

内毒素肺损伤小鼠肺内清道夫受体 A 表达的变化

田玉恒 徐剑铖 钱桂生 龚传明 陈维中 李淑平

【摘要】 目的 观察内毒素肺损伤发病中小鼠肺组织及肺泡巨噬细胞(AM)清道夫受体 A(SR-A)表达的变化。方法 腹腔注射内毒素脂多糖(LPS)复制小鼠急性肺损伤模型,实验分为 LPS 致伤后 0.5、1、2、4 和 8 h 组及对照组,用小鼠 AM 株 J774A.1 细胞作体外实验,分为 LPS 作用后 0.5、1、2、4 和 8 h 组及无血清培养液对照组。用免疫组化及流式细胞仪观察分析小鼠肺组织及 AM、J774A.1 细胞的 SR-A 表达及分布。结果 LPS 各组小鼠动脉血氧分压(PaO₂)均明显低于对照组,且肺湿/干重(W/D)比值明显高于对照组(*P* 均 < 0.01)。对照组小鼠肺组织除支气管上皮细胞、淋巴细胞无 SR-A 表达外,AM、肺血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肺泡上皮细胞、中性粒细胞胞膜及胞质均有 SR-A 表达。LPS 致伤后 0.5 h 即可观察到肺组织 SR-A 免疫组化染色弱于对照组,并且随着致伤时间延长,染色逐渐变浅,表明内毒素肺损伤发病中肺内 SR-A 表达减少。用 J774A.1 细胞作体外实验也发现类似结果,以 4 h 和 8 h 组降低最为显著。流式细胞仪检测 AM 及 J774A.1 细胞的 SR-A 表达与免疫组化染色结果相符,且胞膜 SR-A 下降较细胞总 SR-A 显著。结论 内毒素肺损伤小鼠肺组织及 AM 的 SR-A 表达减少,其表达变化可能与内毒素作用有关。

【关键词】 内毒素; 肺损伤,急性; 巨噬细胞; 清道夫受体 A

The expression of scavenger receptor class A in the lung in mice with acute lung injury induced by lipopolysaccharide TIAN Yu-heng, XU Jian-cheng, QIAN Gui-sheng, GONG Chuan-ming, CHNE Wei-zhong, LI Shu-ping. Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: XU Jian-cheng (Email: xu822036@sohu.com)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of scavenger receptor class A (SR-A) in lung tissue and alveolar macrophage (AM) in mice with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The model of ALI was reproduced by intraperitoneal (ip) injection of LPS (5 mg/kg), and the expression of SR-A was observed in lung tissue and AM, and the expression and distribution of J774 A.1 were also studied by using mouse macrophage line. **Results** Partial pressure of oxygen in artery (PaO₂) of lung tissue in LPS groups was significantly lower while wet/dry weight (W/D) ratio was higher than those in normal saline control group (both *P* < 0.01). SR-A was widely expressed in murine lung, including AM, pulmonary vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells, lung epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils. Immunohistochemical staining showed that, during the course of development of ALI in mice, the expression of SR-A was gradually down-regulated with the elapse of time after ip injection of LPS. The same result was seen in the isolated AM, and especially marked in group 4 hours and group 8 hours. In vitro, the expression of SR-A on J774 A.1 cells decreased was also down-regulated when treated with LPS. **Conclusion** SR-A was widely expressed in murine lung. During the course of ALI, the expression of SR-A in the murine lung and AM is down-regulated, which may be induced by LPS.

【Key words】 lipopolysaccharide; acute lung injury; macrophage; scavenger receptor class A

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是急性肺损伤(ALI)的严重阶段,其病因复杂,脓毒症是其最常见原因^[1]。清道夫受体 A(scavenger receptor class A, SR-A)是内毒素脂多糖(LPS)受体之一,目前认为,SR-A 通过结合多聚阴离子配体如 LPS 和革兰阳性菌磷壁酸在宿主防御反应中起重要作用^[2-3]。为探讨

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370631)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸病研究所

通讯作者:徐剑铖,Email: xu822036@sohu.com

作者简介:田玉恒(1976-),女(汉族),河南省人,硕士研究生(现在河南省洛阳市中心医院呼吸内科工作)。

SR-A 在 ALI 发病中的作用,本研究中采用内毒素肺损伤模型,对内毒素肺损伤小鼠肺组织及肺泡巨噬细胞(AM)的 SR-A 表达变化进行了观察。

1 材料和方法

1.1 实验材料:昆明小鼠由第三军医大学动物实验中心提供。小鼠 AM 株 J774A.1 细胞购于上海细胞生物研究所;2F8 大鼠抗小鼠 SR-A 单克隆抗体(英国 Serotec),LPS(E. coli, O111:B4, 美国 Sigma);免疫组化试剂盒及异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗大鼠 IgG 抗体购于北京中山公司;流式细胞仪(FACS, 美国 Becton Dickinson)。

