论著

文章编号:1000-5404(2012)24-2484-05

霉酚酸酯对小鼠肺纤维化的治疗作用

曹 姝,李少林,兰 曦,王 勇,邹冬玲,臧春宝,王 颖 (400016 重庆,重庆医科大学放射医学教研室)

[摘要] **目的** 探讨霉酚酸酯(mycophenolate mofetil,MMF)对博莱霉素(bleomycin,BLM)诱导的小鼠肺纤维化模型的治疗作用。**方法** 将36只C57BL/6小鼠完全随机分为6组:正常对照组、MMF对照组、BLM模型组及MMF干预组(分为低、中、高剂量组),每组6只。实验第1天BLM模型组、MMF干预组经气管注入BLM(6 mg/kg),正常对照组、MMF对照组则注入等量生理盐水。从实验第2天开始MMF干预组分别给予低、中、高剂量(20、60、100 mg/kg)MMF,2周后处死所有小鼠,收集肺脏标本;HE、Masson染色在组织形态学上观察肺纤维化病变情况,Aschcroft法评分;RT-PCR检测COLA1及COLA2的mRNA表达水平;免疫组化法检测肺组织TGF-β1的蛋白表达。**结果** BLM诱导的肺纤维化模型构建成功。MMF高剂量干预组较BLM模型组纤维化程度减轻,COLA1、COLA2 mRNA表达及TGF-β1蛋白表达明显降低($P<0.01$);低、中剂量组与BLM模型组间,MMF对照组与正常对照组间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** MMF能有效减轻BLM诱导的肺纤维化病变,其机制可能与下调促纤维化细胞因子TGF-β1相关。

[关键词] 霉酚酸酯;博莱霉素;肺纤维化;转化生长因子-β1;Ⅰ型胶原

[中图法分类号] R563.13;R965;R979.5 [文献标志码] A

Mycophenolate mofetil alleviates pulmonary fibrosis in mice

Cao Shu, Li Shaolin, Lan Xi, Wang Yong, Zou Dongling, Zang Chunbao, Wang Ying (Department of Radiology, College of Preventive Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the possible underlying mechanism of mycophenolate mofetil (MMF) in treating bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice. Methods Thirty-six C57BL/6 mice were randomly divided into 6 groups ($n=6$ for each group), including normal control group, MMF control group, BLM model group and MMF treatment groups at low, media and high doses. In 1 d after BLM (6 mg/kg) was intratracheally instilled to the mice from BLM model group and MMF treatment groups, MMF was given orally in the later groups at a dose of 20, 60 and 100 mg/kg respectively once per day for 2 weeks. All mice were killed after the treatment, and their lung tissues were collected. Pulmonary fibrosis was evaluated by Ashcroft score after HE and masson trichrome staining. The expression of collagen 1 (COLA1) and COLA2 at mRNA levels was determined by RT-PCR. TGF-β1 protein was analyzed by immunohistochemistry. Results BLM-induced pulmonary fibrosis model was successfully constructed. High dose MMF treatment resulted in significant attenuated fibrosis, lower expression of COLA and COLA2 at mRNA level, and decreased TGF-β1 protein ($P<0.01$) when compared with BLM group. No statistic difference was found between the other MMF treatment groups and BLM model groups, MMF control group and normal control group ($P>0.05$). Conclusion MMF significantly attenuates BLM-induce pulmonary fibrosis in mice, which may be due to its inhibition of TGF-β1 expression.

[**Key words**] mycophenolate mofetil; bleomycin; pulmonary fibrosis; TGF-β1; collagen 1

Supported by the Project of Chongqing Committee of Science and Technology(CSTC2009B5059). Corresponding author: Wang Ying, Tel:86-23-66691211, E-mail: wangying_cq@hotmail.com

肺纤维化是导致呼吸衰竭的重要原因,是多种不同病因肺间质疾病的共同结局,其发病机制尚不十分明确。目前研究认为纤维化过程是促纤维化细胞因子与抑纤维化细胞因子相互作用的过程,在生理情况下,细胞因子网络处于平衡状态,在病理情况下这一平衡被打破,导致胶原代谢失衡是其发病的主要机制,其中TGF-β1是调节纤维化的关键细胞因子[1]。肺纤维化在临床上尚无特别有效的治疗方法,霉酚酸酯

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2009B5059)

