DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.029
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)20-1843-04

论著

哮喘大鼠气道上皮 CTGF 表达及其与气道重构关系的研究

刘国祥[1],张 雷[2],黄 英[1] ([1]第三军医大学附属西南医院呼吸内科,重庆 400038;[2]南京军区福州总医院呼吸内科,南京 350000)

提 要:目的 通过观察结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)在哮喘大鼠肺内的表达变化,揭示CTGF在哮喘气道重构中的作用。方法 以卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)致敏并持续激发大鼠哮喘,天狼猩红染色法检测胶原分布及分类,酸水解法测定肺组织羟脯氨酸含量,SABC免疫组化法检测CTGF在肺组织的表达。结果 大鼠持续激发哮喘21 d后气道壁胶原增生,气道上皮细胞CTGF表达阳性,CTGF表达与肺羟脯氨酸含量密切相关($r=0.63$, $P<0.01$)。结论 大鼠长期持续激发哮喘可导致气道上皮下纤维化及气道重构,其机制可能与CTGF表达上调有关。

关键词:哮喘;CTGF;气道重构
中图法分类号:R322.33;R392.13;R562.25 文献标识码:A

Roles of epithelial CTGF expression in airway remodeling in asthmatic rats

LIU Guo-xiang, ZHANG Lei, HUANG Ying (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the roles of connective tissue growth factor (CTGF) in airway remodeling in asthmatic rats by observation of the changes of CTGF expression in the lungs of asthmatic rats. **Methods** Rats were sensitized and challenged continually with ovalbumin (OVA) for the purpose of induction of asthma in rats. The distribution and types of collagens were detected by Cirius red staining. Lung hydroxyproline content was determined by acid hydrolysis. CTGF expression in rat pulmonary tissues was detected by SABC immunohistochemistry. **Results** After continual challenging with OVA for 21 days, collagen hyperplasia was found in the airway wall and CTGF positive expression in airway epithelium. CTGF expression was closely associated with lung hydroxyproline content ($r=0.63$, $P<0.01$). **Conclusion** Asthma continually challenged with OVA can result in sub-epithelial fibrosis and remodeling in airway, which may be associated with the up-regulation of CTGF overexpression.

Key words: asthma; CTGF; airway remodeling

支气管哮喘是一种特殊的气道炎症,主要表现为气道高反应性及变异性较大的可逆性气流阻塞。但亦有大量的临床资料显示,相当多的哮喘患者即使用正规的支气管扩张剂或糖皮质激素治疗,亦表现出程度不同的不可逆性气流阻塞。目前认为,此种改变的主要原因是由于气道的持续性损伤和结构异常,即所谓气道重构。近年发现的结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF)具有促进胞外基质合成、成纤维细胞有丝分裂等功能,在肺、肾、肝等器官纤维化过程中具有重要作用,但是否参与哮喘的气道重构尚不清楚。本实验通过观察CTGF在哮喘大鼠肺内的表达变化,旨在初步揭示CTGF在哮喘大鼠气道重构中的作用。

作者简介:刘国祥(1963-),男,河南省温县人,硕士,主任医师,教授 主要从事哮喘防治等方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754511

收稿日期:2003-07-28;修回日期:2003-10-05

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

卵白蛋白(Ovalbumin, OVA, V级):美国Sigma公司;羊抗CTGF多抗:Santa Cruz公司;SABC二抗试剂盒及DAB显色剂:武汉博士德生物工程有限公司;苦味酸-天狼猩红:北京中山公司;LEICA DMIRE2图像分析系统:德国LEICA公司;Smart-Spec3000紫外分光光度计:美国Bio Rad公司。

1.2 实验动物来源及分组

雄性Wistar大鼠80只,体质量150~200g,由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为实验组和对照组,每组10只。

1.3 模型的建立

参照文献[1]方法进行。将OVA 1 mg和氢氧化铝200 mg用生理盐水1 ml新鲜配制成凝胶,第1天在大鼠双侧胸部、腹股沟共4点各皮下注射0.15 ml,同时腹腔注射0.4 ml,共计1 ml进行致敏。对照组用20%氢氧化铝凝胶同法注射。第8天两组再以相同剂量重复致敏。第15天开始每日上午9:00时将大鼠置于10 cm×10 cm×20 cm有机玻璃盒内,超声雾化吸入1%

