

[文章编号] 1000-4718(2009)04-0708-07

## 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的 动态病理变化及其发生机制\*

金晓光, 代华平<sup>△</sup>, 庞宝森, 牛淑洁, 李雪, 吕彧, 王辰<sup>△</sup>

(首都医科大学附属北京朝阳医院-北京呼吸疾病研究所, 北京 100020)

**[摘要]** 目的: 了解博来霉素(BLM)致大鼠肺纤维化模型肺组织的动态病理变化, 探讨 BLM 致肺纤维化的作用机制。方法: 60 只雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常对照组(N 组)和肺纤维化模型组(B3、B7、B14、B28、B56 组), 每组 10 只。除 N 组外, 其余各组采用气管内注入 BLM 致大鼠肺纤维化模型, 分别于 3、7、14、28、56 d 处死各组大鼠, 右肺行苏木精-依红(HE)、Masson 胶原及天狼猩红染色, 测定左肺羟脯氨酸(HYP)的含量。RT-PCR 法半定量测定转化生长因子-1(TGF- $\beta_1$ )、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制物-1(TIMP-1)mRNA 在肺内的表达。免疫组化法观察 TGF- $\beta_1$ 、MMP-9 及 TIMP-1 蛋白在大鼠肺组织的表达。结果: (1) 模型组大鼠肺组织 HYP 含量显著高于 N 组( $P < 0.05$ ), 模型组大鼠肺组织肺泡炎症的程度也明显重于 N 组, B14、B28 和 B56 组大鼠肺纤维化的程度明显重于 N 组, 大鼠在灌注 BLM 后不同时间其肺组织有着不同的病理变化。(2) TGF- $\beta_1$ 、MMP-9 及 TIMP-1 在正常组大鼠肺脏中即有表达, 但表达较弱, 灌注 BLM 后它们的表达均增强, 不同时间它们在肺组织内的分布有不同的特点。结论: 给予后不同时间大鼠肺组织有着不同的病理变化特点, TGF- $\beta_1$ 、MMP-9 和 TIMP-1 在 BLM 诱导的肺纤维化形成过程中起着重要的调节作用。

**[关键词]** 博来霉素; 肺纤维化; 转化生长因子 $\beta$ ; 基质金属蛋白酶-9; 金属蛋白酶 1 组织抑制剂

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

### Kinetics of pathologic changes in bleomycin - induced murine pulmonary fibrosis model

JIN Xiao-guang, DAI Hua-ping, PANG Bao-sen, NIU Shu-jie, LI Xue, LÜ Yu, WANG Chen

(Beijing Institute of Respiratory Medicine, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020, China. E-mail: daihuaping@sina.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the kinetics of pathologic changes in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **METHODS:** Sixty male SD rats were randomized as a negative control group and pulmonary fibrosis model groups (B3, B7, B14, B28, B56 sub-groups). Except for control group, rats in the other groups were intratracheally administered with bleomycin. Animals in pulmonary fibrosis model groups were sacrificed on day 3, 7, 14, 28 and 56. The sections of the right lung were stained by HE, Masson and sirius red. The left lung was weighed and its hydroxyproline content was assayed. The mRNAs of TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 in the lung homogenate were measured by semi-quantitative RT-PCR. The expressions of TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 in lungs were observed by immunohistochemistry. **RESULTS:** (1) The content of lung hydroxyproline in pulmonary fibrosis model groups was significantly increased than that in control group ( $P < 0.05$ ). The pulmonary inflammation in pulmonary fibrosis model groups was significantly serious than that in control group, pulmonary fibrosis in B14, B28 and B56 groups was also significantly serious than that in control group. (2) A small quantity of TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 mRNA were measured in normal lung, and the expression increased significantly after administration of bleomycin. Different expressions of TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 in different days after bleomycin administration were observed. **CONCLUSION:** The pathological changes in different days after bleomycin administration are different. TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 may play important roles in the pathogenesis of pulmonary fibrotic process.

[收稿日期] 2008-04-08 [修回日期] 2008-10-22

\* [基金项目] 北京市自然科学基金资助项目 (No. 7082037)

<sup>△</sup>通讯作者 Tel: 010-85231302; E-mail: daihuaping@sina.com

[KEY WORDS] Bleomycin; Pulmonary fibrosis; Transforming growth factor beta; Metalloproteinase -9; Tissue - inhibitor of metalloproteinase -1

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种原因不明的弥漫性肺疾病。主要表现为弥漫性肺泡炎、肺泡单位结构紊乱和肺纤维化, 最终导致肺脏结构和功能的严重破坏, 目前其发病机制尚未完全阐明。研究发现经气管内灌注博来霉素 (bleomycin, BLM) 可以造成大鼠肺纤维化, 此病理过程与人类特发性肺纤维化的病理过程极其相似, 因此, 对 BLM 致大鼠肺纤维化发生不同阶段的肺组织病理改变及不同细胞因子的表达进行研究, 可以探讨肺纤维化在 IPF 不同阶段的发生机制, 从而为临床制定有效的治疗策略提供理论和实验依据。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