[通信作者] 王 颖,电话:(023)66691211,E-mail: wangying_cq@hotmail.com

(mycophenolate mofetil, MMF)是霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)的酯类衍生物,是新型免疫抑制剂,主要用于器官移植的排异反应,关于其用于肺纤维化的治疗及作用机制的报道尚不多见[2]。本实验利用博莱霉素建立小鼠肺纤维化模型,以低、中、高剂量的 MMF 作为干预,初步探讨其对肺纤维化的治疗作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 36 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,体质量 20 g 左右。实验动物饲养于温室(20~28 ℃)、自然光照周期环境中,自由饮水和进食。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

1.1.2 主要试剂 注射用盐酸博莱霉素(日本化药株式会社),霉酚酸酯粉末(上海罗氏公司),Masson 染色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司),总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒(天根生化科技有限公司),TGF-β1 兔抗鼠多克隆抗体(Santa Cruz 公司),免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 将 36 只 C57BL/6 小鼠完全随机分为 6 组:正常对照组、MMF 对照组(100 mg/kg)、BLM 模型组、MMF 干预组(20、60、100 mg/kg),每组 6 只。实验第 1 天,无菌操作下,小鼠经腹腔内麻醉(10% 的水合氯醛 0.4 ml/100 g)后,颈部正中切口,逐层暴露气管,BLM 模型组、MMF 干预组予微量移液器经甲状软骨与第 1 气管环间刺入,缓慢注入 BLM(6 mg/kg 溶于 50 μl 生理盐水中),注入后将小鼠直立并左右摇晃,使 BLM 均匀分布于两肺,缝合手术切口[3]。正常对照组、MMF 对照组则注入等量生理盐水。实验第 2 天,按照小鼠的体质量计算出 MMF 的给药量,溶于 0.5 ml 的双蒸水中灌胃,每天 1 次,持续 14 d,正常对照组和 BLM 模型组等量双蒸水灌胃。记录好小鼠每日体质量变化,以便调整药量。

1.2.2 标本采集 实验第 16 天,暴露小鼠气管进行结扎,断颈法处死小鼠,迅速取出肺脏,分离左侧肺脏保存于液氮中用于 RT-PCR 检测,右肺经气管内灌注 4% 多聚甲醛后固定于相同浓度的多聚甲醛用于 HE、Masson 染色及免疫组化[4]。

1.2.3 组织学观察 将固定的组织石蜡包埋、切片及 Masson染色,光镜(×100)下观察,每张切片随机选取 10 个视野,按照 Ashcroft 评分法双盲评分。0 分:正常肺;1~2 分:轻度的肺泡和支气管壁增厚;3~4 分:肺泡壁和支气管壁中等增厚,但无肺结构的明显破坏;5~6 分:较多的肺纤维化,伴有确切的肺结构破坏、纤维束形成以及小的纤维聚集;7 分:严重的肺结构扭曲及大面积的纤维化,蜂窝肺;8 分:全肺纤维化[5]。

1.2.4 RT-PCR 检测 取 50 mg 液氮冻存的左肺上叶,快速研磨至粉末状,采用 Trizol 法提取总 RNA,取 1 μg 总 RNA,以寡核苷酸(oligo dT)为引物,逆转录反应体系为 20 μl,反转录合成 cDNA。小鼠 COLA1 上游:5′-ACGCCATCAAGGTCTACTGCAAC-3′,下游:5′-CCTCGCTTCCGTACTCGAAC-3′,扩增长度为 171 bp;COLA2 上游:5′-TCTCTACTGGTGAAACCTGCATC-3′,下游:5′-GAGGACACCCCTTCTACGTTG-3′,扩增长度为 151 bp;内参 β-actin 上游:5′-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3′,下游:5′-ATGTCACGCACGATTTCCC-3′,扩增长度为 263 bp。PCR 反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,退火温度分别为 57、55、55 ℃ 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 30 个循环,72 ℃总延伸 5 min。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,经 Chem Doc XRS System 凝胶成像系统扫描,Quantity One 1-D 分析软件进行分析。

