论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0236-04

ROCK抑制剂法舒地尔在高氧致新生大鼠肺纤维化中的作用

漆秀洁,许 峰,方 芳,李 静 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地,PICU)

[摘要] **目的** 探讨Rho激酶(Rho kinase,ROCK)抑制剂法舒地尔(fasudil,FAS)在高氧致新生SD大鼠肺纤维化中的作用。**方法** 新生SD大鼠24只按随机数字表法分为空气+生理盐水(NS)组(正常对照组)、空气+FAS组、高氧+NS组和高氧+FAS组,分别建立动物模型。在实验的第21天分别取各组新生大鼠行肺组织病理学检查,碱水解法测肺组织羟脯氨酸含量,免疫组化法和Western blot检测肌成纤维细胞表型标志α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)的表达与分布。**结果** ①病理学检查结果显示,高氧+NS组肺组织结构紊乱,纤维化严重;高氧+FAS组较高氧+NS组明显改善。②肺组织羟脯氨酸测定结果显示,空气+NS组和空气+FAS组无明显差异($P>0.05$),高氧+NS组与高氧+FAS组较空气+NS组明显增加($P<0.05$),高氧+FAS组较高氧+NS明显降低($P<0.05$)。③α-SMA免疫组化和Western blot检测结果均显示,与空气+NS组相比,高氧+NS组和高氧+FAS组α-SMA的表达显著增强($P<0.05$),而高氧+FAS组较高氧+NS组明显减弱($P<0.05$)。**结论** ROCK抑制剂法舒地尔能一定程度改善高氧致新生大鼠肺纤维化,其机制可能是通过抑制肌成纤维细胞的产生从而减轻肺纤维化。

[关键词] 法舒地尔;α-平滑肌肌动蛋白;肌成纤维细胞;高氧;肺纤维化
[中图法分类号] R459.6; R563.1; R974 [文献标志码] A

Rho kinase inhibitor fasudil in neonatal rats with hyperoxia-induced lung fibrosis

Qi Xiujie, Xu Feng, Fang Fang, Li Jing (Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing of Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Department of Pediatric Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the Rho kinase inhibitor fasudil (FAS) in neonatal rats with hyperoxia-induced lung fibrosis. **Method** According to the random number tables, twenty-four Sprague-Dawley neonatal rats were randomly divided into 4 groups: air + normal saline (NS) group, air + FAS group, hyperoxia + NS group and hyperoxia + FAS group. After 21 d, the subjects were sacrificed. The changes of lung histomorphology were observed. Hydroxyproline in the lung was detected by sample hydrolysis method. α-smooth muscle actin (α-SMA) protein expression in the lung was determined by immunohistochemistry assay and Western blotting. **Results** Pathological examination showed structural disorder and obvious fibrosis in the lung tissues of hyperoxia + NS group and the signs of improvement in the lung tissues of hyperoxia + FAS group at 21 d. The content of hydroxyproline and α-SMA protein expression in lung tissues were both increased markedly at 21 d in the hyperoxia + NS group and hyperoxia + FAS group compared with the air groups, and were significantly lower at 21 d in the hyperoxia + FAS group than in the hyperoxia + NS group. **Conclusion** Rho kinase inhibitor fasudil has obvious therapeutic effects on hyperoxia-induced lung fibrosis, probably through myofibroblast inhibition.

[**Key words**] fasudil; α-smooth muscle actin; myofibroblast; hyperoxia; lung fibrosis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101442). Corresponding author: Li Jing, E-mail: lijingwangyi@126.com; Xu Feng, E-mail: xufeng9899@163.com

氧疗是临床上改善新生儿尤其是早产儿缺氧的重要治疗手段,但长时间吸入高浓度氧易引发肺实质和间质弥漫性非特异性炎症,进而导致气道重塑和纤维化[1]。目前国际上尚无有效的治疗手段,但大量临床资料显示其病因与肺异常损伤修复密切相关。肌成纤

