

# 矽肺模型大鼠血清中细胞因子消长规律的探讨

金玉兰, 沈福海, 姚三巧, 白玉萍, 范雪云, 徐应军, 陈适, 袁聚祥

(河北联合大学公共卫生学院/河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 目的 检测矽肺模型大鼠血清中细胞因子 IL-1、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  的规律, 探讨细胞因子在肺纤维化过程中的作用。方法 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分成对照组和实验组, 每组 30 只; 实验组经气管灌注 1 ml 游离二氧化硅粉尘悬液 (100 mg/ml), 对照组同法灌注等量生理盐水; 分别于第 1、7、14、21、28 天, 各组 6 只大鼠心脏取血, 处死, 并取肺组织。肺组织行 HE 染色, 观察肺部炎症、纤维化等病理变化; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清中 IL-1、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  的含量。结果 染尘大鼠血清 IL-1 含量均高于对照组, 但不同时间, 差别不明显; 染尘第 1、7、14 天的 IL-8 含量均高于对照组, 随着染尘时间增加, IL-8 含量则渐回归正常; 染尘第 1、7 天; TNF- $\alpha$  含量低于对照组; 第 14、21、28 天 TNF- $\alpha$  含量则高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 染尘不同时间 TNF- $\alpha$  含量也不同 ( $F = 30.724, P = 0.001$ ); 血清 TGF- $\beta$  的波动则较明显, 如染尘第 1、7 天其含量高于对照组, 第 14 天则低于对照组, 第 21、28 天又高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 染尘不同时间的 TGF- $\beta$  含量也不同, 差异具有统计学意义 ( $F = 33.236, P = 0.001$ )。结论 细胞因子 IL-1、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  在染尘不同时间血清中的含量不同, 其分泌的变化可能与染尘大鼠肺纤维化发生、发展有关。

**关键词:** 矽肺纤维化; 白介素-1; 白介素-8; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 转化生长因子- $\beta$

中图分类号: R114; R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2012)01-0020-04

## Study on the growth and decline pattern of serum cytokines in silicotic rats

JIN Yu-lan, SHEN Fu-hai, YAO San-qiao, BAI Yu-ping, FAN Xue-yun, XU Ying-jun, CHEN Shi, YUAN Jv-xiang  
(School of Public Health, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**Abstract: Objective** To explore the growth and decline pattern of IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in serum of silica exposed rats, thereby explore the role of these cytokines in pulmonary fibrosis during silicosis. **Methods** Sixty male Wistar rats were randomly divided into two groups, 30 rats in each group. The experimental rats were intratracheally perfused with 1 ml silica particles suspension (100 mg/ml), while control rats were treated with equal saline. At the 1, 7, 14, 21 and 28 days after administration, 6 rats in each group were sacrificed, respectively, and the samples of blood and lung were collected, the lungs were examined with light microscope and H. E. staining, the serum IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were assayed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Levels of IL-1 in serum of silica exposed rats were higher than those of control rats, without time-dependence. The serum levels of IL-8 in experimental rats 1, 7, 14 days after silica exposure were higher than those of controls, then it tended to normality with the exposure time. Levels of the TNF- $\alpha$  in serum of experimental rats were lower than those of the controls at the 1st and 7th day after exposure, since then it significantly rose and became higher than those of the controls ( $P < 0.05$ ). While the serum levels of TGF- $\beta$  of the experimental rats generally were significantly higher than those of the controls, except that the 14th days after exposure which was lower than that of controls ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The results showed that the serum levels of cytokines, such as IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  were changed with the silica exposure time, which might be related to the development of pulmonary fibrosis of silicosis.

**Key words:** pulmonary fibrosis; interleukin-1 (IL-1); interleukin-8 (IL-8); tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )

研究表明, 细胞因子在矽肺纤维化发生发展中起关键作用, 白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-8、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )

等通过募集中性粒细胞, 引发巨噬细胞性肺炎, 并进而导致肺泡壁结构破坏, 大量胶原蛋白沉积, 引起肺组织纤维化<sup>[1]</sup>。探讨染矽尘大鼠血清细胞因子分泌规律可以为矽肺早期预防提供理论依据。

## 1 对象与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂及仪器 游离二氧化硅粉尘 (购自 Sigma 公司), 大鼠 IL-1、IL-8、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  定量酶

收稿日期: 2011-07-13; 修回日期: 2011-11-14  
基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2010001770)  
作者简介: 金玉兰 (1973—), 女, 副教授。  
通讯作者: 袁聚祥, E-mail: jx\_yuan@ncmc.edu.cn.

