

甘利欣对肺纤维化大鼠的 TGF- β_1 , IFN- γ , IL-4 的影响

殷宗宝^{*}, 王洪武, 邓超, 程亮亮, 李英, 李海军, 陈栩栩

(海南省海口市人民医院暨中南大学湘雅医学院附属海口医院重症医学科, 海口 570208)

[摘要] 目的: 建立大鼠肺纤维化动物模型, 探讨甘利欣治疗博莱霉素致肺纤维化大鼠的作用机制。方法: 将大鼠 40 只, 随机分成 4 组: 博莱霉素所致大鼠肺纤维化模型组 (BLM 组)、生理盐水对照组、甘利欣治疗组、地塞米松 (dexamethasone, DXM) 治疗组。经实验后观察各组大鼠免疫组化 TGF- β_1 、IFN- γ 表达观察; HE 染色病理观察及测定各组大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4、IFN- γ 含量。结果: 甘利欣治疗组大鼠肺纤维化程度较轻微; 模型组大鼠肺组织 TGF- β_1 染色呈强阳性反应, IFN- γ 染色较淡, 而甘利欣治疗组 TGF- β_1 、IFN- γ 染色则相反。免疫组化 TGF- β_1 甘利欣组与地塞米松组相比, P 为 0.018。免疫组化 IFN- γ 甘利欣组与地塞米松组相比, P 为 0.618; 模型组大鼠血清 TGF- β_1 、IL-4 含量较高, IFN- γ 含量较低, 而甘利欣治疗组、DXM 治疗组则相反。大鼠血清 TGF- β_1 地塞米松组与甘利欣组相比 P 为 0.169; 大鼠血清 IL-4 地塞米松组、甘利欣组相比无差异; 地塞米松组和甘利欣组 IFN- γ 均数相比也无差异 ($P > 0.05$), 但两组与模型组相比 P 分别为 0.001, 0.000。结论: 甘利欣可以减轻大鼠肺纤维化损伤和肺组织的 TGF- β_1 、IL-4 的表达, 并降低他们在血清中的含量, 增加血清中的 IFN- γ 含量, 增强肺组织 IFN- γ 的表达。

[关键词] 肺纤维化; 博莱霉素; 干扰素 γ ; 地塞米松; 甘利欣; 转化生长因子 β_1 ; 白细胞介素 4

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0182-03

细胞因子网络在特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 的发生中发挥重要作用, 这些细胞因子能影响疾病过程中纤维化的进程, 一些细胞因子在调节及维持肺纤维化过程中具有决定性作用^[1]。甘利欣具有较强的非特异性的抗炎作用, 其抗炎作用与皮质醇类似, 可减少肝细胞的水肿、坏死, 同时甘利欣调节内源性类固醇水平, 而无盐皮质激素样副作用^[2]; 本实验根据甘利欣这一药理作用探讨其在肺纤维化治疗作用及对细胞因子的影响, 以期为临床防治肺纤维化奠定良好的实验基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂 普通双筒光学显微镜 (日本 Olympus), 酶标仪 (奥地利 TECAN 公司), 台式普通离心机 (上海安亨科学仪器厂), 电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司), 医用低温冰箱 (北京低温设备厂), 医用深低温冰箱 (Forma 公司), 纯水系统 (MLlipor 公司); 电热恒温干燥箱 (上海贺德实验设备有限公司), 超净工作台 (北京伟达净化技术研究所), 电热恒温水箱 (上海一恒科技有限公司),

Finnpipette 可调式移液器 [热电 (上海) 仪器有限公司], 甘利欣 (50 mg, 江苏正大天晴药业股份有限公司, 生产批号 2000011504); 注射用盐酸博莱霉素 (15 mg, 日本化药株式会社, 进口许可证号 X20000349); 地塞米松磷酸钠注射液 (5 mg, 西南药业股份有限公司, 生产批号 2000020604), 浓缩型兔抗大鼠 TGF- β_1 抗体 (Santa Cruz 公司), 浓缩型兔抗大鼠 IFN- γ 抗体 (Santa Cruz 公司), 即用型 SABC 试剂盒 (兔 IgG) (北京中杉金桥生物技术有限公司), DAB 显色试剂盒 (棕黄色) (北京中杉金桥生物技术有限公司), 黏片剂 APES (北京中杉金桥生物技术有限公司); 大鼠 TGF- β_1 ELISA, IL-4 ELISA, IFN- γ ELISA 试剂盒 (美国 Rapid Bio 公司), 戊巴比妥钠 (上海试剂一厂)。

