

TGF- β /Smad 与 Wnt/ β -catenin 在博来霉素致大鼠肺纤维化中的表达及相互作用

肖颖, 杨涛涛, 周卫民, 朱科燕, 寿旗扬, 蔡月琴, 陈方明, 陈民利

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察 TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 通路相关基因在肺纤维化大鼠模型肺组织中的表达, 探讨两条通路对肺纤维化的影响及其相互作用。方法 取 Wistar 大鼠 36 只, 随机分为正常对照组和肺纤维化模型组, 每组 18 只。采用气管内注入博来霉素 (BLM) 建立 Wistar 大鼠肺纤维化模型, 每组分别于第 14、21 和 28 天处死大鼠各 6 只; 取肺组织称重, 测定肺组织中 HYP、IL-1 β 水平, 观察肺组织 Col-I、IL-1 β 、TGF- β 1、Smad3、 α -SMA、Wnt1、 β -catenin、LEF-1 mRNA 的表达, 并进行 HE 染色和 Masson 胶原染色。结果 (1) 与正常对照组比, 造模后 14~28 d 大鼠肺指数均明显升高 ($P < 0.01$); 肺组织 HE 染色呈现明显的肺纤维化病理改变, Masson 染色结果可见造模后 14~28 d 肺间质蓝色胶原呈渐进性增加。(2) 造模后第 14 天, 肺组织 IL-1 β 含量、IL-1 β mRNA 相对含量均显著升高 ($P < 0.01$), 随后逐渐降低, 至造模后第 28 天 IL-1 β 表达量接近正常水平 ($P > 0.05$)。(3) 造模后 14~28 d 大鼠肺组织 HYP 含量、Col-I mRNA 相对表达量均明显升高 ($P < 0.01$)。(4) 与正常组相比, 模型组中 TGF β 1、Smad3、 α -SMA、Wnt1、 β -Catenin、LEF-1 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), 且 TGF β 1、Smad3 mRNA 分别与 Wnt1、LEF-1、 β -catenin mRNA 的表达呈显著正相关。结论 TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 通路相关基因在博来霉素致大鼠肺纤维化中表达上调, 两条通路对肺纤维化可能有促进作用且它们间可能存在一定联系。

【关键词】 博来霉素; 肺纤维化; TGF- β 1; β -catenin

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0063-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.014

Expression and interaction of TGF- β /Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathway-related genes in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats

XIAO Ying, YANG Tao-tao, ZHOU Wei-min, ZHU Ke-yan, SHOU Qi-yang, CAI Yue-qin, CHEN Fang-ming, CHEN Min-li
(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of TGF- β /Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathway-related genes in the lung tissue and explore the function and interaction of the two pathways in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. **Methods** Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into two groups, the control group ($n = 18$) and model group ($n = 18$). The rats were intratracheally injected with saline and bleomycin solutions, and killed on the 14th, 21st and 28th days after operation, respectively. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of HYP and IL-1 β in the lung tissues. Real-time PCR was used to detect the expression of IL-1 β , Col-I, TGF- β 1, Smad3, α -SMA, Wnt1, β -catenin, and LEF-1 mRNA in the lung tissues. Histopathological examination of the

【基金项目】“浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目”资助(编号:ZWR2008-43)。

【作者简介】肖颖(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理与比较医学。E-mail: zhulinfengsmile@163.com。

【通讯作者】陈民利(1963-),女,教授、硕士,研究方向:实验动物与比较医学,E-mail: cml991@aliyun.com。

lung tissues was done with hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. **Results** (1) Compared with the normal group, the lung indexes were significantly increased during the 14 to 28 days after bleomycin administration ($P < 0.01$). The pathological changes were in accordance with pulmonary fibrosis, and the blue collagens by Masson staining were gradually increased in the pulmonary interstitium at 14 to 28 days after model building. (2) Compared with the normal group, the IL-1 β content and the expression of IL-1 β were significantly increased on the 14th day after bleomycin administration ($P < 0.01$) and then declined gradually, and on the 28 day the expression of IL-1 β was near to the normal level ($P > 0.05$). (3) At 14 to 28 days after operation, the content of hydroxyproline and the expression of Col-I were increased successively, and were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). (4) Compared with the normal group, the expression of TGF- β 1, Smad3, α -SMA, Wnt 1, β -catenin, LEF-1 were significantly increased after operation ($P < 0.01$), and there was a significant positive correlation between them. **Conclusions** The expression of TGF- β /Smad and Wnt/ β -catenin pathway-related genes are increased in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. The two pathways may promote the process of fibrosis and there may be some relationship between them.

