

SARS 患者尸检肺组织的 TGF- β_1 检测*

周经姣¹, 林汉良², 方丹云¹, 吴惠茜², 晏辉钧¹, 赵卫³, 龙北国³, 江丽芳^{1**}

(1. 中山大学中山医学院微生物学教研室; 2. 中山大学中山医学院病理学教研室, 广东广州, 510080; 3. 南方医科大学微生物学教研室, 广东广州, 510515)

Detection of TGF- β_1 in the Autopsy Lung Tissue from SARS Patients

ZHOU Jing-jiao¹, LIN Han-liang², FANG Dan-yun¹, WU Hui-xi², YAN Hui-jun¹, ZHAO Wei³,
LONG Bei-guo³, JIANG Li-fang^{1**}

(1. Department of Microbiology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pathology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: The expression of TGF and its role in the autopsy lung tissue of patients with Severe acute respiratory syndrome (SARS) was investigated. Pathological features of 2 autopsy lung tissues of SARS cases were studied by light microscope. TGF- β_1 expression in autopsy lung tissues from patients of SARS and control lung tissues was analyzed by semiquantitative method using immunohistochemistry staining. In one case, the major pathological changes of autopsy lung tissue were diffuse alveolar damage, hyaline membrane formed and alveolar exudative inflammation. In the other case, early pulmonary fibrosis and alveolar organization were presented except degeneration and exudation. The mean grey of TGF- β_1 in autopsy lung tissues of SARS was 103.43 ± 0.62 , 131.47 ± 2.64 in lung tissue of lobular pneumonia, 144.24 ± 0.09 in normal lung tissue. There were significant differences among three groups ($P < 0.05$). The SARS-coronavirus can lead to acute pulmonary interstitial and alveolar exudative inflammation. In addition, the alveolar cell proliferation and early pulmonary fibrosis were presented during the middle and later stages of SARS. The pulmonary lesion and fibrosis in the patients of SARS appear to be associated with the overexpression of TGF- β_1 . It means that anti-TGF- β_1 therapy may have a certain clinical significance on the prevention and treatment of pulmonary fibrosis of SARS.

Key words: SARS; Pulmonary lesion; Fibrosis; TGF- β_1

摘要: 为了研究 TGF- β_1 在严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS) 尸检肺组织中的表达情况及其在患者肺组织损伤中的可能作用, 对 2 例 SARS 尸检肺组织进行病理学观察; 应用免疫组化方法检测 TGF- β_1 在尸检肺组织及对照肺组织中的表达情况, 并进行半定量分析。结果显示病例一尸检肺组织主要病理改变为弥漫性肺泡损伤, 透明膜形成及渗出性炎症。病例二尸检肺组织除了上述改变外, 还伴有肺泡间质纤维增生和肺泡早期纤维化等机化性肺炎改变。TGF- β_1 平均灰度值在 SARS 患者肺组织为 103.43 ± 0.62 ; 小叶性肺炎组织为 131.47 ± 2.64 ; 正常肺组织中为 144.24 ± 0.09 。3 组比较有显著差别 (P 值 < 0.05)。SARS 病毒感染后可引起急性肺间质和肺泡渗出性炎症, 中后期病例还伴有肺泡间质纤维增生和肺泡早期纤维化; SARS 患者肺组织损伤及纤维化与 SARS 冠状病毒感染后 TGF- β_1 表达增强有关, 提示抗 TGF- β_1 治疗在 SARS 患者肺损伤、纤维化的预防、治疗过程中可能具有一定的临床意义。

关键词: 严重急性呼吸综合征; 肺损伤; 纤维化; TGF- β_1

中图分类号: R 511 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0225-03

收稿日期: 2004-11-10, 修回日期: 2005-01-26

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30340013); 广东省自然科学基金资助项目 (532014202028)

作者简介: 周经姣 (1971-), 女, 湖北洪湖籍, 讲师, 博士生, 从事微生物教学与研究。

** 通讯作者。E-mail: jianglf909@yahoo.com.cn, Tel: 020-87332160

严重急性呼吸综合征 (Severe acute respiratory syndrome, SARS), 亦称传染性非典型肺炎, 是一种由 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 引起的新的急性呼吸道传染病。以发热、咳嗽、急性肺损伤为主要临床特征, 部分病例可迅速发展为急性呼吸窘迫综合征, 死亡率高^[1]。SARS 急性期肺部出现广泛性渗出性炎症、弥漫性肺泡损伤与肺间质增生等典型的急性肺损伤的病理表现, 随着病情的延长, 肺部出现明显的纤维化^[2]。目前对其发病机制尚不清楚。本文应用显微镜观察及免疫组织化学检测等对两例诊断明确的 SARS 患者尸检肺组织进行 TGF- β_1 检测和病理学研究, 旨在探讨 TGF- β_1 与 SARS 患者肺损伤和纤维化相互之间的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

