

# 表皮生长因子受体抑制剂对外源锌离子致大鼠急性呼吸道炎症的影响\*

贾陈志<sup>1)</sup>, 关文池<sup>2)</sup>, 李冰<sup>1)</sup>, 梁宁<sup>1)</sup>, 燕贞<sup>1)</sup>, 王威<sup>1)</sup>, 吴逸明<sup>1)</sup>, 吴卫东<sup>1) #</sup>

1) 郑州大学公共卫生学院劳动卫生学教研室 郑州 450001 2) 厦门大学医学院临床医学系 厦门 361005

# 通讯作者, 男, 1963年10月生, 博士, 教授, 研究方向: 分子毒理学, E-mail: wdwu98@ gmail.com

**关键词** 锌离子; 呼吸道炎症; IL-8 表皮生长因子受体; 大鼠

**中图分类号** R136.3

**摘要** 目的: 探讨表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂对外源锌离子致大鼠呼吸道急性炎症的影响。方法: 将 100  $\mu\text{mol/L}$  硫酸锌溶液经气管灌注大鼠肺部复制动物炎症模型, 于灌注后 4 h、8 h 和 24 h 处死大鼠, 以 PBS 为对照, 分别测定支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中白细胞计数、总蛋白、白细胞介素 8 (IL-8) 以及乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量, 以选择炎症最明显的时间点。进一步用二甲亚砜 (DMSO) 和 EGFR 抑制剂 PD153035 预灌注大鼠, 观察其对硫酸锌溶液所致呼吸道炎症的影响。结果: 不同灌注液作用后大鼠白细胞计数 ( $F = 12.149, P = 0.002$ ) 和 IL-8 ( $F = 48.680, P < 0.001$ ) 等炎症反应指标不同, 不同时间点白细胞计数 ( $F = 29.569, P < 0.001$ ) 和 IL-8 ( $F = 59.778, P < 0.001$ ) 等炎症反应指标也不同, 硫酸锌灌注后 8 h 为炎症反应最强的时间。不同预灌注液作用后大鼠白细胞计数 ( $F = 37.872, P < 0.001$ ) 和 IL-8 ( $F = 24.347, P < 0.001$ ) 等炎症反应指标不同, PD153035 能抑制炎症反应的强度。结论: EGFR 抑制剂能有效抑制外源锌离子所致大鼠呼吸道急性炎症。

## Effect of EGFR inhibitor on exogenous zinc-induced acute airway inflammation in rats

JIA Chenzhi<sup>1)</sup>, GUAN Wenchu<sup>2)</sup>, LIBing<sup>1)</sup>, LIANG Ning<sup>1)</sup>, YAN Zhen<sup>1)</sup>, WANG Wei<sup>1)</sup>, WU Yiming<sup>1)</sup>, WU Weidong<sup>1)</sup>

1) Department of Occupational Health, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001

2) Department of Clinical Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005

**Key words** zinc ion; airway inflammation; interleukin 8; EGF receptor; rat

**Abstract** **Aim** To determine the effects of EGFR inhibitor on zinc-induced acute airway inflammation in rats. **Methods** Use acute airway inflammation animal model to ascertain the time points with the severest airway inflammation. 100  $\mu\text{mol/L}$  zinc sulfate was tracheally instilled into rat lungs with PBS as control. The rats were sacrificed 4, 8, and 24 h after the instillation and lung lavage was conducted thereafter. The number of white blood cells and the levels of proteins, LDH, and IL-8 in lung lavage fluids were determined, respectively. Moreover, rats were pre-instilled with the EGFR inhibitor PD153035 prior to zinc sulfate instillation and the alterations in the severity of airway inflammation observed. **Results** Different perfusates cause white blood cell number ( $F$  was 12.149,  $P$  was 0.002) and IL-8 ( $F$  was 48.680,  $P < 0.001$ ) and other indicators of rats inflammation different. white blood cell number ( $F$  was 29.569,  $P < 0.001$ ) and IL-8 ( $F$  was 59.778,  $P < 0.001$ ) and other indicators of inflammation at different time points were different. inflammation was the strongest after zinc sulfate perfusion 8 h. Different pre-perfusates cause white blood cell number ( $F$  was 37.872,  $P < 0.001$ ) and IL-8 ( $F$  was 24.347,  $P < 0.001$ ) and other indicators of rats inflammation different. PD153035 can suppress the inflammation. **Conclusion** The EGFR inhibitor can suppress zinc sulfate-induced airway inflammation.

