

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.03.001

文章编号: 1005-8982 (2019) 03-0001-07

基础研究 · 论著

中和白细胞介素 17 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的干预作用*

宋桂芹¹, 马立飞¹, 赵铁军², 张效云¹

(河北北方学院 1. 生物化学教研室, 2. 生命科学中心, 河北 张家口 075000)

摘要: 目的 初步探讨中和白细胞介素 17 (IL-17) 对博来霉素 (BLM) 诱导小鼠肺纤维化形成过程的干预作用及其机制。**方法** 96 只小鼠随机分为 4 组, 即抗体干预组、同型抗体对照组 (IgG2A 组)、博来霉素组 (BLM 组)、正常对照组 (NC 组)。气管内注射 BLM 使小鼠急性肺损伤诱导肺纤维化形成, NC 组则给予等量生理盐水。复制模型后第 4、9、14、19 和 22 天抗体干预组小鼠尾静脉注射 IL-17A 中和抗体, IgG2A 组注射同型抗体 IgG2A; BLM 组和 NC 组则注射等量生理盐水。在培养的第 7、14 和 28 天将 4 组小鼠分批处死, 取气管肺泡灌洗液 (BALF) 涂片进行细胞计数, ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 含量的变化; 检测小鼠肺组织羟脯氨酸 (HYP)、丙二醛 (MDA) 及活性氧 (ROS) 等生化指标, 并评价各组小鼠肺组织的纤维化程度。**结果** 抗体干预组与 BLM 组比较, BALF 中细胞总数、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞的个数, IL-1 β 、IL-10、IFN- γ 的含量, 以及 HYP、MDA、ROS 的含量在各个时间点均降低 ($P < 0.05$); 而 IgG2A 组上述指标在各个时间点与 BLM 组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 中和 IL-17A 对 BLM 所致的实验性小鼠肺纤维化模型具有一定的防治作用, 有利于延缓肺纤维化的进程。

关键词: 肺纤维化; 博来霉素; 白细胞介素 17; 小鼠

中图分类号: R563; R34

文献标识码: A

Protective effect of neutralizing interleukin-17 on Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*

Gui-qin Song¹, Li-fei Ma¹, Tie-jun Zhao², Xiao-yun Zhang¹

(1. Department of Biochemistry, 2. Life Science Center, HeBei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To explore protective effect of neutralizing Interleukin-17 (IL-17) on Bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods** Totally 96 mice were randomly divided into antibody intervention group (antibody group), IgG group, BLM group and control group ($n = 24$). Endotracheal injection of BLM was performed resulting in acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. Mice in control group received normal saline. Mice were treated with IL-17 neutralizing antibody, IgG2A or BLM at day 4, 9, 14, 19, 22 in antibody group, IgG2A group and BLM group, respectively. Mice were sacrificed 7, 14, 21, 28 days, after cell culture, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was used to detect cell count. IL-1 β , IL-10, IL-17A and IFN- γ were measured by Elisa kits. Hydroxyprine (HYP), malonaldehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in lung tissue were determined. Histological characterization of pulmonary fibrosis was evaluated. **Results** Number of lymph, monocytes, neutrophils, concentration of IL-1 β , IL-10, IFN- γ , IL-17A, and expression of HYP, MDA and ROS were decreased

收稿日期: 2018-08-18

* 基金项目: 河北省高等学校科学研究项目 (No: ZD2017206); 河北省张家口市科学技术研究与发展计划项目 (No: 1821029D); 河北省高等学校科学技术研究项目 (No: Z2018250)

[通信作者] 张效云, E-mail: xzyonly928@163.com

significantly in antibody group when compared with those in BLM group ($P < 0.05$). No obvious differences in the mentioned indexes were witnessed between IgG group and BLM group ($P > 0.05$). **Conclusions** Blockage of cytokine IL-17A effectively reduces BLM induced pulmonary fibrosis in mice through mediating inflammatory response.

