

## 论 著

(基础研究)

# 卡介菌多糖核酸注射液对慢性阻塞性肺疾病大鼠血清 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 和 IL-2 的影响

李树雯, 俞琦, 杨凤娇, 李良红

**【摘要】 目的** 通过观察卡介菌多糖核酸注射液对慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的影响,探讨卡介菌多糖核酸注射液治疗 COPD 的作用机制。**方法** 随机将 60 只 SD 大鼠(雄性)分为对照组、模型组、药物组,每组 20 只。模型组和药物组采用熏香烟加气管内注入脂多糖法建立大鼠 COPD 模型,药物组给予卡介菌多糖核酸注射液 0.45 mg/kg 腹腔注射,隔日 1 次。模型组、对照组给予等渗盐水 0.3 mL 腹腔注射,隔日 1 次。采用双抗夹心 ELISA 方法检测大鼠血清 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量。**结果** 模型组大鼠血清中的 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 [(281.3 $\pm$ 48.3)、(383.9 $\pm$ 210.0)、(4084.1 $\pm$ 2408.9)ng/mL]较对照组[(197.2 $\pm$ 33.4)、(229.5 $\pm$ 61.7)、(695.2 $\pm$ 466.7)ng/mL]显著升高( $P<0.05$ ),而药物组大鼠血清中的 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 [(237.2 $\pm$ 33.4)、(252.2 $\pm$ 160.2)、(2084.0 $\pm$ 2002.7)ng/mL]含量较模型组明显降低( $P<0.05$ )。**结论** 卡介菌多糖核酸注射液能降低 COPD 大鼠血清 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量,调节机体免疫功能,抑制组织炎症反应。

**【关键词】** 细胞间黏附因子-1;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白细胞介素-2;慢性阻塞性肺疾病;卡介菌多糖核酸注射液

**【中图分类号】** R320.2415 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2020)06-0578-03

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2020.06.005

## Effects of pcg-pnsinjection on ICAM-1, TNF- $\alpha$ and IL-2 in serums of rats with COPD

LI Shu-wen, YU Qi, YANG Feng-jiao, LI Liang-hong

(Department of Rehabilitation, Hangzhou Special Service Center of the Air Force, Hangzhou 310007, Zhejiang, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of BCG polysaccharide and nucleic injection on ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-2 in the serum of rats with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and study the mechanism of preventing and treating COPD.

**Methods** 60 male SD rats were randomly divided into blank group, model group, treatment group. COPD models were established by pouring Lipopolysacchride (LPS) into trachea and put rats into smoking environment twice a day. Rats in treatment group were taken with PCG-PNS intraperitoneal injection for 30 days. The levels of ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-2 in serums of rats in each group was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The levels of ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-2 in rat serum of the model group [(281.3 $\pm$ 48.3), (383.9 $\pm$ 210.0), (4084.1 $\pm$ 2408.9)ng/mL] was significantly higher than that of the blank group [(197.2 $\pm$ 33.4), (229.5 $\pm$ 61.7), (695.2 $\pm$ 466.7)ng/mL] ( $P<0.05$ ). The levels of ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-2 in rat serums of treatment group [(237.2 $\pm$ 33.4), (252.2 $\pm$ 160.2), (2084.0 $\pm$ 2002.7)ng/mL] was obviously less than that of the model group ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** This study suggests that PCG-PNS injection can reduce the level of ICAM-1, TNF- $\alpha$  and IL-2 in serum of rats with COPD and regulate its immune function, indicating its effect on inhibition of tissue inflammation.

