

长期应用糖皮质激素对新生大鼠肺泡形态结构及 IGFBP-2 的影响

刘娟娟,赵德育

(南京医科大学附属南京儿童医院呼吸科,江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:探讨长期应用糖皮质激素(ICSs)对新生大鼠肺形态结构及其对肺内胰岛素样生长因子结合蛋白 2(IGFBP-2)表达的影响。方法:新生 SD 大鼠 48 只随机分为 3 组:对照(CONT)组(雾化吸入生理盐水);雾化吸入布地奈德(BUD)组;腹腔注射地塞米松(DEX)组。每个干预组内设 7 d 给药组与 14 d 给药组。大鼠 5 日龄时开始干预,各组在连续给药 7、14 d 后,测量大鼠体重及肺组织重量,计算肺系数,通过肺组织形态学分析评估肺发育程度,应用蛋白免疫印迹技术(WB)检测 IGFBP-2 在肺组织中的表达。结果:①大鼠体重及肺系数:BUD 组与 CONT 组体重间差异无统计学意义($P > 0.05$),但 DEX 组体重较 CONT 组明显下降($P < 0.01$)。BUD 组肺系数低于 CONT 组($P < 0.01$)。给药 14 d 后,DEX 组肺系数与 CONT 组间无统计学差异($P > 0.05$);②肺组织形态学:BUD 组、DEX 组肺泡囊数量较 CONT 组减少($P < 0.01$),间隔变薄($P < 0.01$),囊腔增大($P < 0.05$),BUD 组、DEX 组肺泡形态学指标间无统计学差异($P > 0.05$);③肺组织 IGFBP-2 蛋白表达:IGFBP-2 在 BUD 组、DEX 组表达强于 CONT 组。结论:长期应用糖皮质激素可抑制新生大鼠肺泡化过程,该现象可能与糖皮质激素上调 IGFBP-2 在肺组织中的表达有关。

[关键词] 糖皮质激素;肺泡期;形态发育;胰岛素样生长因子结合蛋白 2

[中图分类号] Q26

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-463-05

Effects of long-term corticosteroids use on lung morphogenesis and IGFBP-2 in rats

LIU Juan-juan,ZHAO De-yu

(Department of Respiratory Medicine, the Nanjing Children's Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of postnatal long-term corticosteroids use on early lung development and find the relation between glucocorticoids and insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2). **Methods:** Total 48 neonatal rats were randomly divided into 3 groups: control group (nebulized saline), budesonide group (nebulized budesonide) and dexamethasone group (intraperitoneal injection of dexamethasone). Treatment began at 5 day of age and continued for 1 to 2 week period. At the end of treatment, body weight and lung index were investigated. Alveolar counts, alveolar septum thickness and alveolar space as morphologic markers were used to evaluate alveolar development. The expression of IGFBP-2 was detected by Western Blot. **Results:** ① There was no significant difference in body weight between budesonide group and control group ($P > 0.05$). Body weight was significantly decreased in dexamethasone group compared with control group after 14 days exposure ($P < 0.01$). There was significant difference in lung index between budesonide group and control group ($P < 0.01$), but there was no statistical difference in lung index between dexamethasone group and control group after 14 days treatment ($P > 0.05$). ② The total number of alveoli, thickness of the alveolar wall were dramatically reduced and alveolar space increased in budesonide and dexamethasone treated groups when compared with control ($P < 0.01, P < 0.05$ respectively). No significant differences about the three morphologic markers were seen between budesonide group and dexamethasone group. ③ The expression of IGFBP-2 in lung tissue of budesonide and dexamethasone groups significantly increased compared with control group detected by Western Blot. **Conclusion:** Long-term corticosteroids use affects postnatal lung alveolization. The overexpression of IGFBP-2 in lung tissue may relate to the pathological changes.

