

化物之间的动态平衡失调^[4~6],氧化损害线粒体基因组,导致更多的 ROS 产生,使 ATP 耗竭、DNA 损伤、蛋白质稳定性下降、质膜破坏、致炎性细胞因子的释放,启动炎症反应和肝纤维化的发生,形成恶性循环,使细胞死亡、坏死^[7,8]。研究证实,NAFLD 时机体 MDA 含量增高,SOD、GSH 等水平降低,且与肝组织炎症、坏死及纤维化等呈显著正相关^[9,10]。

本研究发现 NAFLD 各时相点大鼠和血瘀型 NAFLD 各时相点大鼠血及肝组织 SOD、GSH - PX 均较正常组有不同程度的降低,而血及肝组织 MDA 均较正常组有不同程度的增高,说明单纯 NAFLD 疾病模型和血瘀型 NAFLD 病证结合模型均存在不同程度的氧化应激反应;随着造模时间的延长,NAFLD 大鼠血及肝组织 SOD、GSH 呈动态降低,血及肝组织 MDA 呈动态增高,说明 NAFLD 大鼠氧化应激水平随着造模时间的延长而不断增强;血瘀型 NAFLD 大鼠血及肝组织 SOD、GSH 均较同期 NAFLD 大鼠降低,血及肝组织 MDA 均较同期 NAFLD 大鼠增高,说明同样造模时间血瘀型病证结合模型的氧化应激反应比单纯疾病模型强,故笔者认为使用血瘀型 NAFLD 病证结合模型造模法可能可以适当减少造模时间。

参考文献

- 1 陈芝芸,蔡丹莉,严茂祥,等. 血瘀型非酒精性脂肪性肝病病证结合模型的建立和评价[J]. 中华中医药杂志,2012;27(3):727 - 731
- 2 陈芝芸,严茂祥,何蓓晖. 大鼠非酒精性脂及性肝炎形成中氧化应

- 激水平变化及山楂总黄酮对其影响[J]. 医学研究杂志,2007,36(12):33 - 36
 - 3 张声生,王垂杰,沈洪. 特色专科实用手册·消化病[M]. 北京:中国中医药出版社,2008:214 - 221
 - 4 Videla LA, Rodrigo R, Araya J, *et al.* Oxidative stress and depletion of hepatic long - chain polyunsaturated fatty acids may contribute to non-alcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Biol Med,2004,37(9):1499 - 1507
 - 5 Perez - Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, *et al.* Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology,2003,38(4):999 - 1007
 - 6 Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, *et al.* Uncoupling protein - 2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non - alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia - reperfusion injury[J]. Gut,2008,57(7):957 - 965
 - 7 Bell LN, Temm CJ, Saxena R, *et al.* Bariatric surgery - induced weight loss reduces hepatic lipid peroxidation levels and affects hepatic cytochrome P - 450 protein content[J]. Ann Surg,2010,251(6):1041 - 1048
 - 8 Matsunaml T, Sato Y, Ariga S, *et al.* Regulation of oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor2 in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2010,3(5):472 - 481
 - 9 Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, *et al.* Systemic markers of lipid peroxidation and antioxidants in patients with nonalcoholic Fatty liver disease[J]. Am J Gastroenterol,2005,100(4):850 - 855
 - 10 王旭霞,赵曙光,冯国华,等. 网络抗氧化剂对非酒精性脂肪性肝炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(7):601 - 611 (收稿日期:2012 - 04 - 13)
- (修回日期:2012 - 05 - 04)

干扰素 - γ 对大鼠肺纤维化转录因子 T - bet/GATA3 的影响

涂军伟 赵建平 朱景倩 盛琳 章义利

摘要 目的 通过检测 IFN - γ 干预博来霉素诱导大鼠肺纤维化时各组转录因子 T - bet/GATA3 mRNA 表达的变化,从而探讨 IFN - γ 干预肺纤维化的机制。**方法** 腹腔注射博来霉素(BLM)诱导大鼠肺纤维化动物模型。雄性 SD 大鼠随机均分为对照组(C)、博来霉素致伤组(BLM1、BLM2、BLM4)及博来霉素 + IFN - γ 治疗组(BLM - IFN1、BLM - IFN2、BLM - IFN4)。对各组肺组织纤维化的程度行病理半定量评估,检测各组外周血单个核细胞转录因子 T - bet/GATA3 mRNA 的表达。**结果** BLM1 及 BLM - IFN1 组肺组织病理改变以肺泡炎为主,BLM2 组兼有肺泡炎和纤维化病变,BLM4 组以肺纤维化为主,BLM + INF2 及 BLM + INF4 组中发现肺纤维化程度减轻。半定量 RT - PCR 法显示各博来霉素致伤组大鼠 T - bet 基因的表达均低于 C 组而 GATA3

