

1,25-(OH)₂D₃ 治疗肺纤维化的动物实验研究

陈娴秋 刘瑞麟 李惠萍

摘要 **目的** 观察 1,25-(OH)₂D₃ 对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型的干预效果。**方法** 将 C57BL/6 雄性小鼠 110 只分为对照组($n=30$),模型组($n=40$),干预组($n=40$)。对模型组及干预组小鼠用博来霉素(3.5mg/kg)气管内滴入构建肺纤维化模型,对照组滴入等量生理盐水。干预组小鼠每日予罗盖全 0.5μg/kg 灌胃,对照组及模型组以等体积蓖麻油灌胃。在造模第 7、14、28 天分批处死各组一定数量小鼠,取右上肺组织行苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织纤维化程度并评分,除此之外,在第 28 天增加检测肺组织羟脯氨酸含量。**结果** 造模第 7 和 14 天,干预组与模型组肺纤维化评分无明显差别;第 28 天,干预组小鼠肺纤维化评分低于模型组($P<0.05$),干预组小鼠肺组织羟脯氨酸含量低于模型组($P<0.05$)。**结论** 1,25-(OH)₂D₃ 可减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化程度。

关键词 1,25-(OH)₂D₃ 博来霉素 肺纤维化 肺纤维化病理评分 羟脯氨酸

An Animal Experiment on the Effect of 1,25-(OH)₂D₃ in Treatment of Pulmonary Fibrosis. Chen Xianqiu, Liu Ruilin, Li Huiping. Department of Respiratory Medicine, Shanghai Pulmonary Hospital, Shanghai 200433, China

Abstract **Objective** To evaluate the effect of 1,25-(OH)₂D₃ on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. **Methods** One hundred and ten C57BL/6 male mice were divided into control group ($n=30$), model group ($n=40$) and intervention group ($n=40$). The mice in model group and intervention group were injected with bleomycin (3.5mg/kg) intratracheal to set up the model of pulmonary fibrosis, and the control were injected with saline. Then the mice in intervention group were fed with 1,25-(OH)₂D₃ (0.5μg/kg) daily. At the 7th, 14th and 28th day after intratracheal, we sacrificed a certain number of mice of each group. The inferior lobe of right lung were collected to stain for pathological examination and compare with fibrosis pathological score. Besides, the hydroxyproline content were measured at the 28th day. **Results** At the 28th day, the pulmonary fibrosis pathology score of the mice in intervention group was lower than that in model group ($P<0.05$), and the hydroxyproline content of the mice in intervention group were lower than that in model group ($P<0.05$). **Conclusion** 1,25-(OH)₂D₃ has a protective effect on lung fibrosis induced by bleomycin.

Key words 1,25-(OH)₂D₃; Bleomycin; Pulmonary fibrosis; Pulmonary fibrosis pathology scores; Hydroxyproline

特发性肺间质纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种病因不明,组织病理学表现为普通型间质性肺炎的弥漫性间质性肺病。目前认为,IPF 是由不明原因造成肺泡上皮损伤及异常修复所致。目前该疾病的治疗仍以激素为主,但易造成骨质疏松等不良反应。1,25-(OH)₂D₃ 是目前治疗骨质疏松药物之一。有文献报道,1,25-(OH)₂D₃ 具有抗器官(尤其在肾脏)纤维化的作用,但尚无其对肺纤维化的在体研究及报道^[1-4]。本实验通过 1,25-(OH)₂D₃ 干预博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型,观察不同时期处死小鼠的肺组织病理改变及测定羟脯氨酸含量从而研究 1,25-(OH)₂D₃ 对小鼠肺纤

维化的影响,并推测可能的作用机制,望为 1,25-(OH)₂D₃ 用于 IPF 的临床治疗提供有力依据。

材料与方法

1. 材料:(1)仪器与试剂:1,25-(OH)₂D₃ (骨化三醇胶丸,25μg×10 粒装,罗氏)、切片机(LEICA RM2235)、染色机(LEICA AUTO STAINER XL)、注射用盐酸博来霉素粉剂(日本化药株式会社,15 毫克/支)、羟脯氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所)。(2)实验动物:健康 8 周龄 SCF 级 C57BL/6 雄性小鼠 110 只,体重 18~22g,购于上海第二军医大学实验动物中心,在无特定病原体条件下饲养,环境温度 20±2℃,相对湿度 50%。