联免疫检测试剂盒 (购自上海森雄科技有限公司)。主要仪器包括 37 °C 二氧化碳培养箱 (HEPA CLASS100, Thermo 公司), 台式离心机 (5804R, Eppendorf 公司), 超纯水系统 (Gradient A10, Millipore), 酶标仪 (RT-6000, Rayto 公司)。

1.1.2 实验动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 220 ~ 230 g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 合格证号: SCXK (京) -2009-0008, 在华北煤炭医学院实验动物中心屏障环境动物实验室饲养和实验。随机分为实验组和对照组, 每组 30 只。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 矽肺模型建立与标本的提取、处理

1.2.1.1 大鼠矽肺模型建立 研磨二氧化硅粉尘, 测定粉尘粒径和分散度 (粒子大小范围在 0.5 ~ 10  $\mu\text{m}$ , 80% 的粒子直径在 1 ~ 5  $\mu\text{m}$  之间), 用生理盐水配制成 100 mg/ml 的混悬液, 经高压灭菌后加入 2 000 U/ml 青霉素和链霉素备用。先将注射器、气管插管等器材及试剂进行消毒处理。将实验组大鼠用乙醚轻度麻醉, 将游离二氧化硅悬浊液 1 ml 注入左、右肺后立即拔出针头, 并迅速卸下气管镜。对照组大鼠同法注入等量生理盐水。

1.2.1.2 标本的提取与处理 实验组和对照组大鼠于第 1、7、14、21、28 天分别处死 6 只; 用 25% 乌拉坦腹腔注射 2 ml 麻醉后心脏取血, 留置 30 min 后 2 000 r/min 离心 20 min, 取血清 -80 °C 保存, 待测。取肺置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 做病理切片, HE 染色观察肺部炎症和纤维化病变。

1.2.2 大鼠肺组织的病理观察 肺组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后, 切成 2 ~ 4 mm 厚的组织块, 常规梯度脱水, 浸蜡。HE 染色前二甲苯脱蜡, 梯度脱水, 蒸馏水洗, 后用苏木紫和伊红液染色约 5 min, 盖玻片封片, 待显微镜下观察。

1.2.3 血清中细胞因子测定 应用酶联免疫吸附法检测, 实验步骤严格按照 ELISA 试剂盒进行。实验前

20 min 从冰箱里取出试剂盒, 平衡至室温 (20 ~ 25 °C); 取出所需数量的条板。建立标准曲线; 待测品每孔各加入 100  $\mu\text{l}$ , 将反应板置 37 °C 120 min, 洗板; 每孔中加入第一抗体工作液 50  $\mu\text{l}$ , 将反应板充分混匀后置 37 °C 60 min, 洗板用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次; 每孔中加酶标抗体工作液 100  $\mu\text{l}$ , 将反应板充分混匀后置 37 °C 30 min, 洗板; 每孔中加入底物工作液 100  $\mu\text{l}$ , 置 37 °C 暗处反应 5 ~ 10 min; 每孔加入 50  $\mu\text{l}$  终止液混匀, 在 492 nm 处测吸光值。

### 1.3 统计学处理

用 Excel 建立数据库, 所有统计数据用 SPSS13.0 统计软件处理。数据用均数  $\pm$  标准差表示, 样本均数组间两两比较采用 *t* 检验, 组内多个样本均数比较用方差分析, 趋势检验采用回归分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肺组织病理学观察

对照组肺组织结构完整, 未见明显病变。实验组不同观察时间大鼠肺组织出现不同程度的病变, 以灶性分布为主。染尘第 1 天肺泡壁组织结构水肿, 中心粒细胞、巨噬细胞浸润; 染尘第 7 天炎症进一步加重, 肺气肿, 血管周围间隙增宽, 肺小动脉炎性纤维化, 可见成纤维细胞; 第 14 天纤维组织增多, 肺间质增宽, 出现细胞性矽结节; 第 28 天肺泡炎症明显减轻, 肺纤维化程度明显, 纤维组织增生形成纤维性结节。见图 1。

### 2.2 染尘不同时间两组大鼠血清中细胞因子含量比较

2.2.1 细胞因子 IL-1 含量的比较 实验组染尘后不同时间 IL-1 含量均高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对 1 d、7 d、14 d、21 d、28 d 的 IL-1 含量进行了趋势检验, 结果显示, 随着染尘时间增加, IL-1 含量变化不明显 (回归分析:  $F = 0.795$ ,  $P = 0.388$ )。见表 1。