[基金项目] 国家青年自然科学基金(81101442)
[通信作者] 李 静,E-mail: lijingwangyi@126.com
许 峰,E-mail: xufeng9899@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1409.006.html(2013-10-22)

维细胞(myofibroblast,MF)是一类特殊表型的成纤维细胞,其兼具有成纤维细胞和平滑肌细胞的功能,特征性表达 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)[2]。在病理因素的刺激下,MF 过度增殖,它的持续堆积或凋亡障碍可导致肝、肾、肺等组织纤维化的进行性发展[3-5]。因此,干预 MF 的增殖很可能为高氧肺损伤的预防和治疗提供更有效的手段。近年研究发现阻断 Rho/Rock 通路可明显抑制肌成纤维细胞的产生和堆积,从而减轻组织纤维化[6-7]。然而,Rock 抑制剂是否能改善高氧致肺纤维化鲜有报道。本研究旨在通过 Rock 抑制剂法舒地尔(fasudil,FAS)的使用,观察 α-SMA 的表达变化与肺组织的病理变化和肺纤维化程度,初步探讨法舒地尔在高氧致肺纤维化中的作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及造模方法

将新生足月的 SD 大鼠 24 只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,雌雄不限,体质量(5.0 ± 0.5)g,按随机数字表法分为 4 组,每组 6 只:①空气 + 生理盐水(NS)组(正常对照组);②空气 + FAS 组;③高氧 + NS 组;④高氧 + FAS 组。高氧两组大鼠置于动物氧仓中,持续通入纯氧,测氧仪(数字测氧仪 CY12C 型)监测氧浓度,保证氧浓度 > 95%,CO_2 浓度 < 5%;空气两组大鼠置于同一室内空气中,空气中氧浓度为 21%。②、④组自实验的第 1 天起,腹腔注射法舒地尔 20 mg/(kg · d),每天 1 次,为消除注射因素影响;①、③组同时注射等量生理盐水,直至 21 d。每日上午 10:00 将实验组和对照组母鼠对调以避免因氧气中毒致哺乳能力下降,并更换垫料,添加饲料、水,统计生存情况,称体质量,开箱时间不超过 1 h。环境温度 22 ~ 26 ℃,湿度 60% ~ 70%。于实验 21 d 3% 水合氯醛腹腔注射麻醉后将大鼠固定,取肺组织,左肺浸满 4% 多聚甲醛固定过夜后石蜡包埋,右肺浸满 4 ℃的 PBS 液,置于液氮快速冷冻后于 -80 ℃冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 川威盐酸法舒地尔注射液(天津红日药业股份有限公司),羟脯氨酸(HYP)测试盒(南京建成生物工程研究所),全蛋白提取试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),BCA 法蛋白含量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(碧云天生物技术研究所),兔超敏二步法免疫组化检测试剂、DAB 显色试剂盒(中杉金桥),α-SMA 抗体(美国 Abcam),β-actin 兔多克隆抗体(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.2.2 肺组织病理学检查 肺组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,冲水,脱水,石蜡包埋,5 μm 切片,将病理切片分别进行苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 染色。光镜下观察各组肺组织的病理学改变和纤维化程度。

1.2.3 碱水解法检测肺组织羟脯氨酸含量 为定量观察法舒地尔对高氧致肺组织纤维化程度的影响,在实验第 21 天时,检测各组肺组织羟脯氨酸含量。按照试剂盒说明书,精确称取肺组织湿质量 30 ~ 100 mg,准确加入 1 mL 水解液,沸水浴水解 20 min 后流水冷却,加指示剂,调定 pH 值,加入相应试剂充分反应后,取上清在 550 nm 处测光密度值。根据公式计算出各组肺组织羟脯氨酸含量[8]。

1.2.4 免疫组化法检测 α-SMA 的表达与分布 采用兔超敏二步法,首先将肺组织切片常规脱蜡至水,H_2O_2 孵育以阻断内源性过氧化酶,微波热修复抗原,然后滴加 α-SMA 多克隆抗体(1∶200)孵育过夜,阴性对照用 PBS 代替一抗,二抗采用兔超敏二步法免疫组化检测试剂盒,最后用 DAB 显色,苏木精轻度复染,脱水,透明,封片。结果判断:肺组织细胞细胞膜上及细胞质呈现棕黄色颗粒作为阳性细胞。

