

肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体干预矽肺纤维化的实验研究

张华¹, 高磊², 谭瑞霞¹, 隋君娜³, 郭建¹

(1. 青岛市中心医疗集团职业病防治院, 山东 青岛 266042; 2. 青岛市中心血站, 山东 青岛 266042; 3. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛 266071)

摘要: **目的** 观察肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 单克隆抗体 (英夫利西) 对矽尘诱导的大鼠肺纤维化的抑制作用, 探讨英夫利西治疗肺纤维化的可能机制。**方法** 将 48 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组, 每组 16 只。染尘组和干预组大鼠气管内一次性注入 50 mg SiO₂ 粉尘, 次日起干预组给予 15 mg/kg 英夫利西皮下注射, 共 5 d, 染尘组仅注射等量生理盐水; 对照组气管内和皮下均注射生理盐水。各组分别于建模后 7 d、14 d 处死大鼠各 8 只, 以 HE、Masson 染色对肺组织炎症和纤维化程度进行评价。ELISA 法检测血、支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF- α 含量, Western blot 检测肺组织 NF- κ B 蛋白表达量。**结果** 英夫利西干预后, 肺泡炎评分 (7 d) 和纤维化评分 (14 d) 优化; 血清 TNF- α 含量降低, BALF 中 TNF- α 含量仅 7 d 降低, 7 d 时 NF- κ B p65 蛋白表达下调, 以上结果差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** TNF- α 单克隆抗体可降低 TNF- α 水平, 进而抑制 NF- κ B 信号通路的活化, 缓解矽尘诱导的大鼠肺纤维化进程。

关键词: 英夫利西; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 核因子- κ B 信号通路 (NF- κ B); 矽肺

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2016)06-0411-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2016.06.004

Interventive effect of TNF- α monoclonal antibody on silica-induced pulmonary fibrosis in rats

ZHANG Hua*, GAO Lei, TAN Rui-xia, SUI Jun-na, GUO Jian

(* . Center of Occupational Disease Prevention and Control, Qingdao Municipal Central Medical Group, Qingdao 266042, China)

Abstract: Objective To observe the inhibiting effect of TNF- α monoclonal antibody (infliximab) on silica-induced pulmonary fibrosis in rats, to explore the possible mechanism of infliximab in silicosis treatment. **Methods** Forty-eight Wistar rats were randomly divided into treatment group ($n=16$), model group ($n=16$) and control group ($n=16$). 50 mg SiO₂ dusts were injected into trachea of the rats of silica-exposed group and intervention group, from the second day of silica-exposure the rats of intervention group received 15 mg/kg by s. c injection of infliximab for 5 days, the rats of silica-exposed group were injected with N. S; while the control rats only administrated with N. S both trachea and subcutaneous injection. 7 and 14 days after silica exposure, 8 rats of each group were killed, respectively, the lung tissue were stained with H&E and Masson's trichromedye for observing inflammation and fibrosis, TNF- α levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), NF- κ B p65 expression was measured quantitatively by Western blot method. **Results** The results showed that after intervention of infliximab, the severity of pulmonary inflammation and fibrosis all were improved, the levels of serum TNF- α (7 d, 14 d) and BALF TNF- α (7 d) were decreased, and the rising of NF- κ B p65 protein expression (7 d) was also inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggested that TNF- α monoclonal antibody can reduce TNF- α level, inhibit NF- κ B signal pathway and alleviate the progress of pulmonary fibrosis by silica in rats.

Key words: Infliximab; tumor necrosis factor- α (TNF- α); nuclear factor- κ B (NF- κ B); silicosis

矽肺纤维化形成的具体病理机制复杂且不明确, 目前尚无有效逆转和缓解矽肺病程发展的治疗药物和方法。在公认矽肺发病机制学说中, 细胞因子网络学说, 尤其是细胞因子介导的信号转导通路在矽肺纤维化中的致病作用受到广泛关注。因此, 寻找靶向矽肺发生发展中关键性细胞因子及其介导信号通路的有效药物成为亟待解决的问题。肿瘤坏死因子- α (TNF-

α) 参与纤维原细胞的增殖与成纤维细胞的分化, 被认为是矽肺炎症和纤维化形成和发展的关键性细胞因子^[1-4]。TNF- α 以经典途径激活 NF- κ B^[5,6], 其信号通路参与 TNF- α 介导的矽肺损伤过程^[7,8]。Hubbard 研究发现^[9,10], 核因子- κ B 可以调控多种介导矽肺炎症和纤维化反应的细胞因子、炎症介质的基因转录。目前应用 TNF- α 拮抗剂阻断 TNF- α 与受体结合而启动 NF- κ B 信号通路对矽肺纤维化影响的研究少有报道。本研究采用气管非暴露法建立大鼠矽肺模型, 以 TNF- α 人鼠嵌合的单克隆抗体——英夫利西与可溶性和膜性的 TNF- α 结合, 阻止 TNF- α 与细胞表面受体

