

γ -干扰素对博莱霉素诱导大鼠肺损伤的影响

张德平 邱慧 庄谊 孟凡青

【摘要】 目的 观察 γ -干扰素 (IFN- γ) 对博莱霉素 (BLM) 诱导大鼠肺损伤的影响及其作用机制。**方法** 66 只大鼠随机分为正常对照组 (24 只)、BLM 组 (24 只) 和 IFN- γ 组 (18 只)。分别观察气管内给药后 14、17、21 和 28 d 肺组织损伤程度, 以及血清和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IFN- γ 含量。**结果** 与正常对照组比较, BLM 和 IFN- γ 组在给予 BLM 后 17、21 和 28 d 肺组织损伤加重 (P 均 < 0.05), IFN- γ 组在给予 BLM 后 21 和 28 d 肺损伤程度虽重于 BLM 组, 但差异无显著性, IFN- γ 组于 17、21 和 28 d BALF 中 TNF- α 含量和 21 和 28 d 血清中 TNF- α 含量均显著高于正常对照组和 BLM 组, 21 和 28 d BALF 和血清中 IFN- γ 含量均显著高于其余两组 (P 均 < 0.05)。**结论** IFN- γ 可能会加重 BLM 诱导大鼠肺损伤, 其作用可能与 TNF- α 相互协作有关。

【关键词】 肺损伤; γ -干扰素; 肿瘤坏死因子- α ; 支气管肺泡灌洗液

Effect of interferon- γ on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats ZHANG De-ping, QIU Hui, ZHUANG Yi, MENG Fan-qing. Department of Respiratory Medicine, Drum Tower Hospital, Nanjing University Medical College, Nanjing 210008, Jiangsu, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of interferon- γ (IFN- γ) on lung injury induced by bleomycin and its mechanism. **Methods** Sixty-six SD rats were randomly divided into three group: the normal control group (group N, $n=24$), the bleomycin group (group B, $n=24$) and IFN- γ treatment group (group I, $n=18$). The degree of lung injury and the concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IFN- γ in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and serum were measured. **Results** The degree of lung injury in group I was severer than group B, but with no significant difference. The concentration of TNF- α in BALF on 17, 21, 28 days and in serum on 21 and 28 days were significantly increased after IFN- γ administration compared with group N and group B (all $P < 0.05$). The concentration of IFN- γ in BALF and serum increased on 21 and 28 days in group I (all $P < 0.05$). **Conclusion** IFN- γ might aggravate lung injury induced by bleomycin, and it might attribute to an increase in TNF- α .

【Key words】 lung injury; interferon- γ ; tumor necrosis factor- α ; bronchoalveolar lavage fluid

特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种由于弥漫性肺泡炎症和肺实质损伤, 造成组织修复失衡和过度所致的疾病。有研究表明 γ -干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 具有抗纤维化的作用^[1], 但最近有学者却报道了 IFN- γ 可诱发 IPF 患者发生急性呼吸衰竭^[2]。本研究应用博莱霉素 (bleomycin, BLM) 建立大鼠肺损伤和肺纤维化模型, 观察 IFN- γ 对肺损伤的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂: BLM A5 针剂 (天津太河制药有限公司, 批号: 041102); IFN- γ (上海克隆生物高技术有限公司, 批号: 20040721); 肿瘤坏死因子- α

(TNF- α)、IFN- γ 酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒 (R&D 生产, 北京晶美生物技术公司分装)。

