

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00645

甲磺酸伊马替尼抑制博莱霉素诱导小鼠肺纤维化的作用机制

李莉^{1,2}, 李燕芹^{2*}

1. 同济大学附属上海肺科医院, 上海 200433

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院呼吸科, 上海 200127

[摘要] **目的:**观察甲磺酸伊马替尼(以下简称伊马替尼)对博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化的干预作用,并探讨其可能的作用机制。**方法:**C57BL/6小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组和伊马替尼组($n=30$)。采用博莱霉素制备小鼠肺纤维化模型,分别于术后第7、14、21天各处死10只小鼠,免疫组化半定量分析各组肺组织转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、基质金属蛋白酶1(MMP-1)、基质金属蛋白酶抑制剂1(TIMP-1)表达的变化,并作相关性分析。**结果:**与模型组比较,伊马替尼组、地塞米松组肺组织TIMP-1、MMP-1、TGF- β 1表达均降低($P<0.01$)。TIMP-1表达与TGF- β 1呈正相关($r=0.243, P=0.004$);除正常对照组外,其余3组MMP-1表达与TIMP-1表达呈负相关($r=-0.291, P<0.0001$)。**结论:**甲磺酸伊马替尼可能通过下调TGF- β 1抑制TIMP-1表达,从而相对上调MMP-1,维持TIMP-1/MMP-1平衡,抑制博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化,作用效果与地塞米松类似。

[关键词] 甲磺酸伊马替尼;博莱霉素;肺纤维化;转化生长因子 β ;基质金属蛋白酶1;基质金属蛋白酶抑制剂1

[中图分类号] R 563 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0645-06

Imatinib mesylate inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice: the mechanism

LI Li^{1,2}, LI Yan-qin^{2*}

1. Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China

2. Department of Respiratory, Renji Hospital, Medical College, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the effect of imatinib mesylate on pulmonary fibrosis (PF) induced by bleomycin in mice and to explore the related mechanism. **Methods:** Totally 120 C57BL/6 mice were evenly randomized into control group, model group, dexamethasone group and imatinib group. The pulmonary fibrosis model was established using a single intratracheal infusion of bleomycin; the corresponding drugs were given to mice in each group. Ten mice was sacrificed in each group on day 7, 14, and 21 after operation, respectively. The expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP-1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in the lung tissues was semi-quantitatively analyzed by immunohistochemistry method. **Results:** Immunohistochemistry results showed that the expression of TIMP-1, MMP-1, and TGF- β 1 in lung tissues of the dexamethasone group and imatinib group was significantly lower than that in the model group ($P<0.01$). There was a positive correlation between TGF- β 1 and TIMP-1 expression ($r=0.243, P=0.004$). A negative correlation was found between MMP-1 and TIMP-1 in all the other 3 groups other than in the normal control group ($r=-0.291, P<0.0001$). **Conclusion:** Imatinib may downregulate TGF- β 1 expression, inhibit TIMP-1 expression, and upregulate MMP-1 expression, maintaining the balance of TIMP-1/MMP-1, subsequently inhibit the development of pulmonary fibrosis, showing a similar effect of dexamethasone.

[KEY WORDS] imatinib mesylate; bleomycin; pulmonary fibrosis; transforming growth factor β ; matrix metalloproteinase 1; tissue inhibitors of metalloproteinase 1

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):645-650]

肺间质纤维化(pulmonary fibrosis, PF)以成纤维细胞增殖和肺内细胞外基质(ECM)过度沉积为特

[收稿日期] 2008-11-23 **[接受日期]** 2008-12-09

[基金项目] 上海市科委科研基金(06411963). Supported by the Research Foundation of Shanghai Scientific and Technological Commission (06411963).

[作者简介] 李莉, 硕士生. E-mail: yefan718@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-65915986, E-mail: drliyanqin@163.com

征,发病机制尚不明确^[1]。以糖皮质激素、免疫抑制剂、细胞毒药物和抗纤维化药物为主的传统治疗对阻抑纤维化进展疗效不甚显著,且不良反应明显,极大地限制了其临床应用^[2-3]。因此,迫切需要寻求新的治疗 PF 的方法。