Keywords: pulmonary fibrosis; Bleomycin; interleukin-17A; mice

肺纤维化是一种慢性、进展性的肺间质性疾病,以弥漫性肺泡炎、成纤维细胞大量病理性增生,以及细胞外异常沉积为主要病理特征。其对人类健康危害极大,近年来发病呈上升趋势,是大多数间质性肺疾病的最终病理结果。尽管近几年在阐明肺纤维化的病理生理学方面研究取得了显著的进展,同时人们也在细胞和分子水平加深了对肺纤维化机制的认识,但是在临床上仍缺乏有效的治疗方法,病死率高,预后极差^[1],因此进一步探索其发病机制和拓展其治疗策略具有重要的理论和实际意义。

白细胞介素 17 (interleukin-17, IL-17) 是由活化的 CD⁺T 细胞亚群 TH17 细胞生成的炎症细胞因子^[2]。IL-17 家族中至少存在 6 个成员,即 IL-17A 到 IL-17F,其中 IL-17A 最早被发现且作用最广泛^[3]。IL-17A 具有很强的募集粒细胞及促进多种炎症细胞因子合成并释放的作用,如 IL-6、基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMPs) 等,同时具有协同炎症因子扩大炎症效应的作用,与机体的免疫性疾病、炎症及肿瘤等有关^[4]。本研究以博来霉素 (Bleomycin, BLM) 诱导肺纤维化小鼠为模型,通过检测中和 IL-17A 后支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中炎症细胞和 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ) 4 种细胞因子,以及羟脯氨酸 (Hydroxyprine, HYP)、丙二醛 (Malonaldehyde, MDA)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量在肺纤维化过程中的变化来评价中和 IL-17A 对肺纤维化过程的干预作用,为进一步探索肺纤维化的发生机制及临床治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

小鼠 C57BL/6 96 只,SPF/VAF 级,雌性,6 ~ 8 周龄,体重 (17 \pm 1) g,购自北京大学医学部,许可证号分别为 SCXK-2012-0004 和 SCXK-2012-0001。标记动物后分笼饲养,温度 18 ~ 24 $^{\circ}$ C,光暗周期交替。

1.2 主要药品与试剂

BLM 购自日本化药株式会社 (批号 640110),

HYP、ROS 及 MDA 试剂盒购自南京建成生物研究所,IL-17A 中和抗体和同型抗体 IgG2A 购自美国 R & D System 公司,IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自美国 eBioscience 公司。

1.3 主要仪器

普通光学显微镜、荧光酶标仪、722 分光光度计、小鼠固定操作台、胰岛素注射器、直型静脉滞留针、载玻片均由河北北方学院生物化学教研室提供。

1.4 方法

1.4.1 动物分组 96 只实验小鼠随机分为 4 组,分别为抗体干预组、同型抗体对照组 (IgG2A 组)、博来霉素组 (BLM 组)、正常对照组 (NC 组),每组 24 只。

1.4.2 肺纤维化模型复制及处置 小鼠称体重后,用 3.5% 水合氯醛注射液腹腔麻醉 (0.1 ml/10 g 体重),向抗体干预组、IgG2A 组、BLM 组小鼠的气管内注入生理盐水溶解的 BLM (5 mg/kg),向 NC 组小鼠注入等量生理盐水。于注射 BLM 后的第 4、9、14、19 和 22 天抗体干预组尾静脉注射 IL-17A 中和抗体 (400 μ g/kg),IgG2A 组尾静脉注射 IgG2A 抗体 (400 μ g/kg),BLM 组和 NC 组则给予等量生理盐水。分别于饲养的第 7、14 和 28 天将 4 组小鼠分批处死,取 BALF 涂片进行细胞计数;通过试剂盒检测 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 的含量变化;留取肺组织置于液氮 -70 $^{\circ}$ C 冷冻保存,用于 HYP、MDA 及 ROS 含量的检测。

