

呼吸系统疾病与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000194

雾化吸入布地奈德干预肺纤维化大鼠及其机制的实验研究

贺凤群¹, 秦光梅¹, 曾 鸣¹, 王秋琼¹, 罗 华¹, 廖 娟²

(重庆医科大学附属永川医院 1. 呼吸内科; 2. 中心实验室, 永川 402160)

【摘要】目的:探讨雾化吸入布地奈德对博来霉素诱导的大鼠肺纤维化的影响及其可能机制。**方法:**45 只 SD 雌性大鼠随机分为 3 组(各组 15 只):对照组、模型组和干预组,肺纤维化模型行气管内滴入博来霉素造模。干预组造模后第 7 天雾化吸入布地奈德,模型组和对照组雾化吸入等量生理盐水,雾化后第 7 天、第 14 天、第 28 天各组随机处死 5 只动物并分别保存肺组织,HE 和 Masson 染色判断肺组织肺炎及肺纤维化程度;免疫组化染色测定肺组织转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)的表达水平;RT-PCR 检测 I、III 型胶原 mRNA 的表达水平。**结果:**肺组织病理学观察显示对照组肺炎和肺纤维化程度明显轻于模型组和干预组,干预组较模型组有明显改善;模型组和干预组肺组织中 TGF- β 和 CTGF 水平较对照组均有明显增高($P<0.05$),但干预组较模型组表达减少($P<0.05$);模型组 I、III 型胶原表达明显高于对照组($P<0.05$),而干预组较模型组表达明显减少($P<0.05$)。**结论:**布地奈德具有明显的抗纤维化作用,机制可能为通过抑制细胞因子的表达而减少肺组织中 I、III 型胶原的生成,最终抑制肺纤维化。

【关键词】肺纤维化;布地奈德;雾化吸入;结缔组织生长因子;转化生长因子- β

【中图分类号】R563

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-08-10

Experimental study of inhaling budesonid in treating pulmonary fibrosis in rats and the possible mechanism

He Fengqun¹, Qin Guangmei¹, Zeng Ming¹, Wang Qiuqiong¹, Luo Hua¹, Liao Juan²

(1. Department of Respiratory Medicine; 2. Central Laboratory, the Affiliated Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects and the possible mechanism of inhaling budesonid in treating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods:** Forty-five SD rats were randomly divided into three groups (15 in each group): control group, model group and intervention group. Rats in intervention group inhaled budesonid every two days from the 7th d after intratracheal instillation while those in model group and control group inhaled the same volume of 0.9% normal saline. Five rats in each group were randomly killed on the 7th, 14th, 28th d after atomizing inhalation and the pulmonary tissues were preserved respectively. HE and Masson staining were used to determine the extent of alveolus inflammation and pulmonary fibrosis. Immunohistochemical technique was used to evaluate the level of transforming growth factor- β (TGF- β) and connective tissue growth factor (CTGF) in lung tissues. RT-PCR was used to detect the level of type I and III collagen in pulmonary tissues. **Results:** Pulmonary tissue pathology showed that the extent of alveolus inflammation and pulmonary fibrosis was less intense in control group than in model group and intervention group and was better in intervention group than in model group. Significant over-expressions of CTGF and TGF- β were shown in pulmonary tissues of rats in model group and intervention group (higher expressions in model group than in intervention group, $P<0.05$) compared with those in control group ($P<0.05$). Expressions of type I and III collagen were significantly higher in model group than in control group ($P<0.05$), but lower in intervention group than in model group ($P<0.05$). **Conclusion:** Budesonid has anti-fibrosis potency, the mechanism of which may be reducing the production of type I and III collagen through inhibiting the expressions of cytokines such as TGF- β and CTGF.

