

· 论 著 ·

# 肺纤维化形成过程中大鼠肺成纤维细胞分泌 TGF- $\beta$ mRNA 及 HGF mRNA 对肺泡 II 型上皮细胞的影响\*

黄 莺<sup>1</sup>, 叶燕青<sup>2</sup>, 孙洁民<sup>1</sup>

(1. 武汉市第一医院呼吸内科 430022; 2. 武汉大学中南医院呼吸内科 430071)

**摘要:**目的 研究在肺纤维化形成过程中肺成纤维细胞对肺泡 II 型上皮细胞的影响。方法 用半定量 RT-PCR 法检测肺成纤维细胞及肺泡 II 型上皮细胞共培养过程中转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )mRNA、肝细胞生长因子(HGF)及肺泡表面活性蛋白 A(SP-A)mRNA 的表达变化。结果 (1)SP-A mRNA 的表达实验组低于对照组( $P < 0.01$ ); (2)HGF、TGF- $\beta$  mRNA 的表达实验组高于对照组( $P < 0.01$ )。结论 在肺纤维化的形成过程中,肺成纤维细胞未能促进肺泡 II 型上皮细胞的生长。

**关键词:**肺纤维化; 肺泡 II 型上皮细胞; 肺成纤维细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.002

中图分类号:R365.563

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)19-2548-02

## Effect of pulmonary fibroblast express TGF- $\beta$ mRNA and HGF mRNA to II alveolar epithelial cell in the rat model of pingyangmycin induced pulmonary fibrosis\*

HUANG Ying<sup>1</sup>, YE Yan-qing<sup>2</sup>, SUN Jie-min<sup>1</sup>

(1. Department of Respiratory, Wuhan NO. 1 Hospital, Wuhan 430022, China;

2. Department of Respiratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract:** Objective To investigate the effect of pulmonary fibroblast to II Alveolar Epithelial cell in the rat model of Pingyangmycin induced pulmonary fibrosis. **Methods** The levels of TGF- $\beta$ mRNA, HGF mRNA expressed by pulmonary fibroblasts and SP-AmRNA expressed by II alveolar epithelial cells were detected by demi-quantitate RT-PCR. **Results** The expression of SP-AmRNA, in the experiment group was lower than the control group( $P < 0.01$ ), and the expression of TGF- $\beta$ mRNA, HGF mRNA in the experiment group was increased than the control group( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Pulmonary fibroblasts can't improve the generation and recovery of II alveolar epithelial cells in the procession of pulmonary fibrosis.

**Key words:** pulmonary fibrosis; II alveolar epithelial; pulmonary fibroblast

肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)是由多种原因引起的弥漫性肺部炎症性疾病,其病理特征是肺泡上皮损伤、成纤维细胞灶的形成、灶性单核细胞浸润以及细胞外基质的过度沉淀,最终导致了肺组织结构的异常重塑<sup>[1-3]</sup>。

有研究表明,正常肺成纤维细胞能促进肺泡 II 型上皮细胞的生长,但这种促进作用在 PF 的病变过程中是否存在尚无报道,本实验通过对 PF 过程中将成纤维细胞和肺泡 II 型上皮细胞共培养,然后在 7、28 d 通过 RT-PCR 分别检测肺泡 II 型上皮细胞分泌的肺泡表面活性蛋白 A(SP-A)以及肺成纤维细胞分泌的转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、肝细胞生长因子(HGF)的 mRNA 表达来观察成纤维细胞对肺泡 II 型上皮细胞的影响,并研究其可能机制。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** 注射用平阳霉素(pingyang bleomycin)粉剂(天津市天河制药有限公司产品),DMEM 培养基(美国 Invitrogn 产品),小鼠抗大鼠 Vimentin, Trizol 试剂(上海华舜生物工程有限公司),M-MLV 逆转录酶(Promega 公司产品),大鼠 TGF- $\beta$ 、HGF、SP-A 及 GAPDH 引物(Primer5.0 设计,由北京奥科生物科技公司合成)等。