病例一: 女, 64 岁, 2003 年 1 月 31 日发病, 2003 年 2 月 11 日死亡; 病例二: 男, 56 岁, 2003 年 2 月 1 日接触 SARS 患者, 于 2003 年 2 月 3 日发病, 2003 年 2 月 23 日死亡。上述病例均符合卫生部制定的 SARS 临床诊断标准, 且回顾性 SARS 特异性 IgM、IgG 检测阳性 (ELISA, 华大吉比爱公司试剂)。以肺组织穿刺活检的小叶性肺炎组织以及正常肺组织为对照。

1.2 病理组织学观察

组织标本经 4% 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 常规 HE 染色, 光镜下作病理组织学观察。

1.3 免疫组织化学染色检测 TGF- β_1

制作 5 μ m 石蜡切片, 常规脱蜡脱水, 运用柠檬酸缓冲液微波抗原修复法进行抗原修复; 3% 过氧化氢孵育 5min, 以消除内源性过氧化物酶的活性; 加入 1:50 鼠抗人 TGF- β_1 抗体 37 $^{\circ}$ C, 45min; 每张切片加 50 μ L 聚合物增强剂 37 $^{\circ}$ C, 15min; 再加入 50 μ L 酶标记羊抗鼠/兔 IgG 多聚体 37 $^{\circ}$ C, 30min; DAB 显色, 苏木素复染、中性树胶封片, 镜检。(采用福州迈新公司试剂)

1.4 TGF- β_1 半定量分析

细胞核清晰、胞质有黄色或褐色着色的细胞为阳性细胞。用显微-微机彩色图形分析系统 (BHEC-100, 北京惠中公司) 对每张切片所有阳性细胞进行总的灰度分析。用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 组间差别用非参数统计 Kruskal-Wallis 方法检验。

2 结果

2.1 肺组织病理观察

在本实验中, 病例一尸检肺组织主要病理改变

为急性间质性渗出性炎, 肺间质及肺泡间隔内毛细血管高度扩张充血, 伴有巨噬细胞、淋巴细胞浸润。肺泡间隔及部分肺泡腔内红细胞漏出, 部分肺泡腔内伴有透明膜形成。弥漫性肺泡上皮细胞损伤, 部分上皮细胞坏死、脱落, 型肺泡上皮区域性增生较活跃。病例二尸检肺组织除有上述病理改变外, 还可见肺泡间质大量的成纤维细胞聚集、细胞外基质沉积, 肺泡内肾小球样机化明显。光镜下还可见肺泡上皮细胞浆内病毒包涵体样结构, 呈球形, 约红细胞大小, 嗜酸性染色。(见彩版图 1)

2.2 免疫组化结果

TGF- β_1 主要在巨噬细胞、淋巴细胞以及组织细胞如纤维母细胞和上皮细胞等中表达, 免疫组化阳性着色主要定位于细胞质。TGF- β_1 在正常肺组织有少量表达, 在小叶性肺炎组织的表达有所增强, 但在 2 例 SARS 病例尸检肺组织中表达明显增强。且病例二 TGF- β_1 染色较病例一更强。(见彩版图 2)

2.3 TGF- β_1 半定量分析结果

用显微-微机彩色图形分析系统进行半定量分析表明, 病例一尸检肺组织平均灰度值为 103.87, 病例二尸检肺组织平均灰度值为 102.98, 二者平均灰度值为 103.43 \pm 0.62; 小叶性肺炎组织平均灰度值为 131.47 \pm 2.64; 正常肺组织中平均灰度值为 144.24 \pm 0.09 (见表 1)。用非参数统计 Kruskal-Wallis 方法检验, SARS 尸检肺组织与正常肺组织、小叶性肺炎组织比较, P 值 < 0.05, 有显著差别。

表 1 不用肺组织的 TGF- β_1 检测结果

Groups	No. of cases	Grey
Normal lung tissue	2	144.24 \pm 0.09
Lung tissue from lobular pneumonia	2	131.47 \pm 2.64
Lung tissue from SARS	2	103.43 \pm 0.62

