

肌球蛋白轻链激酶抑制剂对急性肺损伤的保护作用

白建文 邓伟吾 章剑 许淑敏 张斗霞

【摘要】 目的 探讨肌球蛋白轻链激酶(MLCK)抑制剂 ML-7 对细菌脂多糖(LPS)诱导的人肺动脉内皮细胞(HPAEC)和急性肺损伤(ALI)的影响。方法 体外培养 HPAEC,待 4~6 代予 ML-7(10 $\mu\text{mol/L}$)孵育 60 min 后,再给予 LPS 刺激 60 min,四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 HPAEC 活性;荧光显微镜下观察磷酸化肌球蛋白轻链激酶(p-MLCK)免疫反应细胞。20 只雌性 BALB/c 小鼠随机分组,LPS 组鼻内注入 LPS (1 $\mu\text{g/g}$);ML-7 组在 LPS 滴鼻前进行 ML-7 干预。观察小鼠肺湿/干重(W/D)比值、支气管肺泡灌洗液(BALF)蛋白含量、肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性和病理学改变;用免疫组化法检测肺组织 MLCK 和 CD11b 阳性免疫反应细胞,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织 MLCK mRNA 表达,蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 MLCK 蛋白表达。结果 与 LPS 组比较,HPAEC 在 ML-7 孵育下吸光度(A)值增加($P < 0.01$),p-MLCK 免疫反应细胞明显减少($P < 0.05$),肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性、BALF 蛋白含量均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理结果显示,LPS 组小鼠肺部炎症反应明显,以中性粒细胞浸润为主,肺泡充血、水肿;ML-7 组肺部炎症及充血明显改善。免疫组化显示位于内皮的 MLCK 免疫反应细胞和位于炎性细胞的 CD11b 在 ML-7 组均较 LPS 组明显减少。ML-7 组肺组织 MLCK 的 mRNA 和蛋白表达均较 LPS 组降低(P 均 < 0.05)。结论 MLCK 特异性抑制剂 ML-7 能提高 LPS 诱导的 HPAEC 生长活性,降低 p-MLCK 表达;减轻 LPS 诱导的中性粒细胞在肺内浸润、肺水肿及 MLCK、CD11b 蛋白和 MLCK mRNA 的表达。表明抑制 MLCK 活性可能通过减弱 MLCK 磷酸化而达到稳定血管屏障功能,防治 ALI 的作用。

【关键词】 肌球蛋白轻链激酶抑制剂; 肌球蛋白轻链激酶; 急性肺损伤

Protective effect of myosin light-chain kinase inhibitor on acute lung injury BAI Jian-wen*, DENG Wei-wu, ZHANG Jian, XU Shu-min, ZHANG Dou-xia. * Department of Emergency and Intensive Critical Medicine, Dongfang Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200120, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the influence of inhibitor of myosin light-chain kinase (MLCK) on the human pulmonary arterial endothelial cell (HPAEC) challenged with lipopolysaccharide (LPS) and LPS induced of acute lung injury (ALI) in mice. **Methods** HPAECs were cultured in ECM medium and its passages 4 - 6 were used. After treatment with inhibitor of MLCK (ML-7) for 60 minutes, the HPAECs were incubated in LPS for another 60 minutes, and then cell viability was measured by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Immunofluorescence microscope was used to detect phosphorylated-MLCK (p-MLCK) immunoreactive cells. Twenty female BALB/c mice were randomly divided into two groups. The mice of LPS group were exposed to LPS (1 $\mu\text{g/g}$) through nasal instillation, and the mice of ML-7 group were pretreated with ML-7 before intranasal instillation of LPS. Wet/dry weight (W/D) ratio of lung, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) protein content, myeloperoxidase (MPO) activity and histopathological changes of lung tissue were observed. Immunohistochemistry assays were used to determine the status of MLCK and CD11b immunoreactive cells in lung tissue, and expression of MLCK mRNA in lung tissue was assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of MLCK protein in lungs was assayed by Western blotting. **Results** Compared with LPS group, increased absorbance (A) value of HPAEC was found in ML-7 group ($P < 0.01$). Immunoreactive cells of p-MLCK were more reduced in the ML-7 group ($P < 0.05$), and W/D ratio of lung, MPO activity and BALF protein content of lung tissue were decreased in ML-7 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Histological examination showed that an extensive lung inflammation was seen in mice of LPS group, with an accumulation of a large number of neutrophils, marked pulmonary edema and hemorrhage, but the inflammation and parenchymal hemorrhage was significantly alleviated in ML-7 group. Both MLCK immunoreactive cells located in endothelium and CD11b in infiltrated inflammatory cells were decreased in ML-7 group compared with those in LPS group. Compared with LPS group, MLCK mRNA and protein expressions (A) in ML-7 group were significantly decreased (both $P < 0.05$). **Conclusion** ML-7, an MLCK inhibitor, enhances activity of HPAEC induced by LPS and reduces expression of p-MLCK. It also reduces the LPS-induced infiltration of neutrophils in lung tissues, pulmonary edema and expression of MLCK and CD11b protein and MLCK mRNA in lung tissues, demonstrating that inhibition of activation of MLCK, leading to an abatement of phosphorylation of myosin light chain or MLCK, resulting in stabilization of vascular barrier function. The results suggest that MLCK has a crucial role in the pathogenesis of ALI.