基金项目:浙江省金华市科技局技术创新基金资助项目(2006 - 3 - 008)

作者单位:321000 浙江省金华市中心医院呼吸内科(涂军伟、赵建平、朱景倩、盛琳);325000 温州医学院附属第二医院 ICU(章义利)

通讯作者:章义利,电子信箱:seasune@163.com

基因的表达式则高于 C 组 (P 均 < 0.01), $\text{IFN} - \gamma$ 干预后, BLM + INF1 、BLM + INF2 及 BLM + INF4 3 组 T - bet 基因的表达增加,与同时点的博来霉素致伤组对比均有显著性差异, GATA3 基因表达在 2 周后显著减少,甚至低于 C 组。结论 $\text{IFN} - \gamma$ 干预能减轻博来霉素所致的肺纤维化作用,其机制可能与逆转了 T - bet/GATA3 失衡有关。

关键词 肺纤维化 博来霉素 T - bet GATA3 干扰素 - γ

Effects of $\text{IFN} - \gamma$ on the Expression of Transcription Factors T - bet/GATA3 in Rat Pulmonary Fibrosis. Tu Junwei, Zhao Jianping, Zhu Jingqian, Sheng Lin, Zhang Yili. Department of Respiratory of Jinhua Central Hospital, Zhejiang 321000, China

Abstract Objective To investigate the effects of $\text{IFN} - \gamma$ on the expression of transcription factors T - bet/GATA3 mRNA in rat pulmonary fibrosis and thus to explore the potential therapeutic mechanism of $\text{IFN} - \gamma$ on pulmonary fibrosis. **Methods** Male SD rats were randomly divided into three groups: the control group (C), bleomycin groups (group BLM) and $\text{IFN} - \gamma$ treated group (group BLM - INF). The pulmonary fibrosis model was established by intraperitoneal injection with bleomycin (15mg/kg $\times$ 10day). Rats in BLM and BLM - INF group were randomly sacrificed on 7th day (group BLM1 and BLM - INF1), 14th day (group BLM2 and BLM - INF2) and 28th day (group BLM4 and BLM - INF4), respectively. Semi - quantitative analysis of the histopathologic changes stained with Haematoxylin - eosin (H - E) was performed, and the mRNA expression of transcription factors T - bet/GATA3 in each group were measured with RT - PCR. **Results** Alveolitis was the primarily pathologic change of lung tissue in BLM1 and BLM - INF1 , while alveolitis and fibrosis in BLM2 and fibrosis in BLM4. Obviously alleviated fibrosis was seen in both BLM - INF2 and BLM - INF4 group. As compared with group C, the expression of T - bet gene was significantly lower in each bleomycin group, while GATA3 was remarkably higher. After treating with the $\text{IFN} - \gamma$, the expression of T - bet gene was significantly higher in BLM + INF1 , BLM + INF2 and BLM + INF4 than that in counterpart group of BLMs. The expression of GATA3 was remarkably decreased after two weeks, even lower than that in group C. **Conclusion** $\text{IFN} - \gamma$ could alleviate the degree of rat pulmonary fibrosis induced by bleomycin. The mechanism might be related to that $\text{IFN} - \gamma$ could reverse the out - of - balance of T - bet/GATA3.

