

· 论 著 ·

# 高氧肺损伤形成过程中小窝蛋白-1、TGF-β1 表达关系的体内外研究<sup>\*</sup>

党嘉文<sup>1</sup>, 孙鸿燕<sup>2</sup>, 董文斌<sup>1△</sup>, 李清平<sup>1</sup>, 冯志强<sup>3</sup>, 翟雪松<sup>1</sup>, 雷小平<sup>1</sup>

(1. 泸州医学院附属医院新生儿科; 2. 泸州医学院护理学院; 3. 泸州医学院生理学教研室, 四川泸州 646000)

**摘 要:**目的 通过建立高氧肺损伤动物模型和体外细胞培养的方法, 从体内和体外两方面来研究小窝蛋白-1(caveolin-1)和 TGF-β1 的表达关系, 以探讨其发病机制。方法 (1)体内实验: 建立早产鼠高氧肺损伤模型。于给氧后 1、3、7 d 留取肺组织标本, 在光学显微镜下观察肺组织形态学变化, 免疫组织化学法检测相应时间点小窝蛋白-1、TGF-β1 的表达水平。(2)体外实验: 建立高氧 A549 细胞损伤模型。于给氧后 12、24、48 h 收集细胞, 免疫荧光双染检测相应时间点小窝蛋白-1、TGF-β1 表达水平的相关性。结果 (1)体内结果: 小窝蛋白-1 在对照组肺组织中均有较高水平表达。与对照组比较, 高氧组肺组织 caveolin-1 的表达水平出现降低, 在 3、7 d 明显降低( $P < 0.05$ ); TGF-β1 在对照组肺组织中均有较低水平表达。与对照组比较, 高氧组肺组织 TGF-β1 的表达水平升高, 在 3、7 d 明显升高( $P < 0.05$ )。(2)体外结果: 对照组, 小窝蛋白-1 的高表达伴随着 TGF-β1 的低表达; 高氧组, 随着通氧时间的延长, 小窝蛋白-1 表达逐渐减弱, TGF-β1 表达逐渐增强。结论 在高氧肺损伤的发生、发展过程中, Caveolin-1 表达显著性减少, TGF-β1 表达持续性增多, 二者呈拮抗关系, 提示 Caveolin-1 可能通过下调 TGF-β1 的产生而具有抗纤维化能力。

**关键词:** 高氧肺损伤; 小窝蛋白-1; 转化生长因子 β1; 早产鼠; 纤维化

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.18.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)18-2067-04

## Study on relationship of caveolin-1 and TGF-β1 in hyperoxia-induced lung injury in vivo and in vitro<sup>\*</sup>

Dang Jiawen<sup>1</sup>, Sun Hongyan<sup>2</sup>, Dong Wenbin<sup>1△</sup>, Li Qingping<sup>1</sup>, Feng Zhiqiang<sup>3</sup>, Zhai Xuesong<sup>1</sup>, Lei Xiaoping<sup>1</sup>

(1. Department of Neonatology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College; 2. Department of Nursing, Luzhou Medical College; 3. Department of Physiology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** Objective Through the establishment of model for hyperoxia-induced lung injury in vivo and vitro, the dynamic changes of caveolin-1(Cav-1) and transforming growth factor beta(TGF-β1), and the mechanism of hyperoxic lung injury were investigated. **Methods** In vivo, a model of hyperoxia in preterm rats was established. The lung tissue in two groups was obtained at 1, 3 and 7 days after exposing to either room air or hyperoxia. The change of morphology were observed under inverted microscope, and the expression of Caveolin-1, TGF-β1 in the lung tissue was detected in immunohistochemistry. In vitro, Hyperoxia injury A549 cell model was established. After exposure to oxygen or room air for 12, 24 and 48 h, the relationship of expression between Caveolin-1 and TGF-β1 was detected by double immunofluorescence staining technique, followed by laser scan with focus microscope. **Results** In vivo, the expression of Caveolin-1 remained at a higher level in the air group. Compared with control group, the expression of caveolin-1 in the hyperoxia exposure group began to decrease from 1 day, markedly at 3, 7 days( $P < 0.05$ ). The expression of TGF-β1 remained at a lower level in the air group. Compared with control group, the expression of TGF-β1 in the hyperoxia exposure group began to increase significantly from 1 day, markedly at 3, 7 days( $P < 0.05$ ). In vitro: In the control group, the high expression of Caveolin-1 was associated with low expression of TGF-β1; Compared with control group, with prolonged hyperoxia exposure, the content of Caveolin-1 reduced continuously, but TGF-β1 increased gradually. **Conclusion** The expression level of Caveolin-1 reduced significantly and the TGF-β1 increased progressively, when exposed to hyperoxia, which means that Caveolin-1 maybe has the anti-pulmonary fibrosis function through decreasing TGF-β1 generation.