**【Key words】** ICAM-1; TNF- $\alpha$ ; IL-2; chronic obstructive pulmonary disease; BCG polysaccharide and nucleic injection

## 0 引 言

作者单位:310007 杭州,空军杭州特勤疗养中心康复疗养科(李树雯、俞琦、杨凤娇、李良红)

通信作者:李良红, E-mail:3318582808@qq.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是较为常见的临床肺疾病,目前居世界疾病致死率第四位,发病机制复杂,

普遍认为 COPD 以气管、支气管、肺泡、肺间质、肺部血管的慢性炎症为特征<sup>[1-2]</sup>。而炎症的发病机制与肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 等细胞因子介导炎症细胞在气管、支气管、肺泡、肺间质等聚集、趋化、转移等密切相关,最终引起肺组织的慢性炎症反应<sup>[3-4]</sup>。而据报道 TNF- $\alpha$  能增强细胞内细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule, ICAM-1) 的表达<sup>[5]</sup>。卡介菌多糖核酸 (BCG-polysaccharide nucleic acid, BCG-PSN) 是从卡介菌中提取的主要含多糖和核酸的非特异性免疫调节剂,通过调节 IL-2、干扰素、TNF- $\alpha$  等调节机体细胞免疫和体液免疫功能<sup>[6]</sup>。临床上卡介菌多糖核酸治疗 COPD 应用较为广泛,但相关机理的研究较少,因此本研究观察卡介菌多糖核酸注射液对慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的影响,探讨卡介菌多糖核酸注射液治疗 COPD 的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 健康清洁雄性 SD 大鼠 60 只,6~8 周龄,体质量 200~250 g,常规饲料喂养,自由饮食饮水,12 h 光照周期,温度 18~26 °C,相对湿度 40%~70%,购自浙江中医药大学动物实验中心[实验动物许可证号:SYXK(浙)2018-0012]。利群牌香烟购自浙江烟草公司。大鼠 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 酶联免疫分析试剂盒购自美国 ENDONGEN 公司。脂多糖购自 Sigma 公司。自制吸烟染毒箱。卡介菌多糖核酸注射液购自陕西医药控股集团生物制品有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 COPD 大鼠模型的建立** 将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组、药物组各 20 只。模型组和药物组采用熏香烟加气管内注入脂多糖法建立大鼠 COPD 模型。给予对照组大鼠常规喂养;模型组与药物组在第 1 天及第 15 天向大鼠气管内注射 1 g/mL 脂多糖 0.2 mL (当天不进行香烟熏染),其他时间将模型组、药物组大鼠每天暴露于烟雾中 3 次/d (每次间歇 2 h),每次 10 支香烟熏染 30 min。造模期 28 d。完成后进行造模评价,从模型组、药物组、对照组各取 5 只大鼠处死,取肺组织在光镜下观察肺组织形态学变化,综合判断造模是否成功。

**1.2.2 给药方法** 造模完成后,按大鼠与人体公斤

体重剂量折算系数表折算,药物组给予卡介菌多糖核酸注射液 0.45 mg/kg 腹腔注射,隔日 1 次。模型组、对照组给予等渗盐水 0.3 mL 腹腔注射,隔日 1 次。

**1.2.3 大鼠一般状态观察** 从造模开始每周观察大鼠体重、精神状态、皮毛是否光泽、活动状况、对刺激的反应是否灵敏、口鼻分泌物、食欲、咳痰、咳嗽、死亡等情况。

**1.2.4 血清采集** 在第 30 天分别将对照组、模型组、药物组大鼠用 10% 水合氯醛按 300 mg/kg 剂量腹腔麻醉后处死,抽心血 2 mL 于灭菌离心管,室温静置 1 h 后置 4 °C 冰箱 12 h,离半径 12 cm,以 2000 r/min 离心 15 min,取血清待检。

**1.2.5 主要检测指标及方法** 采用双抗体夹心 ELISA 法,取血清 50  $\mu$ L 加入反应孔,震荡、混匀,37 °C 孵育,检测大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的值。试验板设复孔,同时设空白对照。

