DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.014
第24卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 9
2002年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2002

文章编号:1000-5404(2002)09-1031-03

论著

电脉冲裸基因肌肉注射胰岛素样生长因子-1介导的小鼠肺纤维化病理观察

谭亚夏[1],邓鸿业[2],娄雅欣[2],欧阳能太[3],唐 岩[2],李 枫[2], 丁 静[3],钟南山[3] (北京大学:[1]第一医院呼吸科,北京 100034;[2]基础医学院免疫学系,北京 100083;[3]广州呼吸病研究所,广州 510120)

提 要:目的 观察胰岛素样生长因子-1(IGF-1)所致小鼠肺纤维化的病理变化。方法 应用电脉冲裸基因肌肉注射法,观察注射截短型IGF1后2,3,4及8周组小鼠肺组织病理学变化。结果 2周组小鼠肺间质充血水肿。3周组肺泡隔明显增厚,大量肺泡上皮细胞,巨噬细胞及成纤维细胞增生。4周组肺间质大量胶原沉积,肺纤维化样改变。8周组肺纤维化病变明显减轻,肺泡结构渐趋恢复。结论 IGF-1可直接导致肺纤维化发生。IGF-1介导的肺纤维化早期病变可以逆转。

关键词:肺纤维化;截短型胰岛素样生长因子-1;基因注射;电脉冲
中图法分类号:R394.3;R563.13;R977.9 文献标识码:A

Observation on pulmonary fibrosis in mice after electric pulse-mediated insulin-like growth factor-1 gene transfer into skeletal muscle

TAN Ya-xia, DENG Hong-ye, LOU Ya-xin, OUYANG Neng-tai, TANG Yan, LI Feng, DING Jing, ZHONG Nan-Shan (Department of Respiratory Diseases, First Hospital Affiliated to Peking University, Bejing 100034, China)

Abstract: Objective To observe the pathological changes induced by Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) by electric pulse in the development of murine pulmonary fibrosis. Methods Truncated IGF-1[pcDI-Des(1—3)IGF-1] was injected into the skeletal muscles of the mice by electric pulses through invasive needle electrodes. Lung tissues were obtained at the end of week 2, 3, 4, and 8 respectively after injection. The pathological changes in the lungs were observed with light and electron microscopy. Results Edema and congestion were noted in the lung interstitium at the end of week 2. The interalveolar septums were significantly thickened with proliferations of pneumocytes, macrophages and fibroblasts at the end of week 3. Remarked collagen deposition in the interstitium and significant interstitial fibrosis were observed at the end of week 4. At the end of week 8, the interstitial fibrosis subsided and the structure of alveolar wall returned to normal. Conclusion IGF-1 causes directly pulmonary fibrosis in mice, but the early lung injury is reversible.

Key words: pulmonary fibrosis; truncated insulin-like growth factor-1; gene injection; electronic pulse

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)是一重要的细胞因子,在机体发挥多种功能,也参与多种病理过程。研究表明IGF-1参与肺纤维化的发生[1~4],为进一步明确IGF-1的致纤维化效应,本实验利用电脉冲裸基因肌肉注射法[5,6],将截短型IGF-1高效真核表达质粒导入小鼠体内,以证实IGF-1在肺纤维化发生中的直接病理作用,亦为进一步防治肺纤维化提供直接的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4~6周龄小鼠(购自北京大学基础医学院实验动物所),雌雄各半。

1.1.2 质粒构建 质粒pcI购于Promega公司,pcDNA3购于Invitrogen公司,将pcDNA3的BglⅡ-kpnI片段与PcI的BglⅡ-kpnI片段置换,从而得到一个pcDI真核表达质粒。以*EcoRI*酶切PGEM-T-Easy-IGF-1质粒,释放IGF-1的ORF片段,连接至经*EcoRI*酶切并用CIP处理过的pcDI质粒中,再经酶切鉴定得到正向插入的IGF-1的真核表达质粒pcDI-Des(1-3)IGF-1。北京大学基础医学院分子免疫室构建[7]。

1.1.3 质粒提取与纯化 严格按照EndoFree Plasmid Giga Kits(IAGEM-tip10 000, Hilden, Germany)操作说明进行。最后将质粒DNA溶于0.9%生理盐水中,终浓度为1 μg/μl。