收稿日期: 2016-09-26; 修回日期: 2016-11-07

基金项目: 青岛市科技发展指导计划项目 (KJZD-12-23-nsh)

作者简介: 张华 (1971—), 女, 副主任医师, 研究方向: 尘肺的诊断和治疗。

通信作者: 郭建, 主任医师, E-mail: 18563967171@163.com。

特异结合,探讨 TNF- α 单克隆抗体对 TNF- α 下游 NF- κ B 信号通路的干预作用及其防治矽肺纤维化的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 180~220 g,由青岛药品检验所提供;二氧化硅(SiO₂)结晶型标准品,纯度为 99%,粒子直径 0.5~10 μ m,80%在 1~5 μ m 之间(美国 Sigma 公司);注射用 TNF- α 单克隆抗体单抗(英夫利西,瑞士 Cilag AG 公司),10%福尔马林液、苏木素-伊红染液、Masson 三色染液(北京中杉金桥生物技术公司),NF- κ B P65 兔抗大鼠单克隆抗体(美国 Proteintech 公司),大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(美国 RD 公司),羊抗兔二抗、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白 marker(中国康为世纪公司),超敏 ECL 化学发光试剂盒(中国碧云天生物技术公司),酶标仪(中国 Addcare 公司),活体成像分析仪(法国 Fusion Fx)。

1.2 矽肺模型的建立与分组

将大鼠随机分为 3 组,即干预组、染尘组、对照组,每组各 16 只。染尘组和干预组大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉后,气管插管一次性注入 50 mg/ml 二氧化硅混悬液 1 ml^[10],对照组注入等量灭菌生理盐水;建模后 2~6 d,每天干预组给予 3 mg/kg 英夫利西注射液 0.2 ml 皮下注射^[11],染尘组和对照组等量灭菌生理盐水皮下注射,于 7 d、14 d 两个时间点各组分别随机取 8 只大鼠将其处死。

1.3 普通光学显微镜下肺组织病理学观察

大鼠右肺中叶用 10%福尔马林液(甲醛)固定,石蜡包埋切片,进行 HE 染色、Masson 染色,对肺组织肺泡炎和纤维化进行评分^[12]。肺泡炎分级标准:0 级—无肺泡炎;I 级—轻度肺泡炎,受累面积 < 20%;II 级—中度肺泡炎,受累面积占全肺的 20%~50%;III 级—重度肺泡炎,受累面积 > 50%。肺纤维化分级:0 级—无纤维化;I 级—轻度纤维化,受累范围 < 20%,累及胸膜及胸膜下肺实质,肺泡结构紊乱;II 级—病变范围占全肺的 20%~50%,肺纤维化从胸膜开始延伸,但仍属局部;III 级—弥散性肺纤维化,病变范围 > 50%,融合损伤并伴有广泛肺实质结构紊乱。

1.4 ELISA 检测血清和 BALF 中 TNF- α 的含量

抽取大鼠腹主动脉血,4 $^{\circ}$ C,3500 r/min 离心 10 min,取血清。将 2 ml 灭菌生理盐水缓慢注入肺内,见左肺逐渐膨大、变白,间隔 30 s 后缓慢回抽,将

回抽液体再次注入肺内,如此推抽 3 次。2 ml 注入 3 次,收集 BALF 约 5 ml 于塑料试管中,回收率约为 80%。收集的 BALF,4 $^{\circ}$ C,1500 r/min 离心 10 min,取上清。ELISA 法检测 TNF- α 含量。

1.5 Western blot 检测肺组织中 NF- κ B 蛋白表达

肺组织匀浆后提取总蛋白,根据 BCA 法测定总蛋白含量,每孔上样 40 μ g,行 SDS-PAGE 电泳,目的蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 3 h,加入兔抗鼠 NF- κ B 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,羊抗兔二抗室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次,每次 15 min,加入 ECL 显色剂,曝光、显影,采用 ImageJ2x 软件行条带分析,测定条带的平均光密度(OD)值,以 β -actin 作内参照,NF- κ B 条带与 β -actin 的 OD 值的比值表示 NF- κ B 蛋白表达的相对水平。