雄性 Sprague - Dawley 大鼠购自北京通利华实验动物技术有限公司。BLM A<sub>5</sub> 粉剂系日本化药株式会社产品。反转录试剂盒 RNA PCR kit (AMV) Ver. 3.0 为 TaKaRa 产品。转化生长因子 -1 (transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF -  $\beta_1$ )、基质金属蛋白酶 -9 (metalloproteinase -9, MMP -9) 和基质金属蛋白酶组织抑制物 -1 (tissue inhibitor of metalloproteinase -1, TIMP -1) 抗体购自武汉博士德公司。羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

### 2 动物模型的建立、分组与标本处理

雄性 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体重 (295 ± 20) g, 采用随机数字表法分为正常对照组 (N 组) 和肺纤维化模型组 (B3、B7、B14、B28、B56 组), 每组 10 只。除 N 组外其余各组以 12% 乌拉坦腹腔内注射麻醉动物后, 在额镜直视下将硬脊膜外麻醉导管插入气管 1 - 2 cm, 观察到导管内液柱随动物呼吸而波动后, 按 5 mg/kg 缓慢注入 BLM 制作肺纤维化模型。模型组 (B3 - B56) 动物在气管内灌药后第 3、7、14、28、56 d 处死, 分离肺组织, 称肺重, 右中叶置于 10% 中性甲醛固定制备石蜡切片供组织学检查 (HE 染色、Masson 染色和天狼猩红染色) 及免疫组化; 其余肺组织投入液氮中保存备做 RT - PCR。

### 3 肺系数的计算

肺系数是反映肺重与体重之间关系的一个指标, 计算方法为: 肺系数 = (肺重/体重) × 100 (g/g)。

### 4 肺组织羟脯氨酸含量测定

将肺组织在液氮中捣成粉末, 按 100 mg 粉末加入 1 mL 生理盐水的比例制备组织匀浆, 按说明书方

法用碱水解法测定肺组织羟脯氨酸浓度。

### 5 肺泡炎症、肺纤维化程度判断

右肺石蜡切片进行 HE、Masson 及天狼猩红染色, 在光学显微镜下观察肺组织病理学改变。参照 Szapiel 等<sup>[1]</sup>的方法用 HE 染色评定肺组织肺泡炎症程度 (- ~ +++), Masson 染色评定肺组织纤维化程度 (- ~ +++), 天狼猩红偏光法显示 I、III 型胶原纤维。

### 6 RT - PCR 检测肺组织 TGF - $\beta_1$ 、MMP - 9 及 TIMP - 1 mRNA 片段

6.1 肺组织总 RNA 的提取 按试剂盒说明书步骤操作。

6.2 TGF -  $\beta_1$  mRNA 片段的扩增 上游引物 5' - AGC TCC ACA GAG AAG AAC TGC - 3' 下游引物 5' - TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC - 3', 扩增片段长 289 bp。按下列条件进行反应: 42 °C 逆转录 30 min, 94 °C 预变性 3 min, 然后进入 PCR 循环: 94 °C 30 s, 52 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 18 个循环最后 72 °C 7 min。

6.3 MMP - 9 mRNA 片段的扩增 上游引物 5' - AGC ACG GCA ACG GAG AAG G - 3', 下游引物 5' - GTC GGC TGT GGT TCA GTT GTG G - 3', 扩增片段长 545 bp。按下列条件进行反应: 42 °C 逆转录 30 min, 94 °C 预变性 5 min, 然后进入 PCR 循环: 94 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 45 s, 共 25 个循环, 最后 72 °C 10 min。

6.4 TIMP - 1 mRNA 片段的扩增 上游引物 5' - TCT TCA CTG CGG TTC TGG - 3', 下游引物 5' - TGG CAT CTG GCA TCC TCT - 3', 扩增片段长 295 bp。按下列条件进行反应: 42 °C 逆转录 30 min, 94 °C 预变性 5 min, 然后进入 PCR 循环: 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 16 个循环, 再 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 10 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。

6.5 PCR 扩增产物 在含溴化乙啶的 2% 琼脂糖凝胶上电泳, 90 mV 恒流 45 min, 在紫外检测仪下将凝胶拍成黑白照片。用凝胶成像仪扫描分析, 将每个样本的 TGF -  $\beta_1$ 、TIMP - 1 及 MMP - 9 的 DNA 扩增条带吸光度值与相应的  $\beta_2$  - 微球蛋白的 DNA 扩增条带吸光度的比值 (e/c) 作为其 mRNA 水平的相对定量指标。