1.2.5 免疫组化 切片脱蜡至水,0.01 mol/L 枸橼酸修复液微波中高火抗原修复 10 min,3% 过氧化氢去离子水消除内源性过氧化物酶活性,二抗来源动物血清封闭非特异性抗原 37 ℃ 20 min,一抗(1∶100 稀释)4 ℃孵育过夜,生物素化二抗工作液 37 ℃孵育 20 min,辣根酶标记链霉卵白素工作液37 ℃孵育 20 min,DAB 光镜下控制显色,苏木精复染 1 min,乙醇阶梯脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.6 图像分析 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件,每张切片随机选取 10 个视野(×400)进行图像分析,自动计算积分光密度值(IOD),计算图片平均光密度值(MOD)用于比较各组间 TGF-β1 蛋白表达情况。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,组间比较行单因素方差分析,方差齐者用 LSD 检验,方差不齐则用 Tamhanes's T2 检验。

2 结果

2.1 组织学病理变化

光镜下观察正常对照组、MMF 对照组未见明显病理变化。BLM 模型组,低、中剂量 MMF 干预组肺纤维化改变显著,肺间隔明显增宽,见大量胶原沉积,肺泡腔结构破坏,腔内见大量巨噬细胞聚集,证明肺纤维化模型构建成功。高剂量的 MMF 作用后,BLM 诱导的肺纤维化病变程度明显减轻(图 1、2)。各组 Ashcroft 评分见表 1。

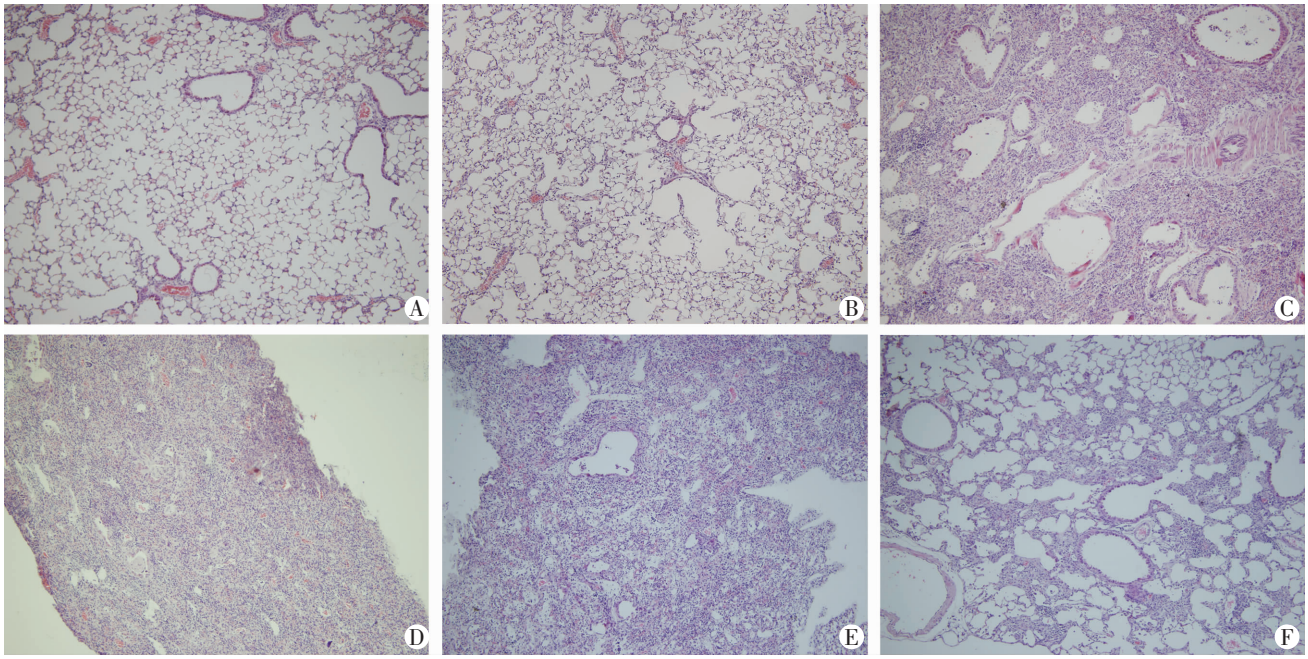
表 1 各组小鼠肺纤维化 Ashcroft 评分比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Ashcroft 评分
正常对照组	0.60 ± 0.28
MMF 对照组	0.93 ± 0.41
BLM 模型组	5.75 ± 0.53[a]
MMF 低剂量干预组	5.40 ± 0.50[a]
MMF 中剂量干预组	5.27 ± 0.62[a]
MMF 高剂量干预组	3.22 ± 0.20[b]

