

## 对白细胞介素-1 $\beta$ 激活核转录因子- $\kappa$ B 介导 A549 细胞分泌细胞间黏附分子-1 作用的研究

廖品琥 杜学柯 黄冰 姚为学 曹建

**【摘要】** 目的 研究白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )对 A549 细胞表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的诱导作用及相关细胞内信号通路的激活和转导机制。方法 以 1  $\mu$ g/L 终浓度的 IL-1 $\beta$  刺激 SC-514[核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)的 IKK-2 复合物抑制物]预处理的 A549 细胞,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 IL-1 $\beta$  刺激 5、10、30、60 min 时细胞内磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白(pI $\kappa$ B $\alpha$ )和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平;激光扫描共焦显微镜(LSCM)显像检测 NF- $\kappa$ B p65 的核转移过程;按试剂盒说明测定 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性;p65 抗体染色质免疫沉淀结合聚合酶链反应(ChIP-PCR)技术检测乙酰化组蛋白 H4 和 p65 与 ICAM-1 基因启动子的结合;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 4 h 后的 ICAM-1 mRNA 表达;酶联免疫吸附法(ELISA)检测 24 h 后细胞表面的 ICAM-1 蛋白表达。结果 IL-1 $\beta$  刺激后细胞内 pI $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平明显升高,I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平明显下降;LSCM 检测显示激活的 p65 蛋白从胞质向胞核转移,p65 与 DNA 结合活性明显升高( $P < 0.01$ )。ChIP-PCR 扩增发现,IL-1 $\beta$  促使乙酰化组蛋白 H4 和 p65 与 ICAM-1 基因启动子区域的 DNA 片段结合。IL-1 $\beta$  刺激 4 h 后 ICAM-1 mRNA 表达明显升高,刺激 24 h 后 A549 细胞表面 ICAM-1 蛋白表达亦明显升高( $P$  均  $< 0.01$ )。SC-514 阻断了 pI $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的升高和 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白的下降,减少了 p65 蛋白的核转移和 DNA 结合活性;降低了 ICAM-1 的 mRNA 及蛋白表达水平( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 IL-1 $\beta$  通过激活 NF- $\kappa$ B 介导了 A549 细胞表达 ICAM-1。

**【关键词】** 细胞间黏附分子-1; 核转录因子- $\kappa$ B; 白细胞介素-1 $\beta$

**Effect of activation of nuclear factor- $\kappa$ B on modulation of secretion of intercellular adhesion molecule-1 by A549 cell** LIAO Pin-hu\*, DU Xue-ke, HUANG Bing, YAO Wei-xue, CAO Jian. \* Coronary Care Unit, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression on A549 cell and underlying signal transduction pathways. **Methods** A549 cells were pre-incubated with SC-514 [nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) inhibitor (I $\kappa$ B) kinase-2 (IKK-2) inhibitor] and/or pre-treated with 1  $\mu$ g/L IL-1 $\beta$ . The phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (pI $\kappa$ B $\alpha$ ) and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  were determined by Western blotting with specific antibody at 5, 10, 30 and 60 minutes. Laser scanning confocal microscope (LSCM) was used to examine the nuclear translocation of p65 at 30 minutes after stimulation. The DNA binding activity of p65 in nuclear extracts was detected at 1 hour following IL-1 $\beta$  treatment. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays combined with polymerase chain reaction (PCR) were used to evaluate interaction between p65 and ICAM-1 promoter site DNA at 1 hour after stimulation. The expression of ICAM-1 mRNA was assessed by reverse transcription (RT)-PCR at 4 hours, and the ICAM-1 expression on A549 cell surface was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) at 24 hours after IL-1 $\beta$  was added. **Results** IL-1 $\beta$  induced rapid pI $\kappa$ B $\alpha$  augmentation and its subsequent degradation. LSCM graphs showed that IL-1 $\beta$  stimulated the translocation of p65 from the cytosol to the nucleus. IL-1 $\beta$  significantly increased the DNA binding ability of p65 ( $P < 0.01$ ) in cell nuclear extracts. ChIP-PCR suggested that both acetylated histone 4 and p65 were recruited to ICAM-1 promoter. IL-1 $\beta$  significantly augmented ICAM-1 mRNA level at 4 hours and expression of ICAM-1 on A549 cell surface at 24 hours (both  $P < 0.01$ ). The IKK-2 inhibitor, SC-514, inhibited IL-1 $\beta$  induced I $\kappa$ B $\alpha$  protein activity, blocked p65 nuclear translocation, caused a significant reduction in IL-1 $\beta$  induced DNA binding activity for p65 and ICAM-1 mRNA expression, and suppressed ICAM-1 expression on A549 cell surface (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** These results suggest that the activation of NF- $\kappa$ B mediates IL-1 $\beta$  induced ICAM-1 expression in A549 cells.