大气中锌离子主要存在于微细颗粒物中, 可以多种形式存在, 主要包括硫酸锌、氧化锌和氯化锌。

环境流行病学调查结果<sup>[1,2]</sup>表明, 长期吸入空气中含锌颗粒物与当地居民呼吸系统炎症性疾病 (如慢性支气管炎、支气管哮喘) 发病率的升高有密切关系。实验结果<sup>[3]</sup>显示, 含锌化合物可提高人支气管上皮

\* 国家自然科学基金资助项目 30872148

细胞和肺泡上皮细胞内白细胞介素 8 (interleukin-8 IL-8) 的表达。发生肺部炎症的大鼠支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid BALF) 中中性粒细胞、巨噬细胞和总蛋白含量升高<sup>[4]</sup>。外源锌离子可激活呼吸道上皮细胞内多个信号传导分子, 如表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B, PI3K-PKB) 等<sup>[5]</sup>。但是这些信号传导分子在锌离子致呼吸道损伤过程中的作用还不清楚。课题组前期研究<sup>[6]</sup>观察到外源性锌离子有磷酸化 (即活化) 人呼吸道上皮细胞 EGFR 作用, 因此推断 EGFR 可能在锌离子致呼吸道炎症过程中发挥重要作用。为证实推论, 作者进行了如下研究。

### 1 材料与方法

1.1 试剂 硫酸锌 (天津凯通化学试剂有限公司), EGFR 抑制剂 PD153035 (美国 Calbiochem 公司), 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司), IL-8 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、ELISA 试剂盒 (美国 R&D Biosciences 公司)。

1.2 实验分组 实验对象: 13 周龄清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 50 只, 体质量 100~130 g 购自河南省实验动物中心, 合格证号 scxk(豫)2005-0001。实验分两个阶段。第一阶段探讨硫酸锌引起大鼠急性呼吸道炎症最明显的时间点。30 只大鼠采用随机数

字表分为 6 组, 每组 5 只, 大鼠先用乙醚麻醉, 然后采用支气管灌注法分别给予 PBS 或 100 μmol/L 硫酸锌溶液 (灌注剂量 1 mL/kg), 分别于灌注后 4 & 24 h 处死。第二阶段探讨预灌注 PD153035 对硫酸锌作用的影响。20 只大鼠随机分为 4 组 (分别用 PD153035 和硫酸锌、PD153035 和 PBS、DMSO 和硫酸锌以及 DMSO 和 PBS 灌注处理), 每组 5 只, 先用 DMSO 或 1 μmol/L PD153035 溶液预灌注, 灌注剂量 0.5 mL/kg 约 30 min 后再按照同样方法分别灌注 PBS 和硫酸锌溶液。处理时间参考第一阶段实验结果。

1.3 呼吸道炎症指标检测方法 大鼠颈椎脱臼处死, 每只用 5 mL 生理盐水进行肺灌洗 2 次, 取 BALF 混匀, 先进行白细胞计数, 然后 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用于总蛋白 (考马斯亮蓝法)、IL-8 蛋白和 LDH 含量检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 进行分析。应用 2 × 3 析因设计方差分析, 比较不同灌注液及时间对大鼠急性呼吸道炎症的影响, 筛选最佳时间; 应用 2 × 2 析因设计方差分析, 比较预灌注液和灌注液的主效应及其交互作用。检验水准 α = 0.05。

