

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.09.006

文章编号: 1005-8982(2016)09-0029-05

论著

依达拉奉对高氧损伤小鼠肺组织中白介素 -4、干扰素 - γ 、转化生长因子 - β_1 的影响

张国强¹, 高荣荣¹, 张爱梅², 林新宇², 张立明²

(1. 潍坊医学院 儿科学教研室, 山东 潍坊 261053; 2. 山东省潍坊市人民医院 新生儿科, 山东 潍坊 261041)

摘要:目的 探讨依达拉奉对新生小鼠高氧肺损伤的治疗作用,为临床防治新生儿高氧肺损伤提供理论依据。**方法** 将新生小鼠随机分为空气+生理盐水组、空气+依达拉奉组、高氧+生理盐水组、高氧+依达拉奉组,于实验第3、7、10、14和21天取材,测定肺组织中白介素-4(IL-4)、干扰素- γ (IFN- γ)、肺组织中转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的变化。**结果** 随着吸氧时间的延长,高氧组IL-4、IFN- γ 含量均高于空气组且比例失衡,TGF- β_1 表达越多并肺组织结构紊乱;依达拉奉治疗组IFN- γ 含量显著增高,IL-4含量明显降低,IFN- γ /IL-4比值更接近正常组,TGF- β_1 表达降低,肺组织结构较高氧组好转。**结论** 高氧可导致新生小鼠急性肺损伤;依达拉奉可调节IFN- γ 、IL-4的含量及比例,降低TGF- β_1 的表达,发挥对高氧肺损伤的防治作用。

关键词: 依达拉奉;肺损伤;高氧;白介素-4;干扰素- γ ;转化生长因子- β_1 ;新生小鼠

中图分类号: R363

文献标识码: A

Impact of Edaravone on hyperoxic lung injury in neonatal mice

Guo-qiang Zhang¹, Rong-rong Gao¹, Ai-mei Zhang², Xin-yu Lin², Li-ming Zhang²

(1. Department of Pediatrics, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Department of Neonatal Medicine, Weifang People's Hospital, Weifang, Shandong 261041, China)

Abstract: Objective To explore the effects of Edaravone in hyperoxic lung injury in neonatal mice so as to provide experimental and theoretical evidences for controlling hyperoxic lung injury in neonate. **Methods** Neonatal mice were randomly divided into air + normal saline, air + Edaravone, hyperoxia + normal saline, hyperoxia + Edaravone groups. At the end of exposure (on the 3rd, 7th, 10th, 14th and 21st day), IL-4 and IFN- γ in lung homogenate were evaluated by ELISA, and TGF- β_1 and optical density (OD) in lung slices were determined using immunohistochemical stain and computerized graphic analysis techniques. **Results** With the increasing time of exposure, IL-4, IFN- γ and TGF- β_1 of the hyperoxic group were increasing and higher than those in the air group, lung injury also aggravated. Compared to the hyperoxic group, the treatment group showed increased IFN- γ and decreased IL-4 and TGF- β_1 ; histopathological changes were alleviated as well. **Conclusions** Hyperoxia can result in acute lung injury in neonatal mice. Edaravone can regulate the content and ratio of IFN- γ and IL-4, decrease the expression of TGF- β_1 , thus play a role in prevention and treatment of hyperoxic lung injury.

Keywords: Edaravone; lung injury; hyperoxia; IL-4; IFN- γ ; TGF- β_1 ; neonatal mouse

氧疗是新生儿缺氧性疾病重要的治疗方式之一,过去的研究十分注重高氧对视网膜的影响,忽

了对视网膜以外重要器官的作用。干扰素- γ (Interferon- γ , IFN- γ)的抗纤维化与白介素-4(Inter-

收稿日期:2015-11-20

[通信作者] 张立明, E-mail: 13963659081@163.com

leukin-4, IL-4)的促纤维化在高氧肺损伤中起重要作用。本实验利用高氧致新生小鼠肺损伤动物模型,应用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、免疫组织化学法测定 IL-4、IFN- γ 及转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)在小鼠肺组织中的表达变化,探讨自由基清除剂依达拉奉对高氧肺损伤的治疗作用,为新生儿高氧肺损伤的临床防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物材料

昆明小鼠由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供[许可证号:SCXK(鲁)20140007],实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 试剂与设备