表 1 染尘不同时间大鼠血清 IL-1 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	6	18.52 $\pm$ 1.23	18.40 $\pm$ 1.63	17.92 $\pm$ 2.21	18.39 $\pm$ 2.12	18.53 $\pm$ 2.64
实验组	6	23.64 $\pm$ 0.84	23.38 $\pm$ 1.10	22.21 $\pm$ 0.86	23.56 $\pm$ 1.27	24.29 $\pm$ 1.31
<i>t</i> 值		5.904	5.885	4.940	6.089	6.424
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.004	0.001	0.001

2.2.2 细胞因子 IL-8 含量的比较 实验组染尘第 1、7、14 天 IL-8 含量高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对染尘后不同时间的大鼠血清 IL-8

含量进行了趋势检验, 结果显示, 随着染尘时间增加, IL-8 含量逐渐降低 (回归分析:  $F = 10.321$ ,  $P = 0.006$ ; 回归方程:  $y = 22.797 - 0.190x$ )。见表 2。

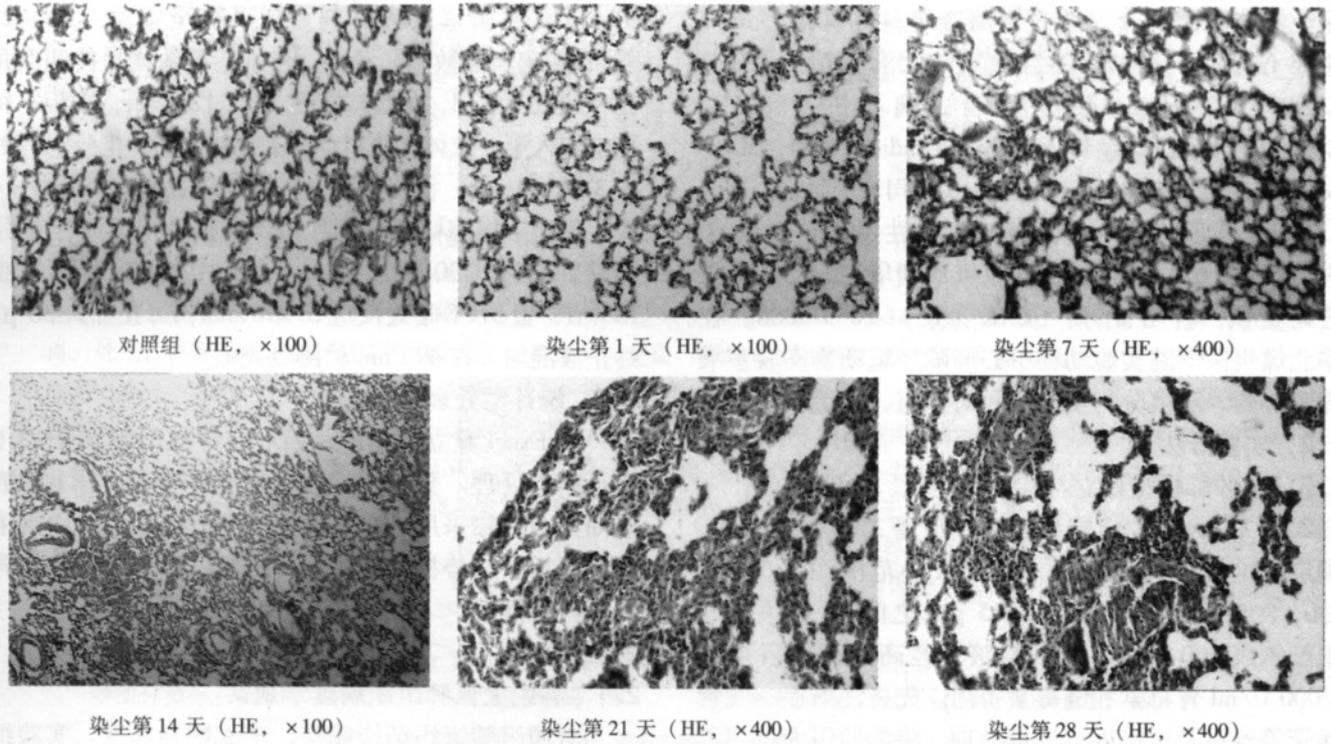


图1 大鼠肺组织病理学观察

表2 染尘不同时间大鼠血清 IL-8 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

pg/ml

组别	n	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	6	17.69 ± 1.09	16.98 ± 2.09	17.54 ± 1.62	17.09 ± 1.65	17.32 ± 2.23
实验组	6	21.32 ± 1.44	21.90 ± 2.08	22.00 ± 2.80	18.10 ± 1.29	16.49 ± 2.02
t 值		4.016	5.865	5.102	1.050	0.950
P 值		0.007	0.001	0.003	0.334	0.386

