

吸入一氧化氮对放射性肺纤维化中细胞因子及丝裂原物质变化的影响

杨振国 王德文 宋良文 彭瑞云 高亚兵
李 杨 谷庆阳 刘 杰

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘要 观察了吸入 NO 对放射性肺纤维化中细胞因子及丝裂原物质表达变化的影响,以期对 NO 防治肺纤维化的可能机理进行探讨。 ^{60}Co γ 射线照射 Wistar 大鼠建立放射性间质性肺炎模型,分别在照射前 1d (B 和 C 组)以及照射后一个月 (D 和 E 组)开始吸入 NO,NO 吸入浓度分别为 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (B 和 D 组) 和 $1.0\times 10^{-5}\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (C 和 E 组)。分别于照射后 1d、1 周、1 个月、3 个月和 6 个月取材应用免疫组化、原位杂交等方法检测 $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{ET}-1$ mRNA 及其蛋白和 $\text{TNF}\alpha$ 、 AII 蛋白表达情况。结果表明,照射后大鼠肺脏 $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{ET}-1$ mRNA 及其蛋白和 $\text{TNF}\alpha$ 、 AII 蛋白表达明显增强,照射前开始吸入 NO 组与正常大鼠相比前述各指标表达增强,但低于其它组。表明 $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{ET}-1$ 和 AII 均参与了放射性肺纤维化的病理发展过程,吸入 NO 可抑制上述因子的过度表达,从而减轻炎症,延缓和抑制肺纤维化的发展。

关键词 一氧化氮, 放射性肺纤维化, 细胞因子

中图分类号 R816.41

近几年来在有关放射性肺纤维化发病机理和防治的研究中,十分重视细胞生长因子和丝裂原物质的重要作用。本实验观察了吸入 NO 对 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TGF}\beta$ 两种细胞因子和血管紧张素 II (AII)、内皮素-1 ($\text{ET}-1$) 两种丝裂原物质在放射性肺纤维化发生中的变化规律,以期对 NO 防治肺纤维化的可能机理进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

两级雌性 Wistar 大鼠(军事医学科学院实验动物中心提供),体重 $180\pm 20\text{g}$ 。分组情况: A 组 单纯照射组; B 组 照射前 1d 开始吸入 NO,浓度为 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; C 组 照射前一天开始吸入 $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的 NO; D 组 照射后 1 个月开始吸入 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ NO; E 组 照射后 1 个月开始吸入 $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ NO;另设未照射组(正常对照)。B-E 组地鼠吸入 NO 的具体剂量见 1.5。

1.2 NO 吸入装置

由本室自行研制,主要由吸气舱、配气和充气系统、混气瓶等几部分组成。

1.3 主要试剂

(1)抗体及检测试剂: $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{TGF}\beta$ 检测试剂盒购自北京中山生物技术有限公司; $\text{ET}-1$ 检测试剂盒购自武汉博士德公司; AII 一抗为 Peninsula Co 产品。(2)探针: $\text{ET}-1$ 和 $\text{TGF}\beta$ 探

国家自然科学基金(29807213)资助

第一作者:杨振国,男,1958 年 3 月出生,2000 年 6 月毕业于中国人民解放军军需大学基础兽医学专业(博士),副教授
通讯联系人:李杨

收稿日期:初稿 2001-08-15, 修回 2001-10-08

针均为体外转录地高辛标记的 RNA 探针,购自北京中山生物技术有限公司。

1.4 照射方式和条件

^{60}Co γ 射线全胸照射,照距为 3m,剂量率为 $599.85 \times 10^{-4} \text{C} \cdot \text{kg}^{-1}$,单次照射,剂量为 30Gy。Wistar 大鼠麻醉后固定于木板架上,胸部对准钴源,照射野面积为 $4.5\text{cm} \times 4.0\text{cm}$,用 10cm 厚铅砖屏蔽大鼠其余部分。