3 讨论

SARS 是由新型冠状病毒引起的一种急性传染病。其起病急, 主要病理学改变为弥漫性肺泡和肺间质损伤。疾病早期 (1-2 周) 主要表现为肺泡内水肿和透明膜形成, 淋巴细胞浸润; 中期 (约 3-4 周) 表现为肺泡上皮细胞脱落并增生 (脱屑性肺炎改变) 和机化性改变; 后期 (约 5 周以后) 表现为肺间质纤维增生和纤维化^[3]。本研究中, 病例一于发病后第 12 天死亡, 病理检查发现肺间质及肺泡间隔内毛细血管高度扩张充血, 伴有巨噬细胞、淋巴细胞浸润; 肺泡间隔及部分肺泡腔内红细胞漏出, 部分肺泡腔内伴有透明膜形成, 符合 SARS 早期病理特征。病例二在发病后第 21 天死亡, 其病理表现除具有病例一

的基本特征外,还发现肺泡间质纤维大量增生和肺泡早期纤维化,呈肾小球样机化性肺炎改变,与 SARS 中后期病理改变一致。

TGF- β_1 是由 T 淋巴细胞、单核/巨噬细胞、血小板、成纤维细胞及上皮细胞等多种细胞分泌的重要的细胞因子,在肺炎和肺纤维化的发生、发展过程中起关键性作用。一方面它可趋化单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞等炎症到感染局部,促进 IL-2、TNF- α 等炎症介质的分泌,参与肺局部损伤及炎症过程;另一方面可促进成纤维细胞分化、生长及合成细胞外基质成分,如胶原、纤维连接蛋白、糖蛋白等,并能诱导肺组织表达高水平的结缔组织生长因子(CTGF),导致肺纤维化形成^[4]。在大多数哺乳动物组织中,TGF- β_1 有三种异构体(TGF- β_1 、 β_2 、 β_3)。在结节病、肺泡炎、石棉肺和放射性引起的肺纤维化患者的肺组织中,均发现 TGF- β_1 表达明显增高^[5]。

在本实验中,TGF- β_1 在 SARS 患者肺组织染色较对照组明显增强,且病例二肺组织 TGF- β_1 染色较病例一更强,主要在单核/巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞以及一些肺泡上皮细胞中表达。这一结果支持 TGF- β_1 是一个关键性的纤维化介质的观点,提示 TGF- β_1 与 SARS 患者肺泡间质纤维增生和肺泡早期纤维化有关。并提示在预防和治疗 SARS 患者肺组织纤维化的过程中,TGF- β_1 可能可作为一个理想靶位,应用 TGF- β_1 抗血清或抗体、

TGF- β_1 可溶受体可能可以抑制或减轻 SARS 患者肺纤维化程度。

SARS 患者在病变早期就出现明显肺损伤,影响肺通-换气功能,在病程中后期,肺间质纤维化压迫肺泡,进一步加重肺通-换气功能,严重者导致呼吸衰竭而死亡。另外,有研究表明,部分 SARS 康复期患者遗留肺间质纤维化改变,有的甚至影响肺功能。因而,减轻肺损伤、预防肺纤维化在 SARS 患者治疗中尤为重要。对于抗 TGF- β_1 在预防和治疗 SARS 肺损伤、纤维化中的作用有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Rota P A, Oberste M S, Montoe S S, *et al.* Characterization of a novel coronavirus associate with severe acute respiratory syndrome[J]. *Science*, 2003, 300: 1394-1399.
- [2] 丁彦青,王慧君,申洪,等. 严重急性呼吸综合征病原体检测及临床病理学观察[J]. *中华病理学杂志*, 2003, 32: 195-200.
- [3] 王德文,李 宁,赵景明,等. 严重急性呼吸综合征不同时间死亡患者的病理变化及其特征[J]. *解放军医学杂志*, 2003, 28: 692-696.
- [4] 魏路清,董 彦. 肺纤维化发病机制及治疗策略的新观念[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2003, 23: 38-41.
- [5] Broekelmann T J, Limper A H, Colby T V, *et al.* Transforming growth factors β_1 is presented at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 88: 6642-6646.