Key words Pulmonary fibrosis; Bleomycin; T - bet; GATA3; Interferon gamma

肺纤维化是以肺部炎症导致肺泡持续性损伤及细胞外基质的反复破坏、修复、重建和过度沉积,正常肺组织结构被破坏为病理特点的一类疾病,是许多病因不同的肺间质疾病的共同结局。近年来研究表明 Th1/Th2 失衡在许多疾病的发生发展过程中起重要作用,有多种转录因子参与 Th1/Th2 的分化及其细胞因子的表达, T - bet (T - box expressed in T cells) 和 GATA3 (GATA binding protein 3, GATA3) 是两种细胞内的分子,分别特异性地表达于 Th1 细胞和 Th2 细胞。其中 T - bet 特异表达于 Th1 细胞并上调 $\text{IFN} - \gamma$ 的表达,促进 Th0 细胞向 Th1 细胞分化; GATA3 主要表达于 Th2 细胞并上调 Th2 细胞因子的表达,是 Th2 细胞分化所必须的转录因子, GATA3/T - bet 二者的相互制衡对 T 细胞的分化及其细胞因子的表达至关重要^[1,2]。有研究表明, $\text{IFN} - \gamma$ 对人和动物的肺纤维化有一定的防治作用,但机制仍不明了。本研究通过检测 $\text{IFN} - \gamma$ 干预博来霉素诱导大鼠肺纤维化模型时外周血单个核细胞 T - bet/GATA3 mRNA 的表达变化,从而探讨 $\text{IFN} - \gamma$ 干预肺纤维化的可能机制。

材料与方法

1. 实验材料:健康雄性 SD 大鼠 70 只(由金华市药检所提供),体重 $250 \pm 50\text{g}$;博来霉素 A5 粉针(哈尔滨博莱制药有限公司

公司, H23021807);干扰素 - γ 针,大鼠干扰素 - γ (rat $\text{IFN} - \gamma$) ELISA 试剂盒上海晶美生物技术有限公司;宝生物 rTaq 酶及配套试剂; T - bet 及 GATA3 引物及探针均由上海基康公司合成,序列如下: T - bet 正向引物: 5' - CGTGACTGCCTAC - CAGAATGC - 3', 反向引物: 5' - GGAACACTCGTATCAAC - CGATGT - 3', TaqMan 探针: 5' - FAM - CAGCTGAAAATCGA - CAACAACCCCTTTG - TAMRA - 3', 长度均为 117bp; GATA3 正向引物: 5' - CACAGAAGGCAGGGAGTGTGT - 3', 反向引物: 5' - CAGGCGTTGCAAAGGTACTG - 3', TaqMan 探针: 5' - FAM - TACCCCACTGTGGCGGCGAGA - TAMRA - 3', 长度均为 90bp。

2. 实验方法: (1)模型的建立及分组: 雄性 SD 大鼠随机方法分为正常对照 (C) 组 10 只、博来霉素致伤 (BLM) 组 30 只、博来霉素 - 干扰素 (BLM - INF) 治疗组 30 只。BLM 组以腹腔内给药法复制大鼠肺纤维化模型,即每日腹腔内注射 15mg/kg BLM $\times$ 10 天;对照组每日腹腔内给予 0.01ml/kg 生理盐水 $\times$ 10 天。BLM 组分别于造模的 7、14、28 天各处死 10 只(相应为 BLM1、BLM2、BLM4 组)^[3]。BLM - INF 组在博来霉素造模后当天开始以 $\text{IFN} - \gamma$ 肌肉注射,剂量为 1.5×10^5 万 IU/(kg $\cdot$ d),直至实验全程结束,分别在 7、14、28 天各处死大鼠 10 只(相应为 BLM - INF1 、BLM - INF2 、BLM - INF4 组)。 (2)动物的处死和标本的收集:各组大鼠行颈动脉放血处死,分离出气管和及肺,左下肺用手术线结扎,取左下肺置于 10% 中性甲醛溶液中浸泡固定,经脱水,石蜡包埋切片,按

