

铍病大鼠肺组织 $\text{TNF-}\alpha$ 的水平 and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的表达及其意义

张晓宇, 刘志宏*, 王光俊

(宁夏医学院劳动卫生与环境卫生教研室, 宁夏 银川 750004)

摘要: 目的 探讨肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF-}\alpha$) 及核因子 κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) 在铍病发病中的作用。方法 采用一次性非暴露式气管注入法染毒建立铍病模型。用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测肺组织匀浆及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 $\text{TNF-}\alpha$ 水平, 免疫组化法测定肺组织 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的表达。同时 HE染色观察肺组织的大体病理改变。结果 大鼠模型组肺组织的病理改变基本符合人类铍病的特点。模型组大鼠肺组织匀浆及 BALF中 $\text{TNF-}\alpha$ 水平、肺组织中 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的表达较生理盐水对照组明显升高 ($P < 0.01$); 且模型组内 $\text{TNF-}\alpha$ 的水平、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 的表达, 60 d组明显高于 20 d组 ($P < 0.05$)。结论 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 相互作用, 在铍病的发病机理中起着重要作用, 并可作为判定疾病活动性的一项重要参考指标。

关键词: 铍病; 肿瘤坏死因子 α ; 核因子 κB

中图分类号: O614.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)03-0151-03

$\text{TNF-}\alpha$ level and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ expression in lung of berylliosis rats and its significance

ZHANG Xiaoyu, LIU Zhihong*, WANG Guangjun

(Department of Occupational and Environmental Health, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To explore the role of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ played in the pathogenesis of experimental berylliosis in rats. Methods The rats were intratracheally injected with 10mg/ml beryllium oxide (BeO) 0.5ml, then observing the histopathological changes of lung, the $\text{TNF-}\alpha$ level (with ELISA) and the expression of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (by immunohistochemistry method) in lung tissues and BALF of the rats 20 d, 40 d and 60 d after the injection respectively. Results The results showed that the pathological changes were consistent with the basic features of berylliosis, both the $\text{TNF-}\alpha$ level and the expression of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in lung tissues and BALF were all significantly risen in berylliosis rats compared with the control rats ($P < 0.01$); and all the results mentioned above in 60 d group were significantly higher than that of 20 d group ($P < 0.05$). Conclusion $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{NF-}\kappa\text{B}$ might play some important role in the pathogenesis of berylliosis, which might be the reference indicators of developing degree of the disease.

Key words: Berylliosis; Tumor necrosis factor α ($\text{TNF-}\alpha$); Nuclear factor κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$)

铍病是一种原因不明, 可以累及多脏器的非干酪样肉芽肿性疾病, 发病机制至今尚不完全清楚。研究发现 $\text{TNF-}\alpha$ 作为一种重要的炎症介质, 可活化炎症细胞的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 系统, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 作为一种多效性转录因子, 参与调节多种炎症蛋白基因的表达^[1]。本实验采用气管内注入氧化铍 (BeO) 的方法建立铍病大鼠模型, 检测 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 在肺组织中的表达、 $\text{TNF-}\alpha$ 在肺组织匀浆及 BALF 中的水平, 探讨 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 在铍病中的作用, 以期揭示 BeO 诱导肺组织炎症反应的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

66只健康 SD 雄性大鼠, 体重 190~220 g 由宁夏医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分为 3 组:

(1) 模型组, 24只, 采用一次性非暴露式气管注入法染毒^[2]。乙醚轻度麻醉大鼠, 暴露气管, 注入 BeO 0.5 ml (浓度为 10 mg/ml) 悬浊液, 染毒时将 BeO (用 0.9% 无菌生理盐水 配成混悬液并高压灭菌); (2) 生理盐水对照组, 24只, 注入等量的无菌生理盐水; (3) 空白对照组, 18只, 不给予任何处理。

