

IL-27 在博来霉素诱导肺纤维化模型中的保护作用

董昭兴, 雷雯, 李昌波, 艾丽, 王颖, 张涛
(昆明医科大学第二附属医院呼吸内科, 云南昆明 650101)

[摘要] **目的** 探讨 IL-27 在博来霉素诱导肺纤维化模型中的作用. **方法** 将 80 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组 (A 组)、BLM 模型组 (B 组)、BLM + IL-27 组 (C 组)、BLM + 抗 IL-27 组 (D 组), 每组各 20 只. 观察 A、B 组小鼠肺组织 IL-27、IL-27R mRNA 表达. 各组分别于 7 d、28 d 各处死小鼠 5 只, 获取肺组织, 病理学方法观察各组小鼠肺组织肺泡炎症和肺纤维化程度, 测定肺组织羟脯氨酸含量, 观察各组小鼠生存情况. **结果** (1) IL-27、IL-27R mRNA 在肺纤维化形成中明显升高 ($P < 0.05$); (2) 病理结果提示: 7 d D 组肺泡炎和肺纤维化程度最重, C 组最轻 ($P < 0.05$); 28 d D 组肺纤维化程度较 B 组加重, C 组最轻 ($P < 0.05$); (3) 羟脯氨酸含量变化: 7 d, 28 d D 组肺组织羟脯氨酸含量最高, C 组含量最少 ($P < 0.05$); (4) 各组小鼠在 28 d 时 A 组无小鼠死亡, C 组死亡率低于 B 组, D 组死亡率高于 B 组 ($P < 0.05$). **结论** IL-27 抑制博来霉素诱导肺纤维化的形成, 提高了小鼠的生存率.

[关键词] IL-27; 肺纤维化; 博来霉素

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 12-0001-04

The Role of IL-27 in the Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis

DONG Zhao-xing, LEI Wen, LI Chang-bo, AI Li, WANG Ying, ZHANG Tao
(Dept. of Respiratory, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of IL-27 in the bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Methods** The 80 C57BL/6 mice were randomly divided into normal group (group A), BLM model group (group B), BLM + IL-27 group (group C) and BLM + anti-IL-27 (group D), each group 20 only. IL-27 and IL-27RmRNA expression of mouse lung tissue were measured in the groups A and B. On the 7th and 28th days, 5 mice were sacrificed in each group respectively, then lung tissue pathology were observed in mice by Eosin staining and Masson's trichrome staining, and lung hydroxyproline content were measured. At the same time, the survival rate in mice was observed. **Results** IL-27 and IL-27RmRNA in pulmonary fibrosis were significantly increased. Pathologic results suggested that: On the 7th day, alveolitis and pulmonary fibrosis in group D were heaviest while the lightest in group C ($P < 0.05$). On the 28th day, the degree of pulmonary fibrosis in group D was higher than that in group B, which was lighter in group C. Hydroxyproline content was similar trend with pathologic results. On the 28th day, the mortality was highest in group D, and the mortality in group C was lower than that in group B. **Conclusion** IL-27 might inhibit the bleomycin-induced pulmonary fibrosis and improve the survival rate of mice.

[Key words] IL-27; Pulmonary fibrosis; Bleomycin

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360015); 云南省教育厅重点基金项目 (2012Z082); 云南省应用基础研究基金资助项目 (2013FB049)

[作者简介] 董昭兴 (1977~), 男, 安徽怀宁县人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事间质性肺疾病的临床与基础研究工作.

[通讯作者] 张涛. E-mail: zt6958@sina.com

肺纤维化形成机制主要认为不明原因的因素引起肺泡持续性损伤、细胞外基质反复破坏、修复、重建并过度沉积,导致正常肺组织结构改变、功能丧失,最终导致呼吸衰竭。尤其是特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF),除了吡非尼酮和尼达尼布对轻中度的 IPF 患者带来了一丝希望外,目前临床上并无更好的治疗方法^[1,2],而其发病机制的研究更需深入。

