

· 实验研究 ·

结缔组织生长因子在高氧致早产鼠慢性肺疾病中的表达及其作用

潘丽, 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 肺纤维化是高氧致慢性肺疾病(chronic lung diseases, CLD)的最终结局,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是近年来发现的与纤维化形成密切相关的因子,但其在CLD肺纤维化中的作用目前尚未见报道。该实验旨在研究CTGF在高氧致CLD中的动态表达规律,并探讨其在CLD中的作用。**方法** 将50例早产鼠随机分为实验组(高氧组)和对照组(空气组),分别于建立模型后1,3,7,14,21 d应用免疫组化技术动态检测肺组织中CTGF的表达部位和强度,对肺组织纤维化程度进行病理组织学评分。**结果** 对照组小鼠CTGF仅在血管内皮细胞、支气管、细支气管上皮细胞有微弱表达;实验组于建立模型后1,3,7 d表达部位与对照组相似,表达强度与对照组无差异($P>0.05$),14 d表达增强($P<0.01$),在部分肺上皮细胞、肺泡间隔、成纤维细胞中出现表达,21 d表达明显增强($P<0.01$)。高氧组14 d和21 d CTGF表达水平与肺组织纤维化程度呈明显正相关(分别为 $r=0.903$, $r=0.926$,均 $P<0.01$)。**结论** 随着高氧暴露时间的延长和纤维化的发展,CTGF表达增强,其与高氧所致CLD肺纤维化的发生密切相关。 [中国当代儿科杂志,2006,8(5):417-420]

[关键词] 结缔组织生长因子;肺纤维化;高氧;早产鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0417-04

Expression and effect of connective tissue growth factor in premature rats with hyperoxia-induced chronic lung diseases

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

Abstract: Objective Lung fibrosis is the ultimate outcome of hyperoxia-induced chronic lung diseases (CLD) and connective tissue growth factor (CTGF) is correlated with fibrosis. This study investigated the role of CTGF in hyperoxia-induced CLD. **Methods** Fifty premature rats were randomly exposed to hyperoxia (Model group) and to room air (Control group) ($n=25$ each). CLD was induced by hyperoxia exposure. The expression of CTGF was detected by immunohistochemical method at 1, 3, 7, 14 and 21 days after exposure. The severity of pulmonary fibrosis was evaluated. **Results** In the Control group there was a slight expression of CTGF in the bronchial epithelial cells and vascular endothelial cells. The intensity and range of CTGF expression in the Model group were similar to the Control group on days 1, 3 and 7 of exposure. On the 14th day, CTGF was expressed in some alveolar epithelial cells, fibroblasts and interstitial cells, and the intensity of CTGF expression increased significantly compared with the Control group, with the IODT of CTGF of 10.53 ± 4.24 vs 5.58 ± 1.18 ($P<0.01$). On day 21, the expression intensity and range of CTGF in the Model group (IODT: 16.61 ± 5.39) increased compared with that of Control group ($P<0.01$). The expression of CTGF was correlated with the degree of fibrosis in the Model group on days 14 and 21 ($r=0.903$, $r=0.926$ respectively, $P<0.01$). **Conclusions** The CTGF expression increased with the time of hyperoxia exposure and the development of fibrosis. CTGF is closely related to the development of hyperoxia-induced pulmonary fibrosis.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(5):417-420]

Key words: Connective tissue growth factor; Pulmonary fibrosis; Hyperoxia; Premature rats

长时间高浓度的氧疗会引起肺损伤或使原来的损伤加剧,这在医学界已得到普遍认识。早产儿慢性肺疾病(CLD)最主要的致病因素就是长期高浓度

的氧疗,其最终后果是不可逆的肺间质纤维化,严重影响了早产儿的生存率和存活者的生活质量。转化生长因子 β (TGF- β)是目前研究最深入、与CLD肺

[收稿日期]2005-10-30;[修回日期]2006-01-28

[作者简介]潘丽,女,硕士在读。主攻方向:新生儿专业。

[通讯作者]薛辛东,教授,中国医科大学附属第二医院儿科,邮编:110004。

纤维化最密切相关的因子,但其生物学功能复杂,针对其的抗纤维化治疗将带来难以预料的后果,因此寻找一个特异而有效防治纤维化的手段已经成为了当今研究的热点。

近年来研究发现,结缔组织生长因子(CTGF)可作为TGF- β 的下游介质,介导其在成纤维细胞中的作用。新近在对肺、肝、肾等器官纤维化及系统性硬化病等疾病的研究中也发现,CTGF与成纤维细胞增殖及细胞外基质合成密切相关,在纤维化区域表达明显增强^[1~4]。但其在CLD过程中的表达情况目前尚未见报道。我们观察了CTGF在高氧诱导早产鼠CLD中的动态表达,初步探讨了其在CLD肺纤维化形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