1.2 肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF-}\alpha$) 的测定

3组动物分别于气管灌注后第 20、40、60 天时, 10% 水合氯醛 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 心脏抽血处死大鼠, 迅速开胸取出完整肺组织。取右下叶同一部位的肺组织 (约 200 mg) 迅速置于 -80°C 冰箱冻存作匀浆用。左肺进行支气管肺泡灌洗, 行气管插管, 用注射器吸取冰冷 PBS 3 ml (4°C), 通过气管导管以较小的压力将 PBS 缓慢注入肺内, 可见大鼠左肺逐渐变得膨隆、苍白, 轻轻按摩肺脏, 回抽灌洗液, 如此反复 3 次, 直至灌洗液总量达 5 ml。将所得灌洗液离心 (离心半径 5.2 cm, 1 000 r/min 离心 10 min), 将上清收集于 5 ml 离心管中, -80°C 冻存。用 ELISA 法 (购自

收稿日期: 2008-01-08 修回日期: 2008-04-08

基金项目: 宁夏自然科学基金 (N40656)

作者简介: 张晓宇 (1975-), 女, 主管防疫师, 研究方向: 工业毒理学。

* 通讯作者, E-mail: liuzh@nmc.edu.cn

RapidBio公司测定 BALF和肺组织匀浆中 TNF α 的水平,实验步骤严格参照试剂盒说明书进行。

1.3 肺组织形态学观察

大鼠放血处死,迅速取右肺上叶,10%甲醛固定 48 h 常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光学显微镜进行观察。

1.4 肺组织中 NF- κ B 表达的测定

肺组织石蜡切片采用链酶亲和素生物素过氧化物酶复合物法检测 NF- κ B 的表达,每个大鼠连续切片 5 张,兔抗鼠多克隆抗体 (Seamarkers 公司) 1:100 稀释,0.01 mol/L PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性片作阳性对照,DAB 显色,镜下控制反应时间,苏木素复染。细胞质和细胞核着色为棕黄色者视为阳性表达。每张切片随机选取 5 个高倍视野,分别计算每个视野中阳性细胞的百分数。

1.5 统计学处理

结果采用 SPSS11.0 软件,多样本均数间比较采用方差分析 (ANOVA) 检验,组间的两两比较采用 student newman-keuls 检验,以 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BeO 对大鼠一般状况影响的观察

大鼠造模后的前 40 d 内,在外观上与对照组无明显差异,饮食量正常,运动活泼,被毛光泽。造模后 60 d 开始,模型组取食、排便、活动均减少,有不同程度的耸毛、反应迟钝。各实验组大鼠无死亡。

2.2 大鼠肺组织病理改变

2.2.1 大体观察 生理盐水对照组肺表面光滑,呈粉红色,弹性良好。模型组:20 d 时肺呈暗红色,充血,体积增大;60 d 时肺表面呈灰色,肺体积回缩,弹性较差,表面凹凸不平。

2.2.2 光镜观察 生理盐水对照组肺组织结构清晰,肺泡壁未见增厚,肺泡上皮细胞结构完整。模型组:20 d 动物肺部出现支气管及肺组织炎症改变,肺间质水肿,肺泡间隔增宽,其中有单核细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润;40 d 时上述改变明显,尤其是肺泡间隔的增宽和炎性细胞渗出,肺泡腔渗出淋巴细胞及多形核细胞;60 d 时部分动物肺组织中可见以支气管为中心的结节样病灶的形成,这些结节由淋巴细胞、上皮样细胞核多形核巨细胞聚集而成。见图 1。

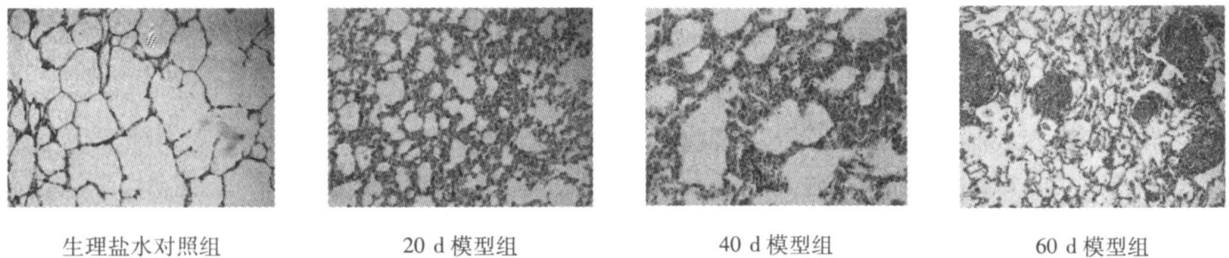


图 1 大鼠肺组织病理学光镜观察 (HE $\times 400$)