1.5 NO 吸入程序

B 和 C 组 Wistar 大鼠分别在照射前 1d 开始吸入 $20\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $10\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 NO,每组每天吸入 NO 的时间为 90min,持续 1 个月。D 和 E 组 Wistar 大鼠分别在照射后 1 个月开始吸入 NO,NO 浓度分别为 $20\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $10\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,每天吸入时间也是 90min,持续 1 个月。

1.6 取材

分别于照射后 1d、1 周、1 个月、3 个月和 6 个月共 5 个时间点活杀动物,取肺制备石蜡和冰冻切片。

1.7 免疫组织化学染色

免疫组织化学染色的主要步骤^[1]如下:石蜡切片常规脱蜡至水,丙酮固定,3%过氧化氢室温孵育 10min;抗原修复;血清封闭;滴加适当比例稀释的一抗,4℃过夜;滴加适当比例稀释的生物素标记二抗,37℃孵育 30min;加 ABC 复合物,37℃孵育 1h;DAB 显色。显微镜下观察切片的着色情况,棕黄色为阳性显色。

1.8 原位杂交

原位杂交的主要步骤^[2]依次如下:制备冰冻切片,4%多聚甲醛固定;杂交前处理;预杂交;杂交;杂交前将探针加热至 95—98℃变性 5—10min 后,置于冰中冷却 5min,将探针与原位杂交液混合滴加于样品上,盖膜后 42℃杂交过夜;经杂交后处理,进行杂交体检测;阳性杂交信号为细胞浆内出现深蓝色—深褐色颗粒。

2 结果

2.1 TGF β 蛋白及 mRNA 表达的变化

未照射组大鼠肺组织呈现 TGF β 的弱表达,主要表达部位在支气管粘膜上皮和血管平滑肌细胞及肺泡上皮细胞(见图 1)。单纯照射组(A 组)大鼠肺脏于照射后 1 个月 TGF β 表达明显增强,3 个月时达最高峰(见图 2),6 个月表达减弱,但仍保持在较高的表达水平。表达部位除支气管粘膜和血管平滑肌外,肺泡上皮细胞、巨噬细胞和成纤维细胞均有强表达,在增生的肺间隔和实变区可见 TGF β 的强表达。照射后吸入 NO 的 D 和 E 组在 3 个月和 6 个月也均有较强的 TGF β 表达,但 D 组略微减弱。照射前开始吸入 NO 的 B 和 C 组虽然在 3 和 6 个月 TGF β 表达也增强,但表达强度低于上述各照射实验组(见图 3)。TGF β mRNA 原位杂交结果显示:未照射组在支气管上皮有阳性表达,血管平滑肌有非常微弱的表达。A 组在照射后 1 周表达开始增强,1 个月和 3 个月均呈现广泛性的强阳性表达(见图 4)。B 和 C 组在 3 个月时表达增强,但明显弱于 A 组(见图 5 示 B 组)。

2.2 TNF α 蛋白表达的变化

未照射组大鼠肺组织仅在个别部位偶见巨噬细胞有微弱的 TNF α 表达。A 组大鼠肺组织在照射后 1 周间质细胞即呈现出强阳性表达,1 个月时表达最强(见图 6),3 个月时明显减弱,6 个月时仅在实变部位见有较强的阳性表达。B 和 C 组 TNF α 的表达趋势与 A 组基本相似,但明显弱于 A 组,尤其在 1 个月时的差别最明显(见图 7 示 B 组)。

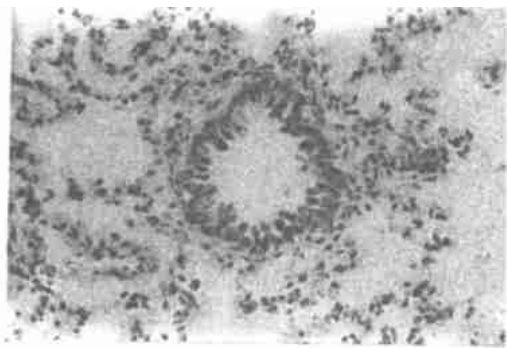


Fig.1 Immunohistochemistry for $TGF\beta$ in normal rat pulmonary tissue showed positive reaction in pneumocytes and epithelia of mucous membrane at bronchus (ABC method, $\times 200$)