[Key words] corticosteroids; alveolar period; morphogenesis; insulin-like growth factor binding protein 2

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 463-467]

吸入糖皮质激素(ICSs)是控制儿童哮喘的一线药物^[1]。持续 ICSs 能改善哮喘症状,减少哮喘相

关的急诊及住院频次^[2]。但婴幼儿处于生长及肺泡发育的关键时期,使得外源性糖皮质激素的应用对

肺发育的影响及相关机制研究成为热点。

自上世纪 80 年代起,国内外学者已建立大鼠、羊等动物模型,研究外源性糖皮质激素的全身应用对肺发育的影响^[3]。Kovar 等^[4]认为处于生长发育期的肺组织对长期 ICSs 敏感。目前国内未见类似研究报告。本研究主要探讨长期维持 ICSs 对肺发育的影响。因大鼠生后肺泡化过程(生后 4~13 d)与婴幼儿肺泡期发育相似^[5],故以新生大鼠为动物模型,探讨 ICSs 对新生大鼠早期肺发育的影响。研究中采用雾化吸入与腹腔注射两种给药途径,以评价局部及全身应用糖皮质激素对生长发育影响的异同,其中局部用药选择布地奈德混悬液,该药为国内仅有的雾化吸入型糖皮质激素,因其高亲脂性,不适于腹腔注射给药,故全身用药选择水溶性的周身型激素地塞米松(DEX)。

1 材料和方法

1.1 材料

新生 SD 大鼠(南京医科大学实验动物中心);吸入用布地奈德混悬液(1 mg/2 ml,阿斯利康);生理盐水(上海百特医疗用品有限公司);地塞米松磷酸钠注射液(5 mg/1 ml,芜湖康奇制药有限公司);IGFBP-2 抗体、 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗(博奥森);ECL 化学发光液(北京康为世纪生物科技有限公司);INQUA NEB 压缩雾化机(百瑞公司,德国);Olympus 光学显微镜(日本);Laica 图像采集系统(德国);Syngene G:BOX 型凝胶成像系统(英国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物准备及药物干预

48 只新生大鼠随机分为 3 组:CONT 组(生理盐水雾化吸入 20 min/次, Bid)、BUD 组(0.02%布地奈德雾化吸入组, 20 min/次, Bid, 相当于婴幼儿布地奈德混悬液 1 mg/d)、DEX 组[0.2 mg/(kg·d)地塞米松腹腔注射组]。上述各组内按给药时程分 7 d 给药组与 14 d 给药组。雾化给药方法:新生大鼠置于特制的密闭塑料容器内,由百瑞空气压缩泵雾化药液,每次放入 8 只新生大鼠。各组分别在连续给药 7 d(相当于人用药 6 个月)、14 d(相当于人用药 11 个月)后^[6],每组取 8 只大鼠,测量体重后用 10%水合氯醛麻醉处死,取其肺组织作为新生大鼠肺发育模型,同时记录湿肺重量(g),计算肺系数,肺系数=肺湿重/体重 \times 100%。

1.2.2 病理切片制作及光镜观察

4%多聚甲醛固定肺组织,经脱水、石蜡包埋后,制备 5 μ m 厚的石蜡切片,行 HE 染色,在 200 倍光镜下观察肺泡化程度,经 Laica 图像采集系统采集图片,每个样本随机取 6 个视野。Image-Pro Plus 6.0 测定每个视野内肺泡数、肺泡腔面积及肺泡间隔厚度。

1.2.3 蛋白免疫印迹方法检测 IGFBP-2 的表达

按每 0.1 g 肺组织加入 1 ml 蛋白提取裂解液的比例提取肺总蛋白,组织冰上匀浆、裂解处理 30 min,收集裂解液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清。BCA 法测蛋白浓度。取 50 μ g 总蛋白与 2 \times SDS-Loading buffer 混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后上样,10% SDS-PAGE 凝胶电泳 70 min,半干式转膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入兔抗鼠 IGFBP-2 (1:200)、 β -actin (1:1 000) 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:50 000),室温平稳摇动 1 h, TBST 洗膜 3 次后, ECL 显色, G:BOX 型凝胶成像系统进行扫描。

1.3 统计学方法

定量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用软件 SPSS13.0 统计分析。数据经方差齐性检验后,单因素多水平比较采用方差分析,组内均数两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 激素对新生大鼠体重及肺系数的影响

7 d 与 14 d 两给药时程下, BUD 组体重与 CONT 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), DEX 组体重较 CONT 组明显下降($P < 0.01$, 表 1)。

连续给药 7 d 时, BUD 组与 DEX 组肺系数均较 CONT 组明显下降($P < 0.01$); 给药 14 d 后, BUD 组肺系数较 CONT 组明显减小($P < 0.01$), 但 DEX 组肺系数与 CONT 组间无统计学差异($P > 0.05$, 表 2)。