【Key words】 pulmonary fibrosis; budesonid; aerosol inhalation; connective tissue growth factor; transforming growth factor- β

作者介绍: 贺凤群, Email: 419298305@qq.com,

研究方向: 肺纤维化临床诊治研究。

通信作者: 秦光梅, Email: QGM1962820@sina.com。

基金项目: 重庆市卫生局资助项目(编号: 2009-2-067)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000194.html>

肺纤维化是由多种原因引起的慢性肺疾病的共同结局,主要的病理改变为弥漫性肺泡炎症、肺成纤维细胞灶的形成以及细胞外基质的反复修复和过度沉积,导致肺正常结构改建和远端有效换气面积减少,多数患者最终死于呼吸衰竭。细胞因子是目前肺纤维化的研究热点,普遍认为大量细胞因子构成相互作用的复杂网络,引发一系列的链式反应,从而加重肺组织炎症和免疫损伤导致纤维化的形成,结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)作为转化生长因子- β (transforming growth factor- β ,TGF- β)的下游因子是新近发现的促纤维细胞分裂和胶原分解促进剂,其可能是肺纤维化形成的一个关键调节因子,因此,CTGF 和TGF- β 致肺纤维化机制成为当今的研究热点。

国内外目前治疗肺纤维化尚无最佳方案,仍以糖皮质激素为主,而长期大剂量使用糖皮质激素会引起免疫抑制、骨质疏松、严重感染等并发症。本实验选择布地奈德,其亲脂性大,有较高的糖皮质激素受体结合力,局部抗炎效果强,采用雾化吸入方式给药,能直接局部作用于呼吸道而发挥抗炎作用,且副作用少。故本实验旨在通过激素干预肺纤维化大鼠模型研究其抗纤维化的机制,以雾化吸入局部用药途径减少全身用药副作用,从而探讨肺纤维化最佳的药物治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠,200 g,雌性,45 只,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 布地奈德(普米克 令舒,澳大利亚,进口药品注册编号:H20090903),博莱霉素(日本化药株式会社),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)、兔 TGF- β 多克隆抗体(bs-0103R,北京博奥森公司),兔 CTGF 多克隆抗体(ab5097,美国 abcam 公司),免疫组化检测试剂盒(北京中杉试剂),其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物造模方法 用 3%的水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠(0.1 ml/kg),仰卧固定于鼠台上,颈部酒精消毒后逐层分离并暴露气管,注射器经气管软骨环间隙朝向心端刺入气管,回抽有气体时,向内缓慢注入 0.3 ml 博莱霉素生理盐水溶液(5 mg/kg),注后立即将动物直立并左右旋转,使药液在肺内均匀分布。其中对照组大鼠肺部注入等体积的生理盐水。

1.2.2 动物分组和雾化吸入方法 动物分组:SD 大鼠随机分为 3 组:对照组、模型组、干预组,每组 15 只。

雾化方法:雾化方法参考文献[1],并稍做改进:将大鼠放

入自制的去底饮料瓶中,露出头部,尾部密封,将之放置在相对密闭的自制牛奶箱里,将雾化管对准鼻面部固定,向超声波雾化器的药杯中分别加入 3 ml 0.9%生理盐水(对照组、模型组)、3 ml 布地奈德稀释液(干预组),雾化 3~5 min,暂停 1~2 min,直至雾化完药杯中的液体为止,雾化时间约 40 min,隔日 1 次用药。

1.2.3 取材方法 大鼠在雾化后第 7、14、28 天后分 3 次取材,每次各组随机处死 5 只,共 15 只。具体步骤:大鼠腹腔注射 3%水合氯醛溶液腹腔麻醉(0.1 ml/kg)后将大鼠固定,经右心取血处死,开胸并结扎右主支气管,将 4%的多聚甲醛打入左主支气管,见肺胸膜灌注饱满,将肺放入多聚甲醛中浸泡。将右肺放入 5 ml 灭酶离心管中,放入-70℃冰箱保存。