2.3 肺组织 NF- κ B 表达

由表 1 可见,生理盐水对照组大鼠在不同时相肺组织中 NF- κ B 阳性细胞百分比与空白对照组比较

未见明显差异 ($P>0.05$),但与同时相的模型组比较差别有统计学意义 ($P<0.01$);模型组内 60 d 时阳性细胞百分比,与 20 d 比较有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 不同时相大鼠肺组织中 NF- κ B 的表达

组别	大鼠 (只)	细胞浆 (%)			细胞核 (%)		
		20 d	40 d	60 d	20 d	40 d	60 d
空白对照组	6	9.67 $\pm$ 2.71	11.50 $\pm$ 3.29	11.91 $\pm$ 3.57	5.67 $\pm$ 2.71	6.79 $\pm$ 2.44	6.08 $\pm$ 3.12
生理盐水对照组	8	11.50 $\pm$ 3.48	12.47 $\pm$ 3.60	11.18 $\pm$ 2.24	7.41 $\pm$ 3.46	8.32 $\pm$ 3.81	8.21 $\pm$ 3.25
模型组	8	21.06 $\pm$ 8.69 [#]	32.55 $\pm$ 10.24 [#]	39.10 $\pm$ 12.69 ^{##}	15.87 $\pm$ 4.69 [#]	19.06 $\pm$ 7.69 [#]	25.54 $\pm$ 10.02 ^{##}

同一时相,与生理盐水对照组比较, [#] $P<0.01$;模型组内,与 20 d 组比较, * $P<0.05$

2.4 肺组织匀浆、灌洗液中 TNF- α 的水平

由表 2 可见,气管注入生理盐水后不同时间肺组织匀浆、BALF 中 TNF- α 水平,与空白对照组相比,未见明显差异 ($P>0.05$);而气管注入 BeO 后不同时间,

大鼠肺组织匀浆、BALF 中 TNF- α 水平明显高于生理盐水对照组,差异有统计学意义 ($P<0.01$);且模型组内 TNF- α 水平在 60 d 时较 20 d 时升高 ($P<0.05$)。

表 2 不同时相大鼠肺组织匀浆和 BALF 中 TNF-α 的水平

组别	大鼠 (只)	支气管肺泡灌洗液			肺组织匀浆		
		20 d	40 d	60 d	20 d	40 d	60 d
空白对照组	6	55.22±6.61	57.50±7.43	55.90±6.71	50.93±7.28	53.78±5.90	52.05±7.32
生理盐水对照组	8	58.85±9.69	61.03±10.07	60.18±11.75	55.91±7.23	57.70±9.46	55.72±8.74
模型组	8	138.81±27.1 [#]	165.97±31.5 [#]	222.54±47.00 [#]	129.60±19.54 [#]	142.71±30.25 [#]	189.52±36.37 [#]

同一时相,与生理盐水对照组比较, [#]P<0.01;模型组内,与 20 d 组比较, * P<0.05

3 讨论

铍是严重危害人体健康的职业与环境毒物之一,肺脏是慢性铍毒性作用的主要靶器官。铍本身不具有抗原性,必须与组织或体液中的某些大分子物质结合,或使某些蛋白质变性,而获得抗原性。本实验用 BCO 非暴露式气管注入法一次性注入 BCO 建立动物模型,并以生理盐水组作为阴性对照组和不进行任何处理的空白对照组进行比较,显示各项指标的测定差异未见统计学意义,表明气管注入生理盐水和气管注入操作对检测指标没有显著性的影响。模型组大鼠 20 d 时肺部出现支气管及肺组织炎性改变,40 d 时肺泡间隔的增宽和炎性细胞渗出更为明显,随着染毒时间的延长可见以支气管为中心的结节样病灶的形成。其病理改变与文献报道近似^[3],符合铍病的典型表现,表明铍病动物模型复制成功。

