CD36功能肽段对小鼠实验性矽肺组织内Ⅰ、Ⅲ型胶原表达的影响

吕丽娜，王欣，陈莹，刘芳炜，陈杰*

（中国医科大学公共卫生学院，辽宁 沈阳 110001）

摘要：目的 观察 CD36功能肽段 YRVRYLAKENITQDPEDH（93-110）对小鼠实验性矽肺纤维化是否有阻抑作用。方法 将小鼠按体重随机分为 4组：生理盐水组、SiO_2模型组、CD36功能肽段组［YRVRYLAKENITQDPEDH（93-110）］、CD36对照肽段组［TVDGVYKVFNGKDNISKV（208-225）］。采用暴露式气管内注入法染尘，分别于 7、14、21 d处死动物，测定小鼠肺脏器系数和采用免疫组织化学染色法测定肺组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的表达。结果 在染尘后 14 d、21 d时，小鼠肺脏器系数和Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的表达明显低于SiO_2模型组和 CD36对照肽段组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。结论 CD36功能肽段（93-110）对小鼠实验性矽肺纤维化具有明显的抑制作用。

关键词：CD36；功能肽段；Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白；矽肺；二氧化硅

中图分类号：R135.2 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2009)03－0171－04

The effect of CD36 synthetic peptide on expression of collagen Ⅰ and Ⅲ of lung tissues in the experimental silica dust exposed mice

LV Li-na, WANG Xin, CHEN Ying, LIU Fang-wei, CHEN Jie*

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore whether CD36 synthetic peptide (93-110) had the inhibitory effect on experimental silicosis in mice or not. Methods Mice were divided randomly into four experimental groups: saline control, SiO_2 exposed group, CD36 (93-110) functional peptide treated group and CD36 (208-225) control peptide treated group. Mice were killed at 7, 14 and 21 days after instillation respectively determinate the lung coefficient, meanwhile the expressions of collagen Ⅰ and Ⅲ in lung tissues were measured by immunohistochemical technique. Results The results showed that there was obvious reduce of lung coefficient and collagen Ⅰ and Ⅲ expression could be seen in mice of CD36 synthetic peptide group ($P<0.05$) at 14 and 21 days after instillation. Quantitative image analysis showed that average of integrated optical density (OD) of collagen Ⅰ and Ⅲ in CD36 synthetic peptide group was lower significantly than SiO_2 group and CD36 control peptide group at 14 and 21 days after instillation ($P<0.05$). Conclusions The results suggest that CD36 functional peptide (93-110) has good inhibiting effect on pulmonary fibrosis in experimental silicosis mice.

Key words: CD36; Functional peptide; Collagen Ⅰ and Ⅲ; Silicosis; SiO_2

尘肺病是危害工人健康最严重的一种职业病，其发病机制十分复杂，目前尚无明确的治疗方案。在探索肺纤维化发病的分子机制过程中，转化生长因子-β1（transforming growth factor β1，TGFβ1）在肺纤维化的发生发展中起关键作用[1~5]。本研究探讨 CD36功能肽段（93-110）阻断 TGFβ1活化[5~8]，进而延缓或阻抑矽肺纤维化的发生发展，为体内阻抑矽肺纤维化及临床上的应用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

标准石英粉尘购自美国 Sigma公司（游离 SiO_2含量＞99%，1~5 μm的粒子不少于 80%）；CD36功能肽段 YRVRYLAKENITQDPEDH（93-110）和 CD36对照肽段 TVDGVYKVFNGKDNISKV（208-225）购自北京中科亚光生物科技有限公司（Beijing SciLight Biotechnology Ltd. Co.）；兔抗小鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原多克隆抗体购自美国 Santa Cruz公司，SP试剂盒和 DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司；其余一般化学试剂均为国产分析纯。

1.2 实验动物及分组

1.2.1 实验动物 健康雌性小鼠 80只，体重 18~25 g，由中国医科大学实验动物部提供。饲养于清洁级动物实验室中，温度 20~25 ℃，自由饮水摄食 1周。

收稿日期：2009－03－02

基金项目：国家自然科学基金资助项目（30500232），辽宁省自然科学基金项目（20072102），高等学校博士学科点专项科研基金资助项目（20060159006）