笔者前期研究探讨了 Th17 淋巴细胞及分泌 IL-17 在肺纤维化中的作用,证实了 IL-17 促进了肺纤维化的形成^[3-5],而作为调节 Th17 淋巴细胞分化的上游因子 IL-27 在肺纤维化中的功能如何,本研究首先观察 IL-27 在肺纤维化中的表达,通过外源性给予注射 IL-27 和 IL-27 抗体后,观察博来霉素诱导肺纤维化形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 C57/BL6 小鼠(周龄 6~8 周) 90 只,体重 18~20 g。购于北京维通利华实验动物技术有限公司,饲养在昆明医科大学动物实验室,饲养环境无特殊病原(SPF 级)。注射用博来霉素粉针剂(bleomycin, BLM)(日本化药株式会社),IL-27 重组蛋白注射剂(美国 Ebioscience 公司),IL-27 重组抗体注射剂(美国 Ebioscience 公司),羟脯氨酸试剂盒(武汉华美生物科技有限公司),动物组织总 RNA 提取试剂盒(大连宝生物科技有限公司),Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 80 只 C57BL/6 小鼠随机分为正常组(A 组)、BLM 模型组(B 组)、BLM + IL-27 组(C 组)、BLM + 抗 IL-27 组(D 组),每组各 20 只。小鼠麻醉后 A 组给予气管内一次性注入生理盐水 0.05 mL, B、C、D 组小鼠气管内一次性注入生理盐水稀释的博来霉素溶液 0.05 mL (5 mg/kg),以复制肺纤维化模型, C 组造模后 2 d 开始腹腔皮下注射小鼠 IL-27 重组蛋白溶液 1 μ g/(只·d),连续注射 7 d, D 组造模后当天一次性腹腔皮下注射小鼠抗 IL-27 蛋白溶液 200 mg/只。饲养于动物房内。

1.2.2 肺纤维化动物模型建立 实验小鼠腹腔注射 2%戊巴比妥(70 mg/kg)麻醉;用 1 mL 注射器经气管软骨环间隙穿刺,回抽有气体后向气管内注入 0.9%氯化钠注射液溶解的博来霉素(5 mg/kg),注射后立即将小鼠直立旋转 2 min,尽量

使药物均匀分布于两肺内;最后将伤口缝合,局部消毒后在原饲养环境下继续饲养。

1.2.3 实验动物的处理和标本的收集 于实验 7 d、28 d 每组各时间点分别处死 5 只小鼠;并收集动物肺组织待用。左肺下叶组织用 10%福尔马林液固定,24 h 后进行石蜡包埋并做组织切片行 HE 染色、Masson 染色,左肺上叶、右肺组织分置冻存管,做好标记,迅速置入液氮罐中后转入 -80℃ 冰箱保存用以羟脯氨酸测定以及 RT-PCR 测定。

1.2.4 肺组织病理切片 肺组织经 10%福尔马林液固定后,将肺组织切片行 HE、Masson 染色,免疫组化,光镜下观察小鼠肺组织病理改变。

1.2.5 肺泡炎症及肺纤维化分级标准 左肺下叶肺组织石蜡切片行 HE、Masson 染色后,请病理科医师在光镜下观察肺组织,采用 Szapiel 等评价博来霉素致肺纤维化的方法进行肺泡炎症及肺纤维化的计分。

1.2.6 Real-time PCR 检测 IL-27、IL-27RmRNA 表达 采用 Trizol 试剂盒抽取肺组织总 RNA。依据 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 试剂盒,进行 IL-27、IL-27R 的 cDNA 合成。通过 GenBank 基因数据库搜索 mRNA 序列,用 BLAST 分析寻找特异性最好的一段设计引物,引物设计软件 Primer5.0。IL-27 (F:CTTCCTCGCTACCACACTTCG, R:CCTCTTCCTCC-TTGTCCTCCT); IL-27R (F:GCTCTGCCCTGGTTT-CTGTC, R:CTCCTTGATGTAAGGTTGCCC)。衡量结果的参数主要是观察熔解曲线和扩增曲线,用软件 DataAssist™v3.0 Software (ABI) 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来对结果进行分析。 $\Delta\Delta Ct = (\text{实验组 } Ct_{\text{待测基因}} - \text{实验组 } Ct_{\text{内参基因}}) - (\text{对照组 } Ct_{\text{待测基因}} - \text{对照组 } Ct_{\text{内参基因}})$ 。

1.2.7 小鼠肺组织羟脯氨酸测定(碱水法) 按照产品说明书进行操作。取 100 mg 肺组织,加入 1 mL 水解液在 100℃ 裂解 20 min,用活性炭吸附有色杂质后,离心,取上清 1 mL,依次加入试剂,充分反应后取上清 1 mL 在 550 nm 处,1 cm 光径,蒸馏水调零,比色,测各管吸光度,依据公式计算出含量。

1.3 统计学处理

实验数据采用 SPSS 统计软件进行分析。计量资料均用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,计量治疗分析采用单因素方差分析(ANOVA)和组间比较(LSD-*t* 检验)计数资料采用 χ^2 检验;生存曲线比较采用 Wilcoxon 检验(Gehan 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-27 和 IL-27R mRNA 在博来霉素致肺纤维化组织中的表达

博来霉素诱导肺纤维化模型后, 分别于 3、7、14、28 d 处死小鼠后, 肺组织行 RT-PCR 检测 IL-27 和 IL-27R mRNA 的表达, 发现 B 组肺组织 IL-27、IL-27R 的 mRNA 的表达量, 3 d 开始升高, 7 d 最高, 14 d 开始下降, 28 d 最低, 各时间点均较 A 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。A 组 IL-27 的 mRNA 的荧光表达量各时间点差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