2.2.3 细胞因子 TNF-α 含量的比较 实验组染尘第 1、7 天 TNF-α 含量低于对照组, 第 14、21、28 天 TNF-α 含量高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P <$

0.05)。实验组染尘不同时间 TNF-α 含量不同, 差异具有统计学意义 ( $F = 30.724, P = 0.001$ )。见表 3。

表3 染尘不同时间大鼠血清 TNF-α 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

pg/ml

组别	n	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	F 值	P 值
对照组	6	6.25 ± 0.86	6.27 ± 0.66	6.40 ± 0.57	6.24 ± 0.36	5.52 ± 0.39	30.724	0.001
实验组	6	4.18 ± 0.74	5.44 ± 0.57	7.42 ± 0.79	7.03 ± 0.32	6.30 ± 0.25		
t 值		4.494	2.322	2.566	4.005	4.073		
P 值		0.001	0.043	0.028	0.002	0.002		

2.2.4 细胞因子 TGF-β 含量的比较 实验组染尘第 1、7 天 TGF-β 含量高于对照组; 第 14 天 TGF-β 含量降低, 并低于对照组; 第 21、28 天 TGF-β 含量升

高, 并高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。实验组染尘不同时间 TGF-β 含量不同, 差异具有统计学意义 ( $F = 33.236, P = 0.001$ )。见表 4。

表4 染尘不同时间大鼠血清 TGF-β 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

ng/ml

组别	n	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d	F 值	P 值
对照组	6	0.69 ± 0.06	0.59 ± 0.10	0.65 ± 0.12	0.53 ± 0.09	0.57 ± 0.08	33.236	0.001
实验组	6	0.87 ± 0.05	0.86 ± 0.09	0.38 ± 0.06	0.63 ± 0.07	0.70 ± 0.12		
t 值		4.487	4.962	5.785	0.497	3.996		
P 值		0.003	0.001	0.001	0.795	0.003		

### 3 讨论

我国仍然是尘肺危害最严重的国家, 为有效地控制和消除尘肺, 在采取防尘措施的同时, 进一步探讨尘肺的发病机制, 将为尘肺病的早期预防提供理论

依据。

IL-1 是炎症形成和急性发作的主要诱导物, 在肺纤维化的发病中, IL-1 既可介导肺泡炎症及损伤, 又可促进修复及过度修复, 引起间质纤维化<sup>[2,3]</sup>。Su-

wabe 等<sup>[4]</sup>推断, 肺内巨噬细胞在受到外界环境刺激后通过 IL-1 引起肺纤维化。另有研究表明, 在病变早期, 肺泡灌洗液和肺组织中的 IL-1 mRNA 表达水平即增高, 且随着天数增加, 含量也逐渐增加, 到第 7 天达到高峰。此后逐渐下降, 但仍然保持高于正常水平表达状态<sup>[5]</sup>。本研究结果显示, 染矽尘组第 1、7、14、21、28 天的 IL-1 含量均高于对照组, 染尘后不同时间的 IL-1 含量虽呈动态变化趋势, 但未见明显差异。说明矽尘刺激引起的 IL-1 分泌增加参与肺部炎症和纤维化的疾病过程。

IL-8 是在炎症刺激因子 IL-1、TNF 或 LPS 作用下, 由多种细胞表达产生的。IL-8 具有很强的趋化中性粒细胞及 T 淋巴细胞的能力<sup>[6]</sup>。有研究表明, IL-8 可诱导中性粒细胞聚集于气道并活化中性粒细胞脱颗粒, 释放氧自由基、白三烯、前列腺素类等介质引发中性粒细胞炎症<sup>[7]</sup>。多数情况下, IL-8 介导的肺泡中性粒细胞在肺部的聚集是机体的正常防御反应, 对机体有保护作用。但当炎症反应过强时, IL-8 可通过介导肺泡中性粒细胞在肺部大量、持续地聚集而引起肺部损伤<sup>[8]</sup>。本次研究结果显示, 染矽尘组第 1、7、14 天的 IL-8 含量高于对照组, 而随着染尘时间增加, IL-8 含量逐渐降低, 第 21、28 天的实验组 IL-8 含量与对照组相比差异没有统计学意义。结合染矽尘组肺组织病理学观察结果 (即早期肺泡炎症明显; 后期炎症减轻, 纤维组织增生), 提示 IL-8 可能参与矽尘所致的肺部炎症反应, 而不直接参与肺组织纤维化。