1.2.4 肺组织病理学检查 取肺,按常规病理学方法进行固定,包埋,切片。将病理切片分别进行苏木精伊红(HE)、Masson 染色评价肺泡炎及肺纤维化的程度。

1.2.5 免疫组化检测 CTGF、TGF- β 采用 IMAGE-Pro plus 5.0 高清晰度彩色图文分析系统进行分析。

1.2.6 RT-PCR 检测 I、III 型胶原 mRNA 按 Trizol 实际盒说明书提取大鼠肺组织总 RNA,分光光度计鉴定 RNA 样品,按试剂盒说明书在 PCR 仪(美国 Bio-Rad)上进行 RT-PCR。采用 Quantityone4.6 图像分析软件进行照相分析。各条带的相对吸光度值=目的条带吸光度值/内参 GAPDH 条带吸光度值。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 16.0 软件包进行数据分析,所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较进行方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SD 大鼠肺组织的肉眼观察

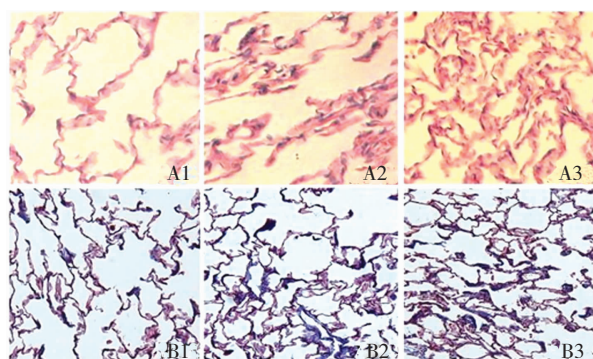
对照组肺组织呈粉红色,表面光滑,弹性良好。模型组在雾化后第 7 天时可见满肺散在出血点或出血灶,第 14、28 天双肺呈苍白色泽,肺组织体积明显缩小,硬度增加或表面有凹凸不平结节突起,仍可见散在的出血点。干预组在雾化后第 7 天可见双肺散在出血点,第 14、28 天可见双肺局部苍白色,肺组织体积缩小不明显,硬度稍增加,弹性减低,可见少许细小出血点,但均较模型组轻。

2.2 肺组织肺泡炎和纤维化程度判定

HE 染色判断肺泡炎症程度,模型组大鼠肺组织早期表现为明显的炎症反应,肺间质及肺泡腔内可见大量的炎细胞浸润;此后肺泡炎随时间推移逐渐减轻,炎细胞浸润减少,肺泡间隔增宽,成纤维细胞增生。干预组大鼠肺组织亦有随时间推移而逐渐减轻的肺泡炎反应,但其程度较模型组轻,详见图 1~3。

Masson 染色判断肺组织纤维化程度,模型组大鼠早期可见少量胶原纤维增多,后期随时间推移胶原纤维逐渐增多,肺间质纤维化逐渐加重,第 28 天时可见较为典型的肺间质纤维化。干预组大鼠肺纤维化程度在早期与对照组无明显差

异,后期(第 28 天)出现肺组织纤维化改变,但程度较模型组为轻,详见图 1~3。

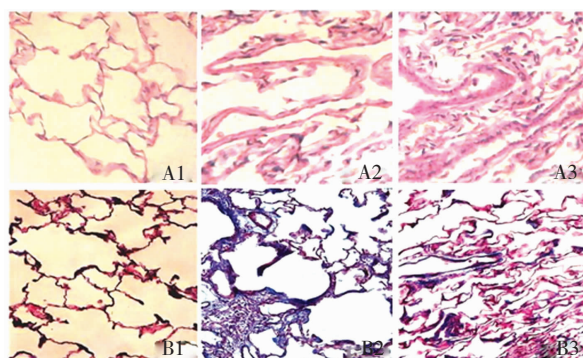


1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组

(图中 A 为 HE 染色,200 $\times$;B 为 Masson 染色,200 $\times$)

图 1 7 d 各组大鼠肺组织 HE 和 Masson 染色

Fig.1 HE and Masson staining of rat pulmonary tissues in each group on the 7th d after the intervention