彩 版

周经姣, 等 SARS患者尸检肺组织的TGF- β 检测 (正文见225页)

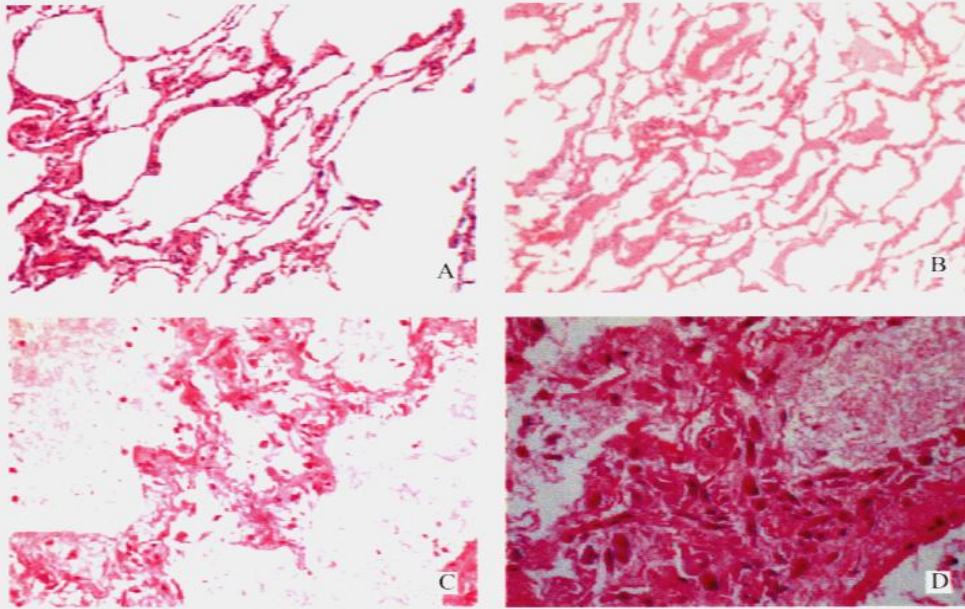


图1 肺组织 HE 染色结果

Fig.1 Result of HE stain in lung tissue

A. Normal lung tissue; B. Lung tissue of lobular pneumonia; C. Autopsy lung tissue from No.1 SARS case; D. Autopsy lung tissue from No.2 SARS case.

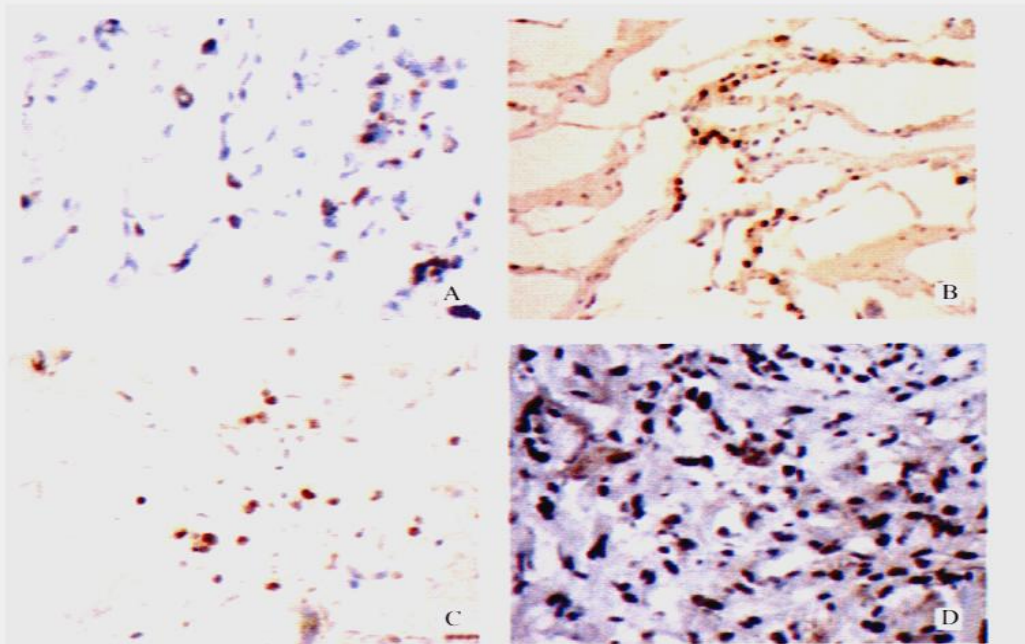


图2 肺组织TGF- β 免疫组化染色结果

Fig.2 Result of TGF- β immunohistochemical stain in lung tissue

A. TGF- β expression in normal lung tissue by immunohistochemical stain; B. TGF- β expression in lung tissue of lobular pneumonia by immunohistochemical stain; C. TGF- β expression in autopsy lung tissue from No.1 SARS case by immunohistochemical stain; D. TGF- β expression in autopsy lung tissue from No.2 SARS case by immunohistochemical stain.