### 2 结果

2.1 硫酸锌对大鼠呼吸道各炎症指标的影响 见表 1。灌注硫酸锌 8 h 时各炎症指标均高于 4 h 和 24 h。

2.2 EGFR 抑制剂对硫酸锌致大鼠呼吸道炎症指标的影响 见表 2。

表 1 硫酸锌对大鼠呼吸道各炎症指标的影响 (n = 5)

时间	白细胞计数 / (10 <sup>9</sup> · L <sup>-1</sup> )		ρ(总蛋白量) / (g · L <sup>-1</sup> )		LDH / (U · L <sup>-1</sup> )		ρ(IL-8) / (ng · L <sup>-1</sup> )	
	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理
4 h	1.74 ± 0.18	2.01 ± 0.40	0.63 ± 0.38	1.85 ± 0.62 <sup>#</sup>	3.91 ± 0.51	4.95 ± 0.31 <sup>#</sup>	412.91 ± 28.32	564.52 ± 34.54 <sup>#</sup>
8 h	1.89 ± 0.38	3.44 ± 0.36 <sup>#Δ</sup>	1.11 ± 0.39	2.93 ± 0.58 <sup>#Δ</sup>	4.53 ± 0.92	6.18 ± 0.45 <sup>#Δ</sup>	666.77 ± 34.88	790.00 ± 93.97 <sup>#Δ</sup>
24 h	1.04 ± 0.18	1.03 ± 0.14	0.12 ± 0.17	0.42 ± 0.25	4.05 ± 0.56	4.80 ± 0.45 <sup>*</sup>	485.97 ± 41.69	602.90 ± 141.94 <sup>#</sup>
F <sub>时间</sub> (P)	29.569 (< 0.001)		41.582 (< 0.001)		9.020 (0.001)		59.778 (< 0.001)	
F <sub>灌注</sub> (P)	12.149 (0.002)		50.436 (< 0.001)		30.751 (< 0.001)		48.680 (< 0.001)	
F <sub>交互</sub> (P)	7.696 (0.003)		7.988 (0.002)		1.689 (0.206)		0.340 (0.715)	

与同时时间点的 PBS 灌注处理组比较, <sup>#</sup>P < 0.05 与其他时间点比较, <sup>Δ</sup>P < 0.05。

表 2 EGFR 抑制剂对硫酸锌致大鼠呼吸道炎症指标的影响 (n = 5)

预灌注	白细胞计数 / (10 <sup>9</sup> · L <sup>-1</sup> )		ρ(总蛋白量) / (g · L <sup>-1</sup> )		LDH / (U · L <sup>-1</sup> )		ρ(IL-8) / (ng · L <sup>-1</sup> )	
	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理	PBS 灌注处理	硫酸锌灌注处理
DMSO	1.55 ± 0.16	3.04 ± 0.46	0.83 ± 0.29	1.84 ± 0.43	2.80 ± 0.37	3.75 ± 0.31	123.29 ± 62.59	307.92 ± 79.87
PD153035	1.22 ± 0.37	1.80 ± 0.31	0.18 ± 0.10	0.65 ± 0.30	2.23 ± 0.13	2.59 ± 0.27	63.08 ± 19.54	139.54 ± 39.81
F <sub>预灌注</sub> (P)	37.872 (< 0.001)		26.212 (< 0.001)		28.741 (< 0.001)		24.347 (< 0.001)	
F <sub>灌注</sub> (P)	21.786 (< 0.001)		40.693 (< 0.001)		50.048 (< 0.001)		18.663 (0.001)	
F <sub>交互</sub> (P)	7.319 (0.017)		3.472 (0.084)		5.705 (0.030)		4.179 (0.060)	

### 3 讨论

EGFR 广泛分布于上皮组织中,参与呼吸道上皮细胞膜的修复等生理反应,在呼吸道炎症发生过程中起重要调节作用<sup>[7]</sup>,另外在肺癌组织中大量表达<sup>[8]</sup>。PD153035是EGFR酪氨酸激酶的特异性抑制剂,能选择性地阻止EGF介导的细胞有丝分裂、基因表达和细胞癌变<sup>[9]</sup>。