### 7 免疫组化法检测肺组织 TGF - $\beta_1$ 、MMP - 9 及 TIMP - 1 蛋白表达

肺组织石蜡切片常规脱蜡至水, 然后按免疫组化试剂盒说明书进行操作。

### 8 统计学处理

采用 SPSS11.5 版统计软件,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,等级资料转化为计量资料,-为0分,+为1分,++为2分,+++为3分。对各组数据进行单因素方差分析和组间比较(方差齐用 LSD 检验,不齐用 Games - Howell 检验)。

## 结 果

### 1 各组大鼠肺重量、肺系数及肺组织 HYP 含量的

表 1 各组大鼠肺重量、肺系数与肺组织 HYP 含量的动态变化以及肺泡炎症和肺纤维化程度的比较

Tab 1 Comparison of body weight, lung - to - body weight ratio, HYP content in lung tissue, pulmonary inflammation and pulmonary fibrosis in each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Body weight(g)	Lung/body weight ratio(g/g)	HYP(mg/g)	Pulmonary inflammation	Pulmonary fibrosis
Control	1.47 ± 0.07	0.34 ± 0.09	1.25 ± 0.20	1.10 ± 0.32	1.23 ± 0.38
B3	2.61 ± 0.14 <sup>▲</sup>	0.96 ± 0.07 <sup>▲</sup>	1.63 ± 0.25 <sup>▲</sup>	2.06 ± 0.60 <sup>▲</sup>	1.50 ± 0.51
B7	3.16 ± 0.24 <sup>▲</sup>	1.25 ± 0.08 <sup>▲</sup>	2.02 ± 0.27 <sup>▲</sup>	3.28 ± 0.62 <sup>▲</sup>	1.65 ± 0.47
B14	2.55 ± 0.17 <sup>▲</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>▲</sup>	2.30 ± 0.21 <sup>▲</sup>	3.03 ± 0.54 <sup>▲</sup>	2.85 ± 0.69 <sup>▲</sup>
B28	2.40 ± 0.16 <sup>▲</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>▲</sup>	2.62 ± 0.32 <sup>▲</sup>	2.85 ± 0.50 <sup>▲</sup>	3.25 ± 0.50 <sup>▲</sup>
B56	2.11 ± 0.14 <sup>▲</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>▲</sup>	2.17 ± 0.35 <sup>▲</sup>	2.11 ± 0.38 <sup>▲</sup>	2.94 ± 0.55 <sup>▲</sup>

<sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs control group. Control group: not intratracheally administrated bleomycin; pulmonary fibrosis model groups: intratracheally administrated bleomycin; B3, B7, B14, B28, B56 sub - groups: sacrificed on 3 d, 7 d, 14 d, 28 d and 56 d.

### 2 各组大鼠肺组织的病理学改变

N 组大鼠肺脏外观大致正常,镜下未见炎症细胞浸润和肺实质胶原沉积。模型组大鼠第 3 d 时肺脏外观与 N 组无明显区别,镜下表现为部分区域炎症细胞渗出,肺泡间隔增宽。第 7 d 时外观明显肿胀,镜下示肺泡间隔明显增宽变形,肺泡间隔和肺泡腔内重度炎性细胞浸润,以单核/巨噬细胞为主,大部分形成炎症灶,成纤维细胞增多,病灶内已出现肺泡萎缩,Masson 染色可见少量胶原纤维被染成蓝色,天狼猩红染色也发现少量 I 型和 III 型胶原纤维分别被染成亮红色和亮绿色。第 14 d 时外观呈灰白色,肿胀部分消退,局部可见大小不等的结节样改变,弹性差,镜下肺泡间隔仍明显增厚,炎性细胞浸润亦较明显,成纤维细胞明显增多并可见较多的纤维组织增生,部分肺泡结构消失,Masson 染色可见较多量染成蓝色的胶原纤维,天狼猩红染色也发现较多的胶原纤维,以亮红色的 I 型胶原纤维为主,其外周肺实质炎症与第 7 d 相比有所吸收。第 28 d 时外观呈苍白色,肿胀已基本消退,体积缩小,弹性更差,硬度增加,表面呈结节样改变并可见条索状凹沟,镜下可见肺泡结构破坏,成纤维细胞大量增生,纤维组织呈条索样瘢痕改变,斑片状分布,但外周肺实质炎症有进一步的吸收,Masson 染色时蓝色胶原纤维明显增多,天狼猩红染色发现 I 型胶原成分比 14 d 明显增