1.2 模型建立及检测指标:健康昆明小鼠,雌雄不拘。按随机数字表法分组,腹腔注射 LPS 5 mg/kg,制备内毒素肺损伤模型,对照组注射等量生理盐水。于 LPS 注射后 0.5、1、2、4 和 8 h 腹腔注射盐酸氯胺酮(200 mg/kg)麻醉小鼠,取动脉血进行血气分析;取左肺,用体积分数为 10%的甲醛磷酸盐缓冲液(PBS)固定,苏木素-伊红(HE)染色后行组织病理学观察;肺组织免疫组化染色后检测 SR-A 表达;全部右肺用于检测肺湿/干重(W/D)比值。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肺组织 SR-A 的表达:用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP)进行免疫组化染色,一抗稀释度 1:400,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。显微镜下观察细胞着色,呈棕黄色者为 SR-A 阳性染色。于 10×10 倍显微镜下每张切片随机选取 2 个视野,用 Tiger920 图像分析仪进行分析,以积分吸光度(A)值表示 SR-A 表达的相对强度。

1.3.2 AM 中 SR-A 的表达:用黏附法分离纯化 AM,SP 法行免疫组化染色,一抗稀释度 1:400, DAB 显色,显微镜下观察。

1.3.3 FACS 分析 AM 细胞膜及细胞总 SR-A 的表达:分离每组小鼠的 AM 并合并。制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10⁹/L,离心弃上清液,加入 100 μl FACS 缓冲液(体积分数为 0.1%的牛血清白蛋白及 1%的羊血清,质量分数为 0.1%的叠氮钠及 0.1 mol/L PBS)重悬细胞;加 1:50 一抗 100 μl (终浓度为 10 g/L),4 ℃ 孵育,缓冲液离心洗涤;加 FITC 标记的二抗(1:100)100 μl 孵育,离心洗涤。加适量缓冲液上机计数 1×10⁵ 个细胞。测定阳性细胞数及其平均荧光强度,进行数据分析。

1.3.4 LPS 对 J774A.1 细胞 SR-A 表达的影响:各实验组加 LPS,对照组加无血清培养液,每组设 4 个复孔。细胞免疫组化染色观察 LPS 对 J774A.1 细胞 SR-A 表达的影响,FACS 分析。以上步骤同 AM 细胞膜及细胞总 SR-A 表达分析方法。

1.4 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动脉血氧分压(PaO₂)的变化(表 1):LPS 致伤后各组小鼠 PaO₂ 均较对照组明显降低,且 LPS 作用时间越长,PaO₂ 越低(P 均<0.01)。

2.2 肺 W/D 比值的变化(表 1):LPS 各组肺 W/D 比值均显著高于对照组(P 均<0.01),且作用时间越长比值越高,但 LPS 各组间无明显差异。

表 1 LPS 对小鼠 PaO₂、肺 W/D 比值及肺组织 SR-A 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	PaO ₂ (mm Hg)	W/D 比值	SR-A 表达(A 值)
对照组	8	121.43 ± 9.10	1.79 ± 0.12	0.44 ± 0.05
LPS 0.5 h 组	8	87.82 ± 8.20 ^a	2.96 ± 0.14 ^a	0.38 ± 0.04 ^a
LPS 1 h 组	8	75.56 ± 7.14 ^a	3.05 ± 0.13 ^a	0.36 ± 0.06 ^a
LPS 2 h 组	8	74.06 ± 5.71 ^a	3.10 ± 0.33 ^a	0.30 ± 0.02 ^{ab}
LPS 4 h 组	8	69.17 ± 10.22 ^a	3.17 ± 0.49 ^a	0.29 ± 0.04 ^{ab}
LPS 8 h 组	8	63.38 ± 9.62 ^a	3.41 ± 0.19 ^a	0.28 ± 0.08 ^{ab}

注:与对照组比较,^aP<0.01;与 LPS 1 h 组比较,^bP<0.05; 1 mm Hg=0.133 kPa

2.3 肺组织病理学变化(彩色插页图 1,图 2):LPS 各组小鼠肺脏均有不同程度肿胀,表面可见暗红色点状病灶,切面可有淡红或白色泡沫样液体溢出,光镜下可见肺间质炎性细胞浸润、出血,肺间质增厚;肺泡结构破坏,肺泡腔内炎性细胞浸润和大量均质红染样渗出物,可见局灶性肺不张及肺气肿,肺微血管充血。而对照组未见上述改变。