2.2 肺组织形态学观察

给药 7 d 后, BUD 组和 DEX 组肺泡数量较 CONT 组减少($P < 0.01$), 肺泡腔增大($P < 0.05$), 肺泡间隔明显变薄($P < 0.01$)。BUD 组和 DEX 组间上述肺泡形态学指标间无统计学差异($P > 0.05$, 图 1, 表 3)。

给药 14 d 后, BUD 组和 DEX 组肺泡数量较 CONT 组减少($P < 0.01$), 肺泡腔增大($P < 0.05$), BUD 组和 DEX 组肺泡间隔平均厚度较 CONT 组减少, 但差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 2, 表 4)。

2.3 肺组织 IGFBP-2 蛋白表达

7 d 与 14 d 给药方案, IGFBP-2 在肺组织中的

表 1 连续给药 7 d 组新生大鼠体重及肺系数比较

Table 1 Body weight and lung index of neonatal rat after different treatments for 7 days ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前体重(g)	给药 7 d 组体重(g)	肺系数
CONT 组	8	7.85 ± 0.37	16.05 ± 1.58	0.99 ± 0.07
BUD 组	8	7.86 ± 0.32	17.29 ± 0.89	0.73 ± 0.02**
DEX 组	8	8.22 ± 0.58	11.85 ± 1.30**	0.84 ± 0.12**

与 CONT 组比较, **P < 0.01。

表 2 连续给药 14 d 组新生大鼠体重及肺系数比较

Table 2 Body weight and lung index of neonatal rat after different treatments for 14 days ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	干预前体重(g)	给药 14 d 组体重(g)	肺系数
CONT 组	8	7.98 ± 0.45	36.62 ± 3.41	0.74 ± 0.07
BUD 组	8	8.18 ± 0.38	34.82 ± 2.26	0.46 ± 0.12**
DEX 组	8	7.94 ± 0.64	24.19 ± 1.83**	0.73 ± 0.13

与 CONT 组比较, **P < 0.01。

表 3 给药 7 d 组肺形态学指标比较

Table 3 Morphologic markers of lung after different treatments for 7 days ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺泡数(个)	肺泡腔面积(μm^2)	肺泡间隔(μm)
CONT 组	8	151.33 ± 9.87	1 582.63 ± 556.83	24.45 ± 4.41
BUD 组	8	103.67 ± 15.70**	2 370.73 ± 1 015.72*	13.89 ± 3.87**
DEX 组	8	107.33 ± 4.51**	2 363.94 ± 1 034.95*	12.30 ± 3.02**

与 CONT 组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

表 4 给药 14 d 组肺形态学指标比较

Table 4 Morphologic markers after different treatments for 14 days ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肺泡数(个)	肺泡腔面积(μm^2)	肺泡间隔(μm)
CONT 组	8	115.25 ± 16.26	4 646.20 ± 1 037.70	12.13 ± 4.65
BUD 组	8	86.33 ± 10.12**	6 012.71 ± 1 693.81*	9.53 ± 3.52
DEX 组	8	83.00 ± 4.35**	5 994.45 ± 2 012.64*	8.88 ± 2.69

与 CONT 组比较, *P < 0.05, **P < 0.01。

表达均表现为 BUD 组、DEX 组强于 CONT 组, DEX 组表达量高于 BUD 组(图 3, 4)。

3 讨论

长期全身应用小剂量糖皮质激素致新生大鼠肺泡发育受阻, 肺泡结构简单化的现象已有多次报道。ICSs 在临床中已应用于小年龄组儿童, 但 ICSs 对肺发育的影响数据较少, 明确 ICSs 对肺生长发育的影响有重要临床意义。本研究将探讨长期 ICSs 对新生大鼠的生长及肺泡发育的影响。

本研究结果显示, 长期吸入 BUD 组大鼠的体重与 CONT 组相比无明显改变, 但肺系数较 CONT 组明显减小。长期小剂量应用 DEX 后, 大鼠体重较 CONT 组明显下降, 但肺系数与对照组间无明显的统计学差异。肺形态学数据显示, BUD 组与 DEX 组肺泡病理变化相似, 即肺泡间隔变薄, 肺泡数目减少, 肺泡腔增大。另外, IGFBP-2 在 BUD 组、DEX 组