Rice 等^[4]研究发现,血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)酪氨酸激酶抑制剂(AG1296)可以改善五氧化二钒诱导的大鼠肺纤维化,认为其可能是通过减轻肺泡上皮和内皮细胞损伤及巨噬细胞的浸润,从而减少胶原形成和 ECM 沉积来抑制肺纤维化。甲磺酸伊马替尼也是一种 PDGFR 酪氨酸激酶抑制剂,主要用于治疗胃肠道间质肿瘤。我们已证实它能明显抑制博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化过程,改善肺纤维化指标^[5],但确切机制不清楚。本研究在前期研究的基础上应用甲磺酸伊马替尼干预治疗博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化,并探讨其可能的作用机制,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 博莱霉素(15 mg/支)由日本化药株式会社生产(批号:450260);甲磺酸伊马替尼(100 mg/粒)由诺华制药有限公司提供;转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)免疫组化试剂盒和基质金属蛋白酶 1(MMP-1)免疫组化试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司;基质金属蛋白酶抑制剂 1(TIMP-1)免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物技术公司。

1.2 动物分组及处理 健康清洁级 C57BL/6 小鼠 120 只,雌性,体质量 17~19 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,质量合格证号:0014561,许可证号:SCXK(沪)2003-0003 号。小鼠随机分为对照组、模型组、地塞米松组、伊马替尼组($n=30$)。动物模型的建立参照文献^[6];小鼠用水合氯醛 5 mg 腹腔注射麻醉后,常规消毒铺巾,按无菌操作原则切开颈部皮肤,模型组、地塞米松组和伊马替尼组经气管穿刺注入博莱霉素溶液(5 mg/kg)50 μ l;对照组注射等量的无菌生理盐水。注药完毕后缝合皮肤,将小鼠直立、旋转,尽量使药液在肺内均匀分布。术后置动物于干燥、温暖条件下喂养,定期消毒喂养场所。模型建立 24 h 后腹腔内分别注射干预药物,每日 1 次,伊马替尼组为甲磺酸伊马替尼 50 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹^[7],地塞米松组为地塞米松 3 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹^[8],模型组则为 0.9%氯化钠注射液 0.3 ml/d。

1.3 标本的采集及处理 各组小鼠分别于术后第 7、14、21 天各处死 10 只。小鼠称量后以水合氯醛 5 mg 腹腔注射麻醉,取右肺固定于甲醛溶液中,供 TGF- $\beta 1$

免疫组化表达分析用。取左肺固定于甲醛溶液中,供 MMP-1 和 TIMP-1 免疫组化表达分析用。

1.4 免疫组化染色 4 μ m 切片 600 $^{\circ}$ C 烘烤 3 h 后,纯二甲苯脱蜡后梯度乙醇中逐级脱水,蒸馏水冲洗。3%过氧化氢室温孵育 20 min,消除内源性过氧化物酶活性。蒸馏水冲洗,PBS 缓冲液冲洗 5 min。抗原修复后进行抗原封闭:5%BSA 封闭液封闭非特异性抗原 20 min,倾去后滴加一抗,湿盒内水浴 90 min,PBS 冲洗,滴加二抗,湿盒内水浴 20 min,PBS 冲洗,滴加 SABC,湿盒内水浴 20 min,PBS、DAB 显色液显色后冲洗,苏木精复染乙醇脱水,二甲苯透明,封片观察。PBS 液代替一抗作阴性对照,同时设阳性对照。免疫组化切片置光学显微镜下观察抗原分布和阳性表达情况。MMP-1 和 TIMP-1 及 TGF- $\beta 1$ 在肺组织中的蛋白表达水平用图像分析仪(Eagle Eye II 型,USA)作积分灰度量化处理,计算积分光密度(测定均在复染前进行,每张切片随机取 6 个视野,取均值)^[9]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 Pearson 相关和 Logistic 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-1 蛋白的表达 结果(图 1)表明:正常对照组肺组织中 MMP-1 呈弱阳性染色;模型组第 7 天时 MMP-1 染色明显增强,第 14 天和第 21 天时染色阳性细胞较第 7 天渐减少,但仍高于正常肺组织;地塞米松和伊马替尼组与模型组比较同一时间点染色阳性细胞数有所减少。半定量分析结果(表 1)表明:正常对照组各时间点无统计学差异;模型组第 7 天表达量最高,此后逐渐降低,且其各时间点表达均高于正常对照组($P < 0.01$);地塞米松和伊马替尼组第 7 天、第 14 天、第 21 天 MMP-1 表达量均低于模型组($P < 0.01$),而前两组间各时间点无统计学差异。