### 变化以及肺泡炎症和肺纤维化程度的比较

模型组的羟脯氨酸含量从第 3 d 开始即显著地高于 N 组,直到 56 d 仍明显高于 N 组( $P < 0.05$ )。在 BLM 处理后第 3 d 模型组的动物开始出现肺泡炎症,7 d 时肺泡炎症明显加重,56 d 时肺泡炎症程度明显减轻,但仍明显高于对照组。模型组动物的肺内纤维化程度呈进行性加重,28 d 时最为严重,56 d 时程度又有所下降,其从第 14 d 到 56 d 与 N 组比较均有显著差异,见表 1。

多且更加致密,肺实质炎性细胞浸润较前减少。第 56 d 时外观与 28 d 相似,镜下仍见肺泡结构紊乱并出现了较多量的呈片状分布的瘢痕条索,成纤维细胞较 28 d 时明显减少,外周肺实质炎症仍在吸收,只在中央气道和大血管周围可见一些炎性细胞,Masson 染色可见多量致密被染成蓝色的胶原纤维,天狼猩红染色可见 I 型胶原成分仍量多且致密。

### 3 免疫组化法测 TGF - $\beta_1$ 、MMP - 9 和 TIMP - 1 在大鼠肺组织内的分布

3.1 TGF -  $\beta_1$  在大鼠肺组织内的分布 TGF -  $\beta_1$  在正常组大鼠肺组织内即广泛表达于气道上皮、血管内皮、肺泡巨噬细胞等各种组织细胞及肺内间质。灌注 BLM 后其表达增强,不同时点它在肺组织内的分布有不同的特点。

3.2 MMP - 9 在大鼠肺组织内的分布 MMP - 9 在正常组大鼠肺组织内表达很弱。灌注 BLM 后表达增强,其主要表达于支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞及肺内间质。不同的时点它在肺组织内的分布也有不同的特点。

3.3 TIMP - 1 在大鼠肺组织内的分布 TIMP - 1 在正常组大鼠肺组织内表达较弱。灌注 BLM 后表达增强,其主要表达于支气管上皮细胞、肺泡巨噬细胞及肺内间质。不同的时点它在肺组织内的分布也有不同的特点。

表 2 TGF-β<sub>1</sub> 在各组大鼠肺组织内的分布

Tab 2 TGF-β<sub>1</sub> protein expression in lung tissue of rats in each group (n = 10)

Group	TGF-β <sub>1</sub>				
	Alveolar epidermis cells	Vascular endothelial cells	Bronchiolar epithelial cells	Interstitial	Alveolar macrophages
Control	- ~ ±	± ~ +	± ~ +	- ~ ±	± ~ +
B3	± ~ +	+	+	- ~ ±	+
B7	+ ~ ++	+	++ ~ +++	+	++ ~ +++
B14	+	+ ~ ++	++ ~ +++	+ ~ ++	+ ~ ++
B28	± ~ +	+	+ ~ ++	++ ~ +++	± ~ +
B56	- ~ ±	- ~ ±	± ~ +	+ ~ ++	± ~ +

表 3 MMP-9 在各组大鼠肺组织内的分布

Tab 3 MMP-9 protein expression in lung tissue of rats in each group (n = 10)

Group	MMP-9				
	Alveolar epidermis cells	Vascular endothelial cells	Bronchiolar epithelial cells	Interstitial	Alveolar macrophages
Control	- ~ ±	- ~ ±	± ~ +	- ~ ±	- ~ ±
B3	± ~ +	+ ~ ++	+ ~ ++	± ~ +	+ ~ ++
B7	+ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++
B14	+ ~ ++	+	+ ~ ++	++ ~ +++	+ ~ ++
B28	± ~ +	- ~ ±	± ~ +	± ~ +	± ~ +
B56	- ~ ±	- ~ ±	± ~ +	± ~ +	- ~ ±

表 4 TIMP-1 在各组大鼠肺组织内的分布

Tab 4 TIMP-1 protein expression in lung tissue of rats in each group (n = 10)

Group	TIMP-1				
	Alveolar epidermis cells	Vascular endothelial cells	Bronchiolar epithelial cells	Interstitial	Alveolar macrophages
Control	- ~ ±	- ~ ±	± ~ +	- ~ ±	- ~ ±
B3	± ~ +	± ~ +	+ ~ ++	± ~ +	± ~ +
B7	± ~ +	± ~ +	++ ~ +++	+ ~ ++	+ ~ ++
B14	+	+	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++
B28	+ ~ ++	+ ~ ++	++ ~ +++	++ ~ +++	++ ~ +++
B56	± ~ +	± ~ +	+ ~ ++	+ ~ ++	+ ~ ++