1.1.4 电脉冲仪 应用汤氏基因治疗仪进行电针刺激,由北京大学基础医学院仪器厂制作。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 BALB/c健康小鼠共80只,随机分为导入pcDI-Des(1-3)IGF-1后2、3、4及8周组,每组20只小鼠。另10只仅导入空质粒PCDI作为对照组。沿实验鼠大腿胫前肌的肌纤维走向注射pcDI-Des(1-3)IGF-1质粒100 μl/只(100 μg),对照鼠于相同部位注射pcDI空质粒100 μl/只(100 μg),注射后即在肌肉注射局部进行电针脉冲刺激,参数为:电压100 V,电流20 mA,脉冲宽度40 ms,刺激频率1次/s,共6次。然后分期分批颈椎脱臼处死小鼠。

1.2.2 标本处理 ①光镜标本制备:新鲜肺组织于Bouin溶液中固定48 h以上,脱水、透明、包埋、切片、HE及改良Mallory染色。②电镜标本制备:新鲜肺组织固定于新近配制的4 ℃ 2.5%戊二醛溶液中,真空抽出肺内空气。按电镜常规制备标本,半薄切片定位后再行超薄切片。醋酸铀和枸橼酸铅双染色,日立H-600透射电镜观察。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39570612)
作者简介:谭亚夏(1955—)女,湖南省湘潭市人,博士研究生,主治医师,主要从事支气管哮喘、肺纤维化方面的研究,发表论文9篇,现在广州呼吸病研究所,广州 510120. 电话:(020)83341017
收稿日期:2001-04-12;修回日期:2001-10-15

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

2 结果

光镜观察: 与对照组相比, 导入 IGF-1 后的小鼠肺组织出现了明显病变, 2 周组肺泡壁轻度增厚, 肺间质充血水肿。3 周组肺泡间隔明显增厚, 肺泡上皮, 巨噬细胞, 成纤维细胞增加, 见图 1、2。4 周组肺间质大量胶原纤维沉积, 形成纤维化样改变。8 周组肺间质纤维化病变减轻, 肺泡结构渐趋恢复。

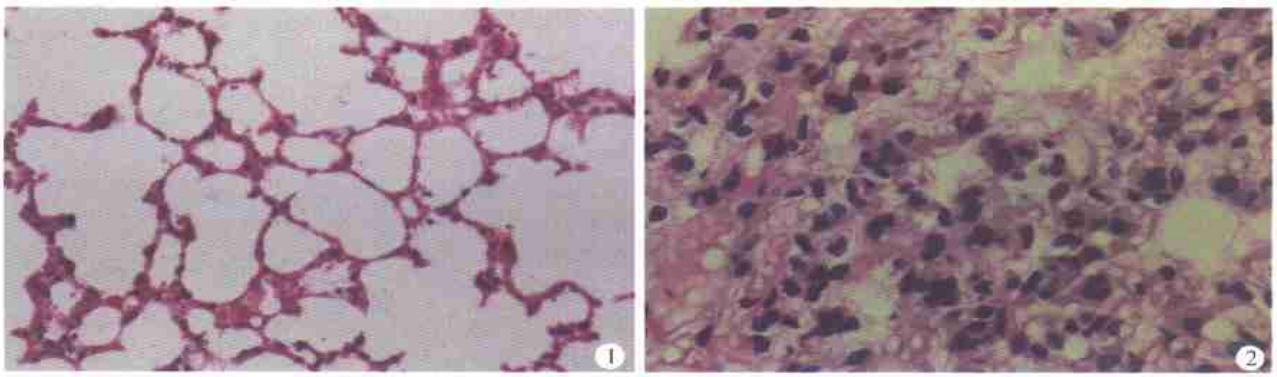


图 1 对照组 3 周, 小鼠肺间质无明显免疫细胞增生 (HE× 200)

Fig 1 No significant proliferation of immunocytes in the interstitium 3 weeks after pcDI transfer (HE× 200)

图 2 导入 pcDI-Des(1-3)IGF-1 3 周, 小鼠肺泡间隔明显增厚, 肺泡上皮, 巨噬细胞, 成纤维细胞增加 (HE× 400)

Fig 2 Significantly thickened interalveolar septums with proliferations of pneumocytes macrophages and fibroblasts in mice 3 weeks after administration of pcDI— Des(1-3)IGF-1 (HE× 400)

电镜观察 4 周组 I 型肺泡细胞变性, 内皮细胞肿胀, II 型肺泡细胞增生, 基膜破坏。肺泡巨噬细胞、间质巨噬细胞增多。肺泡间隔胶原纤维显著增加, 基膜样物质增多并包绕巨噬细胞, 见图 3、4。