1.2 动物来源及分组 健康清洁级雄性大鼠 40 只, 5 周龄, 体重 (180 \pm 20) g, 由温州医学院实验动物中心提供合格证号 SCXK0020158; 随机分为正常对照组、博莱霉素致肺纤维化组 (简称模型组)、地塞米松组 (DXM 组) 和甘利欣治疗组共 4 组, 每组 10 只, 常规喂养。

1.3 造模方法 模型组: 参考文献方法 [3] 略做改进。取 Wistar 大鼠, 以 2% 戊巴比妥钠经腹腔内注射麻醉后, 大鼠颈部适当备皮, 乙醇、碘酒消毒后于颈部正中切开皮肤, 分离并暴露气管, 直视下以 1

[收稿日期] 20100105(006)

[通讯作者] 殷宗宝, 硕士, 主治医师, 从事重症医学呼吸专业, Tel: 15203668565, E-mail: xiaobao6002@sohu.com

mL 注射器穿刺气管, 回抽出大量气体后证明确已在气管内, 依体重缓慢注入含博莱霉素的生理盐水 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (浓度 $4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 注入后立即旋转动物, 使药液在肺内分布均匀, 缝合颈部皮肤切口。正常对照组: 造模方法同模型组, 以等量的生理盐水代替博莱霉素气管内注入。甘利欣治疗组: 造模后第 28 d 开始, 按甘利欣 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量分别给已制成的肺纤维化动物模型在每天同一时间段内连续 14 d 腹腔内注射。DXM 组: 地塞米松注射液浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 造模后第 28 d 开始, 按 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量给已制成的动物模型在每天同一时间段内连续 14 d 腹腔内注射(剂量参照文献[3]并根据皮质类固醇剂量换算表换算)。模型组、对照组第 43 d 全部处死, 甘利欣组及 DXM 组动物分别于治疗后第 15 d 全部处死。

1.4 标本采集 2% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉, 然后使其仰卧平置固定四肢于手术台上, 切开腹腔, 取腹主动脉近心端断端全血 $6 \sim 8 \text{ mL}$, 室温静置 2 h 后, 将离心管置入离心机中以 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 度离心 15 min, 取上层血清于 3 mL 离心管内, 保存于 -70 冰箱中备用。肺组织标本的留取: 取大鼠左肺下叶和右肺下叶 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 大小的组织, 固定于 10% 甲醛溶液, 分别供免疫组化和 HE 病理观察。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 普通病理观察 肺组织常规, HE 染色。肺组织切片肺泡炎按 Szapiel 等^[4] 判断标准。- 无肺纤维化; + 轻度肺纤维化, 受累面积少于全肺 20%; ++ 中度肺纤维化, 受累面积占 20% ~ 50%; +++ 重度肺纤维化, 受累面积 $>50\%$, 肺泡结构紊乱。

1.5.2 肺组织 IFN- γ , TGF- β_1 检测 按免疫组化试剂盒(SABC 法) 进行。TGF- β_1 在博莱霉素致肺纤维化大鼠肺组织中的不同部位表达情况定量分析: 据 IHC 染色程度分为 4 级: 不显色为 -; 显色稍深于背景浅棕色为弱阳性 +; 显色部位与背景明显区别(棕色) 为阳性 ++; 显色部位深度着色(深棕色) 为强阳性 +++。肺组织 TGF- β_1 的 IHC 表达结果用 SPOT 及 IPP 图像采集分析系统处理, 40×10 视野下观察采集图像, Image-Pro Plus 6.0 版专业图像分析软件处理结果, 以累积吸光度值(A) 表示 TGF- β_1 表达的相对强度, 每张切片选 5 个免疫反应较强视野进行分析。IFN- γ 在博莱霉素致肺纤维化大鼠肺组织中的

不同部位表达情况定量分析: 其方法同 TGF- β_1 的定量分析方法。

1.5.3 大鼠血清 TGF- β_1 , IL-4, IFN- γ 的测定 (双抗体夹心 ELISA 法) 按试剂盒说明书要求进行。

1.6 统计学分析 资料采用 SPSS 11.0 统计软件进行, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用多组间的方差分析(F 检验), 如差异有统计学意义, 再进行组间两两比较, 用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理变化 普通病理观察: 正常对照组未出现明显的病理变化(图 1)。模型组肺泡壁增厚, 肺纤维化程度加重, 肺泡结构破坏, 肺泡腔消失(图 2)。甘利欣组肺泡腔内残留少量炎性细胞, 肺组织结构比较完整, 无肺纤维化形成(图 3)。DXM 组肺组织病理变化基本同甘利欣组。大鼠肺组织肺纤维化程度正常对照组大鼠几乎无肺炎及肺纤维化发生。模型组造模后第 43 d 肺纤维化广泛形成; 甘利欣组及 DXM 组: 与模型组相比甘利欣各组及 DXM 组大鼠肺纤维化发生率明显降低, 且程度轻。见表 1。