**Key words:** hyperoxia-induced lung injury; Caveolin-1; transforming growth factor beta 1; premature rats; fibrosis

高氧性肺损伤是一种以弥漫性肺细胞损伤为基础, 早期表现为细胞坏死和肺炎, 晚期则为肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)和发育障碍。虽然发病机制尚不完全清楚, 但研究发现, 高氧可促进肺组织中多种炎性细胞因子的表达<sup>[1]</sup>。形成炎症的级联反应。小窝蛋白-1(caveolin-1, CAV-1) 富集于肺组织肺泡上皮细胞和微血管内皮细胞, 可与信号分子直接接触, 调控许多信号转导通路和生物过程, 生物体内小窝蛋白表达异常可引起多种疾病。转化生长因子-β1(transforming growth factor-β, TGF-β1) 主要由肺泡巨噬细胞分泌, 对多种炎症细胞

或成纤维细胞有趋化作用, 促进成纤维细胞分化, 能刺激多种炎性因子释放, 调节炎症反应<sup>[2]</sup>。由此可以推断, 在高氧肺损伤的发病过程中, CAV-1 呈高表达或低表达, 而 TGF-β1 应该是呈高表达, 那么二者之间是否存在着相关性呢? 为此, 本实验通过对高氧肺损伤中的 CAV-1 和 TGF-β1 进行检测, 旨在探讨 CAV-1 和 TGF-β1 表达的相关性及其可能的生物学意义。

### 1 材料与方

1.1 动物模型制备与分组 参照 Sugimoto 等<sup>[3]</sup>, 将孕 21 d

<sup>\*</sup> 基金项目: 四川省教育厅科研基金资助项目(08ZA150); 四川省卫生厅科研基金资助项目(90191)。 作者简介: 党嘉文(1984~), 医师, 主要从事新生儿疾病研究。 △ 通讯作者, Tel: 13698153757; E-mail: dongwenbin2000@163.com。

剖宫产娩出早产鼠随机分为:对照组( $\text{FiO}_2$  为 210 mL/L)、高氧组( $\text{FiO}_2$  为 950 mL/L)各 15 只。两组分别于处理后 1、3、7 d 收集肺组织标本进行指标检测。

**1.2 细胞模型制备与分组** 参照本实验室建立的方法<sup>[4]</sup>,将心肺腺癌细胞系 A549 随机分为两组:对照组( $\text{FiO}_2$  为 210 mL/L)、高氧组( $\text{FiO}_2$  为 950 mL/L)。两组分别于处理后 12、24、48 h 收集细胞进行指标检测。

1.3 指标检测及方法

**1.3.1 苏木精-伊红染色(HE 染色)** 每张 HE 染色切片随机选取多个高倍镜视野,观察并比较肺组织细胞的病理学改变。

**1.3.2 免疫组织化学染色** 每个蜡块取 5  $\mu\text{m}$  厚连续切片做免疫组织化学染色。分别以兔抗鼠 CAV-1 单克隆抗体(1 : 800),TGF- $\beta$ 1 小鼠抗大鼠(人)单克隆抗体(1 : 200)作为一抗,二氨基联苯胺(DAB)显色,采用 SP 法,具体染色方法按试剂盒说明书进行。