**【Key words】** intercellular adhesion molecule-1; nuclear factor- $\kappa$ B; interleukin-1 $\beta$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.007

基金项目:广西省科技厅留学回国人员基金项目(桂科回 0236009)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院 CCU(廖品琥);广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科(杜学柯、黄冰、姚为学、曹建)

Email:liaopinhu@gmail.com

已知细胞黏附分子家族中的细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)参与了肺内多形核细胞(PMN)对内皮细胞的黏附、跨越血管内皮、选择性募集于肺内病理损伤组织、激活及释放炎症介质导致肺损伤的过程<sup>[1]</sup>。

既往的研究主要集中于内皮细胞及其表达的可溶性 ICAM-1<sup>[2-3]</sup>,而对肺上皮细胞表面表达 ICAM-1 及其信号转导途径和机制以及是否参与肺泡内 PMN 滞留过程等尚未明确。本研究中采用白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )刺激 A549 细胞,以核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)转导通路抑制物,探讨参与 ICAM-1 在肺上皮细胞表达的信号转导途径及其机制。

## 1 材料与与方法

**1.1 实验材料:**A549 细胞购自欧洲细胞培养保藏中心(英国), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、DMEM 培养基(Sigma, 美国),胎牛血清(FBS, Invitrogen, 美国),人 IL-1 $\beta$ (Roche, 英国),磷酸化 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (pI $\kappa$ B $\alpha$ )和 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体(Cell Signaling, 美国),I $\kappa$ B 激酶(IKK-2)复合物抑制物(SC-514, Merck, 英国),兔抗人 p65 多克隆抗体(多抗, Santa Cruz, 美国),ICAM-1 抗体(R&D, 美国),乙酰化组蛋白 H4 抗体(Upstate, 美国),核蛋白抽提试剂盒、染色质免疫沉淀(ChIP)试剂盒、NF- $\kappa$ B DNA 结合活性试剂盒(Active Motif, 美国)。

**1.2 A549 细胞的培养、干预与收集:**将 A549 细胞培养于含 FBS、青霉素和链霉素的 DMEM 培养液中。按照随机数字表法分为 A549 细胞组(A 组)、SC-514 组(B 组)、A549 细胞 + IL-1 $\beta$  组(C 组)、A549 细胞 + SC-514 + IL-1 $\beta$  组(D 组)。A 组加入 100  $\mu$ l 含体积分数为 10% 的血清培养液;B 组加入终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的 SC-514;C 组加入终浓度为 1  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$  培养液;D 组先加入 SC-514 预处理细胞 2 h,然后再加入 1  $\mu$ g/L 的 IL-1 $\beta$  培养液。于培养 5、10、30、60 min 用细胞裂解缓冲液收集细胞,检测细胞内 pI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平;1 h 后抽提细胞核蛋白,进行 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性分析;1 h 后用甲醛水溶液固定细胞后,分离和破碎染色质用于染色质免疫沉淀分析;4 h 后用 TRIzol 法分别收集细胞,提取 RNA 及转录;24 h 后用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞表面的 ICAM-1 蛋白表达。

**1.3 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测细胞内 pI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达:**20  $\mu$ g 的样本蛋白装胶,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜后室温封闭 1 h,加入一抗后 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温下孵育 1 h,用免疫荧光化学法(ECL)发光剂显示蛋白条带,高敏 X 线片曝光显像。