**1.3 统计学分析** 应用 SPSS 19.0 软件进行数据统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,组间比较采用 LSD 法。以  $P\leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般状态观察及肺组织形态学变化** 对照组:大鼠精神状态好,皮毛有光泽,无束毛,饮食、饮水正常,口鼻分泌物正常,呼吸平稳。模型组:大鼠精神状态萎靡,活动减少,毛色晦暗,进食量减少,频发咳嗽,活动后有明显气促,口鼻分泌物增多;光镜下可见肺泡壁变薄、胀大、破裂等。药物组经治疗后精神状态、毛色、进食量均明显改善,咳嗽、活动后气促好转。光镜下肺组织的病理变化较模型组改善。

**2.2 各组实验大鼠血清 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量变化** 模型组大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量与对照组比较均明显增高 ( $P<0.05$ ),而药物组大鼠血清中的 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量较模型组明显降低 ( $P<0.05$ ),表明卡介菌多糖核酸注射液抑制大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的表达。见表 1。

表 1 COPD 大鼠模型血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的表达情况 ( $\bar{x}\pm s$ , ng/mL)

组别	n	ICAM-1	TNF- $\alpha$	IL-2
对照组	15	197.2 $\pm$ 33.4	229.5 $\pm$ 61.7	695.2 $\pm$ 466.7
模型组	15	281.3 $\pm$ 48.3 <sup>*</sup>	383.9 $\pm$ 210.0 <sup>*</sup>	4084.1 $\pm$ 2408.9 <sup>*</sup>
药物组	15	237.2 $\pm$ 33.4 <sup>#</sup>	252.2 $\pm$ 160.2 <sup>#</sup>	2084.0 $\pm$ 2002.7 <sup>#</sup>

与对照组比较, \*  $P<0.05$ ; 与模型组比较, #  $P<0.05$

### 3 讨 论

COPD 是以进行性气流受限为特征的通气功能障碍性肺部疾病,不完全可逆并进行性发展,致病原因和发病机制均不确切,研究证实 COPD 是气道、肺实质以及肺血管的慢性炎症为主要病理特征性疾病<sup>[7]</sup>。其气道慢性炎症是通过 T 淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞产生的细胞因子介导的结果<sup>[8-9]</sup>。中性粒细胞的活化聚集,释放中性粒细胞弹性蛋白酶、中性粒细胞组织蛋白酶 G 等多种蛋白酶引起慢性粘液高分泌状态并导致肺实质的破坏。随着研究的深入,人们逐渐认识到 COPD 亦具有自身免疫性疾病的特征,存在获得性免疫的启动与失衡<sup>[10]</sup>。TNF- $\alpha$ 、IL-2 作为重要的炎症因子在慢性炎症性和自身免疫性疾病中发挥着重要的作用<sup>[11]</sup>。TNF- $\alpha$  是一种由内毒素激活的巨噬细胞和淋巴细胞等分泌的细胞因子。可以增加成纤维母细胞黏附分子(ICAM-1)的表达,从而促进中性粒细胞和单核细胞的募集和活化,促进炎症反应<sup>[12]</sup>。同时 TNF- $\alpha$ 、IL-2 等因子可加剧小气道平滑肌及肺泡完成性的破坏,促进支气管的结构重塑,影响气道气流的稳定性<sup>[13-14]</sup>。

卡介菌多糖核酸是一种非特异性免疫调节剂,通过调节机体内细胞免疫、体液免疫,刺激网状内皮系统来增强机体抗病能力,同时通过稳定肥大细胞,减少脱颗粒细胞释放活性物质,达到抗炎平喘作用<sup>[15]</sup>,主要用于预防和治疗慢性支气管炎、感冒及哮喘。

