

IGF-1 与矽肺纤维化的关系

刘章现 吴逸明 孟爱民 李洪 许东 徐玉宝

摘要 目的 了解胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 与矽肺纤维化的关系。方法 用免疫组化 (SABC 法) 技术对大白兔染石英尘后 90 天、180 天兔肺组织 IGF-1 表达及矽结节数目进行研究。结果 染尘后 90 天、180 天兔肺组织 IGF-1 阳性表达率分别为 70% 和 100% ($P < 0.01$), 染尘后 90 天、180 天兔肺组织矽结节平均数分别为 198 ± 20 和 303 ± 11 ($P < 0.005$), 肺组织 IGF-1 阳性表达强度与肺纤维化程度存在明显相关 ($r = 0.6857$)。结论 IGF-1 可能在矽肺纤维化形成过程中发挥重要作用。

关键词 矽肺 肺纤维化 肺泡巨噬细胞 胰岛素样生长因子-1

Relationship between Insulin-like Growth Factor-1 and Silicotic Fibrosis Liu Zhangxian, Wu Yiming, Meng Aimin, et al. Pingdingshan School of Urban Construction and Environmental Protection. Pingdingshan, Henan 450052

Abstract **Objective** To understand the relationship between insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and silicotic fibrosis. **Methods** Expression of IGF-1 in the lung tissues was revealed with immunohistochemical technique in the rabbits 90 and 180 days after exposure to quartz dust, respectively, and number of silicotic nodules in the lungs was measured. **Results** Positive expression of IGF-1 accounted for 70% and 100% ($P < 0.01$) and number of silicotic nodules averaged 198 ± 20 and 303 ± 11 ($P < 0.005$) in the lung tissues of the rabbits 90 and 180 days after exposure to quartz dust, respectively. Positive expression of IGF-1 correlated significantly with the degree of silicotic fibrosis of the lungs ($r = 0.6875$). **Conclusion** IGF-1 could play an important role in the formation of silicotic fibrosis.

Key words Silicosis Fibrosis, Alveolar macrophage, Insulin-like growth factor 1

有证据表明, 肺泡巨噬细胞的生物合成及分泌功能失衡在肺间质纤维化的发病过程中起着关键性的作用^[1]。以前的研究表明, AM 主要通过分泌一些生物活性物质, 如 IL-1, IFN, TNF, PDGF 等来调节成纤维细胞 (FB) 的生长^[2]。近年来研究发现肺间质纤维化病人和染尘动物可分泌 IGF-1^[3,4]。本文在此研究基础上旨在通过对染尘不同时期家兔肺组织 IGF-1 表达水平的动态观察, 进一步探讨 IGF-1 在矽肺纤维化发生发展中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 家兔矽肺模型制备^[5]

雄性日本大耳白兔, 体重 2.0~3.0 kg, 购自河南医科大学实验动物中心, 石英粉尘 (颗粒直径 $\leq 5 \mu\text{m}$) 购自中国预防医学科学院劳卫所。粉尘经充分研磨水洗, 用生理盐水配成 120 mg/ml 的混悬液, 经高压灭菌后备用。采用氯胺酮、安定兔耳缘静脉联合麻醉后进行喉-气管插管, 按 120 mg/kg 的尘量一次大剂量气管注入染尘, 并轻揉胸部片刻, 使其均匀分

布到两侧肺泡内, 对照组动物只注入相同容积的生理盐水。

1.2 实验家兔分组及分批宰杀

实验家兔随机分为染尘组和对照组各 20 只, 分别于染尘后 3 月、6 月分批经氯胺酮、安定中度麻醉, 颈动脉放血处死, 无菌开胸, 取出肺脏, 每肺称重后用 10% 中性福尔马林溶液固定, 1 周后送病理科制作石蜡包块, 切片备用。

1.3 实验方法及结果判定

1.3.1 免疫组织化学染色 (SABC 法)

1.3.1.1 免疫组织化学试剂: 羊抗人多克隆抗体 IGF-1, Sigma 公司产品。免疫组化 SABC 试剂盒为美国 ZYMED 公司产品。上述产品均由武汉博士德生物技术公司提供。

