

TGF- β 1 在照射后肺损伤早期重建中的作用研究

刁瑞英 宋良文 王少霞 李明 徐新萍

(军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850)

摘要 探讨 TGF- β 1 在放射性肺损伤早期肺组织重建中的作用。用酶标记免疫吸附测定法 (Enzyme-labeled immunosorbent assay, ELISA) 检测照射后不同时期 (1、2 和 4 周) 大鼠血清中 TGF- β 1 的水平变化; 用甲基噻唑基四唑比色法 (Methyl thiazolyl tetrazolium colourimetry, MTT) 检测照射后 4 周大鼠血清对人肺成纤维细胞 (Human lung fibroblast, HLF) 的促增殖作用; 用 ELISA 检测 HLF 经大鼠血清刺激后合成分泌 MMP-9 (Matrix metalloproteinases-9, MMP-9) 和 IV 型胶原的作用。照射后不同时间提取的大鼠血清中 TGF- β 1 水平从 2 至 4 周逐渐增加; 照射后大鼠血清能促进 HLF 增殖, 10% 血清浓度的培养液促细胞增殖的作用最强; 受照后大鼠血清不但能促进 Fb 增生, 而且能显著促进 HLF 合成释放 IV 型胶原和 MMP-9。放射性肺损伤早期肺组织 TGF- β 1 表达增加, 进而促进肺成纤维细胞增生、合成和释放 IV 型胶原和 MMP-9, 参与早期肺损伤的组织重建过程。

关键词 TGF- β 1, MMP-9, IV 型胶原, 肺重建, 成纤维细胞

中图分类号 R818.02, R815.5, R363.1⁺21, R364.5

放射性肺损伤及纤维化确切的发病机制尚未完全被揭示^[1,2]。目前发现, 临床上接受放疗的病人一侧肺部受照射后, 对侧肺组织有时可出现肺纤维化病变; 且在病人血液中可检测到纤维化相关细胞因子如 TGF- β 1 等^[3]。文献[4]报道, TGF- β 1 作用于牛肺动脉内皮细胞后可特异性表达胞外基质成分。表明 TGF- β 1 可能参与了受损肺组织重塑过程, 并在肺纤维化发生中具有重要作用。

最近研究发现, 放射性肺损伤初期肺重塑与肺纤维化的启动有关^[5], 而 IV 型胶原与 MMP-9 之间相互作用的平衡失调是肺重塑向肺纤维化发展的先决条件^[6]。本实验拟就放射性肺损伤后 TGF- β 1 表达与肺组织重塑的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

Wistar 大鼠 (清洁二级, 180—220g, 雄性, 军事医学科学院动物中心提供)、RPMI1640 培养基 (Sigma 公司)、新生小牛血清 (Fetal calf serum, FCS) (杭州四季青生物工程研究所)、噻唑蓝 (Methyl thiazolyl tetrazolium colourimetry, MTT, Gibco 公司)、小鼠抗人 IV 型胶原单克隆抗体 (北京

中杉金桥生物科技有限公司)、羊抗人 MMP-9 多克隆抗体 (SANTA CRUZ 公司)、四甲基联苯胺 (TMB, Amresco 公司)、人肺成纤维细胞 (Human lung fibroblast, HLF) 和 ⁶⁰Co γ 射线照射 (本研究所钴源室)。

1.2 照射后大鼠血清制备

雄性 Wistar 大鼠 24 只, 随机分为对照、照射后 1、2 和 4 周组, 每组 6 只, 1% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉后固定于板架上, ⁶⁰Co γ 射线右胸照射, 照射面积为 2.2cm $\times$ 2.0cm, 源靶距为 3m, 吸收剂量为 20Gy, 剂量率为 293.1cGy/min。分别于照射后 1、2 和 4 周活杀动物, 腹主动脉取血, 室温静置 2 h, 4℃ 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液, -20℃ 下备用。

1.3 受照射大鼠血清 TGF- β 1 检测 (Enzyme-labeled immunosorbent assay, ELISA)

将照射后大鼠血清倍比稀释 (抗原: 包被液为 1:100), 包被酶联检测板, 37℃ 2h, 20% 小牛血清白蛋白 (Bull serum albumin, BSA) 封闭, 37℃ 2h 后加入抗 TGF- β 1 的兔多克隆抗体 (1:50 稀释)

国家自然科学基金 (30570545) 资助

第一作者: 刁瑞英, 女, 1980 年 8 月出生, 2004 年毕业于潍坊医学院, 现为军事医学科学院放射与辐射医学研究所在读硕士, 病理学专业

通讯联系人: 宋良文

收稿日期: 初稿 2007-03-19, 修回 2007-04-16

37℃ 30min, 加入 1:10000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 30min, 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 显色 37℃ 15min, 2mmol/L 硫酸终止反应。实验设血清对照和磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS) 空白对照, 酶联仪检测, 450 nm 吸光度 (A), 根据标准曲线分别求出 TGF-β1 的相对含量。

