

白细胞介素 17 在大鼠纤维化模型中的作用及意义*

鲍文华¹, 穆晓春¹, 顾少岩², 孙云晖¹, 阎红娥¹ (1. 佳木斯大学附属第一医院呼吸内科, 黑龙江佳木斯 154002; 2. 黑龙江省齐齐哈尔市第一医院呼吸内科 161000)

【摘要】 目的 研究白细胞介素 17(IL-17)在大鼠肺纤维化中的表达及意义。方法 健康 SD 大鼠 64 只随机分为健康对照组(N 组)、肺纤维化模型组(B 组)及地塞米松治疗组(D 组)。分别于实验的第 7、14、28 天将 N 组、B 组处死, D 组于第 14、28 天处死, 检测支气管灌洗液及肺组织中 IL-17 表达水平; 观察其病理学改变并测定肺组织中羟脯氨酸水平。结果 (1) B 组肺组织病理切片表现为逐渐由肺泡炎至纤维化动态改变过程, 肺组织内羟脯氨酸高于 N 组和 D 组($P < 0.05$)。 (2) 在 B 组和 D 组中, 肺组织和支气管灌洗液中的 IL-17 的表达趋势相同, 都于第 7 天达到峰值, 而在 N 组中 IL-17 呈低水平表达, B 组和 D 组 IL-17 水平各时间点均明显高于 N 组($P < 0.05$); 肺组织和支气管灌洗液中 IL-17 与肺组织中羟脯氨酸的表达趋势呈负相关($P < 0.05$)。结论 IL-17 参与肺纤维化形成过程。

【关键词】 肺纤维化; 博来霉素; 白细胞介素 17

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.018 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)22-2975-03

Effect and significance of IL-17 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats* BAO Wen-hua¹, MU Xiao-chun¹, GU Shao-yan², SUN Yun-hui¹, YAN Hong-e¹ (1. Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China; 2. Department of Respiratory Medicine, First Hospital of Qiqihar City, Qiqihar, Heilongjiang 161000, China)

【Abstract】 **Objective** To study the significance and expression of IL-17 in pulmonary fibrosis rats. **Methods** 64 SD rats were randomly divided into normal control group(N), pulmonary fibrosis model group(B) and dexamethasone treated group(D). Rats in N group and B group were killed on 7th, 14th and 28th day, respectively. Rats in D group were killed on 14th day and 28th day, respectively. The levels of IL-17 in bronchial lavage fluid and lung tissue were measured. The pathological changes of lung tissue were observed, and the level of hydroxyproline was detected.

Results (1) The lung tissue biopsy in B group showed the dynamic process of change from alveolitis to fibrosis gradually, and the level of hydroxyproline in lung tissue was higher than that in N group and D group. (2) The expression trend of IL-17 in lung tissue was the same as that in bronchial lavage fluid, had peak on 7th day, and lower level expression in N group. These in the B group and D group were significantly higher than these in N group at all the time points($P < 0.05$). IL-17 expression in lung tissue and bronchial lavage fluid was negatively correlated with hydroxyproline expression in lung tissue($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of IL-17 in B group suggests that it may involve in the formation of pulmonary fibrosis.

【Key words】 pulmonary fibrosis; bleomycin; IL-17

肺间质纤维化(IPF)是多种病因引起的异质性疾病, 病变局限于肺部, 组织病理学和(或)影像学表现具有普通型间质性肺炎(UIP)的特征^[1]。本实验用博来霉素制备肺纤维化动物模型, 通过检测白细胞介素 17(IL-17)含量的变化, 从而进一步探讨 IPF 的发病机制, 为早期诊断及治疗提供新的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康 SD 大鼠 64 只, 体质量(240±20)g, 清洁级, 大连医科大学实验动物中心提供; 动物合格证号 ISCXK(辽)2008-0002, 按清洁级标准正常饲养。