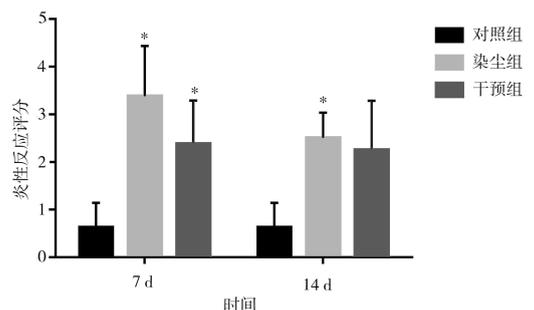
1.6 统计学分析

所有数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间的比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色和 Masson 染色肺组织病理学改变

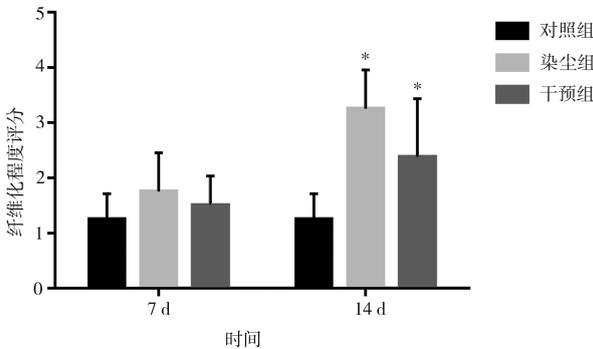
2.1.1 HE 染色结果及炎症评分 对照组肺组织为正常的肺泡结构。染尘大鼠 7 d 时肺泡内出现大量巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞浸润,对照组、染尘组和干预组的炎症反应评分分别为 0.625 ± 0.518 、 3.375 ± 1.061 、 2.375 ± 0.916 ,三组间比较差异均有统计学意义($F = 20.83$, $P < 0.05$)。14 d 时染尘组和干预组的肺组织损伤加重,可见多灶纤维化增生,肉芽肿增多、增大,炎性细胞减少。染尘组和干预组炎症评分(2.500 ± 0.535 、 2.250 ± 1.035)和对照组(0.625 ± 0.518)比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但干预组与染尘组间差异无统计学意义(见图 1)。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 1 HE 染色炎症程度评分

2.1.2 Masson 染色结果及纤维化评分 对照组大鼠肺组织有正常少许胶原纤维分布。染尘 7 d 时, 染尘组与干预组肺间质均有少量胶原沉积, 三组纤维化评分分别为 1.250 ± 0.164 、 1.750 ± 0.250 、 1.500 ± 0.189 , 各组间差异无统计学意义 ($F=1.500$, $P>0.05$)。14 d 时染尘组大鼠肺泡壁及间质胶原沉积开始显著增多, 对照、染尘、干预组纤维化评分为 1.250 ± 0.463 、 3.250 ± 0.707 、 2.375 ± 1.061 , 各组间差异均有统计学意义 ($F=13.51$, $P<0.05$)。见图 2。



注: 与对照组比较, * $P<0.05$ 。

图 2 Masson 染色纤维化程度评分

2.2 血清和 BALF 中 TNF- α 含量变化

对照组大鼠血清中 TNF- α 呈低浓度表达, 染尘组 TNF- α 含量在各时间点均高于对照组, 干预组在各时间点均低于染尘组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。对照组大鼠 BALF 中 TNF- α 亦低浓度表达, 染尘组 TNF- α 含量在染尘 7 d 时明显升高, 干预组 TNF- α 含量低于染尘组, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 但在染尘 14 d 时, 干预组与染尘组比较差异无统计学意义。见表 1。

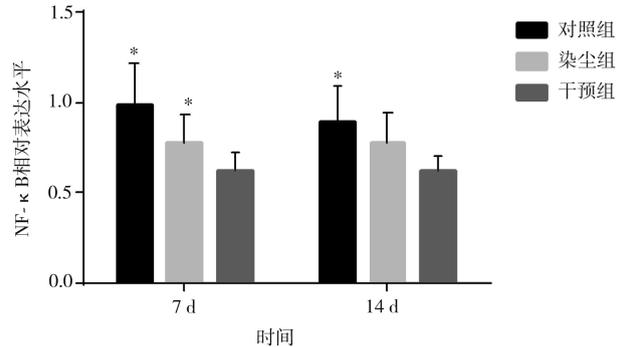
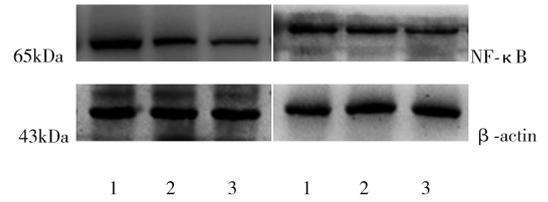
表 1 不同时间点血清和 BALF 中 TNF- α 含量变化 ($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	血清		BALF	
	7 d	14 d	7 d	14 d
对照组	42.974±12.392	45.580±14.591	36.463±12.441	38.554±12.916
染尘组	86.405±20.494*	77.064±11.829*	69.456±23.580*	50.764±16.580
干预组	66.565±19.850#	58.734±16.335#	49.132±17.223#	47.350±12.989

