论著

文章编号:1000-5404(2013)05-0416-05

雾化吸入布地奈德对肺纤维化大鼠的干预效果

贺凤群[1,2],秦光梅[1],曾 鸣[1],王秋琼[1],罗 华[1],廖 娟[3] (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院:呼吸内科[1],中心实验室[3];400016 重庆,重庆医科大学重庆市神经病学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究雾化吸入布地奈德对博莱霉素致大鼠肺纤维化模型的干预作用。**方法** 45只SD雌性大鼠随机分成3组(每组15只):模型组、对照组和布地奈德吸入组。各组大鼠分别于干预后第7、14、28天用随机数字表法处死5只,HE和Masson染色判断肺组织肺泡炎及肺纤维化程度,酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清和肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage fluid,BALF)中转化生长因子(transforming growth factor-β,TGF-β)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)的含量。**结果** ①HE和Masson染色结果证实成功复制经典肺纤维化模型,肺纤维化主要发生在肺组织局部,同时伴有不同程度全身反应。②布地奈德吸入组和模型组大鼠肺泡炎和肺纤维化程度较对照组严重($P<0.05$),且布地奈德吸入组大鼠肺泡炎和肺纤维化程度较模型组有明显改善($P<0.05$)。③ELISA法显示各组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF表达水平不同,BALF中TGF-β和CTGF表达水平较血清水平高。④与对照组比较,模型组和布地奈德吸入组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF明显增加($P<0.05$),布地奈德吸入组中TGF-β和CTGF水平较模型组明显降低($P<0.05$)。**结论** 雾化吸入布地奈德能减轻博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化,可能与肺泡灌洗液和血清中TGF-β和CTGF表达有关。

[关键词] 肺纤维化;布地奈德;雾化吸入;转化生长因子;结缔组织生长因子
[中图法分类号] R563.9; R965; R977.11 [文献标志码] A

Effect of budesonid inhalation on expression of TGF-β and CTGF in serum and BALF of bleomycin-induced pulmonary fibrosis rats

He Fengqun[1,2], Qin Guangmei[1], Zeng Ming[1], Wang Qiuqiong[1], Luo Hua[1], Liao Juan[3] ([1]Department of Respiratory Diseases, [3]Department of Central Laboratory, Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 402160; [2]Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of budesonid inhalation on the expression of transforming growth factor (TGF)-β and connective tissue growth factor (CTGF) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of bleomycin-induced pulmonary fibrosis rats. **Methods** Forty-five SD rats were randomly divided into three groups (15 rats in each group) including a model group, a control group and an intervention group. Five rats in each group were randomly killed on the 7th, 14th and 28th day after the intervention. HE staining and Masson staining were used to determine the degree of alveolitis and pulmonary fibrosis. The expression levels of TGF-β and CTGF in serum and BALF were determined by ELISA. **Results** (1) HE staining and Masson staining of lung tissues proved that the classical model of pulmonary fibrosis was successfully constructed. (2) The degree of alveolitis and pulmonary fibrosis in the model group and intervention group was significantly more serious than that in the control group ($P<0.05$), and the pathological changes in the intervention group were significantly improved as compared with the model group ($P<0.05$). (3) The ELISA results showed the expression levels of CTGF and TGF-β were different in BALF and serum in each group, and the expression levels of CTGF and TGF-β in BALF were significantly higher than those in serum. (4) The expression levels of CTGF and TGF-β in the model group and intervention group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and they were significantly lower in the intervention group than in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Budesonid can improve bleomycin-induced pulmonary fibrosis by reducing the expression levels of TGF-β and CTGF in BALF and serum of rats.

