

• 论著 •

博莱霉素致小鼠肺纤维化模型的动态演变及其发生机制

胡萍 高占成

【摘要】 目的 了解小鼠肺纤维化模型的动态演变,探讨博莱霉素致肺纤维化的作用机制。方法 36 只雄性 ICR 小鼠,按随机数字表法分为阴性对照组(NC 组)和肺纤维化模型组(FMA、FMB、FMC、FMD、FME 组),每组 6 只。除 NC 组外,其余各组经鼻滴入博莱霉素建立肺纤维化模型。分别于 6、14、21、28 和 35 d 处死各组小鼠,取外周血经流式细胞仪测定 T 细胞亚群 Th1/Th2 和 Tc1/Tc2,计数支气管肺泡灌洗液(BALF)中总细胞数和细胞分类,右肺行苏木素-伊红(HE)及 Masson 染色,测定左肺组织中羟脯氨酸(HYP)的含量;并提取左肺组织总 RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)了解肺组织中多种细胞因子的表达。测定 35 d 处死小鼠的潮气量(V_T)、0.1 秒用力呼气容积/用力肺活量(FEV0.1/FVC)和静态肺顺应性(Cst)。**结果** ①肺纤维化各组小鼠 BALF 中细胞总数与 NC 组比较均显著增高(P 均 <0.01),且其肺组织中 HYP 含量除 FMA 组外均显著升高(P 均 <0.01)。②FME 组 V_T 和 Cst 均较 NC 组明显降低(P 均 <0.01),FEV0.1/FVC 则显著升高($P<0.05$)。③在肺纤维化模型炎症期(FMA 组),T 细胞 Th1/Th2 和 Tc1/Tc2 之间的平衡呈 Th1、Tc1 优势表达为主;在纤维化形成期(FMB、FMC 组),则以 Th2、Tc2 优势表达;在肺纤维化形成后,Th1、Tc1 再度呈优势表达的状态。④肺纤维化模型组中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)和金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)均较 NC 组显著升高(P 均 <0.01)。**结论** 博莱霉素致肺纤维化小鼠肺功能为限制性通气功能障碍,Th2、Tc2 及促纤维化生成因子在肺纤维化形成过程中发挥重要作用。

【关键词】 博莱霉素; 肺间质纤维化; 肺功能; 细胞因子

Kinetics and mechanism in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis model HU Ping, GAO Zhan-cheng. Department of Respiratory Medicine, People's Hospital, Peking University, Beijing 100044, China Corresponding author: GAO Zhan-cheng (Email: gaozhancheng@163.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the kinetics of pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and its mechanism in mice. **Methods** Thirty-six male ICR mice were randomized as a negative control (NC) group and pulmonary fibrosis model (FM) groups (FMA, FMB, FMC, FMD, FME subgroups). Except for NC group, mice in the other groups were given bleomycin by nasal instillation. Animals in each group were sacrificed on day 6, 14, 21, 28 and 35, respectively. T lymphocytes were quantified for Th1/Th2 and Tc1/Tc2 by flow cytometry. Accumulation of inflammatory cells in bronchioalveolar lavage fluid (BALF) was quantified by cell count. The sections of the right lung were stained with either hematoxylin-eosin (HE) or Masson trichrome. The left lung was weighed and its hydroxyproline (HYP) content was assayed. Multi-cytokine expression in lung tissue was assayed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). On day 35, the tidal volume (V_T), forced expiratory volume in 1 second/forced vital capacity (FEV 0.1/FVC), static compliance (Cst) of mice were determined before they were sacrificed. **Results** ①The total cell number in BALF in pulmonary fibrosis groups was statistically significantly higher than that in NC group (all $P<0.01$), and HYP content in lung tissue in pulmonary fibrosis groups was statistically significantly increased than that in NC group except for group FMA (all $P<0.01$). ② V_T and Cst in FME group were statistically significantly decreased than those in NC group (both $P<0.01$), and FEV 0.1/FVC was statistically significantly increased ($P<0.05$). ③Th1 and Tc1 were demonstrated as the dominant expression in the acute inflammatory stage; Th2 and Tc2 were the dominant expression in the fibrosis forming stage, and then Th1 and Tc1 were again the dominant expression at the terminal stage of pulmonary fibrosis. ④Compared with the content of cytokine in the lung in NC group, the expression of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) mRNA were significantly higher in FM groups (all $P<0.01$). **Conclusion** The changes in lung function of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice are typical of that of restrictive ventilatory disorder. Th2, Tc2 and fibrotic promoting growth factors (TGF- β_1 , TIMP-1, etc.) play pivotal roles in the pathogenesis of pulmonary fibrotic process.