肺组织中的表达较 CONT 组明显增高, 提示 IGFBP-2 可能与上述肺泡病理变化相关。

DEX 组大鼠的整体生长受抑制, 包括肺组织, 该现象已有报道^[7], 而 BUD 组仅肺生长受抑制, 提示 BUD 较 DEX 导致的全身不良反应小, 与 Masayuki 等^[8]研究结论相似。实验中观察到 DEX 组新生大鼠体重及体型均较同龄对照组小, 提示该组大鼠整体生长减慢, 该现象可能与外源糖皮质激素抑制多种组织内正常的细胞分裂有关^[7], 另外考虑与长期全身应用糖皮质激素致下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA) 受抑制有关^[9]。而 ICSs 时大多药物滞留于口咽部, 经消化道入血循环, 但大多经肝脏首关代谢失活, 仅少量有生物活性^[10], 且该量较全身小剂量糖皮质激素血药浓度小^[4], 因而 BUD 组未引起全身生长抑制。同时, 临床研究显示: ICSs 治疗 (BUD, 200 $\mu\text{g}/\text{d}$) 的第 1 年, 5 岁以上儿童可有短暂的生长减慢现象, 但该现象在后续治疗中没有持续^[2], 且长期接受 BUD 治疗

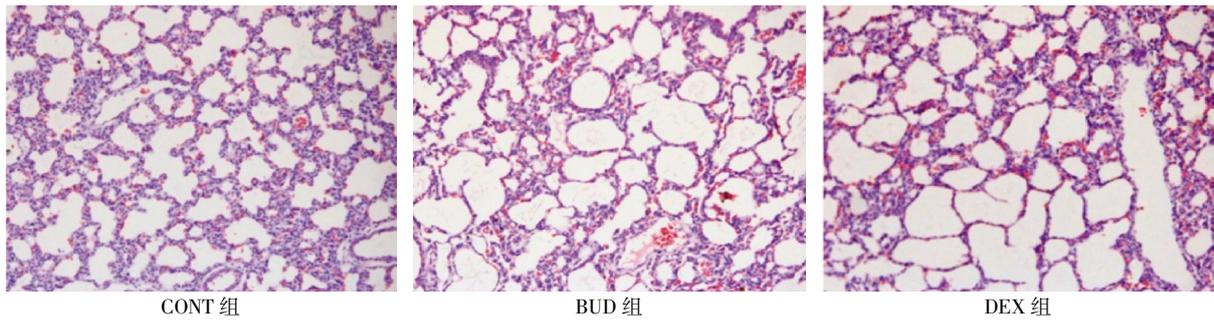


图 1 给药 7 d 各组光镜下肺组织 (HE, × 200)

Figure 1 Pathological observation of lung tissue after different treatments for 7 days (HE, × 200)

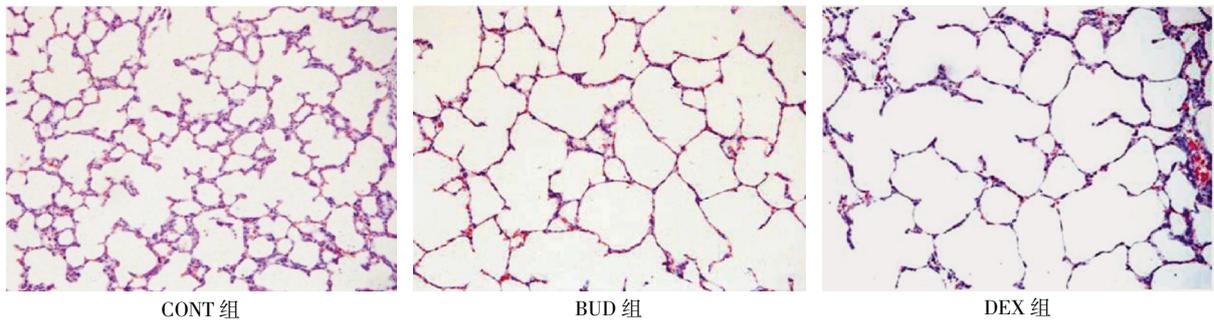


图 2 给药 14 d 各组光镜下肺组织 (HE, × 200)

