文章编号:1000-5404(2005)02-0143-03

论著

干扰素γ对实验大鼠肺纤维化的治疗作用及机制的初步研究

高晓方,崔社怀 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察干扰素γ(IFN-γ)对实验大鼠肺纤维化的治疗作用,初步探讨其抗纤维化的作用机制。**方法** 大鼠分为正常对照组、博莱霉素(BLM)组、IFN-γ治疗组。气管内注入博莱霉素造模后,于当天开始每日给药,分别于第1、3、7、14、28天处死,测量PO_2,取肺组织和血清,行电镜观察及HE染色,免疫组化测定肺组织转化生长因子β_1(TGF-β_1)、纤维连接蛋白(FN)含量,ELISA测定血清IL-4含量及Western Blotting测定表面活性蛋白A(SP-A)含量。**结果** IFN-γ组与BLM组比较,前者肺纤维化程度明显减轻,PO_2显著升高($P<0.01$),TGF-β_1、FN表达减少,血清IL-4、SP-A含量显著减低($P<0.01$)。**结论** IFN-γ对博莱霉素所引起的肺纤维化具有明显的治疗作用,可能通过降低TGF-β_1、FN等前纤维化因子、调节失衡的T细胞亚群及减轻肺组织损伤发挥作用。

关键词:干扰素γ;肺纤维化;博莱霉素
中图法分类号:R-332;R563.130.5;R978.7 **文献标识码**:A

Curative effect of interferon gamma on pulmonary fibrosis in rats and the mechanisms

GAO Xiao-fang, CUI She-huai (Department of Respiratory Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effects of interferon gamma (IFN-γ) on pulmonary fibrosis induced by bleomycin in rats and the related mechanisms. **Methods** A total of 90 rats were randomly divided into 3 groups ($n=30$ in each group): normal control group, pulmonary fibrosis group, and IFN-γ treated group. On days 1, 3, 7, 14, and 28 after bolemycin treatment, 6 rats in each group were sacrificed. PO_2 was determined. The lungs and serum were collected for histopathological and electron microscopic examinations. The contents of transforming growth factor β_1 (TGF-β_1) and fibronectin (FN) were determined by immunohistochemistry, and the contents of IL-4 and surfactant protein A (SP-A) were detected by ELISA and Western blotting, respectively. **Results** PO_2 level increased significantly ($P<0.01$). The degrees of fibrosis, the levels of TGF-β_1 and FN, and the levels of IL-4 and SP-A decreased significantly in IFN-γ group as compared with those in the pulmonary fibrosis group ($P<0.01$). **Conclusion** IFN-γ has the inhibitory effect on pulmonary fibrosis induced by bleomycin possibly through decreasing TGF-β_1 and FN expressions, regulating unbalanced T cytokines, and attenuating lung injuries.

Key words: interferon gamma; pulmonary fibrosis; bolemycin

肺纤维化是多种病因引起的一种慢性炎症性间质性肺疾病,其主要病理改变为弥漫性肺泡炎、肺泡单位结构紊乱和肺纤维化。其发病机制尚未完全清楚。临床较为常用的糖皮质激素仅对部分患者有效,而免疫抑制剂、细胞毒性药物等二线药物则存在潜在的危险副作用[1]。干扰素γ(interferon gamma, IFN-γ)可抑制成纤维细胞增殖及胶原合成,但其抗纤维化作用的具体机制未能明确。本研究用博莱霉素(bleomycin, BLM)建立大鼠肺纤维化模型,观察IFN-γ对肺纤维化的治疗效果,并对其机制做初步研究。

1 材料和方法

1.1 仪器

TECAN酶标仪;TACNAI10透射电镜;Nova血气分析仪;Vesadoc 3000凝胶成像分析系统。

1.2 试剂

博莱霉素粉针(日本化药株式会社,X20000349);重组人干扰素γ(上海克隆生物高技术有限公司,沪克隆S-01号);兔抗大鼠转化生长因子β_1(TGF-β_1)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体(博士德);大鼠IL-4 ELISA试剂盒(晶美分装);兔抗大鼠SP-A抗体(Santa)。

1.3 动物分组及处理

健康Wistar大鼠90只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量(180±20)g。分为对照组、博莱霉

作者简介:高晓方(1977-),男,河南省太康县人,硕士,医师,主要从事肺纤维化机制及治疗方面的研究。电话:(023)68757245
通讯作者:崔社怀,电话:(023)68757265
收稿日期:2004-08-16;修回日期:2004-12-24