【Key words】 bleomycin; pulmonary interstitial fibrosis; lung function; cytokine

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7042031)

作者单位:100044 北京大学人民医院呼吸内科

通讯作者:高占成(Email:gaozhancheng@163.com)

作者简介:胡萍(1980-),女(汉族),山东人,硕士研究生(Email:huping_wind@yahoo.com.cn)。

间质性肺疾病(ILD)的病理改变可严重影响肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞功能及气体交换,病程终末期会出现呼吸衰竭,目前尚无明确有效的治疗方法。对博莱霉素致小鼠肺纤维化发生不同阶段的肺组织病理、肺组织中不同细胞因子的表达以及外周血 T 细胞亚型进行研究,以探讨肺纤维化在ILD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。

1 材料与方法

1.1 实验材料:雄性 SPF 级 ICR 小鼠,体重 28 g 左右,由北京维通利华实验动物技术公司提供。博莱霉素粉剂每支 15 mg(日本化药株式会社),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(美国 Promega 公司)。氯胺 T 溶液(氯胺 T 1.41 g,正丙醇 10 ml,三蒸水 10 ml,柠檬酸缓冲液 80 ml);Ehrlich 溶液(对二甲氨基苯甲醛 12.5 g,正丙醇 46.5 ml,体积分数为 70%的过氯酸 19.5 ml);标记荧光单抗试剂(BDIS),包括 CD8-别藻蓝蛋白(CD8-APC), γ -干扰素-异硫氰酸荧光素(IFN- γ -FITC),CD3e-PE-菁染料(CD3e-PE-CY5),白细胞介素-4-藻红蛋白(IL-4-PE),大鼠 IgG₁-FITC(Rat-IgG₁-FITC),大鼠 IgG₁-PE(Rat-IgG₁-PE)。AniRes2003 动物肺功能分析系统、FACSort 流式细胞仪、SX721 分光光度计、组织匀浆机、基因扩增仪、S×100 凝胶成像系统。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立和分组:按随机数字表法将雄性 ICR 小鼠分为 6 组,每组 6 只。阴性对照组(NC)0 d 经鼻滴入生理盐水 50 μ l;5 个肺纤维化模型(FM)组于 0 d 经鼻滴入博莱霉素 6 μ g/g(50 μ l)。FMA、FMB、FMC 和 FMD 组分别于 6、14、21 和 28 d 处死,FME 和 NC 组于 35 d 处死。

1.2.2 小鼠呼吸生理测定:用 AniRes2003 动物肺功能分析系统测定 NC 组及 FME 组稳定状态潮气量(V_T)、静态肺顺应性(Cst)及用力肺活量(FVC)等呼吸生理参数。测定前称量小鼠体重,用质量分数为 1%的戊巴比妥钠 110 μ g/g 腹腔注射麻醉,在甲状软骨下方 1 mm 处行气管插管,置于体描箱中给予呼吸机辅助通气。呼吸机参数设置为:呼吸频率 100 次/min,吸:呼为 1.0:1.5,实验过程中采用气道压力为 10 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa)进行通气,状态平稳后描计 1 min,测定 V_T 和 Cst,随后测定 FVC,设定 FVC 为 3 倍 V_T 。

1.2.3 流式细胞仪测定外周血 T 细胞亚群:给予

小鼠 0.5 ml 氯胺酮(10 g/L)腹腔注射,右心室取血后用肝素钠(25 kU/L)抗凝。每个体系中包括:佛波酯(PMA)5 μ g/L,离子霉素 500 μ g/L,Golgi-stop 0.35 ml/L,抗凝血 0.25 ml,加 1640 培养基补至 1 ml,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5%的 CO₂ 孵箱中孵育 4~6 h。不同荧光抗体(CD3e-PE-CY5、CD8-APC、IFN- γ -FITC 和 IL-4-PE)标记细胞膜或胞浆内细胞因子,上机测定,获取 5×10^4 个细胞。