2.4 小鼠肺组织 SR-A 表达(彩色插页图 3,图 4):除支气管上皮细胞、淋巴细胞外,SR-A 在 AM、肺血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肺泡上皮细胞、中性粒细胞胞膜及胞质上均有表达;对照组表达较强。LPS 各组 SR-A 免疫组化染色弱于对照组,且 SR-A 积分 A 值显著低于对照组,2、4 和 8 h 组又显著低于 1 h 组(P 均<0.05)。

2.5 小鼠 AM 中 SR-A 表达(彩色插页图 5,图 6):对照组 AM 胞膜及胞质中均可见棕黄色染色,LPS 各组染色较浅,且随 LPS 作用时间延长逐渐变浅,表明 SR-A 表达逐渐下降。

2.6 FACS 分析 AM 细胞膜及细胞总 SR-A 表达(表 2):通过测定平均荧光强度分析 AM 细胞膜及细胞总 SR-A 表达,结果提示,对照组 AM 的 SR-A 表达高于 LPS 各组,尤以细胞膜 SR-A 的表达最为显著;LPS 致伤后 AM 表达 SR-A 有下降趋势,且细胞膜 SR-A 表达下降较显著。

表 2 小鼠 AM 细胞膜及细胞总 SR-A 表达的变化

组别	SR-A 表达(荧光强度)		细胞膜/总量 (%)
	细胞膜	总量	
对照组	66.62	67.52	98.67
LPS 0.5 h 组	30.56	66.97	45.63
LPS 1 h 组	28.26	66.32	42.61
LPS 2 h 组	22.43	55.79	40.20
LPS 4 h 组	20.26	52.72	38.42
LPS 8 h 组	18.05	50.23	35.93

2.7 免疫组化染色观察 J774A.1 细胞 SR-A 表达的变化(彩色插页图 7,图 8):J774A.1 细胞的细胞

膜及胞质均可见棕黄色染色,无血清培养液对照组染色较深。LPS 作用后 J774A.1 细胞 SR-A 表达低于对照组,以 LPS 4 h 和 8 h 组表达最低。

2.8 FACS 分析 J774A.1 细胞 SR-A 表达的变化(表 3):通过测定平均荧光强度分析 J774A.1 细胞膜及细胞总 SR-A 的表达,结果表明,无血清培养液对照组 J774A.1 细胞 SR-A 的表达高于 LPS 各组;随着 LPS 作用时间的延长,J774A.1 细胞膜 SR-A 的表达下降较明显。

表 3 LPS 作用后 J774A.1 细胞 SR-A 表达的变化

组别	SR-A 表达(荧光强度)		细胞膜/总量 (%)
	细胞膜	总量	
无血清培养液对照组	57.89	62.48	92.65
LPS 0.5 h 组	29.83	60.79	49.07
LPS 1 h 组	26.14	57.37	45.56
LPS 2 h 组	35.23	53.89	65.37
LPS 4 h 组	25.68	48.72	52.71
LPS 8 h 组	0.47	36.22	1.29

3 讨论

严重感染是 ALI/ARDS 最常见的原因之一^[4]。已证明,SR-A 主要存在于不同组织和器官的 AM 上,包括肝脏、肺脏、脾脏的红髓及边缘区域,胸腺的皮质以及髓质,心脏、睾丸及淋巴结的 AM,而且细胞 SR-A 表达与物种有关^[5]。SR-A 是一个多功能受体,其功能涉及 AM 生长、维持、黏附、吞噬、宿主防御及细胞间的相互作用,SR-A 的广泛分布可能与其所具有的多种功能有关^[4]。本实验显示,小鼠肺组织中 SR-A 表达较广泛,除支气管上皮细胞、淋巴细胞无表达外,AM、肺血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肺泡上皮细胞、中性粒细胞胞膜及胞质均有表达。LPS 作用 0.5 h 即可观察到肺组织 SR-A 免疫组化染色弱于对照组,且随致伤时间延长染色逐渐变浅。分离 AM 进行细胞免疫组化染色及用 AM 株 J774A.1 细胞进行体外研究结果均类似。FACS 分析各组小鼠 AM 及 J774A.1 细胞 SR-A 表达发现,LPS 各组 AM 及 J774A.1 细胞的平均荧光强度均低于对照组,并随着 LPS 作用时间延长,荧光强度呈逐渐减弱趋势,说明 LPS 作用后小鼠肺组织、AM 及 J774A.1 细胞 SR-A 表达均减少。