【Key words】 myosin light-chain kinase inhibitor; myosin light-chain kinase; acute lung injury

内毒素性急性肺损伤(ALI)发病机制复杂,涉及不同的细胞因子和炎症介质改变。当前血管内皮细胞屏障调节的研究揭示,内皮细胞骨架在维持损害屏障的收缩力和保护屏障的细胞黏附过程中发挥基本的平衡作用。肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是依赖 Ca^{2+} /调钙蛋白的激酶,可催化调节 MLCK 磷酸化,在肌动蛋白和肌球蛋白间通过依赖三磷酸腺苷(ATP)的棘束调节细胞收缩力,证实 MLCK 信号途径可调节内皮屏障功能。本研究中采用培养人肺动脉内皮细胞(HPAEC)并给予脂多糖(LPS)或 MLCK 抑制剂 ML-7 孵育,建立 LPS 诱导的 ALI 小鼠模型,观察 ML-7 对 HPAEC 及 ALI 的作用。

1 材料与与方法

1.1 体外实验

1.1.1 HPAEC 培养:HPAEC 传至 4~6 代使用,细胞生长在含小牛血清、内皮细胞生长成分及青霉素和链霉素的完全培养基中,CO₂ 培养箱培养,隔 48 h 换液 1 次,待细胞生长至 80% 融合进行实验。

1.1.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测 HPAEC 活性:用 96 孔板,待细胞生长融合后给予 2 mg/L 的 LPS 刺激 60 min;ML-7 组细胞在 LPS 刺激前先给予 10 μmol/L 的 ML-7 室温下孵育 60 min。每孔中加入 MTT,CO₂ 孵育,吸出培养液后再加入二甲亚砜(DMSO)并振荡,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定吸光度(A)值,采用 ScanIt 软件分析数据。

1.1.3 免疫荧光染色:将细胞生长至融合的盖玻片放置湿盒中,2 mg/L 的 LPS 孵育 60 min;ML-7 组细胞先给予 10 μmol/L 的 ML-7 孵育 60 min,再予 LPS 孵育 60 min,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,甲醛水溶液固定,曲通 Triton X-100 穿透,免血清封闭,加入一抗磷酸化 MLCK(p-MLCK),PBS 清洗后加入 Texas-Red 耦联的鬼笔环肽二抗孵育,免疫染色后,荧光显微镜下观察细胞单层。

1.2 体内实验

1.2.1 动物模型制备:20 只雌性 BALB/c 小鼠,体重 18~20 g,由上海交通大学医学院动物生命科学部提供(许可证号 syxk 沪 2003-0026)。按随机数字表法分为 LPS 组和 ML-7 组,每组 10 只。鼻内注

入 LPS(1 μg/g)制备 ALI 小鼠模型^[1]。ML-7 在给予 LPS 前腹腔注射 3 mg/kg,每日 2 次,连续 2 d,并于注入 LPS 前 1 h 再次腹腔注射 ML-7 1 次。动物恢复 24 h 后麻醉取标本,检测各项指标。