1.3.1.2 免疫组织化学染色: 切片常规脱蜡至水, 用 3% 过氧化氢-甲醇溶液孵育 20 分钟, 1:50 稀释正常家兔血清, 阻断非特异反应 30 分钟, 最初滴入抗 IGF-1 抗体 (稀释度 1:1500) 4℃ 过夜, 然后再滴入兔抗羊多克隆抗体 (1:100 稀释) 37℃ 孵育 30 分钟, 最后滴入抗 SA-HRP (1:100 稀释) 37℃ 孵育 30 分钟, DAB-过氧化氢底物显色 10 分钟, 苏木素复染, 盐酸

作者单位: 467001 平顶山城建环保学校 (刘章现), 河南医科大学 (吴逸明、孟爱民、李洪、许东、徐玉宝)

酒精分化, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜检。

1.3.1.3 免疫组织化学染色结果判定: 阳性反应为黄色至棕黄色颗粒, IGF-1 多定位于肺间质巨噬细胞浆内, 且主要位于矽结节内。根据矽结节着色强度, 参照 Lou^[6] 方法, 矽结节染色同阴性对照片, 即为 IGF-1 阴性 (-); 矽结节染色呈淡黄色计为 IGF-1 弱阳性 (+); 黄色计 IGF-1 中等程度阳性表达 (++) , 棕黄色计 IGF-1 强阳性表达 (+++)。

1.3.2 病理检查及矽结节纤维化程度比较

常规石蜡切片, HE 染色, 按国内常用的实验性矽肺 4 级分类法^[7], 统计每只家兔全肺五叶矽结节总数和矽结节分级计数, 参照国家尘肺病理诊断标准判定。

1.4 统计学分析

各组肺纤维化程度 (即矽结节数) 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 等级资料作秩和检验。

2 结果

2.1 染尘不同阶段肺组织 IGF-1 表达水平比较

染尘后 3 月、6 月组宰杀家兔的 IGF-1 阳性表达率分别为 70% (7/10) 和 100% (10/10)。IGF-1 主要定位于肺间质巨噬细胞和矽结节内, 两组家兔 IGF-1 阳性表达强度的差异具高度显著意义 ($P < 0.01$), 提示随着染尘时间的延长, IGF-1 的分泌呈增加趋势。见表 1。

表 1 染尘不同阶段兔肺组织 IGF-1 的表达

组别	例数	IGF-1			
		-	+	++	+++
I	10	3	3	3	1
II	10	0	0	3	7
合计	20	3	3	6	8

I: 染尘 3 月组家兔, II: 染尘 6 月组家兔, $P < 0.01$ 。

2.2 染尘不同阶段肺组织纤维化程度比较

染尘后 3 月、6 月分别宰杀。每组每只家兔平均矽结节数分别为 198 ± 20 和 303 ± 11 , 且染尘 6 月组的矽肺组织大结节数量明显增加, 两组矽结节数量和矽结节分级计数经秩和检验, $P < 0.005$, 差异具高度显著性, 说明随着染尘时间的延长, 肺组织纤维化程度不断增加。见表 2。

表 2 染尘不同时间兔全肺矽结节及大小的比较

组别	例数	结节数	矽结节分级 (%)			
			I	II	III	IV
I	9	198 ± 20	93.9	3.2	1.6	1.6
II	10	303 ± 11	78.2	4.9	6.9	9.0

I: 染尘 3 月组家兔, II: 染尘 6 月组家兔, $P < 0.005$ 。

2.3 染尘家兔肺组织 IGF-1 表达水平与矽肺纤维化程度相关性分析

染尘 3 月组家兔肺组织 IGF-1 阳性表达强度与该组同一只兔肺矽结节总数的相关性检验, 相关系数 $r = 0.6857$ 。说明染尘家兔 IGF-1 表达水平与肺纤维化程度呈正相关关系, 即 IGF-1 可在一定程度上促使肺纤维化的发生。

