维普资讯 http://www.cqvip.c

文章编号:0253-3626(2005)01-0020-03

白介素-4 在博莱霉素致大鼠肺纤维模型中的表达

汪 涛,刘 忠

(重庆医科大学临床学院肺科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测 IL-4 在博莱霉素致大鼠肺纤维化模型中的表达,从而探讨 IL-4 在肺纤维化发病机制中的作用。方法:体重 170~190g 的雌性 wistar 大鼠,立即气管内灌注博莱霉素 5mg/(kg·bw)建立肺纤维化模型,设立生理盐水对照组。第 7、14 天分别处死大鼠,收获肺组织及血清,右肺行苏木精-伊红(HE)染色,左肺经逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肺组织中 IL-4mRNA 的表达,酶联免疫吸附实验(ELISA)检测血清中 IL-4 的水平。结果:灌注博莱霉素后第 7 天肺组织病变以肺泡炎为主,第 14 天肺内有纤维化病灶形成。模型组大鼠 IL-4mRNA 相对表达强度和 IL-4 蛋白质水平明显高于对照组,差异有显著性($P<0.05$)。结论:在肺纤维化大鼠模型中 IL-4 的产生明显增高,IL-4 在肺纤维化发病机制中具有重要作用。可将调节 IL-4 的产生及拮抗 IL-4 的作用作为肺纤维化治疗研究的新方向。

【关键词】肺纤维化;博莱霉素;大鼠;IL-4

【中国图书分类法分类号】R563 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-08-26

The expression of IL-4 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats

WANG Tao, et al

(*Department of Pulmonary Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the expression of IL-4 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats and to study the effect of IL-4 in pulmonary fibrosis pathogenesis. *Methods*: Female wistar rats (170~190g weight) were treated with bleomycin (5 mg/kg weight) by intratracheal perfusion on day 0 to induce pulmonary fibrosis, while the controlled animals were only injected with normal saline (NS). The rats were killed on day 7 and 14, and lung tissue and blood serum were collected. The right lung was stained with hematoxylin-eosin. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of IL-4mRNA in the left lung and ELISA was used to detect the levels of IL-4 in blood serum. *Results*: Alveolus inflammation was observed on day 7 and fibrosis focus was found on day 14. Compared with controlled group, the expression levels of IL-4mRNA in lung tissue and the levels of IL-4 in blood serum were elevated significantly in model groups ($P<0.05$). *Conclusion*: IL-4 may play an important role in pathogenesis of pulmonary fibrosis, and possibly, the down-regulation of IL-4 level or antagonist of IL-4 could be taken as a new direction for studying the treatment of pulmonary fibrosis.

【Key words】Pulmonary fibrosis; Bleomycin; Rats; IL-4

肺纤维化是多种慢性肺疾病的共同结局,是导致呼吸衰竭的主要病理基础,其病理特点是肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质的反复破坏、修复、重建和过度沉积。肺纤维化的发病率日趋增高,但尚无行之有效的治疗手段。近年来的研究提示,肺纤维化的发生与 Th1/Th2 漂移有关,即肺纤维化的发病机理涉及 Th1 型细胞因子低应答及 Th2 型细胞因子的过度应答,而 IL-4 作为 Th2 型细胞的一种标志性细胞因子参与了肺纤维化的发生。本研究应用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附实验(ELISA)检测实验性大鼠肺纤维化模型肺组织中 IL-4mRNA 的表达和血清中 IL-4 的蛋白水平,以探讨 IL-4 在肺纤维化发病机制中的作用。

作者介绍:汪 涛(1979-),女,硕士,主要研究方向:肺纤维化。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级雌性 Wistar 大鼠,体重 170~190g(购于第三军医大学大坪三院动物中心);博莱霉素 15mg/支(日本化药株式会社);小量组织总 RNA 快速抽提纯化试剂盒(上海华舜

维普资讯 http://www.cqvip.com

生物工程有限公司);PT-PCR 试剂盒(宝生物工程有限公司);IL-4ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立、分组与标本处理