【Key words】 BLM; Pulmonary fibrosis; TGF- β 1; β -catenin; Rat

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性间质性肺部疾病,是以弥漫性肺炎、肺泡结构紊乱、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)大量沉积等为特征的组织病理学改变^[1]。肺纤维化发病过程主要分为两个阶段,前期炎症反应阶段和后期纤维化阶段^[2],并认为肺纤维化是由肺组织受损后修复调节失控、重建异常所引起的病变,是一系列细胞因子、生长因子通过多条细胞信号转导通路共同调控的结果^[3]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)被认为是最为关键的致纤维化因子之一,它主要通过 TGF- β /Smad 通路而在肺纤维化过程中发挥作用^[4]。博来霉素(bleomycin, BLM)致大鼠肺纤维化模型病理学改变与人类肺纤维化十分相似,是当今比较公认的致模方法^[5]。最近研究发现, Wnt/ β -catenin 通路的活化可促进纤维化疾病的发生^[6],且 TGF- β /Smad 通路和 Wnt/ β -catenin 通路间存在一定联系^[7],但目前关于 Wnt 通路在大鼠纤维化中的研究较少,同时 TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 两条途径的相关基因在 BLM 致大鼠肺纤维化模型中表达变化情况尚未见报道。因此,本文采用气管内注射博来霉素复制大鼠肺纤维化模型,观察造模后 14、21、28d 大鼠肺组织 TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 通路中相关基因的表达,探讨两条通路在博来霉素诱导大鼠肺纤维化过程中的作用及相互关系,为该模型在肺纤维化研究中的应用奠定基础。

1 实验材料

1.1 实验动物与饲养环境

SPF 级雄性 Wistar 大鼠,6~7 周龄,体重(200~220)g,36 只,来源于上海斯莱克实验动物有限公

司[SCXK(沪)2012-0002];饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障环境[SYXK(浙)2012-0001],饲养室温度:(20 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度:50%~60%,光照:12 h/12 h 明暗交替;每笼 3 只饲养,自由饮食;并在实验过程中按实验动物使用的“3R”原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

注射用盐酸博来霉素,日本化药株式会社;Masson 三色染色试剂盒,珠海贝索生物技术有限公司;羟脯氨酸(HYP)、TGF β 1、白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒,杭州诚维科技公司;总 RNA 提取裂解液(RNAiso plus)、RT-PCR 反转录试剂盒和荧光定量试剂均购于大连 Takara 公司;PCR 引物由上海生工生物公司合成。Nikon 生物倒置显微镜(日本 Nikon 公司)、连续光谱酶标仪(美国 Thermo 公司)、Nano-drop 微量核酸测定仪(美国 Thermo 公司)、PTC-200 定性 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)、IQ5 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物分组与模型制备

取体重(200~220)g 的雄性 Wistar 大鼠 36 只,适应性饲养 1 周后,随机分为正常对照组(control)和模型组(model),每组 18 只。参照 Szapie 等^[8]方法进行造模,模型组大鼠用 3% 戊巴比妥钠溶液 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,微创暴露气管,大鼠气管内注入博来霉素(5 mg/kg)水溶液 0.2 mL~0.3 mL,正常对照组麻醉后气管内注入等量生理盐水,注射完毕后立即将大鼠直立旋转 30 s,尽量使药液在肺内均匀分布,每组分别于造模后 14 d、21 d 和 28 d 取大鼠 6 只大鼠,称重后用 3% 戊巴比妥钠溶液 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,开胸取肺组织,用滤纸吸去表面血液和体液后称重,计算肺指数;并取一侧肺组

织置于 10% 中性甲醛中固定;另一侧肺组织分成一式 3 份保存于 -80℃,用于分子检测。

1.4 肺组织病理学观察

肺组织经 10% 中性甲醛固定后,按常规病理方法脱水、包埋、切片,进行 HE、Masson 染色,光学镜下观察肺组织病理学改变;参照 Szapie 等^[8]的方法用 Masson 染色评定肺组织纤维化程度。