素致纤维化组(BLM组)和IFN-γ治疗组,每组30只。大鼠麻醉后无菌操作下行颈部正中切口,暴露气管,BLM组、IFN-γ组经穿刺后向气管内缓慢注入BLM 5 mg/kg(浓度4 mg/ml),对照组注入等量生理盐水。注入后立即旋转动物,使药液在肺内分布均匀[2]。将IFN-γ标准品用无菌生理盐水制成水溶液,浓度为12×10^4 IU/ml,IFN-γ组于造模后当天开始按每天15×10^4 IU/kg予以腹腔内注射[3];BLM组及对照组腹腔内注射等量生理盐水。各组分别于第1、3、7、14、28天处死,每时间段每组处死6只。

1.4 光镜、透射电镜观察

右肺中叶组织10%甲醛固定,石蜡包埋、切片,HE染色光镜观察;右肺上叶组织1 mm 32.5%戊二醛及1%锇酸双固定,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及枸橼酸铅双染色,透射电镜观察。

1.5 SABC法测定转化生长因子β_1(TGF-β_1)、纤维连接蛋白(FN)含量

石蜡切片常规脱蜡,3% H_2O_2浸灭活内源性酶,蒸馏水冲洗后山羊血清封闭,分别滴加兔TGF-β_1、FN抗体,4 ℃过夜,PBS漂洗后滴加生物素标记羊抗兔IgG,然后滴加SABC,37 ℃孵育20 min,漂洗后DAB显色。

1.6 动脉血氧分压测定

肝素化注射器于大鼠腹主动脉抽取动脉血,血气分析仪测定。

1.7 血清IL-4浓度测定

按照大鼠IL-4 ELISA试剂盒说明书要求的步骤进行。

1.8 Western blot检测血清SP-A含量

将样品进行预处理释放SP-A并与样品缓冲液按1∶1配制,上样量为每泳道15 μl,在15%的聚丙烯酰胺凝胶上进行分离,电泳条件为80 V、室温,然后以20 V、4 ℃经18 h转移到NC膜上,用5%脱脂奶粉封闭过夜,分别与1∶1 000抗SP-A多抗和1∶2 400辣根过氧化物酶标记的IgG相结合,然后用增强型化学发光试剂盒进行检测,将显影、定影后的X线胶片用于图像分析,与对照组相比得到相对含量。

1.9 统计学分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS统计软件进行统计学处理,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 肺组织病理变化

光镜观察对照组未出现明显的病理变化。BLM组第1天肺泡腔内出现巨噬细胞、中性粒细胞浸润;第3天肺泡腔内巨噬细胞、中性粒细胞及淋巴细胞渗出增多;肺泡隔稍增宽,肺泡炎加重;第7天开始形成严重肺泡炎,成纤维细胞开始增生,病灶内肺泡萎陷;第14天肺泡炎逐渐减轻,肺泡壁增厚,纤维组织合成增加;第28天肺泡炎不明显,肺纤维化程度加重,肺泡结构破坏,肺泡腔消失。IFN-γ组肺泡炎及肺纤维化程度较BLM组明显减轻,时间推迟,无严重肺泡炎及肺纤维化发生,第3天时出现轻度肺泡炎,第14天肺泡腔中炎性细胞渗出明显减少,第28天仅残留有少量炎性细胞。表明IFN-γ具有抗炎、抗纤维化作用。

2.2 肺组织超微结构变化

电镜下对照组肺泡上皮结构完整,细胞间连接比较紧密,上皮细胞为连续型,外侧有基膜。BLM组第7天肺泡Ⅱ型细胞微绒毛破坏,变稀少或消失,其内板层小体增多增大,空泡样变,且分泌到肺泡腔内,第14天肺泡Ⅰ型上皮细胞水肿,连接松散,基膜扭曲、缺损,成纤维细胞增生,功能活跃,间质胶原纤维增生,第28天间质胶原纤维大量堆积。IFN-γ组肺泡Ⅱ型细胞仅少数板层小体空泡样变,大部分上皮细胞基膜完好,成纤维细胞的增生及间质胶原纤维的沉积显著轻于BLM组。

2.3 肺组织TGF-β_1表达

对照组大血管平滑肌细胞等TGF-β_1呈中度阳性反应,其余均为弱表达。BLM组第1~3天部分炎症细胞、少量间质细胞及支气管上皮细胞呈阳性反应,第3~7天肺泡腔和间质中出现大量强阳性肺泡巨噬细胞,第7~28天肺泡间隔中TGF-β_1阳性反应增强,沉积的细胞外间质呈团块状、粗条索状阳性着色。IFN-γ组各时间段阳性反应细胞较少,基本为弱阳性反应。表明IFN-γ可抑制TGF-β_1表达。