将 30 只大鼠随机分为生理盐水对照组(NSC 组)、博莱霉素组(BM 组),按处死取材的时间不同(第 7、14 天)将 BM 组分为 BM1 组和 BM2 组,每组各 10 只。分组后立即将 BM1 组和 BM2 组大鼠乙醚麻醉后行气管插管,一次性灌注博莱霉素,剂量 5mg/(kg·bw),浓度 4mg/ml^{-1},以同样方法给 NSC 组大鼠灌注相同体积的生理盐水。

第 7、14 天分别处死 BM1 组和 BM2 组大鼠,以及相应的 NSC 组。处死前称量大鼠体重,开胸直视下心脏穿刺采血 2~3ml,将血液在室温凝集 10~15min,离心分离血清,-20℃保存。取双肺,称量双肺组织,求肺系数[肺重(mg)/体重(g)]。右肺经 10%甲醛固定,做病理切片;左肺放入-70℃低温冰箱中保存供 RT-PCR 用。

1.2.2 肺组织病理分析

肺组织经不同浓度酒精常规脱水、石蜡包埋、切片后,行 HE 染色。

1.2.3 肺组织 IL-4mRNA 测定

1.2.3.1 肺组织总 RNA 提取 按照华舜公司试剂盒提供的方法操作。

1.2.3.2 RT-PCR 以 Random 9 mers 为引物逆转录后,进行 PCR。引物设计:从网址 www.ncbi.nlm.nig.gov 的 GenBank 中检索出大鼠 IL-4 基因序列(基因编号 X16058,长 475bp),用 Primers 软件设计引物,上游 5' CAAGGAACACCACGGAGAAC 3',下游 5' TTAGGACATGGAAGTGCAGG 3',扩增片断 269bp,PCR 反应条件:94℃预变性 2min 后,94℃ 30sec,61℃ 30sec,72℃ 40sec,35 个循环。以 β-actin 为内参照,引物序列:上游 5' GAGGGAAATCGTGCGTGAC 3',下游 5' CTGGAAGGTGGACAGTGAG 3',扩增片断 445bp,PCR 反应条件:94℃预变性 2min 后,94℃ 30sec,52℃ 30sec,72℃ 1min,35 个循环。引物由宝生物工程有限公司合成。PCR 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶中电泳,UVP 凝胶图像扫描系统对 IL-4 和 β-actin 扩增产物的电泳条带进行密度扫描,由计算机算出各自的光密度值,以 IL-4/β-actin 表示 IL-4mRNA 的相对表达强度。

1.2.4 血清中 IL-4 的检测

用双抗夹心 ELISA 法检测血清中 IL-4 浓度,按试剂盒说明书进行操作,根据标准曲线计算样本中 IL-4 的含量(pg/ml)。

1.3 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间检验用单因素方差分析和 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化表现

2.1.1 一般表现 模型组大鼠与对照组大鼠相比,精神萎靡、饮水进食量减少、消瘦,有呼吸频率加快,呼吸动度加大等明显呼吸困难征象。

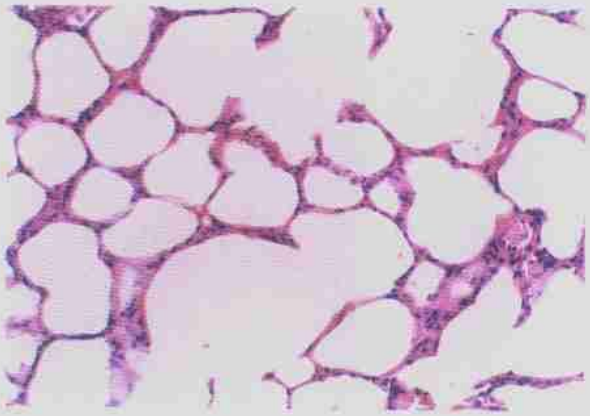


图 1 NSC 组大鼠肺组织病理表现(10×20)

