

染尘大鼠早期肿瘤坏死因子- α 、转生长因子- β 变化规律研究

Study on the early change pattern of TNF- α , TGF- β in BALF of dust-exposed rats

刘红军, 王瑞, 周晓宝, 张玮, 张海东, 曲佳, 王辉

LIU Hong-jun, WANG Rui, ZHOU Xiao-bao, ZHANG Wei, ZHANG Hai-dong, QU Jia, WANG Hui

(山东省医学科学院/山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062)

摘要: 取雄性 Wistar 大鼠, 随机分为 4 组, 采用非气管暴露法分别注入 15 mg/ml、30 mg/ml、60 mg/ml 粉尘悬浮液和生理盐水各 1 ml, 每组 7 只大鼠分别在第 1、3、7、14、21、28 天 6 个时间点处死。离体进行支气管肺泡灌洗 (BAL), BALF 离心取上清液, 然后采用酶联免疫吸附 (ELISA) 测定上清液中 TNF- α 、TGF- β 含量。不同剂量的粉尘对 TNF- α 、TGF- β 有显著影响 ($P < 0.05$), 各剂量组在各时点 TNF- α 含量较对照组均有升高, 除 21 d 高剂量组外差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); TGF- β 含量较对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示矽尘所致的纤维化早期 TNF- α 、TGF- β 含量变化规律明显, 抑制一种或两种细胞因子可有效阻滞纤维化的发生发展。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; 转生长因子- β ; 大鼠; 矽尘

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)02-0131-02

矽肺是由于吸入游离二氧化硅粉尘引起的以间质性肺纤维化为主的全身性疾病, 对机体危害严重, 且尚无有效治疗手段。二氧化硅能刺激肺细胞产生氧化剂、趋化因子和细胞因子, 造成细胞损伤、增生以及胶原异常生长。已有研究表明, 一些细胞因子及其形成的网络系统在肺纤维化的发生、发展过程中起着重要作用, 其中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转生长因子- β (TGF- β) 等对调控肺成纤维细胞的分裂、增殖及胶原蛋白的合成与降解起着十分重要的作用。本文通过不同剂量染矽尘建立矽肺模型, 测定支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中细胞因子 TNF- α 、TGF- β 的浓度, 探讨两种细胞因子在矽肺早期的变化规律, 为矽肺发生机制及早期预防提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

168 只雄性 Wistar 大鼠, 体重 160 ~ 180 g, 购于山东大学实验动物中心, 许可证编号: [SCXK (鲁) 2009-0001]。大鼠在动物房适应一周后, 将其随机分为高、中、低剂量组和对照组, 每组 42 只。分别注入 15 mg/ml、30 mg/ml、60 mg/ml

ml 经高温消毒的粉尘悬浮液 (购于 Sigma 公司的二氧化硅纯度 99%, 粒子大小 0.5 ~ 10 μm , 80% 粒子直径在 1 ~ 5 μm) 各 1 ml, 对照组同样方法注入同体积的生理盐水。

1.2 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 的收集

模型建成后, 每组 7 只 Wistar 大鼠分别在第 1、3、7、14、21、28 天 6 个时间点处死, 进行离体支气管肺泡灌洗。操作过程: 4% 戊巴比妥钠按照 0.1 ml/100 g 进行腹腔注射麻醉, 暴露胸腔, 咽喉部剪断气管, 连带气管取出完整无破损肺组织; 经钝头插管缓慢注入 2 ml 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌生理盐水, 间隔 30 s 回抽灌洗液。反复进行 3 次, 共收集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 约 5 ml, 经 1 500 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 离心 10 min, 上清液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定上清液中 TNF- α 和 TGF- β 。

1.3 统计学分析

数据分析采用 SPSS17.0 统计软件, 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组比较采用单因素方差分析, 各组间两两比较采用 LSD 法检验。