1.4 照射后 4 周大鼠血清促 (Human lung fibroblast, HLF) 的增殖作用

将传至 3—4 代的 HLF 用 0.25% 的胰蛋白酶消化成细胞悬液, 以 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 的密度, 100μL/孔接种于 96 孔板, 用 0%、5%、10%、20% 的照射后 4 周的大鼠血清刺激 HLF, 48h 后用甲基噻唑基四唑比色法 (Methyl thiazolyl tetrazolium colourimetry, MTT) 法检测吸光度 (A)。

1.5 HLF 和上清中 IV 型胶原及 MMP-9 含量变化

(1) 将 HLF 接种于培养瓶, 分为对照组和照射组, 每组 3 瓶, 分别加入照射后 4 周的大鼠血清 (10%) 作用 48h 后, 收集培养上清并提取细胞蛋白后分别进行定量; (2) IV 型胶原检测: 将培养上清和细胞蛋白分别按 1:40 和 1:100 稀释, 包被酶联检测板 (双平行孔), 37℃ 2h, 20% BSA 37℃ 封闭 2h, 加入 1:50 稀释的抗 IV 型胶原单克隆抗体, 37℃ 30min, 加入 1:10000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG, 37℃ 30min, TMB 37℃ 显色 15min, 2mmol/L 硫酸终止反应; 同时设 PBS 空白对照, 用 Rada 450 型酶联仪在 450nm 处检测样品吸光度 (A); (3) MMP-9 检测: 方法同上, 一抗为羊抗人 MMP-9 (1:100 稀释), 二抗为兔抗羊 IgG (1:10000 稀释)。

1.6 统计学处理

采用社会科学统计程序 (Statistical Program for Social Sciences, SPSS) 11.5 统计软件进行分析, 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 照射后大鼠血清中 TGF-β1 的相对含量

照射后 1 周, 血清中 TGF-β1 下降 34.1% ($p < 0.05$); 2 周组 TGF-β1 下降 2.3%, 但较 1 周组增加 48.3%; 4 周组较对照组和 1 周组分别增加 16.4% ($p < 0.05$)、76.7% ($p < 0.05$), 具有统计学

意义 (见图 1)。

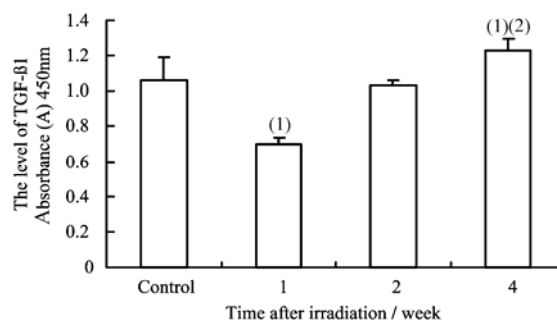


Fig.1 The level of TGF-β1 in serum from irradiated rats
(¹) Compared with Control, $P < 0.05$; (²) Compared with 1 week, $P < 0.05$. (ELISA 1:100)

2.2 照射后 4 周大鼠血清促 HLF 的增殖作用

各剂量组均具有促 HLF 增殖的作用, 其中 10% 血清组的作用最强, 较对照组增加 18.3%, 具有统计学意义 ($p < 0.05$), (见图 2)。

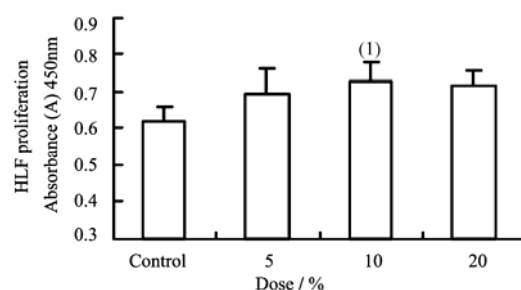


Fig.2 Effect of irradiated rat serum at a concentration of 0, 5, 10 and 20 % on HLF proliferation
(¹) Compared with Control, $p < 0.05$

2.3 HLF 上清和细胞蛋白中 IV 型胶原的相对含量

在照射后 4 周大鼠血清的作用下, 细胞上清内 IV 型胶原的含量较对照组增加 6.1%, 具有统计学意义 ($p < 0.05$); 而细胞蛋白内未检测到 IV 型胶原 (见图 3)。