#### 4 大鼠肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 相对含量的比较

每组选取 8 个样本进行 RT-PCR 检测。灌注 BLM 后 TGF-β<sub>1</sub> 的表达于第 3 d 时增高,7 d 时达高峰,14 d 时持续高表达,以后逐渐下降,56 d 时基本达到正常水平。灌注 BLM 后 MMP-9 的表达于第 3 d 时增高,7 d 时达高峰,以后逐渐下降,到 28 d 及 56 d 时已基本达到正常水平。灌注 BLM 后 TIMP-1 的表达于第 3 d 时增高,以后仍逐渐上升,到 28 d 时达到高峰,56 d 有所下降,但仍明显高于正常组。

#### 讨 论

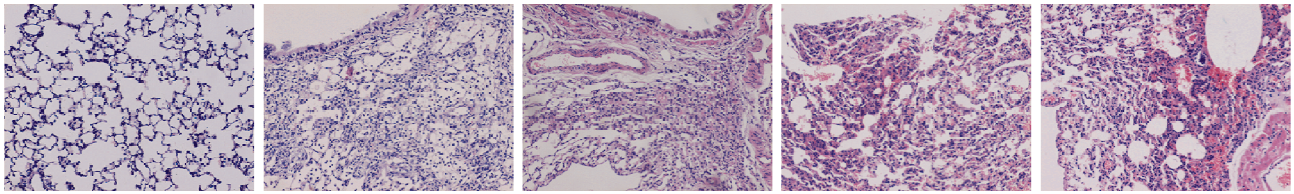
肺纤维化的病理特征是肺泡上皮的损伤和成纤

表 5 各组大鼠肺组织 TGF-β<sub>1</sub>、MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 的相对含量

Tab 5 mRNA expression of TGF-β<sub>1</sub>, MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue of rats in each group (e/c.  $\bar{x} \pm s$ . n = 8)

Group	TGF-β <sub>1</sub> mRNA	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA
Control	0.53 ± 0.07	0.41 ± 0.06	0.54 ± 0.07
B3	0.69 ± 0.12 <sup>▲</sup>	0.53 ± 0.03 <sup>▲</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>▲</sup>
B7	0.90 ± 0.11 <sup>▲</sup>	0.70 ± 0.06 <sup>▲</sup>	0.67 ± 0.08 <sup>▲</sup>
B14	0.81 ± 0.10 <sup>▲</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>▲</sup>	0.72 ± 0.06 <sup>▲</sup>
B28	0.70 ± 0.09 <sup>▲</sup>	0.47 ± 0.04	0.78 ± 0.07 <sup>▲</sup>
B56	0.58 ± 0.06	0.45 ± 0.05	0.66 ± 0.08 <sup>▲</sup>

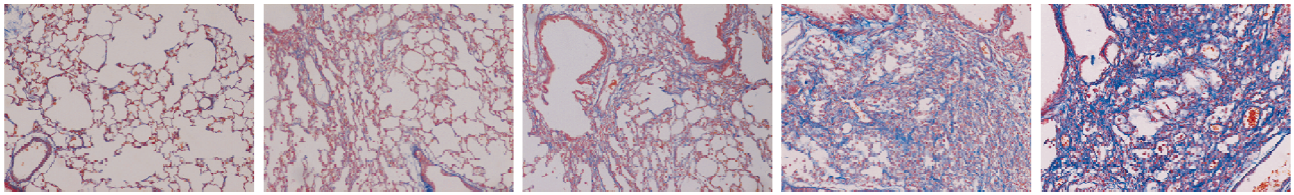
<sup>▲</sup>P < 0.05 vs control group.



Control group( $\times 200$ )      BLM 3 d( $\times 100$ )      BLM 7 d( $\times 100$ )      BLM 14 d( $\times 100$ )      BLM 28 d( $\times 100$ )

Fig 1 Histopathological changes of lung tissue in rat pulmonary fibrosis(HE staining).

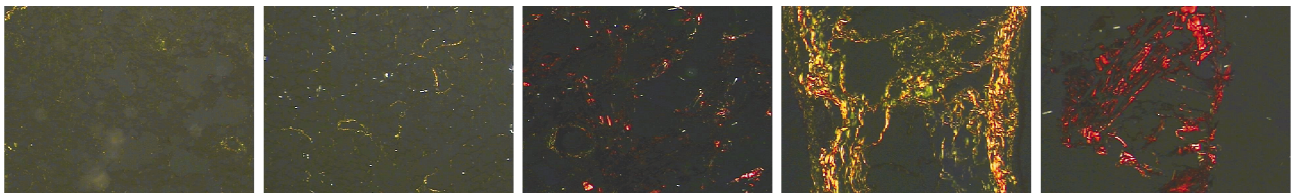
图 1 肺纤维化形成过程中大鼠肺组织病理学改变的动态变化



Control group( $\times 200$ )      BLM 7 d( $\times 200$ )      BLM 14 d( $\times 200$ )      BLM 28 d( $\times 200$ )      BLM 56 d( $\times 200$ )

Fig 2 Collagen deposition in lung tissue of rats during pulmonary fibrosis (Masson staining).

