

Vasohibin免疫脂质体抑制小鼠肺纤维化的实验研究

王兴胜¹ 吴学玲² 杨雪梅¹ 赵云峰³ 徐智² 崔社怀¹

1 第三军医大学大坪医院呼吸科(重庆 400042); 2 第三军医大学新桥医院呼吸科(重庆 400037); 3 东南大学附属中大医院呼吸科(江苏南京 210009)

【摘要】 目的 制备 Vasohibin免疫脂质体,并观察对小鼠肺纤维化的抑制作用。方法 采用逆相蒸发法,首先制备含 Vasohibin质粒的脂质体,并与山羊抗小鼠 VWF单克隆抗体偶联,形成免疫脂质体,并用博莱霉素诱发肺纤维化小鼠模型。14 d后,处死小鼠,取出肺脏组织,用 HE染色和免疫组化观察小鼠肺间质血管密度,比色法检测肺组织羟脯氨酸含量。结果 与对照组相比,吸入 Vasohibin免疫脂质体的小鼠的肺间质血管密度减少,CD31细胞数在模型组平均为(78±12)个,治疗组为(46±16)个,空白对照组为(9±2)个。肺组织羟脯氨酸含量降低,对照组为(1.39±0.23) μg/mg,治疗组为(0.84±0.12) μg/mg。结论 Vasohibin免疫脂质体能有效降低博莱霉素诱发的肺纤维化,为肺纤维化的早期治疗提供了理论基础。

【关键词】 Vasohibin 免疫脂质体; 肺纤维化

Immunoliposomes Containing Vasohibin Inhibit Pulmonary Fibrosis in Mice WANG Xingsheng,
WU Xueling YANG Xue mei ZHAO Yun feng XU Zhi CUI Shehua^{*} Department of Respiratory Medicine
Daping Hospital Third Military Medical University Chongqing 400042 China

Corresponding Author: CUI Shehua; E-mail: cui shehua@tommail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of immunoliposomes containing vasohibin on pulmonary fibrosis in mice. Methods Liposomes containing vasohibin plasmids were prepared by reverse phase evaporation technique, then combined with VWF antibody to form the immunoliposomes. 30 mice were randomly divided into a control group, a model group and a vasohibin group. The mice in the model group and the vasohibin group were nasally instilled with bleomycin to induce pulmonary fibrosis. After 3 days, the mice in the vasohibin group were nasally instilled with the immunoliposomes containing vasohibin. The mice were all sacrificed after 14 days. Lung tissue sections were stained by HE and CD31 immunohistochemistry staining. The level of hydroxyproline in lung was measured by colorimetry. Results The results demonstrated that the vasohibin immunoliposome could markedly decrease angiogenesis with the number of (46±16) compared to (78±12), and decrease fibroblast proliferation with (0.84±0.12) μg/mg compared to (1.39±0.23) μg/mg. Conclusion The vasohibin immunoliposome can attenuate pulmonary fibrosis and provide a novel strategy for clinical application in the future.

【Key words】 Vasohibin; Immunoliposome; Pulmonary fibrosis

肺纤维化是一组以肺间质弥漫性炎性渗出、浸润和纤维化为主要特征的一大组疾病,目前发病机制仍不清楚,缺乏特效治疗手段,预后很差^[1]。近年的研究进一步发现,肺纤维化模型的新生血管增多与博莱霉素诱发的肺纤维化密切相关^[2]。这些研究表明异常的血管重构可能在肺纤维化的发生中起重要作用。Vasohibin是在血管内皮细胞中发现

的一种新型血管生成抑制因子,负反馈抑制调节血管内皮生长因子(VEGF)等因子使血管生成处于相对稳定的状态^[3,4]。本研究拟构建 Vasohibin免疫脂质体,观察对博莱霉素诱发的肺纤维化的影响,为肺纤维化的早期治疗提供理论基础。

材料与方法

一、材料

1. 主要制剂: pDNA3.1 Vasohibin重组质粒由本室保存; POPC DSPE-PEG2000, DSPE-PEG2000-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30800505)