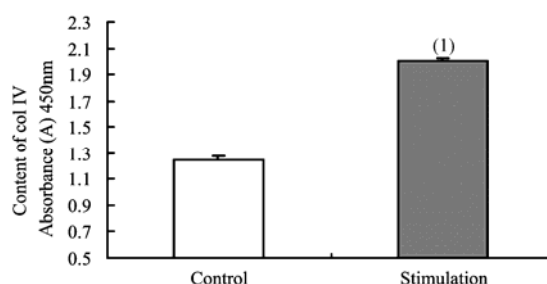


Fig.3 Effect of the irradiated rat serum on excretions of Col IV by HLF
(¹) Compared with Control, $P < 0.05$ (ELISA, 1:50)

2.4 HLF 上清和细胞蛋白中 MMP-9 的相对含量

在大鼠照射后 4 周血清的作用下, 细胞上清内 MMP-9 的含量较对照组增加 24.4%, 而细胞内

MMP-9 较对照组增加 6.6%, 均具有统计学意义 ($p < 0.05$), (见图 4)。

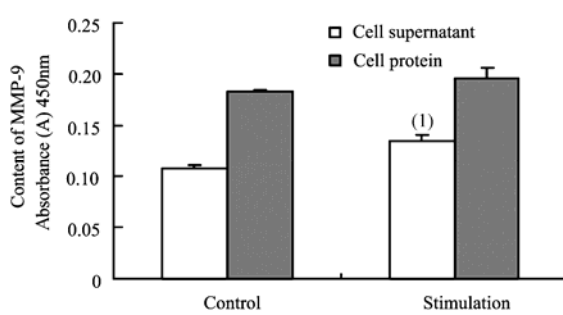


Fig.4 Effect of the serum from irradiated rat on excretion and expressions of MMP-9 by HLF

⁽¹⁾ Compared with Control, $P < 0.05$ (ELISA, 1:50)

3 讨论

胸肺部受照射可导致肺内效应细胞如巨噬细胞、II 型细胞及成纤维细胞等合成释放 TGF- β 1, 并进入血液中^[7,8]; 大量的试验研究已经证明 TGF- β 1 是导致肺纤维化发生的重要细胞因子之一, 可激活和促进肺间质成纤维细胞 (Fibroblast, Fb) 转化为肌成纤维细胞, 并合成胶原等胞外基质成分; 并通过下调 MMPs (Matrix metalloproteinase, MMPs) 和上调组织金属蛋白酶抑制物 (Tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 抑制胶原降解^[9,10]。TGF- β 1 可通过血液循环到达肺的各个部位, 进而扩大了对肺内 Fb 的活化范围。Fb 是肺间质细胞的主要成分, 是肺纤维化过程中合成和分泌细胞外基质 (Extracellular medium, ECM) 的主要效应细胞。

本研究证实, 照射后不同时间 (0、1、2 和 4 周) 提取的大鼠血清中, TGF- β 1 含量呈现先骤然下降 (1 周) 而后逐渐升高 (2 和 4 周) 的趋势, 这可能与照射后初期机体在对射线损伤的代偿与适应过程中消耗 TGF- β 1 过多有关。照射后 4 周大鼠血清 (10%剂量组) 具有明显的促进 HLF 增殖作用并达到高峰。进一步检测发现, 增殖的 HLF 及细胞上清中 IV 型胶原和 MMP-9 的含量明显增加, 提示照射后大鼠血清中含有 TGF- β 1, 不但能够促进肺 Fb 增生, 而且可显著促进 Fb 合成和释放 IV 型胶原和 MMP-9。肺内 Fb 合成 IV 型胶原可能是通过 TGF- β 1/Smad 依赖的信号途径实现的^[11]。

在放射性肺损伤早期, 肺内快速反应的效应细胞如巨噬细胞和 II 型上皮细胞被激活后, 释放 TGF- β 1 等多种细胞因子, 导致其在肺组织和血清中水平升高; 同时肺组织重建开始启动, 肺泡基底膜和间隔内产生较多 IV 型胶原, 使肺泡隔显著增厚, 影响气血屏障功能; 而增多的 IV 型胶原又通过某

种机制使肺组织产生多种 MMPs, 特别是 MMP-9 和 MMP-2, 进而降解过多的 IV 型胶原^[12], IV 型胶原的降解产物又可刺激巨噬细胞和活化的 Fb 进一步产生 MMPs, 反复降解不断增多的 IV 型胶原; 而此时 MMPs 的组织型抑制物 TIMPs 也开始产生, 抑制 MMPs 的降解功能, 导致肺间质的基质和胶原成分沉积增多^[13], 使肺组织重建成为无效, 最终导致放射性肺损伤向纤维化方向发展^[14]。