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

OVA 共 20 min 激发哮喘。

1.4 标本采集

大鼠分别连续激发至第 7、14、21、28 天时相点，腹主动脉放血处死，即刻开胸，充分暴露全肺、气管及支气管，结扎左肺并取出后以液氮冻存。右肺以 9 ml PBS 液（pH 7.4）分 3 次灌洗，回收率> 90%，回收液以 400× *g* 离心 7 min，生理盐水漂洗 2 次，沉淀细胞以 0.5 ml 生理盐水重悬，细胞涂片后部份直接行瑞氏－吉姆萨染色作白细胞计数及细胞分类计数。

1.5 肺组织胶原染色

苦味酸－天狼猩红染色法（Masson 法）：切片常规脱蜡至水，滴加天狼猩红染液 37 ℃ 1 h 左右，苏木精复染。偏光显微镜下观察，Ⅰ型胶原呈粗大的红色或桔黄色，Ⅲ型胶原呈纤细的绿色。

1.6 肺组织羟脯氨酸含量测定

参照文献[2]进行。产物在 560 nm 波长读数，标准曲线由（0～2 μg/ml）L-羟脯氨酸标准管 D_{560} 绘制。结果以“μg”表示。

1.7 肺组织 CTGF 免疫组化染色

SABC 法参照二抗试剂盒说明书进行：切片常规脱蜡至水，枸橼酸盐缓冲液微波修复，一抗稀释度为 1∶100，DAB 显色，苏木素复染。阴性对照以 PBS 替代一抗。采用德国 LEICA 图像分析系统，每张切片随机选取 10 个具代表性的视野（× 400 倍），自动选取阳性区域并计算平均光密度值 D_{560}。

1.8 统计方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS10.0 软件包进行 χ^2 检验、相关分析。

2 结果

2.1 支气管肺泡灌洗液细胞计数

实验组肺泡灌洗液（Bronchoalveolar lavage fluids，BALF）中白细胞总数与对照组相比明显增加，以巨噬细胞增加为主，嗜酸性粒细胞、中性粒细胞也有明显增加，但两组淋巴细胞无显著差异，见表 1。

表 1 BALF 白细胞分类计数（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Differential blood cell count in BALF（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

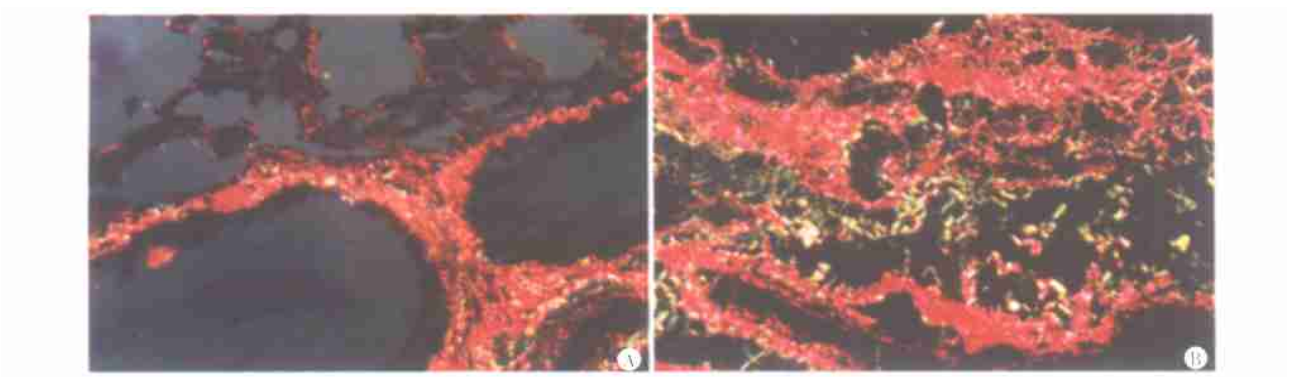
Type of WBC	Asthma group	Control group
White cells	2.41±0.53 *	0.76±0.08
Macrophages	1.42±0.38 *	0.34±0.06
Lymphocytes	0.20±0.03	0.18±0.02
Neutrophils	0.71±0.06 *	0.23±0.02
Eosinophils	0.08±0.04 *	0.01±0.01