常规程序行 HE 染色,进行病理组织学检查。(3)肺组织病理组织学检查:按 Maeyama 方法:在光镜下(4×10)评估每张切片上肺炎和肺纤维化的面积,分成 0、I、II、III 级,分别对应分值 0、1、2、3 分,具体标准如下:0 级,肺组织结构正常,无肺炎和肺纤维化;I 级,肺炎和肺纤维化累及肺组织 $< 25\%$;II 级,肺炎和肺纤维化累及肺组织 $25\% \sim 50\%$;III 级肺炎和肺纤维化累及肺组织 $> 50\%$ [3]。(4)外周血单核细胞转录因子 GATA3 及 T-bet mRNA 的表达检测:取大鼠静脉血 1.5ml,梯度离心法分离单核细胞(PMBC),使用 Bio-Rad Nucleospin RNA Purification Kit 进行总 RNA 抽提,操作流程按试剂盒说明书进行。一步法进行反转录,取总 RNA $2\mu\text{g}$,Oligo (dT) $15\mu\text{l}$,加 DEPC 水至 $18\mu\text{l}$,混匀、离心后 70°C 5min,冰水浴 3min;体系中继续加入 5mol/L - MLV Buffer $8\mu\text{l}$, 10mmol/L dNTP $2\mu\text{l}$, $40\text{U}/\mu\text{l}$ RNasin $1\mu\text{l}$, $200\text{U}/\mu\text{l}$ M-MLV $2\mu\text{l}$,总体积 $40\mu\text{l}$ 。混匀、离心后 42°C 60min, 95°C 10min,产物 -18°C 保存备用。采用 TaqMan PCR 探针法进行。反应体系如下: 20mol/L TaqMan Probe $0.625\mu\text{l}$, 20mol/L primer forward $1.125\mu\text{l}$, 20mol/L primer reverse $1.125\mu\text{l}$, H_2O $7.625\mu\text{l}$, ABI TaqMan 2PCR Master mix $12.5\mu\text{l}$, Template $2\mu\text{l}$,总体积 $25\mu\text{l}$ 。每次检测设置 3 个空白对照。把制备好的待测样品加入 96 孔板中,每个样品进行 3 个平行样实验,PCR 反应程序如下: 50°C 2min, 95°C 10min;进入循环: 95°C 30s, 60°C 30s,共 40 个循环。 β -actin 作为内参,将待测基因 Ct 值与内参 Ct 值的差值作为 ΔCt 值。

3. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计,所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较用 q 检验,病理半定量资料采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肺病理组织学改变:BLM 致伤组 1 周时以肺炎为主,肺泡间隔增宽,肺间质及肺泡内有较多的巨噬细胞和淋巴细胞浸润,伴有水肿和轻度出血;两周时肺泡内炎性细胞减少,成纤维细胞增多,肺泡间隔增宽;4 周时以肺纤维化为主,肺泡壁增厚,部分肺泡腔消失,肺泡结构破坏(图 1 ~ 图 3)。在使用博来霉素致大鼠肺纤维化时同时加用外源性 IFN- γ 治疗的大鼠肺组织病理变化表现不同。BLM + INF1 与 BLM1 组病理对比无明显差异,仍以肺炎为主,但在 BLM + INF2 及 BLM + INF4 组中发现肺纤维化程度减轻。各组大鼠肺组织病理半定量分析见表 1。

2. 外周血单个核细胞转录因子 T-bet 及 GATA3mRNA 的表达检测:外周血单个核细胞转录因子 T-bet mRNA 的表达检测表明各博来霉素致伤组的 $\Delta\text{CtT-BET}$ 值均高于 C 组 (P 均 < 0.01),且 BLM4 组 $>$ BLM2 组 $>$ BLM1 组,说明博来霉素诱导大鼠 T-

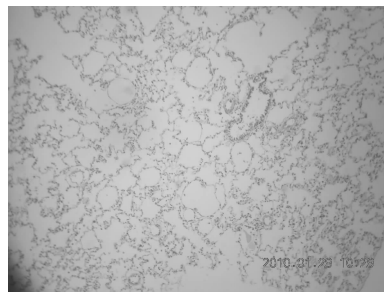


图 1 正常肺组织光镜下表现 ($\times 100$)

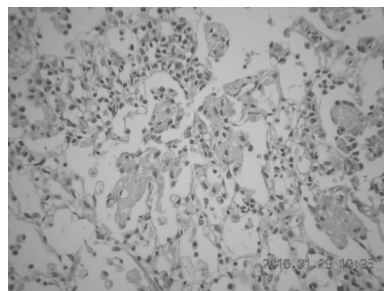


图 2 博来霉素致伤组中博来霉素诱导 4 周时,肺泡腔内纤维化,多种炎症细胞浸润重度肺纤维化表现 ($\times 400$)