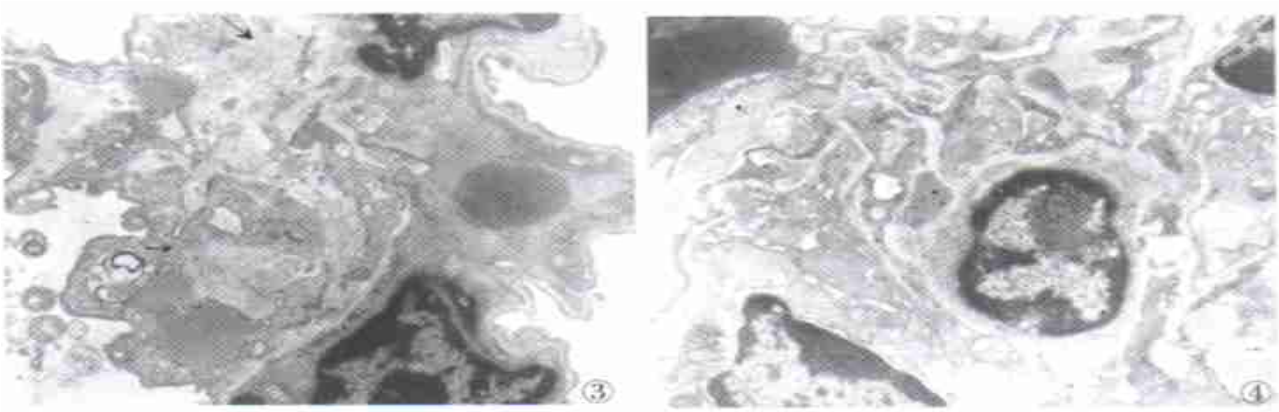


图 3 导入 pcDI-Des(1-3)IGF-1 4 周, 肺间质大量胶原纤维沉积(←) (TEM× 8 000)

Fig 3 Remarked collagen deposition in the interstitium(arrow) in mice 4 weeks after administration of pcDI-Des(1-3)IGF-1 (TEM× 8 000)

图 4 导入 pcDI-Des(1-3)IGF-1 4 周, 基膜样物质增生并包绕巨噬细胞 (TEM× 10 000)

Fig 4 Hyperplasic basement membrane like material surrounding the macrophages in the interstitium of mice 4 weeks after administration of pcDI-Des(1-3)IGF-1 (TEM× 10 000)

3 讨论

早在 1967 年 Heppleston 等在对大鼠矽肺的研究中就提出了矽肺纤维化的发生可能与肺泡巨噬细胞(AM)分泌的某些细胞因子有关, 但 AM 产生何种细胞因子进而导致纤维化的发生, 尚不十分清楚。陈非等[1]在 Heppleston 研究的基础上首先发现并报道了由矽肺大鼠 AM 产生的多种细胞因子中, IGF-1 是促进成纤维细胞增殖进而导致纤维化发生的主要因子。IGF-1 是一种功能广泛的多肽因子, 在所有靶组织内均可促进 DNA, RNA 和蛋白质的合成并能促进细胞生长。近年一些相关的研究亦证实了 IGF-1 在肺纤维化中的重要作用: 肺纤维化的肺泡灌洗液中的 IGF-1 表达明显增强[2]; 肺内 IGF-1 表达愈高, 肺纤维化程度愈重[3]; 染矽尘兔肺免疫组化结果显示: IGF-1 多定位于肺间质巨噬细胞和矽结节内, 且 IGF-1 表达水平与肺

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

纤维化程度正相关[4]。

虽然许多研究都表明了 IGF-1 在肺纤维化发生中的重要作用, 但仍缺乏单一因子 IGF-1 直接导致肺纤维化的证据。这一直是许多学者试图解决的难点。本实验利用 IGF-1 真核表达质粒的电脉冲裸基因体内转移技术, 观察到了单一 IGF-1 因子在体内直接导致肺纤维化发生发展及转归的动态变化过程。本实验显示, IGF-1 导入小鼠后, 肺间质胶原纤维明显增多至第四周达高峰, 第八周则纤维化病变减轻, 肺泡结构渐趋恢复。这可能是一次性注入的 IGF-1 质粒不再表达以及已表达的基因蛋白质产物的代谢与灭活所致, 表明了 IGF-1 介导的早期肺纤维化病变的可逆性, 无疑为肺纤维化的早期治疗并逆转其恶性发展提供了重要依据。

80 年代末 Wolff 等[8] 创建了裸基因肌肉注射的基因转移技术, 即无须特殊载体, 直接将插有外源性目的基因的真核表达质粒注入宿主体内。注入肌细胞内的重组基因在局部转录表达, 其蛋白质产物亦随血循环到达远隔部位产生系统性作用。由于骨骼肌靠近体表, 给药方便且血运丰富, 有利于细胞中表达的蛋白质释放到循环中, 因此骨骼肌就成为最常用的基因转移之靶组织。近年来为使外源性基因在体内进一步高效表达, 在裸露 DNA 肌肉注射的基础上加用电脉冲刺激, 从而使基因表达效率增加了 100 倍, 其原理是瞬间的电流损伤不仅使细胞膜通透性增高亦使 DNA 分子活化, 从而促进 DNA 分子向细胞内转移, 亦提高了细胞摄取 DNA 的效率[5]。