**1.3.3 免疫荧光双染色** 当培养瓶中的 A549 细胞达到 70%~80%融合时,接种于 6 孔板中,进行细胞爬片,分组处理,在处理后的相同时点,同时滴加兔抗鼠 CAV-1(1 : 400)和小鼠抗大鼠 TGF- $\beta$ 1(1 : 200)为一抗,荧光 Cy3 标记山羊抗兔 IgG 和 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗。孵育后激光共聚焦显微镜下观察。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件进行统计学数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,均数和率的比较分别采用  $\chi^2$  检验和  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 肺组织的病理变化** 对照组各时间点肺组织未见炎性改变。肺泡结构规整,大小均匀一致。与对照组比较,高氧组第 1 天,肺组织无明显病理改变;高氧组第 3 天,肺泡腔内有少许红细胞渗出,肺泡间隔有以中性粒细胞为主的浸润;高氧组第 7 天,肺损伤较重,可见较多的炎性细胞和红细胞,肺发育受阻,肺组织结构紊乱,出现肺纤维化倾向。

**2.2 肺组织 CAV-1 及 TGF- $\beta$ 1 的表达** CAV-1、TGF- $\beta$ 1 均

为膜/质表达蛋白,染色阳性表现为细胞膜和细胞质出现棕黄色颗粒。免疫组织化学法检测结果显示,在早产鼠肺组织中,二者主要在肺泡上皮细胞中表达,且不同时间表达水平不同。CAV-1 在对照组中均有较高水平表达,高氧组中,随着通氧时间的增加,CAV-1 在肺组织中的表达阳性率明显降低,以 3、7 d 最明显,其差异有统计学意义(图 1、表 1);TGF- $\beta$ 1 在对照组中均有较低水平表达,高氧组中,随着通氧时间的增加,TGF- $\beta$ 1 在肺组织中的表达阳性率呈上升趋势,以 3、7 d 最明显,其差异有统计学意义(图 2、表 2)。

表 1 早产鼠肺组织 CAV-1 平均灰度值的动态比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

日龄(d)	高氧组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
1	42.12 $\pm$ 3.78	45.34 $\pm$ 2.62	0.530	0.560
3	31.54 $\pm$ 4.16	46.53 $\pm$ 3.57	2.720	0.022
7	18.72 $\pm$ 5.53	43.65 $\pm$ 3.15	3.385	0.010

**2.3 各时间点肺组织 CAV-1、TGF- $\beta$ 1 表达的相关性** 相同时间点 CAV-1 的阳性表达与 TGF- $\beta$ 1 的阳性表达呈负相关,以对照组,高氧组 1、7 d 最显著( $r = -0.91, -0.86, -0.63, -0.82, P < 0.05$ )。

表 2 早产鼠肺组织 TGF- $\beta$ 1 平均灰度值的动态比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

日龄(d)	高氧组	对照组	<i>t</i>	<i>P</i>
1	17.38 $\pm$ 0.98	18.76 $\pm$ 1.34	1.23	0.47
3	20.45 $\pm$ 2.75	16.53 $\pm$ 1.69	2.94	0.032
7	35.78 $\pm$ 2.28	17.05 $\pm$ 3.42	4.43	0.018

表 3 各组 A549 细胞 CAV-1、TGF- $\beta$ 1 平均灰度值的动态比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

项目	对照组	高氧组 12 h	高氧组 24 h	高氧组 48 h
CAV-1	44.25 $\pm$ 3.23	35.25 $\pm$ 1.88	20.75 $\pm$ 1.68	9.86 $\pm$ 2.80
TGF- $\beta$ 1	10.18 $\pm$ 2.74	17.32 $\pm$ 1.50	26.51 $\pm$ 1.82	41.94 $\pm$ 4.47