[**Key words**] pulmonary fibrosis; budesonid; inhalation; TGF-β; CTGF

Supported by the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-067). Corresponding author: Qin Guangmei, E-mail:QGM1962820@sina.com

[基金项目] 重庆市卫生局项目(2009-2-067)
[通信作者] 秦光梅,E-mail:QGM1962820@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121225.1250.008.html(2012-12-25)

肺纤维化是有多种原因引起的慢性肺疾病的共同结局,是呼吸衰竭的主要原因。其主要病理特点是早期以肺泡炎表现为主,后期则以成纤维细胞的病理性增生及细胞外基质病理性聚集取代正常肺组织结构为转归。近年研究[1]主张肺纤维化是一种间叶细胞疾病,间叶细胞因子在纤维化疾病中发挥关键作用。转化生长因子(transforming growth factor-β,TGF-β)和结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)是引起纤维化发生、发展的关键因子。

肾上腺皮质激素是间质性肺疾病首选的治疗药物,布地奈德具有较强的局部抗炎作用,脂溶性强,与激素受体亲和力强,半衰期短,体内灭活快,无蓄积。局部吸入激素全身不良反应少,并可在肺内局部形成高浓度,与相应的受体结合发挥强大的局部抗炎活性,抑制炎症细胞的迁移和活化、抑制细胞因子的生成、抑制炎症介质的释放,从而起到抗炎、抗纤维化的作用,阻止肺纤维化的形成及进展。故本实验采用布地奈德联合局部雾化吸入干预肺纤维化大鼠,观察对大鼠肺纤维化的干预效果,并检测肺纤维化大鼠血清和肺泡罐洗液中TGF-β和CTGF的表达水平以推测其可能机制,旨在为探讨临床最佳药物治疗肺纤维化提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 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),大鼠CTGF、TGF-β ELISA试剂盒(上海沪尚生物科技有限公司),其他常规试剂均为国产分析纯,Bio-Rad酶标仪为美国伯乐公司产品。

1.1.2 实验动物 清洁级SD大鼠,体质量180~200 g,雌性,45只,由重庆医科大学实验动物中心提供。饲养条件:每日光照12 h,黑暗12 h,室温为常温,水食任意摄取。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模方法 45只SD雌性大鼠按数字表法分为3组:对照组、模型组、布地奈德吸入组,每组15只。

模型组、布地奈德吸入组用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。对照组大鼠肺部注入等体积的生理盐水。实验期间,大鼠自由饮水和进食。

1.2.2 雾化吸入方法[2] 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(0.5 mg/kg)稀释液(布地奈德吸入组),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,右心取血离心留取血清放入-70 ℃冰箱保存供ELISA法测定用;结扎左肺,向右肺注入4 ml生理盐水回抽收集灌洗液,重复4次,灌洗液离心留取上清液放入-70 ℃冰箱保存供ELISA法测定用,再结扎右肺,解开左肺,将4%的多聚甲醛打入左主支气管,见肺胸膜灌注饱满后结扎,将左肺放入多聚甲醛中浸泡。

1.2.4 肺组织病理学检查 取左肺,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染色按叶旭军等[3]研究标准评价肺泡炎及肺纤维化(0~+++级)的程度。

1.3 统计学处理

使用SPSS 16.0软件进行数据分析,等级计数资料转化为计量资料,方法如下:-以"1分"表示,+以"2分"表示,++以"3分"表示,+++以"4分"表示,以此类推,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较进行方差分析,两组比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 一般情况观察与体质量变化

各组大鼠在气管内注药后第1天,活动减少,精神萎靡,摄食差,体质量减轻。随着时间进展其状态逐渐好转,对照组大鼠精神、食欲、活动灵敏,恢复快,体质量增加明显;模型组精神、食欲可好转,体质量增加缓慢;布地奈德吸入组精神、食欲逐渐好转,体质量增加逐渐加快。在雾化后第7、14、28天后各组大鼠体质量变化见表1。

表1 各组大鼠雾化后7、14、28 d体质量的变化(g,$n=5$, $\bar{x} \pm s$)

组别	7 d	14 d	28 d
对照组	237.4±2.9	269.0±2.5	306.9±5.1
模型组	206.7±5.3[ab]	221.6±3.1[ab]	235.0±5.6[ab]
布地奈德吸入组	218.4±1.6[a]	236.9±4.6[a]	259.2±3.7[a]
F值	91.88	234.59	281.79
P值	<0.05	<0.05	<0.05

