

· 实验研究 ·

# 改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清涎液化糖链抗原-6和基质金属蛋白酶-7水平的相关性

林佩璜 黄艺君 康卓 徐武 吕国荣

**摘要** 目的 探讨改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清涎液化糖链抗原-6(KL-6)和基质金属蛋白酶-7(MMP7)水平的相关性。方法 将33只新西兰雄兔随机分为实验组(18只)和对照组(15只),其中实验组经气管灌注盐酸博来霉素建立兔肺纤维化模型,对照组灌注等量生理盐水,造模后分别于第14、21天随机抽取实验组和对照组各5只兔进行肺部超声检查及测定血清KL-6和MMP7水平,然后处死行病理学检查。余兔(实验组8只和对照组5只)在第21天按照上述方法再次灌注后于第42天行上述检查。分析改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清KL-6和MMP7水平的相关性。结果 与对照组比较,实验组第14、21及42天改良肺部超声评分明显增加,两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );与对照组比较,实验组血清KL-6、MMP7水平明显升高(均 $P<0.05$ ),其中第21、42天血清KL-6、MMP7水平与第14天比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ ),第42天血清MMP7水平与第14、21天比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清KL-6、MMP7水平均呈正相关( $r=0.844, 0.751$ , 均 $P<0.05$ )。结论 改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清KL-6、MMP7水平均呈正相关。

**关键词** 改良肺部超声评分;血清标记物;肺纤维化,兔  
[中图分类号]R445.1 [文献标识码]A

## Correlation between modified pulmonary ultrasound score and serum salivation liquefied glycol chain antigen-6, matrix metalloproteinase-7 levels in rabbits with pulmonary fibrosis

LIN Pei Huang, HUANG Yijun, KANG Zhuo, XU Wu, LYU Guorong  
Quanzhou Medical College, Fujian 362000, China

**ABSTRACT Objective** To investigate the correlation between modified pulmonary ultrasound score and serum salivation liquefied glycol chain antigen-6 (KL-6), matrix metalloproteinase-7 (MMP7) levels in rabbits with pulmonary fibrosis. **Methods** Thirty-three New Zealand male white rabbits were randomly divided into experimental group ( $n=18$ ) and control group ( $n=15$ ). The experimental group was intratracheally injected with bleomycin hydrochloride to establish rabbit pulmonary fibrosis model, while the control group was perfused with the same dose saline. After modeling, 5 rabbits in the experimental group and 5 rabbits in the control group were randomly selected on days 14 and 21 for lung ultrasound examination and determination of serum KL-6 and MMP7 levels. The remaining rabbits (8 rabbits in experimental group and 5 rabbits in control group) underwent the above examinations on day 42 after perfusion according to the above methods on day 21. The correlation between modified lung ultrasound score and serum KL-6, MMP7 levels were analyzed. **Results** Compared with the control group, the modified lung ultrasound score were significantly increased in the experimental group after bleomycin perfusion on days 14, 21 and 42, there were significant differences between the two groups (all  $P<0.05$ ). Compared with the control group, the levels of KL-6 and MMP7 in the experimental group were significantly increased (both  $P<0.05$ ). Compared with day 14, there were statistically significant differences of the levels of serum KL-6 and MMP7 on days 21 and 42 (all  $P<0.05$ ). There were significant differences of serum MMP7 on day 42 compared with that on days 14 and 21 (both  $P<0.05$ ). Modified lung ultrasound score was positively correlated with serum KL-6, MMP7 levels ( $r=0.844, 0.751$ , both  $P<0.05$ ). **Conclusion** The modified pulmonary ultrasound score is positively correlated with serum KL-6, MMP7 levels in rabbits with pulmonary fibrosis.