Van Lenten 等^[6]发现,1 ng/ml (1 μg/L) LPS 即可抑制培养的人 AM 中 SR-A 的表达与活性。Roselaar 等^[7]观察发现注射 LPS 2 h 后,肝内 SR-A mRNA 下降了 74%,作者认为 LPS 可以在体内从转录水平下调 SR-A 表达。Brown 等^[8]发现,LPS 对

I 型 SR 的下调能被放线菌酮抑制,故认为 LPS 对 I 型 SR 的下调是具有蛋白合成依赖性的。目前认为 LPS 对 SR-A 的下调作用受到转录及转录后水平的调节。本实验中测定 AM 及 J774A.1 细胞膜及细胞总 SR-A 表达,通过计算胞膜表达与细胞总 SR-A 表达量的百分比发现,给予 LPS 刺激后,胞膜 SR-A 下降比细胞总 SR-A 下降显著。此现象可能是由于 SR-A 结合 LPS 后通过胞膜内陷,膜上 SR-A 向细胞内转移,导致细胞膜 SR-A 减少。

根据本实验结果并结合文献^[6-9]的报道,分析 LPS 组 SR-A 表达降低的可能原因:LPS 从转录及转录后水平下调 SR-A 的表达;SR-A 结合 LPS 后,通过胞膜内陷,将 SR-A 内吞并转移至溶酶体内进行降解,导致细胞膜上的 SR-A 减少,而 SR-A 进入细胞内的去向则有待进一步研究。SR-A 进入细胞内的调控机制及其具体循环、代谢路径目前尚无报道,转移入细胞内的 SR-A 可否重新转运至细胞膜上,再次结合 LPS 进入下一轮的循环尚不清楚。

参考文献

- [1] 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(12): 706-710.
- [2] 鄢小建, 姚咏明. 细菌内毒素受体研究新进展[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(6): 375-378.
- [3] Peiser L, Gough P J, Kodama T, et al. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of Escherichia coli: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro[J]. Infect Immun, 2000, 68(4): 1953-1963.
- [4] 樊毫军, 刘书盈, 张健鹏, 等. 静脉注射内毒素致大鼠急性肺损伤模型的病理生理学指标评价[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8): 485-487.
- [5] Platt N, Haworth R, Darley L, et al. The many roles of the class A macrophage scavenger receptor [J]. Int Rev Cytol, 2002, 212: 1-40.
- [6] Van Lenten B J, Fogelman A M, Seager J, et al. Bacterial endotoxin selectively prevents the expression of scavenger-receptor activity on human monocyte-macrophages [J]. J Immunol, 1985, 134(6): 3718-3721.
- [7] Roselaar S E, Daugherty A. Lipopolysaccharide decreases scavenger receptor mRNA in vivo[J]. J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(9): 573-579.
- [8] Brown M S, Goldstein J L, Krieger M, et al. Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins [J]. J Cell Biol, 1979, 82(3): 597-613.
- [9] de Winther M P, van Dijk K W, Havekes L M, et al. Macrophage scavenger receptor class A, a multifunctional receptor in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(2): 290-297.

(收稿日期: 2007-12-19 修回日期: 2008-01-16)

(本文编辑: 李银平)

内毒素肺损伤小鼠肺内清道夫受体A表达的变化

(正文见69页)

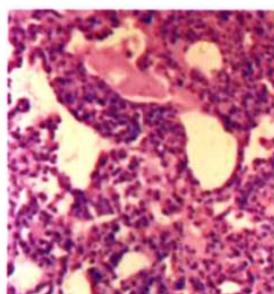


图1 LPS 2 h组小鼠肺组织病理学变化(HE, ×200)

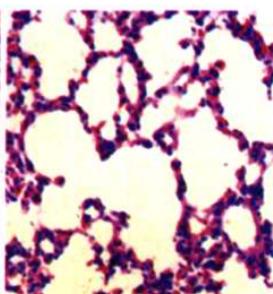


图2 LPS 4 h组小鼠肺组织病理学变化(HE, ×200)

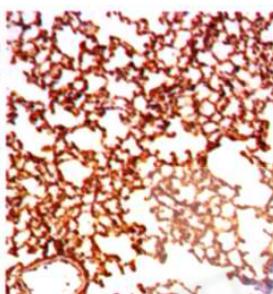


图3 对照组小鼠肺组织SR-A的表达及分布(免疫组化, ×100)