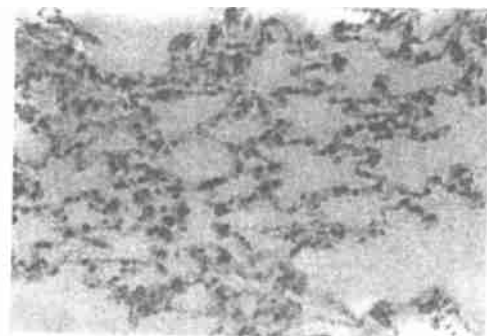


Fig.2 Immunohistochemistry for $TGF\beta$ showed strong positive reaction in pulmonary macrophages and pneumocytes in group A· three months after irradiation (ABC method, $\times 200$)

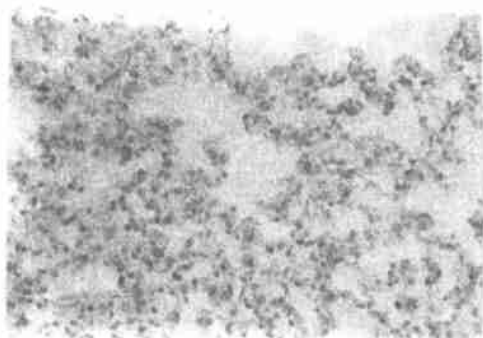


Fig.3 Immunohistochemistry for $TGF\beta$ showed positive reaction in pulmonary macrophages and pneumocytes in group C three months after irradiation, but the reaction is significant weaker than that in group A· (ABC method, $\times 200$)

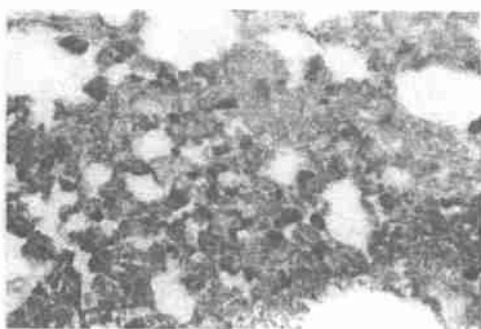


Fig.4 In situ hybridization for $TGF\beta$ mRNA showed strong positive reaction in pneumocytes in group A three months after irradiation (Marked by Digoxigenin, $\times 400$)

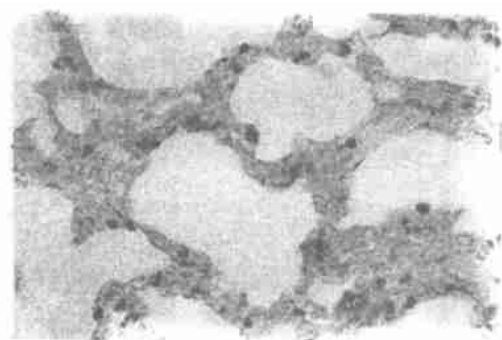


Fig.5 In situ hybridization for $TGF\beta$ mRNA showed positive reaction in pneumocytes in group B three months after irradiation, but the reaction is significant weaker than that in group A· (Marked by Digoxigenin, $\times 400$)



Fig.6 Immunohistochemistry for $TNF\alpha$ showed strong positive reaction in pulmonary tissue in group A one month after irradiation (ABC method, $\times 200$)