a: $P<0.01$,与正常对照组比较; b: $P<0.01$,与 BLM 模型组比较

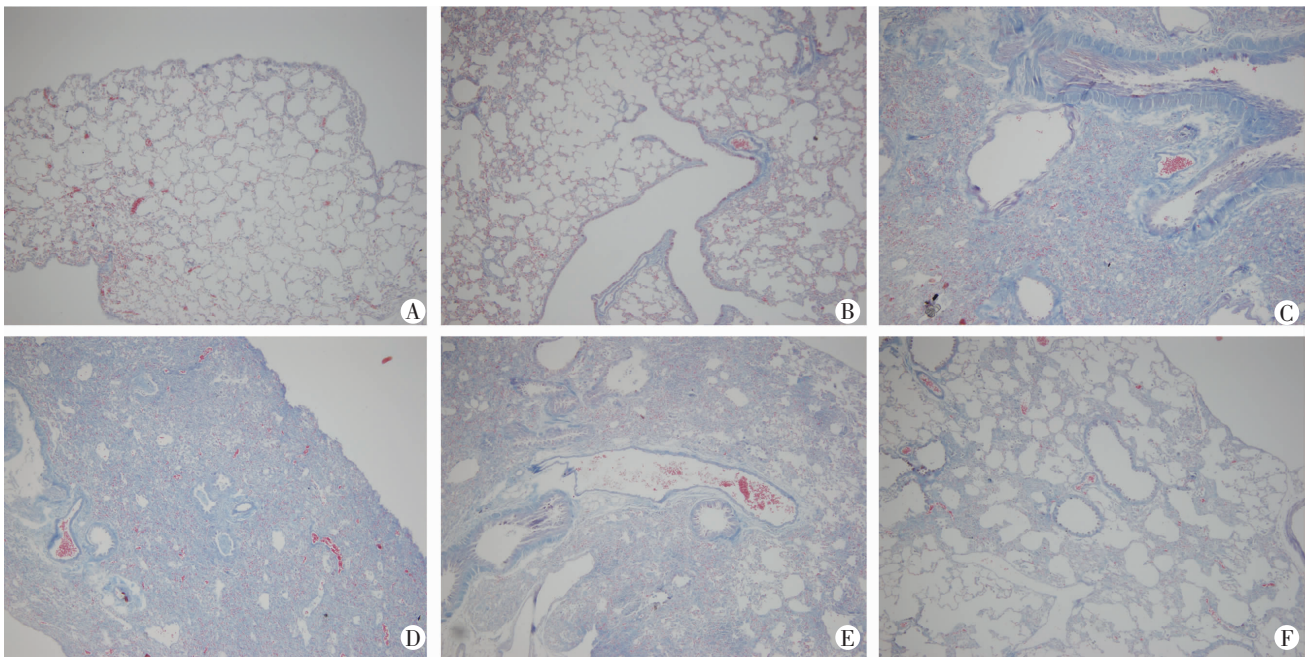
2.2 COLA1 及 COLA2 mRNA 在各组小鼠肺组织中的表达

RT-PCR 结果显示:BLM 模型组 COL1A1 及 COL1A2 mRNA 的表达明显高于正常对照组($P<0.01$),MMF 高剂量干预组 COL1A1 及 COL1A2 mRNA($P<0.01$)的表达较 BLM 模型组显著降低,而 MMF 低、中剂量干预组与 BLM 模型组,MMF 对照组与正常对照组间表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2、图 3。



A:正常对照组;B:MMF对照组;C:BLM模型组;D:MMF低剂量干预组;E:MMF中剂量干预组;F:MMF高剂量干预组

图1 各组小鼠肺组织HE染色观察 (×100)



A:正常对照组;B:MMF对照组;C:BLM模型组;D:MMF低剂量干预组;E:MMF中剂量干预组;F:MMF高剂量干预组

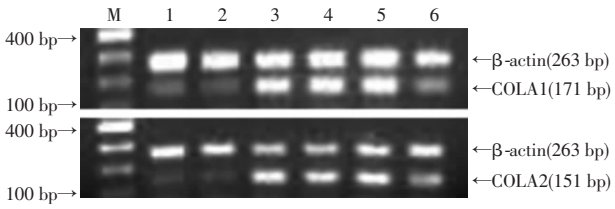
图2 各组小鼠肺组织Masson染色观察 (×100)