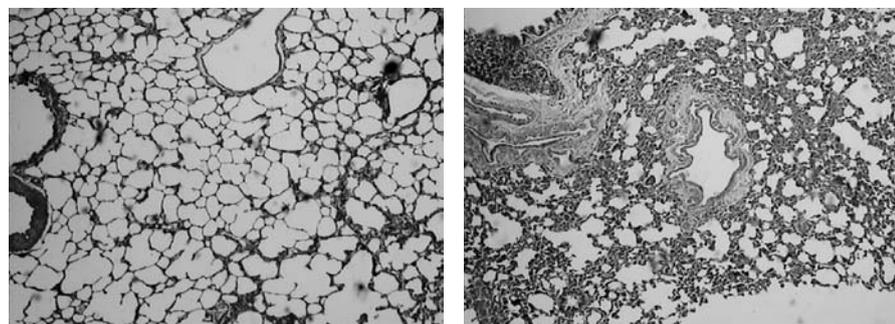


图 1 对照组(HE $\times 100$) 图 2 模型组(HE $\times 100$)

表 1 各组大鼠肺纤维化分级 (n=10)

组别	肺纤维化分级			
	-	+	++	+++
对照	0	0	0	0
模型	0	0	4	6
DXM	5	4	1	0
甘利欣	6	4	0	0

2.2 肺组织 TGF- β_1 和 IFN- γ 的表达 对照组只有较大血管、支气管壁的平滑肌细胞 TGF- β_1 呈中度阳性反应, 其余细胞均为弱表达。模型组病变区有少许炎细胞, 肺泡间质中 TGF- β_1 阳性反应的成纤维细胞、肌纤维母细胞等间质细胞明显, 阳性反应增强, 并可见沉积的细胞外间质呈片块状、粗条索状阳性着色(图 4); 甘利欣组、DXM 组阳性反应细胞较少,

基本为弱阳性反应(图 5);模型组细胞间质 IFN- γ 阳性反应较弱,而甘利欣组和 DXM 组阳性反应较强(图 6);TGF- β_1 和 IFN- γ 在肺内间质的定量表达,见表 2。

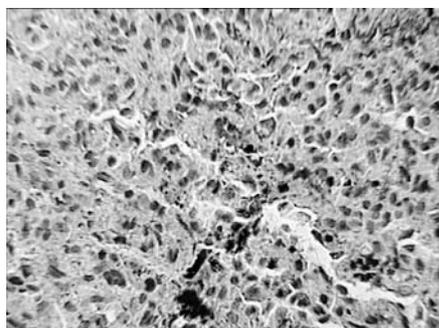
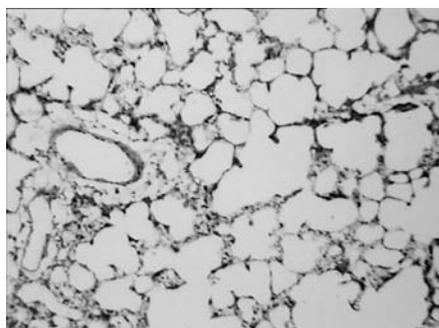


图 3 甘利欣组(HE $\times 100$)

图 4 模型组免疫组化 TGF- β_1 (DAB $\times 400$)

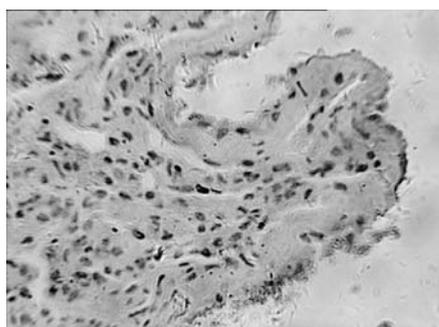
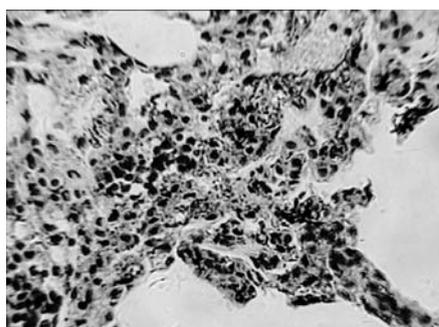


图 5 甘利欣组免疫组化 TGF- β_1 (DAB $\times 400$)

图 6 甘利欣组免疫组化 IFN- γ (DAB $\times 400$)

