

Smad3、Smad4 和 Smad7 在大鼠放射性肺纤维化中的表达及意义

李 杨 宋良文 王德文 彭瑞云 崔雪梅 高亚兵 金梅红 马俊杰

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 探讨转化生长因子 β (Transforming growth factor β TGF β) 的 Smad 信号转导通路中信号蛋白 Smad3、Smad4 和 Smad7 在大鼠放射性肺纤维化中的变化及其意义。采用 25Gy ^{60}Co γ 射线全胸照射二级雄性 Wistar 大鼠 60 只, 建立大鼠放射性肺纤维化模型, 分别于照射后 1 天、1 周、1 月及 3 月活杀后取材并进行肺泡巨噬细胞的分离培养, 采用免疫组化 SP 法检测信号蛋白 Smad3、Smad4 和 Smad7 的表达变化。正常肺组织中较大血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆中存在 Smad3、Smad4、Smad7 蛋白弱阳性表达, Smad4 在支气管上皮细胞胞浆也有阳性表达; 照射后 1 天, 上述 3 种蛋白在部分肺泡上皮细胞和部分巨噬细胞胞浆出现阳性表达; 照射后 1 周及 1 月, Smad4 蛋白在肺间质内纤维/成纤维细胞胞浆也出现阳性表达; 照射后 3 月, Smad4 蛋白在部分肺泡上皮、巨噬细胞、成纤维/纤维细胞胞核出现阳性表达。信号蛋白 Smad3、Smad4、Smad7 主要表达于放射性肺纤维化发生发展相关的靶细胞和效应细胞, 包括部分肺泡上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞及血管内皮细胞、支气管上皮细胞, 并呈一定时相性动态分布, 证明 TGF β 的 Smad 信号通路在放射性肺纤维化中起调节作用。

关键词 放射性肺炎-纤维化, 转化生长因子 β (TGF β), Smad 蛋白质, 信号转导

中图分类号 R816

放射性肺纤维化是胸部肿瘤放疗和骨髓移植预处理的常见而难治的并发症, 也见于战时核辐射和平时核事故^[1]。转化生长因子 β (Transforming growth factor β TGF β) 在其发生发展过程中起关键作用^[2], Smad 通路是 TGF β 信号转导的主要通路^[3], Smad3、Smad4 是该信号转导通路中的主要信号蛋白, Smad7 既是抑制性信号蛋白, 也是该通路靶基因的产物。本研究通过复制大鼠放射性肺炎-纤维化动物模型^[4], 采用免疫组化等技术, 观察 Smad3、Smad4、Smad7 在放射性肺纤维化发生发展过程中的表达变化并探讨其意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及照射方式

二级雄性 Wistar 大鼠 (军事医学科学院实验动物中心提供) 60 只, 体重 (200 $\pm$ 20) g, 随机分为对照组 (10 只) 和照射组 (50 只)。照射组动物采用 ^{60}Co γ 射线进行全胸照射。大鼠麻醉后固定于自制的木板架上, 照射野面积为 4.5cm $\times$ 4.0cm, 将大鼠上至两腋窝平面, 下至胸骨剑突的位置对准照射

源, 用自行设计的 10cm 厚铅砖屏蔽大鼠其余部分。靶距为 3.6m, 剂量率为 2.39Gy/min, 单次照射, 照射时间 10'28", 剂量为 25Gy。

1.2 病理观察

各组动物分别于照射后 1 天、1 周、1 月、3 月活杀取材, 大鼠麻醉后经腹主动脉放血活杀取肺, 10% 缓冲福尔马林固定, 常规石蜡切片, H.E. 染色, 光镜观察。

1.3 肺泡巨噬细胞的分离纯化培养

于上述各时间点取 3 只大鼠进行支气管肺泡灌洗, 将肺连同气管从喉部剪断后一起取出, 用适当大小的注射器及针头 (针头尖部磨钝) 套入气管, 用注射器从气管向肺灌注 4mL 生理盐水来回反复抽吸 3 次, 收集灌洗液, 离心, 去上清, 经低速处理, 用贴壁法纯化培养, 爬片, 培养 2h 后, 取出爬片, 丙酮固定, 备做免疫组化染色。

1.4 免疫组织化学染色 (SP 法)^[5]