表2 各组小鼠肺组织COLA1、COLA2 mRNA表达的比较

($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	COLA1 mRNA	COLA2 mRNA
正常对照组	0.457±0.166	0.420±0.230
MMF对照组	0.482±0.200	0.558±0.288
BLM模型组	1.457±0.155[a]	1.218±0.301[a]
MMF低剂量干预组	1.400±0.243[a]	1.320±0.438[a]
MMF中剂量干预组	1.333±0.227[a]	1.365±0.418[a]
MMF高剂量干预组	0.745±0.284[b]	0.635±0.165[b]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与BLM模型组比较



M:标准;1:正常对照组;2:MMF对照组;3:BLM模型组;4:MMF低剂量干预组;5:MMF中剂量干预组;6:MMF高剂量干预组

图3 RT-PCR检测各组肺组织中COLA1及COLA2 mRNA的表达

2.3 TGF-β1 蛋白在各组小鼠肺组织中的表达

免疫组化结果显示:在正常肺组织中,TGF-β1 主要在支气管黏膜上皮中呈弱表达,BLM 模型组在支气管黏膜上皮、肺泡巨噬细胞、肺间质成纤维细胞中表达较强,与正常肺组织比较差异有统计学意义($P<0.01$),MMF 高剂量干预组 TGF-β1 蛋白表达较 BLM 模型组明显降低($P<0.01$),TGF-β1 蛋白在 MMF 低、中剂量干预组与 BLM 模型组间,MMF 对照组与正常对照组间表达差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3、图 4。

表 3 各组小鼠肺组织中 TGF-β1 蛋白 MOD 值比较 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

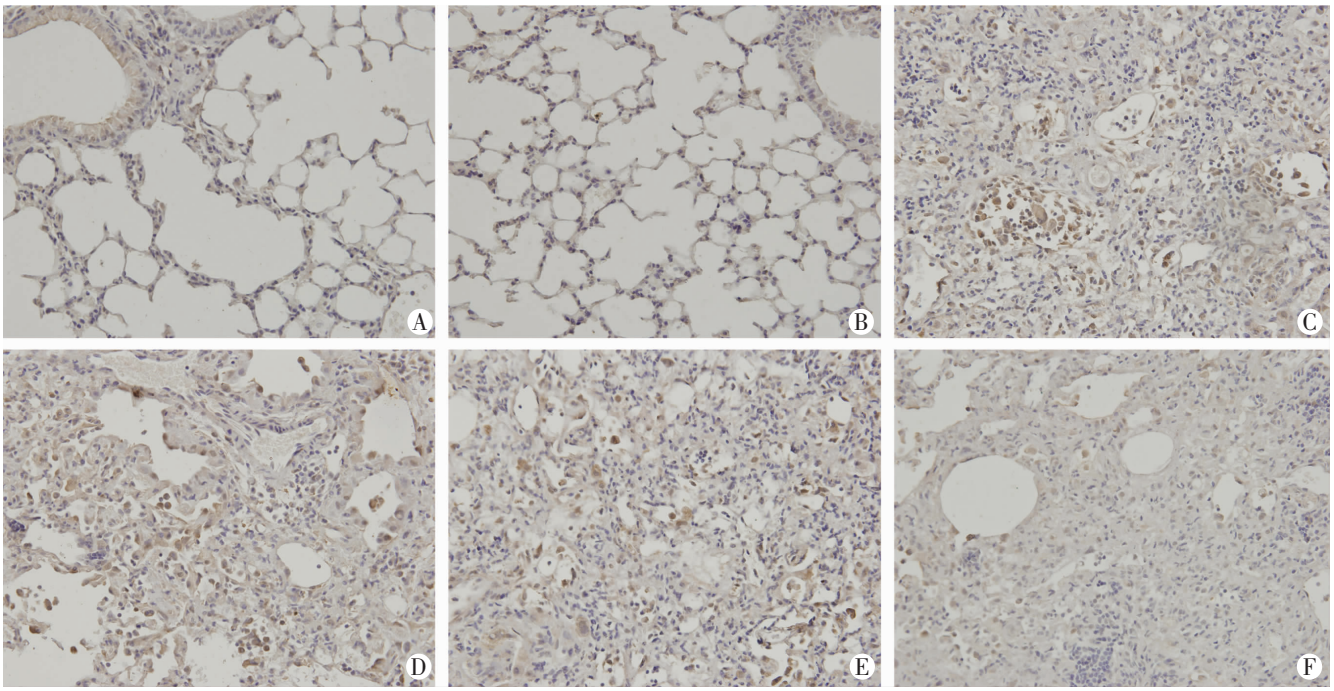
组别	TGF-β1 蛋白 MOD 值
正常对照组	0.015 7±0.000 9
MMF 对照组	0.016 7±0.003 8
BLM 模型组	0.034 1±0.001 6[a]
MMF 低剂量干预组	0.033 9±0.001 9[a]
MMF 中剂量干预组	0.034 5±0.000 9[a]
MMF 高剂量干预组	0.024 5±0.001 2[b]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与 BLM 模型组比较