通讯作者: 崔社怀, E-mail: cui shehua@tommail.com

maleinid 购自 Avant 公司; DDAB 购自 Fluka 公司; 薄膜挤出器购自 Avestin 公司; Sepharose CL4B 为 Pharmacia 公司产品; 质粒小量提取试剂盒购自 Sigma 公司; DNase 购自 Takara 公司; 博莱霉素粉剂每支 15 mg 由日本化药株式会社生产; 羟脯氨酸试剂盒, 由南京建成生物工程有限公司生产。

2 实验动物: 清洁级 C57BL/6 雄性小鼠, 8 周龄, 由第三军医大学动物中心提供, 饲养于清洁级动物房。

二、方法

1 免疫脂质体的合成及抗体的偶联: 制备方法参考相关文献^[5-6]。采用逆相蒸发法将 POPC、DDAB、DSPE-PEG2000 及 DSPE-PEG2000-maleinide 按一定比例溶解于氯仿中, 用旋转蒸发器蒸发除去有机溶剂, 置水浴超声波仪处理 5 min 加入一定量质粒 DNA 在 42 °C 水浴和干冰中反复冻融, 并连续通过 100 nm 薄膜挤出器, 未包裹入脂质体的质粒用 DNase 和 exonuclease III 37 °C 作用 1 h EDTA 终止反应, 琼脂糖 CL4B 柱分离包裹质粒 DNA 的脂质体和被核酸酶降解的 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测。VWF 单克隆抗体经修饰硫化后与包裹质粒 DNA 的脂质体室温下轻摇连接过夜, 再次用琼脂糖 CL4B 柱分离未连接的抗体和免疫脂质体。

2 实验分组和处理: 将 C57BL/6 雄性小鼠随机分为空白对照组、肺纤维化模型组和 Vasohibin 处理组, 每组 10 只。模型组和 Vasohibin 处理组经鼻一次性滴入博莱霉素 7 μg/g (20 μL) 诱导肺纤维化。Vasohibin 处理组在造模后 3 d 再次经鼻一次性滴入 Vasohibin 免疫脂质体 20 μL。三组小鼠于第 14 d 处死。

3 肺纤维化检测: 将新鲜分离的小鼠右肺组织, 常规经 10% 福尔马林固定和石蜡包埋, 连续切片。分别做常规 HE 染色和 CD31 免疫组化染色。切片在 100 倍光镜下观察, 并进行病理评分。1 分: 炎症和纤维化 < 25%; 2 分: 炎症和纤维化在 25% ~ 50% 之间; 3 分: 炎症和纤维化 > 50%。另外切片在 100 倍光镜下挑选微血管分布密度最高区域, 在 200 倍光镜下计数 5 个不重复视野中被 CD31 染成棕黄色的微血管数, 取其平均值作为平均血管密度 (MVD)。将新鲜分离的小鼠左肺组织于 -70 °C 冻存, 按南京建成生物工程研究所羟脯氨酸试剂盒说明书操作, 羟脯氨酸含量结果以 μg/mg 表示。

三、统计学处理

数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析。采用 t 检验分析方法, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异

有统计学意义。

结 果

一、肺组织的 HE 染色结果

博莱霉素模型组造模第 14 d 时肺组织可见实变, 实变区呈斑片状分布, 可见大量炎细胞浸润; 部分肺泡内可见巨噬细胞簇集成团, 成纤维细胞及纤维细胞增生, 纤维化区可见数量不等的胶原纤维沉积。造模第 14 d 已具有肺间质纤维化的病变, 提示肺纤维化诱导成功。而 Vasohibin 处理组的肺组织纤维沉积减少, 炎细胞浸润减少。纤维化病理评分结果显示, Vasohibin 处理组纤维化程度较模型组显著减轻 (2 ± 0.4 比 3 ± 0.8 $P < 0.05$)。结果见图 1。