TNF-α 是由活化的单核巨噬细胞分泌的一类重要的细胞因子,是天然免疫和特异性免疫的重要介质。因此 TNF-α 的分泌水平也可在一定程度上反映机体的细胞免疫功能^[4]。李学军等^[3]研究发现铍病以多形核粒细胞增加为主,随着染毒时间的延长,淋巴细胞和巨噬细胞逐渐增加,后期以 T 淋巴细胞增加更为明显(主要是 CD4⁺ 细胞)。TNF-α 主要由单核细胞和巨噬细胞产生,此外, T 淋巴细胞、中性粒细胞等也可产生。本研究结果显示,模型组肺组织匀浆和 BALF 中 TNF-α 水平较生理盐水对照组明显升高,并随着病情的进展逐渐升高(60 d 高于 20 d),说明 TNF-α 在铍病肉芽肿形成的始动和维持过程中起着更为重要的作用,其导致肺损伤的途径可能主要有(1)直接损伤血管内皮细胞和肺泡 II 型上皮细胞,引起血管通透性增加及表面活性物质合成障碍;(2)作为前炎细胞因子,可激活 PMN 血管内皮细胞及血小板等,诱导释放 IL-1β、IL-8、ICAM-1 等多种细胞因子及黏附分子的表达及活性氧、脂质代谢产物、溶酶体酶等介质的释放,使炎症信号进一步放大和加强,加重组织细胞损伤;(3)激活补体和凝血系统,进一步促进炎症在肺组织中的扩散。

NF-κB 是一种在细胞内广泛存在的转录因子,多种参与炎症反应的细胞因子或炎症介质包括 TNF-α 均含

有 1 个或多个 κB 位点;在大多数静息细胞中 NF-κB 以无活性的形式存在于胞质中,在刺激因素的作用下,可生成有活性的 NF-κB 后者通过核孔进入细胞核,与靶基中启动子或增强子区域的 NF-κB 结合位点相结合,启动各种炎症反应基因转录,从而生成多种炎症因子。有研究表明,多种刺激因素如 TNF-α、氧自由基等均可激活 NF-κB 从而诱导其基因转录,使自身表达和释放增多,生成物可使 NF-κB 持续活化,这种正反馈调节导致最初的炎症信号放大^[5]。本研究发现,模型组一次性气管注入 BCO 后各时相 TNF-α 的水平显著升高,在染毒后 60 d 升高明显,同时观察到肺组织中 NF-κB 表达也明显增高,表明 BCO 刺激可引起 TNF-α 的大量释放,并有 NF-κB 的明显激活,提示 NF-κB 可能参与了铍病发展过程中 TNF-α mRNA 的转录调节过程, NF-κB 被激活,活性增高,促使炎性细胞因子的 mRNA 转录,从而合成炎性细胞因子如 IL-19、IL-8、TNF-α 等,而这些炎症因子又可以反过来活化炎症细胞,促进炎症细胞的合成及释放炎症介质。这就构成了炎症细胞—细胞因子之间的逐步放大环,促使炎症慢性化,以上因素互相交织成复杂的网络, NF-κB 则是这个网络的“焦点”。因此 NF-κB、TNF-α 与铍病的气道炎症密切相关, NF-κB 与 TNF-α 相互作用,促进炎症细胞合成多种炎症因子参与铍病发病。目前有关 NF-κB 与铍病的研究尚少, NF-κB 在铍病中的激活机制、对炎症介质基因表达调控的具体方式、调控程度以及与其他转录因子之间的相互作用等均有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Schmidt C, Peng B, Li Z, et al. Mechanisms of proinflammatory cytokine induced biphasic NF-kappaB activation [J]. Mol Cell 2003; 12 (5): 1287-1300

[2] 宋琦如, 宋辉. 生产性毒物的检测与毒性鉴定 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 2004: 298-299

[3] 李学军, 丁丽华, 刘镜愉, 等. 实验性铍病支气管肺泡灌洗液中细胞免疫学观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995; 13(6): 324

[4] Chen B, Tong Z, Nakamura S, et al. Production of IL-12, IL-18, and TNF-α by alveolar macrophages in hypersensitivity pneumonitis [J]. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 2004; 21(3): 199-203

[5] 林振和. 核因子-κB 信号传导途径的调节研究进展 [J]. 国外医学免疫学分册, 2004; 27(4): 234-238