本实验采用双抗体夹心 ELISA 法,测定大鼠血清中 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 含量,实验结果表明,与对照组比较,COPD 模型组 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的表达显著升高( $P < 0.05$ ),而药物组与模型组相比较,ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的含量明显降低( $P < 0.05$ ),说明 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 表达与 COPD 相关,参与 COPD 病变的病理过程。笔者初步分析其升高的机理认为:①当感染时免疫复合物刺激单核-巨噬细胞合成释放过量的 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2。②患者血中异常增高的 TNF- $\alpha$ 、IL-2 激活炎症细胞、氧自由基等,促使炎症介质释放、磷脂酶 A<sub>2</sub> 活化,致红细胞渗出、白细胞浸润,中性粒细胞活化,内毒素释放,引起 TNF- $\alpha$ 、IL-2 再升高<sup>[16]</sup>。同时卡介菌多糖核酸通过降低 ICAM-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2 的含量,延缓炎症细胞的聚集、活化,抑制炎症介质的释放,减轻肺组织的炎性

病变。总之本实验表明卡介菌多糖核酸不仅通过调节机体免疫功能治疗 COPD,而且抑制组织的炎性反应,从而对 COPD 有较好的治疗作用。

### 【参考文献】

- [1] 王 晶,贺 蓓,沈 宁,等.白介素 17 抗体减轻吸烟所致慢性阻塞性肺疾病模型小鼠的气道炎症[J].国际呼吸杂志,2008,18(16): 981-985.
- [2] 李 蓓,王 敏.CD4<sup>+</sup>T 细胞的新成员:Th17 细胞[J].生命的化学,2009,29(2): 172-175.
- [3] Linder A, Hoshino H, Laan M. Airway neutrophils and interleukin-17[J]. Eur Respir J,2000,15(5): 973-977.
- [4] Diveu C, McGeachy MJ, Cua DJ. Cytokines that regulate autoimmunity[J]. Curr Opin Immunol,2008,20(6): 663-668.
- [5] Shimizu M, Shimamura M, Owaki T, et al. Antiangiogenic and Antitumor Activities of IL-27[J]. Immunol,2006,176(12): 7317-7324.
- [6] 葛海燕,吴 瑾,王 纯,等.卡介菌多糖核酸联合伊可尔治疗面部扁平疣的疗效分析[J].东南国防医药,2017,19(3): 309-310.
- [7] Lane N, Robins RA, Corne J, et al. Regulation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of regulatory T-cells and Th17 cells[J]. Clin Sci (Lond),2010,119(2): 75-86.
- [8] Monk JM, Hou TY, Turk HF, et al. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA) Decrease Obesity-Associated Th17 Cell-Mediated Inflammation during Colitis[J]. PLoS One,2012,7(11): 383-393.
- [9] Cazzola M, Matera MG. IL-17 in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Expert Rev Respir Med,2012,6(2): 135-138.
- [10] 唐启亚,钟小宁.中性粒细胞外诱捕网在慢性阻塞性肺疾病免疫发病机制中的研究进展[J].医学研究生学报,2018,31(8): 869-873.
- [11] 黄少祥,蒋荣民,曲 由,等.参苓白术散对 COPD 稳定期营养不良患者血清瘦素的影响[J].天津医药,2012,40(3): 290-291.
- [12] Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Vos R, et al. Innate and adaptive interleukin-17-producing lymphocytes in chronic inflammatory lung disorders[J]. Am J Respir Crit Care Med,2011,183(8): 977-986.
- [13] 龙仕居,陈忠仁.慢性阻塞性肺病患者急性加重期与缓解期痰液及血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 表达水平的差异及临床意义[J].重庆医学,2012,41(19): 1970.
- [14] 潘云虎,季志宇,李发根,等.血清 IL-8、TNF- $\alpha$ 、IGF-I 检测在慢性阻塞性肺病患者急性加重期的临床意义[J].福建医药杂志,2013,35(1): 74.
- [15] 陈文祥,王雍立.骨质疏松症合并慢性阻塞性肺疾病动物模型建立及致病易感因素的研究进展[J].东南国防医药,2019,21(5): 507-511.
- [16] 胡 蓉.COPD 患者治疗前后血清 hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2007,20(6): 503-505.

(收稿日期:2020-07-27; 修回日期:2020-09-29)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)