二、肺组织平均血管密度

CD31 免疫组化染色结果显示, 模型组造模第 14 d 时肺组织可见大量的纤维化区, 并且有大量的血管内皮增生。而 Vasohibin 免疫脂质体治疗组的肺组织纤维化减少, 并且血管内皮增生减少。半定量分析微血管密度结果, CD31 染成棕黄色的微血管数的模型组平均为 (78 ± 12) 个, 治疗组为 (46 ± 16) 个, 空白对照组为 (9 ± 2) 个 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

三、肺组织的羟脯氨酸水平

模型组为 (1.39 ± 0.23) μg/mg, Vasohibin 处理组为 (0.84 ± 0.12) μg/mg, 空白对照组为 (0.51 ± 0.08) μg/mg。模型组肺组织的羟脯氨酸含量较空白对照组显著升高 ($P < 0.05$), Vasohibin 处理组较模型组显著降低 ($P < 0.05$)。

讨 论

近年来血管生成在肺纤维化发生中的作用日益受到重视, 尽管其精细的机制尚不很清楚。血管生成是炎症发生、组织修复的中心, 炎症因子对血管生成有促进作用, 血管生成又是炎症细胞渗入病灶并活化的通路。血管生成的失控必定会引起炎症反应和组织修复的失控, 新生血管可能是肺纤维化形成中一个核心环节而起关键作用。

肺脏是血管非常丰富的器官, 血管生成的状况受局部刺激因素和抑制因素平衡的调节, 在众多血管生成刺激因子中 VEGF 是目前公认的直接促进血管内皮细胞有丝分裂原, 在血管生成中起首要的作用。在缺氧或炎症因素如博莱霉素刺激下, 肺组织 VEGF 的表达增加, 这对于早期代偿缺氧和帮助组织修复可能具有积极意义^[7]。但过度表达导致血管通透性增加、间质炎症, 大量新生血管为成纤维细胞提供营养, 另外 VEGF 可能通过与特异性受体结