**1.4 NF- $\kappa$ B 的激活:**将 A549 细胞种植在玻片上,加 IL-1 $\beta$  30 min,取出用 1:1 的甲醇和丙酮-20  $^{\circ}$ C

下固定 10 min,室温下干燥;浸于乙基苯基聚乙二醇中 10 min,用含人白蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS)孵育 1 h;将玻片孵育在含兔抗人 p65 多抗的 PBS 中,湿盒内 4  $^{\circ}$ C 过夜,洗涤玻片,加绿色荧光标记的抗兔多抗孵育 1 h,避光;1:1 000 的 4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)核染色 3 min,假思蓝胞质染色 1 min,避光保存玻片。使用激光扫描共焦显微镜(LSCM)对玻片进行扫描和摄像。

**1.5 NF- $\kappa$ B DNA 结合活性分析:**按试剂盒要求操作,抽提核蛋白中的 DNA 进行结合活性分析,测定波长 405 nm 处的吸收峰吸光度(A)值。

**1.6 ChIP 分析:**按 ChIP 试剂盒操作指南进行染色质的分离和破碎,将 p65 抗体和乙酰化组蛋白 H4 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,完成特定染色质片段的免疫沉淀,靶标 DNA 洗脱后,实时聚合酶链反应(PCR)检测 ICAM-1 启动子上 NF- $\kappa$ B 结合位点 GGGGCA TCCC,使用的引物序列为:5'-GCTAGGTGTGG ACGTGACCT-3'和 5'-TACGCAGGCCTCTTTAA TCG-3'。结果以 H4 与 p65 表达量占总 DNA 量的相对比值表示。

**1.7 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 ICAM-1 mRNA 表达:**将 1  $\mu$ g 的 RNA 反转录后,使用 PCR 仪进行基因表达分析。ICAM-1 引物的核酸序列号为 NM\_000201,引物序列:5'-GGCTGGAGCTG TTTGAGAAC-3'和 5'-CTGACAAGTTGTGGGG GAGT-3';三磷酸甘油酯脱氢酶(GAPDH)引物的核酸序列号为 NM\_002046,引物序列:5'-ACA GTCAGCCGCATCTTCTT-3'和 5'-TTGACTCCG ACCTTCACCTT-3'。通过 In Silico 和 NetPrimer 程序对引物进行分析,引物的结构无单核苷酸多态性(SNP)及发夹(Hairpins)结构。

**1.8 ICAM-1 蛋白表达:**PBS 清洗细胞后,用鼠抗人 ICAM-1 抗体与细胞表面表达的 ICAM-1 进行结合,随后采用抗鼠酶标抗体与 ICAM-1 抗体结合,加底物催化显色,反应颜色的深浅与细胞表面表达 ICAM-1 的量直接相关。

**1.9 统计学处理:**计量数据以均数士标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间比较采用 one-way ANOVA 方差分析和 *q* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Western blotting 检测 pI $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达(图 1):**IL-1 $\beta$  刺激后 60 min 内细胞内的 pI $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达水平明显升高,相应的 I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白表达出现明显

降低,均以 5~30 min 最为明显。SC-514 阻断了 pIκBα 表达的升高和 IκBα 的降低。

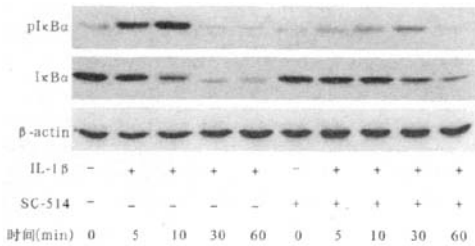
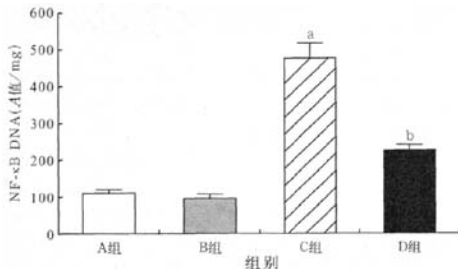