1.4.3 BALF 的制备及涂片 分别于复制模型后第 7、14 和 28 天从每组中随机选取 6 只小鼠,摘除眼球取血,处死,气管插管,PBS 1 ml 灌洗肺组织 2 次,轻轻按摩,收获 BALF。将获得的 BALF 在 4 $^{\circ}$ C、1 400 r/min 离心 10 min,分离上清液,用于细胞因子检测。用 100 μ l PBS 重悬沉淀,充入计数池在光学显微镜下计数细胞总数,涂片行瑞氏染色并在油镜下细胞分类计数,分别计数淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞 (>200 个有核细胞/片)。

1.4.4 BALF 中 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 的测定 按 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ ELISA 试剂盒说明书进行操作,根据标准曲线计算样本中 IL-

1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 的含量。

1.4.5 肺组织 ROS、HYP 及 MDA 的测定 参考文献 [5] 制备 10% 的肺组织匀浆液,低温离心取上清液,严格按照试剂盒说明书行肺组织 ROS、HYP 及 MDA 的测定。

1.4.6 小鼠肺组织病理学评价 复制模型后,第 28 天处死 4 组剩余存活小鼠,并分别取右肺下叶于 4% 多聚甲醛中固定,经脱水、浸蜡和包埋后制作厚度 5 μm 石蜡切片,行 Masson 染色,参照 SZAPIEL 等^[6]的方法,在光学显微镜下观察肺组织病理学改变。肺纤维化程度的评定标准:0 级,无纤维化;1 级,轻度纤维化,且面积 <20% 全肺;2 级,中度纤维化,且面积占 20% ~ 50% 全肺;3 级,重度纤维化,且面积 >50% 全肺,肺泡结构非常紊乱。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组数据采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠的一般情况

NC 组小鼠精神状态均良好,饮食和饮水正常,体重有不同程度的上升,无小鼠死亡。BLM 组、IgG2A 组和抗体干预组的小鼠在复制模型后不久即出现活动度下降,精神萎靡,同时出现不同程度的饮食和饮水减少,在复制模型后的第 9 天,除个别小鼠外,体重又开始回升,并趋于稳定。BLM 组在第 11 天死亡 1 只,IgG2A 组在第 13 天死亡 1 只,抗体干预组和 NC 组无小鼠死亡。

2.2 各组小鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞、淋巴细胞以及单核细胞数量的变化情况

各组小鼠 BALF 中细胞总数比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点的细胞总数有差异 ($F = 14\,790.397, P = 0.000$)。②各组间 BALF 中的细胞总数有差异 ($F = 350.258, P = 0.000$);其他组中 BALF 中细胞总数高于 NC 组 ($P < 0.05$)。IgG2A 组和 BLM 组的细胞总数比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组的表达高峰在第 14 天,其中抗体干预组低于 IgG2A 组和 BLM 组 ($P < 0.05$)。③各组细胞总数的变化趋势有差异 ($F = 1\,069.935, P = 0.000$)。见表 1。

各组小鼠 BALF 中中性粒细胞数比较,采用重复测

量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点的中性粒细胞计数有差异 ($F = 2\,155.813, P = 0.000$)。②各组间的中性粒细胞计数有差异 ($F = 367.880, P = 0.000$);其他组中性粒细胞计数高于 NC 组,其高峰均在第 14 天,其中抗体干预组低于 IgG2A 组和 BLM 组 ($P < 0.05$)。③各组中性粒细胞计数的变化趋势有差异 ($F = 229.875, P = 0.000$)。随着时间推移,中性粒细胞计数呈逐渐下降趋势。见表 2。

各组小鼠 BALF 中淋巴细胞计数比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点的淋巴细胞计数有差异 ($F = 61.430, P = 0.000$);②各组间的淋巴细胞计数有差异 ($F = 456.240, P = 0.000$);抗体干预组低于 IgG2A 组和 BLM 组 ($P < 0.05$)。③各组淋巴细胞计数的变化趋势有差异 ($F = 29.647, P = 0.000$)。见表 3。