2.2 TIMP-1 蛋白的表达 结果(图 2)表明:正常对照组肺组织中 TIMP-1 有少量染色阳性;模型组第 7 天时 TIMP-1 染色已有明显增强,此后持续高表达,至第 21 天时仍保持在较高水平;地塞米松组、伊马替尼组与模型组比较同一时间点染色阳性细胞数有所减少。

半定量分析结果(表 1)表明:正常对照组 TIMP-1 蛋白表达较低;模型组第 7 天 TIMP-1 蛋白表达开始明显增加,此后逐渐升高,与正常对照组有统计学差异($P < 0.01$);地塞米松组、伊马替尼组各时间点 TIMP-1 表达较模型组均明显降低($P < 0.01$),而各时间点前两组间无统计学差异。

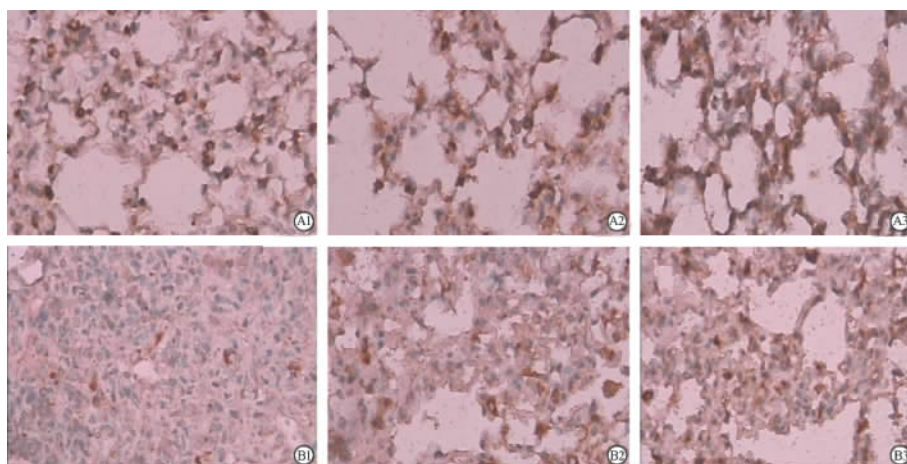


图1 各组小鼠肺组织不同时间点 MMP-1 免疫组化染色结果

Fig 1 Expression of MMP-1 protein in lung tissues of animals in each group by immunohistochemistry

A; The 7th d; B; The 21st d. A1, B1; Model; A2, B2; Dexamethasone; A3, B3; Imatinib mesylate. Original magnification: $\times 200$ 表1 各组小鼠肺组织 MMP-1、TIMP-1 和 TGF- β 1 蛋白表达半定量分析结果Tab 1 Semi-quantitative analysis of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1 protein expression in each group(Average density; $n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Time after model establishment t/d		
	7	14	21
MMP-1			
Control	0.157 \pm 0.022	0.147 \pm 0.022	0.186 \pm 0.055
Model	0.700 \pm 0.027**	0.556 \pm 0.114**	0.415 \pm 0.040**
Dexamethasone	0.622 \pm 0.027** $\Delta\Delta$	0.459 \pm 0.066** $\Delta\Delta$	0.375 \pm 0.018** $\Delta\Delta$
Imatinib mesylate	0.630 \pm 0.030** $\Delta\Delta$	0.444 \pm 0.057** $\Delta\Delta$	0.369 \pm 0.026** $\Delta\Delta$
TIMP-1			
Control	0.223 \pm 0.027	0.258 \pm 0.026	0.260 \pm 0.036
Model	0.361 \pm 0.050**	0.466 \pm 0.065**	0.614 \pm 0.064**
Dexamethasone	0.275 \pm 0.025** $\Delta\Delta$	0.321 \pm 0.022** $\Delta\Delta$	0.441 \pm 0.022** $\Delta\Delta$
Imatinib mesylate	0.273 \pm 0.055** $\Delta\Delta$	0.315 \pm 0.053** $\Delta\Delta$	0.410 \pm 0.035** $\Delta\Delta$
TGF- β 1			
Control	0.356 \pm 0.039	0.335 \pm 0.035	0.278 \pm 0.024
Model	0.757 \pm 0.046**	0.671 \pm 0.049**	0.534 \pm 0.043**
Dexamethasone	0.615 \pm 0.061** $\Delta\Delta$	0.532 \pm 0.062** $\Delta\Delta$	0.460 \pm 0.038** $\Delta\Delta$
Imatinib mesylate	0.558 \pm 0.064** $\Delta\Delta$	0.505 \pm 0.055** $\Delta\Delta$	0.452 \pm 0.041** $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