作者简介：吕丽娜（1983－），女，硕士研究生，研究方向：劳动卫生与环境卫生。

*：通讯作者，教授，博士生导师。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.2 动物分组及处理 将 80只小鼠随机分为 4组：生理盐水组、 SiO_2模型组、 CD36功能肽段组、 CD36对照肽段组。小鼠腹腔给予 2%戊巴比妥钠 40 mg/kg麻醉起效后采用暴露式气管内染尘法，气管内分别注入 0.1 ml生理盐水、 1 mg SiO_2/0.1 ml生理盐水、 1 mg SiO_2+0.4 mg CD36功能肽段 /0.1 ml生理盐水、 1 mg SiO_2+0.4 mg CD36对照肽段 /0.1 ml生理盐水。于染尘 7 d 14 d 21 d后分批处死动物，每组 6~7只。取左肺用 4%多聚甲醛固定，肺组织常规石蜡切片，免疫组织化学染色。

1.3 体重、肺湿重测定

每次处死动物前称量体重，处死后取出肺剪去主支气管称肺重，并计算肺脏器系数，肺脏器系数 =肺湿重 (g) /体重 (g) ×100%。

1.4 免疫组织化学染色

采用 SP法 (链霉菌抗生素蛋白 过氧化物酶法) 对肺组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原进行染色，染色方法按试剂盒说明书步骤进行。使用 BX60F/PM30-3型自动曝光纤维照相系统进行照相，并应用 MetaMorph/DP10/BX41型号图像分析系统 (UIC/OLYMPUS, US/JP) 对蛋白表达进行定量分析。在 10×40倍视野下，每个切片随机选取 5个视野，用平均积分光密度 (integrated OD average) 代表Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白的表达量。

1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0统计学软件进行实验数据处理及分析，采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较各组间的统计学差异，当差异有统计学意义时，用 SNK法进行组间比较， $P<0.05$具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肺脏器系数的变化

由表 1可知，染尘后 14 d 21 d时， SiO_2模型组和 CD36功能肽段组小鼠肺脏器系数明显高于生理盐水组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；CD36功能肽段组小鼠肺脏器系数明显低于 SiO_2模型组和 CD36对照肽段组，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠在不同时间点肺脏器系数 ($\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		21 d	
	n	肺脏器系数 (%)	n	肺脏器系数 (%)	n	肺脏器系数 (%)
生理盐水组	7	2.308 2±0.614 8	7	1.510 3±0.434 8	6	1.401 3±0.217 8
SiO_2模型组	7	2.718 1±0.313 5	7	2.708 5±0.918 5*#	6	2.314 4±0.693 1*#
CD36功能肽段组	7	2.365 6±0.669 8	7	1.809 9±0.475 5	6	1.686 5±0.311 1
CD36对照肽段组	7	2.568 8±0.477 8	7	2.593 1±0.518 6*#	6	2.413 5±0.592 1*#

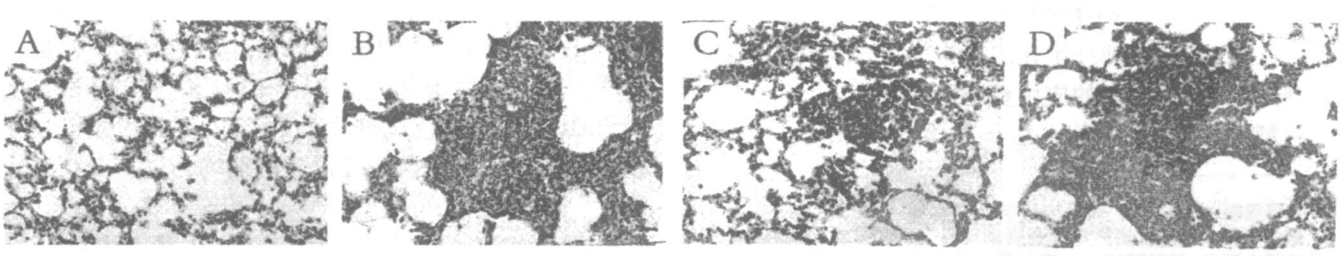
与生理盐水组比较，* $P<0.05$；与 CD36功能肽段组比较，# $P<0.05$

2.2 免疫组织化学结果

2.2.1 肺组织内胶原Ⅰ和胶原Ⅲ免疫组织化学结果

生理盐水组，Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白在小鼠肺组织内未见阳性反应。染尘后 14 d 21 d时， SiO_2模型组和 CD36对照肽段组小鼠肺组织中Ⅰ型、Ⅲ型胶原蛋白阳性反应增强，偶见有局灶性、斑片状的强阳性反应，形成的细胞性结节中可见阳性反应 (图 1. B, D; 图 2. B, D)；CD36功能肽段组小鼠肺组织内Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白大部分呈弱阳性表达，偶见局灶性的阳性反应 (图 1. C; 图 2. C)。