各组小鼠 BALF 中单核细胞计数比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点的单核细胞计数有差异 ($F = 461.806, P = 0.000$)。②各组间的单核细胞计数有差异 ($F = 137.742, P = 0.000$);单核细胞在第 14 天时达高峰,其中抗体干预组低于 IgG2A 组和 BLM 组 ($P < 0.05$)。③各组单核细胞计数的变化趋势有差异 ($F = 57.197, P = 0.000$)。见表 4。

2.3 BALF 中 IL-1 β 、IL-10、IL-17A、IFN- γ 的含量比较

各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 的含量比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点

表 1 各组小鼠 BALF 中细胞总数比较

($n = 6, \times 10^6$ 个/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	5.48 \pm 0.39	6.41 \pm 0.42	5.80 \pm 0.54
BLM 组	65.27 \pm 4.42	81.17 \pm 4.53	36.85 \pm 4.40
IgG2A 组	60.43 \pm 3.21	75.92 \pm 5.38	35.94 \pm 3.52
抗体干预组	40.32 \pm 3.59	53.38 \pm 4.07	22.57 \pm 3.41

表 2 各组小鼠 BALF 中中性粒细胞计数比较

($n = 6, \times 10^6$ 个/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	2.45 \pm 0.39	2.67 \pm 0.41	2.62 \pm 0.31
BLM 组	29.05 \pm 2.84	41.00 \pm 2.15	18.45 \pm 1.45
IgG2A 组	26.65 \pm 2.04	39.32 \pm 1.50	16.94 \pm 1.36
抗体干预组	20.83 \pm 1.55	30.23 \pm 1.94	8.51 \pm 0.95

表 3 各组小鼠 BALF 中淋巴细胞计数比较

(n=6, × 10⁶ 个/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	0.51 ± 0.07	0.79 ± 0.12	0.80 ± 0.07
BLM 组	5.96 ± 0.19	6.75 ± 0.82	5.22 ± 0.74
IgG2A 组	5.08 ± 0.43	6.86 ± 0.53	5.78 ± 0.41
抗体干预组	4.03 ± 0.21	5.23 ± 0.20	2.26 ± 0.45

表 4 各组小鼠 BALF 中单核细胞计数比较

(n=6, × 10⁶ 个/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	2.55 ± 0.40	2.73 ± 0.51	2.32 ± 0.29
BLM 组	26.68 ± 4.33	30.45 ± 2.79	13.05 ± 1.74
IgG2A 组	23.00 ± 3.23	28.38 ± 2.84	10.45 ± 1.48
抗体干预组	15.95 ± 2.68	21.42 ± 2.19	10.09 ± 1.08

IL-1 β 的含量有差异 ($F=9.534, P=0.001$)。②各组间 IL-1 β 的含量有差异 ($F=98.320, P=0.000$)；BLM 组、IgG2A 组及抗体干预组各时间点 IL-1 β 表达量与 NC 组比较升高 ($P<0.05$)，其表达高峰均在第 7 天；IgG2A 组和 BLM 组的表达比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；抗体干预组各时间点 IL-1 β 表达量与 BLM 组比较下降 ($P<0.05$)。③各组 IL-1 β 的含量变化趋势无差异 ($F=0.990, P=0.445$)。见表 5。

表 5 各组小鼠 BALF 中 IL-1 β 的含量比较(n=6, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	2.24 ± 0.95	1.63 ± 0.50	2.21 ± 0.86
BLM 组	8.35 ± 1.25	7.78 ± 1.59	6.71 ± 2.41
IgG2A 组	8.03 ± 1.13	7.43 ± 1.52	6.89 ± 1.91
抗体干预组	4.54 ± 0.10	3.82 ± 1.45	2.51 ± 1.01