1.5 肺组织中 HYP、IL-1β 含量测定

取冻存肺组织 300 mg,分别装入 EP 管,加入 PBS 液,冰水中用超声细胞粉碎机做组织匀浆,离心 15 min,取上清液,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定肺组织匀浆液 HYP 和 IL-1β 含量。

1.6 肺组织纤维化相关细胞因子 mRNA 表达

取冻存肺组织 50 mg ~ 80 mg,按 Trizol 试剂盒说明书操作,提取总 RNA 并逆转录成 cDNA。基因引物由上海生工生物公司设计并合成,引物序列见表 1。将 cDNA 用 RT-PCR 仪进行扩增,所有反应信息资料由 Bio-Rad iQ5 PCR 仪收集,CT 值通过计算机软件测定,转录水平通过公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算。

表 1 RT-PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of RT-PCR

基因名称 Gene names	引物序列 Sequence of primer	片段长度 Length of PCR fragment
GAPDH	F5'-GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAT G-3' R5'-ATG GTG GTG AAG ACG CCA GTA-3'	143 bp
Col- I	F5'-TCA CCA GAC GCA GAA GTC AT-3' R5'-ACC AGG AGG ACC AGG AAG TC-3'	132 bp
Wnt-1	F5'-ACA TCA AGG CAG GGA AGA AAT-3' R5'-TCT GGA CAC TGG AAA TCA ACA C-3'	181 bp
β-catenin	F5'-TGA GGA CAA GCC ACA GGA CTA-3' R5'-CCA GAG TGA AAA GAA CGG TAG C-3'	177 bp
LEF-1	F5'-GCA AGC CTA CCC ATC TTC AC-3' R5'-GTG CTC CTG TTT GAC CTG AG-3'	139 bp
TGF-β1	F5'-CTG CTG ACC CCC ACT GAT AC-3' R5'-CTG TAT TCC GTC TCC TTG GTT C-3'	90 bp
Smad3	F5'-TGG CTA CCT GAG TGA AGA TGG-3' R5'-AGT TAT TGT GTG CTG GGG ACA-3'	110 bp
IL-1β	F5'-AAA TGC CTC GTG CTG TCT G-3' R5'-TCG TTG CTT GTC TCT CCT TGT-3'	116 bp
α-SMA	F5'-TTC CTT CGT GAC TAC TGC TGA G-3' R5'-CAA TGA AAG ATG GCT GGA AGA G-3'	209 bp

1.7 统计学方法

所有数据用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,并用 SPSS 17.0 软件统计包处理,两两比较采用 *t* 检验,

相关性分析采用 Pearson *r* 分析, $P < 0.05$ 表示统计学有意义。

2 结果

2.1 肺组织大体观察

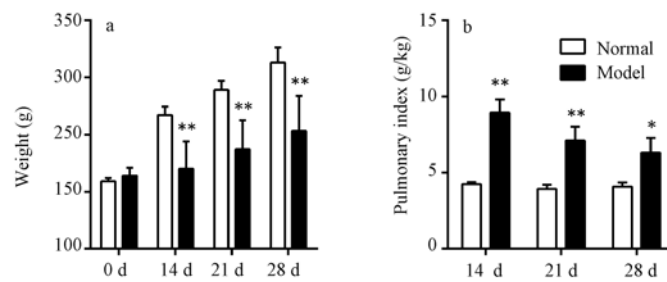
通过气管内注入 BLM 后,大鼠体型明显消瘦 ($P < 0.01$),体重增加缓慢,至造模后第 28 天大鼠体重与正常组相比仍存在显著差异 ($P < 0.01$) (图 1)。解剖观察发现正常组大鼠肺脏呈淡红色,表面光滑,弹性良好,未见出血点;造模后 14 d 肺组织呈黄白色,局部见大小不等结节样改变,双肺表面见出血点和瘀斑;造模后 21 d,肺组织呈灰白色,双肺表面出血点较 14 d 有所减少,出现有少许较浅凹沟;至造模后 28 d 肺组织体积缩小,质地变硬,颜色苍白,表面粗糙不平,可见小片状、条索状凹凸不平的苍白凹沟。图 1 结果显示,与正常对照组比,大鼠造模 14 d 后肺指数显著升高 ($P < 0.01$),造模后第 21 天和第 28 天肺指数虽有所下降,但仍显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。