1.2.5 Western blot 检测 α-SMA 蛋白的表达 将冻存肺组织匀浆处理后用 RIPA 裂解液和 PMSF 提取全蛋白,BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。每个样品取 50 μg 蛋白,行 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,100 V/1 h 湿转至 PVDF 膜,5% BSA 室温封闭 1 h 后,加入封闭液稀释的 α-SMA 抗体(1∶200)和 β-actin(1∶2 000),4 ℃孵育过夜,TBST 漂洗 3 次后加入二抗(1∶1 000),37 ℃孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,ECL 显色曝光,显影,测定光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较行 t 检验,多样本均数比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 法舒地尔对肺组织病理学的改变

第 21 天时,空气 + NS 组和空气 + FAS 组肺组织结构均正常,未见炎性细胞浸润和胶原沉积;高氧 + NS 组肺组织结构紊乱,肺泡塌陷融合,肺泡间隔明显增厚,可见大量宽带状和片状胶原沉积;而高氧 + FAS 组在法舒地尔干预 21 d 后肺纤维化程度较高氧 + NS 组明显改善,镜下未见弥漫性炎症和纤维化,病变部位呈局灶性分布。见图 1。

2.2 法舒地尔对肺组织羟脯氨酸水平的影响

空气 + NS 组与空气 + FAS 组肺组织 HYP 含量分别为(271.66 ± 36.25)、(283.76 ± 41.82)μg/g,高氧 + NS 组与高氧 + FAS 组肺组织 HYP 含量分别为(588.78 ± 51.74)、(477.55 ± 57.15)μg/g。空气组使用法舒地尔对肺组织 HYP 含量无明显影响($P > 0.05$),但高氧 + NS 组肺组织 HYP 含量显著增高($P < 0.05$),法舒地尔干预后高氧 + FAS 组 HYP 含量较高氧 + NS 组明显降低($P < 0.05$)。

2.3 法舒地尔对肺组织 α-SMA 表达的影响

2.3.1 免疫组化水平 第 21 天时,空气 + NS 组和空气 + FAS 组 α-SMA 强表达于支气管平滑肌细胞及血管平滑肌细胞,在肺泡间隔、肺泡表面和细支气管上皮均有少量表达;高氧 + NS 组在高氧刺激后 α-SMA 在肺泡间隔、肺泡表面表达明显增强;而高氧 + FAS 组 α-SMA 的表达较高氧 + NS 组明显减弱。见图 2。

2.3.2 Western blot 半定量水平 第 21 天时,空气 + NS 组与空气 + FAS 组 α-SMA 蛋白均有少量表达,高氧 + NS 组 α-SMA 蛋白表达显著增高($P < 0.05$),法舒地尔干预后高氧 + FAS 组肺组织 α-SMA 蛋白的表达明显降低($P < 0.05$)。见图 3。