1.2.4 标本处理:各组小鼠处死后获取支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织。左肺置于-70 $^{\circ}$ C 待测羟脯氨酸(HYP)及提取 RNA;右肺经体积分数为 4%的多聚甲醛固定和石蜡包埋、切片后进行苏木素-伊红(HE)及 Masson 染色。测量每只小鼠的 BALF 体积,在光学显微镜下计数 BALF 中总细胞数,并行 HE 染色和细胞分类计数(>200 个有核细胞/片)。

1.2.5 HYP 检测:取 50 mg 肺组织,用 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)进行匀浆,加入 4 ml 6 mol/L HCl,126 $^{\circ}$ C 酸解 3 h。使用 6 mol/L 碳酸氢钠(NaOH)调节 pH 为 7.0。吸取 1 ml 混合后的液体,加入柠檬酸缓冲液 0.5 ml、氯胺 T 溶液 1 ml,室温下放置 20 min。加入 Ehrlich 液 1 ml,65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min。采用分光光度计 550 nm 波长比色,记录吸光度(A)值。使用 HYP 标准溶液绘制标准曲线,并根据标准曲线计算待测标本的 HYP 含量,并和肺组织重量比较,结果以 μ g/g 表示。

1.2.6 肺组织 RNA 提取及半定量 RT-PCR 检测:肺组织匀浆后按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA;按试剂盒说明进行逆转录,将逆转录产物加入标准 PCR 反应体系,分别扩增内参磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,30 个循环)和待测细胞因子 IFN- γ (32 个循环)、IL-4(35 个循环)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1,32 个循环)、IL-12(35 个循环)、IL-13(32 个循环)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2,35 个循环)、MMP-9(32 个循环)和金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1,32 个循环)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,30~35 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 7 min。RT-PCR 产物以质量分数为 1%的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统摄像,进行 A 值扫描并作相对量分析,数值以待测细胞因子电泳条带 A 值与 GAPDH 电泳条带 A 值的比值表示。

1.3 统计学分析:数据用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。结果以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,对各组数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和组间

比较(方差齐用 LSD 检验,不齐用 Games - Howell 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 BALF 中细胞总数和细胞分类计数的变化(表 1): BALF 中细胞总数在各纤维化组中均明显高于 NC 组(P 均 < 0.01),其中以 FMA 组最为明显。除 FME 组外,其余各组淋巴细胞计数均显著高于 NC 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),以 FMB 组增高最为明显。中性粒细胞计数则在早期或早中期明显高于 NC 组(FMA 组、FMB 组 P 均 < 0.01),其余各组与 NC 组相比差异均无显著性。

由此可见,小鼠 FM 建立后,在早期(FMA 组) BALF 中细胞总数和中性粒细胞计数增高最明显,随着时间推移,细胞总数和中性粒细胞计数均呈逐渐下降趋势;而淋巴细胞计数则逐渐增加,14 d 时(FMB 组)高达 0.276 ± 0.020 ,随后均呈下降趋势。

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数、细胞分类计数及肺组织中 HYP 含量($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

Table 1 Total cell number, differential cell count in BALF and HYP content in lung tissue of each group ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

组别	BALF			肺组织 HYP ($\mu\text{g/g}$)
	细胞总数($\times 10^6/\text{L}$)	淋巴细胞	中性粒细胞	
NC 组	4.91 ± 0.82	0.013 ± 0.003	0	638.44 ± 24.83
FMA 组	$202.12 \pm 5.21^{\Delta}$	$0.108 \pm 0.015^{*\diamond}$	$0.343 \pm 0.032^{\Delta}$	639.73 ± 30.86
FMB 组	$135.17 \pm 4.89^{\Delta\#}$	$0.276 \pm 0.020^{\Delta}$	$0.076 \pm 0.007^{\Delta\#}$	$1097.49 \pm 50.32^{\Delta}$
FMC 组	$116.35 \pm 7.07^{\Delta\#}$	$0.075 \pm 0.011^{*\diamond}$	0	$1242.81 \pm 12.98^{\Delta}$
FMD 组	$75.66 \pm 3.88^{\Delta\#}$	$0.049 \pm 0.006^{\Delta\diamond}$	$0.002 \pm 0.002^{\#}$	$1170.25 \pm 27.59^{\Delta}$
FME 组	$53.11 \pm 3.57^{\Delta\#}$	$0.029 \pm 0.004^{\diamond}$	$0.010 \pm 0.004^{\#}$	$1230.93 \pm 39.23^{\Delta}$