1.2.2 肺水肿观察:LPS 刺激后 24 h 处死小鼠,切下全肺,PBS 冲洗后称肺湿重,50 ℃ 烘烤后称干重。计算肺湿/干重(W/D)比值以表示肺水肿形成。

1.2.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)分析:反复灌洗肺泡,取 BALF 离心,取上清液,按 Bradford 法^[2]检测 BALF 中蛋白,使用 Bio-Rad 蛋白检测试剂盒操作。取肺组织,用十六酸三甲胺溴化物(HTAB)缓冲液进行匀浆,检测髓过氧化物酶(MPO)活性^[3]。

1.2.4 肺组织病理学改变:用多聚甲醛水溶液浸泡、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察肺组织病理学变化。

1.2.5 肺组织免疫组化染色:制备肺组织石蜡切片,经乙醇脱水、PBS 洗涤、羊血清封闭,将切片与一抗(羊抗人 MLCK 多克隆抗体,1:50 稀释)和二抗(大鼠抗小鼠 CD11b 单克隆抗体,1:200 稀释)孵育过夜,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)染色后,PBS 清洗,采用图像分析系统分析结果。

1.2.6 肺组织 MLCK mRNA 检测:取肺组织,加 TRIzol 制备匀浆。按 GenBank MLCK cDNA 序列设计聚合酶链反应(PCR)引物,所有引物由上海生工公司合成。mRNA 反转录为 cDNA 条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min 和 72 ℃ 6 min,加入上、下游引物,反转录产物分别进行 36 次循环;扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,自动成像分析仪采图测定样品 A 值,三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照计算相对含量。

1.2.7 蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织 MLCK 蛋白含量:用 TRIzol 试剂盒抽提肺组织蛋白,BCA-100 蛋白检测试剂盒测定蛋白含量,自动成像分析仪采集蛋白条带图,以目的条带与 GAPDH 条带 A 值比值作为 MLCK 蛋白半定量分析表达结果。

1.3 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析,采用两独立样本 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPAEC 培养结果(表 1):MTT 检测结果显示,LPS 组和 ML-7 组体外培养 HPAEC 的 A 值比较差异有统计学意义(P<0.01)。免疫荧光染色结果(彩色插页图 1)显示,LPS 孵育后 HPAEC 的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.04.007

基金项目:上海市自然科学基金项目(03ZR14078)

作者单位:200120 上海,同济大学附属东方医院急危重病科(白建文、章剑、许淑敏、张斗霞);上海交通大学附属瑞金医院呼吸科(邓伟吾)

表 1 两组 HPAEC 检测结果及小鼠肺 W/D 比值、MPO 活性、BALF 蛋白含量及肺组织 MLCK 的 mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 动物数 | HPAEC 活性 ($\times 10^{-3}$, A 值) | p-MLCK 细胞(%) | 肺 W/D 比值 | 肺 MPO (U/mg) | BALF 蛋白 含量(mg/L) | MLCK mRNA (A 值) | MLCK 蛋白 |
|--------|-----|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| LPS 组 | 10 | 6.96 \pm 0.95 | 70.5 \pm 12.8 | 4.75 \pm 1.20 | 36.4 \pm 9.5 | 175 \pm 20 | 1.24 \pm 0.49 | 0.65 \pm 0.11 |
| ML-7 组 | 10 | 9.66 \pm 1.20 ^b | 59.4 \pm 11.6 ^a | 3.50 \pm 1.10 ^a | 28.3 \pm 7.5 ^a | 142 \pm 15 ^b | 0.82 \pm 0.38 ^a | 0.54 \pm 0.12 ^a |

注:与 LPS 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

胞质中有红色 p-MLCK 表达,ML-7 孵育后 HPAEC 中红色 p-MLCK 表达减少,两组 p-MLCK 免疫反应细胞比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 BALF 中蛋白含量(表 1):ML-7 组小鼠肺 W/D 比值、肺组织 MPO 活性及 BALF 中蛋白含量均较 LPS 组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 肺组织病理学改变:LPS 组小鼠肺组织有明显的炎症反应,表现为大量中性粒细胞聚集、明显的肺水肿和出血(彩色插页图 2)。ML-7 治疗可显著减轻肺部炎症和损伤,显示肺泡间隔水肿、增厚、出血均在 ML-7 治疗后缓解。