肺泡上皮基底膜的异常改变可能是引起肺纤维化的关键, 而 MMPs 在 ECM 的降解与肺无效重塑过程中具有重要作用。肺泡基底膜损伤有助于激活的 Fb 发生大量迁移及长入肺泡腔形成肺实变进而加快纤维化的进程。有研究认为^[15], P311 (与细胞迁移相关的胞内蛋白) 可与 TGF- β 1 潜在相关蛋白 (LAP) 结合, 使肌成纤维细胞具有阿米巴样的运动能力, 使大量活化的 Fb 迅速迁移至受损的肺间隔空隙中发挥修复作用; 而且这一过程仅依赖胞内 RalA GTP 酶, 不需要胞外整合素等粘附分子参与。因此, 提示 IV 型胶原与 MMP-9 相互作用的稳态失衡, 致使肺泡间隔内大量空隙产生, 为肌成纤维细胞的迁移提供了有利条件。因而 TGF- β 1 等纤维化相关细胞因子与基质金属蛋白酶特别是 MMP-9 的相互作用和活化可能是肺重塑与肺纤维化形成的中心环节。

综上所述, 肺受照射后, 肺泡巨噬细胞、II 型上皮细胞首先受到射线的刺激, 释放 TGF- β 1 等细胞因子, 促进间质 Fb 增生, 后者与上皮细胞共同合成 IV 型胶原, 继发引起 MMPs 的产生, 降解 IV 型胶原, 启动肺重建; IV 型胶原的降解有可能促进了活化的成纤维细胞大量迁移, 使肺重建转为无效。揭示肺损伤重建与纤维化之间的内在关系, 有助于寻找阻断或抑制这一作用途径的关键环节, 用于防治肺纤维化和减轻病变程度。

参考文献

- 1 Trott K R, Herrmann T, Kasper M. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004, **58**(2): 463-469
- 2 Bataller R, Brenner D A. J Clin Invest, 2005, **115**(2): 209-218
- 3 Chen Y, William S J, Ding I, et al. Sem in Radiat Oncol, 2002, **12**(1): 26-33
- 4 Gouri S, Dan O, Roger B, et al. Cell Biology International, 1999, **23**(1): 61-72
- 5 Yang K, Liu L, Ahang T, et al. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci (in Chinese), 2006, **26**(3): 301-304
- 6 Lasky J A, Ortiz L A. Am J Med Sci, 2001, **322**(4):

- 213-221
- 7 Freeburn R W, Armstrong L, Millar A B. *Eur Cytokine Netw*, 2005, **16**(1): 5-16
- 8 Kadota J, Mizunoe S, Mito K, *et al.* *Respir Med*, 2005, **99**(1): 111-117
- 9 Gauldie J, Sime P J, Xing Z, *et al.* *Curr Top Pathol*, 1999, **93**(1): 35-45
- 10 Lasky J A, Brody A R. *Environ Health Perspect*, 2000, **108**(Suppl 4): 751-762
- 11 Tian Y C, Chen Y C, Hung C C, *et al.* *J Am Soc Nephrol*, 2006, **17**(10): 2792-2798
- 12 Leufgen H, Bihl M P, Rudiger J J, *et al.* *J Cell Physiol*, 2005, **204**(1): 146-154
- 13 Fligiel S E, Standiford T, Fligiel H M, *et al.* *Human Pathol*, 2006, **37**(4): 422-430
- 14 Misko A, Ferguson T, Notterpek L. *J Neurochem*, 2002, **83**(4): 885-894
- 15 Shi J, Badri K R, Choudhury R, *et al.* *Cell Res*, 2006, **312**(17): 3432- 3442

Effect of TGF- β 1 on early remodeling of pulmonary injury following irradiation

DIAO Ruiying SONG Liangwen WANG Shaoxia LI Ming XU Xinping

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

ABSTRACT To investigate the role of TGF- β 1 on the early lung remodeling after radiation pulmonary injury. The dose-effect of human lung fibroblast proliferation promoted by serum after radiated rat was observed by MTT colorimetric methods. ELISA was used to observe the contents of TGF- β 1 in serum as well as the expression of collagen IV and MMP-9 in HLF stimulated by serum after radiated rat. The level of TGF- β 1 in rat serum increased from 2 to 4 weeks after irradiation. HLF proliferation was significantly promoted by the serum of irradiated rat at a dose of 10% in the medium. The serum of irradiated rat could not only promote HLF proliferation, but also increase the expressions of collagen IV and MMP-9 in HLF. TGF- β 1 plays an important role in the proliferation of HLF and the expressions of collagen IV and MMP-9 in HLF, and is involved in the process of lung remodeling after radiation pulmonary injury.

KEYWORDS TGF- β 1, MMP-9, Collagen type IV, Pulmonary remodeling, Fibroblast

CLC R818.02, R815.5, R363.1⁺21, R364.5