注:与 NC 组比较: * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 与 FMA 组比较: $\# P < 0.01$; 与 FMB 组比较: $\diamond P < 0.01$

2.2 各组小鼠肺组织中 HYP 的含量(表 1): 与 NC 组相比,除 FMA 组外,各组 HYP 含量均显著升高(P 均 < 0.01)。除 FMA 组外,纤维化各组间差异均无显著性。说明早期炎症阶段肺内以炎性细胞浸润为主,尚未有纤维化形成,博莱霉素所致肺纤维化是在炎症后期(14 d 后)开始逐渐出现的。

2.3 各组小鼠肺组织病理变化: ① NC 组小鼠气道上皮光滑,气道周围无炎性细胞浸润,肺泡壁正常(彩色插页图 1A); ② FMA 组可见支气管周围中性粒细胞及巨噬细胞浸润,肺泡腔内可见红细胞、巨噬细胞及中性粒细胞(彩色插页图 1B); ③ FMB 组小鼠可见肺泡壁增厚,局灶纤维化形成,呼吸性细支气管及肺泡管扩张(彩色插页图 1C); ④ FMC 组小鼠较 FMB 组纤维化增多,肺泡腔内可见淋巴细胞和巨噬细胞浸润(彩色插页图 1D); ⑤ FMD 组小鼠可

见纤维化弥漫发展,在肺泡腔及支气管周围仍可见大量炎性细胞浸润(彩色插页图 1E); ⑥ FME 组小鼠可见弥漫、致密的肺纤维化,炎性细胞浸润有所减少(彩色插页图 1F)。

2.4 35 d 肺纤维化小鼠呼吸生理的改变(表 2): 与 NC 组比较, FME 组体重减轻($P < 0.01$); V_T 、Cst 均显著降低(P 均 < 0.01); 0.1 秒用力呼气容积/用力肺活量比值(FEV0.1/FVC)较 NC 组有所升高($P < 0.05$)。说明 Cst 明显下降,肺通气功能呈典型的限制性通气功能障碍表现。

表 2 35 d 小鼠体重、 V_T 、FEV0.1/FVC 和 Cst 的变化($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

Table 2 Changes of the body weight, V_T , FEV0.1/FVC and Cst on day 35 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

组别	体重(g)	$V_T(\mu\text{l})$	FEV0.1/FVC	Cst(L·cm H ₂ O)
NC 组	40.23 ± 1.36	453.35 ± 7.85	42.43 ± 1.08	4.28 ± 0.11
FME 组	$18.56 \pm 3.37^{**}$	$153.86 \pm 40.56^{**}$	$72.86 \pm 7.38^*$	$1.45 \pm 0.38^{**}$

注:与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.5 肺纤维化进程中外周血 Tc1、Tc2、Th1 和 Th2 的变化(表 3): 与 NC 组比较,外周血 Tc1 所占比例在急性炎症反应期(FMA 组)显著升高($P < 0.01$),在纤维化形成期(FMB、FMC 组)则表现为显著降低的趋势(P 均 < 0.01); 而 Tc2 细胞在急性炎症反应期和纤维化形成期均明显增加(FMA、FMB、FMC 组, P 均 < 0.01),但在纤维化形成后期,则逐渐降为正常。

表 3 各组小鼠外周血中 Th1、Th2、Tc1 和 Tc2 细胞所占比例($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

Table 3 Proportion of Th1, Th2, Tc1 and Tc2 cells in the peripheral blood in each group ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 6$)