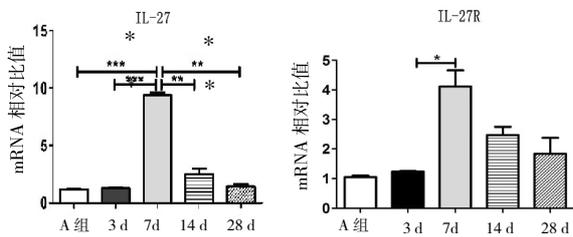


图 1 IL-27 和 IL-27R 在博来霉素诱导肺纤维化中的表达
Fig. 1 The expression of IL-27 and IL-27R mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis
与正常组比较, * $P < 0.05$.

2.2 各组小鼠肺组织病理变化

A、B、C、D 组分别于造模后 7、28 d 处死小鼠各 5 只, 取左肺组织做 HE 染色和 Masson 三色染色。7 d: B 组小鼠肺组织肺泡壁水肿、肺间质增厚、肺泡腔变小, 肺泡腔和肺间质内可见大量的红细胞、淋巴细胞浸润, 近胸膜处较重, 部分肺泡塌陷; Masson 染色可见肺泡间质内有少量的胶原蛋白, 胶原蛋白和肺炎炎症同时存在。C 组镜下累及范围及程度较 B 组轻; D 组镜下表现较 D 组加重。28 d: B 组: 肺泡及肺间质中仍可见轻度肺炎炎症但较 7 d 减轻, 肺间质增宽、淋巴细胞浸润, 部分肺野肺泡消失, 肺实变, 肺实质紊乱, 可见染为红色的带状胶原; Masson 染色肺间质可见条状的蓝色胶原蛋白, 部分肺实质紊乱, 肺纤维化形成。C 组明显较 B 组减轻。D 组较 B 组重, 见图 2。

2.3 肺组织羟脯氨酸含量的测定

在实验 7 d, 各组肺组织羟脯氨酸含量均比 A 升高, 其中 D 组升高最明显, 各组见羟脯氨酸含量差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B、C、D 组 28 d

羟脯氨酸含量明显较 7 d 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 小鼠生存情况分析

A 组在饲养过程中无小鼠死亡, B、C、D 都在造模后不同时间点开始死亡, 各组小鼠生存时间及生存曲线如下 (图 4): 分析比较生存曲线, A 组生存率最高, C 组其次, B 组更低, D 组生存率最低 ($P < 0.05$), 生存曲线两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

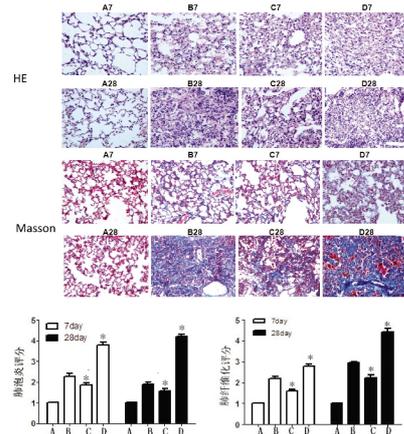


图 2 不同组别小鼠的 HE 染色、Masson 染色和肺炎、纤维化评分
Fig. 2 Eosin (HE) staining (100), Masson's trichrome staining (100), the alveolitis and fibrosis scores for the lungs of mice in the different groups

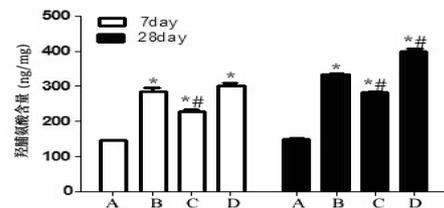


图 3 7, 28 d 不同组羟脯氨酸含量比较
Fig. 3 The hydroxyproline content in mice lungs on the 7th and 28th days in the different treatment groups

与 A 组比较, * $P < 0.05$; 与 B 组比较, # $P < 0.05$ 。

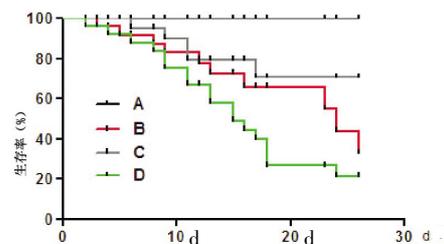


图 4 不同组别小鼠生存率
Fig. 4 The survival rate of mice with BLM-induced pulmonary fibrosis
两两比较, * $P < 0.05$ 。

[参考文献]

