

17 β -雌二醇对 SiO₂ 刺激的小鼠肺成纤维细胞 表达 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的影响*

肖永红, 梁晓飞, 王悦, 肖倩

河北联合大学公共卫生学院(唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨不同浓度 17 β -雌二醇(17 β -E₂)对二氧化硅(SiO₂)刺激的小鼠肺成纤维细胞表达 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的影响。方法 将体外培养的小鼠肺成纤维细胞分 5 组:空白对照组, SiO₂ (100 mg/L)组, SiO₂ (100 mg/L)+不同剂量 17 β -E₂ 组(10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L), 17 β -E₂ 作用 48 h 后收集各组细胞,应用免疫组化法检测 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原表达。结果 SiO₂处理组小鼠肺成纤维细胞与空白对照组比较 Caveolin-1 表达降低($P<0.05$),而 SiO₂+17 β -E₂ 处理组随着 17 β -E₂ 剂量增大 Caveolin-1 表达明显升高($P<0.05$);各处理组Ⅲ型胶原表达差异有统计学意义($P<0.05$),SiO₂ 组与空白对照组比较增高($P<0.05$),而 17 β -E₂ 处理组均低于 SiO₂ 组($P<0.05$);相关分析显示,17 β -E₂ 与 Caveolin-1 的表达呈正相关($r=0.926, P<0.05$),与Ⅲ型胶原表达呈负相关($r=-0.914, P<0.05$),Caveolin-1 与Ⅲ型胶原表达亦呈负相关($r=-0.887, P<0.05$)。结论 17 β -E₂ 可能通过上调肺成纤维细胞 Caveolin-1 的表达,抑制Ⅲ型胶原表达而发挥抗纤维作用。

【关键词】 17 β -雌二醇 肺成纤维细胞 Caveolin-1 Ⅲ型胶原

Effects of 17 β -estradiol on the Expression Caveolin-1 and Type Ⅲ Collagen in the Mouse Lung Fibroblast Stimulated by SiO₂ XIAO Yong-hong, LIANG Xiao-fei, WANG Yue, XIAO Qian. School of Public Health, Hebei United University, Tangshan 063000, China

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of different concentration of 17 β -estradiol (17 β -E₂) on the expression of Caveolin-1 and type Ⅲ collagen in the mouse lung fibroblast stimulated by SiO₂. **Methods** Fibroblast cells were divided into five groups: blank control group, SiO₂ (100 mg/L) group and SiO₂ (100 mg/L) + different concentration of 17 β -E₂ (10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ mol/L) groups. After treated with different concentration of 17 β -E₂, for 48 h, the cells were collected, then the expression of Caveolin-1 and of type Ⅲ collagen were examined with immunohistochemistry method. **Results** Compared with the blank control group, the expression of Caveolin-1 in mouse lung fibroblasts treated by SiO₂ significantly decreased ($P<0.05$), While which in the SiO₂+17 β -E₂ group significantly increased as 17 β -E₂ dose increased ($P<0.05$); There were significantly different in the expression of type Ⅲ collagen among different groups ($P<0.05$), which in SiO₂ group were evidently higher than that in the blank control group, while which in 17 β -E₂ groups decreased significantly, when compared with SiO₂ group ($P<0.05$); 17 β -E₂ increased the expression of Caveolin-1 and decreased the expression of type Ⅲ collagen in the dose dependent manner. Correlation analysis showed that 17 β -E₂ was positive correlated with the expression of Caveolin-1 ($r=0.926, P<0.05$), and negative correlated with the express of type Ⅲ collagen ($r=-0.914, P<0.05$), and the expression of Caveolin-1 and the expression of type Ⅲ collagen was negatively correlation ($r=-0.887, P<0.05$). **Conclusion** 17 β -E₂ may inhibit the expression of type Ⅲ collagen by up-regulating the expression of Caveolin-1 in mouse lung fibroblast cell to play a role in the resistance of the lung fibrosis.