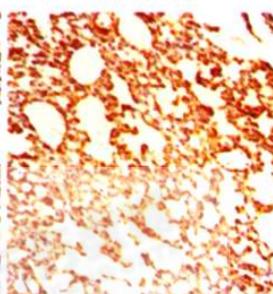


图4 LPS 2 h组小鼠肺组织SR-A的表达及分布(免疫组化, ×100)

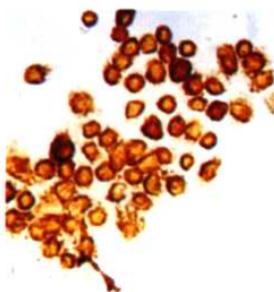


图5 对照组小鼠AM中SR-A的表达(免疫组化, ×200)



图6 LPS 2 h组小鼠AM中SR-A的表达(免疫组化, ×200)

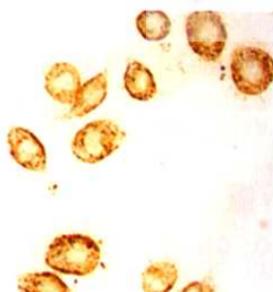


图7 无血清培养液对照组J774A.1细胞SR-A表达(免疫组化, ×200)

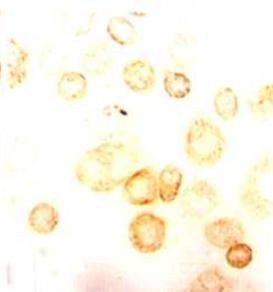


图8 LPS 4 h组J774A.1细胞SR-A表达(免疫组化, ×200)

基质金属蛋白酶-2 及其抑制物-2在高氧致慢性肺疾病新生大鼠肺组织中的动态变化及意义

(正文见72页)

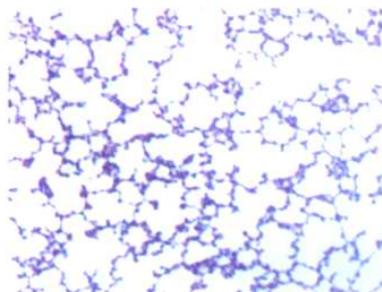


图1 空气组21 d新生大鼠肺组织病理学改变(HE, ×200)

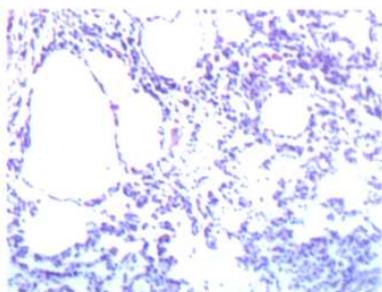


图2 高氧组21 d新生大鼠肺组织病理学改变(HE, ×200)

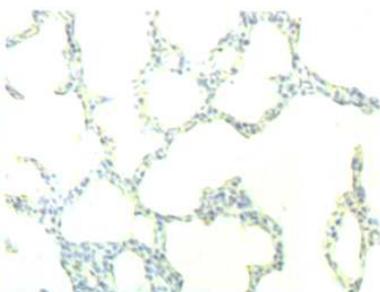


图3 空气组3 d新生大鼠肺组织MMP-2蛋白表达(免疫组化, ×400)

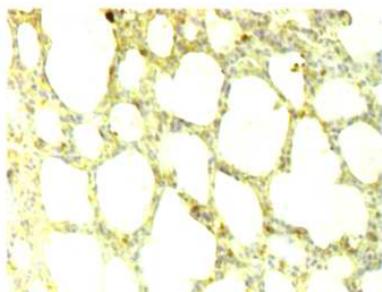


图4 高氧组3 d新生大鼠肺组织MMP-2蛋白表达(免疫组化, ×400)

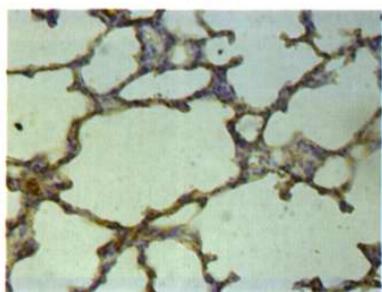


图5 空气组14 d新生大鼠肺组织MMP-2蛋白表达(免疫组化, ×400)

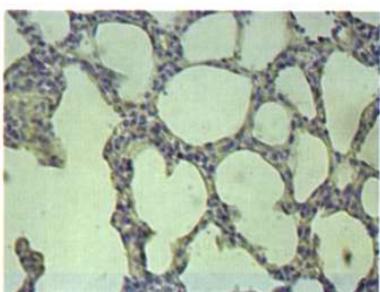


图6 高氧组14 d新生大鼠肺组织MMP-2蛋白表达(免疫组化, ×400)