

本文引用: 徐芳, 黄莺, 万勇, 等. 发现于炎症区域分子1在实验性大鼠肺纤维化组织中的表达及意义[J]. 新乡医学院学报 2014, 31(1): 19-21.

【基础研究】

发现于炎症区域分子1在实验性大鼠肺纤维化组织中的表达及意义

徐芳¹, 黄莺¹, 万勇¹, 李剑平²

(1. 武汉市第一医院呼吸科, 湖北 武汉 430022; 2. 新疆克拉玛依油田医院呼吸科, 新疆 克拉玛依 834000)

摘要: 目的 研究发现于炎症区域分子1(FIZZ1)在大鼠肺纤维化组织中的表达及意义。方法 10只Sprague-Dawley大鼠随机分为模型组和对照组,每组5只。大鼠采用气管内注入博来霉素($5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的方法复制大鼠肺纤维化模型(模型组);采用气管内注入生理盐水($1.25\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)的方法制造阴性对照(对照组)。第28天处死大鼠,肺组织病理切片行苏木精-伊红染色,Ashcroft评分评定大鼠肺组织纤维化的严重程度;免疫组织化学方法检测大鼠FIZZ1和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的表达。结果 模型组大鼠肺纤维化程度较对照组严重,Ashcroft评分比较差异有统计学意义($P < 0.01$);模型组大鼠FIZZ1和TGF- β_1 表达水平较对照组升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 FIZZ1在肺纤维化发病机制中起重要作用,可能与TGF- β_1 的高表达有关。

关键词: 博来霉素;肺纤维化;发现于炎症区域分子1;转化生长因子- β_1

中图分类号: R563 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)01-0019-03

Expression and significance of found in inflammatory zone 1 in pulmonary fibrosis of experimental rats

XU Fang¹, HUANG Ying¹, WAN Yong¹, LI Jian-ping²

(1. Department of Pneumology, the First Hospital of Wuhan City, Wuhan 430022, Hubei Province, China; 2. Department of Pneumology, Hospital of Karamay Oil Field, Karamay 834000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: **Objective** To study the expression and significance of found in inflammatory zone 1(FIZZ1) in pulmonary fibrosis of experimental rats. **Methods** Ten Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group($n = 5$) and model group($n = 5$). Pulmonary fibrosis model was induced by using the method of intratracheal instillation of bleomycin($5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Control group was treated by intratracheal instillation of saline($1.25\text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) to obtain the negative control. On the twenty-eighth day all rats were sacrificed and the lung tissues were harvested. The lung tissue was performed with hematoxylineosin staining. The severity of pulmonary fibrosis in rats was assessed by Ashcroft score. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of FIZZ1 and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). **Results** Compared with the rats of control group, the severity of pulmonary fibrosis was increased in rats of model group, and there was significant difference in Ashcroft score($P < 0.01$). The expression levels of FIZZ1 and TGF- β_1 in model group were higher than those in control group($P < 0.01$). **Conclusion** FIZZ1 may play an important role in the development of pulmonary fibrosis, it possibly relates with TGF- β_1 overexpression.

Key words: bleomycin; pulmonary fibrosis; found in inflammatory zone 1; transforming growth factor- β_1

肺纤维化是一种由不明原因引起的肺泡持续损伤,细胞外基质过度沉积,肺结构发生破坏的难治性肺疾病,主要表现为肺泡炎及肺泡结构紊乱,最终导致肺功能不可逆性下降^[1]。其发病涉及多种细胞因子,但目前具体机制尚不明确^[2]。最近研究发现,一种新的细胞因子发现于炎症区域分子1(found in inflammatory zone 1, FIZZ1)与缺氧、感染、细胞增

殖及胰岛素抵抗等有关。FIZZ1在肺内特异性表达,研究FIZZ1与肺纤维化的关系具有重要意义。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1)是目前公认的最重要的致纤维化因子。本研究通过观察博来霉素致肺纤维化大鼠肺组织中FIZZ1及TGF- β_1 的表达情况,初步探讨FIZZ1与肺纤维化发病机制的关系。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂 10只无特异病原体级健康雌性

DOI: 10.7683/xxyxb.2014.01.005

收稿日期: 2013-06-24

基金项目: 武汉市科技攻关计划资助项目(编号: 200751099415)

作者简介: 徐芳(1974-),女,湖北武汉人,硕士,主治医师,主要从事肺纤维化研究。

Sprague-Dawley 大鼠, 体质量 180 ~ 200 g, 购自武汉大学动物中心。博来霉素(每支 4 mg, 天津太和制药有限公司, 批号: 081102); FIZZ1、TGF- β_1 多克隆抗体一抗(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 抗兔二抗(丹麦 DAKO 公司)。

1.2 实验分组和处理 10 只大鼠随机分为模型组和对照组, 每组 5 只。模型组大鼠用质量分数 10% 水合氯醛 ($3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔注射, 麻醉后固定于手术台上, 颈部气管切开后一次性注入博来霉素 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 复制大鼠纤维化模型。对照组大鼠在相同条件下气管内注入生理盐水 ($1.25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 作为阴性对照。各组大鼠于造模后第 28 天处死, 开胸取左肺甲醛固定, 石蜡包埋, 切片行苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE) 染色及免疫组织化学检测。