2.4 本次研究的对照组家兔在饲养 3 月、6 月宰杀后肺组织 IGF-1 均无表达, 且肺组织无矽结节检出, 故不作统计分析。

3 讨论

在肺部, 肺泡巨噬细胞与成纤维细胞通过细胞因子网络, 来调节肺间质胶原纤维的生长平衡, 在正常情况下, 这种调节受到严格控制, 以利于确保肺间质的正常结构。肺泡巨噬细胞一旦受到粉尘、细菌等物质刺激激活后, 吞噬粉尘的尘细胞可产生一些生长因子类物质, 作用于肺间质成纤维细胞表面相应受体, 使成纤维细胞增殖, 进而发生纤维化, 形成矽结节。自 Heppelston^[8] 研究发现石英粉尘诱导的巨噬细胞可分泌成纤维细胞生长调节因子以来, 现已证明肺泡巨噬细胞在矽肺纤维化病变不同时期, 可分泌多种细胞因子, 文献报道, 在 BLM 致肺纤维化病变的研究中证实 IL-1, PDGF, TNF- α 出现时间早, 持续时间短^[9]。陈非对染尘大鼠支气管肺泡灌洗液 IGF-1 进行动态 RIA 定量分析发现, 随着动物染尘时间的延长, IGF-1 分泌逐渐升高^[10, 11]。本文研究表明, AM 受到石英粉尘激活后, 参与矽结节的形成, 随着染尘时间延长, 矽肺结节 IGF-1 着色强度加深, 说明 IGF-1 分泌增加。提示 IGF-1 在矽肺后期的纤维化产生及进行中可能发挥更重要的作用。

需要指出的是, IGF-1 只是肺泡巨噬细胞释放的众多的致纤维化因子的一种, 它在单独与其他致纤维化因子联合存在时, 对成纤维细胞的促增殖机制, 尚有待进一步探讨。

4 参考文献

- Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. Am J Physiol. 1990; 259: L159
- Bitterman P B, Rennaro S L, Hunninghake G W, et al. Human alveolar macrophage growth factor for fibroblasts. J Clin Invest. 1982; 70: 806
- Ron W N, Basse P, Fells G A, et al. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor-1 type molecule. J Clin Invest. 1988; 82: 1685
- Chen F, Deng H Y, Ding G F, et al. Excessive production of insulin-like growth factor-1 by silicotic rat alveolar macrophages. (下转 91 页)

FITC 标记的 MoAb-CD₃₄ 其余步骤同上。

1.5.2 流式细胞仪检测 激发光源为 15mW 氩离子激光, 波长 488nm, FITC 受激发后发出绿色荧光。检测荧光前以标准微球调整仪器, 使变异系数在 2% 以内, 每一样品用 FACS can 软件收集 1×10^4 个细胞, 荧光强度以对数放大, 光散射数据存软盘, 测试后用 lysysII 软件分析处理数据。

$$\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞}(\%) = \frac{\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞数}}{\text{CD}_{34}^{+} \text{细胞数} + \text{CD}_{34}^{-} \text{细胞数}} \times 100\% - \text{非特异结合细胞}\%$$

1.6 实验数据用 t 和相关检验作统计学处理。

2 结果

2.1 脐血、成人外周血和骨髓 CD₃₄⁺ 细胞含量比较

骨髓 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率显著高于脐血 ($P < 0.05$); 而脐血 CD₃₄⁺ 细胞百分率比成人外周血高 10 倍, 两者之间有极显著性差异 ($P < 0.001$); 骨髓 CD₃₄⁺ 细胞百分率为成人外周血的 16 倍, 二者之间有极显著性差异 ($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 脐血、成人外周血和骨髓 MNC 中 CD₃₄⁺ 细胞百分率 ($\bar{x} \pm s$)

标本	标本数	CD ₃₄ ⁺ 细胞 (%)
骨髓	7	$3.19 \pm 1.05^{*}$
脐血	48	2.14 ± 1.23
成人外周血	48	$0.19 \pm 0.14^{**\Delta}$

与脐血相比 * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$; 与骨髓比较 $\Delta P < 0.001$ 。

2.2 新生儿性别、体重、胎龄及产妇年龄与脐血 CD₃₄⁺ 细胞含量关系

新生儿男性 CD₃₄⁺ 细胞百分率为 1.87 ± 0.79 , 女性为 2.51 ± 1.49 , 经 t 检验两者有极显著性差异 ($P < 0.001$), 女性高于男性。新生儿体重、胎龄、产妇年龄 (24 ~ 39 岁) 与 CD₃₄⁺ 细胞百分率间经相关检验均无相关性 ($P > 0.05$)。

2.3 脐血血象诸指标与脐血 CD₃₄⁺ 细胞含量关系

脐血 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率分别与脐血 Hb、RBC、Plt、WBC 总数、中性粒细胞绝对值及淋巴细胞绝对值作相关检验, 均无相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