成年SD大鼠由中国医科大学实验动物部提供。兔抗大鼠CTGF抗体、即用型SABC及DAB显色试剂盒均购自武汉博士德生物制品公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及标本采集 将孕21 d的SD大鼠行剖宫产,按文献报道^[5]的方法建立高氧早产鼠CLD模型,分别于1,3,7,14,21 d处死实验组(高氧组)和对照组(空气组)动物各5只,分离肺组织后,置于4%多聚甲醛中固定,石蜡包埋,切片(片厚约5 μ m)。

1.2.2 病理肺纤维化评分^[6] 苏木素-伊红染色后,于10倍光镜下根据肺纤维化程度进行双盲评定,评分为0~8分(从正常到严重)。评分标准:0分为正常,1分为肺泡或细支气管壁少许纤维化,2~3分为中度纤维化而无肺泡结构改变,4~5分为有明确的肺泡结构改变(肺泡壁明显增厚)和纤维小结,6~7分为有严重的肺泡结构改变和大片纤维化,8分为完全纤维化。

1.2.3 CTGF表达的免疫组化染色检测 采用SABC法,按照试剂盒说明书进行。主要步骤为:肺组织切片常规脱蜡至水,3%过氧化氢室温孵育15 min灭活内源性过氧化物酶,胃蛋白酶修复10 min以暴露抗原,滴加5% BSA封闭液37 $^{\circ}$ C孵育20 min,滴加兔抗大鼠CTGF抗体(稀释度为1:160)37 $^{\circ}$ C孵育2 h(阴性对照以PBS替代),滴加生物素标记羊抗兔IgG 37 $^{\circ}$ C孵育20 min,滴加SABC复合液37 $^{\circ}$ C孵育20 min,DAB显色,苏木素复染,常规脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。

1.2.4 结果分析 每时间点随机抽取染色清晰的切片8张,每张切片于光学显微镜下($\times 400$)随机选取5个视野,固定窗口面积,利用美国Universal Imaging Porporation图像分析系统,应用Meta Morph软件测定平均积分光密度值,以检测阳性产物的强度。

1.2.5 统计学分析 应用SPSS11.5统计软件进行统计学处理,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本方差齐性检验应用 F 检验,根据样本的方差齐性检验 F 值,组间分别应用 t 检验或 t' 检验,相关分析采用Spearman分析,以 $P < 0.05$ 作为显著性检验的标准。

2 结果

2.1 肺组织的病理变化

对照组(空气组)1,3 d均表现为肺泡样结构不规则,肺泡腔小,肺泡间隔较厚;7~21 d肺泡结构逐渐规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄。实验组(高氧组)1 d时较对照组无明显改变;3 d肺泡腔内有少许红细胞渗出、肺泡间隔有炎性细胞浸润;7 d时仍可见出血、肺水肿、炎症细胞浸润、间质细胞增多,并出现终末气腔扩张、肺分隔、肺泡数量减少等;14 d时肺泡腔明显增大,少数肺泡融合,肺泡数量进一步减少,肺间质成纤维细胞明显增加;21 d正常肺泡结构消失,数量明显减少,肺泡腔直径明显增大,肺分隔明显减少,肺泡壁菲薄,局部肺成纤维细胞增生明显,间隔增宽,小灶或多灶状实变,肺纤维化形成。

2.2 肺组织纤维化评分

实验组和对照组的肺纤维化评分结果如表1所示,两组1,3,7 d肺纤维化程度无显著差异,14 d和21 d实验组肺纤维化程度明显高于对照组($P < 0.01$)。

2.3 CTGF表达的免疫组化染色检测

2.3.1 CTGF表达部位 对照组CTGF仅在血管内皮细胞,支气管、细支气管上皮细胞有微弱表达,肺组织其他部位始终未见明显的CTGF表达。实验组于建立模型后1,3 d表达部位与对照组相似,7 d时可观察到CTGF在部分肺上皮细胞、肺泡间隔、成纤维细胞中出现微弱表达,14 d时在肺上皮细胞和间质成纤维细胞中表达均明显增强,21 d时CTGF在这些细胞中的表达均进一步增强,肺间质成纤维细胞成为其主要表达细胞。(见图1)。

