

· 论著 ·

 α -平滑肌肌动蛋白在高氧肺损伤中的表达变化及意义

符跃强 刘成军 李静 胡兰 卢仲毅 许峰

【摘要】 目的 探讨高氧暴露下大鼠肺损伤中肌成纤维细胞表面标志 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达变化及意义。**方法** 将 64 只 3 周龄 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组(置于空气中,吸入氧浓度 0.21)和高氧暴露组(置于玻璃氧舱中,95%氧),每组于高氧暴露 1、7、14、21 d 随机处死 8 只大鼠。苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理改变,免疫组化法观察 α -SMA 在肺组织中的表达与分布,蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 α -SMA 表达。**结果** HE 染色发现,早期高氧肺损伤时肺组织以炎症水肿表现为主,后期则以间质纤维增生为主。免疫组化结果显示,正常对照组 α -SMA 在细支气管上皮、肺泡表面及肺泡间隔上表达极为微弱;高氧暴露后随着时间的延长 α -SMA 在肺泡表面及肺泡间隔上表达逐渐增强,以 21 d 时最为明显。Western blotting 检测发现,与正常对照组相比,高氧暴露 1 d、7 d 时肺组织 α -SMA 表达无明显差异(1.02 ± 0.12 比 1.00 ± 0.13 , 1.05 ± 0.14 比 0.99 ± 0.12 , 均 $P > 0.05$),高氧暴露 14 d、21 d 时 α -SMA 表达明显增强(1.27 ± 0.21 比 1.05 ± 0.15 , 2.26 ± 0.28 比 1.05 ± 0.14 , $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。**结论** 大鼠高氧暴露后随时间延长, α -SMA 在肺组织中的表达逐渐升高,肺纤维化逐渐加重,说明肌成纤维细胞在肺组织纤维化重构过程中起重要作用。

【关键词】 高氧; 肺组织; α -平滑肌肌动蛋白; 肌成纤维细胞

The expression of α -smooth muscle actin during the lung injury induced by hyperoxia FU Yue-qiang, LIU Cheng-jun, LI Jing, HU Lan, LU Zhong-yi, XU Feng. Department of Critical Care Medicine, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
Corresponding author: XU Feng, Email: xufeng9899@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) during the lung injury induced by hyperoxia in infantile rats. **Methods** Sixty-four male Sprague-Dawley (SD) rats about 3 weeks were randomly assigned into normal control group which exposed to room air [fraction of inspired oxygen (FiO_2) was 0.21] and hyperoxia exposure group (95% O_2) according to random digits table. Eight rats in each group were randomly sacrificed at day 1, 7, 14 and 21. Pulmonary tissue remodeling was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Immunohistochemistry method was performed to evaluate the expression of α -SMA in pulmonary tissue, further Western blotting was also made to determine the expression of α -SMA. **Results** The early histopathologic changes after HE were inflammation and edema in pulmonary tissue, while the later changes were interstitial hyperplasia and fibroblast proliferation. The expression of α -SMA was very slight in bronchial epithelium, alveolar epithelium and alveolar interstitium in normal control group, but increased with the time of hyperoxia exposure prolonged and peaked at 21st day. Western blotting detected that the expression of α -SMA after hyperoxia exposure for 1 day and 7 days in hyperoxia exposure group presented no difference compared with normal control group (1.02 ± 0.12 vs. 1.00 ± 0.13 , 1.05 ± 0.14 vs. 0.99 ± 0.12 , both $P > 0.05$), but the expression of α -SMA after hyperoxia exposure for 14 days and 21 days was increased compared with normal control group (1.27 ± 0.21 vs. 1.05 ± 0.15 , 2.26 ± 0.28 vs. 1.05 ± 0.14 , $P < 0.05$ and $P < 0.01$). **Conclusions** Pulmonary fibrosis remodeling was caused by hyperoxia exposure. The expression of α -SMA in pulmonary tissue in hyperoxia exposure groups obviously increased, and could play an important role in pulmonary fibrosis remodeling.