TNF- $\alpha$  是一种具有细胞毒效应的细胞因子, 它是由活化的单核巨噬细胞产生的一种活性多肽, 它不仅参与介导抗肿瘤、免疫调节、炎症反应和组织损伤等病理生理过程, 也参与组织损伤的修复和结缔组织代谢的调节<sup>[9]</sup>。体外实验表明, TNF- $\alpha$  在肺纤维化中具有重要意义, 无论在间质性肺疾病或动物模型, 巨噬细胞释放的 TNF- $\alpha$  均增加。TNF- $\alpha$  受体消除的小鼠暴露于石棉纤维后不发生肺纤维增生性病变<sup>[10]</sup>。本研究中, 实验组染尘第 1、7 天 TNF- $\alpha$  含量低于对照组, 第 14、21、28 天 TNF- $\alpha$  含量高于对照组, 实验组染尘不同时间 TNF- $\alpha$  含量不同, 呈现先增高后降低的趋势, 染尘 14 d 达峰值。

TGF- $\beta$  在肺纤维化疾病中发挥重要作用, 被大多数学者公认为是肺纤维化形成与发展的关键性细胞因子。很多研究表明, TGF- $\beta$  可以促进成纤维细胞增殖和聚集, 而应用 TGF- $\beta$  单克隆抗体则可抑制其增殖。TGF- $\beta$  还可以促进成纤维细胞表型向成肌纤维细胞表型转化, 而成肌纤维细胞参与细胞外基质蛋白的沉

积, 在肺纤维化发病机制中起重要作用<sup>[11]</sup>。本次研究显示, 实验组染尘第 1、7 天 TGF- $\beta$  含量高于对照组, 第 14 天 TGF- $\beta$  含量降低, 并低于对照组, 第 21、28 天 TGF- $\beta$  含量升高, 并高于对照组, 以第 1、7 天其值最高。结合染矽尘组肺组织病理学观察, 可以认为 TGF- $\beta$  在矽尘刺激早期肺部炎症及后期纤维化形成中发挥重要作用, 而 TNF- $\alpha$  对染尘后期肺部纤维化病变过程的作用更为突出。

近年, 随着研究的不断深入, 细胞因子在肺纤维化发生发展过程中的机制探讨已取得了一些进展, 并初步形成了细胞因子假说, 在临床治疗肺纤维化疾病方面也取得了初步成果。但仍有许多领域需要进一步探索, 进一步了解细胞因子在尘肺纤维化中的作用及其作用机制, 将有助于我们加深对肺纤维化的认识, 并探索出起关键作用的细胞因子加以阻断, 以延缓肺纤维化的进程。

#### 参考文献:

- [1] Nasreen Khalil, Andrew Churg, Nestor Muller, *et al.* Environmental, inhaled and ingested causes of pulmonary fibrosis [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35 (1): 86-96.
- [2] 李明月, 刘立忠, 黄尚质, 等. 干细胞生长因子抑制 MRC5 成纤维细胞所致的纤维化作用 [J]. *基础医学与临床*, 2002, 22(5): 422-427.
- [3] Welsh D A, Guery B P, Deboisblanc B P, *et al.* Keratinocyte growth factor attenuates hydrostatic pulmonary edema in an isolated, perfused rat lung model [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280 (3): H1311-H1317.
- [4] Suwabe A K, Takahashi S, YaSui S, *et al.* Bleomycin-stimulated hamster alveolar macrophage release interleukin-1 [J]. *Am J Pathol*, 1988: 132 (3): 512-520.
- [5] 杨俊玲, 尹金植, 李青山, 等. 实验性肺纤维化小鼠 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的动态表达及其意义 [J]. *吉林大学学报 (医学报)*, 2007, 33 (3): 522-525.
- [6] Lynch J P, Standiford T J, Rolfe M W, *et al.* Neutrophilic alveolitis in idiopathic pulmonary fibrosis. The role of interleukin-8 [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1992, 145 (6): 1433-1439.
- [7] Abu-Harb M, Bell F, Finn A, *et al.* IL-8 and neutrophil elastase levels in the respiratory tract of infants with RSV bronchiolitis [J]. *Eur Respir J*, 1999, 14 (1): 139-143.
- [8] 戴甜, 曹书华. 细胞因子在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的作用 [J]. *医学综述*, 2008, 14 (6): 900-902.
- [9] 李才. 器官纤维化基础与疾病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 195-196.
- [10] Liu J Y, Brass D M, Hoyle G W, *et al.* TNF-alpha receptor knock-out mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled asbestos fibers [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153 (6): 1839-1847.
- [11] Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, *et al.* Transforming growth factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163 (1): 152-157.