Figure 2 Pathological observation of lung tissue after different treatments for 14 days (HE, × 200)

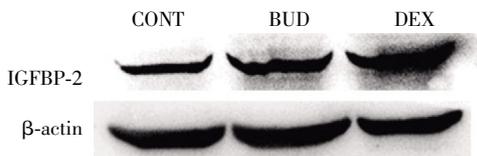


图 3 给药 7 d 各组大鼠肺组织 IGFBP-2 表达

Figure 3 The expression of IGFBP-2 in lung tissue after different treatments for 7 days

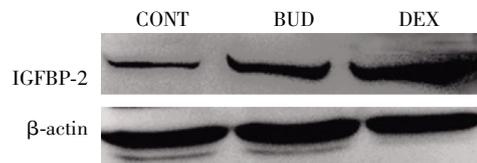


图 4 给药 14 d 各组大鼠肺组织 IGFBP-2 表达

Figure 4 The expression of IGFBP-2 in lung tissue after different treatments for 14 days

的哮喘儿童最终身高未受影响^[11]。1~3 岁反复喘息的患儿吸入丙酸氟替卡松(FP, 200 μg/d)治疗 1 年, 患儿生长及 HPA 轴功能未受影响^[12]。因此, ICSs 相对全身用药更安全, 但长期 ICSs 仍可影响肺发育, 故小年龄组儿童长期 ICSs 时药物剂量应控制在最小有效剂量。

连续给药 7 d 后, 两激素处理组均出现肺系数明显下降, 考虑与激素处理后的大鼠肺内 DNA 合成受抑制^[3], 影响肺组织生长有关。BUD 组仅肺生长受抑制, 故其肺系数下降较 DEX 组更显著, 但连续给药 14 d 后, DEX 组肺系数与 CONT 组无统计学差别, 与长期全身应用激素后, 大鼠整体生长亦明显受到抑制有关。

肺组织形态学结果显示, 新生大鼠长期吸入 BUD 或全身应用小剂量激素后, 两者肺实质的病理变化相似, 肺泡间隔变薄, 肺泡大而少, 呈肺泡化受

阻征象。7 d 给药组, 两激素处理组肺泡间隔变薄, 可能与糖皮质激素促进间隔双层毛细血管提前融合为单层有关, 该病理变化虽有利于肺泡气体交换, 但双层毛细血管提前成熟将影响次级间隔的形成, 进而抑制肺泡化, 加重肺泡化受阻的病变。给药 14 d 组, 3 组肺泡间隔较 7 d 组时均变薄, 但两激素处理组与对照组间无统计学差异。该现象可能与连续给药 14 d 后, 大鼠处于 19~20 d 龄, 对照组大鼠肺泡间隔微血管此时已发育成熟有关。

肺泡大而少的病理变化在连续给药 7 d 后已出现, 该病理变化与肺泡次级间隔形成减少相关, 机制可能与糖皮质激素干预肺泡化过程中细胞的增殖、凋亡有关^[13]。研究显示, 大鼠生后第 4 天时, 肺泡初级间隔细胞达到增殖高峰^[14], 利于初级间隔上成嵴形成次级间隔。当大鼠生后 1~4 d 腹腔注射 DEX 后, 该细胞增殖高峰消失, 随后肺泡密度减少、

肺泡囊腔增大^[12]。可见糖皮质激素能通过上述机制致肺泡化受阻。BUD、DEX 除可引起肺泡结构简单化外,也有研究发现,长期吸入 BUD 或全身应用小剂量 DEX 可致小气道壁面积及管壁厚度减小,该现象与激素诱导的上皮细胞凋亡有关^[4]。体外实验亦发现,BUD、DEX 刺激人原代气道上皮细胞及气道上皮细胞 1HAEo 时能诱导时间、剂量依赖性的细胞凋亡^[15],且 DEX 较 BUD 诱导气道上皮细胞凋亡的作用更强。

研究结果显示,BUD、DEX 组肺泡化受阻伴 IGFBP-2 过表达。IGFBP-2 属于胰岛素样生长因子(IGFs)系统,该系统有 IGF- I、IGF- II 两种多肽及相应受体(IGF- I R、IGF- II R)、6 种 IGF 结合蛋白(IGFBPs)与多种结合蛋白酶。IGF- I 在肺发育中显示出促生长活性,同时肺组织表达的 IGFBP-2 在调控 IGF- I 生理活性及调控 II 型肺泡表面上皮细胞(AEC II)的增殖、凋亡中起重要作用。