2.3 TGF- β 1 蛋白的表达 结果(图 3)表明:正常对照组的肺组织中仅有少许阳性棕黄色产物;模型组第 7 天可见棕黄色颗粒状或丝状阳性表达产物明显增多,第 14 天和第 21 天时阳性染色渐减少,但仍高于正常肺组织;地塞米松组、伊马替尼组肺组织 TGF- β 1 的阳性表达产物较模型组各时间点均明显减少。

半定量分析结果(表 1)表明:正常对照组各时间点 TGF- β 1 表达均较低;模型组各时间点表达量均高于对照组 ($P < 0.01$);除对照组外,其余 3 组 TGF- β 1 表达量均在第 7 天达到高峰,此后缓慢下降;地塞米松组、伊马替尼组各时间点 TGF- β 1 表达量均低于模型组 ($P < 0.01$),而各时间点前两组间

无统计学差异。

2.4 各蛋白表达相关性分析

2.4.1 TGF- β 1 与 TIMP-1 表达的相关性分析 结果(图 4A)表明:TIMP-1 表达与 TGF- β 1 表达呈正相关($r=0.243, P=0.004$),回归方程为:TIMP=0.199+0.299 \times TGF- β 1,提示 TIMP-1 的表达随 TGF- β 1 表达的变化而同时发生改变。

2.4.2 MMP-1 与 TIMP-1 表达相关性分析 结果(图 4B)表明:除正常对照组外,其余 3 组 MMP-1 表达与 TIMP-1 的表达呈负相关($r=-0.291, P < 0.0001$),回归方程为:MMP-1=0.265-0.370 \times TIMP-1,提示 MMP-1 的表达与 TIMP-1 表达相互影响。

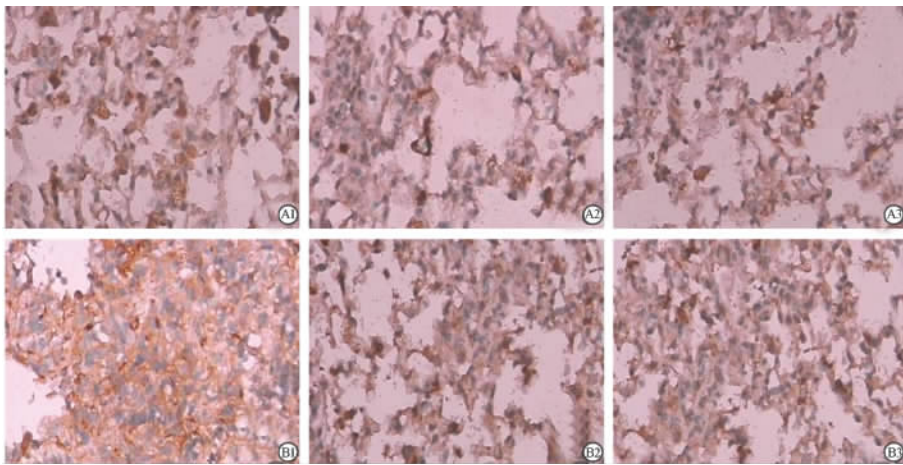


图 2 各组小鼠肺组织不同时间点 TIMP-1 免疫组化染色结果

Fig 2 Expression of TIMP-1 protein at different time points in each group by immunohistochemistry

A: The 7th d; B: The 21st d. A1, B1: Model; A2, B2: Dexamethasone; A3, B3: Imatinib mesylate. Original magnification: ×200