组别	Tc1(%Tc 细胞)	Tc2(%Tc 细胞)	Th1(%Th 细胞)	Th2(%Th 细胞)
NC 组	1.82 ± 0.18	0.71 ± 0.08	2.17 ± 0.23	0.82 ± 0.06
FMA 组	$2.52 \pm 0.13^{**}$	$1.49 \pm 0.10^{**}$	2.44 ± 0.08	$1.36 \pm 0.07^{**}$
FMB 组	$1.15 \pm 0.10^{**}$	$2.00 \pm 0.12^{**}$	$1.61 \pm 0.09^*$	$2.32 \pm 0.10^{**}$
FMC 组	$0.71 \pm 0.10^{**}$	$1.77 \pm 0.18^{**}$	$0.81 \pm 0.14^{**}$	$1.59 \pm 0.14^{**}$
FMD 组	1.95 ± 0.17	0.86 ± 0.06	$2.88 \pm 0.25^*$	$1.45 \pm 0.16^{**}$
FME 组	1.94 ± 0.19	0.95 ± 0.06	1.99 ± 0.26	0.83 ± 0.09

注:与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

对 Th 细胞, Th1 细胞在纤维化形成期的比例明显减少(FMB 组 $P < 0.05$, FMC 组 $P < 0.01$); 与 Tc2 细胞相似, Th2 细胞无论在急性炎症反应期还是纤维化形成期均有明显增高(FMA、FMB、FMC、FMD 组, P 均 < 0.01),在肺纤维化形成后期逐渐降为正常(FME 组, $P > 0.05$)。

由此可见,在用博莱霉素所致 FM 小鼠炎症期, T 细胞呈 Tc1、Th1 优势表达为主; 在纤维化形成

表 4 各组小鼠肺组织中细胞因子 mRNA 表达半定量 RT-PCR 结果比较($\bar{x} \pm s_x, n=6$)Table 4 Comparison of cytokine mRNA expression by semi-quantitative RT-PCR in the lung tissue of each group($\bar{x} \pm s_x, n=6$)

组别	IFN- γ mRNA	IL-4 mRNA	IL-12 mRNA	IL-13 mRNA	TGF- β 1 mRNA	MMP-2 mRNA	MMP-9 mRNA	TIMP-1 mRNA
NC 组	0.17 \pm 0.03	0.16 \pm 0.02	0.18 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.32 \pm 0.07	0.18 \pm 0.03	0.26 \pm 0.04
FMA 组	0.18 \pm 0.03	0.14 \pm 0.05	0.20 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03	0.22 \pm 0.06	0.36 \pm 0.09	0.28 \pm 0.07	0.49 \pm 0.13
FMB 组	0.18 \pm 0.04	0.19 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.05	0.24 \pm 0.06	0.23 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03
FMC 组	0.12 \pm 0.04	0.21 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04	0.21 \pm 0.04	0.44 \pm 0.06**	0.25 \pm 0.04	0.17 \pm 0.04	0.49 \pm 0.07
FMD 组	0.08 \pm 0.01	0.19 \pm 0.03	0.18 \pm 0.03	0.21 \pm 0.03	0.59 \pm 0.07**	0.33 \pm 0.06	0.16 \pm 0.03	0.73 \pm 0.05**
FME 组	0.10 \pm 0.02	0.20 \pm 0.02	0.21 \pm 0.05	0.17 \pm 0.02	0.71 \pm 0.02**	0.30 \pm 0.06	0.16 \pm 0.02	0.71 \pm 0.05**

注:与 NC 组比较:** $P < 0.01$

期,则以 Tc2、Th2 优势表达;在肺纤维化形成后, Tc1、Th1 再度呈优势表达的状态。

2.6 各组肺组织中细胞因子表达的变化见表 4。

2.6.1 肺组织中 TGF- β 1、TIMP-1 的 mRNA 表达:

与 NC 组相比, FMC、FMD 和 FME 组 TGF- β 1 mRNA 与 FMD、FME 组 TIMP-1 mRNA 表达均显著增高(P 均 < 0.01), 而 TIMP-1 mRNA 表达在 FMA、FMB 和 FMC 组差异均无显著性。

2.6.2 肺组织中 IFN- γ 、IL-4、IL-12、IL-13、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达:

各组间上述各指标比较差异均无显著性。

3 讨论

肺间质纤维化的形成是许多慢性肺疾病的共同结局,其病理特点是长期肺部炎症导致肺泡持续性损伤以及细胞外基质(ECM)的反复破坏、修复和改建。博莱霉素引起的急性肺损伤(ALI)可导致成纤维细胞及肌成纤维细胞的增生,这些增生的细胞可产生大量 ECM,最终导致纤维化的形成。

