

阻断白介素-17 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化及肺组织 Fas/FasL 表达的影响

张效云¹, 宋桂芹¹, 鞏晓峰¹, 黄 勇¹, 郝 敏¹, 孙 冲²

(¹河北北方学院医学检验学院生化教研室, 病原生物学和免疫学研究所, ²医学检验学院 12 级 3 班, 河北 张家口 075000)

[摘要] 目的:探讨阻断白介素-17(interleukin-17, IL-17)对博来霉素(bleomycin, BLM)诱导小鼠肺纤维化、细胞凋亡和肺组织 Fas/FasL 表达的影响。方法:80 只 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组,分别为假手术组(SG)、BLM 组(BG)、中和抗体组(NG)和抗体对照组(IG),经小鼠气管内一次性注入 BLM 诱导肺纤维化的形成,假手术组则给予等量生理盐水。NG 和 IG 小鼠分别从造模前 1 天每隔 3 d 通过尾静脉给予抗鼠 IL-17 单克隆中和抗体或同型对照抗体,SG 和 BG 则给予等量 PBS。于造模后 28 d,处死各组小鼠,取肺组织,通过 Masson 染色及羟脯氨酸含量测定评价各组小鼠肺纤维化程度,用流式细胞仪和免疫组织化学法分别检测肺组织细胞凋亡和 Fas/FasL 的表达情况。结果:与 BG 和 IG 相比,NG 小鼠肺纤维化程度明显减弱($P<0.01$),羟脯氨酸含量显著下降($P<0.01$),细胞凋亡率和 Fas/FasL 表达亦显著降低($P<0.01$)。结论:内源性 IL-17 被阻断后,能显著改善 BLM 诱导的肺纤维化,降低细胞凋亡率和 Fas/FasL 表达,表明阻断 IL-17 对 BLM 诱导的小鼠纤维化改善与 Fas/FasL 凋亡通路有关。

[关键词] 白细胞介素-17;细胞凋亡;肺纤维化;Fas/FasL

[中图分类号] R563.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)05-0584-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170513

Blocking effects of interleukin-17 on pulmonary fibrosis and expression of Fas/FasL in mice induced by bleomycin

Zhang Xiaoyun¹, Song Guiqin¹, Nian Xiaofeng¹, Huang Yong¹, Hao Min¹, Sun Chong²

(¹Department of Biochemistry, Institute of Pathogen Biology and Immunology, ²Class 3 Grade 2012, College of Lab Medicine, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect on pulmonary fibrosis, cell apoptosis and expression of Fas/FasL in lung by blocking IL-17 activity in mice induced by bleomycin (BLM). **Methods:** Eighty C57BL/6 mice were randomly divided into the following 4 groups: sham group(SG), BLM group(BG), neutralizing antibody group(NG) and isotype-matched control antibody group(IG), respectively. Three groups were received a single intratracheal instillation of 5 mg/(kg body weight) of BLM to induce pulmonary fibrosis, while SGs were administrated the equivalent sterile saline. NG and IG were injected through caudal vein with neutralizing rat antimouse IL-17 mAb, or control rat IgG every 3 days starting on day 1 before making model, SG and BG were received equivalent PBS alone. All mice were sacrificed after 28 days. Lung tissues were removed and used to evaluate the extent of pulmonary fibrosis by Masson staining and hydroxyproline contents measurement. Cell apoptotic rate and the expression of Fas/FasL in mice were detected through Flow cytometry and immunohistochemical method. **Results:** Compared with BG and IG, the pulmonary fibrosis degree of NG was decreased remarkably ($P<0.01$). Hydroxyproline contents was reduced obviously ($P<0.01$). Apoptotic rate and expressions of Fas/FasL were decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion:** Pulmonary fibrosis was improved significantly after the endogenous IL-17 activity blocked, meanwhile, apoptosis and the expressions of Fas/FasL were both decreased. These data showed that antimouse IL-17 mAb ameliorate the pulmonary fibrosis induced by BLM and it is related to Fas/FasL apoptotic pathways.

