

· 实验研究 ·

高氧诱导早产鼠肺纤维化中结缔组织生长因子的表达及其意义

富建华, 薛辛东

(中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 结缔组织生长因子(CTGF)是新近发现与纤维化发生密切相关的一种因子,但其与早产儿慢性肺疾病(CLD)的肺纤维化有何关系,迄今未见报道。该文旨在阐明 CTGF 在高氧致早产鼠 CLD 发生、发展的表达规律,并探讨其在纤维化中表达及意义。**方法** 采用高浓度氧诱导早产鼠 CLD 模型,应用酶联免疫吸附法(ELISA)、免疫组织化学及反转录聚合酶链反应(RT-PCR)等技术,动态观察 CTGF mRNA 表达,并同时测定肺成纤维细胞的增殖性细胞核抗原(PCNA)指数及肺组织 I 型胶原的含量和 TGF-β₁ 蛋白表达水平。**结果** 生后 1 d, 3 d, 两组 I 型胶原、PCNA 指数、TGF-β₁ 蛋白及 CTGF mRNA 表达水平无差异($P>0.05$);实验组肺组织 TGF-β₁ 蛋白表达 7 d 升高($P<0.05$), I 型胶原、PCNA 指数及 CTGF mRNA 表达 14 d 升高($P<0.05$), 21 d 均达高峰($P<0.01$);肺组织 CTGF mRNA 表达与 I 型胶原呈明显正相关($\gamma=0.89, P<0.01$)。**结论** 高氧致 CLD 早产鼠肺组织 CTGF mRNA 表达水平与肺组织纤维化的程度相一致,CTGF 与 CLD 的肺纤维化密切相关。[中国当代儿科杂志, 2007, 9(5): 449-452]

[关键词] 结缔组织生长因子;肺纤维化;转化生长因子-β₁;早产鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)05-0449-04

Expression and role of connective tissue growth factor mRNA in premature rats with hyperoxia-induced chronic lung disease

FU Jian-Hua, XUE Xin-Dong. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Xue X-D, Email: xdxue@163.com)

Abstract: Objective To investigate the role of connective tissue growth factor (CTGF) in pulmonary fibrosis in rats with hyperoxia-induced chronic lung disease (CLD). **Methods** Eighty premature rats were randomly exposed to hyperxia (FiO₂ = 0.90) or room air (control group) ($n=40$ each). CLD was induced by hyperoxia exposure. The expression of CTGF mRNA and transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), the levels of type I collagen and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) index were assayed with enzyme linked immunoadsorbent (ELISA), immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on days 1, 3, 7, 14 and 21 after exposure. **Results** There were no differences in the levels of type I collagen, PCNA index, TGF-β₁ protein and CTGF mRNA between the CLD and the control groups within 3 days after exposure. In the CLD group, the expression of TGF-β₁ protein increased on the 7th day, remained at a higher level on the 14th and 21st day after exposure; the higher levels of type I collagen, PCNA index and CTGF mRNA were detected on the 14th day and peaked on the 21st day after exposure when comparing the control group. CTGF mRNA expression was positively correlated with type I collagen levels in the CLD group ($\gamma=0.89, P<0.01$). **Conclusions** The expression of CTGF in lung tissues is associated with pulmonary fibrosis in CLD rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(5): 449-452]

Key words: Connective tissue growth factor; Pulmonary fibrosis; Transforming growth factor-β₁; Premature rats

围生期缺氧是导致新生儿中枢神经系统不可逆损害及婴幼儿致残的最主要原因,因此,临床医生对新生儿低氧血症均能给予高度警惕和足够重视。然而恰恰忽视了新生儿、特别是早产儿长时间吸入高浓度氧所致的不同程度肺组织损伤,重者甚至发生慢性肺疾病(CLD),最终因纤维化而严重影响患儿的肺功能。

结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一新发现的细胞因子,虽其生物学作用尚未清楚,但与组织纤维化的发生密切相关,并推测其可能为转化生长因子-β₁(TGF-β₁)的下游因子。我们的前期研究^[1-3]已表明,TGF-β₁过度表达与高氧诱导新生大鼠肺纤维化的发生密切相关,但 CTGF 在