2.4 肺组织纤维连接蛋白(FN)表达

对照组支气管周围、肺泡间隔以及肺泡囊开口处FN呈轻度阳性反应,为细纤维状。BLM组第1~3天上皮细胞、内皮细胞和少量间质细胞FN染色呈阳性,肺间质中出现网状、颗粒状FN,第7~14天肺泡隔内FN明显增多,细胞外基质中出现FN强阳性染色,第28天阳性染色较早期显著减少。IFN-γ组FN阳性染色于第7天开始逐渐减少,第14天后FN阳性染色仅见于小血管、小支气管粘膜下层,量少,各时间段均未出现强阳性染色。说明FN主要参与早期病变的发生、发展,IFN-γ可减少病变早期FN的过表达。

2.5 动脉血氧分压变化

BLM组PO_2第1天即出现明显下降,并随时间推移呈进行性降低,各时间段与对照组比较均有显著差异。IFN-γ组PO_2轻度降低,第3天后与BLM组比较显著升高(表1)。

表1 大鼠PO_2变化($n=6$, p/mmHg, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of PO_2 in rat ($n=6$, p/mmHg, $\bar{x}\pm s$)

Group	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
Control	104.28±4.15	102.01±3.38	102.51±3.16	100.16±3.92	98.46±3.21
BLM	90.23±2.72*	81.76±5.68**	75.79±6.65**	71.13±4.06**	62.63±6.01**
IFN-γ	98.55±3.78	93.98±4.15△	94.36±2.97△△	93.13±3.31△△	91.56±3.27△△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control group; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* BLM group

2.6 血清IL-4含量变化

对照组IL-4含量基本无变化。BLM组IL-4含量第1天即较对照组显著升高,第3天IL-4含量达高峰(119.54±7.51) pg/ml,其后逐渐降低,第28天接近正常水平。IFN-γ组IL-4含量轻度升高,第1、3、7、14天显著低于BLM组(表2)。说明IFN-γ可降低IL-4表达,使失衡的Th1、Th2因子细胞重新恢复平衡。

2.7 血清SP-A含量变化

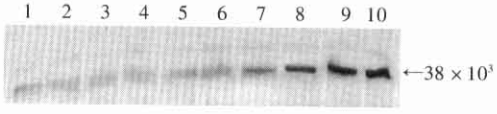
SP-A含量以目标条带单位面积光密度值与对照组条带单位面积光密度值的比值表示。BLM组大鼠血清SP-A含量于造模后即较对照组开始增加[比值为(157.4±23.9)%],并随时间推移不断升高,第28天与对照组比值达(459.2±57.7)%。血清SP-A含量早期升高幅度较大,后期上升曲线较前趋向平坦。IFN-γ组血清SP-A含量轻度升高,第28天与对照组比值仅为(144.0±32.4)%,各时间段与BLM组比较均存在显著性差异($P<0.05$)(图1)。

表 2　大鼠血清 IL-4 含量变化（$n=6$，ρ_B/pg·ml^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2　Changes of serum IL-4 in rats（$n=6$，ρ_B/pg·ml^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Group	1 d	3 d	7 d	14 d	28 d
Control	20.06±3.45	27.56±3.08	22.16±4.39	19.42±3.24	21.76±4.59
BLM	37.77±4.31**	119.54±7.51**	90.95±6.47**	72.84±5.22**	29.41±4.74*
IFN-γ	25.45±3.61△	42.89±6.11△△	34.21±5.16△△	29.22±3.74△△	23.83±3.51

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control group；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* BLM group



1－5：IFN-γ group at 1，3，7，14，and 28 d；6－10：BLM group at 1，3，7，14，and 28 d

图 1　大鼠血清 SP-A 含量变化

Fig 1　Changes of serum SP-A in rats

3　讨论

IFN-γ 由 127～143 个氨基酸组成，主要由 $CD8^+$ T 细胞和某些 $CD4^+$ T 细胞产生。IFN-γ 属于 Th1 细胞因子，具有抗增殖、免疫抑制作用，可调节成纤维细胞增殖及胶原合成[4]。肺纤维化患者 IFN-γ 等 Th1 细胞因子与 Th2 细胞因子相比呈绝对或相对匮乏，因此通过给予外源性 IFN-γ 从而调节 Th1、Th2 细胞因子失衡是可实现的治疗目标[5]。