1.1.2 主要实验试剂 注射用盐酸博来霉素, 15 毫克/支, 日本化药株式会社生产; IL-17 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均由天津市金圣生物试剂公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和模型制备 健康 SD 大鼠 64 只随机分为健康对照组(N 组)、肺纤维化模型组(B 组)及地塞米松治疗组(D 组)。(1) B 组制备: 将大鼠麻醉, 常规消毒后无菌操作下作

颈中切口, 逐层分离暴露气管, 并用弯尖眼科钳经气管下方穿过, 在直视下用针头穿刺两软骨环间, 抬高鼠板头端, 保持针头与气道方向相同, 一次性将博来霉素(BLM-A5)5 mg/kg 注入气管, 立即拔出针头, 竖立鼠板, 保持大鼠直立位, 左右来回旋转 1~2 min, 使药液尽可能到达两侧肺部。手术后缝合皮肤, 置其于动物室喂养。(2) D 组模型制备: 在肺纤维化模型基础上第 8 天开始每日腹腔注射地塞米松注射液 3 mg/kg。(3) N 组: 按照大鼠肺纤维化模型制备方法气管内注射 0.9% 生理盐水注射液 0.2~0.3 mL。

1.2.2 动物的处死和标本采集 分别于实验的第 7、14、28 天将 N 组、B 组各处死 8 只, D 组于第 14、28 天各处死 8 只, 方法是将大鼠眶后动脉放血处死, 留取支气管灌洗液, 检测 IL-17 含量; 取右上肺置于 10% 甲醛溶液中固定, 石蜡包埋切片, 进行 HE 染色, 观察肺组织结构的动态变化; 留取右下肺组织, 用于检测 IL-17 和 IL-17 mRNA 的含量; 从肺组织上留取约 50 mg 肺组织, 测肺组织匀浆中羟脯氨酸(HYP)含量。

1.2.3 在肺组织及支气管灌洗液 IL-17 水平检测 采用

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究面上项目(12521528); 黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2012-361HLJ)。

ELISA,严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 采用碱水解法测定肺组织羟脯氨酸水平 严格按照试剂盒说明书操作。

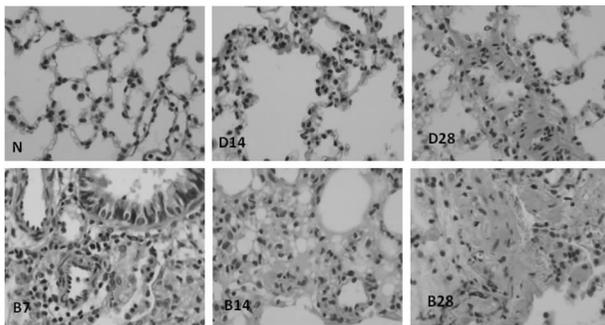
1.2.5 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 IL-17 mRNA 表达 采用 Rat beta 试剂提取总 RNA 逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA),以此为模板行 PCR 扩增目的基因引物序列,IL-17 上游引物:5'-GGG AAG TTG GAC CAC CAC AT-3';下游引物:5'-TTC TCC ACC CGG AAA GTG AA-3',104 bp;Rat beta 上游引物:5'-AAG AGA GGC ATC CTG ACC CT-3';下游引物:5'-GAG CCA GGG CAG TAA TCT CC-3',784 bp。比较 IL-17 与 Rat beta 的相对吸光度值并进行半定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用组内单因素方差分析和组间多重比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肺组织病理学改变 N 组双肺呈粉红色,表面光滑,未见肿胀和出血点。B 组第 7 天双肺颜色灰暗,光泽差,可见散在的灶状、片状出血灶。第 14 天两肺呈灰白色,较坚实,肺组织肿胀部分消退,表面有大小不均匀的灰白色小斑块,触及较硬,弹性差;第 28 天两肺呈苍白色,质地较第 14 天时硬度增加,体积有所缩小,肿胀已基本消退,弹性差,表面挛缩变形,出现结节样,条索状病灶。