各组小鼠 BALF 中 IL-10 的含量比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①各组不同时间的 IL-10 的含量有差异 ($F=71.313, P=0.000$)。②各组间 IL-10 的含量有差异 ($F=814.548, P=0.000$)。NC 组 BALF 中有少量 IL-10 的表达，而抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组各时间段表达量增高，与 NC 组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)，IgG2A 组和 BLM 组的表达比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组表达高峰均在第 14 天，而抗体干预组表达

量低于 BLM 组 ($P<0.05$)。③各组 IL-10 含量的变化趋势有差异 ($F=17.858, P=0.000$)。见表 6。

表 6 各组小鼠 BALF 中 IL-10 的含量比较

(n=6, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	13.14 ± 2.61	12.89 ± 3.05	13.11 ± 3.25
BLM 组	52.06 ± 3.21	65.36 ± 3.01	43.41 ± 4.59
IgG2A 组	50.95 ± 2.92	54.01 ± 3.06	42.53 ± 3.24
抗体干预组	23.98 ± 3.38	30.45 ± 3.68	19.67 ± 3.08

各组小鼠 BALF 中 IL-17A 的含量比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①各组不同时间点 IL-17A 的含量有差异 ($F=201.904, P=0.000$)。②各组间 IL-17A 的含量有差异 ($F=1126.394, P=0.000$)；IL-17A 在 NC 组各时间点 BALF 中有少量表达；抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组各时间点表达量高于 NC 组，IgG2A 组和 BLM 组的表达比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)；抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组第 7 天时均达最高峰，随时间增加 IL-17A 含量逐渐减少，但于第 28 天仍高于 NC 组 ($P<0.05$)，其中抗体干预组表达量低于 BLM 组 ($P<0.05$)。③各组 IL-17A 的含量变化趋势有差异 ($F=38.894, P=0.000$)。见表 7。

表 7 各组小鼠 BALF 中 IL-17A 的含量比较

(n=6, pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
NC 组	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01
BLM 组	1.05 ± 0.06	0.82 ± 0.07	0.69 ± 0.01
IgG2A 组	0.97 ± 0.05	0.85 ± 0.03	0.64 ± 0.02
抗体干预组	0.35 ± 0.07	0.29 ± 0.05	0.20 ± 0.08

各组小鼠 BALF 中 IFN- γ 的含量比较，采用重复测量设计的方差分析，结果：①各组不同时间点 IFN- γ 的含量有差异 ($F=399.298, P=0.000$)。②各组间 IFN- γ 的含量有差异 ($F=55.787, P=0.000$)；抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组 BALF 中 IFN- γ 浓度各时间点表达量较 NC 组增高，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；IgG2A 组和 BLM 组的表达比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组表达高峰均在第 7 天，而抗体干预组表达量低于 BLM 组 ($P<0.05$)。③各组 IFN- γ 含量随时间的变化趋

势有差异 ($F=19.791, P=0.000$)。见表8。

表8 各组小鼠BALF中IFN- γ 的含量比较
($n=6, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第28天
NC组	22.76 \pm 4.59	20.65 \pm 3.51	19.92 \pm 2.55
BLM组	49.88 \pm 4.51	46.01 \pm 5.05	29.35 \pm 3.04
IgG2A组	49.21 \pm 4.31	43.43 \pm 5.22	33.83 \pm 2.95
抗体干预组	40.63 \pm 4.58	34.58 \pm 4.51	22.28 \pm 2.06

2.4 各组小鼠HYP、MDA及ROS的含量比较

各组小鼠HYP、MDA及ROS比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①各组不同时间点HYP、MDA及ROS的含量有差异 ($F=916.819, 398.672$ 和 287.788 ,均 $P=0.000$)。②各组间HYP、MDA及ROS的含量有差异 ($F=381.450, 501.796$ 和 370.548 ,均 $P=0.000$);抗体干预组、IgG2A组和BLM组中HYP、MDA及ROS的含量在各个时间点与NC组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。在各个时间点,BLM组与IgG2A组比较,HYP、MDA以及ROS的含量比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);而抗体干预组与BLM组比较,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。③各组HYP、MDA及ROS含量的变化趋势有差异 ($F=70.307, 19.745$ 和 39.747 ,均 $P=0.000$)。见表9~11。