2.4 免疫组化检测(彩色插页图 3~4):MLCK 和 CD11b 阳性表达为胞质呈黄色染色。LPS 组小鼠肺组织 MLCK 表达上调,主要表达在肺内皮细胞、部分肺上皮细胞;CD11b 阳性主要表达在血管内炎性细胞。ML-7 组 MLCK 和 CD11b 表达均较 LPS 组明显减少。

2.5 肺组织 MLCK 的 mRNA 和蛋白表达(表 1;图 5~6):ML-7 组小鼠肺组织 MLCK 的 mRNA 和蛋白表达均明显低于 LPS 组(P 均 < 0.05)。

3 讨论

近年对 ALI 相关生物学研究显示,由于不同种族的基因差异,ALI 患者仍存在异质性^[4]。在 ALI 发生发展中内皮和上皮屏障功能障碍是关键因素,其中 MLCK 为重要靶位。MLCK 是依赖 Ca^{2+} /调钙蛋白的蛋白激酶,在 Ser-19/Thr-18 位使肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化^[5-6],具有活性的 MLCK 对炎症介质如凝血酶和组胺的反应使内皮细胞收缩并导致屏障功能障碍。其他研究也显示,非平滑肌 MLCK 同种型在细胞骨架重排、调节血管屏障功能、血管发生、内皮细胞凋亡以及白细胞渗出中起重要作用^[4],揭示 MLCK 在 ALI 中的可能机制。

虽然对 ALI 的治疗进行了大量的临床和基础研究,包括机械通气、糖皮质激素、吸入一氧化氮(NO)、表面活性物质、乌司他丁、中药制剂如生脉饮等,但有效治疗仍在不断探索中^[7-9]。本研究中重点关注 MLCK 特异性抑制剂对 ALI 的影响。ALI 涉及 MLCK 信号途径^[10-12]。本实验结果表明,LPS 使 HPAEC p-MLCK 表达增加,推测 p-MLCK 可能是 MLCK 的激活形式,而活化的 MLCK 或 Rho 激酶在 Ser-19 位磷酸化 MLC^[10],MLC 是肌球蛋白复合体的亚基,肌球蛋白复合体调控非平滑肌细胞的收缩活性。ML-7 作用于 ATP 与 MLCK 活化中心结合位点,伴随 300 nmol/L 平衡解离浓度和对其他激酶低亲和力水平($> 20 \mu\text{mol/L}$)^[12]。本研究显示 ML-7 治疗可保护小鼠防止由 LPS 诱导的中性粒细胞聚集、血浆蛋白渗漏,MLCK 在中性粒细胞聚集、MPO 活性、肺水肿以及 CD11b 蛋白的表达过程中起关键作用,表明 LPS 诱导的 MLCK 蛋白表达增加是由于 MLCK 基因转录增加所致,LPS 诱导的 MLCK mRNA 表达增加先于 MLCK 蛋白的表达,并且 MLCK 抑制剂不仅抑制 MLCK mRNA 表达也抑制 MLCK 蛋白的表达。

有研究显示,MLCK 在调节内皮屏障功能过程中发挥中心作用^[13-19]。本研究中检测了小鼠肺组织 MLCK 免疫反应细胞,结果显示 LPS 诱导的小鼠 MLCK 蛋白在肺内皮、部分肺上皮细胞表达上调。