[收稿日期] 2006-10-30; [修回日期] 2006-12-27
[作者简介] 富建华,女,博士,副教授。主攻方向:新生儿肺损伤
[通讯作者] 薛辛东,教授,博士生导师,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

其发生中的作用尚未见报道。因此,本文以高氧诱导早产鼠 CLD 模型为对象,研究肺组织中 CTGF 的动态表达规律,并同步测定肺组织中 I 型胶原的水平、观察肺成纤维细胞(lung fibroblast, LF)增殖状态及肺组织 TGF- β_1 表达,旨在探讨 CTGF 在高氧致 CLD 早产鼠肺纤维中变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验分组及模型制备

将孕 21 d 的 SD 大鼠(由中国医科大学实验动物部提供)剖宫取出的新生鼠(即早产鼠)80 只,依吸氧浓度(FiO_2)随机分为实验组(FiO_2 为 0.90)和对照组(FiO_2 为 0.21),每组为 40 只。按我们已报道的方法制备高氧诱导早产鼠的 CLD 模型^[1]。

1.2 标本采集

每组分别于实验后的 1,3,7,14 和 21 d 随机选取 8 只麻醉后处死。将左肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于观察肺组织 TGF- β_1 蛋白表达,其余肺组织于 -80°C 冰箱中冻存待测 CTGF mRNA 表达水平及 I 型胶原的含量。

1.3 肺组织 I 型胶原含量的测定

采用酶联免疫吸附法检测。用预冷的生理盐水洗净残血,吸干水分,称 1 g 湿重肺组织剪碎,于冰盒内超声粉碎匀浆,制成 10% 的组织匀浆,低温离心后取上清液,分别按照测定试剂盒(上海森雄生物制品公司提供)要求按步骤进行,结果以每毫克肺组织所含 I 型胶原的含量表示(ng/mg)。

1.4 LF 增殖性细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达检测

采用 SABC 免疫组织化学方法,以 1:200 稀释的小鼠抗大鼠 PCNA 抗体为一抗(武汉博士德生物制品公司),按 SABC 方法(武汉博士德生物制品公司)进行染色,以 LF 的胞核染成棕黄色为阳性细胞。结果判定:每例选择 5 个以上具有代表性高倍视野($\times 400$),计数 200 个 LF 中阳性细胞百分比作为 PCNA 指数($\text{PCNA 指数} = \text{PCNA 阳性细胞数} / \text{细胞总数} \times 100\%$)。

1.5 肺组织 TGF- β_1 蛋白表达的检测

采用 SABC 免疫组织化学方法,以 1:100 稀释的兔抗大鼠 TGF- β_1 抗体为一抗(武汉博士德生物制品公司),按 SABC 方法(武汉博士德生物制品公司)进

行染色,以细胞浆有棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。结果判定:应用美国 Universal Imaging Porporation 图像分析系统,以平均灰度值代表阳性产物的表达强度。平均灰度值越低,其阳性反应产物表达强度越强,表明蛋白的含量越高。

1.6 肺组织 CTGF mRNA 表达的检测

采用 RT-PCR 技术。以 TRIZOL 提取总 RNA,逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增。引物序列如下:CTGF 上游:5'-CGC CTT GGT GCT CCT CCT CT-3',下游:5'-TGC GGT CCT TGG GCT CAT C-3(479 bp); β -actin(内参照)上游:5'-GAT TGC CTC AGG ACA TTT CTG-3',下游:5'-GAT TGC TCA GGA CAT TTC TG-3'(690 bp)。PCR 条件: 94°C 变性 3min, 94°C 45 s, 56°C 1 min, 72°C 1 min,共 35 个循环, 72°C 延伸 7 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,紫外灯下观察结果。用 CTGF 及 β -actin 扩增产物的吸光度比值表示每个标本的相对 mRNA 水平。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 Dunnet t 检验。