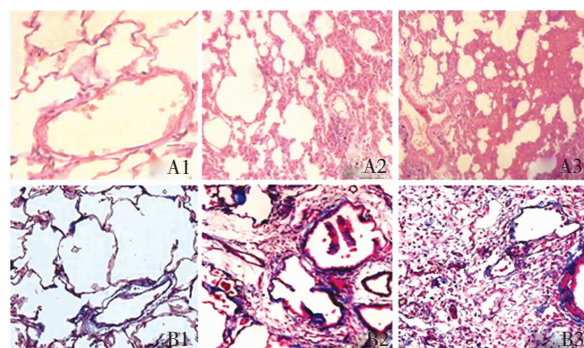


1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组

(图中 A 为 HE 染色,200 $\times$;B 为 Masson 染色,200 $\times$)

图 2 14 d 各组大鼠肺组织 HE 和 Masson 染色

Fig.2 HE and Masson staining of rat pulmonary tissues in each group on the 14th d after the intervention



1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组

(图中 A 为 HE 染色,200 $\times$;B 为 Masson 染色,200 $\times$)

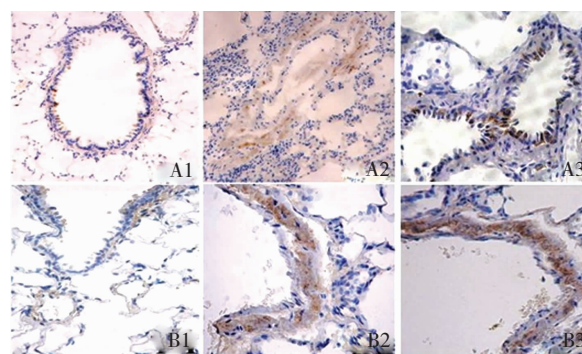
图 3 28 d 各组大鼠肺组织 HE 和 Masson 染色

Fig.3 HE and Masson staining of rat pulmonary tissues in each group on the 28th d after the intervention

2.3 肺组织 TGF- β 、CTGF 的表达

TGF- β 和 CTGF 在对照组肺组织均为弱表达,主要表达在肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞、肺成纤维细胞、支气管上皮

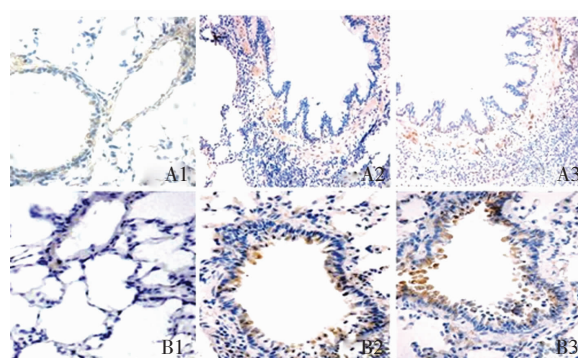
细胞中。模型组和干预组在各个时间点的 TGF- β 、CTGF 表达均较对照组有明显增加(P 均 <0.05),早期(第 7 天)即出现表达高峰,此后随时间推移逐渐下降。干预组各时间点 TGF- β 表达和 CTGF 的表达均较模型组减少(P 均 <0.05)。结果见表 1、图 4~6。



1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组 (图中 A 为免疫组化检测 CTGF, 400 $\times$;B 为免疫组化检测 TGF- β ,400 $\times$)

图 4 7 d 各组大鼠肺组织 CTGF、TGF- β 的表达

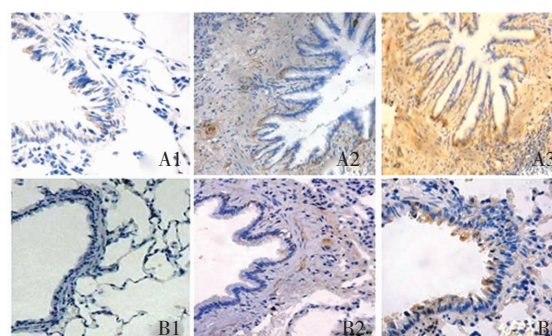
Fig.4 Expressions of CTGF and TGF- β in rat pulmonary tissues in each group on the 7th d after the intervention