**KEY WORDS** Modified lung ultrasound score; Serum markers; Pulmonary fibrosis, rabbit

基金项目:泉州市高层次人才计划项目(2018C071R);泉州市科技计划项目(2018Z168)

作者单位:362000 福建省泉州市,泉州医学高等专科学校(林佩璜、吕国荣);福建医科大学附属第二医院超声科(黄艺君、康卓、徐武)

通讯作者:吕国荣, Email: lgr\_feus@sina.com

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、进行性发展的致死性疾病,其特征是纤维化组织在肺实质内异常积聚,是肺间质疾病最严重的转归,该病的患病率和病死率逐年增加,预后极差<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2-3]</sup>表明,血清涎液化糖链抗原-6 (KL-6) 和基质金属蛋白酶-7 (MMP7) 是评估 IPF 进展的重要标记物,且血清生物标志物 KL-6 水平随时间的变化与肺间质疾病的进展和生存率密切相关。本团队前期临床研究<sup>[4-5]</sup>证实改良肺部超声评分法可用于评估肺间质疾病的严重程度。本实验通过分析改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清 KL-6 和 MMP7 水平的相关性,旨在为临床评估肺纤维化提供参考。

## 材料与方法

### 一、实验动物及分组

清洁级健康新西兰雄兔 33 只,体质量 3.0~4.0 kg,平均 (3.66±0.26) kg,由上海市松江区松联实验动物场提供,动物许可证号:SCXK (沪) 2017-0008,合格证号:20170008002155。将 33 只新西兰雄兔随机分为实验组 (18 只) 和对照组 (15 只)。

### 二、实验方法

1. 实验动物模型建立:实验组经 3% 戊巴比妥 (厦门百赛生物科技有限公司,生产批号:AF7012) 1 ml/kg 麻醉后,使用 20 G 留置针向足端穿刺环甲膜进入气管,将盐酸博来霉素 15 mg (海正辉瑞制药有限公司,生产批号:H20055883) 溶解于 3 ml 生理盐水中,按 8 mg/kg 的剂量灌注于肺内<sup>[6]</sup>。对照组依照实验组同样的方法将等量生理盐水灌注于肺内。造模后,分别于第 14、21 天抽取实验组和对照组各 5 只兔进行肺部超声检查并于耳缘静脉抽取全血 10 ml,最后处死行病理学检查。余实验组兔 (8 只) 在第 21 天时再次灌注盐酸博来霉素 (6 mg/kg),对照组 (5 只) 灌注等量生理盐水,于第 42 天进行超声检查并于耳缘静脉抽取全血 10 ml,然后处死行病理学检查。

2. 超声检查:使用日立 HI VISION Preirus 彩色多普勒超声诊断仪,线阵探头,频率 6~15 MHz。待实验兔脱毛后,将胸廓分为左、右两肺区,每侧胸廓第 1~3 肋间为上部,4~7 肋间为下部,共 4 个肺区 (右上、右下、左上、左下),每个肺区沿肋间选取最严重的切面进行横向扫查,观察胸膜线、B 线及并发症,并向肺内注射少量亚甲蓝进行标记。上述 4 个肺区评分相加之和为肺部超声总评分。改良肺部超声评分法由 B 线数量、胸膜线变化及并发症 3 个部分组成,见表 1。

表 1 改良肺部超声评分法

超声征象	每个肺区评分
B 线	
无	0
散在或 <4 条	1
部分融合或 4~6 条	2
白肺	3
胸膜线	
正常	0
增厚	1
不规则、毛糙	2
不连续、呈碎片状	3
并发症	
Am 线 (无/有)	0/4
胸腔积液 (无/有)	0/5

3. 兔血清采集及血清 KL-6 和 MMP7 水平的测定:将从耳缘静脉抽取的 10 ml 全血室温静置 2 h 后,使用台式普通离心机 (德国 eppendorf 公司) 3000 r/min 离心 15 min,取上层血清。采用 ELISA 法,按照 KL-6 和 MMP7 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司,生产批号分别为 20210817-72012A 和 20210817-72524A) 说明书要求,使用 SpectraMax 340PC 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司) 测定 KL-6、MMP7 水平。