表9 各组小鼠HYP的含量比较
($n=10, \mu\text{g/mg}, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第28天
NC组	0.40 \pm 0.01	0.40 \pm 0.02	0.40 \pm 0.01
BLM组	0.50 \pm 0.02	0.69 \pm 0.03	0.90 \pm 0.01
IgG2A组	0.49 \pm 0.01	0.65 \pm 0.04	0.88 \pm 0.03
抗体干预组	0.45 \pm 0.02	0.56 \pm 0.04	0.76 \pm 0.04

表10 各组小鼠MDA的含量比较
($n=10, \text{nmol/mg}, \bar{x} \pm s$)

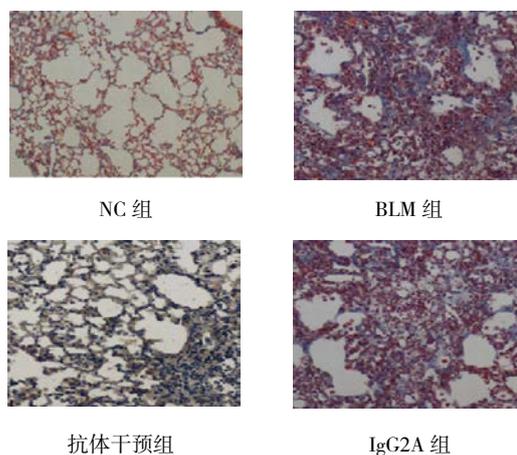
组别	第7天	第14天	第28天
NC组	2.18 \pm 0.17	2.33 \pm 0.15	2.23 \pm 0.14
BLM组	8.21 \pm 0.25	6.94 \pm 0.74	5.57 \pm 0.54
IgG2A组	8.15 \pm 0.26	6.67 \pm 0.21	5.27 \pm 0.24
抗体干预组	6.55 \pm 0.21	5.44 \pm 0.24	4.35 \pm 0.19

表11 各组小鼠ROS的含量比较
($n=6, \text{u/mg}, \bar{x} \pm s$)

组别	第7天	第14天	第28天
NC组	90.44 \pm 3.24	87.38 \pm 2.25	90.93 \pm 3.90
BLM组	160.95 \pm 3.95	136.35 \pm 7.02	116.04 \pm 4.37
IgG2A组	154.39 \pm 5.01	131.43 \pm 6.34	112.50 \pm 2.76
抗体干预组	132.85 \pm 5.86	116.82 \pm 6.35	101.71 \pm 3.11

2.5 各组小鼠肺组织病理学评价

NC组小鼠肺组织的Masson染色显示肺组织轮廓清晰,纤维化未发生,肺间质未见胶原沉积;IgG2A组和BLM组肺组织纤维化明显,并且可见大量胶原沉积;抗体干预组的肺组织纤维化程度轻于IgG2A组和BLM组。见附图。



附图 各组小鼠肺组织的病理切片 (Masson $\times 100$)

3 讨论

肺纤维化的发生和发展进程主要包括肺组织的持续性炎症损伤、正常的组织结构被破坏以及大量成纤维细胞灶形成,最终导致肺损伤部位的多次反复组织修复,即肺损伤和肺纤维化2个阶段。炎症细胞是肺纤维化发生发展的重要参与者。肺纤维化早期表现为肺泡炎,即肺泡上皮细胞首先被损伤,肺泡内出现出血水肿,大量炎症细胞浸润,该炎症细胞会释放出毒性物质或细胞因子等,引起肺组织损伤和结构破坏。本实验在给予BLM后的小鼠表现为炎症反应,BALF中细胞总数增加,早期为急性中性粒细胞浸润,随后过渡为淋巴细胞增多的慢性表现,与IBICKI等^[7]的研究结果一致,同时单核细胞的数目也在第14天达到高峰。而注射IL-17A中和抗体后的小鼠BALF中细胞总数、淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞的个数