【Key words】 Hyperoxia; Pulmonary; α -smooth muscle actin; Myofibroblast

高氧机械通气是临床上治疗呼吸系统危重病最有效的方法之一,由于肺是内脏器官中最先接触氧的器官,且肺内氧张力明显高于其他器官,故高氧暴露可引起氧化应激性肺损伤,并最终导致肺组织纤维化^[1-3]。高氧可引起肺泡上皮细胞的损伤及

凋亡^[4],如果内源性肺泡上皮损伤不能自主恢复,而是由成纤维细胞替代,将导致肺泡上皮细胞和成纤维细胞间的比例失衡,发生肺组织纤维化。

肌成纤维细胞可由成纤维细胞转化而来,能分泌多种胶原纤维,在病理条件下肌成纤维细胞堆积可导致肝、肾和肺等器官的纤维化^[5-7]。有研究表明高氧可引起未成年大鼠肺部炎症损伤,炎症细胞因子的高峰均出现在高氧暴露 24 h^[8],但在高氧肺损

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.10.012

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370618)

作者单位:400014 重庆医科大学附属儿童医院重症医学科

通信作者:许峰, Email: xufeng9899@yahoo.com.cn

伤中,肌成纤维细胞在肺组织中的表达、分布及时空变化目前尚不清楚。本研究旨在观察高氧对 SD 大鼠肺组织肌成纤维细胞表面标志 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达和分布的影响,初步探讨肌成纤维细胞对高氧所致肺组织结构重建中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: α -SMA 兔多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(上海康成生物工程有限公司)。即用型链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化检测试剂盒(深圳晶美生物技术有限公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒(上海生工生物工程有限公司),化学发光(ECL)试剂盒(美国 Pierce 化学公司)。

1.2 动物分组及高氧模型制备:清洁级 3 周龄雄性 SD 大鼠 64 只,体重 40~50 g,重庆医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2007-0001。按随机数字表法等分为 2 组。高氧暴露组大鼠置于含 95% 氧的氧舱中;正常对照组大鼠置于空气中[吸入氧浓度(F_{iO_2})0.21]。2 组动物所处环境温度均保持在 21~25 $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%,每日打开氧舱 10 min,清洁氧舱,更换水及饲料。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 标本采集: 每组分别于实验 1、7、14 及 21 d 时随机选取 8 只大鼠,水合氯醛腹腔注射麻醉动物,开胸取全肺,右肺中叶经 40 g/L 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,5 μm 切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理变化,并行免疫组化检测;左下肺置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,进行蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。

1.3.2 免疫组化检测 α -SMA 表达: 采用 SABC 法,首先将肺组织切片脱蜡至水, H_2O_2 孵育,热修复抗原,正常山羊血清封闭,顺序滴加 α -SMA 多克隆抗体(1:100)、生物素标记的羊抗兔 IgG、SABC 复合物孵育,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素轻度复染,脱水、透明,封片。结果判断:胞核和(或)胞质呈棕黄色颗粒为阳性细胞。

1.3.3 Western blotting 法检测 α -SMA 蛋白含量: 取冻存肺组织,加入改良放射免疫沉淀测定(RIPA)缓冲液进行匀浆,离心后取上清液,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。BCA 比色法测定标本蛋白质浓度,用 Quantity one

ChemIDocXRS 图像采集系统及软件对蛋白条带进行分析。将正常对照组 1 d 时蛋白/内参的值设定为 1,以各蛋白/内参的值为参照得到的相对值进行统计学分析。

1.4 统计学分析: 应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧肺损伤大体及病理改变

2.1.1 大体观察: 正常对照组肺呈粉红色,表面光滑,弹性良好。高氧暴露组 1 d 肺表面见少许出血点;7 d 肺呈暗红色,体积明显增大,表面有多处斑片状出血;14 d 肺呈灰白色,体积略回缩,表面见结节状改变及陈旧性出血点;21 d 肺呈苍白色,体积缩小,表面凹凸不平,弹性不佳,质地稍硬。

2.1.2 光镜观察: 与正常对照组比较,高氧暴露 7 d 肺泡上皮细胞肿胀,肺泡壁增厚,可见 2~3 层细胞,肺泡腔内可见大量渗出液,间质充血、水肿明显;14 d 肺内炎性渗出减少,水肿减轻,间质明显增厚,成纤维细胞增生明显,表现为肺泡融合、数目减少,肺组织结构紊乱;21 d 成纤维细胞增生进一步明显,肺组织间质明显增厚,表现为肺泡融合、数目减少,肺组织结构紊乱。