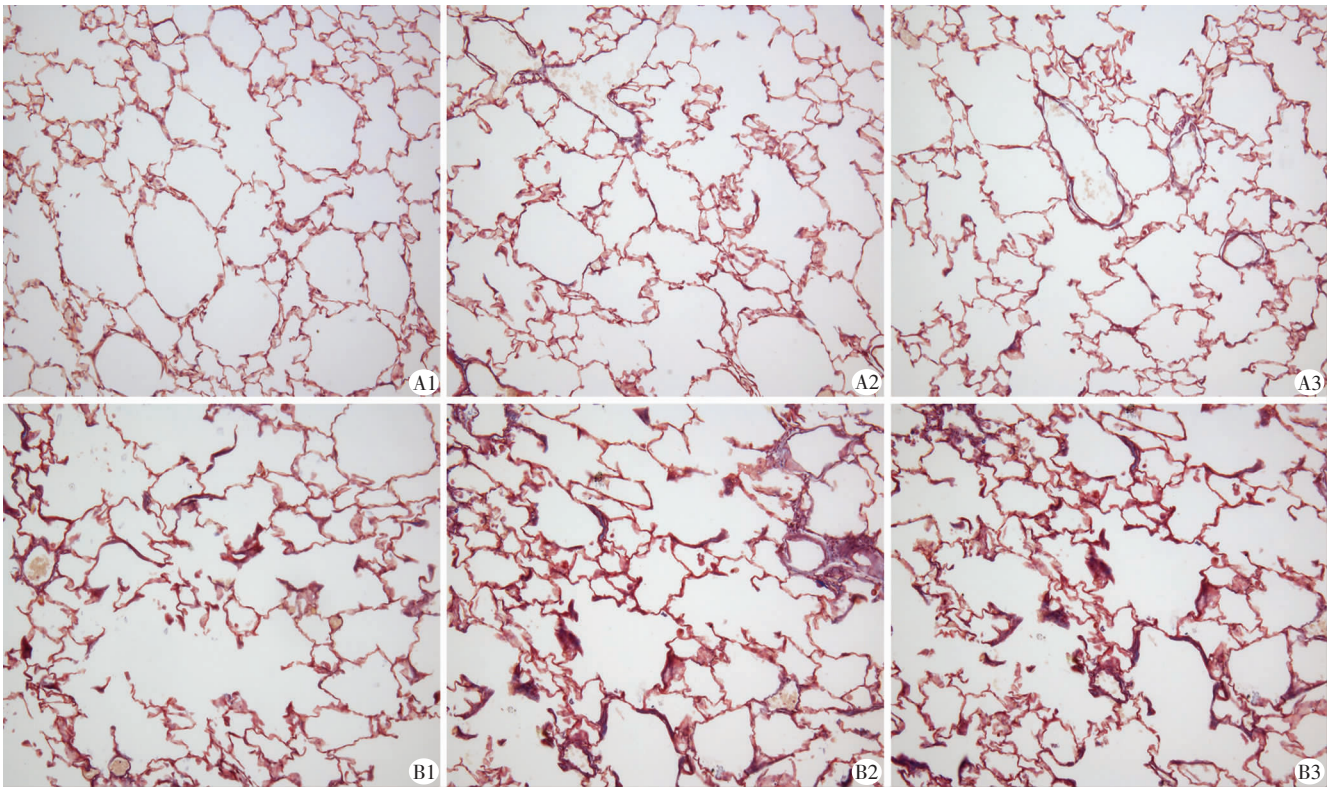
a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与布地奈德吸入组比较

2.2 各组大鼠肺组织病理学变化

石蜡切片HE、Masson染色观察肺泡炎和纤维化程度。对照组肺组织结构正常,大鼠无肺泡间隔水肿、炎性细胞浸润和纤维化形成。模型组及布地奈德吸入组大鼠可见肺泡结构不同程度破坏,间质不同程度增生,可见炎性细胞浸润和胶原纤维增生;与模型组比较,布地奈德吸入组各时间点的肺泡炎和肺纤维化程度均有不同程度的改善(图1~3、表2)。