1.2 实验分组及制模方法: SPF 级雄性 SD 大鼠 (南京大学附属鼓楼医院实验动物中心) 共 66 只, 平均体重 (180 ± 20) g, 随机分为正常对照组 (24 只)、BLM 组 (24 只)、IFN- γ 组 (18 只)。正常对照组气管内一次性注入生理盐水 2 ml/kg, 14 d 后每日腹腔注射生理盐水 0.5 ml/kg; BLM 组气管内一次性注入 BLM A5 5 mg/kg, 14 d 后每日腹腔注射乙醇 0.5 ml/kg; IFN- γ 组气管内一次性注入 BLM A5 5 mg/kg, 14 d 后皮下注射 IFN- γ 50 kU, 隔日 1 次; 正常对照组和 BLM 组分别于气管内给药后 14、17、21 和 28 d 各处死 6 只大鼠; IFN- γ 组于气管内给药后 17、21 和 28 d 各处死 6 只大鼠。因为 IFN- γ 组大鼠在 14 d 时与 BLM 组条件相同, 故未另行检测。各组大鼠均从腹主动脉取血 5 ml 后用放血法处死, 肝素抗凝, 血清在低温离心机上 3 000 r/min (离心半径 30 cm) 离心 15 min, 上清液置 -70°C 冰箱保存, 备检 TNF- α 和 IFN- γ 含量。

基金项目: 江苏省医学重点人才基金资助项目 (RC2001005)

作者单位: 210008 南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸内科

作者简介: 张德平 (1962-), 男 (汉族), 安徽六安人, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主任医师, 江苏省医学会呼吸病分会委员, 江苏省中西医结合学会呼吸专业分会副主任委员, 江苏省医学重点人才, 主要从事肺间质疾病的研究。

处死后,打开胸腔,结扎右肺门,左肺行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)10 ml,置-70℃冰箱保存,备检TNF-α和IFN-γ含量。

1.3 肺组织病理分析:取右肺上叶,中性甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)和Masson染色。由不参与实验过程的病理科医师观察病理切片。参照Szapiel等^[3]方法,根据肺间质水肿、肺泡水肿、炎性细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成和肺不张改变等作出肺损伤评价,按损伤程度无、轻、中、重分别计0、1、2和3分,然后累计总分。

1.4 血清和BALF中TNF-α、IFN-γ含量测定:双抗体夹心ELISA测定血清和BALF中TNF-α、IFN-γ含量,具体步骤参照试剂盒说明书,根据标准曲线计算BALF中TNF-α、IFN-γ含量。

1.5 统计学处理:使用SAS 8.1统计软件处理全部数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,14 d时组间比较采用 t 检验,17、21和28 d时组间比较采用单因素方差分析和SNK- q 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变:光镜观察正常对照组未出现明显的病理变化。BLM组14 d时肺间质及肺泡内有少量巨噬细胞和淋巴细胞浸润,成纤维细胞增生,肺泡间隔明显增宽;17 d时肺间质炎性细胞浸润更明显,肺泡壁增厚,伴轻度出血;21 d时与前相比无明显变化;28 d时肺泡壁增厚,部分肺泡腔消失,由胶原纤维、成纤维细胞及淋巴细胞占据,肺泡结构异常。IFN-γ组17 d时与BLM组相似,21 d和28 d时肺间质及肺泡内有大量巨噬细胞和淋巴细胞浸润,伴严重出血、肺泡壁增厚、部分肺泡腔消失、胶原纤维增多、肺泡结构异常。

2.2 肺损伤评分(表1):BLM组各时间点肺损伤评分均高于正常对照组(P 均 < 0.05),IFN-γ组在给予BLM后17、21和28 d肺损伤评分均高于正常对照组(P 均 < 0.05)。IFN-γ组在21 d和28 d肺损伤程度虽然重于BLM组,但是差异均无显著性(P 均 > 0.05)。

表1 各组大鼠肺损伤评分变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Changes of score of lung injury

in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分

组别	14 d	17 d	21 d	28 d
正常对照组	0	0	0.17±0.41	0
BLM组	3.17±0.98*	3.50±0.84*	3.17±0.98*	3.67±1.37*
IFN-γ组		3.50±1.52*	4.00±0.63*	4.67±1.63*

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$

2.3 血清中TNF-α含量的变化(表2):BLM组各时间点血清中TNF-α含量与正常对照组比较差异均无显著性。IFN-γ组于21 d和28 d血清中TNF-α含量均显著高于正常对照组和BLM组(P 均 < 0.05)。

表2 各组大鼠血清中TNF-α的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Changes of TNF-α content in

serum in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ng/L

组别	14 d	17 d	21 d	28 d
正常对照组	1.04±0.37	0.68±0.45	1.16±0.48	1.80±1.50
BLM组	1.52±0.75	1.65±0.43	1.45±1.12	1.14±1.12
IFN-γ组		1.40±0.71	1.81±1.32*△	2.57±1.36*△