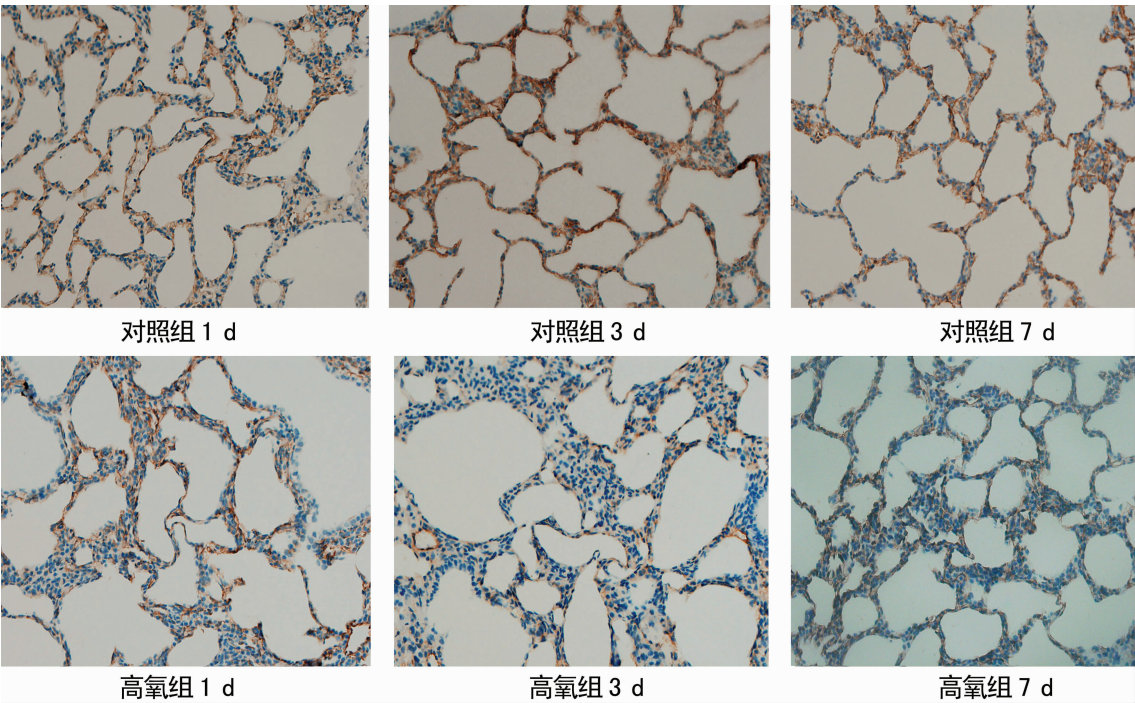


图 1 两组动物不同时间肺组织 CAV-1 的表达水平影像学表现(免疫组化,  $\times 400$ )



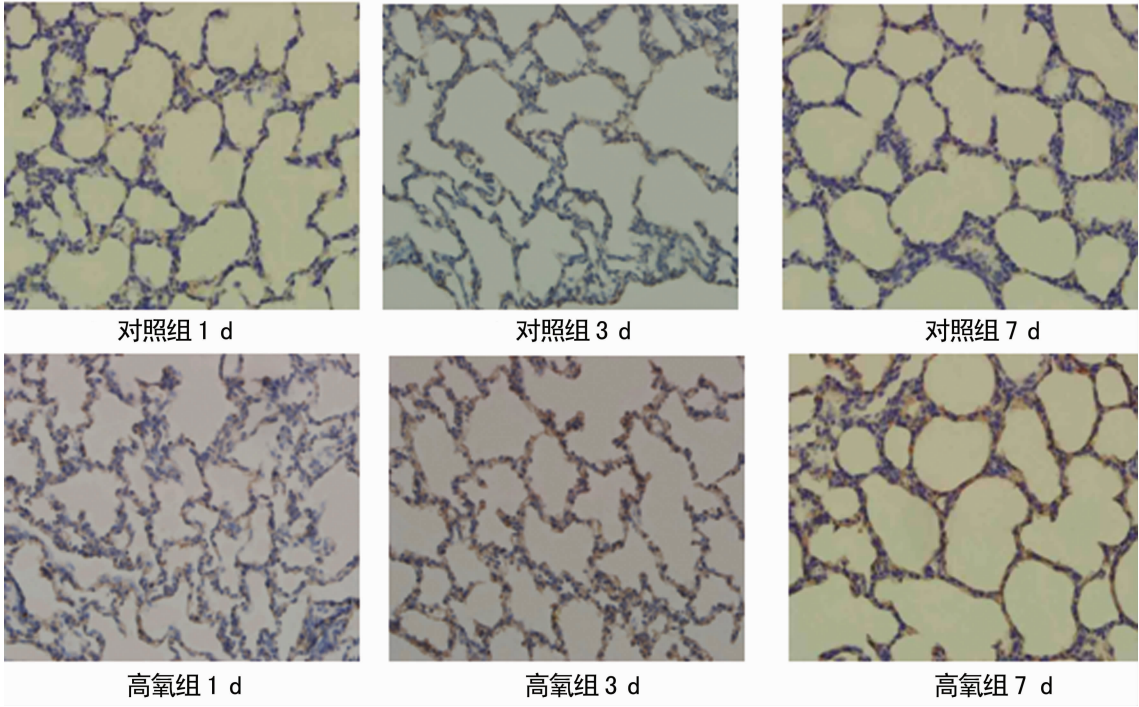


图2 两组动物不同时间肺组织 TGF-β1 的表达水平影像学表现(免疫组化,×400)