2.3.2 CTGF表达强度 建立模型后1,3,7 d,两组肺组织中CTGF表达无显著差异($P > 0.05$)。

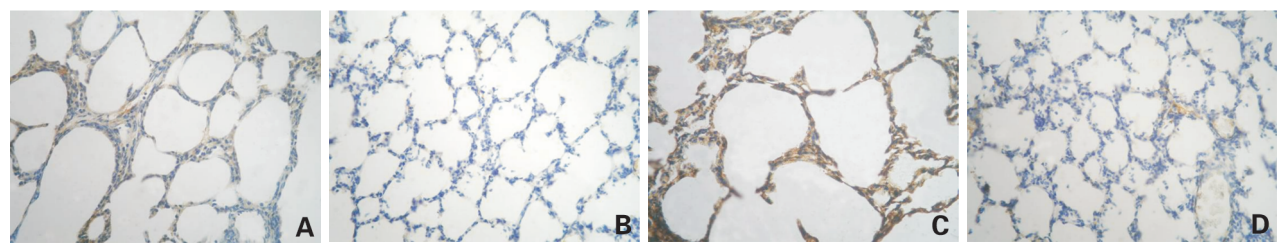


图 1 实验组、对照组 14 d,21 d 肺组织 CTGF 蛋白表达 (SABC 免疫组化 $\times 400$)。(泡浆有棕黄色颗粒沉着即为阳性细胞)。A:实验组 14 d 可见肺泡腔增大,肺泡融合,肺泡数量减少,肺泡壁增厚,肺间质成纤维细胞增加。CTGF 蛋白在肺上皮细胞和间质成纤维细胞中表达均明显增强;B:对照组 14 d 肺组织可见肺泡结构基本规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄,CTGF 蛋白仅在上皮细胞有微弱表达;C:实验组 21 d 肺组织可见肺泡腔明显增大,肺泡融合,肺泡数量减少,肺泡壁显著增厚,肺间质成纤维细胞明显增加。CTGF 蛋白在肺上皮细胞和间质成纤维细胞中表达进一步增强,肺间质成纤维细胞成为其主要表达细胞;D:对照组 21 d 肺组织可见肺泡结构基本规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄,CTGF 蛋白仅在血管内皮细胞和上皮细胞有微弱表达。

表 1 建立模型后不同时间点早产鼠肺组织纤维化评分 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

分组	日龄 (d)				
	1	3	7	14	21
对照组	0.30 $\pm$ 0.13	0.38 $\pm$ 0.14	0.49 $\pm$ 0.13	0.55 $\pm$ 0.10	0.52 $\pm$ 0.10
实验组	0.33 $\pm$ 0.13	0.43 $\pm$ 0.14	0.53 $\pm$ 0.23	1.98 $\pm$ 0.49 ^a	2.60 $\pm$ 0.47 ^a

与对照组比较,a $P < 0.01$

表 2 建立模型后不同时间点早产鼠肺组织中 CTGF 表达的平均积分光密度值变化 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

分组	日龄 (d)				
	1	3	7	14	21
对照组	2.80 $\pm$ 0.49	2.81 $\pm$ 0.60	4.54 $\pm$ 1.13	5.58 $\pm$ 1.18	5.94 $\pm$ 1.12
实验组	2.91 $\pm$ 0.57	2.96 $\pm$ 0.61	5.17 $\pm$ 1.66	10.53 $\pm$ 4.24 ^a	16.61 $\pm$ 5.39 ^a

与对照组比较,a $P < 0.01$

14 d 实验组 CTGF 表达较对照组明显增强 ($P < 0.01$), 21 d 实验组 CTGF 表达继续升高,与对照组差异显著 ($P < 0.01$),见表 2。

2.4 CTGF 表达水平与纤维化程度的相关性分析

暴露于高氧环境下 14 d 和 21 d 早产鼠肺组织中 CTGF 表达与纤维化评分呈明显正相关(分别为 $r = 0.903, r = 0.926$,均 $P < 0.01$)。

3 讨论

长时间吸入高浓度的氧气可导致不同程度的肺损伤,重者可致 CLD 的发生,病情严重的 CLD 患儿多于 1 年内死于呼吸衰竭,幸存者也因肺功能障碍需长期(数年或数月)依赖氧气或机械通气治疗,严重影响了早产儿的生活质量,是目前新生儿致残的主要疾病之一,因此关于 CLD 的发病机制及寻找其有效的防治手段的研究更是迫在眉睫。

目前认为在未发育成熟的肺组织基础上,氧化应激、细胞因子等的复杂作用共同导致了 CLD 的发

生,而其最严重的后果就是晚期不可逆的肺间质纤维化。当前主要是从以下几个方面探讨肺纤维化的发生机制:①细胞外基质 (ECM) 合成和降解失衡;②复杂的细胞作用,其中肺巨噬细胞、肺泡上皮细胞及间质成纤维细胞是研究的热点,认为它们可能在纤维化起始及进展过程中起到最为关键的作用;③庞大的细胞因子网络,其中研究最多的就是可促进成纤维细胞增生和胶原蛋白合成的转化生长因子 β (TGF- β)。以往的研究认为 TGF- β 是纤维化过程中的主要因子,我们的研究也发现 CLD 中 TGF- β 1 可通过过度表达而介导 ECM 合成增加,参与 CLD 中肺纤维化的发生^[5]。于是学者们曾一度企图将拮抗 TGF- β 作为治疗和延缓各器官纤维化的手段,但由于 TGF- β 靶细胞较多、效应复杂,单纯阻断其效应会产生许多难以控制的副作用^[7]。故寻找其下游更具特异性的促纤维化而不影响其他生物学活性的因子,成为了当今纤维化治疗的热点。而近年来越来越多的研究发现,CTGF 作为 TGF- β 的下游因子,在纤维化过程中可能扮演着更加重要的角色。