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$;与BLM组比较:△ $P < 0.05$

2.4 BALF中TNF-α含量的变化(表3):BLM组各时间点BALF中TNF-α含量与正常对照组比较差异均无显著性。IFN-γ组于17 d起BALF中TNF-α含量均显著高于正常对照组和BLM组(P 均 < 0.05)。

表3 各组大鼠BALF中TNF-α的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Changes of TNF-α content in

BALF in each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ng/L

组别	14 d	17 d	21 d	28 d
正常对照组	11.33±6.63	11.33±6.49	11.33±6.30	11.33±7.37
BLM组	11.76±7.66	12.14±5.70	12.95±7.56	34.48±14.28
IFN-γ组		32.39±14.52*△	42.68±13.03*△	67.21±29.41*△

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$;与BLM组比较:△ $P < 0.05$

2.5 血清中IFN-γ含量的变化(表4):BLM组各时间点血清中IFN-γ含量与正常对照组比较差异均无显著性。IFN-γ组在17 d时血清中IFN-γ含量与正常对照组和BLM组比较差异均无显著性,但21 d和28 d时显著高于这两组(P 均 < 0.05)。

表4 各组大鼠血清中IFN-γ的变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Changes of IFN-γ in serum in

each group($\bar{x} \pm s, n = 6$)

ng/L

组别	14 d	17 d	21 d	28 d
正常对照组	41.37±7.00	52.79±8.17	47.73±7.56	49.81±10.11
BLM组	46.07±9.79	55.87±12.31	60.71±10.75	70.45±16.70
IFN-γ组		52.46±9.87	71.33±34.85*△	123.30±70.23*△

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$;与BLM组比较:△ $P < 0.05$

2.6 BALF中IFN-γ含量的变化(表5):BLM组于14 d时BALF中IFN-γ含量显著高于正常对照组($P < 0.05$),但17、21和28 d时与正常对照组比较差异均无显著性(P 均 > 0.05)。IFN-γ组17 d时BALF中IFN-γ含量与正常对照组和BLM组比较差异均无显著性(P 均 > 0.05),但21 d和28 d时显著高于这两组(P 均 < 0.05)。

表 5 各组大鼠 BALF 中 IFN- γ 的变化($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 5 Changes of IFN- γ in BALF
in each group($\bar{x}\pm s, n=6$) ng/L

组别	14 d	17 d	21 d	28 d
正常对照组	25.13 $\pm$ 9.71	32.89 $\pm$ 4.96	29.00 $\pm$ 5.43	29.86 $\pm$ 7.61
BLM 组	49.38 $\pm$ 13.39*	45.88 $\pm$ 11.86	34.67 $\pm$ 13.04	38.98 $\pm$ 12.85
IFN- γ 组		32.45 $\pm$ 14.02	49.38 $\pm$ 13.39* Δ	53.01 $\pm$ 26.30* Δ

注:与正常对照组比较;* $P<0.05$;与 BLM 组比较; $\Delta P<0.05$

3 讨论

IPF 的发病机制尚不明确,缺乏有效的治疗措施。许多基础实验研究证实有效的药物临床应用疗效不理想,甚至可能导致严重不良反应。1999 年 Ziesche 等^[1]报道了 IFN- γ -1b 联合小剂量泼尼松治疗 IPF 有效;但最近 Honore 等^[2]报道 4 例 IPF 患者在给予 IFN- γ 治疗后很快发生急性呼吸衰竭。Carvalho 等^[4]也报道了 1 例 IPF 患者在 IFN- γ 治疗后诱发急性呼吸衰竭。因此有关 IFN- γ -1b 在 IPF 治疗中的作用尚不明确,IFN- γ 是否会诱导 IPF 患者发生肺损伤已引起了关注。