4. 肺组织病理学检查:处死实验兔后,取标记处肺组织,常规石蜡包埋、固定、脱水、切片,采用 Masson 染色。于光学显微镜 (CX23, 日本 Olympus 公司) 下观察兔肺组织情况。

### 三、统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较行 *t* 检验。不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示,组间及组内两两比较行非参数秩和检验。相关性分析采用 Spearman 分析法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

实验组灌注 18 只,病理证实均存在肺纤维化,其中第 26 天死亡 1 只,第 39 天死亡 2 只,最终存活 15 只 (83.3%)。对照组 15 只均存活。实验组第 14 天表现为肺泡间隔轻度增厚,肺泡间少量胶原纤维沉积;第 21 天表现为肺泡间较多胶原纤维沉积;第 42 天表现为肺泡间大量胶原纤维沉积。对照组第 14、21、42 天均未出现肺纤维化的病理改变,肺泡间隔无胶原纤维沉积。见图 1。

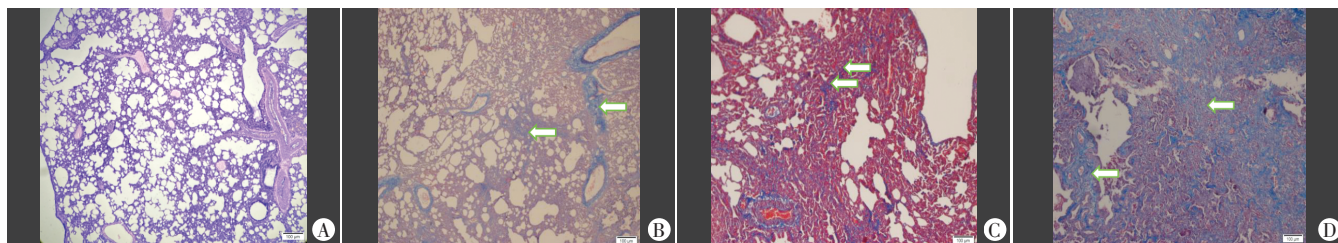
### 一、两组兔不同时间点改良肺部超声评分比较

对照组兔肺可探及 1~2 条 B 线,未见胸膜及胸膜

下改变。实验组兔肺均可探及散在B线、融合B线及胸膜线增厚、不规则、破碎等征象(图2)。与对照组比较,实验组第14、21及42天改良肺部超声评分均明显增加,且两两比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ ),于第42天达最高。见表2。

### 二、两组兔不同时间点血清KL-6、MMP7水平比较

与对照组比较,实验组兔血清中KL-6、MMP7水平均明显升高(均 $P<0.05$ );且随着时间延长而升高,其中,第21、42天兔血清KL-6、MMP7水平与第14天比差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ ),实验组第42天兔血清MMP7水平与第14、21天比较差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。见表2。



A: 对照组第42天肺泡间隔无增厚,肺泡间无胶原纤维沉积;B: 实验组第14天肺泡间少量胶原纤维沉积;C: 实验组第21天肺泡间较多胶原纤维沉积;D: 实验组第42天肺泡间大量胶原纤维沉积。箭头示染色呈蓝色的胶原纤维

图1 两组兔肺组织病理图(Masson染色, ×100)



A: 对照组第21天声像图(箭头示A线);B: 实验组第14天声像图(细箭头示散在B线;粗箭头示胸膜线增厚);C: 实验组第42天声像图(粗箭头示融合B线;细箭头示胸膜线不规则、破碎)

图2 两组兔肺超声表现

表2 两组兔不同时间点改良肺部超声评分及血清KL-6、MMP7水平比较

组别	改良肺部超声评分(分)			KL-6(U/mol)			MMP7(U/mol)		
	第14天	第21天	第42天	第14天	第21天	第42天	第14天	第21天	第42天
实验组	12.00(6.50, 13.50)	15.00(12.50, 16.50)*	18.00(16.50, 23.00)*#	185.28±2.98	196.17±5.00*	226.22±24.78*	487.10±23.77	513.40±3.74*	552.57±7.20*#
对照组	0.00(0.00, 0.50)	0.00(0.00, 1.00)	1.00(0.00, 1.00)	174.23±3.91	178.93±0.99	182.59±4.50	455.03±14.75	468.13±8.65	476.13±19.61