均有下降,说明 IL-17A 中和抗体可使炎症反应减弱。由此推断如果在肺纤维化早期控制炎症反应,势必会减轻非纤维化的程度。

在肺纤维化的发生和发展过程中,由病变部位的多种细胞合成并分泌的许多细胞因子,它们之间相互影响、相互作用,就形成复杂的细胞因子网络。肺纤维化发病机制的研究中细胞因子和细胞因子网络的研究受到越来越多的关注。细胞因子及细胞因子复杂网络不但在肺泡早期炎症阶段发挥重要的作用,在随后组织修复及纤维化的过程中也发挥着极其重要的作用。

IL-1 β 主要由活化的单核巨噬细胞产生,是机体前炎症免疫反应的主要诱导剂。本研究发现,IL-1 β 在大鼠肺纤维化发生的早期表达增加,并于肺泡炎症阶段达到峰值,而随着肺纤维化的进一步发展又下降,并达到正常水平,提示 IL-1 β 主要在肺纤维化发生的早期起作用,可能在肺纤维化的发生中起诱导反应的作用。

IL-10 是已知的免疫和炎症抑制因子,主要由淋巴细胞、巨噬细胞和肥大细胞等产生。实验中发现,在病变早期 BALF 中其表达水平即增高,第 14 天后处于高表达状态,且长时间保持,说明 IL-10 在肺纤维化形成各阶段同样发挥重要作用。

WILSON 等^[8]通过不同的肺纤维化模型证实,在肺纤维化发生、发展的进程中,IL-17A 的表达会升高,与其相关的细胞信号通路也会在肺纤维化组织中被激活而引起一系列的效应。同时有研究表明,在缺乏 IL-17A 作用的受体的过敏性肺炎小鼠的模型中,肺部炎症和肺纤维化的症状会减轻^[9],进而证明 IL-17A 在肺纤维化的形成的进程中具有非常重要的作用。在本研究中,抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组的 IL-17 含量在复制模型后第 7 天时均达最高峰,之后 IL-17A 含量逐渐减少,但于第 28 天仍高于 NC 组。

IFN- γ 主要由活化的 T 细胞和 NK 细胞产生,在炎症反应中发挥重要作用,具有抗纤维化作用,可以减缓肺纤维化的进程。SEGEL 等^[10]研究表明,气管内注射 BLM 的小鼠,其肺部产生的 IFN- γ 在早期炎症反应阶段增多,其持续表达对减轻纤维化程度很重要。本研究发现,抗体干预组、IgG2A 组和 BLM 组 IFN- γ 含量高峰均在第 7 天,随后逐步降低,各个时间点 IFN- γ 含量与 NC 组比较无差异。

ROS 是有氧代谢生成的,化学性质比较活泼的一类含氧物质,主要包括氧自由基及其活性衍生物。氧自由基与其他物质发生反应,可继发生成具有活生生

物活性的衍生物,如过氧化氢(H_2O_2)、脂质过氧化物等。早在 1987 年 CANTIN 等^[11]的研究中检测到肺纤维化患者的 BALF 中 H_2O_2 和 O_2^- 等氧化物异常升高,证明氧化应激与肺纤维化的发生是密切相关的。之后各国的科学家们开展大量的相关性研究,为阐明肺纤维发生的机制以及寻求有效的治疗方案提供了一条新的途径。有研究发现^[12],在 BLM 诱导的肺纤维化小鼠的模型中,发现有大量的 ROS 的释放,并且其抗氧化体系也随之发生改变,同时,若应用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸治疗 BLM 诱导的肺纤维化小鼠,可有效减轻肺纤维化的程度。有研究发现^[13],将小鼠的 *p47 phox* 基因敲除,因不能生成 ROS,所以在 BLM 作用后并未发生明显的肺纤维化。因此证明 ROS 参与肺纤维化的发生、发展的过程。MDA 是氧自由基攻击生物膜的不饱和脂肪酸而引发脂质发生过氧化反应的产物之一,因此测定 MDA 的含量可以反映体内脂质过氧化程度,并且能间接反映机体细胞受损伤程度^[14]。本研究中,在复制模型后的第 7、14 及 28 天,抗体干预组小鼠肺组织 ROS、MDA 的含量与 BLM 组比较有差异。由此,推断 IL-17A 中和抗体有利于减轻 BLM 诱导的小鼠肺纤维化氧化应激反应,从而在一定程度上减轻了肺纤维化的程度。

