

TNF- α 诱导 G α C α^{+} 信号途径在鼠肺成纤维细胞增殖中的作用

葛伦睿, 李素平, 李慧, 席丹丹

(山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001)

摘要: 目的 研究 TNF- α 诱导 G α C α^{+} 信号途径对鼠肺成纤维细胞增殖的机制及尼莫地平 (Nim) 的拮抗效应。方法 以不同浓度的 TNF- α 刺激 4~5 代 SD 大鼠乳鼠肺成纤维细胞, 氯氨 T 法检测成纤维细胞羟脯氨酸的含量; Western blot 检测成纤维细胞 G α 蛋白的表达, 流式细胞技术检测细胞内 C α^{+} 的含量; 酶联免疫吸附试验检测各组成纤维细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的水平。结果 G α 蛋白的结果显示随 TNF- α 剂量的增加而增加; C α^{+} 和羟脯氨酸的结果显示在 10 ng/ml TNF- α 剂量组有明显增加, 与各组比较有明显的统计学意义 ($P < 0.05$); 当 TNF- α 联合 Nim 后, 促使 cAMP 表达量增强, 同时使羟脯氨酸的表达降低。结论 TNF- α 介导 G α C α^{+} 信号途径使羟脯氨酸表达增强, Nim 通过提高 cAMP 的水平来拮抗 TNF- α 介导的效应。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; 尼莫地平; 成纤维细胞; 信号途径

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2011)04-0250-04

Role of TNF- α induced G α C α^{+} signal pathway in proliferation of lung fibroblast of rat

GE Lun-rei, LI Su-ping, LI Hui, XI Dan-dan

(School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: Objective To explore the role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) induced G α C α^{+} signal pathway in lung fibroblast proliferation of rat and the antagonistic effect of nimodipine (Nim). Methods Cultured lung fibroblasts from SD neonatal rat were stimulated by different concentrations of TNF- α , then determined the level of hydroxyproline in fibroblast by chromamine T method, examined the expression of G α protein in fibroblast by Western blot, detected the concentration of intracellular free C α^{+} by FCM, and measured the level of cAMP in fibroblast by ELISA. Results The results showed that G α protein expression was increased with the increase of TNF- α dose; the levels of C α^{+} and hydroxyproline were significantly increased in 10 ng/ml TNF- α group, there was significant difference compared with other groups ($P < 0.05$); while the combined use of TNF- α with Nim might raise the expression of cAMP and reduce the expression of hydroxyproline. Conclusion It was suggested that TNF- α induced G α C α^{+} signal pathway raising the expression of hydroxyproline, and Nim antagonized TNF- α mediated effects through raising the level of cAMP.

Key words: tumor necrosis factor alpha (TNF- α); nimodipine; fibroblast; signal pathway

粉尘进入肺内激活肺泡巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 在矽肺发病过程中起着重要的作用^[1]。Pogue 在 1990 年 *Nature* 杂志上发表文章指出: 给小鼠气管内一次注入石英后, 发现小鼠 TNF- α mRNA 水平明显升高, 当给以抗 TNF- α 抗体时, 石英导致的胶原蛋白沉积几乎完全被阻止。然而 TNF- α 的作用机制报道罕见。根据细胞信号转导理论^[2,3], 胞外信号通过与 G 蛋白偶联受体结合, 介导激活或抑制细胞内信号物质以实现跨膜信息传递, 影响细胞的各种生理功能。设想 TNF- α 对成纤维细胞功能的影响是否与受体偶联的 G 蛋白介导信号的表达有关。这方面的研究未见报道。本实验将探讨 TNF- α 对成纤维细胞 G α 蛋白及介导的

C α^{+} 信号对细胞增殖的影响; 通过 C α^{+} 抑制剂抑制 C α^{+} 的水平, 测定细胞羟脯氨酸, cAMP 的含量对细胞增殖的影响, 证实 TNF- α 诱导 G α C α^{+} 信号途径对鼠肺成纤维细胞增殖作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