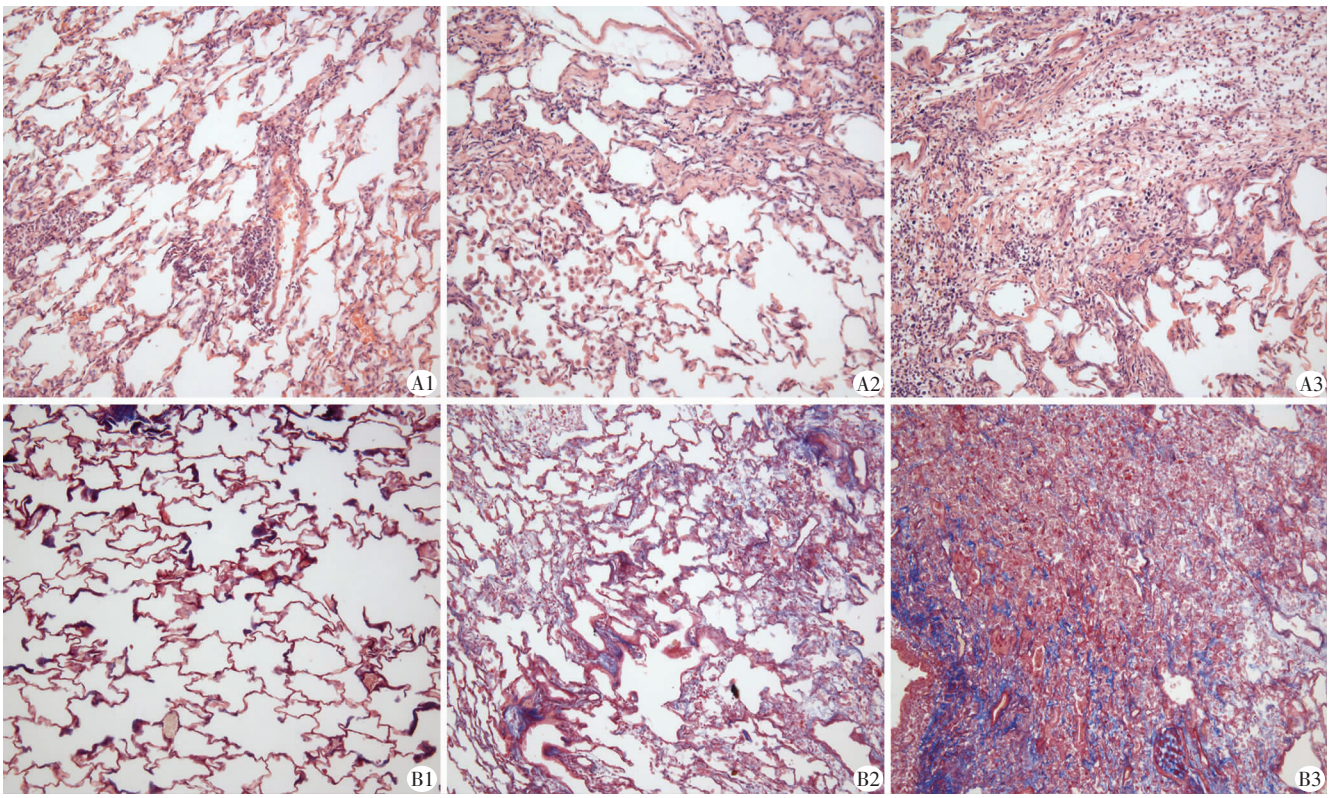
2.3 BALF和血清中TGF-β和CTGF表达水平

ELISA法显示各组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF表达水平不同,与对照组比较,模型组和布地奈德吸入组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF表达均明显增加($P<0.05$),而布地奈德吸入组大鼠血清及BALF中TGF-β和CTGF表达较模型组明显减少($P<0.05$),且各组大鼠BALF中TGF-β和CTGF表达水平较血清水平高(表3、4)。