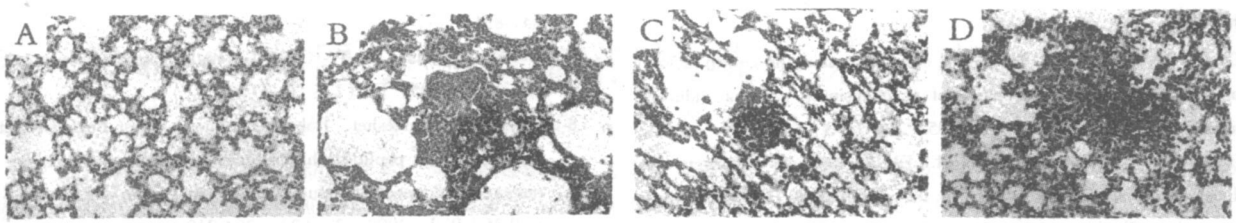
2.2.2 肺组织内胶原Ⅰ和胶原Ⅲ平均积分光密度值结果 由表 2可见，染尘后 14 d 21 d时， SiO_2模型组、 CD36功能肽段组及 CD36对照肽段组小鼠肺组织内Ⅰ型胶原平均积分光密度值均高于生理盐水组，且差异有统计学意义 ($P<0.05$)；CD36功能肽段组小鼠肺组织内Ⅰ型胶原平均积分光密度值均低于 SiO_2模型组、 CD36对照肽段组，且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。



生理盐水组 SiO_2模型组 CD36功能肽段组 CD36对照肽段组

图 1 各组小鼠染尘后 21 d时肺组织内胶原Ⅰ蛋白表达 (×400)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



生理盐水组 SiO_2模型组 CD36功能肽段组 CD36对照肽段组

图 2 各组小鼠染尘后 21 d时肺组织内胶原Ⅲ蛋白表达 (×400)

表 2 各组小鼠在不同时间点胶原Ⅰ平均积分光密度值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		21 d	
	n	平均积分光密度	n	平均积分光密度	n	平均积分光密度
生理盐水组	7	5.525 7±1.092 4	7	5.771 5±1.172 2	6	5.803 9±1.182 9
SiO_2模型组	7	7.106 8±1.005 3	7	18.064 1±1.860 3*#	6	27.474 5±2.727 3*#
CD36功能肽段组	7	6.330 2±0.843 0	7	13.458 1±2.106 7*	6	16.330 0±1.988 4*
CD36对照肽段组	7	6.789 4±1.208 2	7	19.227 6±1.077 1*#	6	28.023 8±2.611 8*#

与生理盐水组比较, * $P<0.05$; 与 CD36功能肽段组比较, # $P<0.05$

由表 3可见, 染尘后 14 d、21 d时, SiO_2模型组、CD36功能肽段组及 CD36对照肽段组小鼠肺组织内Ⅲ型胶原平均积分光密度值均高于生理盐水组, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$); CD36功能肽段组小鼠肺组织内Ⅲ型胶原平均积分光密度值均低于 SiO_2模型组、CD36对照肽段组, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 各组小鼠在不同时间点胶原Ⅲ平均积分光密度值 ($\bar{x}\pm s$)

组别	7 d		14 d		21 d	
	n	平均积分光密度	n	平均积分光密度	n	平均积分光密度
生理盐水组	7	4.857 2±1.097 1	7	5.879 9±1.168 9	6	6.035 0±1.194 5
SiO_2模型组	7	6.702 1±1.220 5	7	15.335 0±2.000 1*#	6	26.296 0±2.984 5*#
CD36功能肽段组	7	5.539 4±1.188 2	7	11.521 1±1.500 0*	6	16.099 6±1.472 9*
CD36对照肽段组	7	6.457 4±1.310 8	7	16.263 4±1.630 4*#	6	25.155 3±3.743 1*#

