

· 基础研究 ·

TGF- β 在放射性肺损伤大鼠肺组织中的表达及意义*官 键¹, 刘来昱², 李启生¹, 陈龙华¹, 刘 英^{1 Δ}

(南方医科大学南方医院:1. 放疗科;2. 呼吸科, 广州 510515)

摘要:目的 探讨转化生长因子- β (TGF- β)在放射性肺损伤大鼠肺组织中的表达及意义。方法 选择无特定病原体(SPF)级健康 Wistar 大鼠 35 只,随机分为对照组(5 只)、照射组(30 只,1 d,1、2、4、8、12 周各 5 只)。在照射 1 d,1、2、4、8、12 周获取标本,采用免疫组化法观察放射性肺损伤大鼠肺组织细胞 TGF- β 水平变化。结果 照射组 TGF- β 在肺成纤维细胞中的表达高于对照组,差异有统计学意义($P=0.000$),其损伤程度随时间的推移而增加。结论 TGF- β 是肺成纤维细胞(FB)活化的最重要生物介质之一,阻断 TGF- β 通路及 FB 的活化,可能为减少照射后肺间质炎症和纤维化的程度带来新的希望。

关键词:放射性肺损伤;成纤维细胞;转化生长因子- β

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.10.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)10-0964-02

Expression of TGF- β on lung tissue of rats with radiation induced lung injury*Guan Jian¹, Liu Laiyu², Li Qisheng¹, Chen Longhua¹, Liu Ying^{1 Δ}

(1. Department of Radiation Oncology; 2. Department of Respiratory Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of TGF- β on lung tissue of rats with radiation induced lung injury. **Methods** Thirty-five male Wistar rats were randomly divided into 7 groups ($n=5$): control group and treatment group (received irradiation on the the right hemithorax or sham right lung irradiation with single 30Gy, 1day, 1, 2, 4, 8, and 12 weeks). The rats were sacrificed at 1 day, 1, 2, 4, 8, and 12 weeks after the irradiation, and lung tissues were separated. The expression of TGF- β was detected by immunohistochemistry. **Results** The expression of TGF- β in fibroblast (FB) significantly increased after irradiation, compared with control group ($P=0.000$). The degree of injury increased with the time passing. **Conclusion** TGF- β was an important biological mediator during the activation of fibroblast. We suspected that FB might be the target cell for prevention and cure the radiation induced lung injury.

Key words: radiation-induced pulmonary injury; fibroblast; transforming growth factor- β

放射性肺损伤是胸部肿瘤放射治疗后的常见并发症,可分为急性放射性肺炎和迟发性肺纤维化^[1],放射性肺纤维化严重影响了患者的生活质量。目前认为放射性肺纤维化是由于肺成纤维细胞(Fibroblast, FB)的过度增殖和胶原的沉积导致肺组织结构的破坏。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)是其中的重要影响因素^[2]。现将本研究通过建立大鼠放射性肺损伤的实验模型,研究放疗肺 FB 放疗后 TGF- β 表达变化情况报道如下。

1 材料与方

1.1 材料 直线加速器 2100/C(美国瓦里安公司)、OLYMPUS BX50 光学显微镜(日本)、PM-10AK3 半自动曝光显微照相装置(日本 OLYMPUS)、兔抗大鼠 TGF- β 亲和纯化多克隆抗体一抗(Santa Cruz 公司)、生物素化二抗工作液(美国 ZYMED 公司)、辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)(美国 ZYMED 公司)、DAB(美国 Sigma 公司)。