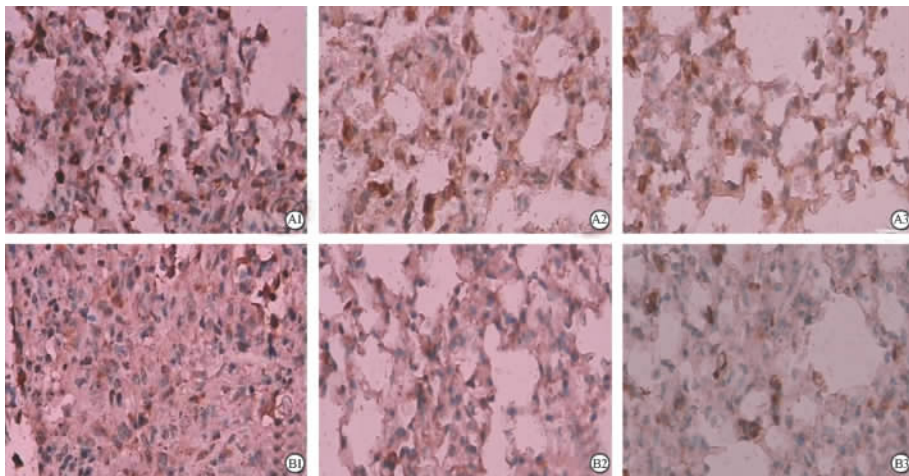


图 3 各组小鼠肺组织不同时间点 TGF-β1 免疫组化染色结果

Fig 3 Expression of TGF-β1 protein at different time points in each group by immunohistochemistry

A: The 7th d; B: The 21st d. A1, B1: Model; A2, B2: Dexamethasone; A3, B3: Imatinib mesylate. Original magnification: ×200

3 讨论

肺纤维化是许多病因不同的肺间质疾病的共同结局,涉及细胞、细胞因子、ECM 等因素间的相互作用^[10],常伴有 ECM 正常合成与降解平衡的破坏。MMPs 是一组结构相似的金属内肽酶,可以降解 ECM 从而减少 ECM 的沉积;而 TIMP 是其抑制物。Ruiz 等^[11]研究发现,肺纤维化中 TIMPs 的表达常较 MMPs 的表达占明显优势,导致广泛的促胶原沉积微环境的形成, TIMPs 表达升高可引起 MMPs/TIMPs 比例失调,进而使胶原沉积增多形成肺纤维化。肺纤维化中起主导作用的细胞因子是 TGF-β^[12]。TGF-β 可增强 TIMP-1 基因表达并促使胶原、纤维粘连蛋白、蛋白多糖和糖胺多糖的产生;

同时抑制 TNF-α、IL-1、EGF、bFGF 诱导的 MMP-1、MMP-3 基因表达上调^[13]。甲磺酸伊马替尼于 2001 年被美国 FDA 批准用于临床治疗慢性粒细胞性白血病(CML),目前还用于不能手术或发生转移的恶性胃肠道间质肿瘤患者。与药物相关的不良反应主要包括中性粒细胞减少或血小板减少,轻度恶心、呕吐、腹泻,肌痛及肌痉挛,偶尔有水肿和水潴留等。

本研究结果显示,甲磺酸伊马替尼可以减轻博莱霉素诱导的小鼠肺纤维化^[13],同时观察到小鼠在给予一次性气管内注入博莱霉素后,与同期正常组比较,模型组各时间点 MMP-1、TIMP-1 蛋白的表达有统计学差异,提示 MMP-1、TIMP-1 参与了肺纤维化的发生、发展。模型组早期(第 7 天) MMP-1

水平最高,此后有所降低,但仍明显高于正常对照组($P < 0.01$)。这表明肺纤维化时 MMP-1 的表达水平并不低,但可能 TIMP-1 的表达水平相对更高,且 ECM 合成代谢异常活跃,使 ECM 降解速度相对小于沉积速度,导致纤维化。模型组 TIMP-1 水平从第 7 天起持续升高,至晚期(第 21 天)达到最高,提示 ECM 的积聚沉积可能与 TIMP-1 在此过程中的持续高表达有关。甲磺酸伊马替尼在降低肺组织 TIMP-1 的表达上与地塞米松组无统计学差异,两

者各时间点 TIMP-1 均明显低于模型组($P < 0.01$)。结果提示甲磺酸伊马替尼可能通过抑制 TIMP-1 的表达,减轻其对 MMPs 的抑制,提高了 MMPs 的活性,使 MMP/TIMP 失衡状态得以恢复,促进过度沉积的 ECM 降解。MMP-1 与 TIMP-1 的相关回归分析可见两者负相关,因此推测甲磺酸伊马替尼对 MMP-1 的相对上调作用可能是由于其降低了 TIMP-1 的表达从而减轻了 TIMP-1 对 MMP-1 的抑制。

