

英夫利西单抗对哮喘模型豚鼠抗肿瘤坏死因子- α 的影响

咎双江^{1,2}, 朱立勤³, 杨文杰^{3*}

1. 天津市第四中心医院, 天津 300140

2. 天津医科大学, 天津 300070

3. 天津市第一中心医院, 天津 300192

摘要: **目的** 探讨英夫利西单抗对哮喘模型豚鼠抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响。**方法** 豚鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 对照组, 模型组, 英夫利西单抗低、中、高剂量 (5、10、15 mg/kg) 组, 每组 10 只。模型组和英夫利西单抗各剂量组 ip 给予 10% 卵蛋白以致敏, 对照组给予等量生理盐水; 模型组和英夫利西单抗各剂量组再分两次给予 2% 卵蛋白溶液雾化吸入, 对照组以等量生理盐水替代。每次激发前英夫利西单抗各剂量组 ip 相应剂量的英夫利西单抗, 第二次激发后 24 h 处死动物, 对比各组血清、组织匀浆和肺泡灌洗液中 TNF- α 水平。**结果** 模型组血清、组织匀浆、肺泡灌洗液中 TNF- α 浓度高于对照组 ($P < 0.05$), 而英夫利西单抗各剂量组血清、组织匀浆、肺泡灌洗液中 TNF- α 的浓度低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** TNF- α 与豚鼠哮喘形成密切相关; 使用英夫利西单抗可以减少豚鼠哮喘模型血清、组织匀浆、肺泡灌洗液中 TNF- α 的产生。

关键词: 英夫利西单抗; 肿瘤坏死因子- α ; 哮喘; 气道炎症

中图分类号: R965; R974 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2013)03-0308-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2013.03.011

Effect of Infliximab on TNF- α of guinea pigs asthma model

ZAN Shuan-jiang^{1,2}, ZHU Li-qin³, YANG Wen-jie³

1. Tianjin Fourth Central Hospital, Tianjin 300140, China

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Infliximab on TNF- α of guinea pigs asthma model. **Methods** Guinea pigs (50), half male and female, were randomly divided into five groups, control, model, low-, mid-, and high-dose Infliximab (5, 10, and 15 mg/kg) groups ($n=10$). Model and the Infliximab groups were ip administered with 10% ovalbumin to sensitivate, and the control group was given physiological saline. Model and Infliximab groups were atomizing inhaled twice with 2% ovalbumin solution, and the control group was given the same dose physiological saline. Infliximab groups were ip administered with appropriate doses of Infliximab before excitation each time, and animals were killed 24 h after the second excitation. TNF- α was detected in serum, tissue, and bronchoalveolar lavage fluid. **Results** TNF- α concentration in the serum, tissue homogenates, and bronchoalveolar lavage fluid in the model group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). However, TNF- α concentration in the serum, tissue homogenates, and bronchoalveolar lavage fluid of the Infliximab group was lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** TNF- α is related to the formation of the guinea pig asthma, and Infliximab could reduce TNF- α of serum, tissue homogenates, and bronchoalveolar lavage fluid in guinea pig model of asthma.

Key words: Infliximab; TNF- α ; asthma; airway inflammation

据统计, 目前全球约有 3 亿人患有哮喘, 同时, 每年有将近 25 万哮喘患者死亡。抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是一种单核因子, 主要由单核细胞和巨噬

细胞产生, 参与气道的炎症。近年来报告显示 TNF- α 与哮喘的发病存在一定的相关性, 且哮喘患者气道中的 TNF- α 含量及其信使核糖核酸 (mRNA) 表达

收稿日期: 2013-02-18

作者简介: 咎双江, 男, 工作于天津市第四中心医院, 现学习于天津医科大学研究生院。Tel: 13820975695 E-mail: shuagnjiang10@126.com

*通信作者 杨文杰, 女, 硕士, 主任医师。Tel: 13602155376 E-mail: yangwenjie157@yahoo.com.cn

水平明显高于正常人群^[1-2]。哮喘是由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、中性粒细胞、气道上皮细胞等)参与的慢性气道炎症性疾病,这种慢性炎症导致气道反应增加,引起反复发作的喘息、气急、胸闷、咳嗽等症状。研究证实^[3-4],哮喘患者的支气管灌洗液和血浆中 TNF- α 浓度明显高于正常人,这就提示 TNF- α 是参与这种慢性炎症的重要介质之一。

哮喘常用的治疗方法为糖皮质激素^[5]、白三烯受体拮抗剂、支气管扩张剂和炎性介质释放抑制剂,抗 TNF- α 单克隆抗体被用来预防或者治疗支气管哮喘也是当前研究控制重症哮喘的热点之一。本实验建立豚鼠哮喘模型,观察使用抗 TNF- α 单克隆抗体对模型豚鼠血清、组织匀浆、肺泡灌洗液(BALF)中 TNF- α 浓度的影响,旨在探讨抗 TNF- α 单克隆抗体对哮喘豚鼠气道炎症的抑制作用。