1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组 (图中 A 为免疫组化检测 CTGF, 400 $\times$;B 为免疫组化检测 TGF- β ,400 $\times$)

图 5 14 d 各组大鼠肺组织 CTGF、TGF- β 的表达

Fig.5 Expressions of CTGF and TGF- β in rat pulmonary tissues in each group on the 14th d after the intervention



1. 对照组;2. 干预组;3. 模型组 (图中 A 为免疫组化检测 CTGF, 400 $\times$;B 为免疫组化检测 TGF- β ,400 $\times$)

图 6 28 d 各组大鼠肺组织 CTGF、TGF- β 的表达

Fig.6 Expressions of CTGF and TGF- β in rat pulmonary tissues in each group on the 28th d after the intervention

2.4 肺组织 I、Ⅲ型胶原的表达

对照组肺组织含有少量 I 型胶原(各时间点间比较 $P > 0.05$),模型组各时间点 I 型胶原表达量较对照组均有明显增加(P 均 <0.05),而干预组各时间点 I 型胶原表达均较模型组对应时间点表达明显减少(P 均 <0.05);Ⅲ型胶原得到类似结果,结果见表 2、图 7、8。

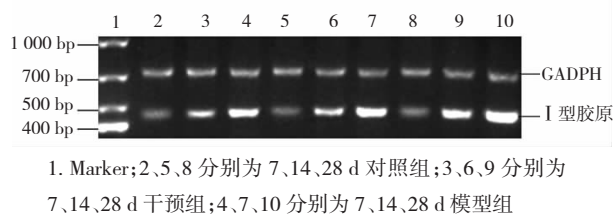


图 7 各组大鼠肺组织中 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达的 RT-PCR 的检测

Fig.7 mRNA expressions of type I and III collagen in rat pulmonary tissues of each group by RT-PCR

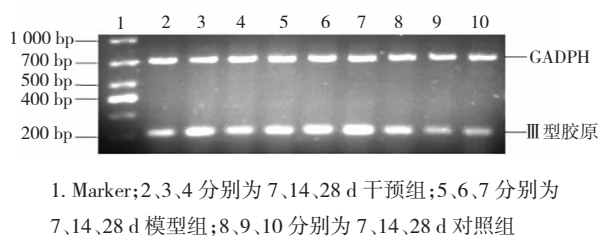


图 8 各组大鼠肺组织中Ⅲ型胶原 mRNA 表达的 RT-PCR 的检测

Fig.8 mRNA expressions of type III collagen in rat pulmonary tissues of each group by RT-PCR

3 讨论

肺纤维化是一种病因不明、进行性进展、致死性的纤维化疾病,其特点为肺间质中细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蛋白过度沉积导致功能肺泡单位闭塞,最终导致呼吸衰竭^[2],其发病机制尚不明确。近年大量研究均主张由于细胞因子网络相互作用,引发一系列的链式反应,刺激成纤维细胞分裂增殖,促进合成 ECM 蛋白,最终形成不可逆的肺纤维化。在众多细胞因子中, TGF- β 和 CTGF 是公认的肺纤维化形成与发展中最重要的细胞因子^[3],依据以往研究结果此模型炎症和纤维化之间的开关时间大约在气管内灌药后 9 d 左右,与以往研究于造模后 0 d 开始干预不同,本实验在炎症最重时(造模后第 7 天)开始布地奈德干预,使之更具有临床可行性,并应用雾化吸入方式以求防止以往全身激素治疗所致的免疫抑制、骨质疏松、严重感染等并发症发生。

本实验是通过复制博来霉素气管内灌药经典成熟模型保证肺纤维化动物模型的成功建立, HE 和 Masson 染色显示了各组各时期的肺炎和肺纤维化程度(图 1~3),证实肺纤维化模型复制成功。