2. 实验方法:(1)动物分组:将 110 只小鼠随机分为对照组(30 只),模型组(40 只),干预组(40 只)。(2)构建小鼠肺纤维化模型:参考文献方法对模型组及干预组小鼠称重后腹腔注射 1%戊巴比妥钠(50mg/kg)溶液进行全身麻醉,将小鼠仰卧固定,颈部正中剪毛,按常规手术切开皮肤,逐层分离颈部组织,暴露气管,注入博来霉素溶液(按 3.5mg/kg 剂量溶于 0.1ml 生理盐水中)后立即将小鼠直立、旋转,使博来霉素在

作者单位:200433 同济大学附属上海市肺科医院呼吸科(陈娴秋、李惠萍) 200065 上海市同济医院呼吸科(刘瑞麟)

通讯作者:李惠萍,电子信箱:lihuiping1958@yahoo.com.cn

肺内均匀分布;对照组气管注入等体积(0.1ml)生理盐水。将所有老鼠颈部止血钳夹合颈部切口缝合,清醒后常规饲养^[5]。(3)干预实验:对干预组小鼠连续 28 天每日以罗盖全 0.5μg/kg(溶于 0.1ml 蓖麻油中)灌胃。方法为:用 1ml 注射器连接灌胃针头(事先将针头磨平)由嘴角进入,当有落空感时开始注药。对照组及模型组小鼠每日予等体积(0.1ml)蓖麻油按同样方法灌胃。每日对小鼠精神、活动、存活情况进行观察。分别在第 7、14、28 天按表 1 所示操作。采用腹主动脉放血法处死小鼠,切开颈部皮肤逐层暴露气管,打开胸廓,观察肺脏

大体标本,结扎右主支气管包括右侧肺门,剪下右侧肺组织,下叶用于病理检查,上叶用于检测羟脯氨酸含量。左肺液氮保存备用。(4)病理组织学观察:对处死小鼠的右肺下叶予 10% 甲醛溶液固定 24h 后,常规脱水,浸石蜡包埋,6μl 连续切片,行光镜 HE 染色。按 Szapiel 等^[6]标准对各组小鼠肺组织纤维化进行双盲评分,见表 2。(5)肺组织羟脯氨酸含量测定:严格按羟脯氨酸试剂盒(碱水解法)说明,对第 28 天处死小鼠的右肺上叶检测羟脯氨酸含量。因羟脯氨酸反映肺组织胶原含量,故可在一定程度上反映肺纤维化程度。

表 1 第 7、14、28 天各组小鼠处理流程

造模天数	对照组(<i>n</i> = 30)	模型组(<i>n</i> = 40)	干预组(<i>n</i> = 40)
第 7 天	处死 10 只小鼠 大体肺观察,右肺下叶行病理组织学观察,左肺液氮保存	处死 10 只小鼠	处死 10 只小鼠
第 14 天	处死 10 只小鼠 大体肺观察,右肺下叶行病理组织学观察,左肺液氮保存	处死 10 只小鼠	处死 10 只小鼠
第 28 天	处死剩余 10 只小鼠 大体肺观察,右肺下叶行病理组织学观察,右肺上叶测定羟脯氨酸含量,左肺液氮保存	处死剩余 8 只小鼠	处死剩余 9 只小鼠

至第 28 天模型组小鼠共死亡 12 只,干预组小鼠死亡 11 只

表 2 Szapiel 肺纤维化评分标准

分级	肺组织受累面积(%)	积分
无纤维化(-)	0	0
轻度纤维化(+)	<20	1
中度纤维化(++)	20~50	2
重度纤维化(+++)	>50	3

3. 统计学方法:利用 SPSS 18.0 软件进行统计,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,符合正态分布者采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠一般情况:对照组小鼠精神佳,体格健壮,毛发有光泽,善活动,在 28 天内均无死亡;模型组及干预组小鼠均表现精神萎,瘦弱,毛发暗无光泽,活动少。模型组小鼠从第 8 天开始陆续出现死亡,至第 28 天共死亡 12 只;干预组小鼠从第 10 天开始出现死亡,共死亡 11 只。