依达拉奉购自国瑞药业,小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒、TGF- β_1 抗体购自博士德生物工程有限公司(编号:EK0375、BA0290),IL-4 ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司(产品目录号:EMC003.96),放射免疫分析(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)购自碧云天生物技术有限公司(编号 P0013B、ST506),其余生化试剂均为国药分析纯。DYC-I 型动物常压高氧实验舱、ML-Y 数字智能测氧仪、Dapex 气体分析仪、Eppendorf 排枪、酶标仪、精密天平、高速离心机等。

1.3 实验方法

1.3.1 建立高氧肺损伤模型 200 只自然分娩的昆明小鼠随机分为空气+生理盐水组(I组)、空气+依达拉奉组(II组)、高氧+生理盐水组(III组)、高氧+依达拉奉组(IV组)4组,每组 50 只。每组又随机分为 3、7、10、14 和 21 d 5 个亚组,每个亚组 10 只。I组、II组在空气中饲养;III组、IV组于生后 12 h 内置于氧舱中,维持氧浓度 90%~95%;钠石灰吸收二氧化碳 CO₂,使其浓度 <0.5%,以变色硅胶保持湿度 60%~70%。隔日更换垫料、干燥剂,并将各组母鼠互换,防止母鼠鼠中毒并保持哺乳条件一致,给予依达拉奉(5 mg/kg)或等量生理盐水腹腔注射,1 次/12 h,保持室温 25~26℃。

1.3.2 组织取材与检测 分别于实验第 3、7、10、14 和 21 天取材。ELISA 如下:将小鼠断头放血,迅速剪开胸腔,取出双肺,吸水纸拭去表面血迹,称重,放入置于冰上的研钵中,倒入适量液氮,快速将其研

成均匀粉末状,加入其 9 倍重量的含蛋白抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液(RIPA:PMSF=100:1),5 min 研磨 1 次,裂解 30 min 后将匀浆移入离心管中,4℃、12 000 r/min 离心 15 min,将上清液移入 Eppendorf 管中,置入 -20℃冰箱保存,统一检测。IFN- γ 浓度检测步骤如下:将标准品、样品分别加入酶标板孔中,37℃(下同)孵育 90 min,甩去液体后加入生物素标记的抗小鼠 IFN- γ 抗体工作液,反应 60 min,洗板后加入亲和素-生物素-过氧化物酶复合物工作液,反应 30 min,洗板后加入 3,3',5,5'-四甲基联苯胺显色液,避光反应 20 min 后加入终止液显色,于 450 nm 处测定光密度值,用标准品计算出曲线后,进一步得出样品浓度;IL-4 浓度检测方法大致相同。免疫组织化学法如下:小鼠麻醉后,采取肺/体循环双重灌注后将肺组织迅速浸泡于 10%中性甲醛液中,石蜡包埋、切片、脱蜡至水、抗原修复、封闭后采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术显色,复染,封片,于 400 倍下每张切片随机选 10 个视野,用 Image-pro plus 6.0 进行图像分析,细胞核和/或胞浆呈棕黄色为阳性细胞,阳性细胞越多,颜色越深,平均光密度越大。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织中 IL-4 的含量变化

高氧+生理盐水组(III组)肺组织中 IL-4 含量较空气+生理盐水组(I组)增加;给予依达拉奉治疗后,高氧+依达拉奉组(IV组)IL-4 含量较高氧+生理盐水组下降,差异有统计学意义,见表 1。

2.2 各组肺组织中 IFN- γ 的含量变化

高氧+生理盐水组(III组)肺组织中 IFN- γ 含量与空气+生理盐水组(I组)比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义,III组 IFN- γ 含量较 I 组增加;给予依达拉奉治疗后,IFN- γ 含量与 III 组比较,经 *t* 检验,差异有统计学意义,其含量继续增加,7 d 起增加更明显。见表 2。

2.3 各组肺组织中 IFN- γ /IL-4 比值的变化

高氧+生理盐水组(III组)IFN- γ /IL-4 明显低于空气+生理盐水组(I组),给予依达拉奉治疗后,IFN- γ /IL-4 比值更接近于 I 组。见图 1。