1 材料

1.1 仪器

Acs—Aa—3 电子称(上海大华电子称厂);百瑞 37 型压缩雾化吸入机(德国百瑞);TDL 水平转离心机(上海安亭科学仪器厂);AY220 岛津托盘电子分析天平(岛津有限公司)。

1.2 试剂

豚鼠 TNF- α ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BD65287491);卵清白蛋白(美国 Sigma 公司,规格 100 mg/瓶,批号 5ER2536);注射用英夫利西单抗(瑞士 Cilag AG 公司,规格 100 mg/瓶,批号 9KM93011);0.9%氯化钠注射液(中国大冢制药有限公司,规格 10 mL/瓶,批号 2D74D1)。

1.3 实验动物

选取清洁级体质量为(300 \pm 20)g 且均为同一花色豚鼠 50 只,雌雄各半,鼠龄 12 周。采购于北京大学医学部实验动物科学部,合格证号 SCXK(京)2011-0012。饲养于天津医科大学动物实验室。实验室按照昼夜采光 12 h,通风良好,室温在 20~25℃。豚鼠自由摄食饮水,饲料由本实验室提供。

2 方法

2.1 模型制造

将豚鼠随机分为 5 组,正常组,模型组,英夫利西单抗高、中、低剂量组,每组 10 只。根据文献报道^[6],于实验开始第 1 天,称取卵清白蛋白 1.4 g

溶于 14 mL 生理盐水中使其完全溶解,以配制成浓度为 10%的卵清白蛋白溶液。模型组和英夫利西单抗高、中、低剂量组均 ip 10%卵蛋白 1 mL,正常组 ip 给予 1 mL 生理盐水。

2.2 第一次激发

实验第 17 天,按照文献报道^[7],以高、中、低(15、10、5 mg/kg)剂量的英夫利西单抗 ip “2.1”所造哮喘豚鼠,给药剂量为 0.2 mL;正常组和模型组给予等量的生理盐水替代。配制 2%的卵清白蛋白,给药 1 h 后,正常组给予生理盐水雾化吸入 5 min;模型组和英夫利西单抗高、中、低剂量组给予 2%的卵蛋白雾化吸入 5 min。

2.3 第二次激发

实验第 27 天,激发前药物干预及激发过程同“2.2”。第二次激发后 24 h,宰杀豚鼠并且采集标本,留取数据。

2.4 标本的采集和测定

2.4.1 血清和肺泡灌洗液的采集 采集血清和肺泡灌洗液^[7]。处死之前,从各组豚鼠下腔静脉抽取静脉血 5 mL,在 4℃、2 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清,将其置于-70℃冰箱中保存待测。随后处死动物,经气管切口向左肺缓慢灌注无菌生理盐水 3 mL,每次注入后立刻开胸、夹闭左支气管,用生理盐水灌洗肺脏(回收率在 80%~90%),并由纱布滤过,重复 3 次,回收总量在 5 mL,离心,取其上清液移入无菌瓶内,并置于-70℃冰箱待测。

2.4.2 组织匀浆的采集 肺泡灌洗液收集之后,将肺脏连同气管取出;取一小部分肺组织用冰冻生理盐水冲洗,制备成 10%的组织匀浆,于 2 500 r/min 离心 15 min,取上清液,备用。

2.4.3 TNF- α 的测定 采用双抗体夹心 ELISA 法测定,严格按照试剂盒的说明要求操作^[8]。提前 20 min 从冰箱中取出 ELISA 试剂盒,平衡至室温。稀释标准品,将标准品溶解成 2 000 pg/mL 的标准液,然后倍比稀释。设标准孔 8 个,在 EP 管中对标准液进行等倍稀释,稀释后浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 pg/mL,1 个空白孔;分别将标本及不同浓度的标准品(100 μ L/孔)加入到相应孔中,用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育 90 min,洗板 4 次。除空白孔外,分别加入生物素化抗体工作液(100 μ L/孔),用封板胶纸封住反应孔,37℃孵箱孵育 60 min,再洗板 4 次,除空白孔外,分别加入酶结合物工作液(100

μL/孔), 用封板胶纸封住反应孔, 37 °C 孵箱孵育 30 min, 洗板 4 次, 加入显色剂 100 μL/孔, 避光 37 °C 孵箱孵育 10~20 min, 加入终止液 100 μL/孔, 混匀后 5 min 内测量 A_{450} 值。根据标准孔浓度及所测得的 A_{450} 值用 SPSS 18.0 软件进行直线回归分析, 计算待测样品的浓度。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计学软件进行数据分析, 计

量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式进行统计描述, 组间比较采用 t 检验。

3 结果

模型组中血清、组织匀浆、肺泡灌洗液中 TNF- α 浓度均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。英夫利西单抗高、中、低剂量组血清、组织匀浆、肺泡灌洗液中 TNF- α 浓度均明显低于模型组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组血清、组织匀浆和肺泡灌洗液中 TNF- α 浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 TNF- α concentration in serum, tissue homogenates, and bronchoalveolar lavage fluid in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