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, 与染尘组比较, # $P<0.05$ 。

2.3 肺组织 NF- κ B 蛋白表达水平

与对照组 (0.617 ± 0.103) 比较, 7 d 时染尘组肺组织蛋白 NF- κ B p65 相对表达量增加 (0.990 ± 0.228), 干预组 (0.779 ± 0.160) 低于染尘组, 差异有统计学意义 ($F=9.518$, $P<0.05$); 14 d 时, 染尘组 NF- κ B p65 表达量与干预组间差异无统计学意义。见图 3。



注: 与对照组比, * $P<0.05$ 。

图 3 不同时间点肺组织中 NF- κ B 蛋白表达水平

3 讨论

在众多参与矽肺纤维化的细胞因子中, TNF- α 作为促炎和促纤维化的激活因子, 对矽肺的发生和发展起关键性作用。TNF- α 主要来源于肺泡和肺间质巨噬细胞, 通过与靶细胞上相应的 TNF 受体 (TNFR) 结合来发挥生物学功能。有研究证实^[2-4], 外源重组 TNF- α 加重矽肺纤维化, 可溶性 TNF 受体或抗 TNF- α 抗体阻碍矽肺胶原沉着; TNF- α 受体敲除的染尘大鼠则不发生矽肺。表明 TNF- α 及其受体介导的活化信号, 为矽肺炎症和纤维化发生所需。

英夫利西是人鼠嵌合的 TNF- α 单克隆抗体, 通过与可溶性和膜性的 TNF- α 结合, 阻止 TNF- α 与细胞表面相应的受体特异结合, 从而发挥抗 TNF- α 的生物学作用。现已批准用于类风湿性关节炎、炎症性肠病、强直性脊柱炎和银屑病的治疗。虽然, 临床上对英夫利西与肺纤维化的关系存在一定争议, 但已有研究报道^[13-16], 英夫利西作为 TNF- α 单克隆抗体, 可以缓解肺部炎症反应和改善肺组织病理表现, 在肠缺血/再灌注导致的急性肺损伤、哮喘的气道平滑肌高反应性、吸烟所致的肺气肿中起一定的保护作用。在动物模型试验中, 英夫利西被证实可有效减弱博来霉素诱导的肺纤维化, 且本身无致肺纤维化的副作用^[17]。本研究通过给予染尘大鼠英夫利西干预后, 大鼠血清中 TNF- α 表达受到抑制, 肺泡炎反应减弱 (7 d), 肺泡壁和间质胶原沉积减少 (14 d), 显示英夫利西可抑制矽尘诱导的大鼠肺炎症反应和纤维化。BALF 中 TNF- α 仅在 7d 时降低, 考虑与矽肺纤维化形成期 BALF 中 TNF- α 作用微弱, 水平下降有关。

NF- κ B 作为一种重要的核转录因子,是多种信号转导途径的交汇点,在各种因子相互作用的复杂网络起中心调控作用^[18]。研究发现,NF- κ B 与肺纤维化关系密切,NF- κ B 与多种相关因子基因启动子或增强子 κ B 序列发生特异性结合,调控其转录和表达而参与肺纤维化形成^[19]。矽尘可诱导巨噬细胞 NF- κ B 活化和表达^[9,20],而 NF- κ B 的活化程度与矽尘暴露时间、病情严重程度高度相关^[21,22]。本研究发现,7 d 时英夫利西干预可抑制 TNF- α 高表达,下调 NF- κ B p65 表达;但在 14 d 时却未见显著性差异。英夫利西能抑制肺泡炎期(7d) TNF- α 介导 NF- κ B 通路活化,然而在肺纤维化形成期(14 d) BALF 中 TNF- α 肺组织 NF- κ B p65 并未呈现明显的下调趋势,据此推测英夫利西拮抗 TNF- α 介导的 NF- κ B 通路主要通过阻遏矽肺早期肺泡炎症反应,从而阻止或减轻肺纤维化的进展,但对抑制肺组织胶原沉积作用可能并不活跃。本研究提示寻找新方法阻遏以 TNF- α 为核心靶点的信号通路过程可能成为临床治疗矽肺纤维化的有效途径,将其用于矽肺的防治存在潜在的研究价值。

参考文献:

[1] Miyazaki Y, Araki K, Vesin C, Garcia I, *et al.* Expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis [J]. *J Clin Invest.* 1995, 96 (1): 250-259.