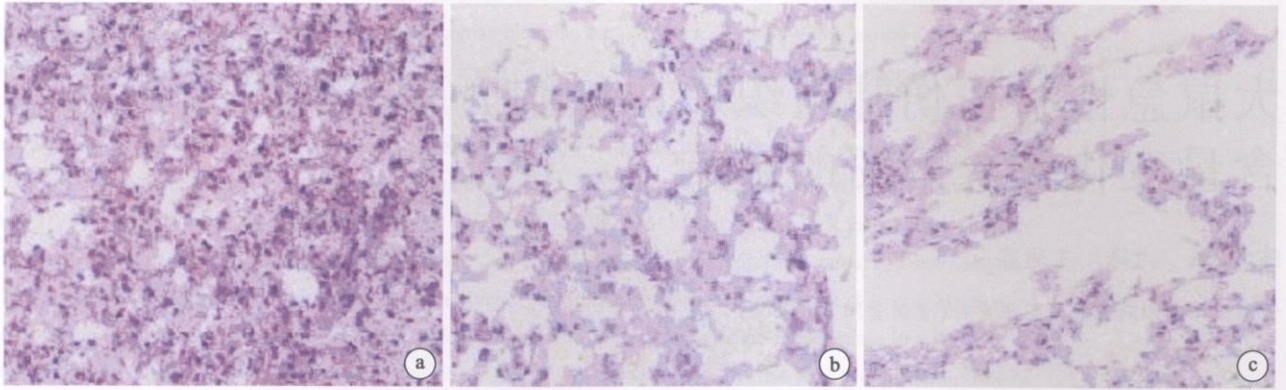


图1 肺组织病理学变化(HE ×100) a.模型组;b. Vasohibin 处理组;c.空白对照组

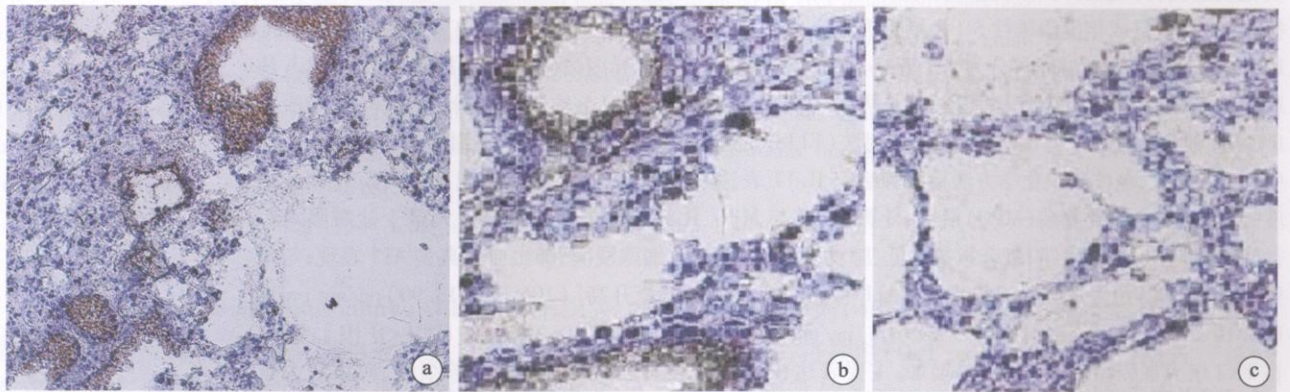


图2 肺组织的 CD31 免疫组化染色图和 CD31 细胞数(HE ×200) a:模型组;b:Vashibin 处理组;c:空白对照组

合促进成纤维细胞生长合成胶原等细胞外基质 (ECM)进一步导致肺纤维化。

Vasohibin是由Watanabe等^[4]于2004年在血管内皮细胞中发现的一种新型血管生成抑制因子,体外实验证实能有效抑制内皮细胞的移行、增殖及网络形成,体内实验证实能有效抑制肿瘤的新生血管形成,从而抑制肿瘤的生长。Vasohibin选择性表达于血管内皮细胞,可以被促血管生成因子如VEGF等诱导产生,被认为是第一个血管生成负反馈调节因子。Vasohibin是重要的血管生成抑制因子,通过负反馈抑制调节VEGF等因子使血管生成处于相对稳定的状态。而在肺纤维化中,Vasohibin是否能有效抑制血管内皮的增生,并在肺纤维化的过程中发挥作用呢?目前为止还未见相关报道。为了证实此假设,本研究构建了Vasohibin免疫脂质体,并进一步在小鼠肺纤维化模型中观察其作用。

研究结果显示,Vasohibin免疫脂质体处理组的肺组织纤维沉积减少,炎细胞浸润减少,并且血管内皮增生减少,同时羟脯氨酸含量减少。以上结果均提示vasohibin免疫脂质体能有效抑制血管内皮的生成,从而降低肺组织纤维的形成。研究结果提示

在肺组织纤维的生成过程中,Vasohibin同样可以负反馈抑制血管生成。我们将在以后的研究中进一步深入探讨其机制,为肺组织纤维的早期治疗提供更多的理论基础和策略。

参 考 文 献

- 1 陈恒屹,崔社怀.特发性肺间质纤维化发病机制及治疗进展.中华肺部疾病杂志(电子版).2009 2:58-62
- 2 徐佳波,李燕芹.肺纤维化和新生血管.国外医学(内科学分册).2006 33:102-104
- 3 Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. J Clin Invest 2004; 114: 898-907.
- 4 Wakusawa R, Abe T, Sato H, et al. Expression of vasohibin, an antiangiogenic factor, in human choroidal neovascular membranes. Am J Ophthalmol 2008; 146: 235-243.
- 5 赵浩,王任直,王菲,等.脑靶向基因转运免疫脂质体的制备.药学学报.2009 44:1285-1290.
- 6 胡雪,曾照芳,陈里里. DEC-205 单抗耦联长循环免疫脂质体的制备及其体外靶向.生物技术通报 2008 5:154-157
- 7 Bauer SM, Bauer RJ, Liu ZJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes vasculogenesis, angiogenesis, and collagen contraction in three-dimensional collagen gels. J Vasc Surg 2005; 41: 699-707.

(收稿日期:2010-04-12 修回日期:2010-05-05)

(本文编辑:梁宗国)