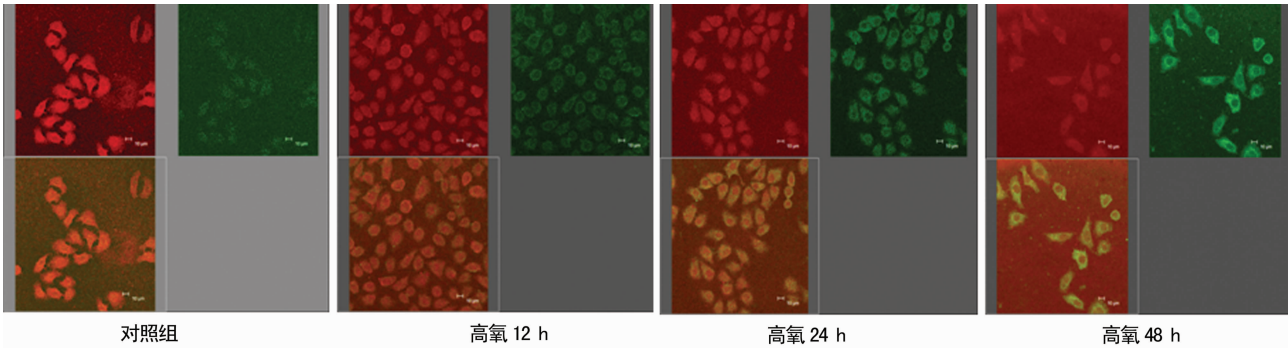


图3 高氧组和对照组不同时间 A549 细胞中 CAV-1、TGF-β1 的表达水平影像学表现(免疫荧光,×400)

**2.4 A549 细胞 CAV-1、TGF-β1 的表达** 免疫荧光染色结果显示,CAV-1 免疫荧光阳性细胞呈红色荧光,表达部位集中在细胞质。TGF-β1 免疫荧光阳性细胞呈绿色荧光,也定位于细胞质,二者合成显示黄色荧光。对照组中,CAV-1 的高表达伴随着 TGF-β1 的低表达,反之,高氧组,随着通氧时间的延长,CAV-1 表达逐渐减弱,TGF-β1 表达逐渐增强(图 3、表 3)。

**2.5 各时间点 A549 细胞中 CAV-1 与 TGF-β1 的表达的相关性** 相同时间点 CAV-1 的阳性表达与 TGF-β1 的阳性表达呈负相关,以对照组、高氧组 48 h 最显著( $r$  值分别为  $-0.91$ ,  $-0.62$ ,  $-0.53$ ,  $-0.88$ ;  $P<0.05$ )。

3 讨 论

近年来,人们在探究炎症理论发病机制基础上,对高氧肺损伤的认识转向对炎症发生、调控及信号传导的认识,从炎症失调及信号传导方面阐明其机制。本研究中观察到早产大鼠持续吸入高浓度氧后肺组织发育受阻,结构紊乱,肺纤维化倾向,说明随着高氧暴露时间的延长,肺组织的纤维增生性改变逐渐加重。与以往的报道<sup>[5]</sup>相类似,说明已成功建立高氧肺损伤动物模型。从细胞水平上,传代培养人肺腺癌 A549 细胞并建立高氧 A549 细胞损伤模型,模拟体内高氧肺损伤,以进一步探讨高氧肺损伤纤维化的发病机制。