本实验从形态学观察 IFN-γ 组大鼠肺泡炎轻微、发生时间推迟，进展缓慢，程度较 BLM 组为轻，实验后期肺组织结构完整，几乎不形成肺纤维化；电镜显示肺泡Ⅱ型细胞板层体增生不明显，大部分上皮细胞的基膜完好。IFN-γ 组大鼠动脉血氧分压降低幅度较小，同时间段显著高于 BLM 组。这表明 IFN-γ 具有较强的抗肺纤维化作用，可单独应用 IFN-γ 对肺纤维化进行治疗。此作用国内、外鲜有类似报道。根据本实验结果及相关文献，IFN-γ 抗肺纤维化的机制可能为以下几个方面：①TGF-β_1 在转录水平激活结缔组织生长因子及胰岛素样生长因子，导致成纤维细胞活化及肺间质的活化、增生，TGF-β_1 还可抑制 IFN-γ 的产生及 IFN-γ 依赖的免疫反应[6]。外源性 IFN-γ 能降低 TGF-β_1 基因的转录，本实验亦显示 IFN-γ 可减少 TGF-β_1 蛋白的表达，因此 IFN-γ 可通过此途径抑制成纤维细胞活化及肺间质的增殖。②FN 可通过趋化作用吸引间质细胞，刺激成纤维细胞分裂、增殖，为成纤维细胞的增殖的始动因子，并且 FN 与成纤维细胞之间存在内循环[7]。本实验显示 IFN-γ 能减少 FN 的产生，因此 IFN-γ 可抑制成纤维细胞增殖、打破 FN 与成纤维细胞内循环，从而减少Ⅰ、Ⅲ型前胶原蛋白及细胞外基质的合成。③IL-4 为促纤维化性细胞因子，可诱导嗜酸性粒细胞聚集[8]，而嗜酸性粒细胞为纤维化早期几种关键的前纤维组织形成因子的主要来源，在肺泡炎的形成中发挥重要作用；IL-4 还可诱导成纤维细胞合成胶原，刺激细胞外基质蛋白的表达[9]。本实验显示 IFN-γ 可减少肺纤维化过程中 IL-4 的产生，恢复 Th1、Th2 细胞因子平衡，因此 IFN-γ 可通过上述途径减轻肺泡炎、减少前纤维组织形成因子的产生及胶原、细胞外基质的合成。IFN-γ 此项抗纤维化机制国内外鲜有报道。④肺泡上皮细胞和基底膜的损伤可导致肺泡壁完整结构的丧失，从而使细胞炎性因子、炎症介质可进入间质，间质中的成纤维细胞也可进入肺泡腔，形成肺泡炎和间质病变的互相沟通影响；肺泡上皮细胞自身具有抗纤维化特性，肺泡上皮细胞的不断丧失可导致有助于发生肺纤维化的微环境产生[10]。本实验显示 IFN-γ 可减轻肺泡上皮细胞、基底膜的损伤，抑制肺泡Ⅱ型上皮细胞过增殖，因此可通过此途径抗纤维化。

细胞因子网络是一个复杂的系统，本实验仅对 IFN-γ 抗肺纤维化的机制做出了初步解释，其中具体的的信号传导及细胞因子间的相互作用仍有待于进一步的深入研究。

参考文献：

[1] Selman M，King T E，Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis：prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy[J]. Ann Intern Med，2001，134 (2)：136－151.

[2] 李学军，崔社怀. 三七总甙及甲泼尼龙对实验大鼠肺纤维化的干预作用及机制的初步探讨[J]. 中华结核和呼吸杂志，2002，25(9)：520－523.

[3] Gurujeyalakshmi G，Giri S N. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis：downregulation of TGF-beta and procollagen Ⅰ and Ⅲ gene expression[J]. Exp Lung Res，1995，21(5)：791－808.

[4] Lasky J A，Ortiz L A. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis[J]. Am J Med Sci，2001，322(4)：213－221.

[5] Wallace W A，Ramage E A，Lamb D，*et al*. A type2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA)[J]. Clin Exp Immunol，1995，101(3)：436－441.

[6] Khalil N，Parekh T V，O'Connor R，*et al*. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Thorax，2001，56(12)：907－915.

[7] 吴　浩，许祖德，张月娥，等. 纤维连接蛋白对大鼠肺成纤维细胞纤维连接蛋白和整合素 $\alpha_5\beta_1$ 表达的影响[J]. 上海医科大学学报，2000，27(4)：241－244.

[8] Gharaee Kermani M，Nozaki Y，Hatano K，*et al*. Lung interleukin-4 gene expression in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Cytokine，2001，15(3)：138－147.

[9] Ando M，Miyazaki E，Fukami T，*et al*. Interleukin-4-producing cells in idiopathic pulmonary fibrosis：an immunohistochemical study[J]. Respirology，1999，4(4)：383－391.

[10] Hagimoto N，Kuwano K，Miyazaki H，*et al*. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，1997，17(3)：272－278.

（编辑　薛国文）