图 2 肺纤维化形成过程中大鼠肺组织胶原的动态变化



Control group( $\times 200$ )      BLM 7 d( $\times 200$ )      BLM 14 d( $\times 200$ )      BLM 28 d( $\times 400$ )      BLM 56 d( $\times 400$ )

Fig 3 Collagen deposition in lung tissue of rats during pulmonary fibrosis (sirius red staining).

图 3 肺纤维化形成过程中大鼠肺组织胶原的动态变化

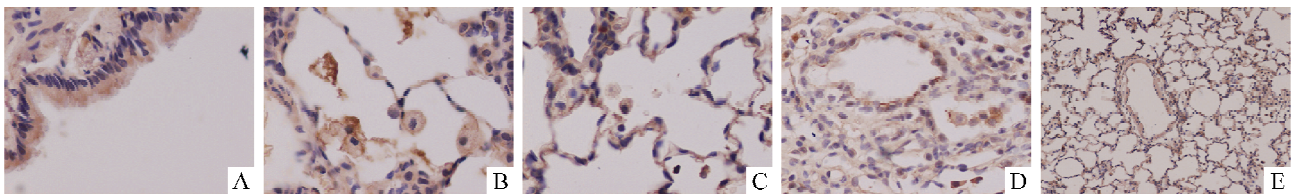


Fig 4 Immunohistochemical staining of  $TGF\beta_1$ , MMP-9 and TIMP-1 in lung tissue of rats during pulmonary fibrosis ( $\times 400$ ).  
A:  $TGF-\beta_1$  expression in bronchiolar epithelial cells; B:  $TGF-\beta_1$  expression in alveolar macrophages; C: MMP-9 expression in alveolar epidermis cells; D: TIMP-1 expression in interstitial; E: TIMP-1 expression in vascular endothelial cells.

图 4 肺纤维化形成过程中大鼠肺组织  $TGF-\beta_1$ 、MMP-9 和 TIMP-1 的免疫组化染色

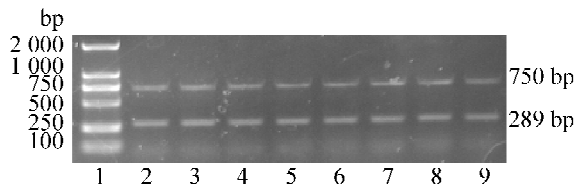


Fig 5 Expressions of  $TGF-\beta_1$  in lung tissue of rats in B7 group. 1:marker; 750 bp:  $\beta$ -actin; 289 bp:  $TGF-\beta_1$ ; 2,3,4,5,6,7,8,9:  $TGF-\beta_1$  in B7 group.

图 5 B7 组大鼠肺组织  $TGF-\beta_1$  mRNA 的 RT-PCR 扩增片段

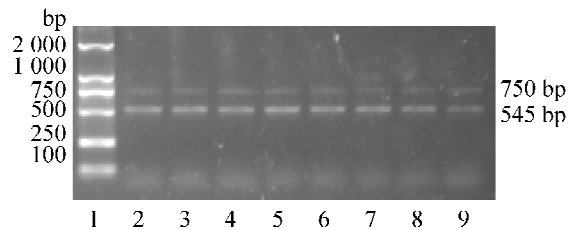


Fig 6 Expressions of MMP-9 in lung tissue of rats in B7 group. 1:marker; 750 bp:  $\beta$ -actin; 545 bp: MMP-9; 2,3,4,5,6,7,8,9: MMP-9 in B7 group.

图 6 B7 组大鼠肺组织 MMP-9 mRNA 的 RT-PCR 扩增片段

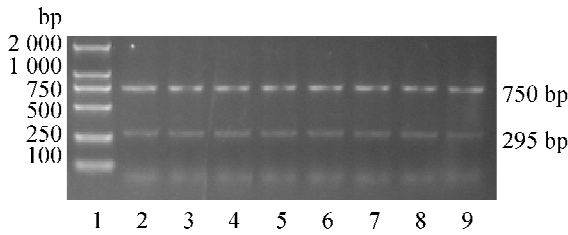


Fig 7 Expression of TIMP - 1 in lung tissue of rats in B28 group. 1; marker; 750 bp;  $\beta$  - actin; 295 bp; TIMP - 1; 2,3,4,5,6,7,8,9; TIMP - 1 in B28 group.