1.4.1 主要试剂 Smad3、Smad4、Smad7 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司产品), SP 试剂盒 (中

国家自然科学基金 (30170292) 资助

第一作者: 李杨, 女, 1973 年 11 月出生, 军事医学科学院放射医学研究所读博士研究生, 实验病理学专业, 助理研究员
收稿日期: 初稿 2003-06-16, 修回 2003-07-21

山公司), DAB (美国 Santa Cruz 公司产品), DMEM (Gibco 公司)。

1.4.2 主要实验步骤 石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温孵育 5min; 抗原修复; 血清封闭; 滴加适当比例稀释的一抗 (山羊多克隆抗体), 4°C 过夜; 滴加生物素标记兔抗羊 IgG; 37°C 孵育 30 min; 加辣根酶标记链霉卵白素, 37°C 孵育 30 min; DAB 显色。显微镜下观察切片的着色情况, 棕黄色为阳性显色。每张细胞爬片取 5 个视野计数 100 个细胞中胞核阳性表达的细胞数。

2 结果

2.1 肺组织病理变化

照射后 1 月以内主要为炎症反应的病理表现, 肺泡壁毛细血管和支气管周围血管充血、间质水肿、肺泡腔积液及红细胞、巨噬细胞等聚集; 照射后 2—3 月, 急性炎症逐渐消退, 代之以成纤维细胞为主的细胞增生性变化, 肺泡壁增厚, 肺泡腔变小, 肺泡壁细胞成分增多, 主要为成纤维细胞, 之外尚可见巨噬细胞、淋巴细胞等, 在血管和支气管周围等肺间质部分也可见成纤维细胞增生。

2.2 肺组织中 Smad3、Smad4、Smad7 蛋白的表达变化

2.2.1 Smad3 蛋白 对照组肺组织中较大血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆弱阳性表达; 照射后 1 天, 部分肺泡上皮细胞和部分巨噬细胞胞浆出现阳性表达 (见图 1); 照射后 1 周, 部分肺巨噬细胞和肺泡上皮细胞胞浆阳性表达; 照射后 1 月, 渗出区较多巨噬细胞及部分肺泡上皮细胞胞浆阳性表达; 照射后 3 月, 部分肺泡上皮细胞及增生的巨噬细胞胞浆阳性表达 (见图 2)。

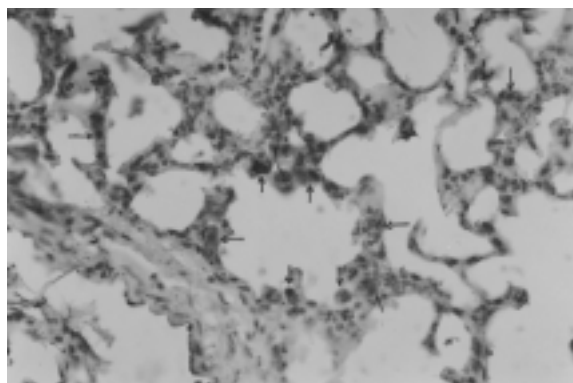


Fig.1 Immunohistochemistry for Smad3 protein in rat's lung showed positive reaction in the the plasma of some pneumocytes and macrophages 1 week after irradiation (SP method, $\times 200$)

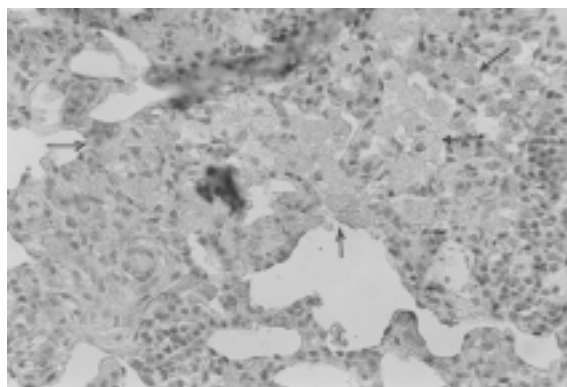


Fig.2 Immunohistochemistry for Smad3 protein in rat' lung showed positive reaction in the plasma of some pneumocytes and hyperplasic macrophages 3 months after irradiation (SP method, $\times 200$)