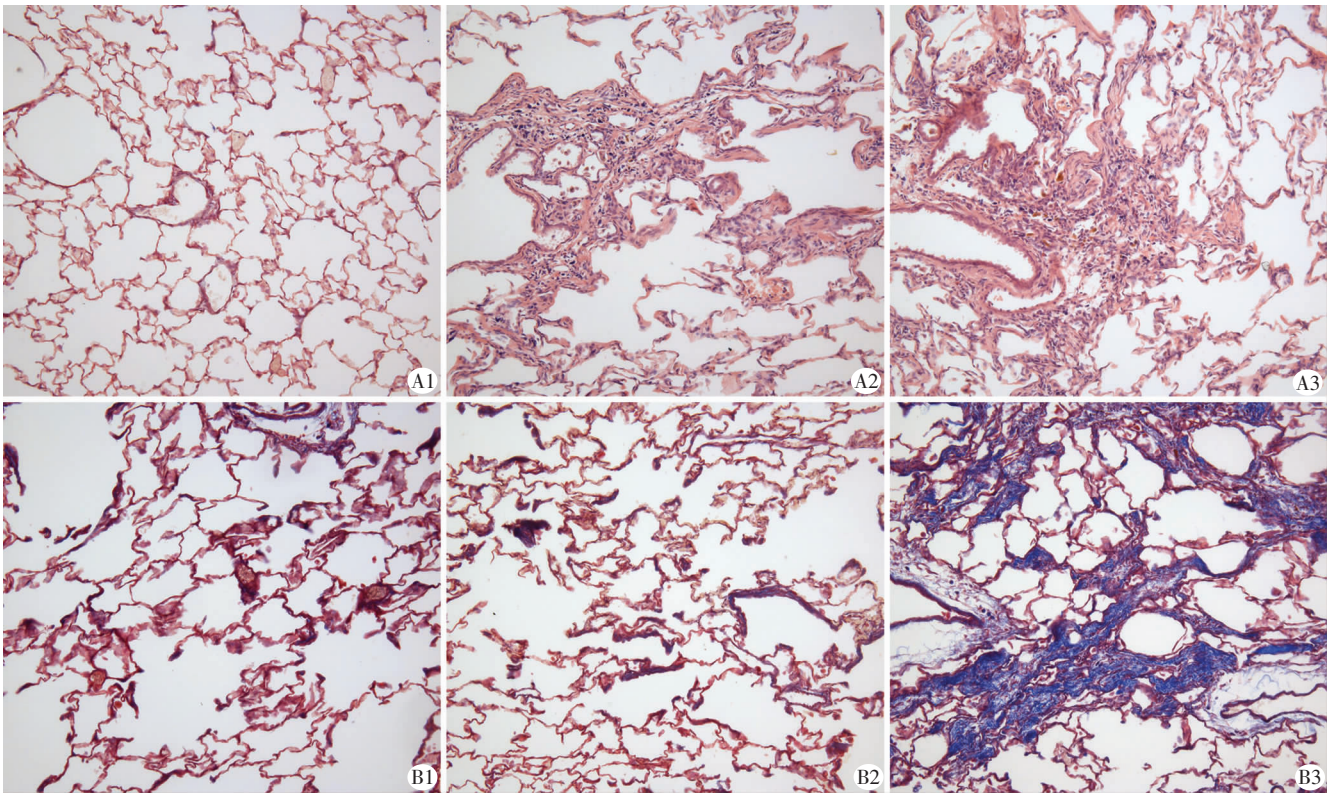
A1、B1:7 d;A2、B2:14 d;A3、B3:28 d

图1 对照组各时相点大鼠肺组织纤维化的HE(A)和Masson染色(B)结果 (×200)