CTGF 是即刻早期基因家族成员之一,其生物学功能尚处于研究阶段,目前认为主要与促进细胞(主要是成纤维细胞)增殖,产生细胞外基质,细胞迁移、黏附,新生血管生成等有关^[7]。本研究结果显示,CTGF 在空气组早产鼠肺组织中表达微弱,而在高氧组早产鼠肺组织中表达明显增高,且与纤维化程度呈明显正相关,随着纤维化的加重其表达逐渐增高,这与我们以前研究的高氧暴露下早产鼠肺组织中 TGF- β 1 的变化是一致的。而以往的研究已证实 TGF- β 是促进 CTGF 表达的主要因子,提示在 CLD 致肺纤维化形成过程中,TGF- β 1 可能是通过促进 CTGF 的表达来发挥其促纤维化作用的。CTGF 在高氧致 CLD 肺纤维化过程中可能起着更为重要的作用,似乎可将检测 CTGF 作为评价肺纤维化发生、发展的早期、灵敏指标。

本实验中我们还发现,肺纤维化早期 CTGF 主要表达于气管、支气管上皮细胞和部分肺泡上皮细胞,而后期随着纤维化的逐渐形成,肺上皮细胞、间质成纤维细胞成为了 CTGF 的主要表达细胞。目前已证实 CTGF 能直接诱导成纤维细胞活化、增殖和分泌细胞外基质,因此本研究提示:在没有其他细胞因子参与的情况下,肺上皮细胞和/或成纤维细胞可通过自分泌和旁分泌 CTGF 的机制导致纤维化的逐渐加重。

综上所述,我们认为,将拮抗 CTGF 活性作为早

期预防和治疗高氧引起肺纤维化的策略,可能为临床上治疗 CLD 提供更为科学、有效的途径。

[参 考 文 献]

- [1] Dziadzio M, Usinger W, Leask A, Abraham D, Black CM, Denton C, et al. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma[J]. QJM, 2005, 98(7): 485-492.
- [2] Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, et al. Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis[J]. Liver, 2000, 20(4): 296-304.
- [3] Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway[J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 2033-2043.
- [4] 张雷,卢惠苹,赖国祥. 结缔组织生长因子在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化中的作用初探. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(3): 290-292.
- [5] 富建华,薛辛东. CLD 早产鼠肺组织内 TGF- β 1 的动态长达及其对细胞外基质的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2004, 6(3): 166-170.
- [6] Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-470.
- [7] Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor; new targets for antifibrotic therapy? [J]. Matrix Biol, 2002, 21(6): 473-482.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

《临床儿科杂志》2007 年征订启事

《临床儿科杂志》创刊于 1983 年,由上海市儿科医学研究所及上海交通大学医学院附属新华医院主办,其编委会由二百余名全国各地的著名儿科专家、教授组成。本刊遵循面向临床、面向全国、面向基层,普及与提高相结合的办刊宗旨,反映本学科学术水平和发展动向。主要读者为全国二、三级医院的医务人员。除每期设一个系统疾病专栏(包括呼吸、消化、神经、血液、心血管、肾脏、免疫、遗传、代谢、内分泌等系统),另设综合报道、儿童保健、实验研究、临床病理(例)讨论、疑难病例分析、循证医学、综述、讲座、临床经验点滴、误诊分析、临床用药、诊治技术、临床医学影像导读、继续医学教育函授等十余个专栏。主要论著附有英文摘要及英文目录。自 90 年代起连续被评为临床医学类及生物医学类核心期刊,2000 年起又被纳入国家科学技术部中国科技论文统计源期刊。本刊自创刊以来,深受读者欢迎。

2007 年(第 25 卷)1~12 期《临床儿科杂志》已在全国邮局征订,我刊编辑部热诚欢迎新、老读者踊跃订阅。凡欲订者可径向当地邮局订购,邮发代号 4-426,每期 80 页,7.80 元/本,全年合计 93.60 元。如未能及时订购者,也可直接将款项邮汇到本刊编辑部。地址:上海市控江路 1665 号,邮编:200092,电话:021-65790000 * 3406,3407。