表 1 肺组织中 IL-4 的含量变化 ($n=10, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d
空气 + 生理盐水 (I 组)	117.69 ± 4.91	126.85 ± 7.69	123.82 ± 9.25	142.27 ± 7.47	130.01 ± 12.62
空气 + 依达拉组 (II 组)	115.93 ± 6.38	130.58 ± 4.52	125.87 ± 5.84	140.31 ± 5.86	135.05 ± 9.36
高氧 + 生理盐水组 (III 组)	211.53 ± 8.21	283.53 ± 9.18	294.49 ± 13.73	330.47 ± 8.63	324.37 ± 13.74
高氧 + 依达拉奉组 (IV 组)	130.63 ± 8.64	154.85 ± 9.56	161.21 ± 7.31	183.23 ± 9.37	175.65 ± 12.83
<i>t</i> 值 (I 组 vs III 组)	22.933	40.142	30.530	58.342	44.374
<i>P</i> 值 (I 组 vs III 组)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>t</i> 值 (III 组 vs IV 组)	16.142	29.371	25.683	45.632	27.853
<i>P</i> 值 (III 组 vs IV 组)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.4 肺组织形态及 TGF- β_1 的表达

随着吸氧时间延长,高氧 + 生理盐水组 (III 组) 肺组织水肿、充血及血管扩张,炎症细胞浸润逐渐加重,肺组织结构紊乱;而高氧 + 依达拉奉组 (IV 组) 肺组织结构较 III 组明显好转。正常新生小鼠肺组织内 TGF- β_1 含量微弱;高氧 + 生理盐水组 (III 组) TGF- β_1 含量逐渐增加,高氧 + 依达拉奉组 (IV 组) 较空气 + 生理盐水组 (I 组) TGF- β_1 含量增加,但较 III 组表达减少,差异有统计学意义。见表 3 和图 2。

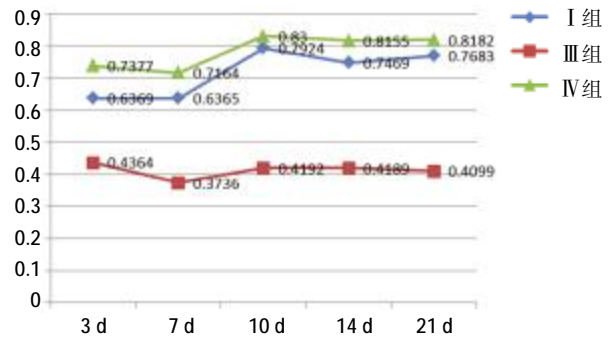


图 1 肺组织中 IFN- γ /IL-4 比值的变化

表 2 肺组织中 IFN- γ 的含量变化 ($n=10, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d
空气 + 生理盐水 (I 组)	74.78 ± 4.71	80.76 ± 4.72	98.12 ± 9.70	106.26 ± 8.63	99.89 ± 11.63
空气 + 依达拉组 (II 组)	69.47 ± 5.25	82.32 ± 4.28	96.38 ± 7.48	110.36 ± 10.32	102.25 ± 9.46
高氧 + 生理盐水组 (III 组)	92.32 ± 4.74	101.73 ± 8.78	113.44 ± 10.67	138.42 ± 11.31	132.96 ± 12.92
高氧 + 依达拉奉组 (IV 组)	97.82 ± 7.35	111.94 ± 7.25	133.80 ± 9.48	149.42 ± 7.50	143.71 ± 10.56
<i>t</i> 值 (I 组 vs III 组)	6.492	6.383	9.462	18.322	16.454
<i>P</i> 值 (I 组 vs III 组)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>t</i> 值 (III 组 vs IV 组)	1.431	2.240	7.632	12.364	5.472
<i>P</i> 值 (III 组 vs IV 组)	0.176	0.042	0.000	0.000	0.000

表 3 肺组织中 TGF- β_1 的平均光密度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	10 d	14 d	21 d
空气 + 生理盐水 (I 组)	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.05	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.06	0.29 ± 0.05
空气 + 依达拉组 (II 组)	0.16 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.04	0.27 ± 0.06
高氧 + 生理盐水组 (III 组)	0.42 ± 0.06	0.54 ± 0.05	0.71 ± 0.07	0.72 ± 0.02	0.89 ± 0.02
高氧 + 依达拉奉组 (IV 组)	0.28 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.08	0.53 ± 0.07	0.65 ± 0.06
<i>t</i> 值 (I 组 vs III 组)	21.021	32.252	47.544	40.593	65.514
<i>P</i> 值 (I 组 vs III 组)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<i>t</i> 值 (III 组 vs IV 组)	9.483	6.952	15.762	17.431	18.762
<i>P</i> 值 (III 组 vs IV 组)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