环磷酸腺苷 (cAMP) 购自武汉新启迪生物技术有限公司, 尼莫地平 (Nim) 购自天津市中央药业有限公司, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、荧光生物素标记羊抗兔抗体购自北京博奥森生物科技有限公司。

1.2 实验动物

选择出生 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠, 由山西医科大学实验动物中心提供。动物合格证号: 山医字第 070101。

1.3 细胞培养及分组

取出生 1~3 d 的 SD 大鼠乳鼠, 在无菌超净台上用酒精棉擦拭全身, 腹主动脉放血处死, 开胸取出肺

收稿日期: 2010-11-16 修回日期: 2011-03-04

基金项目: 山西医科大学博士启动基金 (200614)

作者简介: 葛伦睿 (1985-), 男, 硕士研究生。

通讯作者: 李素平, 教授。

脏, 根据消化培养法^[4]提取肺组织的肺成纤维细胞; 用 Hanks液清洗肺脏, 用眼科剪将其剪成约 1 mm³大小, 用 0. 25% 胰酶消化, 200 目的尼龙膜过滤后 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 用含 10% 新生牛血清的完全培养液重新悬浮细胞且吹打均匀, 将细胞悬液接种于培养瓶后, 于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内培养并传代。4—5 代的细胞用于实验。实验前细胞做同步化处理。实验分 7 组, 空白对照组、5 ng/ml TNF-α、10 ng/ml TNF-α、20 ng/ml TNF-α、20 ng/ml TNF-α + 20 μmol/ml Nim、40 μmol/ml Nim、80 μmol/ml Nim 组。空白对照组只加无血清培养液, 每实验组设 4 个平行样品及 4 h、24 h 观察时点。

1. 4 指标测定

用不同浓度的 TNF-α 刺激 4—5 代 SD 大鼠鼠肺成纤维细胞 4 h、24 h 氯氨 T 法检测成纤维细胞羟脯氨酸含量, Western blot 技术检测成纤维细胞 G α 蛋白的表达, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定成纤维细胞内 cAMP 的含量。

用不同浓度的 TNF-α 刺激 4—5 代 SD 大鼠鼠肺成纤维细胞 30 min 流式细胞技术检测成纤维细胞内 Ca²⁺ 的含量。

1. 5 统计学分析

用 SPSS 11. 5 软件对数据处理。多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 法, 以 P < 0. 05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2. 1 不同浓度 TNF-α 对成纤维细胞羟脯氨酸含量的影响

表 1 显示, 在不同作用时间, 各实验组羟脯氨酸含量均较对照组高, 且随着作用时间的增加, 羟脯氨酸含量显著增高, 差异有统计学意义 (P < 0. 05)。在 4 h 和 24 h 作用时间, 10 ng/ml TNF-α 和 20 ng/ml TNF-α 组羟脯氨酸含量较空白对照组和 5 ng/ml TNF-α 组高, 差异均有统计学意义 (P < 0. 05)。

表 1 不同浓度 TNF-α 作用成纤维细胞羟脯氨酸含量测定结果 (x ± s) μg/ml

组别	n	4 h	24 h
空白对照组	4	0. 315 ± 0. 034	0. 823 ± 0. 037 [△]
5 ng/ml TNF-α 组	4	0. 467 ± 0. 031*	1. 002 ± 0. 021* [△]
10 ng/ml TNF-α 组	4	0. 872 ± 0. 061*	1. 019 ± 0. 041* [△]
20 ng/ml TNF-α 组	4	0. 634 ± 0. 056*	1. 010 ± 0. 033* [△]

注: 经方差分析, 与同时间空白对照组比较, * P < 0. 05 不同时间相同剂量组间比较, [△] P < 0. 05

2. 2 不同浓度 TNF-α 对成纤维细胞 G α 蛋白的影响

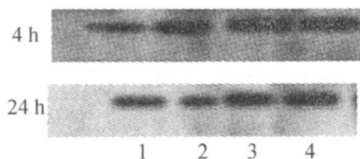
表 2 显示, 随 TNF-α 剂量的增加, G α 表达明显增

强, 各组间差异有统计学意义 (P < 0. 05)。随作用时间延长, G α 表达有所下降 (P < 0. 05)。见图 1

表 2 不同浓度 TNF-α 作用成纤维细胞 G α 含量测定结果 (x ± s)