我们的实验结果显示:给予博莱霉素后小鼠表现为炎症反应,早期为急性中性粒细胞浸润,随后过渡为淋巴细胞增多的慢性表现,与 Izbicke 等^[1]的研究结果一致。Tarnell 等^[2]的研究指出,纤维化模型 BALF 中中性粒细胞比血液中中性粒细胞产生更多的超氧阴离子。然而这种反应是暂时的,在明显纤维化发生之前中性粒细胞就已恢复到正常水平,所以这些细胞可能并不直接作用于纤维化的起始。而 T 细胞表达的细胞因子则能直接刺激肺成纤维细胞的增殖,并具有一定的促纤维化活性。研究发现,给予肺纤维化小鼠抗 CD3 抗体,可明显减少纤维化损伤的范围^[3]。同时我们发现,博莱霉素所致肺损伤早期肺组织及 HYP 含量均提示没有纤维化形成;而在制模 14 d 肺组织开始出现肺泡壁增厚和局灶纤维化形成,同时 HYP 含量也提示肺组织内胶原纤维

含量增加。说明 FM 中淋巴细胞浸润为主的慢性炎症有可能成为纤维化应答的关键始动因素。

肺纤维化患者肺功能的特点为限制性通气功能障碍(包括肺总量降低, FEV0.1/FVC 正常或增高, Cst 减低),伴有弥散功能减退和低氧血症。这在肺间质疾病诊断中是不可或缺的。然而国内外对肺纤维化动物呼吸生理方面的研究甚少。在本实验中,我们应用 AniRes2003 动物肺功能分析系统对 35 d FM 组及 NC 组进行肺功能测定,测定参数为 V_T 、Cst 和 FEV0.1/FVC。结果显示,博莱霉素致 FM 小鼠 V_T 的及 Cst 均显著下降,且无明显气道阻塞,其 FEV0.1/FVC 明显增高。

Th1、Th2 是 CD4⁺T 辅助细胞的两个亚群,其分泌的细胞因子称 Th1/Th2 细胞因子。Th1/Th2 细胞因子表达失衡反映了不同的免疫病理过程:抗原或致病原作用于机体,首先诱发 I 型免疫应答, Th1 型因子占优势;若抗原持续存在,机体对慢性刺激原的继发反应转为以 II 型免疫应答为主,产生 Th2 型因子优势表达现象。Th2 型因子优势表达则是引起慢性炎症持续发展、组织修复不协调、成纤维细胞增生、ECM 沉积、血管异常增多和终末期组织纤维化的重要原因^[4]。

在本实验过程中我们发现,炎症期 T 细胞各组分除 Th1 外,均较 NC 组明显增加,并表现为 Th1 优势表达,这与 Dalton 等^[5]的研究一致;同时也存在 Tc1 的优势表达。在纤维化形成期表现为 Th2、Tc2 优势表达(14、21 d),促进了成纤维细胞的增生以及 ECM 的沉积,最终形成纤维化。

众所周知,细胞因子与细胞因子网络在肺纤维化发展中发挥重要作用。国内外学者研究肺纤维化发病机制的焦点是这些细胞因子的来源和表达水平,而 TGF- β 1 是致纤维化的关键性细胞因子。TGF- β 1 能促进成纤维细胞合成胶原蛋白、纤维连

结蛋白、蛋白多糖等 ECM, 促进 ECM 的沉积; 此外, TGF- β 1 还能减少基质降解蛋白酶的产生, 增加这些蛋白酶的抑制物^[6]。本实验结果显示, 在纤维化形成后期(21、28 和 35 d) TGF- β 1 表达持续升高, 由于 TGF- β 1 的主要来源是增生的间质细胞, 包括大量的成纤维细胞^[7], 而间质细胞是在纤维化形成期开始增生的, 说明肺间质局部 TGF- β 1 表达在纤维化持续发展过程中发挥重要作用。