A1、B1:7 d;A2、B2:14 d;A3、B3:28 d

图2 模型组各时相点大鼠肺组织纤维化的HE(A)和Masson染色(B)结果 (×200)



A1、B1:7 d;A2、B2:14 d;A3、B3:28 d

图 3　布地奈德吸入组各时相点大鼠肺组织纤维化的 HE(A)和 Masson 染色(B)结果　(×200)

表 2　雾化吸入布地奈德对各组大鼠肺纤维化大鼠肺泡炎和肺纤维化程度的影响(分, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		28 d	
	肺泡炎	肺纤维化	肺泡炎	肺纤维化	肺泡炎	肺纤维化
对照组	1.20±0.45	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
布地奈德吸入组	2.80±0.84[a]	1.80±0.45[a]	2.20±0.84[a]	2.40±0.55[a]	1.80±0.45[a]	3.40±0.54[a]
模型组	3.60±0.55[ab]	2.60±0.54[ab]	3.20±0.45[ab]	3.20±0.44[ab]	2.80±0.45[ab]	4.00±0.45[ab]
F 值	18.67	19.2	20.22	37.2	30.5	65.2
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与布地奈德吸入组比较

表 3　各组大鼠 BALF 中 TGF-β 和 CTGF 表达水平变化(pg/mL, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		28 d	
	TGF-β	CTGF	TGF-β	CTGF	TGF-β	CTGF
对照组	8.17±1.65	115.20±2.48	8.30±1.14	116.86±3.46	9.81±0.53	117.4±5.26
布地奈德吸入组	34.28±0.55[a]	132.59±3.05[a]	22.83±1.25[a]	156.01±2.71[a]	18.23±1.23[a]	127.9±5.06[a]
模型组	58.28±1.70[ab]	151.73±3.33[ab]	46.69±2.80[ab]	171.37±3.17[ab]	32.04±0.77[ab]	143.8±1.30[ab]
F 值	1271	150.81	422.33	323.08	638.06	38.71
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与布地奈德吸入组比较

表 4　各组大鼠血清 TGF-β 和 CTGF 表达水平变化(pg/mL, $n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		28 d	
	TGF-β	CTGF	TGF-β	CTGF	TGF-β	CTGF
对照组	0.75±0.14	14.26±0.63	0.82±0.15	17.02±2.15	0.90±0.11	11.40±0.77
布地奈德吸入组	6.70±0.19[a]	30.34±0.57[a]	4.72±0.43[a]	22.42±0.41[a]	2.38±0.14[a]	17.67±1.58[a]
模型组	12.49±0.62[ab]	43.12±1.01[ab]	9.58±0.39[ab]	35.05±0.95[ab]	5.72±0.21[ab]	26.6±1.67[ab]
F 值	952.46	1 438	651.70	180.43	961.15	119.37
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与布地奈德吸入组比较

3 讨论

间质性肺疾病起病隐匿,早期症状轻或无,很难及时发现及治疗,故就诊时患者常处于炎症重而临床症状突出,多属中晚期。针对这一特点,本实验选择在造模后第7天开始干预,与以往研究选择在造模后0 d开始干预相比更具有临床可行性。本研究病理学结果显示布地奈德吸入组和模型组肺泡炎程度在造模后第7天达高峰,而后逐渐下降,纤维化程度呈进行性加重,到第28天达高峰,与文献[4]研究一致。