【Key words】 17 β -estradiol Lung fibroblast Caveolin-1 Type Ⅲ collagen

肺成纤维细胞在肺纤维化的形成和进展中起重要作用。研究认为,小窝蛋白-1(Caveolin-1)在调节成纤维细胞增殖及肺纤维化细胞外基质(extracellular matrix, ECM)中具有关键作用,且在实验性肺纤维化体内模型中表达异常^[1]。Caveolin-1 降低是肺纤维形成过程中的核心环节,并作为治疗肺纤维化的新靶点。17 β -雌二醇(17 β -

E₂)可增加 Caveolin-1 蛋白的表达^[2]。为此,本研究通过体外细胞实验,研究 17 β -E₂ 对二氧化硅(SiO₂)刺激的小鼠肺成纤维细胞 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原表达的影响,初步探讨 Caveolin-1 在肺纤维化中的变化,为肺纤维化提供新的治疗方法。

1 材料和方法

1.1 材料

SiO₂ 粉尘由中国疾病预防控制中心提供,经充分研磨干燥(180 ℃,干烤 6 h),用无血清 RPMI-1640 细胞培养基制成 100 mg/L SiO₂ 粉尘混悬液,

* 河北省科学技术研究与发展计划(No. 10276113D)、河北省教育厅课题(No. 2006139)和唐山市科技计划项目(No. 13130269z)资助

4℃储存备用;17β-E₂(北京博奥森生物技术有限公司)用二甲基亚砜(DMSO)制成10⁻⁴ mol/L的原液,再用无血清 RPMI-1640 细胞培养基稀释成相应浓度后4℃存放;胎牛血清(杭州四季青公司),兔抗人 Caveolin-1 单克隆抗体(美国 millipore 公司),兔抗鼠Ⅲ型胶原蛋白单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),免疫组化试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的培养 将保存于液氮中的小鼠肺成纤维细胞(L929 细胞株,购于天津赛尔试剂公司)复苏后接种于含10%胎牛血清、100×10³ U/L 青霉素、100×10³ U/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5%CO₂ 条件下培养。将对数生长期的成纤维细胞消化传代,以1×10⁶/mL 的密度接种于培养瓶中,24 h 后换液并观察细胞贴壁及形态,待细胞长满培养瓶80%面积时,加入不含血清的培养基同步化24 h。

1.2.2 细胞分组处理 根据前期实验结果^[3],选取 SiO₂ 剂量(100 mg/L)及作用时间间隔(2 h)。实验分组如下:空白对照组, SiO₂ 组, SiO₂ + 不同剂量 17β-E₂ 组。空白对照组只加入 RPMI-1640 培养液, SiO₂、SiO₂ + 17β-E₂ 组分别加入 100 mg/L SiO₂, 间隔 2 h 后, SiO₂ + 17β-E₂ 组在原有液体培养中再加入终浓度为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ mol/L 的 17β-E₂。

1.2.3 免疫组织化学法检测细胞 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的表达 将对数生长期的 L929 细胞用无血清 RPMI-1640 培养基稀释成密度为 1×10⁵/mL,种

植于置有小玻片的 6 孔板中,各组处理 48 h 后收集各组细胞进行检测,分别以兔抗人 Caveolin-1 单克隆抗体(1:200)、兔抗鼠Ⅲ型胶原抗体(1:100)作为一抗,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,二氨基联苯胺(DAB)显色,应用免疫组化(SP)法检测 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原表达,具体方法按试剂盒说明书操作。

免疫组织化学阳性表达结果判定:光学显微镜下观察,成纤维细胞膜和细胞质出现棕黄色或黄褐色颗粒为阳性显色。用 IPP 软件对蛋白表达进行定量分析,200 倍视野下每片随机取 6 个视野,取其阳性染色的平均光密度(AOD)值作为 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的表达。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,两两比较用最小差值显著法,各指标间的相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺成纤维细胞 Caveolin-1 的表达

见图 1、附表。免疫组化结果显示, SiO₂ 处理组肺成纤维细胞 Caveolin-1 的表达较空白对照组降低 ($P < 0.05$); SiO₂ + 17β-E₂ 3 个剂量组 Caveolin-1 的表达与 SiO₂ 处理组比较均增强 ($P < 0.05$),随 17β-E₂ 剂量增加光密度值增加 ($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠肺成纤维细胞Ⅲ型胶原的表达