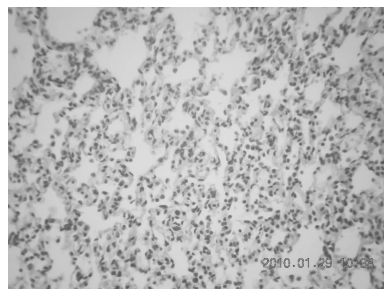


图 3 IFN- γ 治疗 4 周时纤维组织增生较博来霉素致伤组明显减少,中等纤维化表现 ($\times 200$)

表 1 大鼠肺组织病理半定量分析

分级	组别						
	C	BLM1	BLM2	BLM4	BLM + INF1	BLM + INF2	BLM + INF4
0	9	0	0	0	0	0	0
1	1	8	2	0	8	4	2
2	0	1	4	2	2	4	4
3	0	1	4	8	0	2	4
平均分	0.1	1.3	2.2	2.8	1.2	1.8	2.2

7 组间秩和检验 (K-W 法) $\chi^2 = 30.119$, $P < 0.01$; BLM1 与 BLM2 比较 (M-W 法) Z 值 = -2.466 , $P < 0.05$; BLM1 与 BLM4 比较 Z 值 = -3.539 , $P < 0.01$; BLM2、BLM + INF4 与 BLM4 比较 Z 值 = -2.023 , $P < 0.05$; BLM + INF1 与 BLM1 比较 Z 值 = -1.023 , $P > 0.05$; C 组与其他各组比较, P 均 < 0.01

bet 基因的表达显著降低 (ΔCt 值与 T-bet 的含量成反比)。IFN- γ 干预后,IFN- γ 治疗组的 T-bet 基

因的表达均较博来霉素致伤组显著增加 (P 均 < 0.01), 但 $IFN-\gamma$ 治疗组内第 2 周与第 4 周时, 两组 $T-bet$ 基因的表达无显著差异 ($P > 0.05$)。各博来霉素致伤组 $\Delta Ct-GATA3$ 值均低于 C 组 (P 均 < 0.01), 提示博来霉素使 $GATA3$ 基因的表达显著增高。 $IFN-\gamma$ 干预后, 大鼠 $GATA3$ 基因在第 2 周时表达较博来霉素致伤组显著减少 (P 均 < 0.01), 甚至低于 C 组 (P 均 < 0.01), 但在第 1 周时 $BLM1$ 与 $BLM+INF1$ 无统计学差异。从该表可以看出, 正常对照组 $\Delta Ct-TBET/\Delta Ct-GATA3$ 比值 0.82, 博来霉素致伤组比值 $BLM1$ 为 0.95, $BLM2$ 为 1.55, $BLM4$ 为 1.68, 而 $IFN-\gamma$ 治疗组分别为 0.65、0.63、0.65, 和正常组相接近, 见表 2。

表 2 大鼠外周血单个核细胞转录因子 $T-bet$ 及 $GATA3$ mRNA 的表达检测

组别	<i>n</i>	$\Delta Ct-TBET$	$\Delta Ct-GATA3$
C	10	9.87 ± 0.79	11.99 ± 1.14
BLM1	10	10.76 ± 0.75	11.36 ± 0.52
BLM2	10	13.02 ± 0.95 *	8.38 ± 0.68
BLM4	10	14.12 ± 0.86	8.39 ± 0.52
BLM + INF1	10	7.85 ± 0.69	12.14 ± 0.40
BLM + INF2	10	8.70 ± 0.74	13.74 ± 0.43
BLM + INF4	10	8.45 ± 0.72	12.93 ± 0.51

7 组间 $\Delta Ct-TBET$ 的比较, F 值为 274.96, $P < 0.01$; $BLM+INF2$ 与 $BLM+INF4$ 比较, $P > 0.05$; 其他各组两两间比较 ΔP 均 < 0.01 。7 组间 $\Delta Ct-GATA3$ 的比较, F 值分别为 318.81, $P < 0.01$ 。 $BLM1$ 与 $BLM+INF1$ 及 $BLM2$ 与 $BLM4$ 比较 $P > 0.05$; 其他各组两两间比较, P 均 < 0.01