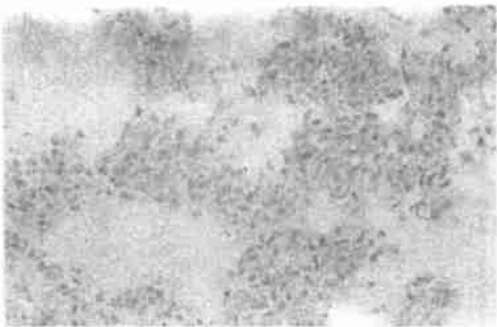


Fig.7 Immunohistochemistry for TNF α showed positive reaction in pulmonary tissue in group B one month after irradiation ,but the reaction is significant weaker than that in group A (ABC method, $\times 200$)

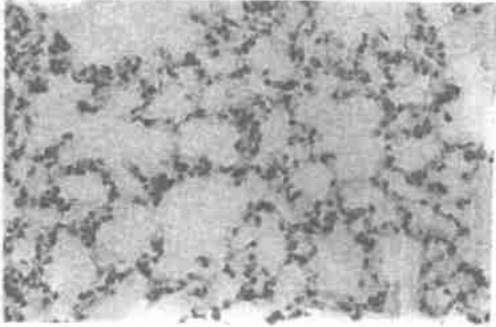


Fig.8 Immunohistochemistry for ET showed strong positive reaction in pneumocytes and macrophages in group A one month after irradiation (ABC method, $\times 200$)

2.3 ET-1 蛋白及 mRNA 表达的变化

未照射组大鼠肺组织 ET-1 在血管内皮和平滑肌及支气管粘膜上皮有弱阳性表达。照射后 1 周 A 组肺组织 ET-1 表达开始增强,1 个月时达高峰,(见图 8 示 A 组)。3 个月开始下降,但仍维持在较高水平,6 个月时明显降低,B 组和 C 组 1 个月时 ET-1 表达增强,高峰期出现在第 3 个月,但仍低于 A 组的表达强度(见图 9 示 C 组),D 组和 E 组在 3 个月有强阳性表达。ETmRNA 杂交结果显示;未照射组血管内皮和少量的间质细胞呈阳性表达。A 组大鼠肺组织在 1 周、1 和 3 个月均呈现强阳性表达(见图 10),6 个月时减弱。B 组和 C 组在 1 和 3 个月表达最强,但弱于 A 组(见图 11 示 C 组)。D 组和 E 组 3 个月时为强阳性表达。

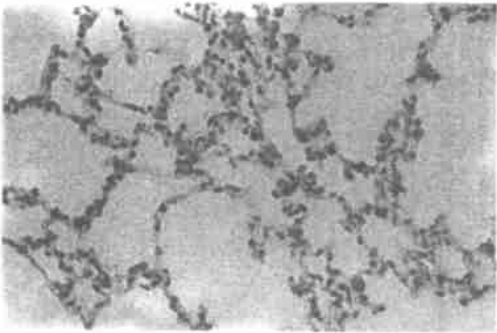


Fig.9 Immunohistochemistry for ET showed positive reaction in pneumocytes and macrophages in group C one month after irradiation ,but the reaction is significant weaker than that in group A (ABC method, $\times 200$)

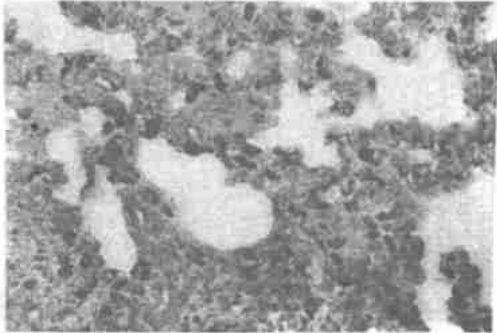


Fig.10 In situ hybridization for ET mRNA showed strong positive reaction in pneumocytes, interstitial cells and endothelia of capillary vessel in group A one month after irradiation (Marked by Digoxigenin, $\times 400$)

2.4 AII 表达的变化

未照射组大鼠肺组织仅在支气管粘膜上皮呈阳性反应,而血管壁平滑肌细胞呈弱阳性反应。A 组大鼠肺组织照射后 1 个月和 3 个月 AII 表达明显增强,在肺间质巨噬细胞和 II 型上