2.2 免疫组化检测肺组织 α -SMA 的表达及分布(图 1): 正常对照组中除在较大支气管壁和血管壁的平滑肌细胞的胞质可见 α -SMA 表达外,在细支气管上皮、肺泡表面、肺泡间隔上表达极为微弱。高氧暴露组 1 d 时 α -SMA 表达无明显变化;7 d 时 α -SMA 在肺泡间隔、肺泡表面及成纤维细胞中表达较正常对照组略有增加;14 d 时 α -SMA 在肺泡间隔、肺泡表面及成纤维细胞的表达增强;21 d 时在肺泡间隔、肺泡表面特别是成纤维细胞上呈强阳性表达。肺组织发生纤维化时,成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,作为肌成纤维细胞表型标志之一的 α -SMA 可在肺组织中出现明显而广泛的表达。

2.3 Western blotting 检测肺组织 α -SMA 蛋白表达(图 2~3;表 1): 随高氧暴露时间延长,肺组织 α -SMA 表达逐渐增加,14 d、21 d 时 α -SMA 表达较 1 d、7 d 明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而正常对照组 α -SMA 表达无明显变化。高氧暴露 1 d、7 d 时肺组织 α -SMA 表达与正常对照组无明显差异;14 d、21 d 时肺组织 α -SMA 表达较正常对照组明显升高,尤以 21 d 更显著($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。

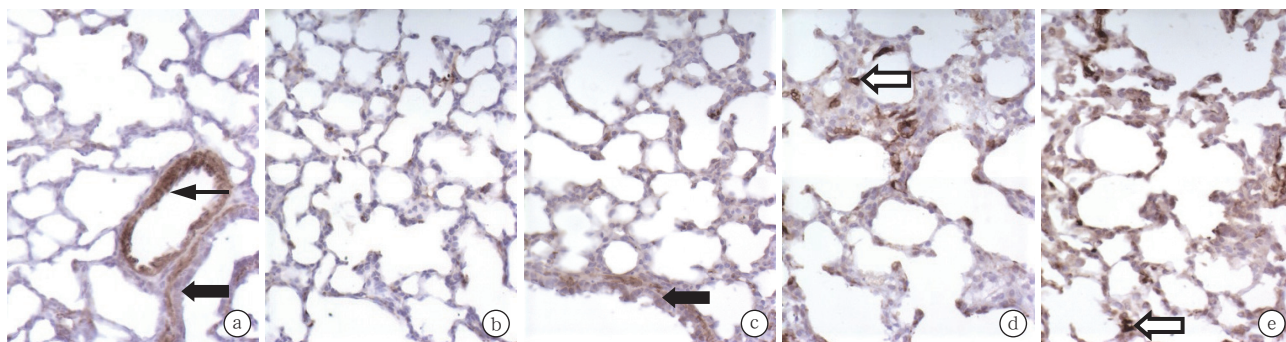
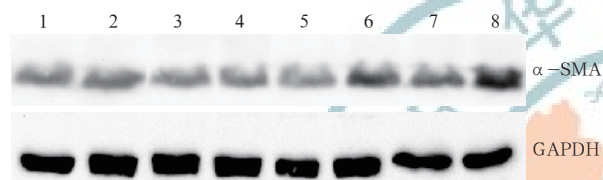
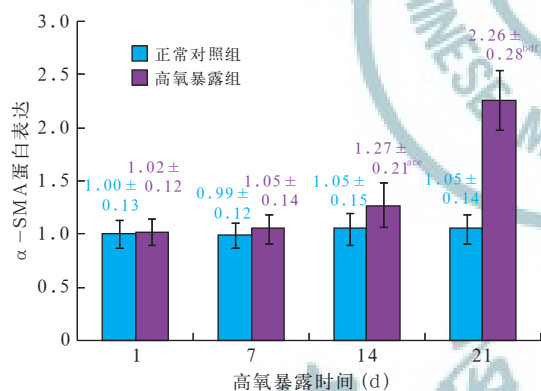