[2] Piguet P F, Collart M A, Grau G E, *et al.* Requirement of tumor necrosis factor for development of silica-induced pulmonary fibrosis [J]. *Nature*, 1990 (344): 245-247.

[3] Gossart S, Cambon C, Orfila C, *et al.* Reactive oxygen intermediates as regulators of TNF- α production in rat lung inflammation induced by silica [J]. *J Immunol*, 1996, 156 (4): 1540-1548.

[4] Ortiz L A, Lasky J, Lungarella G, *et al.* Upregulation of the p75 but not the p55 TNF- α receptor mRNA after silica and bleomycin exposure and protection from lung injury in double receptor knockout mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20 (4): 825-833.

[5] Hoffman A, Levchenko A, Scott M L, *et al.* The IKappa-NF-KappaB signaling module: temporal control and selective gene activation [J]. *Science*, 2002 (298): 1241-1245.

[6] Perkins N D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (1): 49-62.

[7] Di G M, Gambelli F, Hoyle G W, *et al.* Systemic inhibition of NF kappa B activation protects from silicosis [J]. *PLoS One*, 2009, 4 (5): 5689.

[8] Gozal E, Ortiz L A, Zou X, *et al.* Silica-induced apoptosis in murine macrophage: involvement of tumor necrosis factor-alpha and nuclear factor-kappa B activation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27 (1): 91-98.

[9] Hubbard A K, Timblin C R, Shukla A, *et al.* Activation of NF- κ B dependent gene expression by silica in lungs of luciferase reporter mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282 (5): L968-L975.

[10] Lacher S E, Johnson C, Jessop F, *et al.* Murine pulmonary inflammation model: a comparative study of anesthesia and instillation methods [J]. *Inhal Toxicol*, 2010, 22 (1): 77-83.

[11] Triantafyllidis J K, Papalois A E, Parasi A, *et al.* Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 43 (11): 6843-6847.

[12] 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.

[13] Cai Y, Cao Y X, Xu C B, *et al.* Infliximab alleviates inflammation and ex vivo airway hyperreactivity in asthmatic E3 rats [J]. *Int Immunol*, 2011, 23 (7): 443-451.

[14] Guzel A, Gunaydin M, Guzel A, *et al.* Infliximab attenuates activated charcoal and polyethylene glycol aspiration-induced lung injury in rats [J]. *Experimental Lung Research*, 2012, 38 (3): 147-156.

[15] Zhang X Y, Zhang C, Sun Q Y, *et al.* Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats [J]. *Chin Med J*, 2011, 124 (16): 2502-2506.

[16] Guzel A, Kanter M, Guzel A, *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion [J]. *J Mol Histol*, 2012, 43 (3): 361-369.

[17] Altintas N, Erboga M, Aktas C, *et al.* Protective effect of infliximab, a tumor necrosis factor-alfa inhibitor, on bleomycin-induced lung fibrosis in rats [J]. *Inflammation*, 2015, 39 (1): 65-78.

[18] Natoli G, Constanzo A, Ianni A, *et al.* Tuning up inflammation: How DNA sequence and chromatin organization control the induction of inflammatory genes by NF-KB [J]. *Febs Lett*, 2006, 580 (12): 2843-2849.

[19] El-Khouly, El-Bakly W M, Awad A S, *et al.* Thymoquinone blocks lung injury and fibrosis by attenuating bleomycin-induced oxidative stress and activation of nuclear factor Kappa-B in rats [J]. *Toxicology*, 2012, 302 (2-3): 106-113.

[20] Kang J L, Pack I S, Lee H S, *et al.* Enhancement of nuclear factor- κ B activation and protein tyrosine phosphorylation by a tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, involves reactive oxygen species in silica-stimulated macrophages [J]. *Toxicology*, 2000, 151 (1-3): 81-89.

[21] Castranova V, Porter D, Millecchia L, *et al.* Effect of inhaled crystal line silica in a rat model: time course of pulmonary reactions [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002 (234-235): 177-184.

[22] Porter D W, Ye J, Ma J, *et al.* Time course of pulmonary response of rats to inhalation of crystalline silica: NF- κ B activation, inflammation, cytokine production, and damage [J]. *Inhal Toxicol*, 2002, 14 (4): 349-367.