[Key words] interleukin-17; apoptosis; pulmonary fibrosis; Fas/FasL

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):584-587, 624]

[基金项目] 张家口市科技局自然科学基金资助(12110046D-1);河北省高等学校自然科学基金重点项目(ZD2017206)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xyzonly928@163.com

肺纤维化(pulmonary fibrosis,PF)是多数慢性肺疾病发展的终末病理改变,以肺上皮细胞的过度凋亡、成纤维细胞过度增殖、间质炎症、细胞外基质(extracellular matrix,ECM)过度沉积为主要特征,故PF肯定存在细胞凋亡与增殖的失衡^[1]。从纤维化动物模型或人体组织活检结果发现,大量炎症细胞及相关细胞因子等参与了PF的形成过程。其中T淋巴细胞是炎症细胞的重要组成部分,通过多种途径影响肺纤维化的进程^[2]。Th17细胞是不同于Th1、Th2的一种新的细胞亚群,主要通过分泌IL-17发挥效应,已经被证实在自身免疫性疾病、感染等疾病中发挥重要作用^[3]。目前国内外文献表明IL-17在PF的形成中起着重要作用^[4-5],有关IL-17与细胞凋亡的研究国内外均鲜见报道。本研究旨在探讨IL-17对PF小鼠肺组织细胞凋亡和对Fas/FasL的影响,为肺纤维化寻求有效的治疗方法提供新的思路和依据。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级C57BL/6雄性小鼠(6~8周龄,军事医学科学院实验动物中心提供)。抗鼠IL-17中和抗体(克隆号50104.11,R&D systems公司,美国),同型对照抗体(克隆号54447.11,R&D systems公司,美国),博来霉素(bleomycin,BLM)(批号640110,化药株式会社,日本),羟脯氨酸(hydroxypridine,HYP)测定试剂盒(南京建成生物有限公司),Masson三色染色试剂盒(福州迈新生物科技开发有限公司),AnnexinV/PI凋亡检测试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司),免疫组化Fas抗体(批号:BA0484,武汉博士德生物工程有限公司),免疫组化Fas-L抗体(批号:ZS-834,Santa Cruz公司,美国),抗兔免疫组化试剂盒SP-9001DAB试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),小鼠IgG(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 PF模型建立及处理

80只小鼠随机分为4组,分别为假手术组(SG)、BLM组(BG)、中和抗体组(NG)和抗体对照组(IG)。各组小鼠称重后,用3.5%水合氯醛注射液腹腔麻醉(0.1 mL/10 g体重),向气管内注入生理盐水溶解的博来霉素(5 mg/kg)0.1 mL,SG小鼠注入等量生理盐水,动物清醒后常规饲养。NG、IG分别从造模前1 d开始每隔3 d通过尾静脉给予抗鼠IL-17单克隆中和抗体(400 μg/kg)、同型对照抗体(400 μg/kg)0.2 mL,BG和SG则给予等量生理盐水。于造模后

28 d,处死各组小鼠。

1.2.2 PF病理评价

取右肺下叶经4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,5 μm连续切片,行Masson三色染色,按Szapiel等^[6]的方法光镜下观察并评价肺组织纤维化程度,0级:无纤维化;1级:轻度纤维化,病变区域少于全肺的20%,肺泡结构正常;2级:中度肺纤维化,受累面积占全肺的20%~50%;3级:弥漫性肺纤维化,病变范围>50%,利用HMIAS-2000W病理图文分析系统计算肺纤维化在切片中所占的比例,评价肺纤维化程度。

1.2.3 肺组织HYP含量测定

肺组织HYP含量测定按照试剂盒说明书操作。具体方法如下:取右肺上叶精确称重后加入水解液煮沸20 min,调pH至6.0~6.8,加蒸馏水定容,经适量活性炭处理后取上清进行检测。

1.2.4 细胞凋亡检测

取新鲜肺组织用冷生理盐水反复冲洗,剪成1 mm小块,用胰蛋白酶和胶原酶I消化后,加入适量含10%胎牛血清的DMEM终止消化,经200目网筛过滤,800 r/min离心5 min 2次,用含10%胎牛血清的DMEM重悬沉淀,将肺细胞悬液接种入包被小鼠IgG的培养皿中,置37℃、5%CO₂培养箱内孵育40 min,吸出含未黏附细胞的液体接种于另一包被小鼠IgG的培养皿中37℃孵育40 min,吸出未黏附细胞,800 r/min离心5 min去上清,用含10%胎牛血清的DMEM重悬沉淀,此时细胞主要为肺泡II型上皮细胞、肺泡I型上皮细胞和支气管上皮细胞。按照试剂盒说明进行AnnexinV-FITC凋亡检测。