为阐明EGFR抑制剂对锌离子诱发呼吸道炎症的影响,研究者先制备大鼠呼吸道炎症模型。由于硫酸盐在细胞代谢和哺乳动物的发育过程中起重要作用,硫酸根离子维持着机体的酸碱平衡<sup>[10]</sup>,且硫酸锌是锌离子在空气颗粒物中主要的存在形式,因此研究者使用气管灌注硫酸锌的方法诱发动物的呼吸道炎症。结果显示,BALF中各指标均较对照组明显升高,以灌注8h最明显,提示硫酸锌可诱发大鼠急性呼吸道炎症。

进一步用EGFR抑制剂PD153035(溶解于DM-SO)预灌注大鼠呼吸道,并用DM-SO为对照,在灌注硫酸锌和PBS8h后观察炎症变化。研究结果显示PD153035预灌注组各炎症指标均比DM-SO预灌注组减弱,提示PD153035可明显抑制硫酸锌对大鼠呼吸道的炎性损伤作用。至于硫酸锌是通过何种机制激活EGFR以及EGFR又是通过何种机制介导硫酸锌的炎症作用,尚有待深入研究。

综上所述,呼吸道灌注硫酸锌可诱发大鼠呼吸道急性炎症,EGFR抑制剂PD153035能够有效抑制硫酸锌诱发的呼吸道急性炎症。

#### 参考文献

[1] 琴翰娇,孙景辉,王倩倩,等. 环境空气污染与儿童呼吸系

统疾病的研究[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(34): 5048

- [2] 李宁,彭晓武,张本延,等. 广州市居民呼吸系统疾病每日死亡人数与大气污染的时间序列分析[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2010, 39(6): 863
- [3] 徐磊,燕贞,吴卫东,等. 纳米氧化锌对人呼吸道上皮细胞白细胞介素-8表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2010, 45(1): 39
- [4] 龙静雯,马卓,杨旭东,等. 不同品系大鼠哮喘模型的比较[J]. 西安交通大学学报:医学版, 2009, 30(5): 550
- [5] AbiHachem RN, Zine A, Van De Water TR. The injured cochlea as a target for inflammatory processes in initiation of cell death pathways and application of related otoprotective strategies[J]. Recent Pat CNS Drug Discov, 2010, 5(2): 147
- [6] Zhang Q, Wu W, Zhang T, et al. Involvement of EGF receptor and PI3K in ICAM-1 expression in human airway epithelial cells exposed to zinc sulfate[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2008, 37(5): 552
- [7] Zhang Y, Wang L, Zhang M, et al. Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: An involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway[J]. J Cell Physiol, 2011[Epub ahead of print]
- [8] De Palma G, Mazoni P, Acanpa O, et al. Expression levels of some antioxidant and epidermal growth factor receptor genes in patients with early-stage non-small cell lung cancer[J]. J Nucleic Acids, 2010, 2010 pii 147528. Epub 2010 Mar 23
- [9] Chilin A, Conconi MT, Marzaro G, et al. Exploring epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor features: the role of fused dioxxygenated rings on the quinazoline scaffold[J]. J Med Chem, 2010, 53(4): 1862
- [10] Dawson PA. Sulfate in fetal development[J]. Semin Cell Dev Biol, 2011 Mar 17. [Epub ahead of print]

(2010-08-27收稿 责任编辑赵秋民)

## 豫医卷毛大鼠表皮生长因子受体基因的比较生物学分析\*

章金涛<sup>1)△</sup>, 张明昊<sup>2)</sup>, 王纯耀<sup>1)</sup>

1)郑州大学实验动物中心 郑州 450052 2)河南中医学院基础医学院医学实验教学中心 郑州 450008

△男, 1968年9月生, 博士, 教授, 研究方向: 分子遗传学, Email: jtzhang@zzu.edu.cn

关键词 卷毛大鼠; 表皮生长因子受体; 同源性比较

\* 国家自然科学基金资助项目 31071923; 河南省科技攻关基金资助项目 082102310061