2 结果

2.1 BALF 中 TNF- α 水平测定

经方差分析不同剂量组大鼠 BALF 中 TNF- α 含量显示, 不同时间点 ($F = 0.670$, $P > 0.05$)、不同剂量组 ($F = 17.211$, $P < 0.01$), 仅不同矽尘剂量对 TNF- α 有显著影响。各剂量组在不同时间点与对照组相比 TNF- α 均有不同程度升高, 经 LSD 两两比较显示, 除 21 d 高剂量组外, 其余差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各剂量组比较显示, 仅在 7 d 和 21 d 高剂量组与低剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 剂量-效应关系不明显。见表 1。

2.2 BALF 中 TGF- β 水平测定

经方差分析不同剂量组大鼠 BALF 中 TGF- β 含量显示, 不同时间点 ($F = 1.682$, $P > 0.05$)、不同剂量组 ($F = 25.487$, $P < 0.01$), 仅不同矽尘剂量对 TGF- β 有显著影响。各剂量组在各时间点均有不同程度的升高, 经 LSD 法两两比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。总体观察显示, 各剂量组染尘后期 TGF- β 水平高于前期, 在 14 ~ 28 d 高剂量组与低剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 14 d、21 d 高剂量组与中剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

许多生物活性介质共同参与矽肺发病进程, 最主要的是 TNF- α 、TGF- β 等, 它们多由肺常驻细胞或浸润的炎性细胞所释放, 刺激成纤维细胞增殖, 使胶原等细胞外基质合成增加, 后者在肺内沉积, 导致肺泡壁和间质发生纤维化。

收稿日期: 2011-10-13; 修回日期: 2011-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30872094); 山东省科技攻关项目 (编号: 2008GG30002036)

作者简介: 刘红军 (1983—), 男, 在读医学硕士, 研究方向: 职业卫生。

通讯作者: 王瑞, 研究员, 硕士生导师, E-mail: ykywangrui@yahoo.com.cn。

表 1 BALF 中 TNF- α 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

ng/L

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	126.8 $\pm$ 27.0	138.0 $\pm$ 43.3	158.7 $\pm$ 47.1	162.3 $\pm$ 74.5	147.8 $\pm$ 31.5	106.7 $\pm$ 29.2
低剂量组	217.7 $\pm$ 35.7*	263.3 $\pm$ 63.8*	203.8 $\pm$ 9.9	270.2 $\pm$ 84.1*	290.5 $\pm$ 73.5*	253.5 $\pm$ 86.8*
中剂量组	238.1 $\pm$ 42.7*	241.4 $\pm$ 43.2*	239.1 $\pm$ 52.6*	293.8 $\pm$ 84.1*	233.4 $\pm$ 30.8*	278.5 $\pm$ 26.2*
高剂量组	279.9 $\pm$ 43.2*	246.2 $\pm$ 47.8*	291.0 $\pm$ 85.2* [#]	271.8 $\pm$ 107.2*	173.9 $\pm$ 23.8 [#]	238.5 $\pm$ 58.3*

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与低剂量组相比, [#] $P < 0.05$ 。表 2 BALF 中 TGF- β 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

ng/L

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
对照组	76.50 $\pm$ 21.15	78.6 $\pm$ 27.4	73.9 $\pm$ 23.4	75.2 $\pm$ 28.2	84.0 $\pm$ 40.5	86.0 $\pm$ 30.6
低剂量组	165.8 $\pm$ 24.9*	146.8 $\pm$ 22.5*	204.5 $\pm$ 49.6*	191.7 $\pm$ 46.4*	219.9 $\pm$ 54.8*	203.7 $\pm$ 37.0*
中剂量组	192.8 $\pm$ 56.1*	175.5 $\pm$ 35.4*	202.2 $\pm$ 49.8*	153.3 $\pm$ 20.7*	214.7 $\pm$ 47.6*	214.7 $\pm$ 47.6*
高剂量组	191.4 $\pm$ 42.3*	160.6 $\pm$ 19.9*	184.0 $\pm$ 44.4*	254.5 $\pm$ 24.9* ^{#Δ}	152.3 $\pm$ 19.0* ^{#Δ}	254.5 $\pm$ 29.9* [#]