图 1 IL-1β 和 SC-514 对细胞内 pIκBα 和 IκBα 蛋白表达的影响

2.2 LSCM 显像结果(彩色插图页 2):细胞在未受刺激时, p65 蛋白(绿荧光染色)主要位于胞质内; IL-1β 刺激后 30 min 内, 激活的 p65 蛋白由胞质转移至胞核内; SC-514 抑制了 p65 蛋白的核转移。

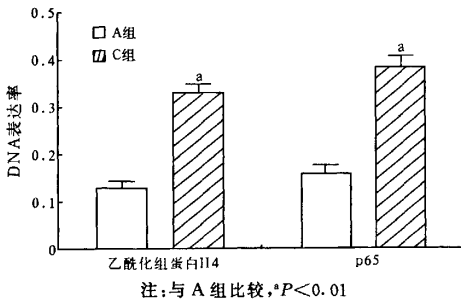
2.3 NF-κB DNA 结合活性(图 3): IL-1β 刺激后 60 min 内, 细胞核 p65 DNA 结合活性明显升高 ( $P < 0.01$ ); SC-514 预处理可明显降低 NF-κB DNA 结合活性 ( $P < 0.01$ )。



注:与 A、B 组比较,  $*P < 0.01$ ; 与 C 组比较,  $^bP < 0.01$

图 3 IL-1β 和 SC-514 对 NF-κB DNA 结合活性的影响

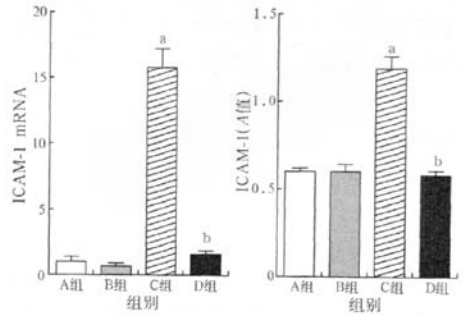
2.4 ChIP-PCR 分析结果(图 4): IL-1β 刺激乙酰化组蛋白 H4 和 p65 与 ICAM-1 启动子区域的特定 DNA 序列结合 ( $P$  均  $< 0.01$ )。



注:与 A 组比较,  $*P < 0.01$

图 4 IL-1β 对乙酰化组蛋白 H4 和 p65 与 ICAM-1 启动子结合的影响

2.5 ICAM-1 的 mRNA 和蛋白表达结果(图 5): IL-1β 刺激后 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达均明显升高; SC-514 预处理降低了 ICAM-1 mRNA 和蛋白的表达水平 ( $P$  均  $< 0.01$ )。



注:与 A 组比较,  $*P < 0.01$ ; 与 C 组比较,  $^bP < 0.01$

图 5 IL-1β 和 SC-514 对 IL-1β 刺激后 24 h ICAM-1 mRNA 及蛋白表达水平的影响

### 3 讨论

在创伤、感染、理化刺激、体外循环等诱因作用下,细胞黏附分子参与了 PMN 在肺毛细血管内的聚集、附壁移行、渗透至肺泡腔的过程。ICAM-1 在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)过程中具有重要的作用<sup>[1,4]</sup>。虽然肺泡灌洗液或血清中可溶性 ICAM-1 水平升高<sup>[3-4]</sup>,但内皮细胞表面表达的 ICAM-1 在 PMN 移行渗透过程中起主要作用<sup>[1]</sup>。肺内的内皮细胞、上皮细胞及巨噬细胞受刺激后释放 IL-1、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等促使 PMN 在肺内趋化和聚集,参与了 ALI 的发生<sup>[5]</sup>。ICAM-1 在肺泡上皮细胞的表达及其信号转导机制以及在肺(泡)内 PMN“扣押”过程中的作用尚未明确。既往研究表明, ICAM-1 的表达主要与丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)和 NF-κB 激活有关,由于实验条件不同,参与调节 ICAM-1 表达的主要信号转导通路也不同或有明显差异<sup>[6-8]</sup>。NF-κB 是细胞内重要的核转录因子,激活后能启动多种细胞分子(如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8)和黏附分子(如 ICAM-1)的基因转录<sup>[9]</sup>。NF-κB 在 ALI 的肺组织中表达升高<sup>[10]</sup>,参与 ALI 发生的细胞因子和黏附分子包括 TNF-α、IL-1β、IL-2、IL-6、ICAM-1、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等,构成了主要的肺内炎症反应的细胞因子网络<sup>[11-12]</sup>。这些基因的基因启动子区域均含有 NF-κB 的固定核苷酸 κB 序列, NF-κB 活化后和 κB 序列的 DNA 结合,启动了基因的转录和表达<sup>[13]</sup>。在 ICAM-1 基因的 5'-调节区,有与转录因子