讨 论

肺纤维化是一种发展隐匿、进展迅速、病死率和致残率高且治疗效果欠佳的慢性肺部疾病, 目前尚无有效的治疗方法^[4]。

本实验利用博来霉素诱导大鼠肺纤维化模型, 起初 1 周内表现为肺的炎细胞浸润, 纤维化成分较少, 2 周后纤维化成分增多而炎细胞消退, 与有关实验结果相似^[5]。虽然肺纤维化的发病机制尚不明确, 但目前认为主要与 $Th1/Th2$ 型细胞因子比例失衡密切相关^[5]。 $Th1/Th2$ 细胞共同来源于 T 前体细胞 $T0$, 分化需要独特的转录因子, $T-bet$ 特异表达于 $Th1$ 细胞, 促进 $Th0$ 细胞向 $Th1$ 细胞分化, $GATA3$ 主要表达于 $Th2$ 细胞, 是 $Th2$ 细胞分化所必须的转录因子^[1,2]。由此可以推测, 在正常情况下, $T-bet/GA-$

$TA3$ 表达是处于一种平衡状态。研究表明博来霉素诱导大鼠肺纤维化时, 其转录因子 $T-bet$ 表达减少, $GATA3$ 表达增加, $T-bet/GATA3$ 的改变 (失衡状态) 参与了 $Th1/Th2$ 失衡, 且此时血清 $IFN-\gamma$ 含量下降, $IL-4$ 含量升高, 呈 $Th2$ 细胞因子优势型变化, 从而发生肺纤维化^[6]。本研究的病理结果表明 $IFN-\gamma$ 干预有明显的抗纤维化作用, 但对炎症的影响较小。本研究还表明, $IFN-\gamma$ 的干预能显著提高被博来霉素抑制了的 $T-bet$ 基因表达, 同时显著抑制被博来霉素激发了的 $GATA3$ 基因表达, 从而逆转了博来霉素诱发的 $T-bet/GATA3$ 失衡, 使 $Th1/Th2$ 的比例与正常对照组接近, 达到治疗纤维化的作用^[7]。本研究结果还表明, 随着 $IFN-\gamma$ 干预时间的推移, 在第 2 周和第 4 周 $T-bet$ 基因的表达无显著性差异, 而 $GATA3$ 基因表达在第 2 周和第 4 周虽然具有统计学差异, 但有下降的趋势, 这提示应早期使用 $IFN-\gamma$ 治疗肺纤维化。

综上所述, 早期使用 $IFN-\gamma$ 能治疗肺纤维化, 可能的机制是其逆转 $T-bet/GATA3$ 失衡, 这为治疗肺纤维化提供了一个新的理论基础。

参考文献

1 Zheng W, Flavell RA. The transcription factor $GATA-3$ is necessary and sufficient for $Th2$ cytokine gene expression in $CD4^+$ T cells [J]. Cell, 1997, 89(4): 587-596

2 Zhang DH, Yang L, Cohn L, et al. Inhibition of allergic inflammation in a murine model of asthma by expression of a dominant-negative mutant of $GATA-3$ [J]. Immunity, 1999, 11(4): 473-482

3 Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, et al. Attenuation of bleomycin-induced pneumopathy in mice by monoclonal antibody to interleukin-12 [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(6): 1128-1137

4 Demedts M, Costabel U. ATS/ERS international multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias [J]. Eur Respir J, 2002, 19(5): 794-796

5 Kimura T, Ishii Y, Yoh K, et al. Overexpression of the transcription factor $GATA-3$ enhances the development of pulmonary fibrosis [J]. Am J Pathol, 2006, 169(1): 96-104

6 涂军伟, 朱以军, 朱寿田, 等. 大鼠肺纤维化转录因子 $T-bet/GATA3$ 的表达及其与相关细胞因子的关系 [J]. 浙江医学, 2010, 32(11): 1621-1624

7 Majumdar S, Li D, Ansari T, et al. Different cytokine profiles in cryptogenic fibrosing alveolitis and fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis: a quantitative study of open lung biopsies [J]. Eur Respir J, 1999, 14(2): 251-257

(收稿日期: 2012-04-16)
(修回日期: 2012-05-21)