*：$P<0.01$ *vs* control

2.2 肺组织胶原染色

对照组：大鼠胶原分布于气管、支气管及血管周围，各时相点无明显差异。

实验组：激发 7、14 d 组与对照组相似；激发 21 d 组细支气管管壁较对照组增厚，Ⅲ型胶原增生为主；激发 28 d 管壁胶原增生更明显，见图 1。



A：Control group：A little collagen around the bronchi；B：Asthma group：Thickened bronchial walls and mainly collagen Ⅲ hyperplasia

图 1 两组大鼠连续激发 28 d 后支气管管壁胶原分布 （Masson× 200）

Fig 1 Distribution of collagens in the bronchial walls of rats challenged for 28 days in both groups （Masson× 200）

2.3 肺组织羟脯氨酸含量测定

实验组激发 21 d 后肺组织匀浆羟脯氨酸含量较对照组增高，28 d 进一步增高，见表 2。

2.4 肺组织 CTGF 免疫组化染色

对照组肺组织 CTGF 几乎不表达；

实验组早期不表达，激发 21 d 后表达较对照组显著增高，主要表达于支气管、细支气管上皮细胞，28 d 表达进一步增强，见表 3，图 2。

2.5 相关分析

CTGF 免疫组化的 A average D_{560} 值与肺羟脯氨酸含量之间呈显著线性相关（$r=0.63$，$P<0.01$）。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　大鼠各时相点肺羟脯氨酸含量(μg)

Tab 2　Contents of lung hydroxyproline in rats at different time points(μg/right lung)

	7 d	14 d	21 d	28 d
Control group	1 405±103	1 416±87	1 438±127	1 433±96
Asthma group	1 366±115	1 420±139	1 607±212 *	1769±243 **

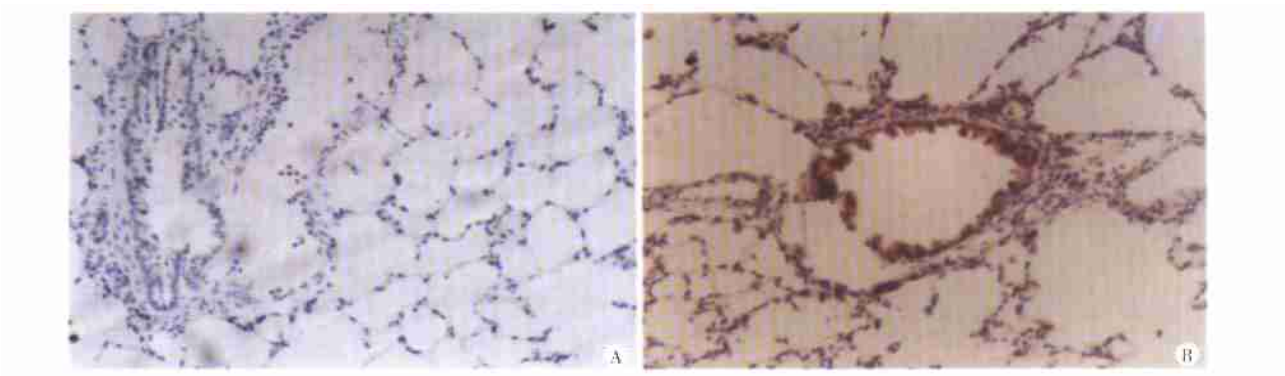
n=10,　*: P< 0 05,　**: P< 0. 01 *vs* control

表3　大鼠各时相点肺 CTGF 免疫组化结果(A average D_{560}× 100, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Immunohistochemical results of rat pulmonary CTGF at different time points(A average D_{560}× 100, $\bar{x}\pm s$)

	7 d	14 d	21 d	28 d
Control group	7±1. 6	9±1. 2	9±2. 7	8±1. 5
Asthma group	8±1. 4	10±2. 1	18±4. 5 *	24±3. 7 *

*: P< 0. 01 *vs* control



A: Control group: Nearly no CTGF expression; B: Asthma group: Markedly increase of CTGF

图 2　两组大鼠肺组织 CTGF 免疫组化染色　(SABC× 200)

Fig 2　Immunohistochemical staining of CTGF in rat pulmonary tissue in both groups　(SABC× 200)