2.2 肺组织病理学观察

HE 染色结果显示,正常对照组大鼠肺组织结构清晰,肺泡间隔未见增厚,无水肿、炎症及纤维化表现。模型组大鼠造模后第 14 天,肺泡腔和肺间质有炎性细胞浸润,肺泡间隔增厚,有纤维结缔组织增生,肺泡腔变窄,出现纤维化;造模后第 21 天,肺炎泡较 14d 时有所减轻,少量炎症细胞浸润,成纤维细胞大量增生,纤维组织呈条索样瘢痕改变;造模后第 28 天,肺组织仅有少量炎症细胞浸润,肺泡结构破坏、萎缩或消失,成纤维细胞大量增生,纤维组织呈斑片状分布 (图 2-a,图 2 见封底)。Masson 染色结果,正常对照组大鼠肺组织中未见蓝色胶原沉积,而造模后第 14 天有少量蓝色胶原沉积,随时间延长蓝色胶原呈进行性增多,至第 21、第 28 天肺间质出现大量的蓝色胶原沉积 (图 2-b,图 2 见封底)。

2.3 肺组织 IL-1β 含量和 IL-1β mRNA 的表达

由图 3 可见,与正常对照组比,模型组肺组织中 IL-1β 含量、IL-1β mRNA 相对表达量均在造模后第 14 天明显升高 ($P < 0.01$),此后均有所降低,至造模后第 28 天时 IL-1β 含量仍高于正常对照组 ($P < 0.05$),但 IL-1β mRNA 表达量已降为正常水平 ($P > 0.05$)。



注:与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

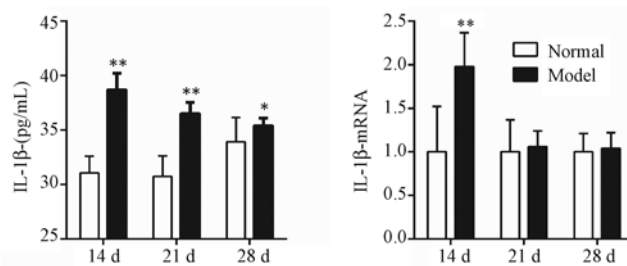
(a) 模型组大鼠体重增加缓慢,与正常组相比存在显著差异($P < 0.01$)。(b) 与正常组相比,大鼠造模 14 d 后肺指数显著升高($P < 0.01$),造模后第 21 天和第 28 天肺指数虽有所下降,但仍显著高于正常对照组($P < 0.01$)。

图 1 肺纤维化大鼠体重和肺指数的变化($n = 6$)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. normal control group.

(a) In the model groups, the body weight increased slowly and significantly different from that of the normal group ($P < 0.01$). (b) Compared with the normal group, the lung index was significantly increased on 14 days after bleomycin administration. The lung index was decreased 21 and 28 days after model building, but were still significantly higher than that in the control group.

Fig. 1 Changes of the body weight and pulmonary index of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rats



注:与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

模型组 IL-1 β 含量、IL-1 β mRNA 相对含量在造模后第 14 天升高($P < 0.01$),第 28 天时 IL-1 β 含量仍高于正常组($P < 0.05$),IL-1 β mRNA 表达量降为正常水平($P > 0.05$)。

图 3 大鼠肺组织 IL-1 β 含量和 IL-1 β mRNA 相对含量的比较($n = 6$)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. normal control group.

Compared with the normal groups, the content of IL-1 β and expression of IL-1 β mRNA are significantly increased after operation ($P < 0.01$), and then declined. On 28 days after model building the contents of IL-1 β remain higher than those in the normal groups, while the expression of IL-1 β mRNA is near the normal level ($P > 0.05$).

Fig. 3 Comparison of IL-1 β content and mRNA expression of IL-1 β in the lung tissue of rats

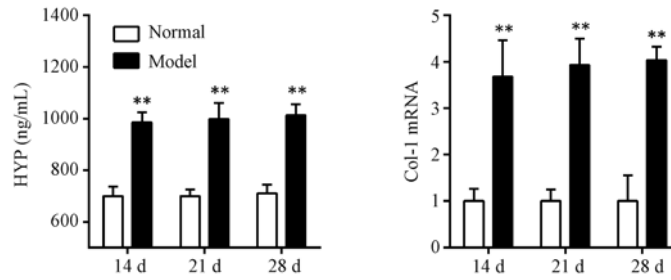
2.4 肺组织 HYP 含量、Col-I mRNA 表达

与正常对照组比,模型组肺组织中 HYP 含量、Col-I mRNA 表达水平均显著升高($P < 0.01$),且造模后第 14 天至第 28 天时肺组织中 HYP 含量、Col-I mRNA 相对表达量均呈持续性显著上升($P < 0.01$),见图 4。