图1 光镜下观察各组大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)在肺组织中的表达 正常对照组(a) α -SMA 在肺泡间隔及肺泡表面表达微弱, α -SMA 的强表达见于血管平滑肌细胞及支气管平滑肌细胞;高氧暴露组 1 d 时(b) α -SMA 在肺泡表面及肺泡间隔的表达与正常对照组相比未见明显变化,7 d 时(c) α -SMA 在肺泡间隔及肺泡表面表达稍有增强,14 d 时(d) α -SMA 在肺泡间隔及肺泡表面表达明显增强,21 d 时(e) α -SMA 在肺泡间隔及肺泡表面的表达最强(←:血管平滑肌细胞,↙:支气管平滑肌细胞,↘:肌成纤维细胞) 免疫组化 高倍放大



α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶,1,3、5,7:正常对照组 1,7,14,21 d,2,4,6,8:高氧暴露组 1,7,14,21 d

图2 蛋白质免疫印迹法检测幼鼠肺组织 α -SMA 蛋白表达



注: α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;与本组 1 d 比较,^a $P < 0.05$,

^b $P < 0.01$;与本组 7 d 比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;

与正常对照组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

图3 高氧暴露对不同时间点大鼠肺组织 α -SMA 蛋白表达的影响

表1 高氧暴露对不同时间点大鼠肺组织 α -SMA 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA 蛋白表达			
	1 d	7 d	14 d	21 d
正常对照组	1.00 ± 0.13	0.99 ± 0.12	1.05 ± 0.15	1.05 ± 0.14
高氧暴露组	1.02 ± 0.12	1.05 ± 0.14	1.27 ± 0.21 ^{ace}	2.26 ± 0.28 ^{bdf}

注: α -SMA: α -平滑肌肌动蛋白;与本组 1 d 比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与本组 7 d 比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与正常对照组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$;各组不同时间点样本数为 8

3 讨论

肺泡上皮损伤及肺泡炎性水肿是高氧肺损伤早期的特征性改变,继之将出现成纤维细胞增生和细胞外基质(ECM)过度沉积,导致肺纤维化的发生。肌成纤维细胞具有成纤维细胞和平滑肌细胞的特征和功能。当成纤维细胞出现 α -SMA 时则分化为肌成纤维细胞。 α -SMA 是肌成纤维细胞特征性表面标志之一。肌成纤维细胞能通过分泌细胞因子、趋化因子、生长因子、ECM 和蛋白酶等物质,在炎症和组织的纤维化过程中起重要作用。各种病理性刺激因素在引起肺损伤的同时,也激活了肌成纤维细胞,后者能导致胶原沉积和纤维化发生。

博来霉素肺损伤模型是研究肺损伤和纤维化的常用模型,与对照组比较,博来霉素作用 1 周后,小鼠肺组织 α -SMA mRNA 表达明显增加,作用 3 周后肺组织 α -SMA 蛋白表达显著增加^[9]。百草枯导致大鼠肺纤维化的发展过程中,肺组织 α -SMA 蛋白表达进行性升高,提示肺成纤维细胞向肌成纤维细胞转化在百草枯致肺纤维化病理进展中起重要作用^[10]。从胎鼠肺组织中分离的成纤维细胞,在 21% O_2 或 95% O_2 条件下培养,通过检测细胞表面标志和细胞功能发现,成纤维细胞均可转化为肌成纤维细胞,但在 95% O_2 条件下这种转化更为剧烈,说明高氧暴露有助于成纤维细胞获得肌成纤维细胞的表型^[11]。Chang 等^[12]研究发现,对新生鼠进行高氧刺激 14 d 后肺组织 α -SMA 蛋白表达增加。另外,体外研究还发现,肌成纤维细胞可通过分泌 H_2O_2 损伤共培养体系中的肺泡上皮细胞,造成肺泡上皮细胞死亡,从而导致肺泡上皮的剥脱和上皮化的滞后^[13]。上述研究表明肌成纤维细胞对肺损伤和纤维化具有重要作用。

本研究中免疫组化结果显示,正常对照组大鼠肺泡上皮及间质中仅有少量 α -SMA 表达;随着高氧暴露时间延长, α -SMA 表达逐渐增多,高氧暴露 14 d 后,肺泡上皮和间质出现大面积强阳性 α -SMA 表达,高氧暴露 21 d 后 α -SMA 表达进一步加强;Western blotting 检测表明,与正常对照组相比,高氧暴露 14 d 时肺组织 α -SMA 表达明显升高,随高氧暴露时间延长, α -SMA 表达逐渐增强,21 d 时达峰值;病理形态观察表明,随高氧暴露时间延长,肺组织纤维化程度加重。以上结果提示,肌成纤维细胞参与了高氧所致肺纤维化过程。