肺间质纤维化主要特点之一就是肺间质胶原沉积, MMPs 及其抑制因子在这一过程中发挥重要作用。肺泡上皮基底膜是一种特殊的 ECM 形式, IV 型胶原是其重要组成成分。而 MMP-2 和 MMP-9 作用底物主要是 IV 型胶原, 它们在肺纤维化发病中的作用日益受到重视。Selman 等^[8]研究表明, 特发性肺纤维化(IPF)患者 MMP-2 和 MMP-9 的过度产生可能在破坏基底膜而使成纤维细胞侵入肺泡腔引起肺纤维化中发挥一定作用。本研究结果显示, 炎症早期 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 处于正常水平, MMPs/TIMPs 比例仍维持相对平衡状态, 可能是炎症早期未出现 ECM 积聚之故。而在肺纤维化形成后(28 和 35 d) TIMP-1 mRNA 表达明显升高, 略滞后于 TGF- β 1 的高表达, 可能与 TGF- β 1 高表达引起的级联反应相关^[6], 继之导致 MMPs/TIMPs 比例失衡, 促使 MMPs 溶解 ECM 活性下降, 导致胶原沉积。但由于细胞因子网络的多样性和复杂性, 以及本实验方法的敏感性和实验时间段选择的局限性等, 各种细胞因子之间在肺纤维化形成过程中的相互作用与其确切的调节机制仍有

待于进一步深入探讨。

综上所述, 博莱霉素致小鼠 FM 的肺功能具有典型的限制性通气功能障碍特征, Th2、Tc2 及促纤维化生长因子(如 TGF- β 1、TIMP-1 等)在肺纤维化形成过程中发挥着十分重要的作用。

参考文献:

- 1 Izbicki G, Segel M J, Christensen T G, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis[J]. *Int J Exp Pathol*, 2002, 83: 111-119.
- 2 Tarnell E B, Oliver B L, Johnson G M, et al. Superoxide anion production by rat neutrophils at various stages of bleomycin-induced lung injury[J]. *Lung*, 1992, 170: 41-50.
- 3 Huaux F, Liu T, McGarry B, et al. Eosinophils and T lymphocytes possess distinct roles in bleomycin-induced lung injury and fibrosis[J]. *J Immunol*, 2003, 171: 5470-5481.
- 4 Lukacs N W, Hogaboam C, Chensue S W, et al. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis[J]. *Chest*, 2001, 120(Suppl 1): 5S-8S.
- 5 Dalton D K, Pitts-Meek S, Keshav S, et al. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes[J]. *Science*, 1993, 259: 1739-1742.
- 6 Border W A, Noble N A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis[J]. *N Engl J Med*, 1994, 331: 1286-1292.
- 7 吴浩, 张月娥, 许祖德, 等. 大鼠肺纤维化血小板源性生长因子、血小板源性生长因子-受体、转化生长因子- β 、转化生长因子- β 受体的表达[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2000, 9: 157-160.
- 8 Selman M, Ruiz V, Cabrera S, et al. TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis: a prevailing nondegradative lung microenvironment [J]? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: L562-L574.

(收稿日期: 2006-03-31 修回日期: 2006-05-25)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

2006 呼吸支持技术高级研修班(第 6 届)报名通知

首都医科大学附属北京朝阳医院北京呼吸疾病研究所将于 2006 年 10 月 13-22 日在北京举办国家级继续教育项目“2006 呼吸支持技术高级研修班(第 6 届)”, 项目负责人为王辰教授。研修班以实用技术与最新进展相结合为宗旨, 邀请本领域的知名专家(王辰、刘大为、席修民、陈荣昌、俞森洋、邱海波、杜斌、陈惠德等)对呼吸支持技术及呼吸危重症领域的实用技术和新进展进行讲座。主要内容包括: 呼吸衰竭、心肺交互作用、呼吸力学、呼吸肌疲劳、机械通气模式、无创通气、困难撤机、人工气道的建立与管理、非常规通气技术、多器官功能障碍综合征(MODS)、严重感染、重症监护室(ICU)建设与管理等。此外, 研修班将就大家感兴趣的热点问题进行专题研讨和病例分析, 如通气模式、无创通气、撤机、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、免疫抑制患者的机械通气等。