特殊蛋白 1(SP-1)、活化蛋白-1(AP-1)、NF-κB 结合的特异 DNA 序列,是 ICAM-1 表达的基因学基础<sup>[14]</sup>。但是,在 ICAM-1 基因转录时,ICAM-1 基因启动子区域的乙酰化改变情况及 NF-κB 是否在启动子区域的募集等尚无文献报道。

本研究结果显示,A549 细胞经 IL-1β 刺激后,细胞内的 pIκBa 表达水平明显升高,IκBa 降解,表明 NF-κB 三聚体复合物降解,使 p65 蛋白从 NF-κB 三聚体复合物中解离出来;LSCM 检测显示了 p65 从胞质向胞核转移的过程;入核的 p65 与 DNA 结合活性明显升高,提示激活的 p65 能与细胞核 DNA 相应位点结合。组蛋白的乙酰化可引起染色质重构及转录活化<sup>[15]</sup>,IL-1β 的刺激促使 ICAM-1 启动子区域组蛋白 H4 的乙酰化水平明显升高,p65 明显被募集于 ICAM-1 启动子区域与特定 DNA 序列结合。ICAM-1 mRNA 及蛋白表达水平的提高是基因转录表达的结果。用 SC-514 阻断 NF-κB 的激活,能完全阻断以上所有的效应,显示 NF-κB 是 IL-1β 诱导和 ICAM-1 表达之间的中间环节,同时也是启动炎症细胞因子基因转录的主要环节,激活的 NF-κB 介导了 IL-1β 诱导的 ICAM-1 mRNA 和蛋白表达。本研究结果提示,IL-1β 对 A549 细胞的刺激,通过激活 NF-κB 介导了 A549 细胞分泌 ICAM-1。

**参考文献**

[1] 季宪飞,黄亮. 细胞黏附分子与急性肺损伤. 中国危重病急救医学,2004,16(7):444-446.  
 [2] Müller AM,Hermanns MI,Cronen C,et al. Comparative study of adhesion molecule expression in cultured human macro- and microvascular endothelial cells. Exp Mol Pathol,2002,73(3):171-180.  
 [3] Agouridakis P,Kyriakou D,Alexandrakis MG,et al. The predictive role of serum and bronchoalveolar lavage cytokines and adhesion molecules for acute respiratory distress syndrome development and outcome. Respir Res,2002,3:25.

[4] Cepkova M,Brady S,Sapru A,et al. Biological markers of lung injury before and after the institution of positive pressure ventilation in patients with acute lung injury. Crit Care,2006,10(5):R126.  
 [5] 孙中吉,卢青,李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质. 中国危重病急救医学,2003,15(3):186-189.  
 [6] Lin CC, Lee CW, Chu TH, et al. Transactivation of Src, PDGF receptor, and Akt is involved in IL-1beta-induced ICAM-1 expression in A549 cells. J Cell Physiol, 2007, 211(3):771-780.  
 [7] Lin FS, Lin CC, Chien CS, et al. Involvement of p42/p44 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced ICAM-1 expression in human pulmonary epithelial cells. J Cell Physiol, 2005,202(2):464-473.  
 [8] Holden NS, Catley MC, Cambridge LM, et al. ICAM-1 expression is highly NF-kappa B-dependent in A549 cells, no role for ERK and p38 MAPK. Eur J Biochem, 2004, 271(4):785-791.  
 [9] Tian B, Brasier AR. Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. Recent Prog Horm Res, 2003, 58:95-130.  
 [10] 刘明伟,安明顺. 三七总皂苷对急性坏死性胰腺炎大鼠肺组织核转录因子-κB 活性及肺损伤的影响. 中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):58-60.  
 [11] Pinhu L, Whitehead T, Evans T, et al. Ventilator-associated lung injury. Lancet, 2003, 361(9354):332-340.  
 [12] Grigoryev DN, Finigan JH, Hassoun P, et al. Science review: searching for gene candidates in acute lung injury. Crit Care, 2004, 8(6):440-447.  
 [13] 张秋金,沈洪,张维,等. 纳洛酮与甲基泼尼松龙联用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子-κB 表达的影响. 中国危重病急救医学,2005,17(6):370-372.  
 [14] Voraberger G, Schäfer R, Stratowa C. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region, induction by cytokines and phorbol ester. J Immunol, 1991, 147(8):2777-2786.  
 [15] Eberharther A, Ferreira R, Becker P. Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. Biol Chem, 2005, 386(8):745-751.