2.5 TGF- β /smad 和 Wnt/ β -catenin 通路相关基因表达及其相关性分析

与正常对照组比,给予博莱霉素后第 14 天肺组织中 TGF β 1、Smad3、 α -SMA、Wnt1、 β -catenin、LEF-1 mRNA 相对表达量均显著升高($P < 0.01$),之后逐

渐下降,但均显著高于正常对照组($P < 0.01$),见图 5。肺组织中 TGF β 1 mRNA 表达与 Wnt1、 β -catenin、LEF-1 mRNA 表达呈显著正相关,相关系数分别为 0.650、0.730、0.747 ($P < 0.01$); Smad3 mRNA 与 Wnt1、 β -catenin、LEF-1 mRNA 表达趋势一致,其相关系数分别为 0.727、0.813、0.764 ($P < 0.01$);此外, α -SMA mRNA 表达与 TGF β 1、Smad3、Wnt1、 β -catenin 及 LEF-1 mRNA 表达呈显著性正相关,相关系数分别为 0.721、0.843、0.812、0.673、0.755 ($P < 0.01$),见图 5。



注:与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

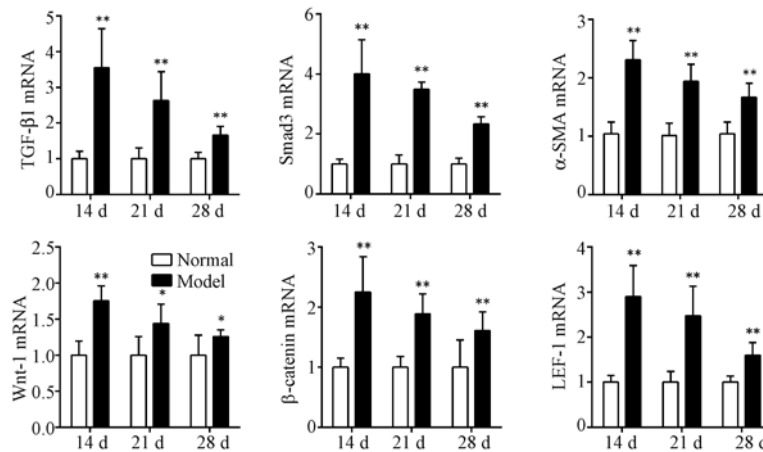
模型组 HYP 含量、Col-I mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$),造模后 14 ~ 28 d HYP 含量、Col-I mRNA 相对表达量均持续上升。

图 4 大鼠肺组织 HYP 含量、Col-I mRNA 相对含量的比较 ($n = 6$)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. normal control group.

Compared with the normal groups, the contents of HYP and Col-I mRNA are significantly increased after operation ($P < 0.01$), and continue to increase during 14 to 28 days after model building.

Fig. 4 Comparison of HYP, Col-I mRNA contents in the lung tissues of rats.



注:与正常对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

模型组 TGFβ1、Smad3、α-SMA、Wnt1、β-catenin、LEF-1 mRNA 相对含量显著升高 ($P < 0.01$),造模后 14 ~ 28 天逐渐下降,28 d 时仍显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。

图 5 大鼠肺组织 TGF-β1、Smad3、α-SMA、Wnt1、β-catenin、LEF-1 mRNA 表达情况比较 ($n = 6$)

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. normal control group.

Compared with the normal groups, the expression of TGF-β1, Smad3, α-SMA, Wnt1, β-catenin, LEF-1 are significantly increased after operation ($P < 0.01$), and then decline. On the 28 days after model building the level remains higher than that in the normal groups ($P < 0.01$)

Fig. 5 Comparison of the expression of TGF-β1, Smad3, α-SMA, Wnt1, β-catenin and LEF-1 in the lung tissue of rats.