皮细胞均可见强阳性表达(见图 12),6 个月时明显减弱。B 组仅在 3 个月时表达最强。C 组表达规律与 B 组相同,但表达强度相对较弱。D 和 E 组在 3 个月时也呈现强阳性表达,但明显弱于 A 组。

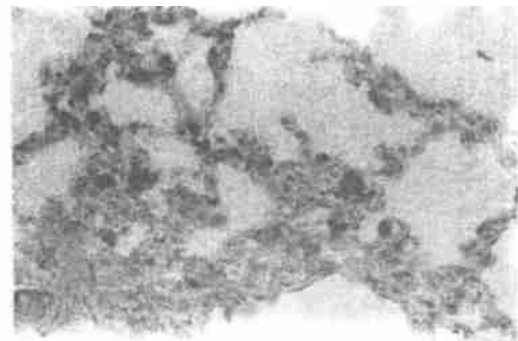


Fig. 11 In situ hybridization for ET mRNA showed positive reaction in lung tissue in group C one month after irradiation, but the reaction is significant weaker than that in group A (Marked by Digoxigenin, $\times 400$)

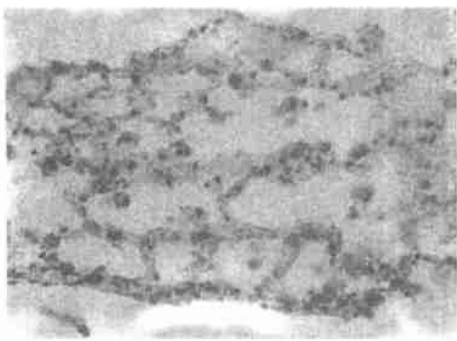


Fig. 12 Immunohistochemistry for AII showed positive reaction in pulmonary tissue in group A one month after irradiation (ABC method, $\times 200$)

3 讨论

3.1 TGFβ与放射性肺纤维化

TGFβ是一种多功能生长因子,它在肝、肺、肾等器官纤维化的发生发展过程中起重要作用^[2]。我们的实验发现 TGFβ mRNA 在照射后 1 周表达开始增高,照射后 1 个月和 3 个月均呈现很强的阳性表达;TGFβ 蛋白合成的高峰期出现在第 3 个月,以后虽有下降,但始终保持在一个较高的表达水平,与文献^[3]报道基本一致。TGFβ 表达高峰期与我们在组织学检查发现成纤维细胞大量增殖、胶原合成旺盛时期相吻合,说明 TGFβ 与放射性肺纤维化有着十分密切的关联。

照射前开始吸入 NO 组 TGFβ mRNA 和 TGFβ 蛋白表达减弱,表明 NO 对 TGFβ 基因的表达和蛋白合成具有一定的抑制作用。

3.2 TNFα与放射性肺损伤

近年的研究表明,TNFα 是引发急性肺炎和肺纤维化的重要细胞因子之一^[4]。文献^[5]表明在放射性肺纤维化的早期 TNFα 最先表达,照射后 1dTNFα 基因表达增强,第 14 天比第 1 天增加 4 倍。我们在实验中也发现,TNFα 蛋白照射后 1 周表达开始增强,在急性炎症高峰期 1 个月时 TNFα 表达最强,说明 TNFα 与早期的放射性间质肺炎有着非常密切的关系,即 TNFα 作为最早出现的炎性因子,有着激活和促进其它炎性因子合成及分泌的作用。TNFα 对肺纤维化也具有十分重要的作用。实验表明,照射后大鼠肺组织 TNFα 在 3 个月时虽然表达下降,但仍高于未照射组,特别是在 6 个月时于实变区还可见 TNFα 的较强表达,证实 TNFα 不仅在早期的放射性间质肺炎起到了关键作用,同时也积极参与了肺纤维化的形成,对放射性间质性肺炎和肺纤维化的发生发展具有“双重性”的影响。