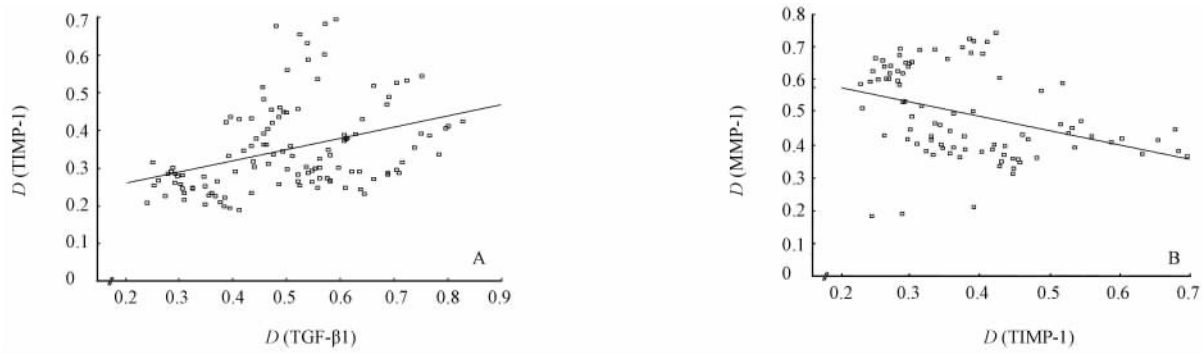


图 4 TIMP-1 与 TGF- β 1(A)、TIMP-1 与 MMP-1(B)表达的相关性分析

Fig 4 Correlation analysis of average densities of TGF- β 1 and TIMP-1(A), and MMP-1 and TIMP-1(B)

D: Average density

另外,在实验中我们观察到伊马替尼组和地塞米松组 TGF- β 1 的表达较模型组各时间点均显著降低,且 TIMP-1 的表达与 TGF- β 1 表达正相关,推测甲磺酸伊马替尼对 TIMP-1 的抑制作用可能是通过下调 TGF- β 1 的表达来实现的。这提示甲磺酸伊马替尼对肺纤维化 ECM 代谢的影响可能是一种连锁反应,存在着网络效应,即通过抑制 TGF- β 1 的高表达减弱其对 TIMP-1 表达的促进作用,解除对 MMP-1 表达的抑制,纠正 MMP/TIMP 的失衡,从而减轻肺纤维化。但确切机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Davies H R, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: current and future treatment options[J]. *Am J Respir Med*, 2002, 1: 211-224.
- [2] Snell G I, Walters E H, Kotsimbos T C, Williams T J. Idiopathic pulmonary fibrosis: in need of focused and systematic management[J]. *Med J Aust*, 2001, 174: 137-140.
- [3] Horowitz J C, Thannickal V J. Idiopathic pulmonary fibrosis: new concepts in pathogenesis and implications for drug therapy [J]. *Treat Respir Med*, 2006, 5: 325-342.
- [4] Rice A B, Moomaw C R, Morgan D L, Bonner J C. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155: 213-221.
- [5] 李莉,李燕芹,格列卫对博来霉素致小鼠肺纤维化的干预作用[J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19: 229-232.
- [6] Kolb M, Margetts P J, Galt T, Sime P J, Xing Z, Schmidt M, et al. Transient transgene expression of decorin in the lung reduces the fibrotic response to bleomycin[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(3 Pt 1): 770-777.
- [7] Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, et al. Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171: 1279-1285.
- [8] Dik W A, McNulty R J, Versnel M A, Naber B A, Zimmermann L J, Laurent G J, et al. Short course dexamethasone treatment following injury inhibits bleomycin induced fibrosis in rats[J]. *Thorax*, 2003, 58: 765-771.
- [9] 章巍,刘新民,李海潮,张红. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型肺组织 MMP-2、MMP-9、MT1-MMP 及 TIMP-1、TIMP-2 的表达[J]. *北京大学学报:医学版*, 2002, 34: 716-721.
- [10] 黄山英,宋良文. 效应细胞、细胞因子及相关基因调控在肺纤维化发生中的作用研究进展[J]. *国外医学:呼吸系统分册*, 2005, 25: 328-330.
- [11] Ruiz V, Ordóñez R M, Berumen J, Ramirez R, Uhal B, Becerril C, et al. Unbalanced collagenases/TIMP-1 expression and epithelial apoptosis in experimental lung fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285: L1026-L1036.
- [12] Willis B C, Liebler J M, Luby-Phelps K, Nicholson A G, Cran-

- dall E D, du Bois R M, et al. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta 1; potential role in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1321-1332.
- [13] Khalil N, Parekh T V, O'Connor R, Antman N, Kepron W, Yehaulaeshet T, et al. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Thorax*, 2001, 56: 907-915.

[本文编辑] 贾泽军