2. 肺组织大体观察:对照组小鼠两肺呈粉红色,表面光滑,质地柔软有弹性。模型组小鼠第 14 天时两肺呈暗红色,表面凹凸不平,弹性差,第 28 天时两肺苍白,表面见灰白色小结节及散在出血点,体积缩小,弹性差,质硬。干预组小鼠两肺第 14 天与对照组无明显区别,第 28 天时两肺表面亦见灰白色小结节,但少于模型组,两肺有一定弹性,体积较对照组略有缩小,但程度轻于模型组。

3. 肺组织病理学观察:造模第 7、14、28 天处死各

组一定数量小鼠,制作肺组织病理切片并行 HE 染色。拍摄各时期各组小鼠肺组织病理照片,如图 1 所示。对照组小鼠的肺组织结构清晰,组织未见炎细胞浸润,肺泡壁完整、无增宽,无肺泡萎陷,未见血管壁增厚等现象,支气管腔和肺泡腔内均未见有炎性渗出物(图 1A~G)。模型组小鼠肺组织在第 14 天表现为小灶状或大片状炎性细胞浸润(图 1E),干预组则有少量肺泡出现间隔增厚,成纤维细胞、毛细血管增生等现象(图 1F)。第 28 天,模型组表现为广泛的肺纤维化,其间见大量炎症细胞浸润,多处肺泡结构消失(图 1H);而干预组可见肺泡间隔增厚,病灶内肺泡萎陷,也可见肺组织被一些成纤维细胞和上皮细胞占据,间质中可见一些胶原纤维(图 1I),纤维化程度轻于模型组。对处死小鼠进行肺组织纤维化评分结果如表 3 所示。在造模第 7 和 14 天,模型组与干预组比较均无统计学差异($P > 0.05$);第 28 天干预组纤维化评分低于模型组($P < 0.05$),说明在第 28 天干预组小鼠的肺纤维化程度轻于模型组。

4. 肺组织羟脯氨酸含量:造模第 28 天除进行病理检查外,对处死小鼠的右上肺组织检测羟脯氨酸含量,结果如表 4 所示。应用单因素方差分析,第 28 天干预组及模型组羟脯氨酸含量均高于对照组(0.538 ± 0.008 vs 0.442 ± 0.004 , $P < 0.05$; 0.640 ± 0.069 vs 0.442 ± 0.004 , $P < 0.05$),干预组小鼠肺组织羟脯氨酸含量低于模型组(0.538 ± 0.008 vs $0.640 \pm$