IGF-1 所致肺纤维化的发生是一极其复杂的过程, 受到机体一系列因素的调节。本实验仅从截短型 IGF-1 介导小鼠肺纤维化的发生来探讨 IGF-1 结合蛋白(IGFBP)对 IGF-1 的调控作用。在体内 IGF, IGF 受体(IGFR)及 IGFBP 构成了 IGF 系统, 三者的相互作用调节着机体组织细胞的重要功能[9]。当 IGF-1 与 IGF 受体(IGFR)结合时就发挥促细胞增殖作用, 而 IGF-1 与 IGFBP 结合时则作用丧失, 即 IGFBP 是 IGF-1 作用的阻遏因素。血循环中几乎所有的 IGF-1 都以与 IGFBP 结合而存在[10], 这是因为, 与 IGFR 相比, IGFBP 对 IGF-1 具有更高的亲和力, 后者对 IGF-1 的亲和力约为前者的 7 倍。因此为去除体内 IGFBP 对 IGF-1 的阻遏作用, 探明 IGF-1 的体内生物学效应, 本实验组构建了截短型 IGF-1 高效表达质粒[7]。截短型 IGF-1 是 IGF-1 的一种特殊形式, 天然存在于体内, 它是在 IGF-1 的 N 端缺失了 3 个氨基酸 Gly-Pro-Glu, 故为截短型 IGF-1。实验表明, 在体内发挥作用并具有强烈生物活性的 IGF-1 乃此截短型 IGF-1。由于其 N 端缺失 3 个氨基酸, 与 IGFBP 的结合力就大为降低仅为完整型 IGF-1 的 1%[11]。因此本实验以截短型 IGF-1 作为致纤维化因子, 不但克服了完整型 IGF-1 在血液中绝大部分与 IGFBP 结合而不能发挥生物学效应的弊端, 同时还间接证实了 IGFBP 对 IGF-1 的负调控作用。

本实验利用新的电脉冲裸基因肌肉注射法成功地复制出由单一 IGF-1 介导的小鼠肺纤维化模型, 不仅为 IGF-1 导致肺纤维化提供了直接的病理依据, 亦为进一步防治由 IGF-1 介导的肺纤维化提供了实验依据。

(致谢: 衷心感谢广州军区总医院医学实验中心赖晃文副主任医师、杨传红主管技师对本实验电镜制片及观察给予的大力指导和帮助。)

参考文献:

[1] 陈　非, 邓鸿业, 丁桂凤, 等. 染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞胰岛素样生长因子的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11(5): 257—260.

[2] Maeda A, Hiyama K, Yamakido H, *et al*. Increased expression of platelet-derived growth factor A and insulin-like growth factor-1 in BAL cells during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Chest, 1996, 109(3): 780—786.

[3] vanhee D, Grosset P, Wallaert B, *et al*. Mechanisms of fibrosis in coal workers' pneumoconiosis[J]. Am J Respir Crit Ccare Med, 1994, 150(4): 1 049—1 055.

[4] 刘章现, 吴逸明, 孟爱民, 等. IGF-1 与矽肺纤维化的关系[J]. 中国工业医学杂志, 1999, 12(2): 82—83, 91.

[5] Mir L M, Bureau M F, Gehl J, *et al*. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(8): 4 262—4 267.

[6] Bettan M, Emmanuel F, Darteil R, *et al*. High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle[J]. Mol Ther, 2000, 2(3): 204—210.

[7] 李　莹, 邓鸿业, 狄春辉, 等. 重组人截短型胰岛素样生长因子 1 在大肠杆菌中的高效表达[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(2): 57—60.

[8] Wolff J A, malone R W, Williams P, *et al*. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247(4 949 pt 1): 1 465—1 468.

[9] 松原昭郎, 中本贵久, 确井亚. IGF-1, IGFBP-3 [J]. 日本临床, 2000, 58(Suupl 7): 157—162.

[10] Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R G. Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily [J]. Acta Paediatr Suppl, 1999, 88(428): 37—45.

[11] Walton P E, Dunshea F R, Ballard F J, *et al*. *In vitro* actions of IGF analogues with poor affinities for IGFBPs: metabolic and growth effects in pigs of different ages and GH responsiveness [J]. Progr Growth Factor Res, 1995, 6(2—4): 385—395.

(编辑　王　红)

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