表 2 肺内间质 TGF- β_1 和 IFN- γ 的定量表达(A) ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $n=10$)

组别	TGF- β_1	IFN- γ
对照	13.47 \pm 6.86 ¹⁾	11.99 \pm 6.92 ¹⁾
模型	18.07 \pm 5.81	9.42 \pm 3.67
DXM	10.50 \pm 5.15 ¹⁾	13.85 \pm 7.48 ¹⁾
甘利欣	13.60 \pm 5.90 ^{1,2)}	14.49 \pm 5.79 ¹⁾

注:与模型组比较,¹⁾ $P < 0.01$;与地塞米松组比较,²⁾ $P < 0.05$ (下同)。

2.3 大鼠血清 TGF- β_1 , IL-4, IFN- γ 含量 见表 3。模型组大鼠血清 IL-4 和 TGF- β_1 含量均高于其他组,地塞米松组与甘利欣组 TGF- β_1 相比 P 为 0.169。血清 IL-4 地塞米松组、甘利欣组两两相比也无差异($P > 0.05$)。血清 IFN- γ 甘利欣组最高,与地塞米松组相比无差异($P = 0.389$),但两组与模型组相比 P 分别为 0.000, 0.001。

表 3 各组大鼠血清 TGF- β_1 , IL-4 和 IFN- γ 含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $n=10$)

组别	TGF- β_1	IL-4	IFN- γ
对照	0.71 \pm 0.26 ¹⁾	11.31 \pm 3.60 ¹⁾	53.89 \pm 28.38 ¹⁾
模型	1.55 \pm 1.06	27.27 \pm 15.97	11.33 \pm 10.49
DXM	0.95 \pm 0.50 ¹⁾	16.08 \pm 5.59 ¹⁾	54.48 \pm 23.83 ¹⁾
甘利欣	0.48 \pm 0.14 ^{1,2)}	8.73 \pm 4.20 ^{1,2)}	63.47 \pm 19.93 ^{1,2)}

3 讨论

实验证明 IFN- γ 可以下调小鼠巨噬细胞中

TGF- β_1 的过度表达,从而下调前胶原的表达,使间质中胶原积聚减少^[4]。由 TH1 细胞和 TH₂ 细胞分泌的不同细胞因子组成的细胞因子网络在 IPF 的发生中发挥重要作用,这些细胞因子介质能影响疾病过程中成纤维细胞的活化、增殖及胶原的沉积^[5]

本实验显示:甘利欣治疗组大鼠 HE 染色显示细胞基膜完好,成纤维细胞的增生及间质胶原纤维的沉积范围及程度显著轻于模型组;免疫组化表明肺组织内 TGF- β_1 阳性反应细胞较少,基本为弱阳性反应,强度和范围显著少于模型组,这与叶进燕等^[2]报道类似;而 IFN- γ 阳性反应细胞较多,较模型组表达明显。甘利欣治疗组血清中 TGF- β_1 , IL-4 含量明显较模型组低,而 IFN- γ 则相反。因此本实验结果表明甘利欣可以促进大鼠肺组织分泌 IFN- γ ,抑制 IL-4, TGF- β_1 的生成,具有较强的抗肺纤维化作用。虽然甘利欣组和 DXM 组相比在以上因子的表达上没有统计学意义,但是无盐皮质激素样副作用。

综上所述,甘利欣影响肺纤维化形成可能为以下几个方面:减少 TGF- β_1 蛋白表达,抑制成纤维细胞活化及肺间质的增殖;增加 IFN- γ 合成并促进其分泌,抑制成纤维细胞增殖,减少 I、II 型前胶原蛋白及细胞外基质的合成;降低 IL-4 的表达,使肺纤维化过程中失衡 Th 细胞因子亚型重新平衡,从而减轻肺泡炎症、减少前纤维组织形成因子及胶原、细胞外基质的合成。

[参考文献]

- [1] Lukacs N W, Hogaboam C, Chensue S W, et al. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2007, 120(Suppl): 5.
- [2] 叶进燕, 陈少贤, 徐红蕾, 等. 甘草甜素对大鼠肺纤维化的治疗作用及对转化生长因子表达的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 9(29): 636.
- [3] Luppi F, Cerri S, Beghe B, et al. Corticosteroid and immunomodulatory agents in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Res Pir Med, 2004, 98: 1035.
- [4] Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, et al. Molecular mechanisms of TGF (β) antagonism by interferon- γ and cyclosporine A in lung fibrosis[J]. Chest, 2001, 119(3): 797.
- [5] Lukacs N W, Hogaboam C, Chensue S W, et al. Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2001, 120: 5.

[责任编辑 邹晓翠]