免疫组化结果(图2、附表)显示,各处理组小

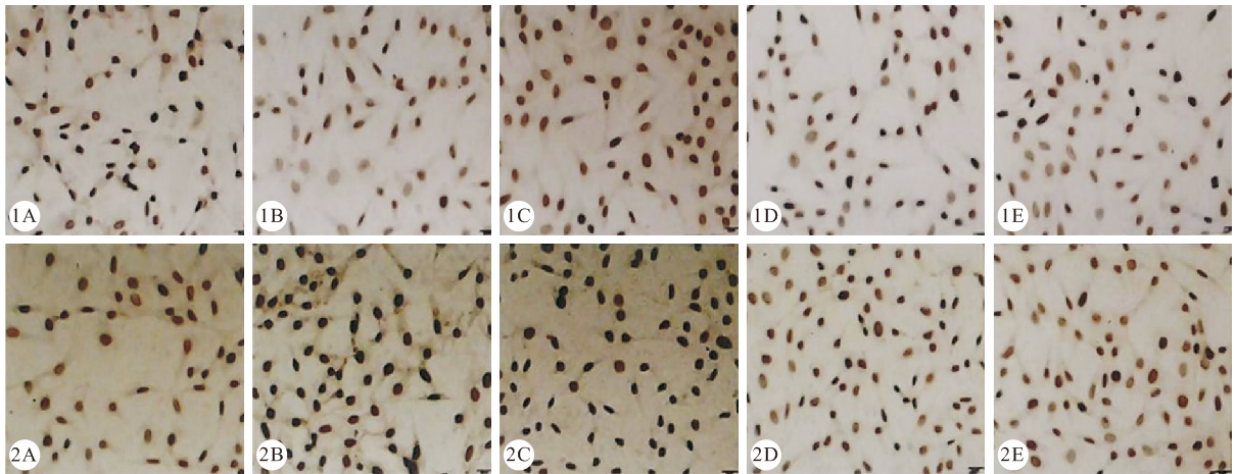


图 1 小鼠肺成纤维细胞中 Caveolin-1 的表达。SP ×200

图 2 小鼠肺成纤维细胞中Ⅲ型胶原的表达。SP ×200

Fig 1 The expression of Caveolin-1 in lung fibroblasts of different groups. SP ×200 Fig 2 The expression of type Ⅲ collagen in lung fibroblasts of different groups. SP ×200

A: Blank control group; B: SiO₂ group; C: SiO₂ + 10⁻⁸ mol/L 17β-E₂ group; D: SiO₂ + 10⁻⁷ mol/L 17β-E₂ group; E: SiO₂ + 10⁻⁶ mol/L 17β-E₂ group

附表 鼠肺成纤维细胞 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的表达(AOD)
Table The expression of Caveolin-1 and type Ⅲ collagen in lung fibroblasts of different groups (average optical density)

Group	n	Caveolin-1	Type Ⅲ collagen
Blank	6	34.20±1.14 [△]	15.71±2.56 [△]
SiO ₂	6	8.63±0.58	96.54±5.62
SiO ₂ +17β-E ₂			
10 ⁻⁸ mol/L *	6	16.56±1.05 [△]	75.61±3.43 [△]
10 ⁻⁷ mol/L *	6	23.71±1.72 ^{△, #}	68.93±3.57 ^{△, #}
10 ⁻⁶ mol/L *	6	26.70±1.86 ^{△, #}	57.28±3.83 ^{△, #}

* Dosage of 17β-E₂. [△]P<0.05, vs. SiO₂ group; [#]P<0.05, vs. former dosage in co-treated group

鼠肺成纤维细胞Ⅲ型胶原表达差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较, SiO₂ 组Ⅲ型胶原表达增强($P<0.05$); SiO₂ + 17β-E₂ 各组的小鼠肺成纤维细胞Ⅲ型胶原表达较 SiO₂ 组减弱($P<0.05$), 且随 17β-E₂ 剂量增加光密度值降低($P<0.05$)。

2.3 17β-E₂ 与小鼠肺成纤维细胞表达 Caveolin-1 和Ⅲ型胶原的相关性

17β-E₂ 与肺成纤维细胞 Caveolin-1 的阳性表达呈正相关($r = 0.926, P < 0.05$), 而 17β-E₂、Caveolin-1 与Ⅲ型胶原表达均呈负相关(r 分别为 -0.914 和 -0.887, $P < 0.05$)。

3 讨论

肺纤维化的发生是 ECM 合成与降解失衡, 造成 ECM(如 I、Ⅲ型胶原蛋白)的大量沉积, 早期以Ⅲ型胶原为主, 晚期以 I 型胶原增生为主^[4]。动物实验发现, 外源性雌激素可使脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤减轻^[5]。富集于细胞膜的 Caveolin-1 是细胞表面的穴样内陷(caveolae)家族的最重要的一员, 可在胞浆与胞膜之间穿梭, 结合并失活一些细胞内信号转导的重要分子, 从而负性调节信号传导。研究报道^[6,7], Caveolin-1 与肺纤维化密切相关。本研究从细胞水平, 研究肺成纤维细胞在 17β-E₂ 作用下, Caveolin-1 与Ⅲ型胶原蛋白表达水平的变化, 以探索更可靠的作用靶点, 寻找肺纤维化治疗的新思路。