HYP 是机体胶原蛋白的主要组成成分,占到其氨基酸总量的 13% 左右。仅 1% 左右的 HYP 存在于弹性蛋白中,其余的几乎均存在于胶原中。而胶原是机体器官发生纤维化的时候,细胞外基质的重要组成部分。因此测定肺组织中的 HYP 的含量可以了解胶原组织的分解代谢情况,进而反映机体组织器官的纤维化程度。本研究中,抗体干预组小鼠肺组织 HYP 含量在各个时间点与 BLM 组相比有差异,进一步说明 IL-17A 中和抗体有利于减轻肺纤维化程度。

综上所述,中和 IL-17A 在 BLM 诱导的肺纤维化小鼠,能减弱肺组织的炎症反应,降低某些重要细胞因子的表达,减弱氧化应激反应,从而有效减轻肺纤维化的程度,改善小鼠的肺功能。为阐明肺纤维化的发病机制以及为临床上研制逆转肺纤维化的药物提供了新的方向。

参 考 文 献:

- [1] 夏婷婷,张丽婷.特发性肺纤维化的细胞学研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(3):314-318.
- [2] 魏泰,吴立玲,俞光岩.白介素-17 在恶性肿瘤发生发展过程中作用及其机制的研究进展[J].生理科学进展,2016,47(5):315-339.

- [3] 王静静,宋昕阳,钱友存.白介素-17家族细胞因子的研究进展[J].生命科学,2016,28(2):170-181.
- [4] 张维,朱涛,王导新,等.瑞舒伐他汀抑制小鼠哮喘模型慢性气道炎症反应的实验研究[J].西部医学,2014,26(2):150-153.
- [5] 郑金旭,卢坤琴,夏德刚,等.柴胡皂甙d对博来霉素诱导肺纤维化小鼠的治疗作用及机制研究[J].中华医学杂志,2010,9(12):808-812.
- [6] SZAPIEL S V, ELSON N A, FULMER J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899.
- [7] IBICKI G, SEGEL M J, CHRISTENSEN T G, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis[J]. Int J Exp Pathol, 2002, 83(3): 111-119.
- [8] WILSON M S, MADALA S K, RAMALINGMA T R, et al. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent[J]. J Exp Med, 2010, 207(3): 535-552.
- [9] SIMONIAN P L, ROARK C L, WEHRMANN F, et al. TH17-Polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis[J]. J Immunol, 2009, 182(1): 657-659.
- [10] SEGEL M J, LEBICK I G, COHENPY, et al. Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285(6): 1255-1262.
- [11] CANTIN A M, NORTH S L, FIELDS G A, et al. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. J Clin Invest, 1987, 79(6): 1665-1673.
- [12] TEXIA K C. Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine[J]. Pulm Pharmacol, 2008, 21(2): 309-316.
- [13] MANOURY B, NENAN S, LECLERC O, et al. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis[J]. Respir Res, 2005, 6(1): 11.
- [14] 白剑,肖漓,韩勇,等.牛磺酸对肝纤维化模型小鼠肝组织超氧化物歧化酶和丙二醛的影响[J].中国组织工程研究,2015,19(27):4379-4383.

(王荣兵 编辑)