TGF-β和CTGF是肺纤维化形成和进展的关键因子,其具体致病机制尚不明确。虽然早有研究证实TGF-β是已知唯一的CTGF mRNA表达诱导剂,而针对此观点,各家言论不同。Ono等[5]研究证明CTGF协同TGF-β共同促进细胞增殖和胶原沉积,并证实CTGF受体上存在Smads功能结合位点,TGF-β依赖于Smad3和Smad4在转录水平介导CTGF表达,Asano等[6]提出在动物模型中TGF-β或CTGF单独存在时仅仅产生一个短暂的纤维化反应,这些细胞因子的行为共同促进持续肺纤维化,同时Ponticos等[7]也主张无论是体内还是体外,CTGF是一个需要联合TGF-β提高纤维化进程的辅助因子,而Sonnylal等[8]研究则证实在没有TGF-β水平高表达情况下,CTGF仍出现独立的高表达水平,Wang等[9]也认为CTGF和TGF-β存在各自独立的纤维化活动,CTGF作为TGF-β信号路径的下游因子及辅助因子双重身份参与各类型细胞纤维化过程。故本实验拟通过布地奈德抑制TGF-β和CTGF产生,影响TGF-β介导CTGF表达及CTGF独立表达双重路径,减少细胞外基质蛋白产生,从而减少肺纤维化形成。

大量研究[6-9]从蛋白和mRNA水平均证实CTGF与肺纤维化程度密切相关,其表达规律与TGF-β有着密切关系,而有关血清和BALF中TGF-β和CTGF水平升高的研究较少,本实验通过收集各组大鼠血清和BALF分别行ELISA实验检测TGF-β和CTGF的含量,其结果表明,对照组仅表达少量TGF-β和CTGF,模型组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF水平明显增加($P<0.05$),而对应时间点布地奈德吸入组大鼠血清和BALF中TGF-β和CTGF水平较模型组明显降低($P<0.05$),与Kono等[10]研究结果一致。本实验还显示出各组大鼠BALF中TGF-β和CTGF水平明显高于血清水平,与Wang等[9]提出的组织、血液或体液中CTGF表达水平与纤维化程度和严重性成正相关的说法一致,说明CTGF和TGF-β水平的升高主要发生在肺组织局部,但同时伴有不同程度的全身反应,与程继荣等[11]临床试验研究提出的CTGF水平的升高仅发生在肺部局部反应而非全身性反应有不同结论,但考虑到实验对象和纤维化模型建立及程度影响,仍需进一步临床试验证实。

参考文献:

[1] Robinson P M, Blalock T D, Yuan R, *et al*. Hammerhead ribozyme-mediated knockdown of mRNA for fibrotic growth factors: transforming growth factor-beta 1 and connective tissue growth factor[J]. Methods Mol Biol, 2012(820): 117-132.

[2] Carpenter M, Epperly M W, Agarwal A, *et al*. Inhalation delivery of manganese superoxide dismutase-plasmid/liposomes protects the murine lung from irradiation damage[J]. Gene Ther, 2005, 12(8): 685-693.

[3] 叶旭军, 徐启勇, 叶燕青. 结缔组织生长因子在大鼠肺纤维化模型中的蛋白表达[J]. 微循环学杂志, 2004, 14(1): 16-17, 20.

[4] Wang X, Wu G, Gou L, *et al*. A novel single-chain-Fv antibody against connective tissue growth factor attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Respirology, 2011, 16(3): 500-507.

[5] Ono A, Utsugi M, Masubuchi K, *et al*. Glutathione redox regulates TGF-beta-induced fibrogenic effects through Smad3 activation[J]. FEBS Lett, 2009, 583(2): 357-362.

[6] Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis[J]. J Dermatol, 2010, 37(1): 54-70.

[7] Ponticos M, Holmes A M, Shi-wen X, *et al*. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(7): 2142-2155.

[8] Sonnylal S, Shi-Wen X, 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.

[9] Wang Q, Usinger W, Nichols B, *et al*. Cooperative interaction of CTGF and TGF-β in animal models of fibrotic disease[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2011, 4(1): 4.

[10] Kono M, Nakamura Y, Suda T, *et al*. Plasma CCN2 (connective tissue growth factor; CTGF) is a potential biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(23/24): 2211-2215.

[11] 程继荣, 齐曼古力·吾守尔, 何元兵, 等. 特发性肺纤维化患者肺泡灌洗液及血清结缔组织生长因子水平的变化[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(4): 305-306.

(**收稿**:2012-08-10;**修回**:2012-12-07)

(编辑 邓强庭)