组别	n	4 h	24 h
空白对照组	4	0. 743 ± 0. 101	0. 685 ± 0. 127
5 ng/ml TNF-α 组	4	0. 833 ± 0. 039*	0. 996 ± 0. 147*
10 ng/ml TNF-α 组	4	1. 259 ± 0. 076*	1. 102 ± 0. 053* [△]
20 ng/ml TNF-α 组	4	1. 612 ± 0. 083*	1. 365 ± 0. 098* [△]

注: 经方差分析, 与同时间空白对照组比较, * P < 0. 05 不同时间相同剂量组间比较, [△] P < 0. 05



1 空白对照组, 2 5 ng/ml TNF-α 组, 3 10 ng/ml TNF-α 组, 4 20 ng/ml TNF-α 组

图 1 G α 蛋白 Western blot 结果

2. 3 不同浓度 TNF-α 对成纤维细胞 Ca²⁺ 信号的影响

表 3 显示, 不同浓度的 TNF-α 作用于鼠肺成纤维细胞 30 min 各实验组荧光强度 (F) 值均较对照组明显增高 (P < 0. 05), 随着 TNF-α 剂量的增加, 各实验组荧光强度 (F) 值呈现先增高后降低的趋势。见图 2

表 3 不同浓度 TNF-α 作用成纤维细胞内 Ca²⁺ 测定结果 (x ± s)

组别	n	F 值
空白对照组	4	1. 15 ± 0. 02
5 ng/ml TNF-α 组	4	5. 49 ± 0. 88*
10 ng/ml TNF-α 组	4	7. 99 ± 1. 00*
20 ng/ml TNF-α 组	4	5. 40 ± 0. 24*

注: 经方差分析, 与空白对照组比较, * P < 0. 05

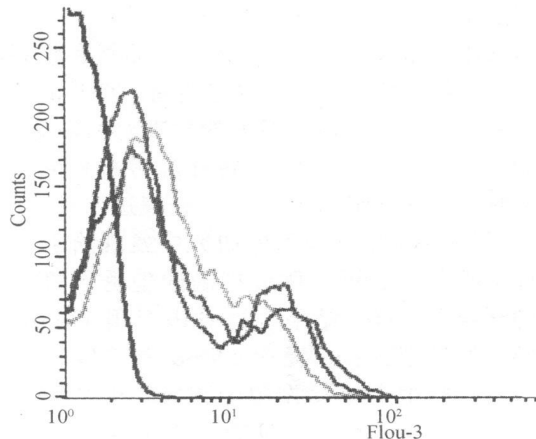


图 2 成纤维细胞内游离 Ca²⁺ 浓度检测结果

2. 4 不同浓度 Nim 联合 TNF-α 作用成纤维细胞内羟脯氨酸含量

表 4 显示, 随 Nim 含量增加, 羟脯氨酸含量降

低, 统计学检验, $P < 0.05$ 。随着作用时间的增加, 各组羟脯氨酸含量显著增高, 但 Nim 组较单独 $TNF-\alpha$ 组羟脯氨酸含量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 4 不同浓度 Nim 联合 $TNF-\alpha$ 作用成纤维细胞羟脯氨酸含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$) $\mu g/m$

组别	4 h	24 h
空白对照组	0.324 ± 0.034	0.811 ± 0.040 [△]
20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	0.661 ± 0.033*	1.333 ± 0.028* [△]
20 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	0.649 ± 0.049*	1.358 ± 0.023* [△]
40 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	0.423 ± 0.021*	1.015 ± 0.037* [△]
80 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	0.367 ± 0.021*	1.019 ± 0.041* [△]