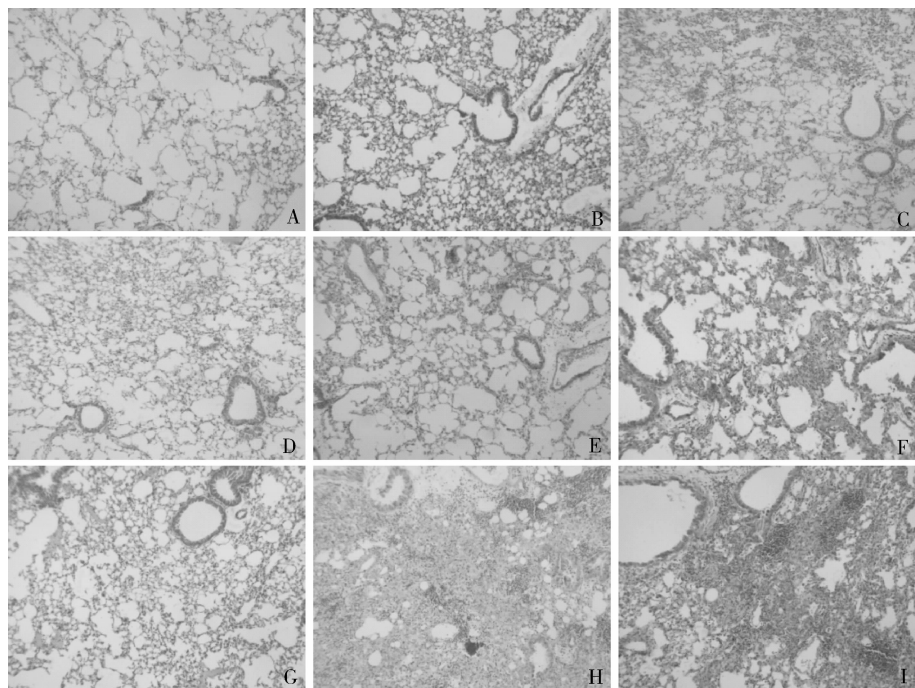


图1 第7、14、28天各组小鼠肺组织病理照片(HE染色,×100)
A. 对照组第7天;B. 模型组第7天;C. 干预组第7天;D. 对照组第14天;E. 模型组第14天;F. 干预组第14天;
G. 对照组第28天;H. 模型组第28天;I. 干预组第28天

表3 小鼠肺组织病理纤维化评分

分组	第7天	第14天	第28天
模型组	1.70±0.48(n=10)	2.60±0.52(n=10)	2.82±0.39(n=8)
干预组	1.50±0.53(n=10)	2.40±0.52(n=10)	2.44±0.52(n=9)*
对照组	0(n=10)	0(n=10)	0(n=10)

与模型组相比,*P<0.05

表4 第28天各组小鼠肺组织羟脯氨酸含量($\bar{x}\pm s$,mg/g)

分组	小鼠数量	羟脯氨酸含量(mg/g)
对照组	10	0.442±0.004
干预组	9	0.538±0.008*
模型组	8	0.640±0.069#

与模型组相比,*P<0.05;与对照组相比,#P<0.05

0.069, $P<0.05$)。因羟脯氨酸含量随肺纤维化程度增加而增加,故得出干预组小鼠肺纤维化程度轻于模型组。

讨论

本实验观察了1,25-(OH)₂D₃对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型的干预作用,发现在造模第28天干预组小鼠肺组织纤维化评分及羟脯氨酸含量均低于模型组($P<0.05$)。因羟脯氨酸反映肺组织胶原含量,可在一定程度上反映肺纤维化程度,综合两项实验结果得出造模第28天干预组小鼠肺纤维化程

度轻于模型组小鼠,并推测1,25-(OH)₂D₃可能具有抑制小鼠肺纤维化的作用。研究证实,肺泡上皮的损伤不仅是肺纤维化的始动因子,而且损伤后的肺泡上皮通过上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)产生成纤维细胞或肌成纤维母细胞,参与纤维化的形成。在肺泡上皮持续损伤和异常修复过程中,局部肾素-血管紧张素(RAS)系统起着重要作用,尤其是血管紧张素Ⅱ(AngⅡ),它不仅能直接损伤肺泡上皮细胞还可通过诱导TGF-β₁的上调引起成纤维细胞的增殖、激活及EMT发生,参与IPF的形成^[7-9]。

1,25-(OH)₂D₃是维生素D₃的活性代谢物,通过与细胞核内的维生素D受体(VDR)结合调节相关基因而发挥作用。近年来研究发现,它不仅是机体无机盐及骨骼稳态的主要调节因子,还能抑制间质多能细胞的增殖,在细胞增殖、分化、免疫调节等方面均具有一定意义^[10,11]。已有研究证实在人类气管上皮细胞及气道平滑肌细胞中有VDR存在^[12,13]。研究发现1,25-(OH)₂D₃具有抗器官纤维化的作用,尤其在肾脏:1,25-(OH)₂D₃会明显减轻各种慢性肾病动物模型的纤维化病变^[1-4]。其机制与其抑制肾脏炎症、调节肾素-血管紧张素系统活性、抑制EMT、