光镜观察 N 组肺组织结构正常。B 组大鼠第 7 天肺泡炎明显,肺泡腔内可见大量炎性细胞渗出,成纤维细胞增殖。第 14 天,大鼠肺炎性细胞浸润减轻,成纤维细胞增多和胶原纤维增生,部分肺泡结构消失;第 28 天,大鼠肺炎性细胞浸润进一步减轻,肺纤维化程度加重,肺泡结构破坏,纤维组织呈条索样瘢痕改变,斑片状分布。D 组病理变化与 B 组基本相同,不同时间点,D 组炎症细胞的浸润和纤维细胞增生及胶原纤维的沉积要轻于 B 组。见图 1。



注:N 为健康对照组;B7 为肺纤维化模型组第 7 天;B14 为肺纤维化模型组第 14 天;B28 为肺纤维化模型组第 28 天;D14 为地塞米松治疗组第 14 天;D28 为地塞米松治疗组第 28 天。

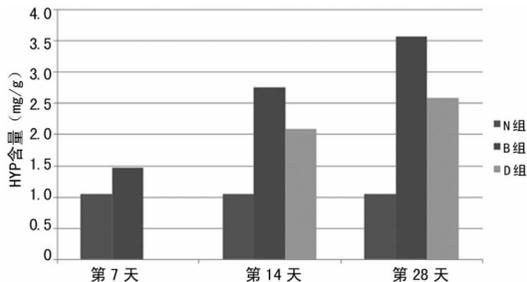
图 1 光镜下的肺组织结构(HE×200)

2.2 HYP 在各组大鼠肺组织中含量的变化 HYP 含量在 N 组大鼠肺组织中随时间变化无明显改变。HYP 含量在 B 组和 D 组大鼠肺组织随时间延长逐渐增加。B 组 HYP 含量较 N 组明显增加($P < 0.05$),D 组 HYP 含量较 N 组明显增加($P < 0.05$),较 B 组明显减少($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 肺组织中 IL-17 mRNA 和 IL-17 的含量 肺组织 IL-17 mRNA 的表达在 N 组小鼠肺组织中表达较弱,而在 B 组小鼠肺组织第 7 天达到高峰,第 14 天略有下降,第 28 天明显下降,D 组较 N 组增加($P < 0.05$),较 B 组减少($P < 0.05$)。各时间点之间有差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1、图 3)。

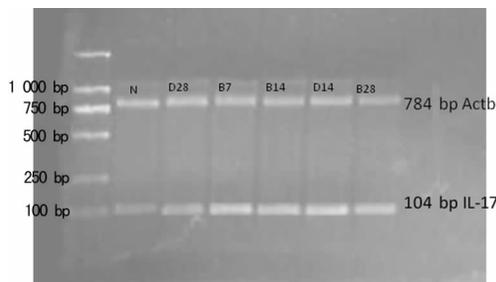
2.4 肺组织中 IL-17 的含量 B 组大鼠肺组织中 IL-17 的含量各时间点较 N 组相比显著增高,且在第 7 天达到高峰($P <$

0.05),之后 IL-17 含量逐渐减少,但第 28 天仍高于 N 组($P < 0.05$)。D 组各时间点 IL-17 含量均低于 B 组($P < 0.05$),但高于 N 组中的含量($P < 0.05$),见图 4。



注:N 组为健康对照组;B 组为肺纤维化模型组;D 组为地塞米松治疗组。

图 2 HYP 在各组大鼠肺组织中水平变化



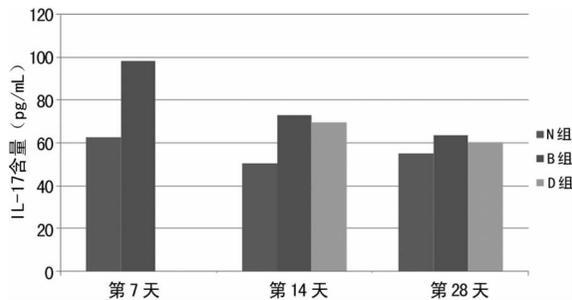
注:N 为健康对照组;B7 为肺纤维化模型组第 7 天;B14 为肺纤维化模型组第 14 天;B28 为肺纤维化模型组第 28 天;D14 为地塞米松治疗组第 14 天;D28 为地塞米松治疗组第 28 天。