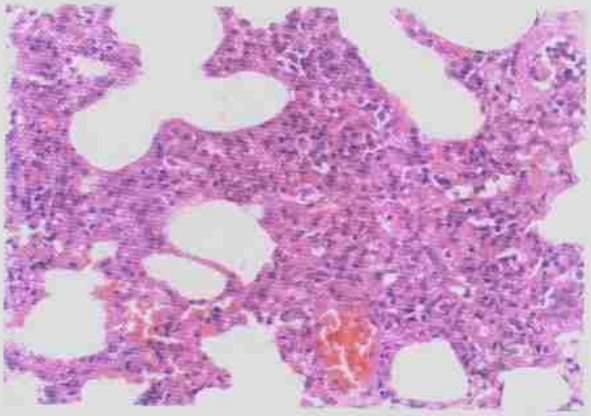


图 2 BM1 组大鼠肺组织病理表现(10×20)

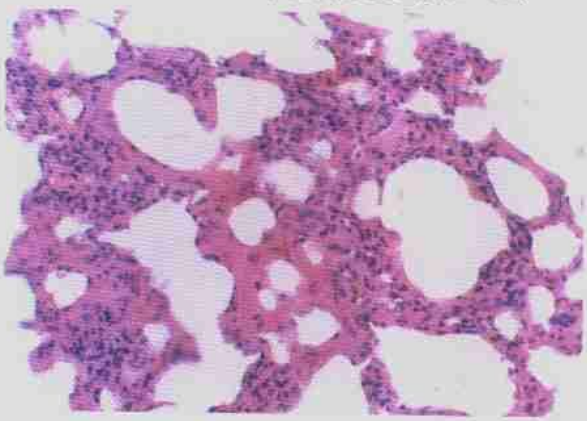


图 3 BM2 组大鼠肺组织病理表现(10×20)

2.1.2 病理表现 与 NSC 组相比,BM1 组肺泡间隔增厚,伴有巨噬细胞、淋巴细胞为主的细胞浸润,间质内成纤维细胞增多,病灶内肺泡萎缩、实变,病理改变以肺泡炎为主;BM2 组肺泡间隔明显增宽,

维普资讯 http://www.cqvip.com

巨噬细胞、淋巴细胞等炎症细胞减少，成纤维细胞和胶原基质明显增多，可见纤维化病灶形成，与文献报道一致[2](图 1～3)。

2.1.3 肺系数 由于肺纤维化大鼠体重减轻，肺组织实变及纤维化引起肺重增加，因此肺系数可间接反映肺组织纤维化的程度[3]，BM1 组和 BM2 组与 NSC 组相比肺系数明显增大，差异有显著性(表 1)。

2.2 肺组织中 IL－4mRNA 的表达

BM1 组和 BM2 组肺组织中出现 IL－4mRNA 的高表达，与 NSC 组相比差异有显著性(表 2，图 4)。

2.3 血清中 IL－4 的水平

BM1 组和 BM2 组血清中 IL－4 水平明显高于 Nsc 组，差异有显著性(表 2)。

表 1 各组动物肺系数($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	处死时间(d)	肺系数(mg/g)
NSC 组	10	7、14	10.70 ± 0.40
BM1 组	10	7	16.50 ± 2.87
BM2 组	10	14	17.32 ± 1.48

注：BM1 组和 BM2 组与 NSC 组比较 $P<0.01$；BM1 组与 BM2 组比较 $P>0.05$

表 2 各组动物肺组织中 IL－4mRNA 表达及血清中 IL－4 蛋白水平($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL－4mRNA 相对表达强度(IL－4/β－actin)	IL－4 蛋白水平(pg/ml)
NSC 组	10	0.193 ± 0.046	25.020 ± 3.962
BM1 组	10	0.533 ± 0.074	58.200 ± 4.762
BM2 组	10	0.534 ± 0.066	56.500 ± 3.636