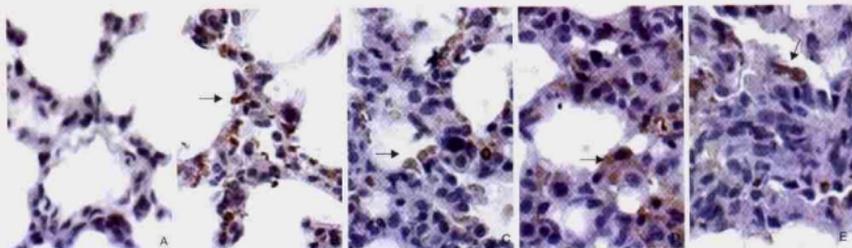
报名方法: 将姓名、性别、单位、职务、职称、地址、邮编、电话、传真、Email 地址写明后寄至: 北京市朝阳区白家庄路 8 号, 北京朝阳医院北京市呼吸疾病研究所; 邮编: 100020; 杜敏捷医生收。信封注明“2006 呼吸支持技术高级研修班”。联系电话: 010-65060167, 010-85231893; 传真: 010-65060167。也可通过电子邮件 sunbing@vip.sohu.net 报名, 或登陆 www.birm.com.cn/index.do 或 www.bjcyh.com.cn 网站查询相关更新内容。

研修班学费及资料费每人 1 280 元, 住宿费 100 元/d, 伙食费 50 元/d, 由组委会统一安排, 费用自理。

(首都医科大学附属北京朝阳医院, 北京呼吸疾病研究所)

水通道蛋白5在高氧肺损伤中的表达及调节机制

(正文见462页)



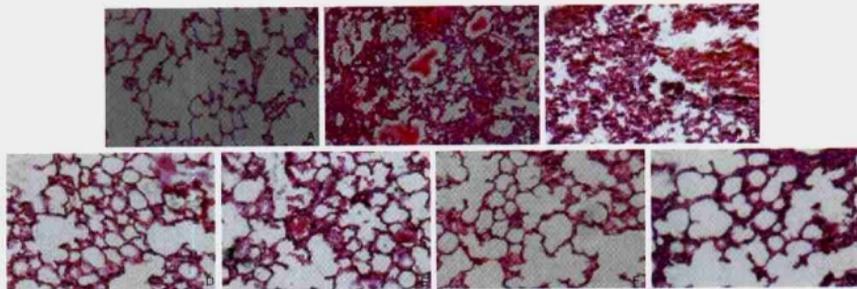
A为阴性对照组, B为空气对照组, C为高氧暴露3 d组, D为高氧暴露7 d组, E为高氧暴露14 d组, 箭头示肺泡I型上皮细胞

图1 高氧暴露不同时段AQP5在肺内表达和分布的变化 (DAB, $\times 400$)

Figure 1 Change of distribution and expression of AQP5 at different stages exposed to hyperoxia (DAB, $\times 400$)

不同剂量猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响

(正文见470页)



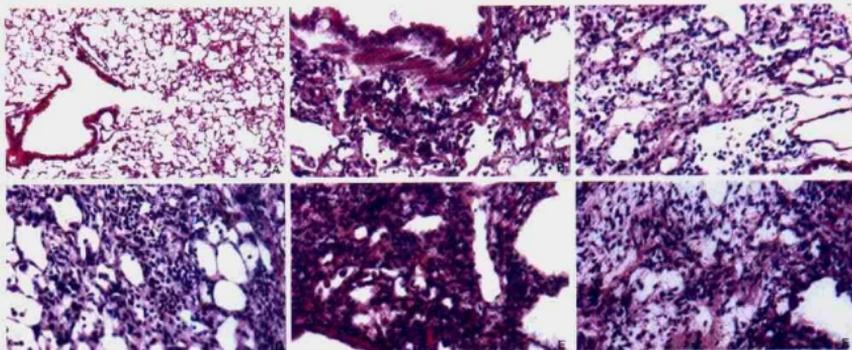
A-G分别为假手术组、模型组、PPS50、80、100、150、200 mg/kg组

图1 不同剂量PPS对ALI大鼠肺组织病理学的影响 (HE, $\times 200$)

Figure 1 Influence of different doses of PPS on the pathology of lung tissue in ALI rats (HE, $\times 200$)

博莱霉素致小鼠肺纤维化模型的动态演变及其发生机制

(正文见474页)



A, NC组($\times 100$); B, BMA组($\times 200$); C, FMC组($\times 200$); D, FMC组($\times 200$); E, FMD组($\times 200$); F, FME组($\times 200$)

图1 各组小鼠肺组织病理学变化 (HE)

Figure 1. Pathological changes in lung tissue of mice in each group (HE)