1.2 实验动物模型的建立 由南方医科大学动物实验中心提供无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康雄性 Wistar 大鼠 35 只,体质量(200 \pm 20)g。随机分为对照组(5 只)、照射组(30 只,1 d,1、2、4、8、12 周各 5 只)。对照组在实验第 1 天处死,照射组在 SPF 环境中分笼喂养。在接受相同剂量照射后 1 d,1、2、4、8、12 周后分别处死。剂量:30 Gy,剂量率 4 Gy/min。实验前给予 0.4% 硫喷妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射进行麻醉,在南方医科大学放疗科采用 Varian 2100C 直线加速器 6MV X 线照射右侧半胸。射野面积 3.0 cm \times 5.0

cm,源皮距 110 cm。

1.3 标本制作 取肺组织以 4% 多聚甲醛固定,取 1 cm \times 1 cm \times 0.5 cm 肺组织,行石蜡浸泡过夜,包埋。免疫组织化学检测肺组织中 TGF- β 的表达。

1.4 结果判定 采用二级记分法判定结果^[3]。在 \times 400 视野下计数 200 个,分别观察肺 FB 免疫染色的细胞数量百分比及染色强度。半定量阳性细胞计数记分方法:0 分, $n<5\%$;1 分, $5\%\leq n<25\%$;2 分, $25\%\leq n<50\%$;3 分, $50\%\leq n<75\%$;4 分, $n\geq 75\%$ 。免疫组织化学染色强度记分方法:1 分,淡黄色;2 分,黄色或深黄色;3 分,褐色或棕黄色。分级记分法:阴性(-), ≤ 1 分;阳性(+), $>1\sim 3$ 分;中等阳性(++), $>3\sim 5$ 分;强阳性(+++), $>5\sim 7$ 分。

1.5 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对不同分组的结果进行方差分析(ANOVA)的非参方法 Kruskal Wallis Test 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

TGF- β 在放射性大鼠肺损伤中的表达情况见封 3 图 1,表 1。

表 1 TGF- β 在放射性大鼠肺损伤中的表达情况

组别	n	TGF- β				平均秩和
		-	+	++	+++	
对照组	5	5	0	0	0	10.17
照射组						
1 d	5	0	4	1	0	13.50

续表 1 TGF-β 在放射性大鼠肺损伤中的表达情况

组别	n	TGF-β				平均秩和
		-	+	++	+++	
1 周	5	0	3	2	0	24.89
2 周	5	0	2	2	1	32.14
4 周	5	0	1	2	2	37.15
8 周	5	0	0	2	3	45.00
12 周	5	0	0	0	5	10.17
χ^2		33.342				

3 讨 论

小鼠模型是最适合且应用最为广泛的放射性肺损伤模型^[4-5]。Wistar 大鼠照射后肺放射性肺损伤病理呈动态变化^[6-7]，张洁旻等^[8]发现，放射线照射后早期以急性炎症为主，表现为肺充血、水肿、肺间质增厚，后期损伤以肺泡间隔的进行性纤维化为特征。有研究表明，放射性肺纤维的形成是一个不可逆的涉及多种细胞和分子相互作用的复杂的信号传导网络的过程，目前有研究发现，肺 FB 在照射后转化为肌纤维母细胞(Myofibroblast, MF)，而 MF 是肺纤维化过程最活跃细胞，分泌大量生长因子、细胞因子和炎性介质，在复杂的细胞网络中传递信息是导致肺纤维化进行性发展的关键环节。

FB 的活化为 MF 的信号通路机制，目前研究尚不完全清楚。Willis 等^[9]和 Gaudie 等分别将 TGF-β 基因转入小鼠肺组织中可诱导肺 MF 出现和肺纤维化的发生。也有研究也证实，TGF-β 作用于人胚肺 FB，逐渐向 MF 分化。在 TGF-β/Smads 通路中影响 FB 分化为 MF 的最主要因子是 TGF-β₁ 及其下游 Smad3 分子^[10]。近来有研究发现，非 Smad3 依赖的 TGF-β 信号诱导 MF 的分化^[11]。Adam 等^[12]在 α-SMA 基因启动子序列中发现了一个 TGF-β 调控位点(TGF-β Control Element, TCE)，提出 TGF-β 本身可以直接参与到 FB 的分化。Tomasek 等^[13]研究认为，除了 TCE 外，TGF-β 还作用于内源性的 CARG[CC(A/T)6GG]控制元件调控 FB 的分化。TGF-β₁ 诱导 FB 表达 α-SMA 必须在细胞外基质(ECM)中含有 ED-A 序列的纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)，FN 的沉积要先于 α-SMA 的表达，故含 ED-A 序列的 FN 和 ECM 是影响 MF 分化的重要影响因素之一。同时，TGF-β 超家族中的其他成员也发挥诱导 FB 分化的作用^[14]，由此由 TGF-β 在 FB 活化中有非常重要的地位^[15]。