2 结果

2.1 肺组织 I 型胶原的含量

实验后 1,3,7 d,两组比较差异无显著性($P > 0.05$),14 d 实验组升高($P < 0.05$),21 d 明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 LF 细胞的 PCNA 指数

生后 1 d,3 d 和 7 d 两组差异无显著性,14 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$),21 d 达高峰($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 肺组织 TGF- β_1 蛋白表达的程度

实验 1 d 和 3 d,两组差异无显著性($P > 0.05$),7 d 实验组高于对照组($P < 0.05$),14 d 和 21 d 实验组明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 3。

2.4 肺组织 CTGF mRNA 表达水平

于实验后 1,3,7 d,两组比较差异无显著性($P > 0.05$),14 d 实验组升高($P < 0.05$),21 d 明显高于对照组($P < 0.01$)。见表 4。

2.5 肺组织 CTGF mRNA 表达与 I 型胶原相关性

实验组 CTGF mRNA 表达水平与 I 型胶原含量呈明显正相关($r = 0.89$, $P < 0.01$)。

表 1 两组肺组织 I 型胶原含量的动态变化 (n = 8, $\bar{x} \pm s$, ng/mg)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	406.73 ± 20.32	491.25 ± 15.16	501.50 ± 18.17	496.01 ± 11.02	511.86 ± 49.55
实验组	422.08 ± 49.48	470.87 ± 29.39	528.11 ± 43.39	556.60 ± 40.04 ^a	874.89 ± 81.25 ^b

a 与对照组比较 $P < 0.05$; b 与对照组比较 $P < 0.01$

表 2 两组肺细胞的 PCNA 指数 (n = 8, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	6.21 ± 0.14	6.79 ± 1.37	6.66 ± 2.98	7.71 ± 2.04	6.44 ± 2.09
实验组	6.01 ± 0.09	6.95 ± 1.29	8.23 ± 3.05	24.93 ± 4.31 ^a	38.57 ± 6.12 ^a

a 与对照组比较 $P < 0.01$

表 3 两组肺组织 TGF-β₁ 蛋白表达强度 (灰度值表示) (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	85.24 ± 5.65	86.17 ± 3.99	84.56 ± 2.14	84.56 ± 2.56	84.16 ± 2.16
实验组	86.82 ± 6.80	85.92 ± 5.53	80.89 ± 1.36 ^a	73.83 ± 5.21 ^b	72.99 ± 5.00 ^b

a 与对照组比较 $P < 0.05$; b 与对照组比较 $P < 0.01$

表 4 两组肺组织 CTGF mRNA 表达水平的比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	1.10 ± 0.07	1.09 ± 0.12	1.08 ± 0.12	1.07 ± 0.08	1.07 ± 0.09
实验组	1.08 ± 0.08	1.17 ± 0.18	1.17 ± 0.18	1.28 ± 0.11 ^a	1.41 ± 0.12 ^b

a 与对照组比较 $P < 0.05$, b 与对照组比较 $P < 0.01$

3 讨论

随着低出生体重儿存活率的日益提高,早产儿 CLD 的发生率在逐年上升。虽其发生机制尚不清楚,但长时间吸入高浓度氧仍是 CLD 发生的最危险因素。大量临床及动物实验研究结果证实,不可逆的肺纤维化是影响 CLD 患儿预后和导致其死亡的最主要原因。因此,探索 CLD 肺纤维化的发生机制已成为当今新生儿研究领域亟待解决的问题。目前有关早产儿 CLD 肺纤维化发生机制的研究多集中于因 TGF-β₁ 异常表达而导致的细胞外基质 (ECM) 合成与降解失衡,最终胶原等过量的 ECM 沉积于肺组织发生纤维化,并认为 TGF-β₁ 是目前促进纤维化发生、发展的重要细胞因子^[2]。我们以往的研究也证实了该结果^[3],故目前多试图通过应用 TGF-β₁ 拮抗剂而达到有效防治肺纤维化的目的。然而 TGF-β₁ 生物学作用广泛,效应复杂,若完全阻断其表达,后果则难以预料。如 TGF-β₁ 基因敲除的新生鼠,生后很快死于全身炎症反应^[4]。因此,TGF-β₁ 的正面效应可能限制了 TGF-β₁ 抗体或其拮抗剂在抗纤维化中应用前景。