2.2.2 Smad4 蛋白 对照组肺组织中大血管内皮细胞及平滑肌细胞胞浆、支气管上皮细胞胞浆及胞核阳性表达 (见图 3); 照射后 1 天, 少数肺泡上皮细胞及巨噬细胞胞浆阳性表达; 照射后 1 周, 部分肺巨噬细胞、肺间质内纤维/成纤维细胞胞浆阳性表达 (见图 4); 照射后 1 月, 渗出区较多巨噬细胞及肺泡上

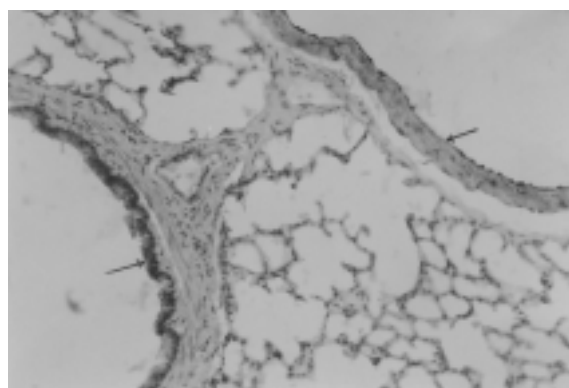


Fig.3 Immunohistochemistry for Smad4 protein in normal rat' lung showed positive reaction in the the plasma of endothelia cells and smooth muscle cells of blood vessel and epithelial cells of bronchi (SP method, $\times 200$)

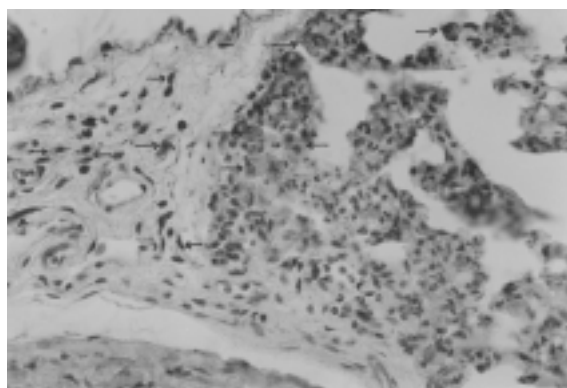


Fig.4 Immunohistochemistry for Smad4 protein in rat' lung showed positive reaction in the the plasma of some macrophages and fibroblasts 1 week after irradiation (SP method, $\times 200$)

皮细胞、成纤维/纤维细胞胞浆阳性表达;照射后3月,部分肺泡上皮、巨噬细胞、成纤维/纤维细胞核中也呈阳性表达(见图5)。

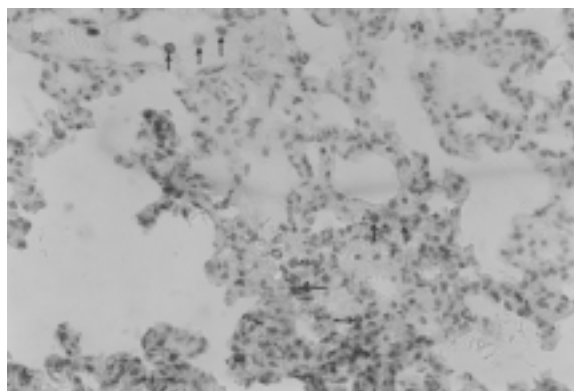


Fig.5 Immunohistochemistry for Smad4 protein in rat lung showed positive reaction in the the nucleus of some pneumocytes, macrophages and fibroblasts 3 months after irradiation (SP method, $\times 200$)