作者研究发现,在正常早产大鼠肺组织 CAV-1 呈强表达,吸入高浓度氧后 CAV-1 在肺组织中表达逐渐减弱。国外文献也有类似报道:Odajima 等<sup>[6]</sup>将携 CAV-1 的腺病毒经气管滴注转染小鼠,可抑制博莱霉素诱导的鼠肺纤维化。在 Le Saux 等<sup>[7]</sup>研究发现小窝蛋白缺陷时,小鼠肺组织的顺应性明显下降,弹性回缩力和支气管阻力明显增加。以上研究结果表明,肺组织 CAV-1 与肺纤维化的发生、发展密切相关。形态研究显示,小窝蛋白的 N-端区域除了参与寡聚体形成外,尚含一个由 20AA 组成的小窝蛋白-支架结构域,被称为“脚手架结构域”(caveolin scaffolding domain,CSD),CAV-1 通过脚手架域与多种信号分子连接,将这些信号分子与信号转导有关的受体、激酶和连接蛋白质在小窝区域高度富集,从而参与多种信号通路的调节。

值得注意的是,目前,已有参考 CSD 氨基酸序列(82~101)合成的穿透细胞膜的 Caveolin-1-肽(CAV-1-p)。在体外,CAV-1-p 通过调节多种分子信号转导过程,可抑制成纤维细胞的  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白表达和细胞外基质合成。在活体内,CAV-1-p 可进入体内的细胞,抑制血管内皮细胞一氧化氮合酶的活性、减轻全身血管的炎症反应<sup>[8]</sup>等。CAV-1-p 具有与 CAV-1 类似的生物学功能。

本次实验中发现对照组支气管黏膜上皮细胞仅有极少量 TGF- $\beta$ 1 表达,随着吸氧时间的延长 TGF- $\beta$ 1 表达水平逐渐升高。TGF- $\beta$ 1 致肺纤维化机制主要包括:(1)TGF- $\beta$ 1 对细胞外基质(extracellular matrix,ECM)是迄今发现的最强的 ECM 沉积促进剂,他可促进 ECM 聚集,减少 ECM 降解引起纤维化。(2)TGF- $\beta$ 1 与其他因子协同发挥作用,如 TGF- $\beta$ 1 可刺激 MMP-12 分泌增加,而 MMP-12 在 TGF- $\beta$ 1 诱导的炎症、纤维化、凋亡中起重要作用<sup>[9]</sup>。(3)现代研究认为,TGF- $\beta$ 1 还是一种促血管生成因子,TGF- $\beta$ 1 可能通过调节内皮细胞的成活及血管内皮生长因子(VEGF)的表达而促进新生血管的发生,最终导致纤维化。(4)TGF- $\beta$ 1 可诱导氧自由基及活性氧(reactive oxygen species,ROS)的生成并导致细胞活性的改变,造成肺上皮细胞、毛细血管内皮细胞结构和功能的损害,从而导致严重的肺损伤。(5)TGF- $\beta$ 1 还可在体外诱导肺泡上皮细胞向间质细胞转化,肺泡上皮细胞间质转化是肺纤维化的重要发病机制之一<sup>[10]</sup>。

大量研究证实,TGF- $\beta$ 1 致肺组织纤维化作用可通过经典的 TGF- $\beta$ /SMAD 信号转导途径介导,此通路是 TGF- $\beta$  发挥生物学作用的主要通路<sup>[11]</sup>。TGF- $\beta$ 1 与 TGF- $\beta$ 1 I 型受体及 II 受体形成复合物,通过激活苏/丝氨酸激酶活性,促进 Smad-2/3 磷酸化,增强与 Smad-4 的联合,Smad-2/3/4 复合物至核内提高细胞外基质基因的转录,增强细胞外基质 I 型胶原和纤维连接蛋白的合成,促进肺纤维化的发生、发展<sup>[12]</sup>。而 CAV-1 与 TGF- $\beta$ 1 I 型受体、TGF- $\beta$ 1 II 型受体、Smad-2 等共定位在细胞质膜丰富的区域,CAV-1 通过 CSD 与 TGF- $\beta$ 1 I 型及 II 型受体作用,负性调节 TGF- $\beta$  与受体结合,进而阻断该信号转导通路的激活。Razani 等<sup>[13]</sup>研究发现,CAV-1 与 I 型 TGF- $\beta$  受体(TGF- $\beta$ R I)及其下游 Smad-2 蛋白共域化且能与 TGF- $\beta$ R I 相互作用。在 NIH<sub>3</sub>T<sub>3</sub> 中,CAV-1 通过支架结构域(CSD)与 Smad-2 结合,抑制其磷酸化,从而破坏 Smad-2 与 Smad-4 的相互作用,阻断 Smad-2 复合物核转位,发挥其调节 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导通路的作用。