MF 具有很强的合成和分泌功能，能产生细胞因子、生长因子和炎性介质。有研究证实，在没有外源性生长因子的情况下，慢性炎症性肺组织 MF 可以通过自分泌机制，合成一些细胞因子、生长因子，对其本身或其他细胞的增殖状态产生影响，例如 TGF-β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-1、IL-6、血小板衍生因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、一氧化氮和一氧化碳等。其中 MF 自分泌的 TGF-β 对 MF 自身表型的诱导和维持有重要的作用，参与肺间质纤维化的各个环节，包括促进 MF 在 ECM 合成，抑制基质降解、整合素黏附分子的上调，提高 MF 抗凋亡的活性，以及趋化 FB 作用等。

本研究也发现，Wistar 大鼠照射后肺 FB 转化成 MF 的同时，免疫组化提示细胞内 TGF-β 呈阳性表达，证实了照射后活化的 MF 具有分泌功能。结合 FB 活化通路的分析，TGF-β 是诱导 FB 活化的最重要生物介质之一，MF 的这种自分泌作用可能放大了 FB 的活化，促进放射性肺炎和肺纤维化的形成，因此，阻断 TGF-β 通路及 FB 的活化，可能为减少照射后肺间质炎症和纤维化的程度带来新的希望。

参考文献：

[1] 李启生, 刘来昱, 官键, 等. 干扰素-γ 在放射性肺损伤发生过程中的作用研究[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(21): 3654-3656.

[2] 曾鸣, 范贤明. 成纤维细胞、肌成纤维细胞与肺纤维化[J]. 国外医学内科学分册, 2006, 30(11): 485-848.

[3] 刘来昱, 丁轶, 李启生, 等. 放射性肺损伤肺成纤维细胞的活化机制研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 1082-1084.

[4] 周芊, 王东, 李梦侠, 等. 小鼠放射性肺损伤动物模型的建立与鉴定[J]. 重庆医学, 2010, 39(19): 2553-2554, 2557.

[5] 杨明会, 张利军, 冯林春, 等. 小剂量多次照射大鼠放射性肺损伤模型的评价[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(6): 415-417.

[6] 曹小飞, 陈龙华, 刘国龙. 大鼠放射性肺损伤模型的动态病理学观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(11): 818-822.

[7] 谭永红, 王东, 肖桃元, 等. 大鼠半胸照射致肺纤维化模型的病理学观察[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(2): 104-106.

[8] 张洁旻, 张纬建, 黄春芳, 等. 放射性肺损伤小鼠动物模型的建立与鉴定[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(19): 1455-1457.

[9] Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Pathol, 2005, 166(5): 1321-1332.

[10] Gu L, Zhu YJ, Yang X, et al. Effect of TGF-beta/Smad signaling pathway on lung myofibroblast differentiation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(3): 382-391.

[11] 黄文林, 朱孝峰. 信号转导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 203.

[12] Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, et al. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48): 37798-37806.

[13] Tomasek JJ, Mcrae J, Owens GK, et al. Regulation of alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts is dependent on the intronic CARG element and the transforming growth factor-beta1 control element[J]. Am J Pathol, 2005, 166(5): 1343-1351.

[14] Jeffery TK, Upton PD, Trembath RC, et al. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(2): L370-L378.

[15] Zhao W, Robbins ME. Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: therapeutic implications[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(2): 130-143.