1.2.5 Fas/FasL免疫组化染色

按照生物素—链霉卵白素免疫组化检测试剂盒说明进行,将肺组织切片常规脱蜡至水,抗原修复15 min,以3%H₂O₂消除内源性过氧化物酶活性,血清封闭,滴加一抗4℃过夜,PBS冲洗,滴加二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,经DAB显色、苏木素复染、脱水、透明、封片。镜下观察棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。每张玻片随机计数10个视野,通过Image-Pro plus 5.1半定量分析免疫组化的染色结果,以光密度值表示。

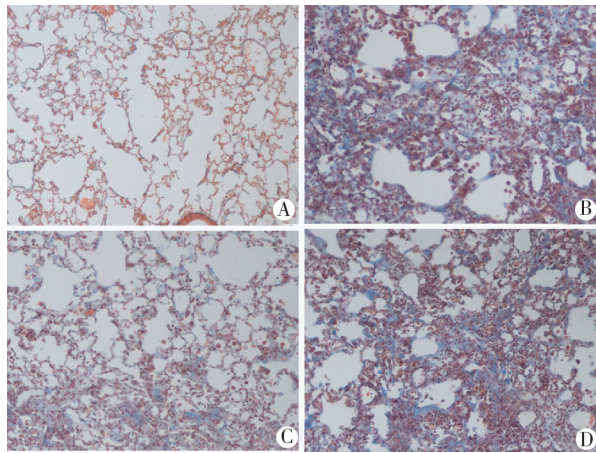
1.3 统计学方法

应用统计软件SPSS 19.0软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,当多组间总的比较差异有统计学意义时,用LSD检验进行组间多重比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阻断 IL-17 对博来霉素诱导小鼠肺纤维化程度的影响

造模后第 9 和第 12 天 BG 组各死亡 1 只,第 10 天 IG 组死亡 1 只,其余两组没有死亡。SG 组小鼠 Masson 染色肺组织结构清晰,无纤维化发生,仅在肺泡间隔有少量的胶原出现,BG 和 IG 小鼠肺组织则可见大量胶原沉积,肺纤维化严重,中和抗体方法阻断内源性 IL-17 发现,NG 的胶原分布明显轻于 BG 和 IG 两组,差异有统计学意义($P<0.01$,图 1,表 1)。



A:(SG 组)小鼠肺切片;B:(BG 组)小鼠肺切片;C:(NG 组)小鼠肺切片;D:(IG 组)小鼠肺切片。

图 1 各组小鼠肺组织 Masson 染色($\times 100$)

Figure 1 Masson staining of mouse lung for each group($\times 100$)

表 1 阻断 IL-17 对小鼠肺组织纤维化、HYP 含量的影响

Table 1 Influence on lung fibrosis, HYP content in mouse lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x}\pm s$)

组别	纤维化(%)	HYP 含量 ($\mu\text{g/g}$)
SG 组($n=20$)	3.65 \pm 0.49	391.39 \pm 29.69
BG 组($n=18$)	50.33 \pm 4.91 ^{***Δ}	776.95 \pm 36.66 ^{***Δ}
NG 组($n=20$)	18.75 \pm 3.23 [*]	526.29 \pm 40.70 [*]
IG 组($n=19$)	49.26 \pm 4.03 ^{***Δ}	762.73 \pm 35.66 ^{***Δ}

与 SG 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 NG 组比较, $\Delta P<0.01$ 。

2.2 阻断 IL-17 对博来霉素诱导小鼠肺组织 HYP 含量的影响

取各组肺组织进行 HYP 含量测定,结果多组间比较差异有统计学意义。与 SG 比较其余 3 组 HYP 含量明显升高,差异有显著性($P<0.05$),采用中和抗体方法阻断内源性 IL-17 发现,NG 组 HYP 含量与 BG 和 IG 组相比均下降,差异有显著性($P<0.01$),与