除成纤维细胞可分化为肌成纤维细胞外,肺组织纤维化时肌成纤维细胞的来源可能还存在其他途径。如上皮间质转化(EMT),即上皮细胞在特定条件下向间质细胞的转化是胚胎发生及机体生理过程中存在的一类现象。在肾脏研究领域发现,炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)通过降低肾小管上皮细胞细胞角蛋白-18(CK-18)表达,上调 α -SMA 表达,促使肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞^[14]。同样在肺研究领域中发现,外源性转化生长因子- β (TGF- β)可诱导体外培养的大鼠肺泡上皮细胞和人支气管上皮细胞株 16HBE-14o 细胞表达 α -SMA,导致上皮细胞发生向肌成纤维细胞的转化^[15-16]。

综上,本研究结果显示,在高氧暴露下肺泡表面有 α -SMA 的阳性表达,提示高氧可能促使肺泡上皮细胞获得肌成纤维细胞的表型标志,当然也可能是由于肌成纤维细胞增殖移位至肺泡表面所致,其具体机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292: L537-549.
- [2] 潘丽,富建华,薛辛东. 结缔组织生长因子在高氧致早产鼠慢性肺疾病中的表达及其作用. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8: 417-420.
- [3] Kondrikov D, Caldwell RB, Dong Z, et al. Reactive oxygen species-dependent RhoA activation mediates collagen synthesis in hyperoxic lung fibrosis. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50: 1689-1698.
- [4] 付红敏,许峰,刘成军,等. 高氧对早产鼠肺泡 II 型上皮细胞的影响及降钙素基因相关肽的保护作用. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 578-581.
- [5] Scotton CJ, Chambers RC. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest*, 2007, 132: 1311-1321.
- [6] Samuel CS, Mookerjee I, Halls ML, et al. Investigations into the inhibitory effects of relaxin on renal myofibroblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1160: 294-299.
- [7] Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*, 2007, 170: 1807-1816.
- [8] 吴长毅,岳峰,李民,等. 高浓度氧对未成年大鼠肺部炎症反应的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 389-392.
- [9] Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, et al. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 2007, 117: 3800-3809.
- [10] 黄敏,齐小娟,张平,等. 结缔组织生长因子及 α 平滑肌肌动蛋白在百草枯致大鼠肺纤维化中的作用. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2010, 28: 729-734.
- [11] Rehan V, Torday J. Hyperoxia augments pulmonary lipofibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Cell Biochem Biophys*, 2003, 38: 239-250.
- [12] Chang YS, Oh W, Choi SJ, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*, 2009, 18: 869-886.
- [13] Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, et al. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J*, 2005, 19: 854-856.
- [14] 刘青娟,史永红,刘淑霞,等. 白细胞介素-1 β 在人肾小管上皮细胞转分化中的作用及 Janus 激酶 2 抑制剂 AG490 的影响. *中国危重病急救医学*, 2010, 22: 747-749.
- [15] Yao HW, Xie QM, Chen JQ, et al. TGF- β 1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci*, 2004, 76: 29-37.
- [16] Zhang M, Zhang Z, Pan HY, et al. TGF- β 1 induces human bronchial epithelial cell-to-mesenchymal transition in vitro. *Lung*, 2009, 187: 187-194.

(收稿日期:2012-08-22)

(本文编辑:李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞:Bene View T8 病人监护仪 (封二)
- ②天津红日药业:血必净注射液 (插页)
- ③珠海健帆:血液灌流器 (插页)
- ④德尔格:SmartCare™ 智能化自动脱机系统 (插页)
- ⑤天津生化制药:琥珀氢可 (插页)
- ⑥广东天普药业:天普洛安 (插页)
- ⑦南京臣功:特苏尼®托拉塞米注射液 (插页)
- ⑧北京谊安:VT5250 呼吸机 (插页)
- ⑨罗氏诊断产品(上海)有限公司:
血气分析仪 (插页)
- ⑩第一制药:克倍宁 (封三)
- ⑪江苏新晨:艾贝宁®盐酸右美托咪定注射液 (封四)