CAV-1 还可通过调节丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase MAPK)家族 ERK1/2 信号通路的激活促进 ECM 的合成及沉积。其中 ERK 通路作为 MAPK 系统主要的和经典的通路,是细胞因子、生长因子介导细胞增殖效应中最重要的细胞内信号转导途径。作者认为 ERK 通路激活来源 2 个方面:(1)TGF- $\beta$ 1 诱导 ERK 通路活化。(2)TGF- $\beta$ 1 经 ERK 通路诱导 Smad2/3 磷酸化活化 Smad7,反过来其进一步促进 TGF- $\beta$ 1 对 ERK 通路的活化,并拮抗 TGF- $\beta$ 1 抑制血管平滑肌细胞增殖的效应。CAV-1 通过调节 ERK 途径来促进成纤维细胞合成胶原,调节 TGF- $\beta$ 1 诱导的 ECM 的产生。研究表明,来源于 CAV-1 脚手架区的多肽能抑制 EGFR、MEK1 的活性<sup>[14]</sup>,从而阻断纤维化进程。

#### 参考文献:

- [1] 张晓慧,初清,丁艳洁,等.细胞因子在高氧肺损伤中表达的研究[J].中国新生儿科杂志,2009,12(4):223-226.
- [2] Bottoms SE,Howell JE,Reinhardt AK,et al. Tgf-Beta

isoform specific regulation of airway inflammation and remodelling in a murine model of asthma[J]. PLoS One, 2010,5(3):e9674.

- [3] Sugimoto S,Lin X,Lai J,et al. Apyrase treatment prevents ischemiareperfusion injury in rat lung isografts[J]. Thorac Cardiovasc Surg,2009,138(3):752-759.
- [4] 邹新艳,董文斌,邹丹. mitoKATP 通道开放剂对高氧诱导人 A549 细胞凋亡的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志,2011,13(6):514-517.
- [5] 许巍,富建华,薛辛东. HoxB5 在高体积分数氧致慢性肺疾病新生大鼠肺组织中的动态变化及其意义[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(4):257-259.
- [6] Odajima N,Betsuyaku T,Nasuhara Y,et al. Loss of caveolin-1 in bronchiolization in lung fibrosis[J]. J Histochem Cytochem,2007,55(9):899-909.
- [7] Le Saux O,Teeters K,Miyasato S,et al. The role of caveolin-1 in pulmonary matrix remodeling and mechanical properties[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008,295(6):1007-1017.
- [8] Tourkina E,Richard M,Gooz P,et al. Antifibrotic properties of Caveolin-1 scaffolding domain in vitro and in vivo [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2008,294(5): 843-861.
- [9] Kang HR,Cho SJ,Lee CG. Transforming growth factor stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metal-loproteinase-12 [J]. Biol Chem, 2007, 282 (10): 7723-7732.
- [10] 黄振杰,郑金旭,莫凯灭. TGF- $\beta$ 1 诱导肺泡上皮细胞间质转化[J]. 吉林医学,2010,31(29):5062-5064.
- [11] Xiao J,Xiang Q,Xiao YC,et al. The effect of transforming growth factor-beta1 on nasopharyngeal carcinoma cells:insensitive to cell growth but functional to TGF-beta/Smad path way[J]. J Exp Clin Cancer Res,2010, 29 (1):35-37.
- [12] Lasky JA,Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors[J]. Environ Health Perspect,2000,108(4):751-762.
- [13] Razani B,Zhang XL,Bitzer M,et al. Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-bet/Smad signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor[J]. J Biol Chem,2001,276(9):6727-6738.
- [14] Zuluaga S,Alvarez-Barrientos A,Gutierrez-Uzquiza A,et al. Negative regulation of akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1[J]. Cell Signal,2007,19(1):62-74.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-02-12)