BG 组比较,IG HYP 含量变化并不明显(表 1)。

2.3 阻断 IL-17 对博来霉素诱导小鼠肺组织细胞凋亡率的影响

流式细胞仪检测发现,NG 组阻断内源性 IL-17 活性,有明显诱导细胞凋亡的作用,凋亡率与 SG 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),与 BG 和 IG 组相比均显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$,表 2)。

表 2 阻断 IL-17 对小鼠肺组织细胞凋亡率的影响

Table 2 Influence on apoptotic rate in mouse lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x}\pm s$)

组别	凋亡率
SG 组($n=20$)	3.18 \pm 0.14
BG 组($n=18$)	17.68 \pm 1.49 ^{***Δ}
NG 组($n=20$)	6.74 \pm 0.46 [*]
IG 组($n=19$)	18.15 \pm 1.44 ^{***Δ}

与 SG 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 NG 组比较, $\Delta P<0.01$ 。

2.4 阻断 IL-17 对博来霉素诱导小鼠肺组织 Fas/FasL 表达的影响

细胞胞质呈棕黄色颗粒表达的细胞即为 Fas/FasL 表达阳性细胞,IG、BG 组可见肺组织阳性细胞明显增多,Fas 主要表达在肺泡上皮细胞,FasL 主要表达在肺泡上皮细胞、炎性细胞和部分间质细胞及支气管上皮细胞,SG 组只有少量的阳性细胞,3 组与 SG 组相比有显著性差异($P<0.01$),采用中和抗体阻断内源性 IL-17 活性发现,NG 组肺组织 Fas/FasL 表达明显减少,NG 组与 IG 组和 BG 组比较差异显著 ($P<0.01$,表 3、图 2)。

表 3 阻断 IL-17 对小鼠肺组织 Fas/FasL 表达的影响

Table 3 Influence on expression of Fas/FasL in mice lung after blocking IL-17 activity ($\bar{x}\pm s$)

Group	Fas	FasL
SG 组($n=20$)	4.22 \pm 0.17	3.77 \pm 0.47
BG 组($n=18$)	11.78 \pm 1.79 ^{***Δ}	9.99 \pm 1.75 ^{***Δ}
NG 组($n=20$)	6.75 \pm 0.42 [*]	5.92 \pm 0.73 [*]
IG 组($n=19$)	12.09 \pm 1.26 ^{***Δ}	10.71 \pm 1.35 ^{***Δ}

与 SG 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 NG 组比较, $\Delta P<0.01$ 。

3 讨论

本研究采用 BLM 经气管给药诱导小鼠 PF 的发生,结果发现,BG 组小鼠 PF 程度与 SG 相比明显加重,HYP 含量显著升高,而 HYP 为胶原纤维所特有,HYP 含量增加,提示肺组织内胶原纤维含量增

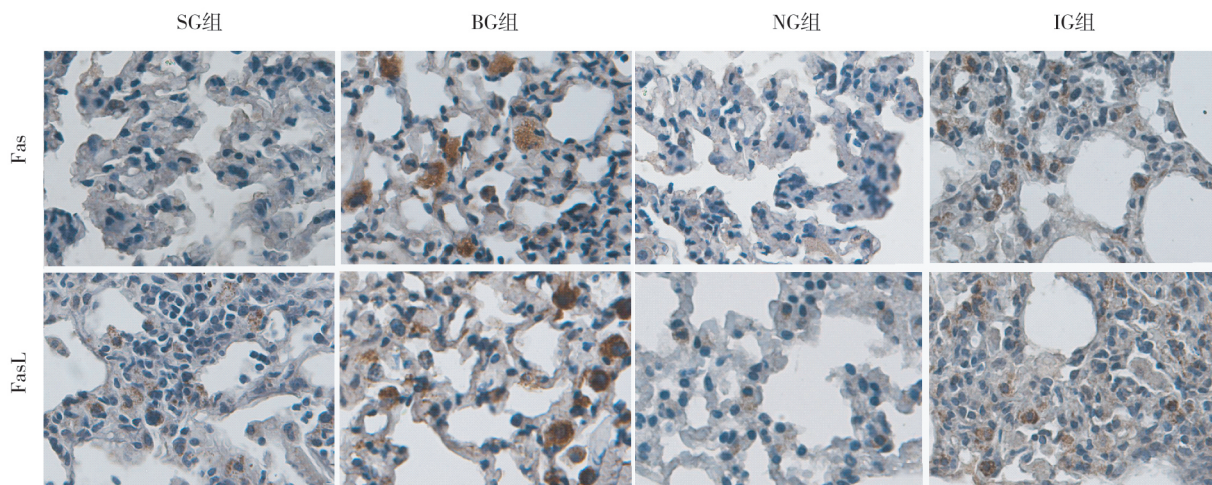


图 3 各组小鼠肺组织 Fas/FasL 免疫组织化学染色(×100)