1.3 HE 染色及 Ashcroft 评分 肺组织固定包埋后制成 $5 \mu\text{m}$ 厚度的石蜡切片。用苏木精染色液染细胞核 3 min, 流水洗; 盐酸乙醇分化, 流水洗; 氨水返蓝 30 s, 蒸馏水洗, 显微镜下观察染色情况。乙醇伊红染细胞质 15 s。染色后梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在显微镜下观察肺间质的厚度和肺纤维化的范围, 参照文献[3]进行 Ashcroft 评分。

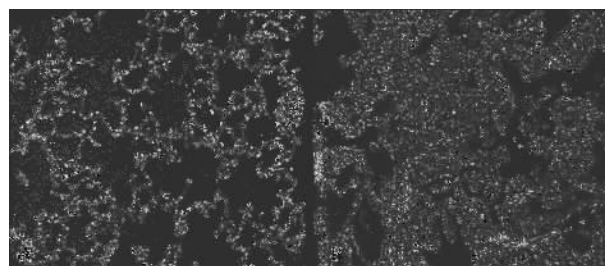
1.4 免疫组织化学检查肺组织中 FIZZ1 及 TGF- β_1 的表达 切片常规脱蜡, 水化, $30 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 过氧化氢-甲醛处理, 放入枸橼酸钠缓冲液中修复, 分别按程序加入 FIZZ1、TGF- β_1 一抗及二抗孵育, 磷酸盐缓冲液冲洗, 二氨基联苯胺显色。每张切片选取 5 个肺间质相似区域, 在 400 倍放大的高倍视野下通过显微镜拍照取图, 每次取图将显微镜光源强度和显微镜放大倍数保持恒定。通过 Image-Pro Plus 分析软件对每张图片根据免疫组织化学阳性着色的深浅及其阳性面积大小计算视野下的积分光密度。每张切片所有视野的积分光密度取平均值作为该张切片的积分光密度。以积分光密度作为评估目标蛋白表达强弱的指标。

1.5 统计学处理 所有数据应用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析。2 组大鼠 Ashcroft 评分以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 经过方差齐性检测发现方差不齐, 采用 Manna-Whitney U test 进行统计学分析; 采用两独立样本 t 检验(标注 t 值和 P 值) 及 Manna-Whitney U test(标注 z 值和 P 值) 对 FIZZ1 及

TGF- β_1 积分吸光度结果进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化 对照组大鼠肺组织切片行 HE 染色发现, 肺泡间隔正常, 肺泡的连续性未受到破坏, 肺泡的直径和面积大小均匀, 大部分区域终末小呼吸道及血管周边无明显炎性浸润表现(图 1A)。模型组大鼠肺泡间隔增宽, 肺泡的连续性受到破坏, 肺泡的直径和体积大小不均匀, 终末小呼吸道周边炎性细胞浸润明显, 血管周边也发现明显的炎性细胞浸润现象。同时伴有纤维化形成, 以支气管周边区域较为明显, 外周局部区域也有局灶性的纤维化表现(图 1B)。对照组大鼠 Ashcroft 评分 0.28 ± 0.45 , 模型组评分 5.76 ± 1.76 , 模型组大鼠肺纤维化程度较对照组严重, 差异有统计学意义 ($z = -6.192$, $P < 0.01$)。



A: 对照组; B: 模型组。

图 1 2 组大鼠肺组织病理学改变(HE 染色, $\times 100$)

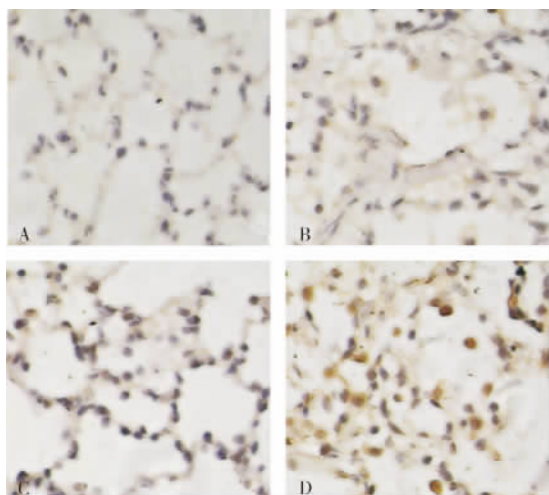
Fig. 1 Pathological changes of the rats lung tissue in the two groups(HE staining, $\times 100$)

2.2 肺组织免疫组织化学检测结果 免疫组织化学检测见大鼠肺组织中有 FIZZ1、TGF- β_1 表达, 主要表达在肺泡上皮细胞、细支气管上皮细胞、巨噬细胞及血管内皮细胞。对照组大鼠见少量表达, 模型组大鼠表达量明显增高, 其积分光密度值与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 见表 1 和图 2。

表 1 2 组大鼠肺组织免疫组织化学积分光密度比较

Tab. 1 Comparison of immunohistochemical integral optical density in the rats lung tissue between the two groups