诱导抗纤维化的细胞因子表达等相关^[1]。关于 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与肺脏的报道, Ramirez 等人发现, $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可通过抑制 $\text{TGF}-\beta_1$ 对肺脏成纤维细胞及上皮细胞的激活作用, 从而下调 RAS 系统活性^[14]。因此我们推测 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可能通过抑制肺脏局部 RAS 系统活性从而减轻肺纤维化, 这一点有待于从分子生物学角度深入研究。另一方面, 据报道, 在哺乳动物中存在一种与细胞的增殖、分化和形态有关的信号通路——Hedgehog (Hh) 信号通路, 是胚胎发育的重要信号途径。该通路在许多成熟组织均有表达, 与调节细胞的增殖和自我更新、炎症、肿瘤、器官纤维化等密切相关。研究发现, 外源性给予维生素 D_3 可明显抑制此信号通路下游分子 $\text{Gli}-1$ 的活化。此外 Bikle 报道, VDR 敲除小鼠皮肤的 Hh 信号通路组成分子 (Shh、Ptc、Smo、Gli1) 表达上调。由此我们推测 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 抗纤维化的机制还可能与抑制 Hh 信号通路有关。

综上所述, 我们认为 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可能一方面通过抑制肺脏局部 RAS 系统活性, 另一方面抑制 Hh 信号通路从而抑制肺纤维化。对其作用机制的深入研究有望为 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 在治疗激素不良反应 (骨质疏松) 同时用于抗纤维化的治疗提供理论依据。

参考文献

- 1 Park JW, Bae EH, Kim IJ, *et al.* Renoprotective effects of paricalcitol on gentamicin - induced kidney injury in rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(2):301 - 313
- 2 Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, *et al.* $1,25$ - Dihydroxyvitamin D_3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotaly nephrectomized rat [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286(3):526 - 533
- 3 Schwarz U, Amann K, Orth SR, *et al.* Effect of $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 on glomerulosclerosis in subtotaly nephrectomized rats [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(6):1696 - 1705

- 4 Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(12):3382 - 3393
- 5 陶章, 李惠萍. 不同剂量博来霉素致小鼠肺纤维化模型的比较 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(7):1214 - 1218
- 6 Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, *et al.* Bleomycin - induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*. 1979, 120(4):893 - 899
- 7 Thierry JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial - mesenchymal transitions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2):131 - 142
- 8 Wang R, Zagariya A, Ibarra - Sunga O, *et al.* Angiotensin II induces apoptosis in human and rat alveolar epithelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(5):885 - 889
- 9 Uhal BD, Kim JK, Li X, *et al.* Angiotensin - $\text{TGF}-\beta$ 1 crosstalk in human idiopathic pulmonary fibrosis: autocrine mechanisms in myofibroblasts and macrophages [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(12):1247 - 1256
- 10 Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, *et al.* $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 119(1 - 2):73 - 83
- 11 Yang L, Wang J, Fan Y, *et al.* Effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on rat peritoneal mesothelial cells treated with high glucose plus lipopolysaccharide [J]. *Cell Immunol*, 2011, 271(1):173 - 179
- 12 Menezes RJ, Cheney RT, Husain A, *et al.* Vitamin D receptor expression in normal, premalignant, and malignant human lung tissue [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(5):1104 - 1110
- 13 Bosse Y, Maghni K, Hudson TJ, *et al.* $1\alpha,25$ - Dihydroxy - vitamin D_3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 29(2):161 - 168
- 14 Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T. Vitamin D inhibition of pro - fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2010, 118(3):142 - 150

(收稿:2012 - 05 - 07)

(修回:2012 - 06 - 05)

彩色多普勒超声诊断脐尿管癌的价值

朱雪莲 潘 媚 陈顺平

摘 要 目的 探讨脐尿管癌的二维及彩色多普勒超声特点。**方法** 对 14 例脐尿管癌肿块的二维及彩色多普勒血流显像

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院超声科 (朱雪莲、陈顺平);325024 温州龙湾永中社区卫生服务中心 (潘媚)

通讯作者:朱雪莲, 电子信箱:932928792@qq.com