CTGF 是一富含半胱氨酸的多肽,属即刻早期基

因 CCN 家庭成员之一。1991 年首次在人脐静脉内皮细胞中被发现,此后研究证实,CTGF 广泛存在于人类组织器官中,具有促进有丝分裂、趋化细胞、诱导粘附、促进成纤维细胞增殖和 ECM 合成的作用。在生理状态下,机体组织仅有基础量的 CTGF 分泌,病理状态下,CTGF 过度表达与某些增生性或纤维化性疾病的发生密切相关。Bonniaud 等^[5]发现,用博莱霉素处理后的小鼠,其肺部炎症反应明显,可见散在胶原,但并无成纤维母细胞聚集,若同时给予 CTGF,则可见小鼠肺间质胶原沉积和成纤维母细胞聚集,从而进一步证实了 CTGF 的促纤维化作用。因此,近年来 CTGF 在博莱霉素诱导的鼠肺纤维化和成人特发性肺间质纤维化中作用已倍受关注,并认为 CTGF 可作为评价肺纤维化发生、发展的早期、敏感指标^[6,7]。但有关 CTGF 的生物学功能尚处于研究阶段,其信号调控通路也不甚清楚。

尽管 CTGF 被研究认为与博莱霉素诱导大鼠肺纤维化和成人特发性肺间质纤维化发生密切相关,但在高氧诱导早产儿 CLD 模型表达规律及其意义如何,目前尚未见报道。若能阐明该问题,可能对完善早产儿 CLD 的发生机制及探索有效的防治途径发现新的突破点。为此,我们在以往建立的高氧致早产鼠

CLD 模型的基础上,应用 RT-PCR 方法,研究 CTGF 基因表达,并与 TGF- β_1 蛋白表达相比较,实验发现于高氧暴露后的 7 d,早产鼠肺组织的 TGF- β_1 表达开始增强,14 d CTGF 基因表达随之增强,21 d 两者均达高峰,该结果表明 CTGF 基因表达滞后于 TGF- β_1 蛋白表达。同时我们还发现正常肺组织及 CLD 的早期仅有微弱表达,随肺间质病变加重,CTGF 表达逐渐增强,为进一步证实其表达与肺间质纤维化密切程度,还同时观察肺成纤维细胞 PCNA(是判定细胞增殖状态的最有效标志物之一)指数及肺组织 I 型胶原含量,结果证实 CLD 的肺组织 CTGF mRNA 表达水平与 LB 增殖程度及 I 型胶原水平呈明显正相关,表明 CLD 肺组织 CTGF mRNA 异常表达与肺纤维化的发生密切相关,但其纤维化的发生是 CTGF 与 TGF- β_1 协同完成,还是作为 TGF- β_1 下游因子单独作用,仍有待于深入研究。

[参 考 文 献]

[1] 富建华,薛辛东. 高氧致 CLD 早产鼠肺组织超微结构及其氧化

应激反应的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(1):16-19.
[2] 富建华,薛辛东. 转化生长因子 β_1 与早产儿慢性肺疾病[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(4):313-315.
[3] 富建华,薛辛东. 慢性肺疾病早产鼠肺组织转化生长因子 β_1 基因及蛋白表达的动态变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3):207-211.
[4] Letterio JJ, Bottinger EP. TGF-beta knockout and dominant-negative receptor transgenic mice[J]. Miner Electrolyte Metab, 1998, 24(2-3):161-167.
[5] Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gamlie J, et al. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a pro-fibrotic environment in "fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31(5):510-516.
[6] Pan LH, Yamacchi K, Uzuki M, Nakanishi T, Takigawa M, Inoue H, et al. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF[J]. Eur Respir J, 2001, 17(6):1220-1227.
[7] 张雷,卢惠苹,赖国祥. 结缔组织生长因子在博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化中的作用初探[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(3):290-292.

(本文编辑:吉耕中)