2.2.3 Smad7 蛋白 与 Smad3 蛋白表达规律相似。

2.3 肺泡巨噬细胞中 Smad3、Smad4 蛋白的表达

2.3.1 Smad3 蛋白 照射后1天,多数细胞为胞核阳性表达(约达80%),也存在胞浆阳性表达的细胞;照射后1周,胞核阳性表达的细胞明显减少,多数细胞为胞浆阳性表达;照射后1月,几近所有细胞均为胞浆阳性表达。

2.3.2 Smad4 蛋白 其表达变化趋势与 Smad3 相同,不同之处是其胞核表达更为显著,照射后1天几乎所有细胞均为胞核阳性表达(见图6)。

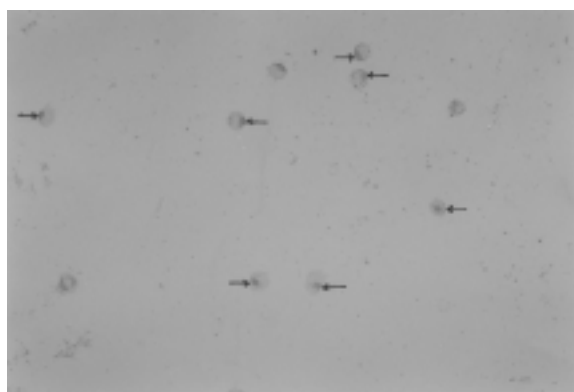


Fig.6 Immunohistochemistry for Smad4 protein in alveolar macrophages showed positive reaction in the nucleus of almost all cells (SP method, $\times 200$)

3 讨论

放射性肺纤维化的病理改变已基本阐明,主要经历4期:炎症反应期—细胞增生期—纤维化期—胶原化期。血管内皮细胞和肺泡II型上皮细胞为其主要的靶细胞,间质细胞如巨噬细胞、肥大细胞也

参与其发生发展,成纤维细胞为其主要的效应细胞,其过度增生及合成胶原增多为纤维化期的主要特征^[1]。多种细胞因子如 TGF β 、白介素-1 (IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、血小板源性生长因子 (PDGF)、IL-8、纤维细胞生长因子 (FGF)、胰岛素样生长因子 (IGF) 等参与放射性肺纤维化的发生发展^[6]。其中以 TGF β 最为重要,它被认为是一种“开关”性分子,并被作为治疗的靶分子^[2]。

TGF β 在体内的作用主要是促进细胞外基质的生成、调节炎症反应等。目前从分子生物学角度, TGF β 的信号转导通路已基本阐明。通常认为其主要通路如下: TGF β 首先与 II 型受体结合,再结合 I 型受体,活化的 I 型受体磷酸化 Smad2/3,后者与 Smad4 结合形成异二聚体,并转位入核^[7,8],调节靶基因的表达, Smad7 是抑制性信号蛋白,构成一个负反馈环路。在放射性肺纤维化过程中 Smad 信号蛋白的表达变化规律及 Smad 通路在该病进展中的作用尚未见研究报道。

以往的研究已经证明 TGF β 在大鼠放射性肺损伤过程中呈波动性变化,主要表达于肺泡上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、支气管粘膜和血管平滑肌,在增生的肺间隔和实变区也可见 TGF β 的强表达, TGF β 的阳性表达在照射后1月明显增强,3月时达高峰^[9]。本研究证明 Smad3、Smad4 作为 TGF β 下游特异的信号转导分子, Smad7 既作为负反馈信号分子也是该通路靶基因的产物,它们在肺组织中的分布特征与 TGF β 的效应范围一致,其呈阳性表达的血管内皮细胞、肺泡上皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞均在放射性肺纤维化的发生发展过程中起重要作用。Smad 蛋白在同一种细胞中的表达强度无明显变化,其表达的变化主要是随着病变的发展,不同细胞数量的变化而变化,或同一种细胞中呈阳性表达的细胞增多, Smad4 在细胞内的表达部位也有变化,于不同时期分别表达于胞浆或胞核。Smad3、Smad4、Smad7 蛋白在这些细胞的阳性表达及随疾病进展呈动态分布,初步证明它们在 TGF β 参与炎症反应及诱导纤维化形成的信号转导过程中起一定作用。Smad3 活化后与 Smad4 形成异二寡聚体,发生核转位,从而作为转录因子调节靶基因的表达,核转位的发生是 Smad 通路活化的证据之一^[9]。但是,由于 TGF β 在血液中2—3min即被肺脏、肝脏等脏器摄取而灭活,同时信号转导通路的活化是一个短时间内的生物学过程,而动物实验由取材到组织切片的制备是一个复杂和较长的过程,影响因素较多,不利于核转位的捕捉。本研究中仅在照射后3月组,发现 Smad4 蛋白在肺泡上皮