3 讨论

肺纤维化是许多肺系慢性疾病后期的共同结局,其病理特点是早期肺泡炎和后期成纤维细胞大量增生及胶原进行性沉积并取代正常的肺组织结构^[1]。博莱霉素致大鼠肺纤维化模型病理学改变与人类肺纤维化极为相似^[5]。有文献报道^[2],大鼠气管内注入 BLM 后,纤维化疾病发展基本上可以分

为三个阶段,炎症反应阶段(造模后 3 ~ 7 d),间质细胞增生阶段(造模后 7 ~ 14 d)和弥漫性纤维化阶段(造模后 14 ~ 28 d)。本实验通过气管内注入博莱霉素建立大鼠肺纤维化模型,研究发现造模 14 d 后 IL-1β 含量和 mRNA 表达量均明显升高,随后逐渐降低,至造模后第 28 天时 IL-1β mRNA 相对表达量几乎接近正常水平。另外,HE 染色结果可见造模后 14 ~ 28 d 炎性细胞浸润明显减少,提示

BLM 诱导大鼠肺纤维化后期炎症反应逐渐减弱。胶原代谢处动态平衡对维持肺泡正常结构和功能有着十分关键的作用,肺纤维化的改变主要为胶原代谢失衡,其中 Col-I 型和 Col-III 型代谢失衡起主要作用,肺组织中 III 型胶原过度沉积能够逆转,而 I 型胶原的过度沉积将导致不可逆的肺纤维化^[9]。HYP 是机体胶原蛋白的主要成分之一,且为胶原蛋白所特有,其含量可作为胶原组织代谢的重要指标,常用于判断肺纤维化程度。本实验结果显示,造模后第 14 天至第 28 天期间肺组织中 HYP 含量和 Col-I mRNA 的表达量均显著升高,肺组织 Masson 染色结果亦发现造模后第 14 天胶原纤维明显增生,且胶原沉积随着时间的延长而呈进行性增加。由此可见,BLM 可诱导大鼠形成明显肺纤维化,并且 BLM 致大鼠纤维化后期是以肺间质纤维化为主,与文献报道相一致。

TGF- β 1 被公认为是纤维化形成与发展的启动枢纽,能促进成纤维细胞趋化,促使胶原合成和改变细胞外基质成分。Smads 蛋白是 TGF- β 下游信号转导和调节分子,磷酸化的 Smad2 和 Smad3 与 Smad4 形成 Co-Smads 入核调控靶基因转录,从而诱导纤维化改变^[10]。Wnt/ β -catenin 通路是调控细胞增殖、分化的重要途径, β -catenin 是 Wnt 通路中关键的信号转导分子,创伤等诱因激活 Wnt 蛋白表达分泌,使得 β -catenin 无法磷酸化,游离的 β -catenin 在细胞浆蓄积到一定量后,进入细胞核与 TCF/LEF 结合,从而激活靶基因转录^[11]。近来研究表明,Wnt/ β -catenin 通路的激活可导致肺纤维化形成^[12]。TGF- β /smad 与 Wnt/ β -catenin 通路在多个环节存在交互作用^[13]。在人类真皮成纤维细胞中,TGF- β 和 Wnt 信号转导通路可以共同调节胶原、基质金属蛋白酶等的表达,TGF- β 1 作用于皮肤成纤维细胞后,可诱发 β -catenin 表达升高^[14]。本研究结果显示,模型组中 TGF β 1、 β -catenin、Col-1 mRNA 相对含量均显著高于正常组,且造模第 14 ~ 28 天,TGF- β 1 与 β -Catenin mRNA 变化趋势一致,呈显著性正相关,说明 TGF β 1 可能通过激活 β -catenin 表达从而促进 BLM 致肺纤维化过程。此外,TGF β 1 可以通过 Smad3 和 Smad4 激活淋巴细胞增强因子(TCF/LEF)转录目的基因,而 TCF/LEF 是 Wnt 通路下游信号转导分子,它可以刺激基质金属蛋白酶和结缔组织大分子等的表达调节纤维化^[15]。本实验检测亦发现造模后第 14 天 TGF β 1、Smad3 和

LEF-1 mRNA 的表达量均明显升高,至 21 d 和 28 d 时其表达量有所降低且存在一定相关性,提示 TGF β 1 可能通过其下游信号分子 Smad3 实现对 Wnt 通路中 LEF 的表达上调而导致肺纤维化形成。近年来研究证实^[16],肌成纤维细胞与肺纤维化发生、发展密切相关,上皮间质转化(EMT)是肌成纤维细胞细胞来源的一个重要途径。另有文献表明^[17],TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 通路均可促使 EMT 发生。本实验结果发现,模型组中, α -SMA、TGF β 1、Smad3、Wnt1、 β -catenin 和 LEF-1 mRNA 表达都高于正常对照组,且它们变化情况均与 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)存在显著性正相关, α -SMA 的大量表达是肌成纤维细胞细胞分化的一个重要标志^[16],故我们推测 TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 途径可能通过共同促使 EMT 发生从而诱导肌成纤维细胞分化而达到致肺纤维化作用。