肺发育过程中,IGF- I 可与相应受体结合,通过胞内 MAPK/PI3K 通路促进 AEC II 的增殖,AEC II 的增殖有利于次级间隔的生长及呼吸膜面积的增加。IGFBP-2 过表达时与 IGF-1R 竞争性结合 IGF-1 阻断上述通路,同时 IGFBP-2 可直接抑制 AEC II 的增殖^[16]。体外研究发现,DEX 可上调肺泡上皮细胞内 IGFBP-2,抑制 AEC II 的增殖^[17]。因此,研究中新出生大鼠肺泡化受阻现象可能与激素上调肺组织 IGFBP-2 的表达相关。

综上所述,长期 ICSs 可影响肺组织的生长,抑制新生大鼠肺泡化过程,该现象可能与糖皮质激素上调 IGFBP-2 在肺组织中的表达有关;长期全身应用小剂量糖皮质激素可致新生大鼠整体生长受限,而长期 ICSs 对新生大鼠无上述影响。

[参考文献]

[1] National Asthma Education,Prevention Program. Expert panel report 3 (EPR-3):guidelines for the diagnosis and management of Asthma-Summary report 2007 [J]. J Allergy Clin Immunol,2007,120(5 Suppl):94-138

[2] Long-term effects of budesonide or nedocromil in children with asthma. The childhood asthma management program research group [J]. N Engl J Med,2000,343(15):1054-1063

[3] Sahebajami H,Domino M. Effects of postnatal dexamethasone treatment on development of alveoli in adult rats [J]. Exp Lung Res,1989,15(6):961-997

[4] Kovar J,Willet KE,Hislop A,et al. Impact of postnatal

glucocorticoids on early lung development [J]. J Appl Physiol,2005,98(3):881-888

[5] Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development-alveolar formation and growth [J]. Biol Neonate,2006,89(4):313-322

[6] Quinn R. Comparing rat's to human's age:how old is my rat in people years [J]. Nutrition,2005,21(6):775-777

[7] Fayon M,Jouvencel P,Carles D,et al. Differential effect of dexamethasone and hydrocortisone on alveolar growth in rat pups [J]. Pediatr Pulmonol,2002,33(6):443-448

[8] Kohno M,Haramoto M,Nakajima O,et al. Antedrug budesonide by intrapulmonary treatment attenuates bleomycin-induced lung injury in rats with minimal systemic adverse effects [J]. Biol Pharm Bull,2010,33(7):1206-1211

[9] Poetker DM,Reh DD. A comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids [J]. Otolaryngol Clin North Am,2010,43(4):753-768

[10] Derendorf H,Nave R,Drollmann A,et al. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma [J]. Eur Respir J,2006,28(5):1042-1050

[11] Agertoft L,Pedersen S. Effect of long-term treatment with inhaled budesonide on adult height in children with asthma [J]. N Engl J Med,2000,343(15):1064-1069

[12] Stefanovic IM,Verona E,Cicak B,et al. No effect of fluticasone propionate on linear growth in preschool children with asthma [J]. Pediatr Int,2011,53(5):672-676

[13] Luyet C,Burri PH,Schittny JC. Suppression of cell proliferation and programmed cell death by dexamethasone during postnatal lung development [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2002,282(3):477-483

[14] Kauffman SL,Burri PH,Weibel ER. The postnatal growth of the rat lung. II. Autoradiography [J]. Anat Rec,1974,180(1):63-76

[15] Dorscheid DR,Wojcik KR,Sun S,et al. Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids [J]. Am J Respir Crit Care Med,2001,164(10):1939-1947

[16] Chetty A,Manzo N,Waxman AB,et al. Modulation of IGF-binding protein-2 and -3 in hyperoxic injury in developing rat lung [J]. Pediatr Res,2005,58(2):222-228

[17] Mouhieddine OB,Cazals V,Kuto E,et al. Glucocorticoid-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells is associated with increased production of insulin-like growth factor binding protein-2[J]. Endocrinology,1996,137(1):287-295

[收稿日期] 2011-11-13