Figure 3 Immunohistochemistry staining for Fas/FasLof mice lung in each group(×100)

加,反映肺纤维化程度加重。同时免疫组化结果显示肺纤维化小鼠肺组织中 Fas/FasL 表达明显增加。由此可见,肺纤维化时启动了 Fas/FasL 介导的细胞凋亡程序,换言之 BLM 诱导的肺纤维化发生过程中肺上皮细胞等的过度凋亡与 Fas/FasL 介导的细胞凋亡相关。

Hagimoto 等^[7]相关研究也证实了本研究的观点,在 BLM 诱导的 PF 模型中,FasL mRNA 在浸润的淋巴细胞中表达上调,而 Fas 则在过度凋亡的支气管和滤泡上皮细胞中表达上调,他还进一步用重复吸入抗-Fas 抗体模拟 Fas/FasL 相互作用,发现可诱导上皮细胞和炎症细胞过度凋亡从而导致小鼠 PF 发生^[7]。可见,Fas/FasL 信号途径诱导过度凋亡在 PF 发生和发展中发挥了关键作用,抑制此信号途径可能为肺纤维化免疫防治提供新靶位。

前炎症因子 IL-17 与肺炎、哮喘、慢性阻塞性肺疾病和囊性纤维化等发生有关,通过促进 IL-8、IL-6 和 MIP-2 等导致肺中性粒细胞募集及活化^[8],还能活化核因子 κ B 诱导炎症细胞的分化和活化。研究发现用抗 IL-17 单克隆抗体处理的小鼠能抑制中枢神经系统的自身免疫性疾病^[9]。Zhang 等^[10]报道 IL-17 是宿主防御衣原体肺炎的重要介质,中和 IL-17A 活性使小鼠易感性和死亡率显著升高,且 IL-17 的表达依赖于髓样分化蛋白 88(MyD88)介导的信号转导途径。最近研究发现,IL-1 和 IL-23 介导的 IL-17 在肺部炎症的早期表达可导致肺纤维化^[5]。

本研究用抗 IL-17 单克隆抗体阻断内源性 IL-17 活性后,小鼠 PF 得以改善,其作用机制可能与下列因素有关:①TGF- β 是促纤维化细胞因子,阻断

内源性 IL-17 活性可能也抑制了 TGF- β 的促肺纤维化作用,而 TGF- β 促纤维化作用是通过上调 Fas/FasL 基因的表达实现的;②在 PF 的发病过程中,大量炎症细胞聚集和上皮细胞损伤会产生活性氧,有证据表明,活性氧能通过上调 Fas/FasL 系统的表达而活化细胞死亡程序,阻断内源性 IL-17 活性可能降低肺组织氧自由基的释放;③BLM 可诱导肺泡上皮细胞和呼吸道内皮细胞大量表达钙离子依赖性钙调蛋白激酶-II (CaMK II),抑制 CaMK II 活性则可以阻止 BLM 诱导的肺泡上皮细胞凋亡^[11],降低肺纤维化。内源性 IL-17 活性被阻断后,Fas/FasL 表达降低可能与抑制了 CaMK II 活性有关。

综上所述,本研究证明 BLM 诱导的肺纤维化因内源性 IL-17 活性被阻断而得以改善,Fas/FasL 蛋白表达降低,上皮细胞凋亡下调,提示 IL-17 作用的发挥与促进细胞凋亡有关。在目前 IPF 和其他一些慢性肺纤维化疾病有较高的发病率和病死率且没有满意的药物治疗方案情形下,IL-17 可能会成为预防和治疗 PF 的新靶点。至于 IL-17 对 Fas/FasL 途径是直接或间接发挥作用及是否影响其他凋亡通路有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 孔璐,王继峰,牛建昭.特发性肺纤维化与细胞凋亡[J].中华结核和呼吸杂志,2013,27(6):368-371
- [2] Xiong S,Guo R,Yang Z,et al. Treg depletion attenuates irradiation-induced pulmonary fibrosis by reducing fibrocyte accumulation,inducing Th17 response,and shifting IFN- γ ,IL-12/IL-4,IL-5 balance [J].Immunobiology,