3 讨论

肺纤维化是一种严重的肺疾病,是导致呼吸衰竭的重要原因,是多种不同病因肺间质疾病的共同结局。在肿瘤的治疗过程中,无论放疗还是化疗都可能导致肺纤维化,肺纤维化是肿瘤放射治疗中最为严重的并发症之一。Kong 等[6]报道:3D-CRT 治疗 NSCLC 剂量递增实验随访 110 个月,Ⅱ/Ⅲ级放射性肺纤维化发生率为 14.6%;特发性肺纤维化的发病机制不明,是肺纤维化的主要原因。Navaratnam 等[7]报道:在英国,其发病率及年死亡率均显著增加,其年死亡率由 0.92/100 000(1968 – 1972 年)增加至 5.10/100 000(2006 – 2008 年);另外免疫性疾病如系统硬化症、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎等,职业和环境相关疾病如矽肺、尘肺、石棉肺等也是肺纤维化的重要病因。其主要病理特点是早期的弥漫性肺泡炎和后期大量成纤维细胞的异常增生、肺间质胶原异常沉积。BLM 诱导的鼠类肺纤维化模型是最能表现肺纤维化特征的模型[3]。本实验成功利用 BLM 构建小鼠肺纤维化模型,组织学观察见肺组织间隔明显增宽,大量胶原沉积,肺泡结构破坏,肺泡腔内可见大量巨噬细胞聚集。

肺纤维化的发病机制尚未完全明了,纤维化的过程是多步骤的,包括多种细胞(巨噬细胞、上皮细胞和纤维母细胞)分泌的促炎症反应细胞因子、促纤维化细胞因子和化学因子过度分泌,导致细胞外基质合成增多、降解减少、胶原异常沉积。TGF-β 具有广泛的生物学作用,包括调节细胞生长、分化、凋亡、迁移、粘附、基质形成,以及损伤修复等,其促纤维化作用是细胞因子中最强的,能够促进胶原的表达,并抑制胶原的降解。



A:正常对照组;B:MMF 对照组;C:BLM 模型组;D:MMF 低剂量干预组;E:MMF 中剂量干预组;F:MMF 高剂量干预组

图 4 免疫组化观察各组肺组织 TGF-β1 蛋白表达 (S-P ×400)

TGF-β有5种同分异构体,哺乳动物主要有TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3 3种形式,三者的生物学作用基本相似,其中以TGF-β1最重要[8-9]。本实验中BLM模型组TGF-β1的蛋白表达水平明显高于正常对照组,免疫组化结果显示其主要在支气管黏膜上皮、肺间质成纤维细胞及肺泡腔巨噬细胞中呈强阳性表达,而在MMF高剂量干预组表达明显减少($P<0.01$)。

肺纤维化的治疗效果不甚理想,临床上尚无特效药物。MMF口服后在体内迅速水解为活性代谢产物MPA,通过抑制嘌呤核苷酸从头合成途径的关键限速酶次黄嘌呤核苷磷酸脱氢酶(inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH),使鸟嘌呤核苷酸的合成减少,因而能选择性抑制T、B淋巴细胞的增殖和功能,与咪唑硫嘌呤、环孢素等免疫抑制剂相比最大的优点是无明显的肝肾毒性[2]。有研究表明MMF对血管平滑肌细胞的增殖及TGF-β1、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、金属蛋白酶组织抑制物1(TIMP-1)等细胞因子及细胞外基质聚集有影响,MMF可能除了具有已知的免疫抑制作用外,还有直接的抗纤维化作用。Liu等[10]研究发现MMF对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾间质纤维化有抑制作用。Roos等[11]研究发现MMF能抑制胶原基因的表达、细胞外基质的收缩、成纤维细胞的迁移,提示其可能具有抗纤维化作用。