图7 B28组大鼠肺组织TIMP-1 mRNA的RT-PCR扩增片段

纤维细胞增殖。在早期肺泡巨噬细胞明显增多<sup>[2]</sup>。我们的实验结果显示:给予BLM后第3d大鼠肺脏即表现为炎症反应,此时炎症细胞渗出,肺泡间隔水肿、增宽,肺重量、肺系数及肺泡炎症评分较正常组均明显增加,第7d时炎症表现最为显著,第14d时成纤维细胞明显增多,并出现纤维组织增生,这时肺组织HYP含量和肺纤维化程度评分较正常组明显增加,到第28d时肺纤维化表现最为显著,这时Masson染色可见较多量染成蓝色的胶原纤维,天狼猩红染色也发现较多的胶原纤维,以亮红色的I型胶原纤维为主,说明BLM致肺纤维化大鼠其肺部早期以肺泡炎症改变为主,晚期则以肺间质纤维化为主。

纤维化过程包括上皮细胞基膜的破坏,间质细胞通过上皮细胞基膜的间隙进入肺泡腔以及肺泡腔内细胞外基质(ECM)的沉积。研究发现,多种细胞因子如白细胞介素13等参与了肺纤维化的进程<sup>[3]</sup>。TGF- $\beta_1$ 也是重要的调节因子,TGF- $\beta_1$ 可通过诱导细胞外基质聚集,在各种纤维增生代谢紊乱中具有核心作用。TGF- $\beta_1$ 还可刺激间质细胞的增生,形成大量的细胞外基质,造成组织纤维化。在肺纤维化病变中,TGF- $\beta_1$ 的含量也明显提高,但有关其在肺内的主要来源各家报道不一。我们的研究发现,TGF- $\beta_1$ 在正常肺组织即广泛存在于气道上皮、血管内皮、肺泡巨噬细胞等各种组织细胞及肺内间质,说明TGF- $\beta_1$ 参与一系列肺的正常生理过程。在气管内灌注BLM后3d其表达就出现升高,此时TGF- $\beta_1$ 主要分布在肺泡巨噬细胞,到第7d时达到高峰,这时肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞着色强度均达到强阳性反应,14d、28d虽较第7d下降,但仍呈较强的阳性表达,此时以支气管上皮细胞分布最广,到56d时表达已回落至基础水平,这时TGF- $\beta_1$ 的阳性表达主要存在于肺内间质,而肺泡巨噬细胞的阳性表达已接近正常水平,这表明肺泡巨噬细胞

是肺损伤早期TGF- $\beta_1$ 在肺内的主要来源,支气管上皮细胞对于肺纤维化的发生及进展期TGF- $\beta_1$ 的分泌过多起到了一定的作用,随着肺纤维化的发展进入纤维细胞大量增生阶段,大量的TGF- $\beta_1$ 阳性反应区分布在纤维化病灶内,这时成纤维细胞则是TGF- $\beta_1$ 的重要来源,对肺纤维化的持续进展发挥着重要作用,这与文献报道基本一致<sup>[4-8]</sup>。

另一调节细胞外基质沉积的重要物质是MMPs和TIMPs两大酶系统。MMPs的主要功能之一是降解基质,TIMPs的基本功能是特异性抑制MMPs活性。由于特发性肺纤维化的肺组织以表达MMP-9为主,TIMP-1又是MMP-9的抑制剂,我们对它们在BLM致肺纤维化大鼠肺组织中的分布表达情况进行了探讨。

我们发现MMP-9在正常肺组织表达较弱。在灌注BLM后3d时出现增高,7d时达到高峰,以后逐渐下降,28d及56d时基本降至正常水平。MMP-9主要表达于肺泡巨噬细胞,其次见于支气管上皮细胞及肺内间质的炎症细胞。肺泡巨噬细胞是肺脏主要的炎症效应细胞,这提示MMP-9的表达与肺脏炎症密切相关,说明在肺纤维化形成过程中,MMP-9在早期的损伤阶段参与了细胞外基质和基底膜的降解。TIMP-1在灌注BLM后3d时出现增高,以后随着时间的推移逐渐上升,到28d时仍持续高表达,56d有所下降,但仍明显高于正常组。TIMP-1在正常组大鼠肺组织内表达较弱,灌注BLM后主要表达于肺泡巨噬细胞、支气管上皮细胞及肺内间质,这与文献报道的由矽肺及石棉肺导致的肺纤维化中MMP-9和TIMP-1的表达相近<sup>[9,10]</sup>。我们还发现TIMP-1的分布部位与MMP-9极其相似,这提示两者具有共分泌的特性。TIMP-1表达的增强,一方面可以抑制MMP-9,使MMP-9溶解基质的范围局限在产MMP-9细胞的周围,起到保护基质的作用;另一方面可以引起MMP-9/TIMP-1比例失调,而MMP-9/TIMP-1比例失调可能是基质溶解胶原活性下降的原因,由此可导致胶原沉积,从而促进肺纤维化的发展。