(下转第 624 页)

innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMK II alpha[J]. *J Immunol*, 2010,185(12):7244-7251

[10] Fan L, Qi H, Teng J, et al. Identification of serum miRNAs by nano-quantum dots microarray as diagnostic biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016,37(6):7777-7784

[11] Honardoost MA, Naghavian R, Ahmadinejad F, et al. Integrative computational mRNA-miRNA interaction analyses of the autoimmune-deregulated miRNAs and well-known Th17 differentiation regulators: An attempt to discover new potential miRNAs involved in Th17 differentiation [J]. *Gene*, 2015, 572(2): 153-162

[12] 史新惠, 潘世扬, 黄珮琚, 等. 单抗 NJ001 杀伤肺腺癌细胞机制的初步研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(7): 858-862

[13] 卓宋明, 徐文莉, 梁珊瑚, 等. 慢性阻塞性肺病患者 T 淋巴细胞亚群凋亡与 Fas, FasL, Bcl-2 表达的关系[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2011, 5(6): 1554-1560

[14] 付海龙, 徐广峰, 史春梅, 等. hsa-miR-100 的生物信息学分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(18): 2177-2180

[15] Weigent DA, Arnold RE. Expression of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-1 receptors in EL4 lymphoma cells overexpressing growth hormone[J]. *Cell Immunol*, 2005, 234(1): 54-66

[16] 刘 更, 周鸿鹰. miR-93 与肿瘤的研究进展[J]. *四川解剖学杂志*, 2013, 28(3): 28-31

[17] Lin CF, Young KC, Bai CH, et al. Blockade of reactive oxygen species and Akt activation is critical for anti-inflammation and growth inhibition of metformin in phosphatase and tensin homolog-deficient RAW264. 7 cells [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(6): 669-677

[18] Zhou Y, Yang Q, Xu H, et al. miRNA-221-3p enhances the secretion of interleukin-4 in mast cells through the phosphatase and tensin homolog/p38/nuclear factor-kappaB pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e148821

[19] Guo L, Yang Y, Liu J, et al. Differentially expressed plasma microRNAs and the potential regulatory function of Let-7b in chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e101055

[20] Aurora AB, Baluk P, Zhang D, et al. Immune complex-dependent remodeling of the airway vasculature in response to a chronic bacterial infection[J]. *J Immunol*, 2005, 175(10): 6319-6326

[收稿日期] 2016-05-17

(上接第 587 页)

2015, 220(11): 1284-1291

[3] Bălănescu P, Lădaru A, Bălănescu E, et al. IL-17, IL-6 and IFN- γ in systemic sclerosis patients[J]. *Rom J Intern Med*, 2015, 53(1): 44-49

[4] Thakur C, Wolfarth M, Sun J, et al. Oncoprotein mdig contributes to silica-induced pulmonary fibrosis by altering balance between Th17 and Treg T cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 3722-3736

[5] 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

[6] Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899

[7] Hagimoto N, Kuwano K, Kawasaki M, et al. Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(3): 436-445

[8] 张效云, 李 琦, 张颖骞. 中和白细胞介素-17 加重小鼠衣原体呼吸道感染[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2013, 45(4): 613-618

[9] 程 溪, 王沙沙, 刘宇宏, 等. IL-17A 对硝普钠诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2013, 29(12): 1276-1280

[10] Zhang XY, Gao LF, Lei L, et al. A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum* [J]. *J. Immunol*, 2009, 183(2): 1291-1300

[11] Winters CJ, Koval O, Murthy S, et al. CaMK II inhibition in type II pneumocytes protects from bleomycin-induced pulmonary fibrosis by preventing Ca²⁺-dependent apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(1): L86-94

[收稿日期] 2016-10-27