本课题组前期体外实验已经证实MMF能阻止TGF-β1诱导的细胞纤维化[12],本实验经气管注入BLM成功建立小鼠肺纤维化模型,利用MMF 3个不同干预剂量,探讨其在肺纤维化中的作用。与模型组比较,组织学结果显示MMF高剂量干预组肺间隔增宽程度减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡结构大致正常,Ashcroft评分明显降低($P<0.01$);RT-PCR、免疫组化结果提示其能在mRNA水平降低Ⅰ型胶原基因的表达($P<0.01$),在蛋白水平降低TGF-β1的表达($P<0.01$),而MMF对照组与正常对照组相比没有发现明显变化($P>0.05$)。实验结果证实MMF能够有效改善小鼠肺组织纤维化病变,其作用机制可能是通过降低TGF-β1蛋白表达,抑制TGF-β1细胞信号转导,在转录水平抑制Ⅰ型胶原基因表达,改善肺纤维化程度,对肺纤维化有治疗作用,同时也证明MMF本身没有毒性,为该药的临床应用提供了实验依据。

TGF-β1促纤维化作用的发挥需要完整的信号通路,Smad蛋白是TGF-β1的主要中介分子,它将TGF-β1的信号由细胞外转至细胞核。Smads蛋白家族根据结构和功能特征可分为3个亚族:受体调节Smads(R-Smads),包括Smad2、3、5、8;通用型Smads(C-Smads),即Smads4;抑制型Smads(Ⅰ-Smads),包括Smad6、7。Ⅰ型TGF-β受体(TβRⅠ)被TGF-β1激活后,磷酸化Smad2和Smad3蛋白,磷酸化的R-Smads和C-Smads形成寡聚合物后进入细胞核,与其他转录因子共同调节靶基因的转录,Smad7是主要的抑制负向调节剂,是TGF-β1信使的拮抗剂,能够与TβRⅠ牢固结合,阻止TβRⅠ磷酸化Smad2、Smad3蛋白,从而终止TGF-β1的信号转导[13]。霉酚酸酯对Smad蛋白家族的作用将是我们下一步研究的内容。

参考文献:

[1] Wynn T A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis[J]. J Exp Med, 2011, 208(7): 1339-1350.

[2] Ciancio G, Miller J, Gonwa T A. Review of major clinical trials with mycophenolate mofetil in renal transplantation[J]. Transplantation, 2005, 80(2 Suppl): S191-S200.

[3] Moore B B, Hogaboam C M. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2): L152-L160.

[4] 尚宏伟, 李宝红, 王兴翠, 等. 大鼠肺组织制片方法的改进[J]. 首都医科大学学报, 1999, 20(2): 127-128.

[5] Ashcroft T, Simpson J M, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. J Clin Pathol, 1988, 41(4): 467-470.

[6] Kong F M, Hayman J A, Griffith K A, *et al*. Final toxicity results of a radiation-dose escalation study in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC): predictors for radiation pneumonitis and fibrosis[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 65(4): 1075-1086.

[7] Navaratnam V, Fleming K M, West J, *et al*. The rising incidence of idiopathic pulmonary fibrosis in the U.K[J]. Thorax, 2011, 66(6): 462-467.

[8] 黄越龙, 周春光, 陈燕, 等. TGF/Smad信号通路与肝纤维化的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2010, 27(10): 1883-1884.

[9] 谭强, 刘新民, 曾惠惠, 等. TGF-β与肺纤维化[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2007, 1(1): 50-55.

[10] Liu W H, Tang N N, Zhang Q D. Could mycophenolate mofetil combined with benazapril delay tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats?[J]. Chin Med J (Engl), 2009, 122(2): 199-204.

[11] Roos N, Poulalhon N, Farge D, *et al*. *In vitro* evidence for a direct antifibrotic role of the immunosuppressive drug mycophenolate mofetil[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321(2): 583-589.

[12] 王颖, 万跃, 谭兵, 等. 霉酚酸酯抑制转化生长因子-β在肺成纤维细胞中的表达及应用价值[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(13): 1413-1416.

[13] Rosenbloom J, Jimenez S A. Molecular ablation of transforming growth factor beta signaling pathways by tyrosine kinase inhibition: the coming of a promising new era in the treatment of tissue fibrosis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(8): 2219-2224.

(**收稿**:2012-07-30;**修回**:2012-10-21)

(编辑 张 维)