**1.2 动物分组** 清洁级 SD 大鼠(雌性,6~10 周龄,体质量 130~200 g,由武汉大学医学院动物部提供)36 只。随机分为平阳霉素组和生理盐水组,平阳霉素组气管内给药复制大鼠

PF 动物模型(平阳霉素 3 mg/kg),生理盐水组气管内注射等量生理盐水。分别于 7、28 d 处死平阳霉素组大鼠 18 只,生理盐水组大鼠 18 只,其中平阳霉素组 8 只及生理盐水组 8 只提取肺成纤维细胞,平阳霉素组 8 只及生理盐水组 8 只提取大鼠原代 II 型肺泡上皮细胞,7 d 和 28 d 时平阳霉素组和生理盐水组各取 1 只鼠做病理切片。分别进行培养。至 2 种细胞到亚汇合状态时,再进行如下分组:(1)实验组(A7、A28):用平阳霉素组肺成纤维细胞上清液加入平阳霉素组肺泡 II 型上皮细胞并培养 48 h,平阳霉素组肺泡 II 型上皮细胞上清液加入平阳霉素组肺成纤维细胞并培养 48 h;(2)对照组(C7、C28):用生理盐水组肺成纤维细胞上清液加入平阳霉素组肺泡 II 型上皮细胞并培养 48 h,用生理盐水组肺泡 II 型上皮细胞上清液加入平阳霉素组肺成纤维细胞并培养 48 h。

**1.3 肺泡 II 型上皮细胞的分离、纯化和鉴定** 参照 Dobbs 等介绍的方法。腹部注射肝素钠 400 u/kg 和乌拉坦 1 g/kg 麻醉大鼠,无菌条件下打开胸腔,经右心室灌流肺循环,同时剪开腹主动脉,待肺苍白后灌洗肺泡腔。将上述经支气管肺泡灌洗后大鼠的心肺完整取下,经气管注入 800  $\mu$ g/mL 胰蛋白酶和 100  $\mu$ g/mg DNA 酶 10 mL,于 37  $^{\circ}$ C 水浴消化 20 min,其间每 3~5 min 补充消化液适量。然后用 5 mL 未灭活新小牛血清终止消化。将肺组织充分剪碎,振荡 5~10 min,用 200 目不锈钢网过滤,将滤液 4  $^{\circ}$ C,1 000 r/min 离心 10 min。以 3 mL

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670938)。

DMEM(含 0.25% DNA 酶 I 1 mL)重新悬浮细胞,经过大鼠 IgG 免疫黏附 2 h 后重新收集上清液离心,离心后所得细胞重悬于 DMEM,加 20% 小牛血清培养。用 BCIP/NBT 试剂盒染色,肺泡 II 型上皮细胞因为能分泌 AKP,所以,细胞内能见蓝染颗粒(封 2 图 1、2)。

**1.4 肺成纤维细胞的分离、鉴定** 原代肺成纤维细胞:大鼠腹腔内注射乌拉坦(1 g/kg)麻醉后,无菌条件下打开胸腹腔,经右心室用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 溶液灌流肺循环,同时剪开腹主动脉放液,气管插管人工缓慢通气,待肺苍白后,从气管插管处,用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS 溶液灌洗肺泡腔(50 mL);无菌条件下整体取出肺,细切成小块,用双抗漂洗组织(青霉素 1:1 000,链霉素 1:400),后用 DMEM 培养液洗 3 次,用含胰蛋白酶(3 mg/mL)和 DNA 酶 I (2.5 mg/mL)的 DMEM 培养液的消化液中消化,置于 5%  $\text{CO}_2$  培养箱 37 °C,每次 30 min,共消化 3 次(每次均用新配制的消化液)。将每次消化后所得的液体与等体积含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液混合,过无菌纱网后,离心(25 °C,1 000 r/min 离心 8 min),再悬浮于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液中,将所得细胞接种于培养瓶内,37 °C,5%  $\text{CO}_2$  孵育箱内孵育,24 h 内贴壁细胞即为肺成纤维细胞。原代肺成纤维细胞的鉴定采用免疫细胞化学 SP 法检测 Vimentin 表达及光学显微镜镜下观察(封 2 图 3、4)。