综上所述,在博来霉素诱导大鼠肺纤维化过程,TGF- β /Smad 和 Wnt/ β -catenin 通路中相关基因表达上调,说明这两条通路的活化可能导致纤维化发生,它们间也许存在一定的联系。TGF β 1 可能通过激活 β -catenin,进而使得成纤维细胞中胶原过度分泌,影响肺纤维化形成;同时 TGF β 1 也可能通过 Smads 蛋白调节 Wnt 通路下游信号分子 LEF 活性,进而上调基质金属蛋白酶和其它结缔组织大分子的表达促进纤维化进程;此外 TGF β 和 Wnt 通路还可能通过共同激活 EMT 发生导致肌成纤维细胞大量产生达到促肺纤维化作用。目前关于这两条通路在肺纤维化中作用及相互间关系的研究还处于初步阶段,其具体机制有待我们进一步确认及深入研究。

参考文献:

- [1] 孔勤,陈民利. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8):74-74.
- [2] 柴文成,李永春,刘玉玲,等. 博来霉素致肺纤维化大鼠形态学变化的实验研究 [J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(2):77-80.
- [3] Steele MP, Schwartz DA. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Ann Rev Med, 2013, 64:265-276.
- [4] 曹汐汐,许祖德. Smad 与肺纤维化 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(6):488-494.
- [5] 金晓光,代华平,庞宝森,等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织的动态病理变化及其发生机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(4):708-714.
- [6] 龚文颖,曾林祥. Wnt 信号通路纤维化疾病关系的研究进

- 展 [J]. 天津医药, 2013 (9):935-936.
- [7] Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis [J]. *Nature Commun*, 2012 March 13, 3:375.
- [8] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Resp Dis*, 1979, 120(4):893-899.
- [9] 刘涛, 宋良文. 肺纤维化发生的分子机制和早期防治研究进展 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27(4):312-316.
- [10] 靳慧斌, 李智伟. 转化生长因子- β /Smad 信号通路及其在肝纤维化中的作用研究进展 [J]. *山西医药杂志*, 2009, 38(1):37-40.
- [11] Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20:781-810.
- [12] Chilosi M, Poletti V, Zamò A, et al. Aberrant Wnt/ β -catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(5):1495-1502.
- [13] 饶翠, 林山力, 文欢, 等. 经典转化生长因子 β /Smad 信号和 Wnt/ β -catenin 信号间的相互作用. *浙江大学学报医学版*, 2013, 42(5):591-596.
- [14] Cook BD, Ferrari G, Pintucci G, et al. TGF- β 1 induces rearrangement of LK-1 VE-cadherin- β catenin complex at the adherens junction through VEGF mediated signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 105(6):1367-1373.
- [15] Labbé E, Letamendia A, Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor- β and wnt pathways [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 2000, 97(15):8358-8363.
- [16] 高建, 刘干, 李俊. 肺成纤维细胞在肺纤维化进程中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(9):1125-1128.
- [17] Attisano L, Labbe E. TGF β and Wnt pathway cross-talk [J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2004, 23(1-2):53-61.

[修回日期] 2013-12-12

(上接第 62 页)

- [13] Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans [J]. *Diabetes*, 2009, 58(7):1526-1531.
- [14] Lee KH, Ko BH, Paik JY, et al. Effects of anesthetic agents and fasting duration on FDG biodistribution and insulin levels in tumor-bearing mice [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(9):1531-1536.
- [15] Yeung HWD, Grewal RK, Gonen M, et al. Patterns of FDG uptake in adipose tissue and muscle; a potential source of false-positives for PET [J]. *J Nucl Med*, 2003, 44(11):1789-1796.
- [16] Woo SK, Lee TS, Kim KM, et al. Anesthesia condition for FDG imaging of lung metastasis tumors using small animal PET [J]. *Nucl Med Biol*, 2008, 35(1):143-150.

[修回日期] 2013-12-05