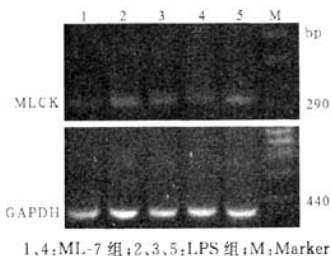


图 5 LPS 或 ML-7 对小鼠肺组织 MLCK mRNA 表达的影响

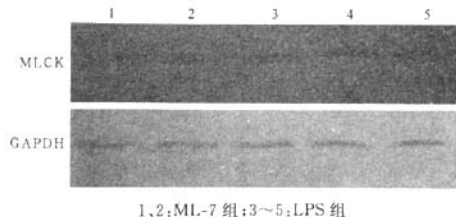


图 6 LPS 或 ML-7 对小鼠肺组织 MLCK 蛋白表达的影响

由于细胞因子释放^[19]、中性粒细胞-内皮细胞相互作用及细胞骨架的改变导致内皮通透性增加,证实肺内皮和肺上皮细胞 MLCK 被激活可导致炎症和肺损伤形成,与 Eutamene 等^[12]的研究结果一致,他们的结果揭示上皮细胞渗漏是管腔免疫细胞聚集的关键因素,选择性 MLCK 抑制剂 ML-7 减轻了由 LPS 诱导的气道上皮屏障细胞间通透性增加、中性粒细胞进入 BALF 及肺组织,证实了肺组织在炎症反应中 MLCK 控制气道上皮屏障(AEB)通透性的至关重要作用。此外,Wong 等^[5]研究显示 3 种干扰细胞因子合成的抑制剂,分别通过阻断 MLCK 活性、MLC 磷酸化和肌球蛋白 I 收缩的机制进行,ML-7 对 MLCK 的抑制以相似的方式影响细胞因子合成,揭示 ML-7 在调节细胞因子产生如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)尚有其他作用。但有研究证实,急性刺激或延长对 TNF- α 的暴露时间可有不同的方式改变人脐静脉内皮细胞(HUVEC)形态、肌动蛋白细胞骨架和紧密联结,早期反应涉及 Rho 激酶活性、MLC 磷酸化,但通透性无明显增加^[20]。也有研究显示,小鼠腹腔注射内毒素引起依赖 CD11/CD18 整合蛋白激活而导致多个核细胞汇集、经肺泡移动和呼吸“瀑布样”效应^[21]。我们发现 ML-7 可显著阻断 LPS 诱导小鼠肺血管腔增加的 CD11b 免疫反应细胞及肺组织 CD11b 阳性的中性粒细胞浸润,表明 ML-7 可抑制黏附蛋白及其配体对多个核细胞和内皮细胞的作用。

总之,目前的研究强调肺上皮和肺内皮屏障在肺损伤、肺炎反应中的重要性。MLCK 选择性抑制剂的提前治疗可以抑制通透性增加和肺组织炎症,揭示 MLCK 在 ALI 发病机制中的重要作用及 ML-7 可以作为治疗肺损伤相关的靶向药物。