免疫组化结果显示干预组各时间点 TGF- β 和 CTGF 表达水平均较模型组对应时间点明显降低,且随时间进展其表达水平逐渐下降(详见图 4~6、表

表 1 各组大鼠肺组织中 CTGF 和 TGF- β 表达的免疫组化染色检测 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

Tab.1 CTGF and TGF- β expressions in rat pulmonary tissues by immunohistochemical staining (IOD value, $\bar{x} \pm s$)

组别	7 d (n=5)		14 d (n=5)		28 d (n=5)	
	CTGF	TGF- β	CTGF	TGF- β	CTGF	TGF- β
对照组	0.18 $\pm$ 0.002	0.16 $\pm$ 0.013	0.15 $\pm$ 0.013	0.17 $\pm$ 0.021	0.17 $\pm$ 0.020	0.17 $\pm$ 0.012
干预组	0.24 $\pm$ 0.008 ^a	0.41 $\pm$ 0.010 ^a	0.22 $\pm$ 0.005 ^a	0.36 $\pm$ 0.011 ^a	0.20 $\pm$ 0.007 ^a	0.28 $\pm$ 0.031 ^a
模型组	0.31 $\pm$ 0.016 ^b	0.61 $\pm$ 0.014 ^b	0.29 $\pm$ 0.010 ^b	0.54 $\pm$ 0.008 ^b	0.26 $\pm$ 0.005 ^b	0.50 $\pm$ 0.012 ^b
F 值	197.44	1478	244.75	803.97	69.71	319.36
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与干预组比较, $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肺组织中 I、Ⅲ型胶原 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 mRNA expressions of type I and III collagen in rat pulmonary tissues of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	7 d (n=5)		14 d (n=5)		28 d (n=5)	
	I 型胶原	Ⅲ型胶原	I 型胶原	Ⅲ型胶原	I 型胶原	Ⅲ型胶原
对照组	0.46 $\pm$ 0.06	0.55 $\pm$ 0.04	0.43 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.05	0.61 $\pm$ 0.03
干预组	0.59 $\pm$ 0.01 ^a	0.68 $\pm$ 0.02 ^a	1.46 $\pm$ 0.03 ^a	1.02 $\pm$ 0.06 ^a	1.68 $\pm$ 0.05 ^a	0.90 $\pm$ 0.10 ^a
模型组	1.21 $\pm$ 0.05 ^b	1.03 $\pm$ 0.03 ^b	1.87 $\pm$ 0.13 ^b	1.10 $\pm$ 0.03 ^b	2.90 $\pm$ 0.18 ^b	1.25 $\pm$ 0.08 ^b
F 值	373.85	347.07	442.29	193.18	626.20	87.02
P 值	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