与第14天比较,\* $P<0.05$ ;与第21天比较,# $P<0.05$ 。KL-6: 涎液化糖链抗原-6;MMP7: 基质金属蛋白酶-7

### 三、改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清KL-6和MMP7水平的相关性

改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清KL-6、MMP7水平均呈正相关( $r=0.844, 0.751$ , 均 $P<0.05$ )。见图3, 4。

### 讨论

IPF是最常见的不明原因的间质性肺疾病,预后极差,5年生存率仅20%~40%<sup>[7]</sup>,因此早期诊断及评估IPF严重程度对其预后至关重要。气管内灌注博来霉素可导致肺泡上皮细胞损伤,诱导炎性细胞浸润及炎性

介质释放;在亚急性阶段,病变区域会出现成纤维细胞的增殖和分化,以及促纤维化细胞因子的表达;后

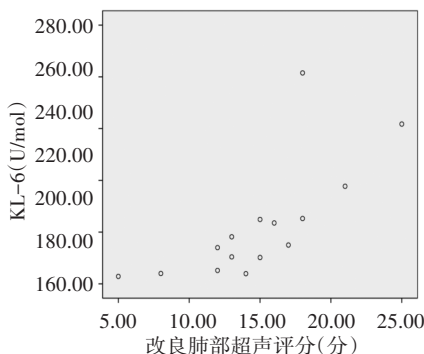


图3 改良肺部超声评分与血清KL-6水平的相关性分析散点图

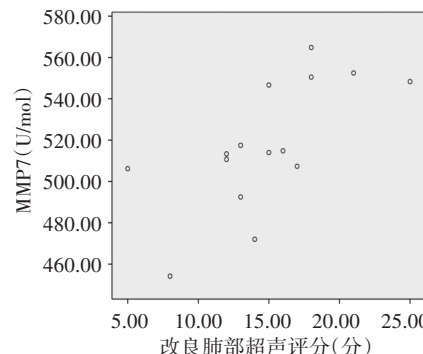


图4 改良肺部超声评分与血清MMP7水平的相关性分析散点图



期则会出现细胞外基质的大量沉积和纤维化病变<sup>[8]</sup>。文献<sup>[9-10]</sup>指出博来霉素单次给药存在可逆性,但通过重复灌注可以解决这一问题<sup>[11]</sup>,因此本实验在第 21 天对一组实验兔进行重复灌注。本实验中在各个时间点均对实验兔进行超声检查,若出现 B 线则表明存在肺间质疾病,证明造模成功,可以进行后续实验。另外,本实验经病理检查结果也证实,气管内灌注博来霉素后肺纤维化程度随时间延长而加重,于第 42 天时肺纤维化程度明显增加,证实该建模方法有效。

近年来,肺部超声在 IPF 影像研究中的应用越来越广泛,但目前关于肺部超声评分系统尚存争议。以往研究<sup>[12-13]</sup>利用 B 线数量评价 IPF 的严重程度,但仅依据 B 线数量评分并不全面,还应考虑胸膜线及并发症情况。Buda 等<sup>[14]</sup>发现 IPF 超声征象中除 B 线及胸膜线之外,还有 Am 线,其为源于胸膜的广泛垂直伪像,多发平行伪像呈水平排列,延续至屏幕边缘,底部宽,顶部窄。本实验采用团队前期研究<sup>[4-5]</sup>提出的改良肺部超声评分法,将 B 线、胸膜线、Am 线及胸腔积液纳入该评价系统,且对 B 线及胸膜线进行了更加细致的分类。本实验结果显示,实验组第 14、21 及 42 天改良肺部超声评分均较对照组明显增加(均  $P < 0.05$ ),且实验组不同时间点两两比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ),随着时间延长兔肺纤维化的程度越来越严重,评分也越来越高,证实改良超声评分法可以评估肺纤维化的严重程度。