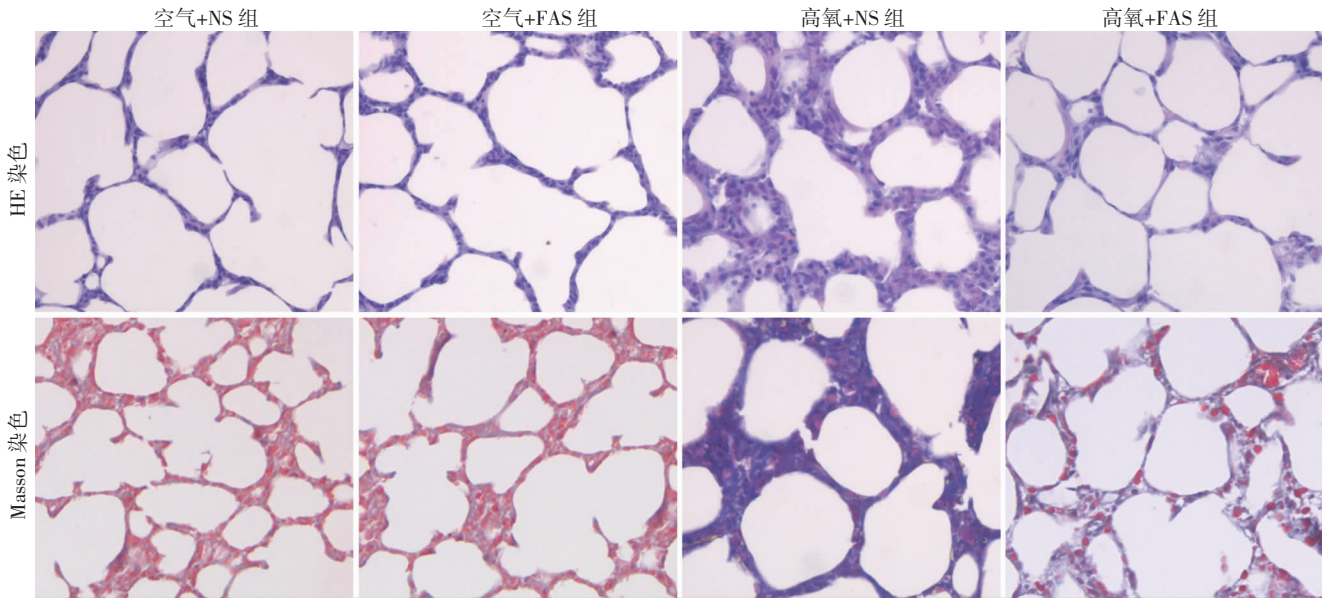
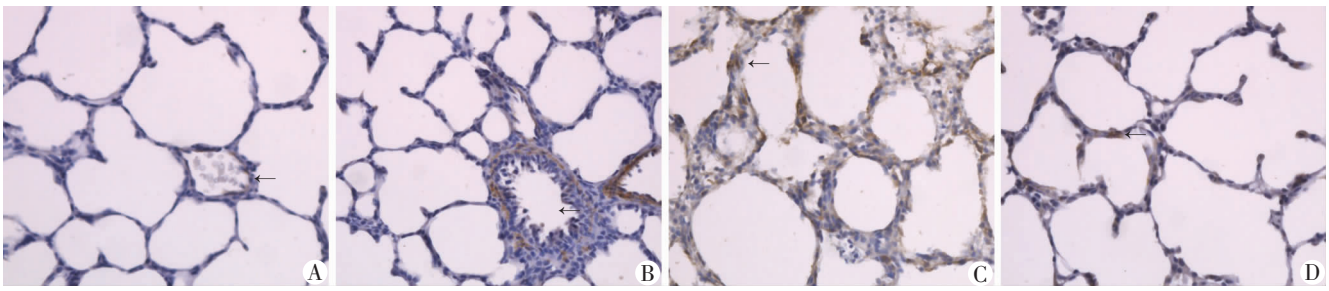
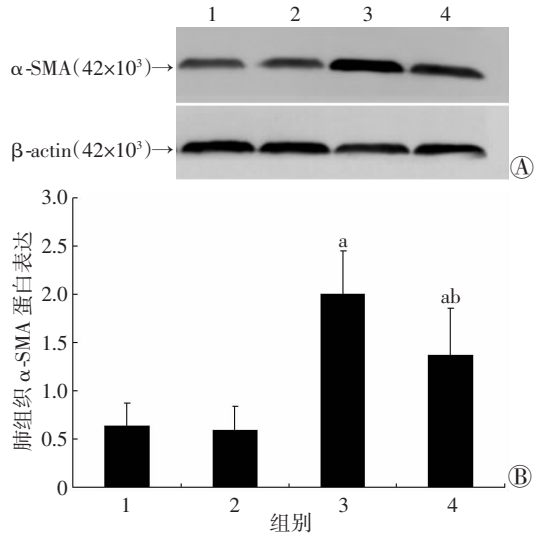