虽然TIMP-1与MMP-9具有共分泌的特性,但TIMP-1的表达并不依赖MMP-9的表达。在BLM诱导的MMP-9基因敲除鼠中,MMP-9的基因缺乏并未引起TIMP-1的表达缺失,在BLM灌注后7-14d仍检测到了高水平的TIMP-1mRNA<sup>[11]</sup>,这说明MMP-9与TIMP-1的表达并不平行,而是

肺内多种因素共同作用的结果,它们在肺纤维化发生发展的不同阶段发挥作用,决定肺纤维化的进程。

### [参 考 文 献]

- [1] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin - induced interstitial pulmonary diseases in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120 (4) : 893 - 899.
- [2] 陈晓玲, 黄善生, 李文斌, 等. 大鼠肺纤维化形成中肺巨噬细胞增殖和凋亡的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(3) : 433 - 436.
- [3] 肖莉, 敖然, 李振华, 等. 重组白细胞介素 13 促进成纤维细胞增殖及胶原合成[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8) : 1579 - 1583.
- [4] Phan SH, Kunkel SL. Lung cytokine production in bleomycin - induced pulmonary fibrosis[J]. *Exp Lung Res*, 1992, 18(1) : 29 - 43.
- [5] Raghov B, Irish P, Kang AH. Coordinate regulation of transforming growth factor - beta gene expression and cell proliferation in hamster lungs under going bleomycin - induced pulmonary fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 1989, 84 (6) : 1836 - 1842.
- [6] Baecher - Allan CM, Barth RK. PCR analysis of cytokine induction profiles associated with mouse strain variation in susceptibility to pulmonary fibrosis [J]. *Reg Immunol*, 1993, 5(3 - 4) : 207 - 217.
- [7] Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor -  $\beta$  expression in bleomycin - induced pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 1955, 147 (2) : 352 - 361.
- [8] 靳长俊, 辛洪涛, 林殿杰, 等. 芪丹颗粒剂对大鼠肺纤维化模型的干预作用及对 TGF -  $\beta_1$ 、TNF -  $\alpha$  表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4) : 814 - 817、820.
- [9] Perez - Ramas J, De Lourdes, Segura - Vanda M, et al. Matrix metalloproteinases 2, 9 and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(4) : 1274 - 1282.
- [10] Tan RJ, Fattman CL, Niehouse LM, et al. Matrix metalloproteinases promote inflammation and fibrosis in asbestos - induced lung injury in mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 35(3) : 289 - 297.
- [11] Betsuyaku T, Fukuda Y, Parks WC, et al. Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin[J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(2) : 525 - 535.

## 骨髓细胞血管内皮细胞生长因子缺失加速肿瘤的生成

血管生成和血管网的生长是肿瘤演进所必需的条件,它们参与血管生成因子的释放,包括恶性细胞和基质细胞所释放的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF - A)。骨髓系细胞的浸润是多数肿瘤的标志,其中巨噬细胞是主要的浸润细胞,大多数情况下巨噬细胞表达 VEGF - A。研究表明,炎症细胞来源的 VEGF - A 的缺失减少了典型高密度血管网的形成,因而阻断了小鼠实体肿瘤的“血管生成开关”。在野生型小鼠中,随着肿瘤的演进,血管密度和长度有所增加,血管扭曲增大,而在缺乏骨髓细胞来源的 VEGF - A 的小鼠肿瘤中血管系统较少扭曲,同时血管外膜细胞覆盖增加,血管通透性下降,血管缩短,这标志着血管的正常化。另外,骨髓来源的 VEGF - A 缺失减少了肿瘤血管内皮细胞生长因子受体 2 (VEGF receptor 2, VEGFR2) 的磷酸化,降低了其活性,而肿瘤的 VEGF - A 总水平没有受到影响。这表明了 VEGF - A 信使 RNA 表达增加而其蛋白表达并没改变。而且,在乳腺肿瘤的多发性皮下同系移植模型和自体转基因模型中,巨噬细胞来源的 VEGF - A 缺失导致乳腺肿瘤进展加速,表现为总体的肿瘤细胞死亡数量减少和缺氧情况改善。此外,骨髓细胞来源的 VEGF - A 缺失提高了肿瘤对化学药物细胞毒性的敏感性。这表明骨髓细胞来源的 VEGF - A 对血管系统肿瘤性转化和 VEGFR2 信号转导的重要性,其引起的一系列变化不是加速而是减缓肿瘤演进。在临床试验中,抗血管新生药物能产生微弱的疗效,但整体而言单独使用这些药物并不能显著提高长远生存率。相比之下,联合应用化学疗法时 VEGF - A 抗体可以提高结肠癌患者的生存率。研究进一步证明了与化学疗法敏感性相关的关键介质是浸润的固有免疫细胞而不是恶性肿瘤细胞。