($\bar{x} \pm s$)			
组别	n	FIZZ1	TGF- β_1
对照组	5	2167.27 ± 879.23	3370.07 ± 1478.14
模型组	5	4214.56 ± 1012.34	7772.23 ± 1526.46
t/z		$-3.867(z)$	$-4.63(t)$
P		<0.01	<0.01



A: 对照组 TGF- β_1 ; B: 模型组 TGF- β_1 ; C: 对照组 FIZZ1; D: 模型组 FIZZ1。

图2 2组大鼠肺组织中 TGF- β_1 和 FIZZ1 的表达(HE染色, $\times 400$)

Fig.2 Expressions of TGF- β_1 and FIZZ1 in the rats lung tissue of the two groups(HE staining, $\times 400$)

3 讨论

FIZZ1 又称缺氧诱导有丝分裂因子(hypoxia-induced mitogenic factor, HIMF), 是2000年首次在过敏性炎症中发现的一种独立性因子^[4], 它不但具有炎症因子的特点, 还兼有生长因子的特性, 具有促进细胞趋化、迁移、增殖、抗凋亡、收缩血管及促进血管增生等功能^[5]。近年来研究发现, FIZZ1 与肺部疾病密切相关, 参与了肺部炎症、矽肺、哮喘、慢性阻塞性肺疾病等的发病过程。Liu等^[6]研究显示体外培养的肺成纤维细胞未见 FIZZ1 的表达, 但是将表达有 FIZZ1 的肺泡 II 型上皮细胞同肺成纤维细胞共同培养, 能刺激肺成纤维细胞 α -肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) 和 I 型胶原的表达。将表达 FIZZ1 的质粒转入肺成纤维细胞中, α -SMA 和 I 型胶原的表达也明显增强。 α -SMA 是肺肌成纤维细胞的特征性标志物, 以上实验表明 FIZZ1 有诱导肺成纤维细胞向肌成纤维细胞表型转化的作用, 肌成纤维细胞能分泌大量细胞外基质, 促进肺纤维化的发生。本实验中模型组大鼠 FIZZ1 的表达明显高于对照组, 差异具有统计学意义, 说明 FIZZ1 参与了肺纤维化的发病过程。

TGF- β_1 是一种多功能的细胞因子, 文献报道

TGF- β_1 可加速成纤维细胞细胞外胶原蛋白的合成, 其对多种器官的纤维化均具有重要的作用^[7-8]。本实验中模型组大鼠 TGF- β_1 明显高表达, 说明其与肺纤维化密切相关。近期研究发现, TGF- β_1 可以诱导人肺成纤维细胞表型转化, 具有产生平滑肌细胞肌动蛋白的能力, 加重肺纤维化^[9]。作者所在研究小组前期研究在原代肺成纤维细胞的培养中发现, 成纤维细胞可以产生内源性的 TGF- β_1 ^[10]。由此推测肺纤维化大鼠肺组织 FIZZ1 和 TGF- β_1 之间可能存在某种联系, 共同促进肺纤维化的病理发展。关于 TGF- β_1 与 FIZZ1 的相互关系有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 葛莉莉, 宋岳祥, 史可云. 依那普利对博来霉素致大鼠肺纤维化的影响[J]. 新乡医学院学报 2012, 29(10): 757-761.
- [2] 杜海科, 周欣, 李贺. 应用表面增强激光解吸/离子化飞行时间质谱技术筛选博来霉素肺纤维化大鼠血清蛋白标志物[J]. 新乡医学院学报 2012, 29(10): 736-739.
- [3] Ashcroft T, Simpson J M, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale[J]. *J Clin Pathol* 1988, 41(4): 467-470.
- [4] Raes G, De Baetselier P, Noël W, et al. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages[J]. *J Leukoc Biol* 2002, 71(4): 597-602.
- [5] Su Q, Zhou Y, Johns R A. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is a binding partner for hypoxia induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1) and mediates myeloid cell chemotaxis[J]. *FASEB J* 2007, 21(7): 1376-1382.
- [6] Liu T, Dhanasekaran S M, Jin H, et al. FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation[J]. *Am J Pathol* 2004, 164(4): 1315-1326.
- [7] Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis N G. TGF- β signaling in fibrosis[J]. *Growth Factors* 2011, 29(5): 196-202.
- [8] 陈飞, 魏厚仁, 曾艳彩, 等. TGF- β_1 AS-ODN 对牛眼小梁细胞 TGF- β_1 、纤维连接蛋白、I 型胶原表达的影响[J]. 眼科新进展 2004, 24(4): 260-263.
- [9] Lepparanta O, Sens C, Salmenkivi K, et al. Regulation of TGF- β storage and activation in the human idiopathic pulmonary fibrosis lung[J]. *Cell Tissue Res* 2012, 348(3): 491-503.
- [10] 万勇, 黄莺, 孙洁明. 成纤维细胞在博来霉素致肺纤维化中高表达 IL-2、 β -catenin、TGF- β_1 和 IL-40[J]. 华中科技大学学报: 医学版 2010, 39(6): 766-770.

(本文编辑: 杨博 英文编辑: 杨博)