注: 经方差分析, 与同时间空白对照组比较, * $P < 0.05$ 不同时间相同剂量组间比较, $\Delta P < 0.05$

2.5 不同浓度 Nim 与 $TNF-\alpha$ 作用成纤维细胞内 cAMP含量

表 5显示, 随 Nim 含量增加, 各实验组 cAMP含量均较空白对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随作用时间延长, cAMP含量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 5 不同浓度 Nim 与 $TNF-\alpha$ 作用成纤维细胞内 cAMP含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$) $pmol/ml$

组别	n	4 h	24 h
空白对照组	4	2.43 ± 0.72	5.14 ± 0.41 [△]
20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	4	25.72 ± 1.27*	21.65 ± 1.11* [△]
20 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	4	24.51 ± 1.18*	20.33 ± 1.16* [△]
40 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	4	30.64 ± 1.33*	25.41 ± 1.67* [△]
80 $\mu mol/ml$ Nim + 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组	4	32.83 ± 1.00*	27.42 ± 1.28* [△]

注: 经方差分析, 与同时间空白对照组比较, * $P < 0.05$ 不同时间相同剂量组间比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

成纤维细胞大量增殖, 细胞外基质量和胶原合成增加产生肺纤维化是矽肺的最终结局, $TNF-\alpha$ 在这个过程中起着关键的作用。系列的病理对照研究表明, 血液中 $TNF-\alpha$ 含量与尘肺发病有密切的关系^[5], 在矽肺动物模型的肺组织中 $TNF-\alpha$ 高表达^[6]。Piguet^[7]等 1993年在小鼠矽肺模型的研究中发现给予可溶性的 $TNF-\alpha$ 受体后, 可以明显抑制矽尘诱导的胶原生成和肺纤维化。这一结果也被 Ortiz^[8]用 $TNF-\alpha$ 受体敲出的动物模型证实, 提示 $TNF-\alpha$ 参与矽肺纤维化形成。本实验中 $TNF-\alpha$ 作用于肺成纤维细胞, 会使羟脯氨酸含量显著增加, 且随着 $TNF-\alpha$ 浓度的增加羟脯氨酸含量增加的趋势也证实这一点。Csaszar^[9]等研究认为, $TNF-\alpha$ 生物学效应是通过与相应的受体结合而发挥作用的, 表明 $TNF-\alpha$ 受体在转导 $TNF-\alpha$ 生物学信号方面起着重要的作用。 $TNF-\alpha$ 受体属 G

蛋白偶联受体 (G Protein coupling receptors GPCR)。 Gq 是 G蛋白的一种亚型。心肌病的研究显示^[10], 血管紧张素 II激活心脏成纤维细胞 Gq 蛋白产生蛋白激酶 C和 Ca^{2+} , 可以导致心肌成纤维细胞增殖, 引发心肌纤维化。博莱霉素诱导的肺纤维化病理组织中, Ca^{2+} 水平明显升高, 用 Ca^{2+} 拮抗剂后, 通过提高 cAMP的水平削弱博莱霉素诱导的肺纤维化。在矽肺发病过程中, $TNF-\alpha$ 致成纤维细胞增殖是否与 $Gq-Ca^{2+}$ 信号途径有关系, 本实验研究发现 $TNF-\alpha$ 可以增强 $Gq-Ca^{2+}$ 信号途径而导致成纤维细胞羟脯氨酸含量升高, 且有明显的剂量反应关系。因为在肺纤维化时, 成纤维细胞大量增殖, 使胶原蛋白异常表达, 肺组织内胶原纤维量增加, 由于羟脯氨酸为胶原纤维所特有, 因此羟脯氨酸含量的测定可作为判断纤维化程度的指标。为了进一步证实 $Gq-Ca^{2+}$ 信号与成纤维细胞增殖的关系。通过钙抑制剂 Nim 的干预研究发现, 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 联合 40 $\mu mol/ml$ Nim 和 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 联合 80 $\mu mol/ml$ Nim 组羟脯氨酸含量较 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 联合 20 $\mu mol/ml$ Nim 和单独 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 组低 ($P < 0.05$), 提示钙参与了 $TNF-\alpha$ 诱导成纤维细胞的增殖过程。