与生理盐水组比较, * $P<0.05$; 与 CD36功能肽段组比较, # $P<0.05$

3 讨论

矽肺是一种最严重的尘肺类型, 由于在生产过程中长期吸入游离二氧化硅含量较高的粉尘达一定量后所引起的以肺组织纤维化为主的全身性疾病, 以肺部广泛的结节性纤维化为主。矽肺的发生是一个由多种细胞因子启动和维持的胶原代谢调控失衡的结果[9], 其中转化生长因子 TGF-β1被认为与肺纤维化的发生和形成关系最为密切的介导因子, 是许多器官纤维化发生发展关键的下游介质。在肺部受到刺激时, 肺泡巨噬细胞就会产生大量的 TGF-β1, TGF-β1与肺成纤维细胞膜上 TGF-β1的受体结合, 激活细胞内蛋白信号传导途径, 激活核内转录蛋白, 启动胶原蛋白的 mRNA转录, 合成胶原蛋白, 同时抑制胶原蛋白的降解; 最终引起肺纤维化[5~8,11,12]。CD36为跨膜糖蛋白, 作为 TSP-1的受体参与 TGF-β1致纤维化的作用[6,7,10]。研究表明, 肺纤维化早期 TGF-β1以无活性的潜在 TGF-β1 (latent-TGF-β1, L-TGF-β1) 分泌, 其不能与 TGF-β1受体结合而无生物学活性。L-TGF-β1首先与血小板反应素-1 (thrombospondin-1, TSP-1) 结合成复合物, 再依靠 TSP-1第 447~452的氨基酸序列 CSVTCG与其在肺泡巨噬细胞表面的受体 CD36第 93~110氨基酸序列 YRVRFLAKENVTQDAEDN为主的结构域特异结合, 蛋白复合物发生构变, 在纤溶酶的作用下酶解, 使 TGF-β1与 LAP发生分离, 从而产生活化的 TGF-β1, 发挥致纤维化作用[5~8]。

本实验采用 1 mg SiO_2复制小鼠矽肺纤维化模型, 观察染尘后 7 d、14 d、21 d小鼠肺脏器系数和Ⅰ、Ⅲ型胶原的变化。结果发现 14 d、21 d CD36功能肽段组小鼠的脏器系数明显低于 SiO_2模型组和 CD36对照肽段组; 免疫组织化学分析结果显示, SiO_2模型组、CD36对照肽段组的小鼠肺组织中, Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达有随时间推移而逐渐增高的趋势, 明显高于 CD36功能肽段组。这些结果间接的可以说明游离 SiO_2粉尘已对小鼠肺脏产生了危害, 而通过给予 CD36功能肽段阻抑 TSP-1与其受体 CD36结合, 缓解了矽肺纤维化的发展, 说明 CD36功能肽段对于阻抑矽肺产生了一定的效用, 为肺纤维化疾病的预防、控制以及临床上的应用奠定了实验基础。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Chen C M, Chou H C, Hsu H H, et al. Transforming growth factor-beta1 up-regulation is independent of angiotensin in paraquat-induced lung fibrosis[J]. Toxicology, 2005, 216(2-3): 181-187.

[2] Li Y J, Azuma A, Usuki J, et al. EM703 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the inhibition of TGF-beta signaling in lung fibroblasts[J]. Respir Res, 2006, 7(1): 16.

[3] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 19(6): 579-585.

[4] Do T V, Kubba L A, Du H, et al. Transforming growth factor-{beta}1, transforming growth factor-{beta}2, and transforming growth factor-{beta}3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a smad3-dependent epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 695-705.

[5] Christian Hugo. The thrombospondin 1-TGF-b axis in fibrotic renal disease[J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18: 1241-1245.

[6] Yehualaeshet T, O'Connor R, Green-Johnson J, et al. Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36[J]. Am J Pathol, 1999, 155(3): 841-851.

[7] Ge Y, Elghetany M T. CD36: a multiligand molecule[J]. Lab Hematol, 2005, 11(1): 31-37.

[8] Teshome Yehualaeshet, Robert O'Connor, Asher Begleiter, et al. A CD36 synthetic peptide inhibits bleomycin-induced pulmonary inflammation and connective tissue synthesis in the rat[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23(2): 204-212.

[9] Warburton D, Bellusci S. The molecular genetics of lung morphogenesis and injury repair[J]. Paediatr Respir Rev, 2004, 5: 283-287.

[10] Chen Y, Wang X, Weng D, et al. A TSP-1 functional fragment inhibits activation of latent transforming growth factor-beta1 derived from rat alveolar macrophage after bleomycin treatment[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009, 61(1): 67-73.