图 3 肺组织中 IL-17 mRNA 和 IL-17 的水平

表 1 肺组织中 IL-17mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	第 7 天	第 14 天	第 28 天
N 组	8	0.777 ± 0.127	0.783 ± 0.131	0.898 ± 0.134
B 组	8	2.481 ± 0.358*	2.163 ± 0.415*	1.633 ± 0.263*
D 组	8	—	1.738 ± 0.273*#	1.308 ± 0.209*#

注:—表示无数据;与 N 组相比,* $P < 0.05$;与 B 组相比,# $P < 0.05$ 。

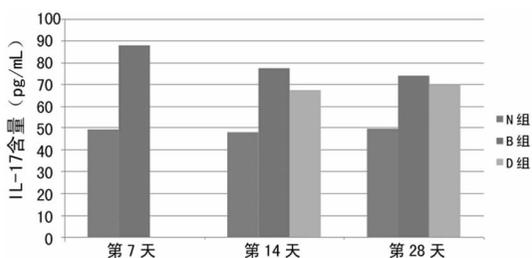


注:N 组为健康对照组;B 组为肺纤维化模型组;D 组为地塞米松治疗组。

图 4 IL-17 在肺组织中的表达

2.5 支气管灌洗液中 IL-17 的水平 B 组大鼠支气管灌洗液中 IL-17 的水平各时间点较 N 组相比显著增高,且在第 7 天达到高峰($P < 0.05$),之后 IL-17 水平逐渐减少,但第 28 天仍高于 N 组($P < 0.05$)。D 组各时间点 IL-17 水平均低于 B 组($P < 0.05$),但高于 N 组中的水平($P < 0.05$),见图 5。

2.6 IL-17 在肺组织与支气管灌洗液中的关系及与羟脯氨酸的关系 IL-17 在肺组织中与支气管灌洗液中呈正相关($r = 0.774, P < 0.01$),与羟脯氨酸呈负相关($r = -0.831, P < 0.05$)。



注: N 组为健康对照组; B 组为肺纤维化模型组; D 组为地塞米松治疗组。

图 5 IL-17 在支气管冲洗液中的表达

3 讨 论

IL-17 是一种促炎症性细胞因子, 含有 155 个氨基酸的糖蛋白^[2]。Th17 是能分泌 IL-17 细胞因子的 CD4⁺ T 细胞, 在人体, 除了 Th17 细胞能分泌 IL-17 外, 还有 $\gamma\delta$ T 细胞及 NK 细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞及单核细胞, 但主要的来源还是 Th17 细胞^[3-5]。IL-17 可以促进 T 细胞的激活和刺激上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞产生多种细胞因子, 如 IL-6、IL-8、粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)和化学增殖素及细胞黏附分子, 从而导致炎症的产生。

应用博来霉素制备肺纤维化动物模型是目前公认最接近人肺纤维化的实验模型^[6]。肺内胶原合成的主要细胞是肺成纤维细胞, 羟脯氨酸含量可以用来反映肺内胶原含量, 因此纤维化程度可以用测定肺组织中羟脯氨酸含量来判断。本研究采用气管内注入博来霉素制备大鼠肺纤维化模型, 肺纤维化模型组及地塞米松组大鼠肺组织羟脯氨酸含量的测定结果随时间逐渐升高, 提示肺纤维化动物模型制备成功。本研究发现, IL-17 在博来霉素组大鼠肺纤维化发生的早期表达升高, 并于造模后第 7 天肺泡炎症最重时达到峰值, 进而随着肺纤维化的发展逐渐降低, 但仍高于健康对照组。IL-17 在肺组织表达规律和支气管灌洗液中的变化趋相一致, 呈现了先高后低的趋势, 与羟脯氨酸呈负相关。Prudhomme^[7]在研究肺的囊性纤维化中, 提出 Th17、IL-17 与肺纤维化有关, Decraene 等^[8]在检测 IL-17 与 IL-23 在肺纤维化患者痰液的 mRNA 表达和蛋白水平, 发现了在肺纤维化的炎症及病理发展过程中 IL-23 和 IL-17 起着重要作用。