本实验中病理形态学观察发现,IFN- γ 组大鼠有较严重的肺损伤出血和胶原沉积,有加重 BLM 诱导肺损伤的趋势。许多炎症因子参与了肺损伤的过程。TNF- α 是肺损伤过程中的关键性炎性介质^[5],而 IFN- γ 是前炎症因子,可以提高 TNF- α 等其他前炎症因子的表达^[6]。另外, TNF- α 也可以通过上调细胞而表明 IFN- γ 受体的数量,招募细胞内的 IFN- γ 受体到细胞表面,从而增强细胞对 IFN- γ 的敏感性。本研究结果显示,IFN- γ 组大鼠血清和 BALF 中 TNF- α 、IFN- γ 含量均显著高于正常对照组和 BLM 组,因此推测 IFN- γ 致肺损伤的机制可能为 IFN- γ 促进单核/巨噬细胞释放 TNF- α ,两者相互协作,增强 TNF- α 的细胞毒作

用,致使线粒体结构和功能改变,即线粒体肿胀,诱发产生氧自由基,同时糖氧化速率降低,ATP 合成不足,上皮细胞损伤脱落,促使或加重肺泡损伤^[7,8]。本实验研究显示,IFN- γ 能增加肺损伤相关的炎症因子,有加重 BLM 诱导大鼠肺损伤的趋势,有可能促使呼吸衰竭的发生,应进一步扩大样本数验证。因此,应用 IFN- γ 治疗 IPF 应当慎重。但本实验中的肺损伤发生过程与 IPF 患者临床应用 IFN- γ 所致肺损伤是否一致尚待进一步研究。

参考文献:

1 Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, et al. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis [J]. N Engl J Med, 1999, 341: 1264-1269.
2 Honore I, Nunes H, Groussard O, et al. Acute respiratory failure after interferon-gamma therapy of end-stage pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167: 953-957.
3 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: 893-899.
4 Carvalho C R, Kairalla R A, Schettino G P, et al. Acute respiratory failure after interferon-gamma therapy in IPF [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169: 543-544.
5 邱海波, 陈德昌, 潘家琦, 等. 急性肺损伤的炎症反应机制与药物治疗探讨 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 678-680.
6 Segel M J, Izicki G, Cohen P Y, et al. Role of interferon-gamma in the evolution of murine bleomycin lung fibrosis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003, 285: L1255-1262.
7 Kampf C, Relova A J, Sandler S, et al. Effects of TNF- α , IFN- γ and IL- β on normal human bronchial epithelial cells [J]. Eur Respir J, 1999, 14: 84-91.
8 O'Connor T M, Bredin C P. Interferon-gamma toxicity in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 169: 428.

(收稿日期: 2005-12-31 修回日期: 2006-05-18)
(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

糖皮质激素用于持续性急性呼吸窘迫综合征的疗效和安全性

持续性急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的特点是进行性炎症反应、长期机械通气、过度纤维增生和高病死率。曾有报道说糖皮质激素可提高该病生存率,最近美国学者进行了一项多中心随机对照的临床试验来验证了这一观点。该试验采用双盲法,纳入了 180 例 ARDS 患者,所有患者均服用甲基泼尼松或安慰剂至少 7 d;检测指标主要为入院 60 d 病死率,其次包括自由呼吸时间、炎症和纤维增生的生化指标以及发生感染并发症的例数。结果显示:入院 28 d 内甲基泼尼松能改善肺顺应性,增加患者自由通气时间。与安慰剂相比,甲基泼尼松不增加患者并发症的发生率,但能促进患者神经、肌肉功能的衰退。安慰剂组与甲基泼尼松组 60 d 和 180 d 住院病死率差异均无显著性 (28.6% 比 29.2%, $P=1.000$; 31.9% 比 31.5%, $P=1.000$)。在 ARDS 发病 14 d 后入院的患者中,使用甲基泼尼松还与 60 d 和 180 d 住院病死率增高有关。结论:本试验结果并不支持糖皮质激素可改善 ARDS 患者心肺功能这一传统观点,而且在 ARDS 发病后使用糖皮质激素超过 2 周反而可能增加患者病死率。

车晋伟, 编译自《N Engl J Med》, 2006, 354: 1671-1684; 胡森, 审校