照射前开始吸入 NO 组 TNFα 表达强度明显弱于单纯照射组,证明吸入 NO 对肺脏 TNFα

的产生具有抑制作用。

3.3 内皮素(ET)与肺损伤

肺内 ET 主要分布在肺血管、呼吸道上皮和粘膜上皮,以粘膜上皮的含量最丰富。肺是体内产生 ET 最多、ET 受体分布最为丰富的器官,对 ET 的生物学作用有较强的敏感性^[6]。ET 是一种重要的炎性介质和强烈的丝裂原物质。有人发现,ET-1 能刺激肺巨噬细胞 O_2^- 的形成,促进中性粒细胞产生过氧化物^[7];其对内皮细胞的直接毒性作用可增加毛细血管和微血管的通透性导致肺水肿,且血浆和肺组织 ET 的升高与肺水肿的严重程度相一致^[8]。在实验中也观察到,单纯照射组动物在照射后 1 个月 ET mRNA 和 ET 蛋白即呈强阳性表达,这时也正是间质肺炎和肺水肿最严重时期,而在照射前开始吸入 NO 组 ET mRNA 和 ET 的表达明显弱于单纯照射组,其炎症和肺水肿程度较轻,证明 ET 在急性肺损伤中有着重要作用。ET 作为一种较强的促有丝分裂物质,能促进成纤维细胞和肺泡 II 型上皮细胞的增殖^[6]。我们的实验结果显示,在放射性肺纤维化的增生期(3 个月),ET-1 mRNA 和 ET-1 均有强阳性表达,说明 ET-1 在放射性肺纤维化的发展过程中有着一定的作用。

ET-1 和 NO 之间存在反馈调节,NO 可抑制 ET-1 的缩血管活性和丝裂原作用^[9]。实验结果表明,照射前开始吸入 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ NO 的 B 组和 C 组,肺组织 ET-1 mRNA 和 ET-1 表达明显弱于单纯照射组,峰值出现时间滞后,说明吸入 NO 可抑制实验动物放射性肺纤维化组织内 ET-1 mRNA 和 ET-1 的表达。

3.4 血管紧张素 II(AII)与 RPF 的关系

有关 AII 与肺纤维化关系的文献报道很少,宋良文等^[10]用放射免疫法测定了放射性肺纤维化过程中肺组织 AII 含量的变化。发现照射后 1—5 个月 AII 的含量明显增高。我们的实验证明 1—3 个月 AII 的表达最强,在 6 个月时减弱,但仍高于未照射组,进一步证实 AII 在放射性肺纤维化过程中具有重要作用。

NO 可以抑制 AII 的合成。宋良文等^[11]报道,NO 供体硝普钠(SNP)能明显抑制照射后离体细胞的 AII 合成,照射+SNP 组 AII 的积分光密度仅相当于单纯照射组的 1/2。我们的实验观察了 NO 对整体动物肺组织 AII 的影响,发现照射前开始吸入 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ NO 的实验动物肺组织 AII 的表达明显减弱,说明吸入 NO 也能降低肺组织 AII 的表达。结合其它实验指标,我们的研究证明照射前开始吸入 NO 明显减轻放射性间质性肺炎的发生及其病变程度,延缓和减轻肺纤维化发生的时间和程度,而照射后吸入 NO 此种作用较弱。本研究也证实照射前开始吸入 NO 对于 $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、ET-1 和 AII 等因子基因表达和蛋白合成的抑制作用更为显著,我们认为,NO 对于上述因子的抑制作用可能为其防治放射性肺纤维化的机制之一。 $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 均为体内应用的安全浓度,在体内实验中,关于两种浓度何者作用更佳对于不同的实验指标结果不尽一致,尚有待进一步研究。