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$; 与低剂量组相比, [#] $P < 0.05$; 与中剂量组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

TNF- α 最初被认为是由能导致肿瘤坏死的内毒素刺激的巨噬细胞所产生的因子^[1], 它是一种具有多种功能并且是重要炎性介质的强效的前炎性细胞因子。TNF- α 能由大多数类型的细胞产生, 包括巨噬细胞、单核细胞^[2]。TNF- α 在矽尘引起的纤维化过程中的作用被肺泡巨噬细胞的体外实验所证实, 因为体外实验的功能和体内矽尘所引起的炎症反应相同^[3,4]。冯国贤等^[5]在对早期矽肺患者 BALF 的研究中也发现 TNF- α 含量明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究显示, 大鼠 BALF 中 TNF- α 水平于各剂量组各个时间点较对照组差异有统计学意义, $P < 0.05$, 并且在 14 d 出现高峰。推测 TNF- α 在矽肺早期发挥了重要作用, 对其研究有重要意义。

TGF 是 DeLarco 等于 1978 年在小鼠肉瘤病毒转化的细胞株条件培养基中鉴定出的具有促进细胞生长和转化特性的物质, 它包括 TGF- α 和 TGF- β ^[6]。因为 TGF- β 是一族可以促进某些细胞如成纤维细胞分化、生长与增殖的细胞因子^[7], 因此 TGF- β 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, 在肺纤维化疾病中发挥着重要的作用。随着研究的不断深入发现, 在肺纤维化发展的早期阶段, TGF- β 主要通过自分泌或者旁分泌作用, 促进细胞增殖和 ECM 细胞外基质的沉积, 趋化单核细胞、中性粒细胞核淋巴细胞等, 从而使其他细胞因子如 TNF- α 、IL-1 等合成增加^[8]。本研究结果显示, TGF- β 水平于各剂量组在不同时间点较对照组均有显著的增高 ($P < 0.05$), 并且在染尘后期 TGF- β 水平高于前期。以上结果可以推测, TGF- β 在染尘大鼠矽肺进程中发挥了重要作用。

TGF- β 和 TNF- α 作为矽肺进程中的主要细胞因子, 不同剂量染尘 28 d 显示, 两种因子对矽肺炎症和纤维化进程均发

挥了重要作用, 彼此相互作用, 与其他细胞因子形成复杂的网络。同时提示, 在矽肺发生发展中通过抑制一种细胞因子而影响其他因子发挥作用, 对早期预防矽肺的发生及减轻矽肺病情有积极作用。

参考文献:

- [1] Carswell E A, Old L J, Kassel R L, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1975, 72 (9): 3666-3670.
- [2] Dubravac D B, Spriggs D R, Mannick J A, *et al.* Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990, 87 (17): 6758-6761.
- [3] Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture [J]. Sci Total Environ, 2001, 270 (1-3): 135-139.
- [4] Driscoll K E, Maureu J K. Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: Potential biomarkers of pulmonary toxicity [J]. Toxicol Pathol, 1991, 19 (4-1): 398-405.
- [5] 冯国贤, 南培宏, 于建军, 等. 早期矽肺患者支气管肺泡灌洗液中生物标志物的研究 [J]. 2000, 18 (4): 226-228.
- [6] Delarco J E, Todaro G J. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978, 75 (8): 4001-4005.
- [7] 李宏伟, 王世鑫. 转化生长因子- β 与矽肺 [J]. 中国职业医学, 2004, 31 (1): 62-63.
- [8] Harris W T, Muhlebach M S, Oster R A, *et al.* Transforming growth factor-beta (1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis [J]. Pediatr Pulmonol, 2009, 44 (11): 1057-1064.

欢迎投稿、订阅、发布广告