分组	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(μ g·mL ⁻¹)		
		血清	组织匀浆	肺泡灌洗液
对照	—	238.83 ± 4.01	6.37 ± 1.03	367.23 ± 22.41
模型	—	274.46 ± 11.72 [*]	9.02 ± 0.93 [*]	444.23 ± 23.22 [*]
英夫利西单抗	5	241.37 ± 6.03 [▲]	7.10 ± 0.46 [▲]	370.23 ± 9.53 [▲]
	10	251.54 ± 6.99 [▲]	7.02 ± 0.54 [▲]	369.52 ± 9.63 [▲]
	15	256.14 ± 7.16 [▲]	7.07 ± 0.53 [▲]	379.99 ± 10.46 [▲]

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$ 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group [▲] $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

哮喘是一种由多种细胞和细胞因子参与的慢性气道炎症性疾病, 据目前调查显示哮喘患者中约有 1/10 为重症患者^[9], 目前常用加大皮质类固醇的用量加以控制^[10], 从而导致重症哮喘患者病态和死亡的风险明显增加。在哮喘的致病过程中, TNF- α 作为一种重要的前炎性介质, 由巨噬细胞、淋巴细胞、肺泡上皮细胞等释放, 在哮喘的发生、发展过程中发挥着重要的作用^[11]。目前的研究认为 TNF- α 在哮喘发病过程中能激活中性粒细胞、肥大细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等, 并且促进炎性介质的释放, 活化炎症细胞合成炎性因子, 在炎性细胞-细胞因子之间形成逐步放大环, 促使炎症反应, 因此抗 TNF- α 单克隆抗体治疗哮喘成为新的研究方向^[12-13]。

本实验以豚鼠为研究对象, 以英夫利西单抗为干预药物, 以 TNF- α 为观察指标, 研究抗 TNF- α 单克隆抗体对气道炎症的抑制作用。与以往研究相比, 本实验在血清和组织匀浆标本的基础上, 增加了肺泡灌洗液作为标本, 测定并比较 3 种标本中 TNF- α 的浓度, 进一步说明了 TNF- α 单抗在哮喘发生、发展中减轻哮喘气道炎症的作用, 与文献报道^[14]一致。

本实验结果显示, 英夫利西单抗高、中、低剂量组豚鼠血清、组织匀浆和肺泡灌洗液中 TNF- α

表达均明显下降 ($P < 0.05$), 其中以低剂量 (5 mg/kg) 效果最为显著。由此可以推断, TNF- α 作为一种重要的介质参与哮喘发病的整个过程, 通过使用英夫利西单抗可以减轻气道炎症, 改善哮喘的发病程度。英夫利西单抗作为一种抗肿瘤坏死因子对哮喘有一定的治疗作用, 虽然应用于临床尚需时日, 但是它对于治疗哮喘, 特别是重症哮喘患者的治疗提供了更多选择, 为临床治疗提供了一种新的方向^[15-16]。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2007 修订版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(1): 8-17.
- [2] Rennard S I, Fogarty C, Kelsen S, *et al*. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(9): 926-934.
- [3] 张程, 陈平, 蔡珊, 等. 重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(6): 432-436.
- [4] 何浩明, 郭继忠, 朱雪明. 新编肺病防治必谈 [M]. 上海: 同济大学出版社, 2006: 225-226.
- [5] 陈雪英, 刘芹, 何艳, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血浆生物介质的临床意义及糖皮质激素疗效相关性研

- 究 [J]. 中华老年医学杂志, 2007, 26(6): 446-447.
- [6] 孙圣华, 唐文祥, 刘 纯, 等. 肿瘤坏死因子- α 对慢性阻塞性肺疾病大鼠模型呼吸肌蛋白质分解代谢的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(3): 186-191.
- [7] Triantafyllidis J K, Papalois A E, Parasi A, *et al.* Favorable response to subcutaneous administration of infliximab in rats with experimental colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(43): 6843-6847.
- [8] 樊德利, 赵 翊, 李 伟. SP-A、TNF- α 、IL-6、IL-8 在支气管哮喘中的检测与分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011(2): 450-453.
- [9] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗及管理方案) [J]. 中华结核与呼吸杂志, 2008, 31(3): 817-822.
- [10] 上官文姬. 支气管哮喘免疫学发病机制的研究进展 [J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2009, 9(5): 602-606.
- [11] Najam F L, Giasuddin A S, Shembesh A H. Tumour necrosis factors in childhood asthma [J]. *Indian J Pediatr*, 2001, 68(3): 217-222.
- [12] Aaron S D, Angel J B, Lunau M, *et al.* Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(2): 349-355.
- [13] 张 程, 张湘燕, 罗溶溶, 等. 预防性使用英夫利西单抗对肺气肿模型大鼠气道炎症的影响研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(37): 3480-3482.
- [14] Erin E M, Leaker B R, Nicholson G C, *et al.* The effects of s monoclonal antibody directed against tumor necrosis factor-(alpha) in asthma [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(7): 753-762.
- [15] 张俊玲, 高 捷, 张树华, 等. 支气管哮喘儿童纤维蛋白原、单体聚合功能及 D-二聚体变化对照研究 [J]. 中国医药导刊, 2011, 13(12): 2051-2052.
- [16] 刘 凤, 迟春花. 难治性哮喘发病机制及治疗进展 [J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2011, 5(1): 62-66.