3 讨论

白介素-27 (interleukin-27, IL-27) 是 2002 年由美国的 Pflanz 等^[6]发现并命名的一种新的 IL-6/IL-12 家族的细胞因子, 由 EB13 和 p28 亚基组成, 两条多肽链通过二硫键连接构成的异源二聚体, P28 不与 EB13 结合时并无生物学活性. IL-27 主要由活化的单核细胞、树突状细胞、淋巴细胞等产生, 在机体内发挥着促进和抑制炎症的双重作用. IL-27 调节辅助性 T 淋巴细胞 (T helper cells, Th) 的分化, 可以促进初始 CD4 增殖, 使其向 Th1 分化, 同时抑制 Th2 和 Th17 的生长, 而在 Th1 高度活跃的时候, 又会抑制 Th1 的应答强度^[7]. 现已证实, IL-27 在抗肿瘤、自身免疫性疾病、炎性肠病、抗感染、哮喘等方面有积极的作用^[8].

现已证实 IL-27 与多种肺部疾病相关. Dong 等^[9]通过研究 IL-27 和 TNF- α 调节趋化因子 -10 (chemokine cxcl-10, CXCL-10) 在肺成纤维细胞表达的联合作用, 发现 IL-27 联合 TNF- α 可能通过来源于气道上皮细胞 CXCL10 增强气道的炎症反应. Huang^[10]证实了中国人人群中 COPD 患者的形成与 IL-27 基因的多态性相关. Shen^[11]发现皮炎/肌炎患者中的 IL-27 表达量升高, 亚组分析发现肌酸激酶高和合并间质性肺炎的患者表达升高更显著. Kim 等^[12]研究 TLR2 在博来霉素诱导的肺纤维化的作用机制中发现, TLR2 主要表达在支气管上皮细胞, 促进了肺纤维化的形成, 同时 IL-27 水平也升高, 其机制可能为诱导呼吸道上皮细胞分泌 IL-27, 抑制了 Th17 的生成, 以及刺激其他炎症细胞的肺部浸润促进了肺纤维化的进程. 但是该研究的出发点为 TLR2 受体, 并没有直接阐明 IL-27 是否促进或者抑制了肺纤维化的进程.

发现小鼠肺组织中 IL-27、IL-27R 的 mRNA 的表达量均较正常组升高, 证实了 IL-27 可能参与了肺纤维化的形成. 然后给予外源性的 IL-27 和 IL-27 抗体进行干预后, 通过病理和羟脯氨酸的检测的结果分析证实了 IL-27 对肺纤维化的形成有抑制作用, 而且在注射 IL-27 抗体后发现明显增加了小鼠的死亡率, 进一步证实了 IL-27 在博来霉素诱导肺纤维化形成中起保护作用.

- [1] XAUBET A, SERRANO-MOLLAR A, ANCOCHEA J. P-irfenidone for the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15(2): 275 - 281.
- [2] ROSAS I O, KAMINSKI N. Update in diffuse parenchymal lung disease 2013 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(3): 270 - 274.
- [3] 董昭兴, 邵文琳, 雷雯, 等. IL-17A 在博来霉素致小鼠肺纤维化形成中的表达 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(2): 199 - 202.
- [4] DONG Z, TAI W, YANG Y, et al. The role of all-trans retinoic acid in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Exp Lung Res*, 2012, 38(2): 82 - 89.
- [5] DONG Z, YANG Y, ZHAO T, et al. siRNA-Act1 inhibited the function of IL-17 on lung fibroblasts via NF- κ B pathway [J]. *Respiration*, 2013, 86(4): 332 - 340.
- [6] PFLANZ S, TIMANS J C, CHEUNG J, et al. IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EB13 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells [J]. *Immunity*, 2002, 16(6): 779 - 790.
- [7] GWYER FINDLAY E, VILLEQAS-MENDEZ A, DE SOUZA J B, et al. IL-27 receptor signaling regulates CD4+ T cell chemotactic responses during infection [J]. *Immunol*, 2013, 190(9): 4553 - 4561.
- [8] WYNICK C, PETES C, GEE K. Interleukin-27 Mediates Inflammation During Chronic Disease [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(10): 741 - 749.
- [9] DONG S, ZHANG X, HE Y, et al. Synergy of IL-27 and TNF- α in regulating CXCL10 expression in lung fibroblasts [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(4): 518 - 530.
- [10] HUBER S, GAGLIANI N, ESPLUGUES E, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3- and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10 -dependent manner [J]. *Immunity*, 2011, 34(4): 554 - 565.
- [11] SHEN H, XIA L, LU J. Pilot study of interleukin-27 in pathogenesis of dermatomyositis and polymyositis: associated with interstitial lung diseases [J]. *Cytokine*, 2012, 60(2): 334 - 337.
- [12] KIM H S, GO H, AKIRA S, et al. TLR2-mediated production of IL-27 and chemokines by respiratory epithelial cells promotes bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(8): 4007 - 4017.

(2015 - 10 - 14 收稿)