3　讨论

本实验以卵蛋白诱发大鼠哮喘为动物模型, 实验组大鼠支气管肺泡灌洗液中巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及中性粒细胞明显增多, 与对照组相比有显著差异; 符合支气管哮喘病理生理改变, 与文献[3]报道哮喘模型的变化结果一致, 说明本实验模型是成功的。

慢性或严重的哮喘患者常常伴有明显的气道重构, 目前认为气道重构是难治性哮喘及哮喘气道不可逆性损伤的主要原因。哮喘气道重构主要表现为: ①(肌)成纤维细胞增生, 上皮基底膜下胞外基质沉积; ②气道平滑肌增生; ③上皮下及外膜血管增生, 血容量增加。近年发现不仅哮喘重症患者, 甚至连轻症及新近诊断的哮喘患者也有不同程度的上皮下纤维化[4]。从本实验可以看出, 实验组(哮喘组)连续激发 21 d 后细支气管管壁开始明显增厚, 以 II型胶原增生为主, 且肺组织羟脯氨酸含量较对照组明显增高, 连续激发 28 d 后上述改变进一步加重, 研究结论与他人一致。

CTGF 是一种新发现的细胞因子, 属于 CCN(CTGF、cyr61、nov)家族[5]。CTGF 具有促进成纤维细胞趋化、活化、增殖以及促胞外基质产生、积聚等功能, 在肺纤维化的发病过程中起着重要作用[6]。本实验显示无哮喘症状的大鼠以及早期哮喘大鼠肺组织羟脯氨酸含量均无显著变化, 也无明显 CTGF 表达。而大鼠持续激发哮喘 21 d 后肺羟脯氨酸含量开始增加, 大气道和小气道管壁均有胶原增生, 以 II型胶原为主; 同时 CTGF 表达明显增高, 主要表达于气道上皮细胞, 并且 CTGF 的表达强度与气道壁的胶原增生程度密切相关, 从而提示了 CTGF 可能在哮喘大鼠气道上皮下纤维化及气道重构中具有重要作用。

大鼠激发哮喘后 CTGF 表达上升的机制尚不清楚。TGF-β_1 是一种作用广泛的生长因子, 一方面能抑制炎症反应, 另一方面在某些炎症过程中过度表达时可能会诱导其下游因子 CTGF 表达上调, 最终导致组织器官纤维化。CTGF 与转化生长因子-β_1(TGF-β_1)关系密切。有研究表明, TGF-β_1 部分通过 CTGF 来发挥其对相关细胞的作用[7]。已往研究显示活化的 Eos 分泌 TGF-β_1 功能明显增强, 因而与普通肺部炎症不同, 哮喘患者及哮喘动物模型肺内 TGF-β_1 表达均明显上升[8,9]。据此我们推测, 哮喘时 Eos 向肺部大量浸润、活化, 分泌大量的 TGF-β_1, 后者在某些因素的协同下诱导气管、支气管上皮细胞合成、分泌 CTGF, 从而促进气道上皮下成纤维细胞活化、增殖、分泌胶原等 ECM, 导致气道重构。

参考文献:

[1]　赖克方, 王长征, 郭先健, 等. 哮喘豚鼠嗜酸性细胞浸润和凋亡的动态变化[J]. 第三军医大学学报, 1998, 20(3): 198－201.

[2]　袁发焕, 刘素英, 光丽霞. 血清羟脯氨酸浓度和脯肽酶活性在判断肾纤维化病程中的意义[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 49－

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

52.
[3] 李和权, 邵传森, 谢强敏. 鼠白细胞介素 12 质粒对小鼠支气管哮喘模型气道炎症及细胞因子的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(6): 354—357.
[4] 孙永昌. 关于重度支气管哮喘的概念和病理生理特征[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3): 172—174.
[5] Brigstock D R. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family[J]. Endocr Rev, 1999, 20(2): 189—206.
[6] Pan L H, Yamauchi K, Uzuki M, *et al*. Type Ⅱ alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF[J]. Eur Respir J, 2001, 17(6): 1220—1227.
[7] Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, *et al*. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis[J]. J Rheumatol, 2000, 27(1): 149—154.
[8] Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, *et al*. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF—β1 and TGF-β3[J]. Am J Physiol, 1999, 276(5 Pt 1): L814—824.
[9] Chen M M, Lam A, Abraham J A, *et al*. Connective tissue growth factor expression is induced by TGF-β in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(10): 1805—1819.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)20-1846-01