HSC/HPC 绝大部分存在于 CD₃₄⁺ 细胞组分中, 而不表达 CD₃₄ 抗原的细胞几乎没有集落形成能力, CD₃₄⁺ 可作为早期 HSC/HPC 的标志^[1]。本文比较了脐带血、成人外周血和骨髓

CD₃₄⁺ 细胞含量。结果表明, MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率以骨髓最高, 其次是脐血, 成人外周血最低, 脐血 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率为成人外周血的 11 倍, 这与 Bender 等的研究结果非常一致。有关脐血中 CD₃₄⁺ HSC/HPC 数量各家报道不尽相同, 可能与各实验室检测方法、条件、样本量等差异有关, 但可以肯定脐血中含有丰富的 HSC/HPC, 其数量远远超过成人外周血。

虽然脐血的 MNC CD₃₄⁺ 细胞百分率低于骨髓, 但其 CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 亚群比例明显高于骨髓, 脐血 HSC/HPC 较骨髓和外周血增殖能力强, 其 CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 细胞在体外可形成大量的各系集落, CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ 细胞可在液体培养体系中维持长期的活跃造血, 并且对细胞因子的反应敏感, 说明脐血为干/祖细胞的良好来源^[1,4]。我们发现, 不同性别新生儿脐血中 CD₃₄⁺ 细胞数量存在极显著性差异, 女性明显高于男性。这种性别差异目前尚难以解释。脐血中 CD₃₄⁺ 细胞数量与足月新生儿体重、胎龄、产妇年龄及脐血血象诸指标之间均无相关性, 可能与胎儿发育至 34 周时大部分造血细胞已完成从肝脏到骨髓的主动转移有关。Clapp 等发现脐血 HPC 随胎龄不同而有不同的动态变化, HPC 随胎龄增加而递减, 直至 34 周, 才与足月儿相当^[5]。本文也显示 37 ~ 42 周间胎儿脐血 CD₃₄⁺ 细胞数量与胎龄增加无明显关系。

4 参考文献

- 1 裴雪涛, 王立生, 徐黎, 等. 脐带血造血干细胞的“质”和“量”研究. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 17: 146 ~ 150
- 2 Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, et al. Phenotypic analysis and characterization of CD₃₄⁺ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. Clin Immunopathol, 1994, 70: 10 ~ 18
- 3 Rao SG, Desai SS, Goud AP, et al. Umbilical cord blood as a source of CD₃₄ positive hematopoietic stem cells. Indian J Med Res, 1995, 101: 28 ~ 30
- 4 Hao QL, Shah AJ, Thiernann FT, et al. A functional comparison of CD₃₄⁺ CD₃₈⁻ cells in cord blood and bone marrow. Blood, 1995, 86: 3745 ~ 3753
- 5 Clapp DW, Baley JE, Gerson SL, et al. Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants. J Lab Clin Med, 1989, 113: 422 ~ 427

(收稿: 1998-10-05)

(上接 83 页) APMIS, 1994, 102 (8): 581

5 司徒锐. 实验性矽肺的亚细胞研究. 暨南大学学报, 1981, 1: 152

6 Lou H, Zhao Y, Delafontaine P, et al. Estrogen effects on insulin-like growth factor-I-induced cell proliferation and IGF-1 expression in native and allograft vessels. 1997, Aug 5, 96 (3): 927

7 Chung A, Nissely SP, Adams SD, et al. Asbestos fibers and pleural plaques in a general autopsy population. AM J Path, 1982, 109 (1): 88

8 Heppelston AG, Styles JA. Activity of a macrophage factor in collagen formation by silica. Nature, 1967, 214: 5219

9 陈佰义, 姜莉, 赵洪文, 等. 肺纤维化大鼠肺泡巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α 和血小板源生长因子的研究. 中华结核和呼吸杂志, 1996, 19 (4): 209

10 陈非, 邓鸿业, 丁桂凤, 等. 染矽尘大鼠肺泡巨噬细胞胰岛素样生长因子的研究. 中华劳动卫生职业病杂志, 1993, 11 (5): 257

11 Jagirdar J, Begin R, Dufresne A, et al. Transforming growth factor-beta in silicosis. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (4pt1): 1076

(收稿: 1998-11-30)