综上所述, $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、ET-1 和 AII 均参与了放射性间质性肺炎—纤维化的病理发展过程。有关 NO 抑制 $\text{TGF}\beta$ 、 $\text{TNF}\alpha$ 、ET-1 和 AII 基因表达和蛋白合成的机理目前尚不清楚。Mary 等^[6]在发现 NO 能抑制巨噬细胞产生 $\text{TNF}\alpha$ 后,又在同样条件下,随后又发现 NO 也能抑制 IL-1 和 PDGF 的产生,认为 NO 是在基因转录水平影响细胞因子的产生。我们的实验发现,NO 并不是一个某种细胞因子的特异性抑制剂,它具有广泛地抑制各种炎性细胞因子和炎性介质分泌的作用。因此我们认为,NO 主要是通过改善肺循环、阻止炎性细胞聚集和降低炎性细胞反应活性来达到抑制炎性物质分泌、控制炎症发展的目的。

参 考 文 献

- 1 蔡文琴,王伯云编著.实用免疫组织化学与核酸分子杂交技术,成都:四川科学技术出版社,1994,59—229
CAI W Q, WANG B Y. Applied immunohistochemistry and nucleic acid molecular hybridization technology, Chengdou, Sci Tech Publishing Company of Sichuan, 1994, 59—229
- 2 Roekelmann T J, Limper A H, Colby T V *et al*. Proc Natl Acad Sci, 1991, **88**:6642—6653
- 3 Vaillant P, Limper A H, Colby T V. *et al*. Mondalde Arch chest Dis. 1996, **51**(2) 145—152
- 4 Piguet P F, Collart M A, Grau Q E *et al*. Nature, 1990, **344**:245—253
- 5 Lmper A H, Broekelmann T J, Colly T V *et al*. Chest 1991, Suppl:55s—56s
- 6 Mary J T, Lisa T B, Mary J C *et al*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, **17**:279—283
- 7 Filep J G. Life Sci, 1993, **52**:119—133
- 8 Gotaro S, Kazuwa N, Yoshihikos *et al*. Life Sci, 1991, **48**:969—975
- 9 冯晓东,蔡英年等.中国医学科学院学报,1995, **17**(3):172—177
FENG X D, CAI Y N *et al*. Trans Med Sci Acad of China, 1995, **17**(3):172—177
- 10 SONG L W, WANG D W, CUI X M *et al*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 1998, **17**(2):141—150
- 11 宋良文,王德文,崔雪梅等.中国病理生理学杂志,1998, **14**(6):60—62
SONG L W, WANG D W, CUI X M *et al*. Chin J Pathol Physiol, 1998, **14**(6):60—62

EFFECT OF INHALED NITRIC OXIDE ON THE EXPRESSION OF RELATED CYTOKINES AND MITOGENS IN RADIATION PULMONARY FIBROSIS

YANG Zhenguo WANG Dewen SONG Liangwen PENG Ruiyun GAO Yabing
LI Yang GU Qingyang LIU Jie

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

ABSTRACT To investigate the Effect of inhaled Nitric Oxide on the expression of related cytokines and mitogens in radiation pulmonary fibrosis. Pulmonary fibrosis model was made induced by irradiation with ^{30}Gy ^{60}Co γ rays on the whole thorax of Wistar rats. The NO inhalation started one day before (B and C groups) and one month (D and E groups) after radiation exposure respectively. The concentration of NO inhaled was $20\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ppm (B and D groups) and $10\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (C and E groups). Group A was not treated except for irradiation. The immunohistochemistry and in situ hybridization were examined in 1W, 1M, 3M, and 6M after radiation. In group A, the mRNA transcription of $\text{TGF}\beta$ and ET, and the protein expression of $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, ET and AII was increased significantly in group A after irradiation. In group B and C, the expression $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, ET and AII was higher than normal controls, but lower than that in other groups. $\text{TGF}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ and ET, AII are important factors in the formation of lung fibrosis, and NO has preventive and therapeutic effect through inhibiting the activities of these factors.

KEYWORDS Nitric oxide, Radiation pulmonary fibrosis, Cytokines

CLC R816.41