(收稿日期:2008-12-26 修回日期:2009-01-20)

(本文编辑:李银平)

**• 科研新闻速递 •**

**抗利尿激素与感染、严重脓毒症及感染性休克的关系**

奥地利科研人员研究了感染、严重脓毒症及感染性休克患者血清抗利尿激素(AVP)水平的变化。采用前瞻性队列研究方法,纳入 10 例感染、22 例严重脓毒症及 28 例感染性休克患者。每日记录血流动力学、实验室及临床数据,同时检测血清 AVP 水平的变化。采用线性回归进行统计分析。结果显示:感染组、严重脓毒症组及感染性休克组患者血清 AVP 水平差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),后两组血清 AVP 水平明显高于感染组( $P$  均  $< 0.001$ ),而严重脓毒症组及感染性休克组间差异无统计学意义( $P = 0.98$ )。严重脓毒症患者血浆渗透压( $P < 0.001$ )、pH 值( $P = 0.001$ )、乳酸浓度( $P < 0.001$ )及动脉血氧分压( $P = 0.04$ )与血清 AVP 水平相关;感染性休克患者血浆渗透压也与血清 AVP 水平相关( $P = 0.03$ )。研究还发现血清 AVP 水平受肾小球滤过功能影响( $P = 0.002$ )。研究者认为,与感染患者比较,严重脓毒症患者血清 AVP 水平变化更为明显,而在严重脓毒症和感染性休克患者间差异不显著,提示严重脓毒症时 AVP 生理作用消失,可能是导致感染性休克循环衰竭的原因之一。

白慧颖,编译自《Crit Care Med》,2008-12-26(电子版);胡森,审核

## 羟乙基淀粉130/0.4急性大容量血液稀释对脓毒症兔肺脏的影响

(正文见143页)

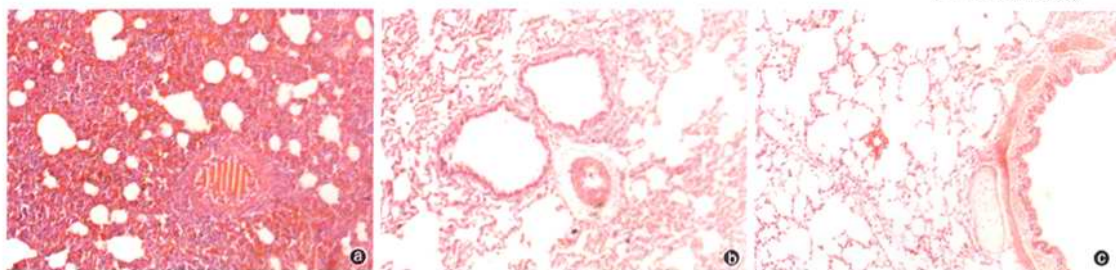


图2 光镜下观察制模后8 h大鼠肺组织病理学变化 模型组(a)肺毛细血管充血,肺泡壁破坏严重,肺泡间隔增厚,有大量炎症细胞浸润,肺间质及肺泡腔内可见渗出液,部分肺泡腔萎陷不张,肺泡腔内透明膜形成,小血管中见微血栓形成 治疗组(b)肺泡结构尚可,少数肺泡间质水肿,肺泡隔毛细血管轻度充血,间质中性粒细胞轻度浸润,组织病理学改变较模型组明显减轻 假手术组(c)呈现正常肺组织形态,结构完整,肺泡腔无渗出液,肺泡间隔无水肿和炎症 HE  $\times 100$

## 对白细胞介素-1 $\beta$ 激活核转录因子- $\kappa$ B介导A549细胞分泌细胞间黏附分子-1作用的研究

(正文见151页)