参考文献

- [1] 李鹤师,白建文,林国焜,等.肌球蛋白轻链激酶在急性肺损伤模型的表达及意义.上海交通大学学报(医学版),2007,27(12):1424-1427.
- [2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [3] Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, et al. Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury. *Infect Immun*, 2005, 73(3):1754-1763.
- [4] Kamp R, Sun X, Garcia JG. Making genomics functional; deciphering the genetics of acute lung injury. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, 5(3):348-353.
- [5] Wong R, Fabian L, Forer A, et al. Phospholipase C and myosin light chain kinase inhibition define a common step in actin regulation during cytokinesis. *BMC Cell Biol*, 2007, 8:15.
- [6] Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 2006, 86(1):279-367.
- [7] 施梦,曹同瓦,白春学.急性肺损伤的药物治疗研究进展.中国危重病急救医学,2008,20(10):634-637.
- [8] 赵晓琴,吴英林,邝晓聪.乌司他丁对大鼠急性肺损伤保护作用的实验研究.中国危重病急救医学,2008,20(6):369-370.
- [9] 何新华,李春盛,桂培春.生脉饮对内毒素诱导急性肺损伤大鼠一氧化氮及其合酶的影响.中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):175-178.
- [10] Ralay Ranaivo H, Carusio N, Wangenstein R, et al. Protection against endotoxic shock as a consequence of reduced nitrosative stress in MLCK210-null mice. *Am J Pathol*, 2007, 170(2):439-446.
- [11] Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, et al. Protein kinase involved in lung injury susceptibility; evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10):6233-6238.
- [12] Eutamene H, Theodorou V, Schmidlin F, et al. LPS-induced lung inflammation is linked to increased epithelial permeability; role of MLCK. *Eur Respir J*, 2005, 25(5):789-796.
- [13] Chilcoat CD, Sharief Y, Jones SL. Tonic protein kinase A activity maintains inactive beta2 integrins in unstimulated neutrophils by reducing myosin light-chain phosphorylation; role of myosin light-chain kinase and Rho kinase. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(4):964-971.
- [14] Reynoso R, Perrin RM, Breslin JW, et al. A role for long chain myosin light chain kinase (MLCK-210) in microvascular hyperpermeability during severe burns. *Shock*, 2007, 28(5):589-595.
- [15] Gao L, Grant A, Halder I, et al. Novel polymorphisms in the myosin light chain kinase gene confer risk for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, 34(4):487-495.
- [16] Garcia JG, Verin AD, Schaphorst K, et al. Regulation of endothelial cell myosin light chain kinase by Rho, cortactin, and p60 (src). *Am J Physiol*, 1999, 276(6 Pt 1):L989-998.
- [17] Petrache I, Verin AD, Crow MT, et al. Differential effect of MLC kinase in TNF- α -induced endothelial cell apoptosis and barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280(6):L1168-1178.
- [18] Petrache I, Birukov K, Zaiman AL, et al. Caspase-dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved in TNF- α -mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J*, 2003, 17(3):407-416.
- [19] Essler M, Staddon JM, Weber PC, et al. Cyclic AMP blocks bacterial lipopolysaccharide-induced myosin light chain phosphorylation in endothelial cells through inhibition of Rho/Rho kinase signalling. *J Immunol*, 2000, 164(12):6543-6549.
- [20] McKenzie JA, Ridley AJ. Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF- α -induced changes in endothelial morphology and permeability. *J Cell Physiol*, 2007, 213(1):221-228.
- [21] Ong ES, Gao XP, Xu N, et al. E. coli pneumonia induces CD18-independent airway neutrophil migration in the absence of increased lung vascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 285(4):L879-888.

(收稿日期:2009-01-06 修回日期:2009-02-13)

/(本文编辑:李银平)

肌球蛋白轻链激酶抑制剂对急性肺损伤的保护作用

(正文见215页)

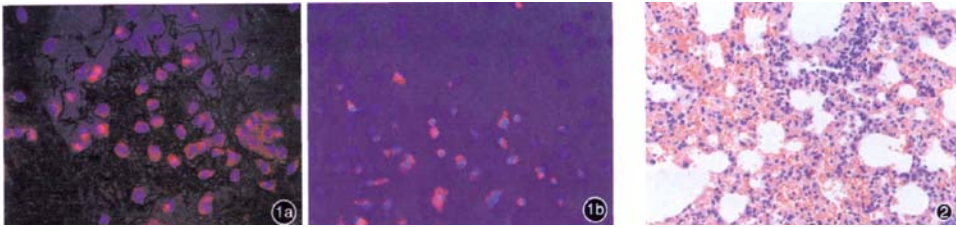


图1 荧光显微镜下观察LPS孵育HPAC (a)后p-MLCK在胞质呈红色染色; ML-7孵育HPAC (b)后p-MLCK表达减少 免疫荧光染色 $\times 400$ 图2 显微镜下观察LPS组小鼠肺组织有大量中性粒细胞聚集, 肺水肿和出血明显 HE $\times 100$