细胞、巨噬细胞、肺间质内的成纤维细胞/纤维细胞核阳性表达较明显,而照射后 3 月正是 TGF β 的表达高峰期,是成纤维细胞增生、胶原合成增加进而纤维化形成即 TGF β 的生物学效应发挥的显著时期,该结果初步证明 Smad 通路在 TGF β 诱导肺纤维化的过程中是活化的,从而提示 Smad 通路在 TGF β 诱导放射性肺纤维化的信号转导过程中发挥一定作用。对于分离纯化的肺泡巨噬细胞则较易于核转位的捕捉,在照射后 1 天,肺泡巨噬细胞中 Smad3 和 Smad4 蛋白均主要表达于胞核,该结果提示在放射性肺损伤发生的启动时期 Smad 通路是活化的,从而证明 TGF β 在放射性肺损伤的启动时期发挥一定作用。

参考文献

- 1 王德文主编. 现代军事病理学, 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 140-142
WANG Dewen. Modern military pathology, Beijing: Military Medical Scientific Publishing House, 2002. 140-142
- 2 Martin M, Lefain J L, Delanlan S *et al.* Int J Radiation Oncology Biol Phys, 2000, **47** (2): 277-290
- 3 Derynck R, Feng X H. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, **1333**(2): 105-150
- 4 刘纯杰, 王德文, 高亚兵等. 中国兽医学报, 2000, **20** (6): 576-580
LIU Chunjie, WANG Dewen, GAO Yabing *et al.* China Vet Trans, 2000, **20** (6): 576-580
- 5 蔡文琴, 王伯云编著. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术, 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 72-89
CAI Wenqin, WANG Boyue. Applied immunohistochemistry and nucleic acid molecular hybridization technology, Chengdu: Sci Tech Publishing Company of Sichuan, 1994. 72-89
- 6 Philip R, Carl J J, Jacqueline P *et al.* Int J Radiation Oncology Biol Phys, 1995, **33** (1): 99-109
- 7 Massague J. Cell, 1996, **85**(7): 947-950
- 8 Petridou S, Maltseva O, Spanakis S *et al.* IOVS, 2000, **41** (1): 89-95
- 9 刘纯杰, 王德文, 高亚兵等. 中华放射医学与防护杂志, 2000, **20** (6): 391-394
LIU Chunjie, WANG Dewen, GAO Yabing *et al.* Chin J Radiol Med Protect, 2000, **20** (6): 391-394

Studies on the expression of Smad3, Smad4 and Smad7 in rats with radiation pulmonary fibrosis

LI Yang SONG Liangwen WANG Dewen PENG Ruiyun CUI Xuemei GAO Yabin
JIN Meihong MA Junjie

(Radiation Medicine Institute of Academy of Military Medicine Science, Beijing 100850)

ABSTRACT The work is to investigate expressions and roles of Smad3, Smad4 and Smad7 in pathogenesis of pulmonary fibrosis of rats. Altogether 60 specific-pathogen-free Wistar rats were used in the study, with 50 of them being irradiated with 25Gy ^{60}Co γ -rays on whole thoracic region. The rats were sacrificed and specimens were harvested in 1 day, 1 week, 1 month and 3 months after the irradiation. Alveolar macrophages were obtained and cultured. Expressions of Smad3, Smad4 and Smad7 were observed by immunohistochemistry. In normal pulmonary tissue, expressions of Smad3, Smad4 and Smad7 could be seen in the plasma of endothelial cells and smooth muscle cells of blood vessel. Expressions of Smad4 could be seen in the plasma of epithelial cells of bronchi. One day after the irradiation, expressions of the three proteins could be seen in the plasma of some pneumocytes and macrophages. One week and even one month after the irradiation, expressions of Smad4 could be seen in the plasma of some fibroblasts. Three months after the irradiation, expressions of Smad4 could be seen in the nucleus of endothelial cells, macrophages and fibroblasts. The cells, in which Smad3, Smad4 and Smad7 are positive, are main target or effect cells related to the initiation and development of radiation pneumonia and fibrosis. This indicates that Smad signaling might be a key pathway of TGF β -mediated radiation pulmonary injury.

KEYWORDS Radiation pneumonia and pulmonary fibrosis, Transforming growth factor β (TGF β), Smad protein, Signal transduction

CLC R816