Gs 是 G蛋白的又一亚型, cAMP是 Gs 介导的下游信号。胞外信号激活 Gs 介导的 cAMP可以抑制细胞增殖。正常生理情况下, $Gq-G$ 途径存在交互作用以维持细胞正常的消长平衡。为了证实 $TNF-\alpha$ 在诱导细胞增殖的过程中是否影响了 Gs 介导的 cAMP水平以及这种影响效应是否是由于 Ca^{2+} 表达异常所致, 实验中使用了 Nim 以拮抗 $TNF-\alpha$ 诱导的高表达 Ca^{2+} , 从而探讨是否高表达的 Ca^{2+} 影响了 cAMP水平而导致成纤维细胞的增殖。实验表明, 在不同时间点, 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 联合 40 $\mu mol/ml$ Nim 和 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 联合 80 $\mu mol/ml$ Nim 组 cAMP浓度值均较单独 20 ng/ml $TNF-\alpha$ 高, 并且随着 Nim 浓度的增加, cAMP浓度有增加的趋势, 结合 $TNF-\alpha$ 联合 Nim 对羟脯氨酸水平的影响结果, 推测 Ca^{2+} 可能通过调节 cAMP的表达影响成纤维细胞的增殖。

参考文献:

[1] 姚三巧, 马庆坤, 范雪云, 等. 肿瘤坏死因子基因多态性与尘肺的相关性研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2006 32 (5): 286-291
 [2] 赵宝钰, 段丽琴. 尘肺病纤维化过程中细胞因子的作用 [J]. 职业与健康, 2007 11 (23): 1982-1983
 [3] 王卓, 袁聚祥. 肿瘤坏死因子 α 与尘肺、肺结核关系的研究进展 [J]. 中国工业医学杂志, 2007 20 (5): 317-319
 [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 2版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2004: 440-441. (下转第 303页)

表 1 印刷企业有毒物质检测结果

有毒物质	样品数	SIEL范围 (mg/m ³)	合格样品数	合格率 (%)
苯	160	0.01~59.96	147	91.88
丙酮	52	0.03~9.62	52	100.00
二甲苯	80	0.04~21.73	80	100.00
环己烷	44	0.07~44.99	44	100.00
甲苯	156	0.02~6.36	156	100.00
环己酮	12	0.12~0.69	12	100.00
溶剂汽油	128	0.01~77.21	128	100.00
乙苯	4	0.03~0.30	4	100.00
乙酸丙酯	20	0.24~58.64	20	100.00
乙酸乙酯	124	0.05~115.79	124	100.00
合计	780		767	98.33

表 2 印刷企业不同工序有毒物质检测对比 (x±s)

检测项目	单色及双色 印刷		四色及以上 印刷		F值	P值
	值	P值	值	P值		
苯	-2.15±1.31	0.18±2.05	14.24<0.05	8.64<0.05		
丙酮	-1.53±1.50	-0.36±1.72	0.33>0.05	-2.50<0.05		
二甲苯	-2.25±0.88	-1.64±1.95	14.66<0.05	-1.94>0.05		
环己烷	-0.69±2.31	0.62±1.07	12.10<0.05	-2.56<0.05		
甲苯	-1.35±1.37	-0.86±1.43	0.15>0.05	-2.19<0.05		
溶剂汽油	-1.14±2.00	-0.36±2.76	9.21<0.05	-3.46<0.05		
乙酸乙酯	-1.68±1.34	0.03±2.60	36.90<0.05	-4.82<0.05		

2.6 职业健康监护情况

29家印刷企业仅有 7家进行职业健康检查, 占 24.38%。进行职业健康检查共 193人, 接触苯系物作业的有 76人血液分析异常, 11人白细胞不同程度降低; 接触噪声作业 98人, 有 47人高频听阈提高。193人中, B超异常 85人, 血压异常 26人, 心电图异常 22人, 尿常规异常 32人。