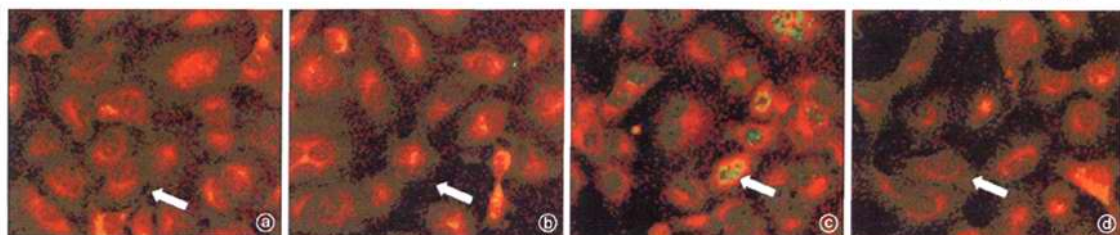


图2 LSCM下观察IL-1 $\beta$ 和SC-514对p65蛋白核转移的影响 箭头示绿色荧光染色部分为p65蛋白 A549细胞组(a), SC-514组(b)细胞未受刺激时, p65蛋白主要位于胞质内 A549细胞+IL-1 $\beta$ 组(c)IL-1 $\beta$ 干预后30 min内激活的p65蛋白由胞质转移至细胞核内 A549细胞+SC-514+IL-1 $\beta$ 组(d)SC-514抑制了p65蛋白的核转移 免疫荧光染色  $\times 200$

## 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 对血管内皮细胞通透性及细胞骨架和紧密连接形态变化的诱导作用

(正文见160页)

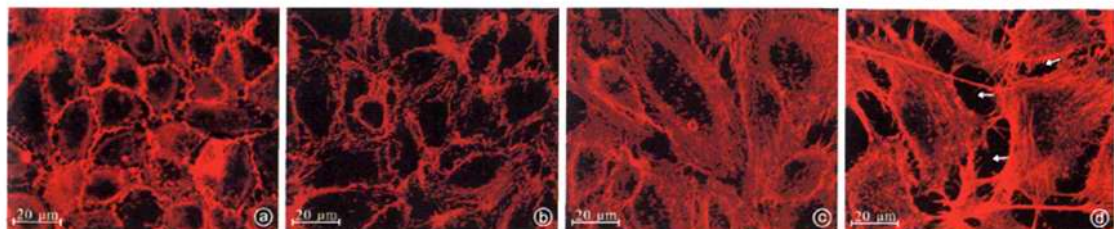


图3 镜下观察TNF- $\alpha$ 对内皮细胞肌动蛋白F-actin的作用 F-actin呈红色黄光染色 空白对照组(a)细胞间连接紧密,圆滑,未见明显缝隙形成 10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用12 h(b)时细胞边缘粗糙,不规则,纤维致密斑减少 10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用24 h(c)时胞质内应力纤维明显增多,细胞收缩,变形 20  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用24 h(d)时细胞收缩明显,外周纤维致密斑断裂,细胞间裂隙增大、增多,箭头示细胞间裂隙 免疫荧光染色  $\times 400$

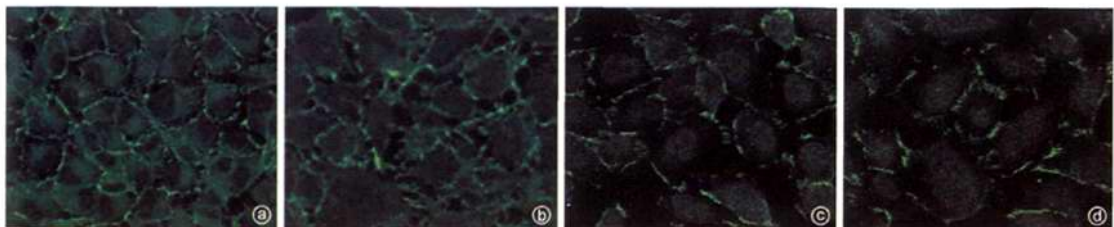


图4 镜下观察TNF- $\alpha$ 对内皮细胞紧密连接蛋白ZO-1的作用 ZO-1呈绿色黄光染色 空白对照组(a)ZO-1呈环状,线条清晰、连续、光滑 10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用12 h(b)时细胞边缘呈锯齿状,部分ZO-1环打开 10  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用24 h(c)时ZO-1环出现中断、数量减少 20  $\mu$ g/L的TNF- $\alpha$ 作用24 h(d)时ZO-1环出现明显中断、数量明显减少 免疫荧光染色  $\times 400$