺间质的蓝色胶原沉积均较模型组明显减少，而且肺纤维化Ashcroft评分及肺泡间隔厚度评分均有显著性降低，显示双环醇可有效抑制博来霉素诱导的大鼠肺纤维化。

近年研究发现细胞凋亡在肺纤维化的进程中起着重要的作用，支气管、肺泡上皮细胞凋亡过度，成纤维细胞凋亡受抑而增殖过度，促进肺纤维化的发生和发展。Bcl-2 家族在细胞凋亡调控中起着重要作用，Bcl-2 和 Bax 分别是 Bcl-2 家族中最具代表性的抑凋亡和促凋亡基因[15]。Bcl-2 可与 Bax 形成异二聚体并使之失活，因此 Bcl-2 可能是决定细胞对凋亡刺激信号的敏感性的重要因素之一[16]。Caspase 家族是凋亡发生和调控机制中最重要的组成部分，caspase-3 是凋亡通路中的关键效应蛋白[17]。其中 pro-caspase 3 是活化的 cleaved caspase 3 的前体，cleaved caspase 3 活化后可促进细胞凋亡。大量研究报道，Bcl-2 可作用在 caspase-3 激活的上游，通过抑制 caspase-3 激活而发挥作用[18-19]。本实验中模型组 Bax、cleaved caspase 3 水平升高，Bcl-2 水平降低，经双环醇处理后，三者相反。这与 Plataki 等[20]报道一致，提示 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase 3 在肺纤维化过程中发挥着重要作用，双环醇可能通过干预 Bcl-2、Bax 和 cleaved caspase 3 影响细胞凋亡改善肺纤维化。

因此，通过以上的实验研究，笔者发现如果能够抑制肺上皮细胞凋亡和成纤维细胞的增殖，就有希望在治疗肺纤维化方面取得进展。本实验结果显示双环醇对博来霉素诱导大鼠肺纤维化具有明显的保护作用，其作用机制可能与调节细胞凋亡信号通路中的靶点相关。但是本实验在很多方面还不够完善，虽然双环醇高剂量组作用最明显，但其最佳给药剂量范围仍有待进一步研究；其抗肺纤维化的机制有待更深入的探索；而且肺纤维化的发生发展是一个错综复杂的过程，其有效信号通路和靶点也有待进一步明确。

REFERENCES

[1] CHEN Q, HUANG W H, SHEN Z R, et al. Research progress of epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(9): 1155-1160.

[2] LEDERER D J, MARTINEZ F J. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2018, 378(19): 1811-1823.

[3] GU Y, ZHAO J, YAO X M, et al. Effects of bicyclol on immunological liver fibrosis in rats[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(5): 388-398.

[4] THRALL R S, MCCORMICK J R, JACK R M, et al. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: Inhibition by indomethacin[J]. Am J Pathol, 1979, 95(1): 117-130.

[5] 丁军红. 布地奈德吸入治疗慢性阻塞性肺疾病急性发作临床观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(5): 491-492.

[6] LOVGREN A K, JANIA L A, HARTNEY J M, et al. COX-2-derived prostacyclin protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(2): L144-L156.

[7] BELLER T C, FRIEND D S, MAEKAWA A, et al. Cysteinyl leukotriene 1 receptor controls the severity of chronic pulmonary inflammation and fibrosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(9): 3047-3052.

[8] GAUTAM A, KOSHKINA N. Paclitaxel(taxol) and taxoid derivates for lung cancer treatment: Potential for aerosol delivery[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3(4): 287-296.

[9] 徐卫华, 沈华浩. 肺泡巨噬细胞合成转化生长因子 β1 在慢性阻塞性肺疾病气道重塑中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(1): 57-58.

[10] MICHAŁ Z, PIOTR S, DARIUSZ Z. Idiopathic pulmonary fibrosis coexisting with lung cancer - a review[J]. 2018, Online ahead of print. Doi: 10.5603/ARM.a2018.0052.

[11] ZHANG J T. New drugs derived from medicinal plants[J]. Therapie, 2002, 57(2): 137-150.

[12] CHI X L, XIAO H M, SHI M J, et al. Histological improvement in chronic hepatitis B patients treated with bicyclol: Real world experience[J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1): 88.

[13] TANG Y, HU W, LI Y, et al. Synthesis of metabolites of bicyclol[J]. Acta Pharm Sin, 2007, 42(10): 1054-1057.

[14] HOHMANN M S, HABIEL D M, COELHO A L, et al. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis *in vivo*[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2019, 60(1): 28-40.

[15] SAFAEIAN L, ABED A, VASEGHI G. The role of Bcl-2 family proteins in pulmonary fibrosis[J]. Eur J Pharmacol, 2014(741): 281-289.

[16] SAFAEIAN L, JAFARIAN A, RABBANI M, et al. The role of strain variation in BAX and BCL-2 expression in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Pak J Biol Sci, 2008, 11(23): 2606-2612.

[17] GARG A D, NOWIS D, GOLAB J, et al. Photodynamic therapy: Illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity[J]. Apoptosis, 2010, 15(9): 1050-1071.

[18] FAN X R, XI H M, ZHANG Z, et al. Germ cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in porcine testis under normal and heat stress conditions[J]. Acta Histochem, 2017, 119(3): 198-204.

[19] LIU Z, DING Y, YE N, et al. Direct activation of Bax protein for cancer therapy[J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 313-341.

[20] PLATAKI M, KOUTSOPOULOS A V, DARIVIANAKI K, et al. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2005, 127(1): 266-274.

收稿日期：2020-11-16

(本文责编：李艳芳)