综上所述, 提示 IL-17 参与了肺纤维化的全过程, 为肺纤维化的诊断及治疗提供了一条新的思路。但是, 肺纤维化发病机制复杂, 有关 IL-17 与肺纤维化的发病机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Melissa M, Ahmedin J, Robert A, et al. Worldwide variations in colorectal cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2009, (59):366-378.
- [2] 戴小波, 孙万邦. IL-17 免疫调节作用的研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2011, 8(6):732-734.
- [3] Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, et al. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger [J]. J Immunol, 2003, 170(4):2106-2112.
- [4] Lockhart E, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection [J]. J Immunol, 2006, 177(7):4662-4669.
- [5] Zhou Q, Desta T, Fenton M, et al. Cytokine Profiling of macrophages exposed to Porphyromonas gingivalis, its lipopolysaccharide, or its FimA protein [J]. Infect Immun, 2005, 73(2):935-943.
- [6] Moriya Y, Sugihara K, Akasu T, et al. Importance of extended lymphadenectomy with lateral node dissection for advanced lower rectal cancer [J]. World J Surg, 2004, 21(9):728-732.
- [7] Prudhomme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations [J]. Lab Invest, 2007, 87(11):1077-1091.
- [8] Decraene A, Willems-widyastuti A, Kasran A, et al. Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable cystic fibrosis patients [J]. Respir Res, 2010, 11(1):177-184.

(收稿日期: 2013-03-06 修回日期: 2013-05-12)

(上接第 2974 页)

- NSE 和 CEA 对非小细胞肺癌的诊断价值 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(4):489-492.
- [4] 刘向红. CEA、NSE 和 CYFRA2-1 联检在肺癌中的诊断价值 [J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(5):465-466.
- [5] Ushijima C, Tsukamoto S, Yamazaki K, et al. High vascularity in the peripheral region of nonsmall lung cancer tissue is associated with tumor progression [J]. Lung Cancer, 2001, 34(2):233-241.
- [6] 韩志刚, 单利, 黄艳春, 等. 肿瘤标志物联合检测晚期肺癌的临床意义 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 28(3):244-246.
- [7] 徐红萍, 薛冰, 徐笛. 肿瘤标志物 CEA、NSE、CYFRA21-1 联合检测在肺癌诊断中的应用 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(16):2943-2944.
- [8] 陈琳, 朱惠莉, 张新. 非小细胞肺癌患者呼出气冷凝液 ET-1 测定的意义 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2011, 11(4):243-244.

- [9] 董敬军, 陶一江, 陈建荣, 等. 非小细胞肺癌患者呼出气冷凝液中 CEA 检测的临床意义 [J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(7):828-830.
- [10] Chantapet P, Riantawan P, Lebnak P, et al. Utility of serum cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1) and carcinoembryonic antigen (CEA) as tumour markers for non-small cell lung cancer [J]. J Med Assoc Thai, 2000, 83(4):383-391.
- [11] 马航. 肺癌治疗前后呼出气冷凝液和血浆中 CEA、ET-1 水平研究 [J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(12):227-228.
- [12] 刘玉春, 李益红, 林士军, 等. 非小细胞肺癌组织 ET-1、VEGF 及 MVD 的表达及相互关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2009, 10(17):1881-1884.
- [13] 杨东霞, 韩艳春, 刘鲁英, 等. E1f-1 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义 [J]. 癌症, 2009, 28(7):762-767.

(收稿日期: 2013-04-10 修回日期: 2013-06-12)