手掌式血气监测仪在肝移植术中的应用

Application of blood gas monitor(i-stat)in liver transplantation

张 铭, 赵保生, 邓安智, 鲁开智 (第三军医大学附属西南医院麻醉科, 重庆 400038)

我们在肝移植手术中应用了手掌式血气监测仪, 为及时调整病人的病理改变, 促进病人全身状况的改善提供了有力的保障。现介绍如下。

患者, 男, 50 岁, 在全麻下行背驮式肝移植术, 其基础血压为 124/85 mmHg。麻醉诱导及病肝分离期患者血流动力学状况基本平稳, 于无肝期血压逐渐下降至 72～65/51～40 mmHg, 术野无明显失血, 经加快补充胶体及血制品(白蛋白、纤维蛋白原及凝血酶原复合物)并加大多巴胺的输注速度至 15～20 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$, 患者血压无明显改善。于手术室内急查血气结果如下: 血 K^+ 2.7 mmol/L, HCO_3^- 32 mmol/L, pH 7.3, Na^+ 142 mmol/L, HCT 13%, SaO_2 100%, BE 5 mmol/L, 在心电图监测下立即经中心静脉通道快速补充高浓度钾后血压迅速回升至 95～104/60～80 mmHg, 测血 K^+ 5.0 mmol/L。新肝开放后循环稳定, 未出现明显血压波动。手术顺利, 患者于术后平安返回病房。

讨论

肝移植病人多属终末期肝病患者, 常伴有代谢及水电解质, 酸碱平衡紊乱[1]。无肝期由于代谢缺乏, 水、电解质及血流动力学紊乱现象十分常见。其常见原因有: 腹水的迅速清除, 体壁及肠系膜静脉的出血, 枸橼酸性低钙血症, 快速输血及出血引起的高钾血症等。新肝开放前由于缺血再灌注及保护液的缘故, 产生大量的细胞因子及炎性介质, 于新肝开放时迅速进入体循环中, 其结果迅速引起外周血管阻力明显下降, 导致全身循环急剧波动, 甚至可能危及患者的生命安全[2,3]。因此在无肝期应尽早发现和及时纠正各种紊乱, 在新肝开放前应尽量维持血流动力学平稳并将血压维持于相对较高的水平, 为减轻新肝开放时的循环波动作好充分的准备。便携式血气分析仪能在 2～3 min 内于床旁迅速检测出患者的血气结果, 便于及时调整和指导临床用药。同传统血气检测费时长、不利于及时指导临床用药尤其是危重病人的抢救相比较具有十分突出的优势。肝移植病人于无肝期常会出现高钾血症, 组织灌流不足引起的酸中毒常常会加重高钾血症, 甚至危及生命。本例患者于无肝期出现了低钾血症, 其原因不详。由于及时迅速的血气监测结果的指导, 避免了此期的经验性用药所可能带来的危害, 患者的低钾血症迅速得到了纠正, 循环功能迅速恢复到正常水平, 为病人在新肝期的平稳过渡提供了有利的保障。

关键词: 肝移植; 血气监测仪; 酸碱平衡
中图法分类号: R657.3 文献标识码: B

参考文献:

[1] Nakasuji M, Bookallil M J. Pathophysiological mechanisms of postrevascularization hyperkalemia in orthotopic liver transplantation[J]. Anesth Analg, 2000, 91(6): 1351—1355.
[2] Novelli G, Rossi M, Pretagostini R, *et al*. MARS (Molecular Adsorbent Recirculating System): experience in 34 cases of acute liver failure[J]. Liver, 2002, 22(2): 43—47.
[3] Huang W, Hei Z, Huang W. Anesthetic management of adult patients under orthotopic liver transplantation[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei), 2001, 81(12): 737—739.

(编辑 栾 嘉)

作者简介: 张 铭(1964—), 男, 重庆市人, 硕士, 主治医师, 讲师, 主要从事缺血再灌注损伤方面的研究。电话: (023)68754200-8020

收稿日期: 2003-04-07; 修回日期: 2003-07-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net