图1 HE染色和Masson染色观察21 d各组新生大鼠肺组织病理形态学变化 （×200）



A：空气+NS组 ↑：示血管平滑肌细胞；B：空气+FAS组 ↑：示支气管平滑肌细胞；C：高氧+NS组 ↑：示肌成纤维细胞；D：高氧+FAS组 ↑：示肌成纤维细胞

图2 光镜下观察21 d新生大鼠α-SMA在肺组织中的表达 （S-P ×200）



1：空气+NS组；2：空气+FAS组；3：高氧+NS组；4：高氧+FAS组

A：Western blot检测结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与空气+NS组比较；b：$P<0.05$，与高氧+NS组比较

图3 Western blot检测21 d各组新生大鼠肺组织α-SMA蛋白的表达

3 讨论

长期吸入高浓度氧易导致高氧肺损伤，理想中的肺损伤由肺泡上皮细胞修复，并恢复原有的结构和功能，而不是由成纤维细胞代替正常组织结构，这种异常修复导致了后期肺纤维化的形成。我室前期研究发现，在高氧暴露的第3、7天时肺组织以炎症反应为主，在高氧暴露的第14天时可观察到肺组织纤维化，而21 d时肺组织纤维化更明显[8]，因此选用21 d作为本研究的观察点。本研究成功建立了新生大鼠高氧肺损伤后期的肺纤维化模型，发现在高氧刺激21 d时，肺组织结构紊乱，肺泡塌陷融合，间隔增厚，肺组织羟脯氨酸含量明显升高。

成纤维细胞增生和细胞外基质（ECM）过度沉积是导致肺纤维化的重要原因，在此过程中，成纤维细胞转化为肌成纤维细胞发挥重要作用。肌成纤维细胞主要由活化的成纤维细胞发生表型改变而来，亦可通过上皮间质转分化而来。它通过分泌细胞因子、趋化因

子、生长因子、细胞外基质和蛋白酶等,在炎症、修复和多种组织的纤维化过程中发挥重要作用[9]。Kim 等[10]发现在输尿管结扎致肾纤维化的发展过程中,肾组织 α-SMA 蛋白表达进行性升高;而在脂多糖导致的肺纤维化初期时,肺组织 α-SMA 蛋白表达显著增加[11]。体外研究[12]也发现,将肺成纤维细胞在 95% O_2条件下培养 12 h 后 α-SMA mRNA 的合成增加显著,说明高氧加速了肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化。本研究 α-SMA 免疫组化发现,高氧暴露 21 d 后,α-SMA 在肺泡表面表达明显增强,提示高氧可能促进肺泡上皮细胞向肌成纤维细胞转分化,也有可能是由成纤维细胞转化而来的肌成纤维细胞移位至肺泡表面所致。Western blot 检测结果亦显示,高氧刺激 21 d 后,肺组织 α-SMA 蛋白的表达较空气对照组明显增加,同肺组织病理改变与肺组织羟脯氨酸含量变化具有一致性,提示肌成纤维细胞参与了高氧肺损伤的后期纤维化。

Rho/Rock 信号通路是机体组织中普遍存在的一条信号通路,其关键信号分子包括 RhoGTP 酶超家族、Rocks 和肌球蛋白磷酸酶等。在各种炎症因子的刺激下,通过激酶级联反应,Rho/Rock 通路参与了细胞的收缩、趋化、粘附、浸润等生物学行为。Rho/Rock 通路可调控成纤维细胞产生胶原和 ECM,促进成纤维细胞转分化,表达表型标志 α-SMA[12]。Rho/Rock 信号通路还可通过诱导上皮间质转分化,从而调节肌成纤维细胞的产生,参与组织纤维化进程[13]。在慢性肾移植致肾纤维化的模型中,通过 ROCK 抑制剂 Y-27632 的使用,能显著降低肾组织 α-SMA 蛋白表达,减轻肾纤维化[7]。而 ROCK 的另一抑制剂法舒地尔能下调 α-SMA mRNA 和蛋白的表达,减少支气管肺泡灌洗中炎性细胞的浸润、肺组织羟脯氨酸的含量,从而明显改善博来霉素所致的肺纤维化[14]。本研究发现,法舒地尔干预 21 d 后肺组织 α-SMA 蛋白的表达明显减少,羟脯氨酸含量明显降低,而肺组织纤维化明显减轻。因此,推测法舒地尔可能通过抑制肌成纤维细胞的产生与堆积从而在一定程度上改善高氧致新生大鼠肺纤维化。