[11] Chen Y, Wang X, Weng D, et al. A TSP-1 synthetic peptide inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in mice[J]. Exp Toxicol Pathol, 2009, 61(1): 59-65.

[12] Ide M, Ishii H, Mukae H, et al. High serum levels of thrombospondin-1 in patients with idiopathic interstitial pneumonia[J]. Respir Med, 2008, 102(11): 1625-1630.

应用前臂皮神经营养血管皮瓣治疗手部氢氟酸烧伤的体会

王曦, 程云飞, 戴滨, 王中伟, 刘晓辉

(沈阳市第五人民医院手外科, 辽宁 沈阳 110023)

2006年至 2008年我科收治了 10例手部被氢氟酸烧伤患者, 我们应用前臂皮神经营养血管皮瓣进行手术治疗, 效果满意, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 10例, 男 8例、女 2例。年龄 20~46岁, 平均 33岁。受伤原因, 均为工作中不慎被氢氟酸烧伤。其中玻璃切割工 5例, 化工技师 3例, 石蜡检验师 2例。烧伤部位为手掌 5例, 手背 5例。其中 7例肌腱外露, 3例骨外露。皮肤缺损最大面积 10.0 cm×6.0 cm, 最小 5.0 cm×3.0 cm。

1.2 手术方法

首先大量流水冲洗创面, 用 10%葡萄糖酸钙浸泡创面, 彻底切除坏死组织, 创面用银锌霜覆盖, 经过 7~10 d创面换药, 至创面新鲜后手术治疗。术中根据受区皮肤缺损面积大小设计适当皮瓣进行修复, 手背应用前臂外侧皮神经营养血管皮瓣修复, 手掌应用前臂内侧皮神经营养血管皮瓣修复。

1.2.1 前臂外侧皮神经营养血管皮瓣 在臂丛神经阻滞麻醉下进行, 皮瓣轴心线位于前臂中立位, 桡骨茎突与肘横纹中心连线上, 旋转点在桡骨茎突近端 3~5 cm。皮瓣设计在前臂上 1、3处, 保留蒂宽约 3.0 cm, 皮瓣宽度不超过 8.0 cm, 切开皮瓣近端, 在切口内找到头静脉和前臂外侧皮神经, 结扎头静脉, 在深筋膜下肌膜表面逆行切取皮瓣, 于皮神经两侧保留 1~3 cm蒂部, 将皮瓣掀起前用 0号线将皮肤和深筋膜层固定缝合 3针, 蒂部设计一个倒三角形皮瓣, 以利于皮瓣 180°旋转。通过明道旋转后和周围皮肤缝合。

1.2.2 前臂内侧皮神经营养血管皮瓣 除皮瓣轴心线位于前臂中立位, 尺骨茎突与肱二头肌与肱骨内髁中心连线上, 旋转点在豌豆骨近端 3~5 cm。在切口内找到贵要静脉和前臂内侧皮神经, 结扎贵要静脉外, 麻醉及手术同前臂外侧皮神经营养血管皮瓣方法。

2 结果

10例皮瓣全部成活, 1例皮瓣远端部分坏死, 后经换药 2周后痊愈。术后随诊 1至 2年, 皮瓣外形美观, 手功能恢复满意。

3 讨论

3.1 氢氟酸 (HF) 为一种强无机酸, 对生物组织具有强渗透性及强腐蚀性, 容易透过完整的皮肤和脂质屏障进入皮下深部组织, 甚至深达骨组织, 所以手部的氢氟酸烧伤必须早期及时处理, 否则后果严重, 甚至终身残疾。我们早期对伤口立即大量流动清水清洗创面和使用中和剂, 阻止氢氟酸对组织的进一步损害, 冲洗时间至少 5 min。本组 10例全部使用 10%葡萄糖酸钙, 使钙离子与氟离子结合成氟化钙, 减轻脂质溶解和皂化脂肪作用, 并减轻骨质脱钙, 进而减轻氢氟酸对手部的进一步损害。

3.2 手部氢氟酸烧伤致手掌、手背皮肤大面积缺损, 因创面有肌腱和骨外露, 需应用皮瓣移植修复创面。皮神经营养血管皮瓣 1992年由国外学者提出, 并经解剖学研究证实后应用于临床。近几年来应用广泛并取得较好效果, 是公认的治疗手部皮肤缺损的首选皮瓣。本组病例是采用此方法的又一佐证。

收稿日期: 2009-02-06 修回日期: 2009-04-15

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net