**1.5 肺成纤维细胞上清液对肺泡 II 型上皮细胞的干预及肺泡 II 型上皮细胞的 SP-A、TGF- $\beta$ 、HGF mRNA 的半定量 RT-PCR 的检测** 2 种原代细胞在不同上清液环境下培养 48 h 后,倒掉上清液,用酶消化液将培养瓶上细胞消化下来,按 Trizol 试剂一步法分别提取肺成纤维细胞及肺泡 II 型上皮细胞总 RNA。经紫外分光光度法定量后,取 2  $\mu\text{g}$  RNA 用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录反应合成 cDNA 液。以 GAPDH 为内参照,分别取 1  $\mu\text{L}$  模板进行 PCR 反应。SP-A、TGF- $\beta$ 、HGF mRNA 的反应条件均为预变性 95 °C、5 min,94 °C、30 s $\rightarrow$ 60 °C、30 s $\rightarrow$ 72 °C 30 s,28 个循环后 72 °C 延伸 5 min。结果检测:2% 琼脂糖检测,100 V 电压,EB 染色。结果分析:利用 SynGene 公司开发的随凝胶成像系统的 GeneTools 图像软件进行半定量分析,比较目标基因与内参基因的相对表达量变化,并将数据转换到 Excel 表格中,利用 Excel 做出相对表达趋势图。

**1.6 统计学方法** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析、标准差分析、*t* 检验和相关分析。

## 2 结 果

**2.1 病理组织形态学改变** 实验组和对照组 7 d 时,见大量多形核白细胞、单核/巨噬细胞浸润,肺泡间隔增宽,结构受损,部分肺泡腔消失,肺泡与肺泡融合,呈现为弥漫性肺炎;28 d 肺泡结构破坏,肺间质纤维化形成。给予生理盐水的大鼠肺泡结构正常,极少炎性细胞浸润。

**2.2 肺成纤维细胞上清液与肺泡 II 型上皮细胞共培养后肺泡 II 型上皮细胞分泌 SP-A mRNA 表达** 在第 7 天时,实验组肺泡 II 型上皮细胞表达的 SP-A 量明显低于对照组( $P < 0.01$ ),28 d 时实验组 SP-A 的表达仍低于对照组( $P < 0.05$ )。7 d 时无论实验组还是对照组的 SP-A 的表达都高于 28 d( $P < 0.05$ )。

**2.3 肺泡 II 型上皮细胞上清液与肺成纤维细胞共培养后成纤维细胞分泌 HGF mRNA 的表达** 7 d 和 28 d 时,实验组成纤维细胞表达的 HGF 量都明显高于对照组( $P < 0.01$ ),7 d 时

无论实验组还是对照组的 HGF 的表达都低于 28 d( $P < 0.01$ )。

**2.4 肺泡 II 型上皮细胞上清液与肺成纤维细胞共培养后成纤维细胞分泌 TGF- $\beta$  mRNA 的表达** 7 d 和 28 d 时,实验组成纤维细胞表达的 TGF- $\beta$  量都明显高于对照组( $P < 0.01$ ),实验组 TGF- $\beta$  的表达在 7 d 和 28 d 时相比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 3 讨 论

平阳霉素诱导的 PF 分两期,早期(7 d)为炎性反应期,即肺损伤阶段,晚期(28 d)为 PF 期,即 PF 阶段<sup>[4]</sup>。SP-A 为肺泡 II 型上皮细胞中强烈表达、信号最丰富的蛋白,在调节肺顺应性,维护正常生理功能及增强肺防御能力上有不可忽视作用。本实验无论 7 d 还是 28 d,实验组 SP-A mRNA 的表达均低于对照组,证明在肺损伤及最终 PF 阶段,肺泡 II 型上皮细胞的生长均受到抑制,尤其在 28 d PF 阶段,SP-A mRNA 的表达较前明显减少。