综上所述,肌成纤维细胞参与高氧致新生大鼠肺纤维化的过程,ROCK 抑制剂法舒地尔可能通过抑制成纤维细胞向肌成纤维细胞转分化和(或)上皮间质转分化,有效减少肌成纤维细胞的产生,从而改善肺组织纤维化。法舒地尔是临床上唯一使用的 ROCK 抑制剂,1995 年日本正式批准其进入临床,用于治疗蛛网膜下腔出血后的脑血管痉挛,临床资料显示其具有良好的安全性[15]。本研究结果显示,ROCK 抑制剂法舒地尔有可能成为高氧肺损伤的潜在治疗药物,但其具体作用机制还有待进一步探明。

参考文献:

[1] Ali Z, Schmidt P, Dodd J, *et al*. Bronchopulmonary dysplasia: a review[J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 288(2): 325 – 233.

[2] Phan S H. Genesis of the myofibroblast in lung injury and fibrosis[J]. Proc Am Thorac Soc, 2012, 9(3): 148 – 152.

[3] Harris W T, Kelly D R, Zhou Y, *et al*. Myofibroblast differentiation and enhanced TGF-B sinaling in cystic fibrosis lung disease[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70196.

[4] Samuel C S, Mookerjee I, Halls M L, *et al*. Investigations into the inhibitory effects of relaxin on renal myofibroblast differentiation[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1160: 294 – 299.

[5] Brenner D A, Kisseleva T, Scholten D, *et al*. Origin of myofibroblasts in liver fibrosis[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, 5(Suppl 1): S17.

[6] 田高润. Rho/Rock 信号转导通路在小鼠肺纤维化模型中的作用及干预研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2010.

[7] Liu M, Gu M, Wu Y, *et al*. Therapeutic effect of Y-27632 on chronic allograft nephropathy in rats[J]. J Surg Res, 2009, 157(1): e117 – e127.

[8] 姚兰, 许峰, 罗冲, 等. CXCL12/CXCR4 在高氧致新生大鼠肺损伤中的动态变化及意义[J]. 第三军医大学报, 2011, 33(18): 1920 – 1923.

[9] 王晓蕾, 薛辛东. 肌成纤维细胞与高氧肺损伤[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(3): 260, 封3, 封4.

[10] Kim J I, Jang H S, Jeong J H, *et al*. Defect in Runx2 gene accelerates ureteral obstruction-induced kidney fibrosis *via* increased TGF-β signaling pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1832(10): 1520 – 1527.

[11] He Z, Zhu Y, Jiang H. Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study[J]. Respir Res, 2009, 10: 126.

[12] Ni J, Dong Z, Han W, *et al*. The role of RhoA and cytoskeleton in myofibroblast transformation in hyperoxic lung fibrosis[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61C: 26 – 39.

[13] He J, Xu Y, Koya D, *et al*. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease[J]. Clin Exp Nephrol, 2013, 17(4): 488 – 497.

[14] Jiang C, Huang H, liu J, *et al*. Fasudil, a rho-kinase inhibitor, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(7): 8293 – 8307.

[15] Mong P Y, Wang Q. Activation of Rho kinase isoforms in lung endothelial cells during inflammation[J]. J Immunol, 2009, 182(4): 2385 – 2394.

(**收稿**:2013-09-03;**修回**:2013-09-24)

(编辑 龙 亮)