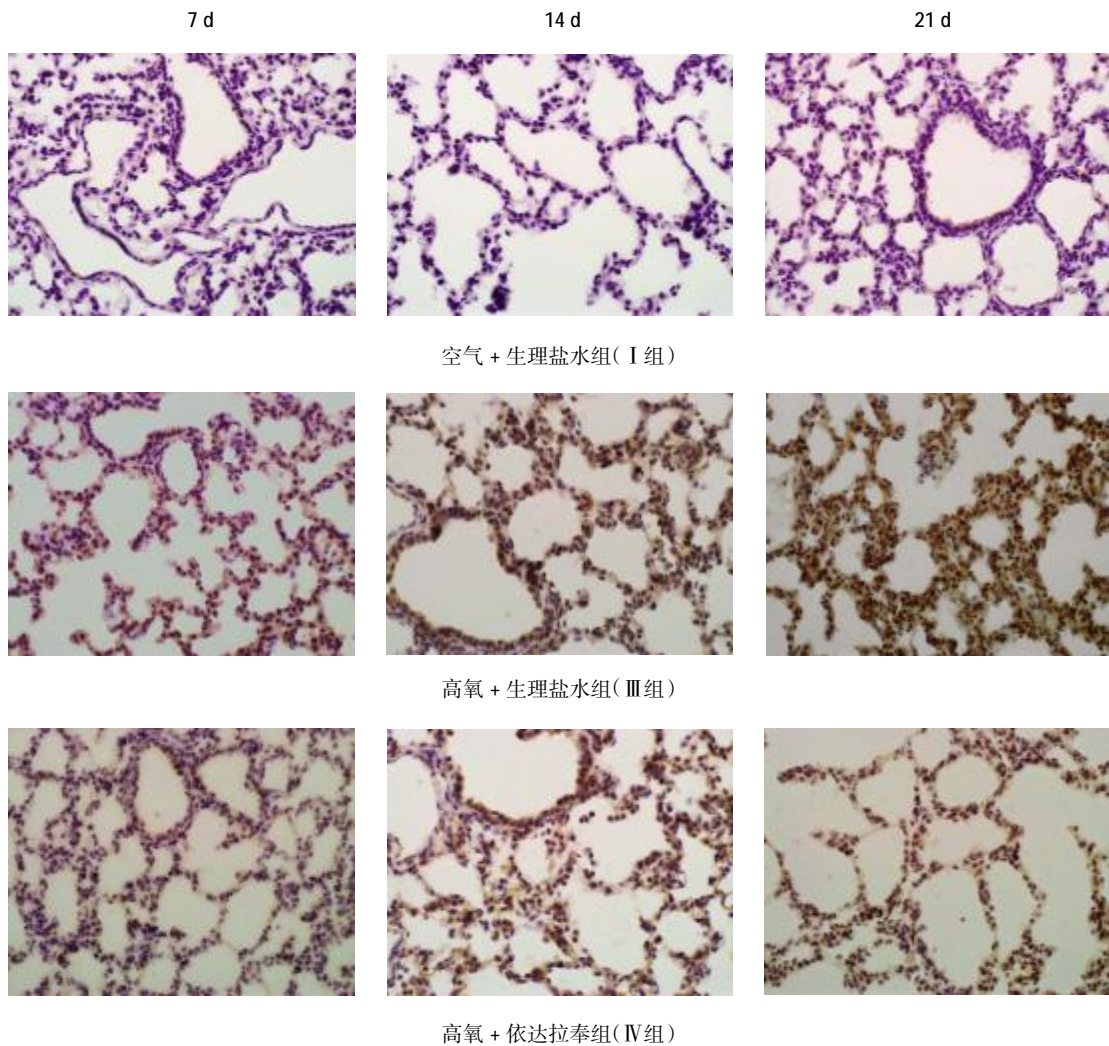


图 2 各组肺组织中 TGF- β_1 含量比较 (免疫组织化学法染色 $\times 400$)