HGF 是重要的抗纤维化因子,能修复受损肺组织,是重要的保护性因子<sup>[5-7]</sup>。本实验中,实验组 HGF mRNA 的表达高于对照组,且 28 d PF 阶段高于肺损伤阶段。然而这种 HGF 的高表达却未能影响到纤维化的进展。其原因可能为 HGF 的受体 C-met 位于肺泡 II 型上皮细胞<sup>[8]</sup>,PF 过程中由于肺泡 II 型上皮细胞的损伤及减少,C-met 的表达同样减少<sup>[9]</sup>,因此,HGF 不能有效发挥其保护作用。

TGF- $\beta$  是标志性致纤维化因子<sup>[10-11]</sup>,可促进细胞外基质 ECM 聚集,促进其他促纤维化因子合成<sup>[12]</sup>。本实验中,实验组 TGF- $\beta$  mRNA 的表达高于对照组,即在肺损伤及 PF 阶段,TGF 的表达均有明显增加<sup>[13]</sup>,表明 PF 的形成在 TGF- $\beta$  的作用下进一步进展。

正常成纤维细胞能促进肺泡 II 型上皮细胞生长,抑制转分化<sup>[14-15]</sup>,本实验中,PF 发展过程中,成纤维细胞高表达 HGF mRNA 可能对肺泡 II 型上皮细胞起到一定保护作用,但是纤维化的趋势已经形成,若不能有效活化,不能与其受体有效结合,纤维化的发生难以避免。本实验结果显示,PF 形成过程中,成纤维细胞高表达 TGF- $\beta$ 、HGF mRNA,肺泡 II 型上皮细胞仍低表达 SP-A mRNA,肺成纤维细胞未能促进肺泡 II 型上皮细胞的生长。

## 参考文献:

- [1] Smith MR, Gangireddy SR. Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 33(7):1023.
- [2] King TE, Schwarz MI, Brown K, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: relationship between histopathologic features and mortality[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(6):1025.
- [3] Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis[J]. N Engl J Med, 2001, 345(7):517.
- [4] 刘小燕, 李时悦, 陈小波, 等. 小剂量地塞米松、丹参酮联合乙酰半胱氨酸对肺纤维化大鼠的治疗作用[J]. 广东医学, 2008, 29(1):20.
- [5] Lassus P, Janer J, Haglund C, et al. Consistent expression of HGF and C-met in the perinatal lung[J]. Biol Neonate, 2006, 90(1):28.

后。近 20 年来,随着关节镜技术的进步和微创理念的深入,髋关节镜越来越受到重视。目前,髋关节镜因其具有创伤小、恢复快、视野清晰及并发症少的优点,已成为较多髋关节疾病的主要治疗手段。同时,一些学者利用关节镜进行髋关节圆韧带损伤的诊断及治疗,取得较为理想的疗效。

Gray 等将圆韧带损伤分为部分、完全及退变性断裂等几种,并认为损伤后残端组织通常呈现散乱绒毛状病变,继发引起滑膜刺激症状和关节绞锁及弹响,所以,不论对于哪种类型损伤,治疗均需要清理局部病变组织。本组病例在髋关节镜下都清晰探查至圆韧带损伤的位置及类型,并在镜下进行了残端的清理。术后因其创伤小,患者恢复快,本组 3 例患者术后 1 周髋关节活动恢复正常,绞锁及疼痛症状较快消失。本组患者在清理时,除采用常规的改良入路外,还利用辅助内侧入路来获得更为优良的操作空间及视野,但对于内侧入路由于其紧邻股血管及神经,故操作上应更为谨慎,应具备一定的髋关节镜操作经验后再采用,避免损伤血管、神经。本组未见任何并发症出现。当然,相信如果操作器械上能够进一步改良,内侧辅助入路的必要性将大大减低。尽管部分学者认为无牵引技术仍然可以很好完成髋关节镜的手术操作,但作者既往临床实践的经验是,牵引床及 C 型臂辅助才能更为顺利的完成手术。随着髋关节镜更为广泛的应用,无疑将提高包括圆韧带损伤在内的髋部疾病诊疗水平,增加外科医生对于髋部疾病治疗的选择,实现检查和手术的微创化。

#### 参考文献:

[1] Rao J, Zhou YX, Villar RN. Injury to the ligamentum teres. Mechanism, findings, and results of treatment[J].