注：BM1 组和 BM2 组与 NSC 组比较 $P<0.01$；BM1 组与 BM2 组比较 $P>0.05$

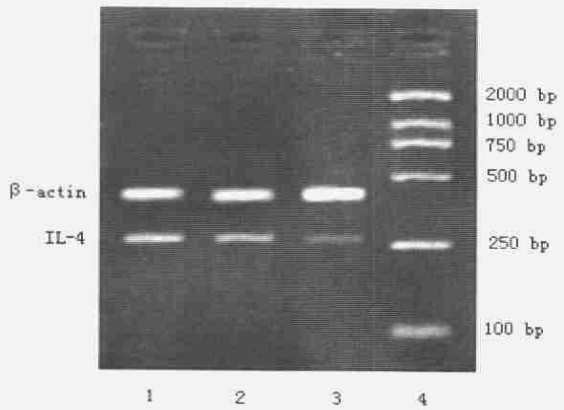


图 4 各组动物肺组织中表达 IL－4mRNA 比较
1. BM2 组 2. BM1 组 3. NSC 组 4. 分子量标记

3 讨 论

肺纤维化的发生机制涉及到细胞、细胞因子、细胞外基质等因素间的相互作用，是多种因素、多个环节参与的缓慢的错综复杂的过程。一些实验表明，当 Th1 与 Th2 型细胞因子的平衡向 Th2 型细胞因子转变时(即 Th2 型细胞因子占优势)，可导致纤维化的发生。

IL－4 分子量约为 20kD，是 Th2 型细胞的标志性细胞因子，主要生物学反应有：①刺激 B 细胞的活化。②促进 $CD4^+$ T 细胞向 Th2 细胞分化。③趋化嗜酸性粒细胞及单核巨噬细胞[4]。IL－4 与 Th1 型细胞因子如 IFN－γ(干扰素－γ)、IL－12 之间具有拮抗作用，从而形成 Th1 细胞与 Th2 细胞之间的相互抑制，维持 Th1 细胞与 Th2 细胞之间的动态平衡。在肺纤维化的形成中，IL－4 可以直接促进成纤维细胞的增生、胶原基因表达和胶原合成增加[5]。

在放射线诱发的大鼠肺纤维化模型中，肺泡巨噬细胞和 $CD4^-$ T 细胞均有 IL－4 和 IL－4mRNA 高表达[6]。给予 IL－4 基因敲除小鼠博莱霉素诱导肺部感染和肺纤维化，在炎症反应早期，IL－4 基因敲除的小鼠体内出现高度的 T 淋巴细胞肺部浸润以及 TNF－α(肿瘤坏死因子－α)、IFN－γ 和 NO 等前炎症介质的过度表达。在纤维化的晚期，IL－4 基因敲除的小鼠体内的纤维化程度减轻。提示 IL－4 在肺纤维化模型中的作用为限制炎症反应早期的 T 淋巴细胞聚集以及刺激慢性肺纤维化[4]。在本研究中，博莱霉素诱导的肺纤维化发生的第 7 天和第 14 天，模型中均出现了肺组织中 IL－4mRNA 及血清中 IL－4 的高表达，Nozaki 等的研究也证实在博莱霉素诱导的肺纤维化小鼠肺组织中 IL－4 的 mRNA 及蛋白水平显著上调[7]，提示 IL－4 在肺纤维化的发生机制中起重要作用。

目前，阻断 Th2 型细胞因子效应或使 Th2 型细胞因子反应偏向 Th1 型细胞因子反应，已成为治疗肺纤维化疾病的一个新途径。IFN－γ 通过促进 Th1 型细胞因子应答，抑制 Th2 型细胞因子反应，而阻抑成纤维细胞的增生和胶原的沉积，已经被实验性应用于治疗肺纤维化疾病的研究中[8]。IL－12 通过促进 IFN－γ 的产生来削弱博莱霉素所致的小鼠肺纤维化[9]。Jakubzick 等用 IL－13 免疫毒素嵌合分子(IL13－PE，由 IL－13 和切除顶端的假单胞菌外毒素构成的蛋白)鼻内滴注能显著减少肺纤维化小鼠肺内表达 IL－4、IL－13 受体(下转第 26 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

近年来普遍认为 TNF－α 与 HBsAg，HBcAg 和 HBVDNA 等的关系密切，在 HBV 感染过程中既有抵制及清除 HBV 的作用，与乙型肝炎的不同类型、病情程度有关(9)。根据本组统计资料显示 TNF－α 的阳性表达与 HBV 感染密切相关，在慢性肝病患者中，HBV 阴性组的 TNF－α 阳性率为 20%，而 HBV 阳性组 TNF－α 阳性率为 59%，两者之间存在显著差异，可以认为 TNF－α 的阳性表达增强与 HBV 感染有关。TGF－β_2 与 HBV 的关系笔者未见相关报道，从本研究结果来看 HBV 阴性组的 TGF－β_2 阳性率为 30%，而 HBV 阳性组 TGF－β_2 阳性率为 38.6%，两者之间没有显著差异。可以认为 TGF－β_2 与 HBV 感染不存在相关关系，而只在肝纤维化及肝癌形成过程中发挥作用。

参 考 资 料

[1] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha－ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissue[J]. Hum Pathol, 1990; 21: 607－612.