3 讨论

本次调查对象主要为纸张印刷企业, 因其工艺过程较简单, 故本次调查仅反映纸张印刷企业的职业病危害现状^[1]。通过调查发现, 29家印刷企业产生职业病危害因素的岗位主要为印刷和装订岗位, 印刷岗位生产过程中使用的油墨、清

洗剂和添加剂等产生的苯、甲苯、二甲苯等有机溶剂是印刷行业的主要危害因素; 印刷四色及以上工序岗位因车间环境相对密闭、通风排毒设备设施未能达到预期效果且生产过程中使用较多添加剂等因素, 有毒物质高于单色及双色印刷岗位。29家企业仅有 10家企业印刷机配备通风排毒设备, 车间设有机械排风设施; 仅 1家企业工人佩戴防毒口罩, 3家企业为工人配备防噪声耳塞, 另有 2家企业为工人配备防尘口罩; 反映出企业对职业病危害防护的漠视和对防护知识认知上的缺乏^[1]。

调查显示, 印刷企业印刷工序和装订工序存在的职业病危害仍较严重, 应加大对企业的监管力度, 保证劳动者身体健康。本次检测的印刷企业主要为委托我单位进行职业病危害因素检测和职业健康检查的企业, 未能对全区印刷企业进行全面调查, 其检测与体检结果存在一定的局限性。

针对此次调查结果, 对印刷企业的职业病防治工作提出如下建议。(1) 采用有利于防治职业病和保护劳动者健康的新技术、新工艺、新材料, 逐步替代职业病危害严重的技术、工艺、材料, 目前美国已将世界最先进的无毒油墨应用于印刷业^[2]。(2) 有毒物质超标的作业场所, 应改善通风排毒设备设施; 噪声超标的作业场所, 应对生产设备采取降噪和减振措施。(3) 监督印刷行业加强防护设施和个人防护用品的配置和使用, 保障作业工人的健康^[1], 制定以呼吸保护计划为重点的个人职业病防护用品使用计划; 为劳动者选择并提供个人职业病防护用品, 所提供的职业病防护用品应符合防治职业病的要求。(4) 企业应建立健全职业卫生档案和劳动者职业健康监护档案; 组织工人进行职业健康检查, 掌握劳动者健康资料。(5) 加强对印刷企业领导层和劳动者职业卫生法律法规的培训, 个人职业病防护用品的选择和使用方法等职业卫生知识培训, 不断提高领导和员工对职业病危害的认知能力。(6) 加大对印刷行业职业病防治的监管力度, 尤其涉及四色以上印刷和装订的作业岗位应重点管理。监督、指导印刷行业加强作业环境治理, 改善工作环境, 降低职业病危害, 保护劳动者健康。

参考文献:

[1] 林英, 刘丽霞, 董梅, 等. 北京市某区印刷企业职业病危害状况 [J]. 职业与健康, 2010, 26(4): 374-377
 [2] 比尔·兰帕德, 王晓蕾. 2005年印刷业五大技术亮点 [J]. 国际印刷, 2005, 5: 88-89.

(上接第 252页)

[5] 侯强, 徐孝华, 王瑞. TNF-α 及其受体在尘肺病中的作用 [J]. 工业卫生与职业病, 2007, 33(2): 105-108.
 [6] Stephen S G Ferguson. Evolving concepts in G Protein coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling [J]. Pharmacological Reviews, 2001, 53(1): 1-24.
 [7] Gau G E, Tacchini-Cottier F, Vesin C, et al. TNF-α induced microvascular pathology: active role for platelets and importance of the LFA-1/ICAM-1 interaction [J]. Eur Cytokine New, 1993, 4(6): 451-419.

[8] Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF Jr, et al. Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin induced lung injury in mice [J]. Exp Lung Res, 1998, 24(6): 721-743
 [9] Csaszar A, Abel T. Receptor polymorphisms and diseases [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 414(1): 9-22
 [10] Ikushima M, Ishii M, Ohishi M, et al. ANG II inhibits insulin mediated production of PI3-kinase 4, 5-trisphosphates via a Ca²⁺-dependent but PKC-independent pathway in the cardiomyocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol [J]. 2010, 299(3): H680-689.