Clin Sports Med, 2001, 20(4):791.

- [2] Wenger D, Miyajiri F, Mahar A, et al. The mechanical properties of the ligamentum teres: a pilot study to assess its potential for improving stability in children's hip surgery[J]. J Pediatr Orthop, 2007, 27(4):408.
- [3] Yamamoto Y, Usui I. Arthroscopic surgery for degenerative rupture of the ligamentum teres femoris[J]. Arthroscopy, 2006, 22(6):689.
- [4] Dienst M, Goedde S, Seil R, et al. Diagnostic arthroscopy of the hip joint[J]. Orthop Traumatol, 2002, 10(1):1.
- [5] Kelly BT, Williams RJ, Philippon MJ. Hip arthroscopy: current indications, treatment options, and management issues[J]. Am J Sports Med, 2003, 31(6):1020.
- [6] Byrd JWT, Pappas JN, Pedley MJ. Hip arthroscopy: An anatomic study of portal placement and relationship to the extra-articular structures[J]. Arthroscopy, 1995, 11(4):418.
- [7] Gray AJR, Villar RN. The ligamentum teres of the hip: an arthroscopic classification of its pathology[J]. Arthroscopy, 1997, 13(5):575.
- [8] Armfield DR, Towers JD, Robertson DD. Radiographic and MR imaging of the athletic hip[J]. Clin Sports Med, 2006, 25(2):211.
- [9] Dorfmann H, Boyer T. Arthroscopy of the hip: 12 years of experience[J]. Arthroscopy, 1999, 15(5):67.

(收稿日期:2010-03-18 修回日期:2010-05-09)

(上接第 2549 页)

- [6] 马红艳,叶燕青,黄莺,等.肝细胞生长因子在内毒素诱导肺泡 II 型上皮细胞损伤中的作用[J].广东医学,2007,28(10):1601.
- [7] Crestani B, Dehoux M, Hayem G, et al. Differential role of neutrophils and alveolar macrophages in hepatocyte growth factor production in pulmonary fibrosis Laboratory investigation[J]. American Journal of Technical Methods and Pathology, 2002, 82(8):1015.
- [8] 陈志,颜雨春.肝细胞生长因子 C-Met 系统与口腔鳞癌相关性研究的进展[J].安徽医药,2009,13(1):8.
- [9] Atabai K, Ishigaki M, Geiser T, et al. Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(1):163.
- [10] 郝长付,姚武,吴逸明. TGF- $\beta$ 1 在实验性矽肺大鼠肺组织中的表达及其意义[J].医药论坛杂志,2006,27(7):42.
- [11] 许光兰,梁劲松,陈敏,等.转化生长因子- $\beta$ 1 在博来霉素

诱导肺纤维化大鼠肺泡灌洗液中的表达及青蒿素的干预作用[J].广西医学,2008,30(8):1119.

- [12] 唐仕芳,朱洪春,李华强,等.转化生长因子- $\beta$ 1 在新生大鼠高浓度氧致肺损伤中的作用研究[J].重庆医学,2009,38(4):438.
- [13] 秦开秀,简华刚.内毒素性急性肺损伤小鼠肺组织中炎症介质的表达[J].重庆医学,2007,36(4):335.
- [14] Beaver LM, Stemmy EJ. Lung inflammation, injury, and proliferative response after repetitive particulate hexavalent chromium exposure[J]. Environ Health Perspect, 2009, 117(12):1896.
- [15] Ray P, Devaux Y, Stolz DB, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10):6098.

(收稿日期:2010-04-15 修回日期:2010-05-04)