[2] Reed JA, Mc Nutt NS, Prieto VG, et al. Expression of transforming growth factor－β_2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion[J]. Am J Pathol, 1994; 145: 97.

[3] 潘志刚，杨秉辉，刘银坤. 肝癌组织中转化生长因子 β_2 表达的免疫组化研究[J]. 中国实用内科杂志，1999; 19(1): 25－27.

[4] Maggard M, Meng L, Ke B, et al. Antisense TGF－beta2 immunotherapy for hepatocellular carcinoma: treatment in a rat tumor model[J]. Ann Surg Oncol, 2001; 8(1): 32－37.

[5] Abou－Shady M, Baer HU, Friess H, et al. Transforming growth factor betas and their signaling receptors in human hepatocellular carcinoma[J]. Am J Surg, 1999; 177(3): 209－215.

[6] Baer HU, Friess H, Abou－Shady M, et al. Transforming growth factor betas and their receptors in human liver cirrhosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998; 10(12): 1031－1039.

[7] Orfila C, Lepert JC, Alric L, et al. Expression of TNF－alpha and immunohistochemical distribution of hepatic macrophage surface markers in carbon tetrachloride－induced chronic liver injury in rats[J]. Histochem J, 1999; 31(10): 677－685.

[8] Wheelhouse NM, Chan YS, Gillies SE, et al. TNF－alpha induced DNA damage in primary murine hepatocytes[J]. Int J Mol Med, 2003; 12(6): 889－894.

[9] 黄建生，郭明秋，王昌才. 肿瘤坏死因子与乙型肝炎[J]. 国外医学流行病学传染病分册，1995; 22(5): 196－199.

(上接第 22 页)的单核细胞和巨噬细胞数量及前纤维化细胞因子和趋化因子水平，提出以 IL－4 和/或 IL－13 的靶向细胞为靶点进行抗纤维化治疗的观点[10]。

参 考 文 献

[1] 李 才. 器官纤维化—基础与临床[M]. 第 1 版. 北京：人民卫生出版社，2003; 225.

[2] 柴文戌，李永春，刘玉玲，等. 博莱霉素致肺纤维化大鼠形态学变化的实验研究[J]. 中国实验动物学报，2002; 11(2): 77－80.

[3] 田桂珍，高占成，徐 钰，等. γ 干扰素转基因表达对博莱霉素致小鼠肺纤维化的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志，2003; 26(5): 290－293.

[4] Huaux F, Liu T, McGarry B, et al. Dual roles of IL－4 in lung injury and fibrosis[J]. J Immunol, 2003; 170(4): 2083－2092.

[5] Bresser P, Jansen HM, Weller FR, et al. T－cell activation in the lungs of patiens with systemic sclerosis and its relation with pulmonary fibrosis[J]. Chest, 2001; 120(1): 66－68.

[6] Westermann W, Schl R, Rieber EP, et al. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat[J]. Int J Radiat Biol, 1999; 75(5): 629－638.

[7] 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.

[8] 崔勇丽，王晓彬，陈 莹，等. 肺纤维化与细胞因子[J]. 国外医学卫生学分册，2002; 29(6): 325－327.

[9] Michael P, Keane, John A, et al. IL－12 attenuates bleomycin－induced pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001; 281(1): 92－97.

[10] Jakubzick C, Choi ES, Joshi BH, et al. Therapeutic attenuation of pulmonary fibrosis via targeting of IL－4－ and IL－13－responsive cells[J]. J Immunol, 2003; 175(5): 2684－2693.