注: a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与干预组比较 $P < 0.05$

1),与 Ponticos 等^[4]研究结果一致。TGF- β 是肺纤维化研究最早认识的细胞因子,在肺损伤伤口修复过程中起着至关重要的作用,可促进 CTGF 的高表达,且临床和基础实验研究均已证实 CTGF 的表达与纤维化程度呈显著正相关,作为 TGF- β 的特异性下游分子,TGF- β 对 CTGF 基因转录有明显的调控作用^[5-6],后者通过促进 I、III 型胶原和纤维连接蛋白为代表的 ECM 产生,促使成纤维细胞转化为肌成纤维细胞,使之产生 ECM 进一步增多,最终导致进展性纤维化^[7]。CTGF 是组织开始修复和加强肺纤维化进展的关键生长因子,其致病机制目前大多主张 CTGF 基因表达与多种信号途径相关,如 LK5/Smad3 途径是 TGF- β 1 介导 CTGF 的最主要路径,CTGF 亦对 TGF- β 的生物效应起介导和加强作用,介导 TGF- β 的促 ECM 聚集和组织纤维化效应,CTGF 的存在可提高低浓度 TGF- β 与其受体的结合力,提升 TGF- β 的促纤维化效应^[8],TGF- β 在胞外激活后,与其胞膜上特异性受体结合发出信号,继而刺激细胞质 Smads 蛋白介导胞内信号传递,调解目的基因的转录,包括编码 ECM 蛋白如: I、III 型胶原蛋白^[9]。而过度纤维化的发生是以 I 型和 III 型胶原纤维增加为特征的^[10],胶原是肺的 ECM 的主要成分,对维持正常肺结构起着至关重要的作用,Tung 等研究^[10]还提出 I、III 型胶原是肺中存在的最主要的胶原亚型,在急性肺损伤早期即增加并影响呼吸力学,本实验行 RT-PCR 检测 ECM 代表 I、III 型胶原的表达,结果(图 7、8、表 2)提示干预组在各个作用时间点 I、III 型胶原含量较模型组均明显减少,跟以往研究结果一致,再次证实了以 ECM 增生和合成为主的肺纤维化形成机制。然而,对于 CTGF 是否独立引发疾病或者通过 TGF- β 信号激活还是其他信号转导途径致病,Sonnylal 等研究结果^[11]提示成纤维细胞中的 CTGF 的强制性表达未涉及典型的 TGF- β 路径,却促进了其他信号通路和下游转录程序的激活最终导致纤维化,但始终未证实有 CTGF 的特定感受器存在,推测 CTGF 可能通过其结构不同要件与多种细胞表面受体或辅助受体相互作用引起。因此,TGF- β 和 CTGF 的具体致纤维化途径还有待更进一步研究。

综上所述,该实验证明雾化吸入布地奈德具有明显的抗纤维化作用,其可能的治疗机制是减少肺

组织中 TGF- β 和 CTGF 的表达,从而减少 I、III 型胶原为代表的 ECM 合成。采用雾化吸入局部用药可减少全身激素所致副作用,故布地奈德雾化吸入有望成为临床安全有效抗纤维化用药的最佳选择之一。

参 考 文 献

- [1] Carpenter M, Epperly MW, Agarwal A, et al. Inhalation delivery of manganese superoxide dismutase plasmid/liposomes protects the murine lung from irradiation damage[J]. *Gene Therapy*, 2005, 12(8): 685-693.
- [2] Datta A, Scotton CJ, Chambers RC. Novel therapeutic approaches for pulmonary fibrosis[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2011, 163(1): 141-172.
- [3] Robinson PM, Blalock TD, Yuan R, et al. Hammerhead ribozyme-mediated knockdown of mRNA for fibrotic growth factors: transforming growth factor- β 1 and connective tissue growth factor[J]. *Methods Mol Biol*, 2012(820): 117-132.
- [4] Ponticos M, Holmes A M, Shi-Wen X, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis[J]. *Arthritis & Rheum*, 2009, 60(7): 2142-2155.
- [5] Kottmann RM, Hogan CM, Phipps RP, et al. Determinants of initiation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Respirology*, 2009, 14(7): 917-933.
- [6] Leask A, Parapuram SK, Xu SW, et al. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease? [J]. *Cell Commun. Signal*. 2009, 3(2): 89-94.
- [7] 刘 鹤,董利群,陈 菲,等.转化生长因子- β 和结缔组织生长因子在翼状胬肉中的表达[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(5): 496-498.
- [8] Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, et al. Glutathione redox regulates TGF- β -induced fibrogenic effects through Smad3 activation[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(2): 357-362.
- [9] Weng HL, Ciuculan L, Liu Y, et al. Profibrogenic transforming growth factor- β /activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2007, 46(4): 1257-1270.
- [10] Tung JN, Lang YD, Wang LF, et al. Paraquat increases connective tissue growth factor and collagen expression via angiotensin signaling pathway in human lung fibroblasts[J]. *Toxicol in Vitro*, 2010, 24(3): 803-808.
- [11] Sonnylal S, Xu SW, Leoni P, et al. Selective Expression of connective tissue growth factor in fibroblasts in vivo promotes systemic tissue fibrosis[J]. *Arthritis & Rheum*, 2010, 62(5): 1523-1532.

(责任编辑:冉明会)