课题组前期研究表明^[3], 经 SiO₂ 刺激的小鼠肺成纤维细胞Ⅲ型胶原表达增加。本研究结果显示, SiO₂ 处理的 L929 细胞 Caveolin-1 表达明显减少、Ⅲ型胶原表达显著增加, 而 17β-E₂ 剂量依赖性地增加经 SiO₂ 处理的 L929 细胞的 Caveolin-1 表达、降低Ⅲ型胶原表达, 进一步相关分析表明, 17β-E₂ 与 Caveolin-1 表达呈正相关($P < 0.05$), 与Ⅲ型胶原表达呈负相关($P < 0.05$), 而 Caveolin-1 与Ⅲ型胶原表达亦呈负相关($P < 0.05$), 提示肺成纤维细胞的 Caveolin-1 表达上调可能抑制成纤维细胞的 ECM 合成, 这与有关报道相一致^[8]。国内曾报道人胚肺

成纤维细胞 Caveolin-1 蛋白表达与 I 型胶原表达呈显著负相关^[9]。在博莱霉素诱导的肺纤维化实验中 I 型肺泡上皮细胞 Caveolin-1 的表达进行性下降, 并且这种下降在明显的组织学异常出现之前就已开始^[10], 说明 Caveolin-1 表达的下调可能是肺纤维化发生过程的重要始动因素。

Caveolin-1 的下调与肺纤维化发生和发展涉及多条信号传导通路。有研究报道^[11], Caveolin-1 通过抑制 EGFR、MEK1 的活性, 调节 ERK 途径来抑制成纤维细胞合成胶原, 从而阻断纤维化进程; Caveolin-1 可能通过下调 TGF-β₁ 的产生^[6], 中断 TGF-β₁/Smad 信号通路传导^[12], 而具有抗纤维化能力。但 17β-E₂ 通过何种途径调节体外肺成纤维细胞胶原表达, 以及 Caveolin-1 如何与信号分子相互作用调节肺纤维化进展, 将进行进一步研究。

参 考 文 献

- 1 高燕, 顾振纶, 蒋小岗等. 小窝蛋白-1 与特发性肺纤维化. 中国药理学通报, 2009; 25(6): 704-707.
- 2 Liu HM, Zhao XF, Guo LN, *et al.* Effects of caveolin-1 on the 17beta-estradiol-mediated inhibition of VSMC proliferation induced by vascular injury. Life Sci, 2007; 80(8): 800-812.
- 3 姚晓雷, 张娟, 肖永红. 转化生长因子 β₁ 抗体对小鼠肺成纤维细胞增殖及Ⅲ型胶原表达影响. 中国职业医学, 2011; 38(3): 210-212.
- 4 杜海科, 宋福成, 周欣等. 博莱霉素大鼠肺纤维化 I、Ⅲ型胶原表达. 中国公共卫生, 2010; 26(1): 97-98.
- 5 程青, 陈忠庆. 外源性雌激素在脂多糖诱导大鼠急性肺损伤中的作用. 西南国防医药, 2004; 14(4): 353-355.
- 6 党嘉文, 孙鸿燕, 董文斌等. 高氧肺损伤形成过程中小窝蛋白-1、TGF-β₁ 表达关系的体内外研究. 重庆医学, 2013; 42(18): 2067-2070.
- 7 Gvaramia D, Blaauboer ME, Hanemaaijer R, *et al.* Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. Matrix Bio, 2013; 32(6): 307-315.
- 8 Wang XM, Zhang Y, Kim HP, *et al.* Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. J Exp Med, 2006; 203(13): 2895-2906.
- 9 丁辉, 周凤秋, 蔡后荣等. 转换生长因子-β₁ 对肺成纤维细胞窖蛋白-1 与细胞外基质表达的影响. 中华结核和呼吸杂志, 2010; 33(4): 280-283.
- 10 Barth K, Bläsche R, Kasper M. Lack of evidence for caveolin-1 and CD147 interaction before and after bleomycin-induced lung injury. Histochem Cell Biol, 2006; 126(5): 563-573.
- 11 Zuluaga S, Alvarez-Barrientos A, Gutiérrez-Uzquiza A, *et al.* Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. Cell Signal, 2007; 19(1): 62-74.
- 12 Tourkina E, Hoffman S. Caveolin-1 signaling in lung fibrosis. Open Rheumatol J, 2012; 6: 116-122. doi: 10.2174/1874312901206010116. Epub 2012 Jun 15.