3 讨论

文献报道,给予 90%氧 3 d 即可诱发小鼠急性肺损伤,损伤程度与暴露时间成正比^[1]。高氧所造成的肺损伤机制尚不完全明确,但活性氧具有的细胞毒性作用、炎症因子诱导等作用,会促进肺内相关炎症细胞因子的分泌,损伤肺泡上皮、血管内皮等生物膜系统,导致肺水肿及肺内结构性改变^[2]。因此,增加抗氧化物质,以拮抗活性氧的负面作用,调节氧化/抗氧化平衡,理论上可以防治高氧性损伤^[3]。

依达拉奉是强效自由基清除剂,临床主要用于治疗急性缺血性脑梗死^[4-5]。文献报道,依达拉奉可以减轻大鼠的急性肺损伤^[6-7],减轻高氧状态下细胞的损伤^[8],保护肝缺血再灌注后引起的肺损伤^[9],与其他药物联合应用可治疗急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征^[10]。

小鼠肺组织发育经历假腺期、小管期、原始肺泡期、肺泡期 4 个阶段,在时序上与人类相似。不同之处在于:新生小鼠肺只发育至大体形态,近似于人类 28 周胎龄肺结构,生后 3 d 肺泡开始形成^[11]。3 d 龄以前给予高氧吸入会导致肺泡的发育及成熟受到阻碍^[12],这与早产儿高氧肺损伤相似。本研究用生后 12 h 新生小鼠模仿新生儿出生后因各种原因,特别是危重患儿在呼吸机辅助通气下吸入高浓度氧后造成的肺损伤。

IL-4 是 Th2 类细胞因子,可以刺激肺内成纤维细胞增生,同时促进其他 Th2 型细胞因子,抑制 Th1 型细胞因子的生成,使 Th1/Th2 平衡向 Th2 优势方向发展,引起肺纤维化^[13]。IFN- γ 是 Th1 类细胞因子,可以抗感染,抗增殖,调节免疫,拮抗 IL-4^[14],已有吸入 IFN- γ 治疗肺纤维化的报道^[15]。

TGF- β_1 可以促进多种炎症细胞的表达,而聚集

的炎症细胞又能释放 TGF- β_1 , 形成交互放大效应; 在肺纤维化过程中 TGF- β_1 与结缔组织生长因子、血管内皮生长因子等密切相关^[16]。本实验将 TGF- β_1 作为观察肺组织损伤的形态学指标。

本实验中高氧组肺组织中 IL-4、IFN- γ 含量均高于空气组且比例失衡, 肺组织中 TGF- β_1 明显增多, 肺组织损伤渐加重; 给予依达拉奉治疗后 IFN- γ 上升明显(7 d 起两组比较差异有统计学意义), IL-4 含量明显降低, IFN- γ /IL-4 比例更接近于高氧+生理盐水组, TGF- β_1 表达减少, 肺损伤减轻。提示依达拉奉对高氧诱导的新生小鼠急性肺损伤具有保护作用。作为自由基清除剂, 依达拉奉可以直接转移电子给氧自由基进而将其直接清除。另有研究证实, 依达拉奉可以增强抗氧化酶的活性^[17], 抑制活性氧的产生^[18], 减轻甚至消除氧化基团对细胞的破坏, 刺激前列环素生成, 减少炎症介质的表达^[19-20]; 参与血红素加氧酶-1 和 PI3K/Akt 途径, 上调血红素加氧酶-1 的表达, 减轻细胞脂质过氧化反应和 DNA 氧化损伤^[21]。

综上所述, 依达拉奉对新生小鼠高氧肺损伤具有保护作用, 为临床防治新生儿高氧肺损伤提供新思路。

参 考 文 献:

- 马丽亚, 常立文. L-NAME 对新生大鼠高氧肺损伤的影响[J]. 同济大学学报, 2000, 29(2): 157-159.
- DUTKA T L, VERBURG E, LARKINS N, et al. ROS-mediated decline in maximum Ca²⁺-activated force in rat skeletal muscle fibers following in vitro and in vivo stimulation[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35226. DOI: 10.1371/journal.pone.0035226.
- SCHOELER M, LOETSCHER P D, ROSSAINT R, et al. Dexmedetomidine is neuroprotective in an in vitro model for traumatic brain injury[J]. BMC Neurology, 2012, 12(1): 1-7.
- KIKUCHI K, KAWAHARA KI, UCHIKADO H, et al. Potential of edaravone for neuroprotection in neurologic diseases that do not involve cerebral infarction (Review)[J]. Experimental Therapeutic Medicine, 2011, 2(5): 771-775.
- 李平, 汪波. 依达拉奉联合溶栓治疗急性脑梗死的疗效及对氧自由基清除效果的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(28): 49-52.
- YANG T, ZHANG J, SUN L, et al. Combined effects of a neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) and a free radical scavenger (edaravone) on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. Agents Actions, 2012, 61(6): 563-569.
- 施梦, 王宜青, 庞烈文, 等. 依达拉奉对大鼠急性肺损伤的干预作用[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2009, 25(6): 402-405.
- ZHANG G L, ZHANG W G, DU Y, et al. Edaravone ameliorates oxidative damage associated with A β 25-35 treatment in PC12 cells[J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2013, 50(3): 494-503.
- UCHIYAMA M, TOJO K, YAZAWA T, et al. Edaravone prevents lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion[J]. Journal of Surgical Research, 2015, 194(2): 551-557.
- WANG Z, LI R, LIU Y, et al. Protective effects of edaravone combined puerarin on inhalation lung injury induced by black gunpowder smog [J]. International Immunopharmacology, 2015, 26(1): 125-132.
- MUND S, STAMPANONI M J. Developmental alveolarization of the mouse lung[J]. Developmental Dynamics, 2008, 237(8): 2108-2116.
- NICHOLAS F, INGRID B, PHILIP H, et al. Disruption of the interaction between the rieske iron-sulfur protein and cytochrome B in the yeast bc1 complex owing to a human disease-associated mutation within cytochrome B [J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(7): 1292-1298.
- VASAKOVA M, STERCLOVA M, MATEJ R, et al. IL-4 polymorphisms, HRCT score and lung tissue markers in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Human Immunology, 2013, 74(10): 1346-1351.
- KLINGSBERG R C, MUTSAERS S E, LASKY J A. Current clinical trials for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Respirology, 2010, 15(1): 19-31.
- FUSIAK T, SMALDONE G C, CONDOS R. Pulmonary fibrosis treated with inhaled interferon-gamma (IFN- γ)[J]. Journal of Aerosol Medicine Pulmonary Drug Delivery, 2015, 28(5): 406-410.
- LONG X, SHANSHAN X, RENFENG G, et al. Transforming growth factor β_3 attenuates the development of radiation-induced pulmonary fibrosis in mice by decreasing fibrocyte recruitment and regulating IFN- γ /IL-4 balance [J]. Immunology Letters, 2014, 162(1): 27-33.
- REYES Y A B, TAKEHIKO S, HIDEKI A, et al. MCI-186 (edaravone), a free radical scavenger, attenuates ischemia-reperfusion injury and activation of phospholipase A(2) in an isolated rat lung model after 18 h of cold preservation [J]. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2006, 29(3): 304-311.
- ZHAO Z Y, LUAN P, HUANG S X, et al. Edaravone protects HT22 neurons from H(2) O(2) -induced apoptosis by inhibiting the MAPK signaling pathway[J]. CNS Neuroscience Therapeutics, 2012, 19(3): 163-169.
- CHEN W, ZHOUEHENG Y, JUAN Z, et al. Targeting reactive oxygen species by edaravone inhalation in a rat hyperoxic lung injury model: role of inflammasome[J]. Undersea and Hyperbaric Medicine, 2013, 40(6): 505-511.
- ZHANG W, GUO Y, YU S, et al. Effects of edaravone on the expression of β -defensin-2 mRNA in lung tissue of rats with myocardial ischemia reperfusion[J]. Molecular Medicine Reports, 2013, 7(5): 1683-1687.
- CAO H, FENG Y, NING Y, et al. Edaravone protects rats and human pulmonary alveolar epithelial cells against hyperoxia in jury: heme oxygenase-1 and PI3K/Akt pathway may be involved[J]. Experimental Lung Research, 2015, 41(7): 404-414.

(申海菊 编辑)