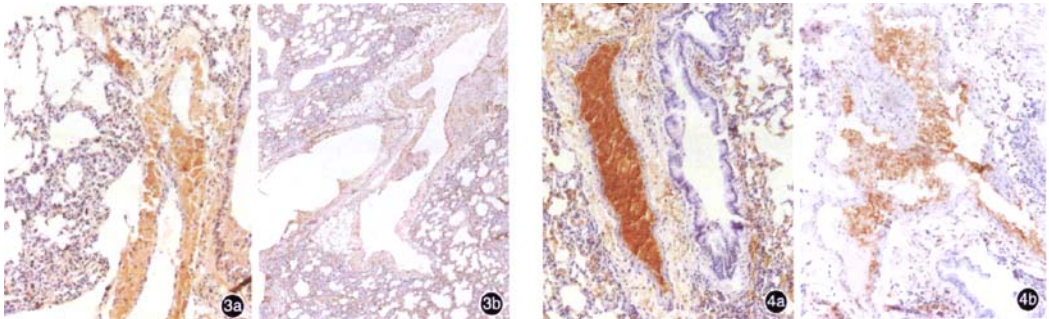


图3 光镜下观察小鼠肺组织MLCK阳性表达, 胞质呈黄色 LPS组(a)MLCK表达上调, 位于肺内皮和上皮细胞; ML-7组(b)MLCK阳性表达较LPS组明显减少 免疫组化 $\times 100$ 图4 光镜下观察小鼠肺组织CD11b阳性表达, 胞质呈黄色 LPS组(a)CD11b阳性表达位于血管内炎性细胞; ML-7组(b)CD11b阳性表达较LPS组明显减少 免疫组化 $\times 100$

胰岛素样生长因子1对全氟异丁烯吸入性肺损伤小鼠防护作用的研究

(正文见219页)

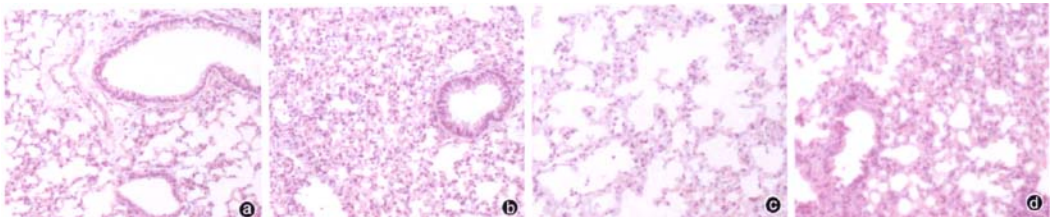


图1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 正常对照组(a)肺组织结构清晰, 可见细支气管和肺泡组织, 肺空泡变, 肺泡壁与肺间质内未见炎性细胞浸润; PFIB染毒组(b)肺组织可见透明膜形成, 大量红细胞渗出, 可见弥漫性肺泡不张, 正常肺泡结构消失, 水肿液积聚, 大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集等病变; IGF-1干预组(c)各种肺损伤较PFIB染毒组明显减轻, 未见弥漫性肺泡不张和水肿液积聚, 也未见大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集等病变; 空载腺病毒对照组(d)各种损伤与PFIB染毒组相似 HE $\times 100$

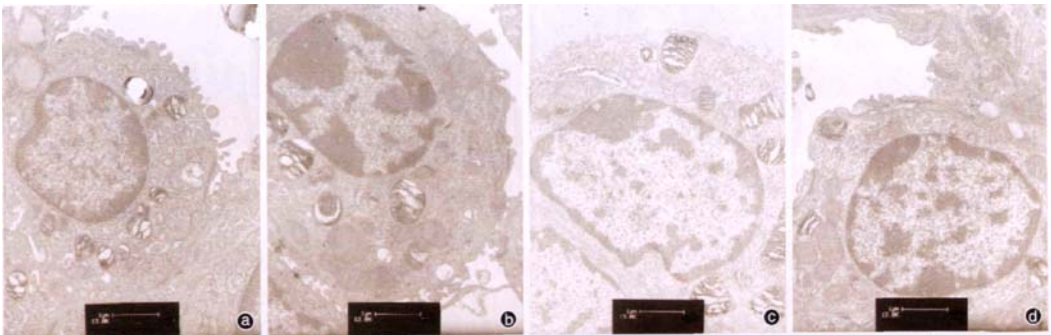


图2 电镜下观察各组小鼠肺组织ATII超微结构改变 正常对照组(a)肺组织ATII细胞器比较丰富, 有被染成黑色的板层体; PFIB染毒组(b)肺组织ATII可见细胞微绒毛脱落, 细胞核皱缩, 染色质变致密并呈现边缘化, 线粒体肿胀, 双层膜结构破坏, 基质内出现空泡; IGF-1干预组(c)ATII各项病理改变较PFIB染毒组明显改善, 而空载腺病毒对照组(d)ATII的病理改变与PFIB染毒组相似 铅铍双染 $\times 13\ 000$