尽管目前 IPF 的发病机制尚无定论,但研究<sup>[2-3]</sup>证实 IPF 患者血清中某些血清标记物如 KL-6、MMP7 水平升高。KL-6 通常由肺泡 II 型细胞和呼吸性细支气管上皮细胞产生,在末端支气管上皮的基底细胞中呈弱表达,IPF 患者因 II 型肺泡上皮细胞增生,导致 KL-6 大量表达,过表达的 KL-6 通过破坏的肺基底膜进入血清中<sup>[15]</sup>,导致血清 KL-6 水平升高。MMP7 是 MMPs 蛋白家族之一,通常在肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞和细支气管上皮细胞中表达,可降解多种细胞外基质成分,促进细胞迁移、增殖,在组织重塑及创伤修复中发挥作用<sup>[3]</sup>。本实验结果表明,与对照组比较,实验组第 14、21 及 42 天兔血清 KL-6、MMP7 水平均明显升高(均  $P < 0.05$ ),且实验组不同时间点两两比较差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。本实验结果还显示,改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清 KL-6、MMP7 水平均呈正相关( $r = 0.844, 0.751$ , 均  $P < 0.05$ ),进一步表明改良肺部超声评分法可间接反映肺纤维化的程度。

综上所述,改良肺部超声评分与肺纤维化兔血清

KL-6、MMP7 水平均呈正相关。由于本实验样本量小,未来需扩大样本量进一步探讨。

#### 参考文献

- [1] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management[J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32.
- [2] Jiang Y, Luo Q, Han Q, et al. Sequential changes of serum KL-6 predict the progression of interstitial lung disease[J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(8): 4705-4714.
- [3] Bauer Y, White ES, de Bernard S, et al. MMP-7 is a predictive biomarker of disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *ERJ Open Res*, 2017, 3(1): 00074-2016.
- [4] 张颖, 连细华, 吕国荣, 等. 改良经胸肺部超声评分法对间质性肺疾病的诊断价值[J]. *中华超声影像学杂志*, 2020, 29(9): 749-753.
- [5] Lyu GR, Zhang Y, Wang ZH. Modified scoring method for COVID-19 pneumonia[J]. *J Ultrasound Med*, 2021, 40(2): 429-431.
- [6] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(4): 442-452.
- [7] Karampitsakos T, Tzilas V, Tringidou R, et al. Lung cancer in patients with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2017, 45(3): 1-10.
- [8] Espindola MS, Habieli DM, Narayanan R, et al. Targeting of TAM receptors ameliorates fibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 197(11): 1443-1456.
- [9] Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, et al. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: from biological mechanisms to counteractions[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97(1): 122-130.
- [10] Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, et al. Exploring animal models that resemble idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2017, 4(1): 118.
- [11] Degryse AL, Tanjore H, Xu XC, et al. Repetitive intratracheal bleomycin models several features of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(4): 442-452.
- [12] Xie HQ, Zhang WW, Sun S, et al. A simplified lung ultrasound for the diagnosis of interstitial lung disease in connective tissue disease: a Meta-analysis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2019, 21(1): 93.
- [13] Mohammadi A, Oshnoei S, Ghasemi-Rad M. Comparison of a new, modified lung ultrasonography technique with high-resolution CT in the diagnosis of the alveolo-interstitial syndrome of systemic sclerosis[J]. *Med Ultrason*, 2014, 16(1): 27-31.
- [14] Buda N, Piskunowicz M, Porzezińska M, et al. Lung ultrasonography in the evaluation of interstitial lung disease in systemic connective tissue diseases: criteria and severity of pulmonary fibrosis—analysis of 52 patients[J]. *Ultraschall Med*, 2016, 37(4): 379-385.
- [15] Hamai K, Iwamoto H, Ishikawa N, et al. Comparative study of circulating MMP-7, CCL18, KL-6, SP-A, and SP-D as disease markers of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016(1): 4759040.

(收稿日期: 2021-11-27)