

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

李蓓 陈力 马劲夫 赵建 尹明 丁日高 黎檀实

【摘要】 目的 观察胰岛素样生长因子 1(IGF-1)对小鼠全氟异丁烯(PFIB)吸入性急性肺损伤(ALI)模型的防护作用并探讨其可能机制。方法 64 只雄性昆明小鼠随机分为正常对照组(A 组)、吸入 PFIB 染毒组(B 组)、染毒前 7 d 气管内滴入携带 IGF-1 基因的重组腺病毒 5 载体(Ad5-IGF-1)干预组(C 组)、空载腺病毒对照组(D 组)。使用小鼠动态吸入 PFIB 全身暴露染毒实验装置对小鼠进行染毒,观察各组小鼠的肺系数、支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量、血清及肺组织中 IGF-1 含量,光镜下观察肺组织病理学变化及透射电镜下观察肺泡 I 型上皮细胞(AT I)的变化。结果 与 A 组比较,其他各组小鼠的肺湿/干重(W/D)比值、含水量及 BALF 中总蛋白含量显著增高(P 均 <0.01);C 组小鼠肺 W/D 比值、含水量及 BALF 中白蛋白和总蛋白含量均较 B 组和 D 组显著下降(P 均 <0.01);B 组、D 组血清 IGF-1 含量显著低于 A 组,而 C 组 IGF-1 含量明显高于 A、B、D 组(P 均 <0.01),B、C、D 组肺组织匀浆中 IGF-1 含量较 A 组明显升高(P 均 <0.01),且 C 组显著高于 B 组和 D 组(P 均 <0.01)。光镜下观察 C 组小鼠肺组织内透明膜形成,弥漫性肺泡不张、水肿液积聚、红细胞渗出、大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集等病变较 B 组和 D 组明显改善,C 组 AT I 超微结构可见微绒毛脱落、细胞核皱缩、染色质致密、线粒体肿胀、双层膜结构破坏、基质空泡等改变也较 B 组和 D 组改善。结论 Ad5-IGF-1 对小鼠 PFIB 吸入性 ALI 具有预防作用,可以显著降低肺 W/D 比值、含水量及 BALF 中蛋白含量,提高血清及肺组织中 IGF-1 的含量,保护 AT I 是 IGF-1 发挥作用的可能机制。

【关键词】 全氟异丁烯; 重组腺病毒 5; 胰岛素样生长因子 1; 急性肺损伤

Protective effect of insulin-like growth factor-1 on acute lung injury induced by perfluoroisobutylene inhalation in mice LI Bei*, CHEN Li, MA Jin-fu, ZHAO Jian, YIN Ming, DING Ri-gao, LI Tan-shi. * Emergency Department, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China
Corresponding author: LI Tan-shi, Email: lts301@sohu.com

【Abstract】 Objective To observe the protective effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on acute lung injury induced by perfluoroisobutylene (PFIB) inhalation in mice. Methods Sixty-four male Kunming mice were randomly divided into normal control (A) group, exposed (B) group, recombinant adenoviruses 5 of IGF-1 (Ad5-IGF-1) intervention (C) group (in which Ad5-IGF-1 was injected into the trachea of the mice), blank vector control (D) group. B, C and D groups were exposed to gaseous PFIB in a flow-past whole-body exposure system. The lung index, concentration of total protein and albumin in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), concentration of IGF-1 in serum and lung homogenate were measured. The lung pathologic changes were examined with light microscope, and ultrastructure changes in alveolar type I cells (AT I) with electron microscope. Results Compared with A group, the lung index, concentration of total protein in BALF were significantly increased in other groups, the lung index and concentration of total protein and albumin of BALF in B and D groups were prominently higher than C group (all $P < 0.01$). The concentration of IGF-1 in serum of B and D groups was lower markedly than that of A group, and the concentration of IGF-1 in serum of C group was distinctly higher than those of A, B, D groups (all $P < 0.01$). The concentration of IGF-1 in lung homogenate of B, C, D groups was higher than that of A group, and the concentration of IGF-1 in lung homogenate of C group was significantly higher than that of B and D groups (all $P < 0.01$). Lung hyaline membrane formation, diffuse alveolar atelectasis, accumulation of edema fluid, red blood cell exudation, were obviously milder in C group, and changes in the ultrastructure of AT I showed a similar result. Conclusion The protective effect of Ad5-IGF-1 against the toxicity of PFIB inhalation is identified. In the mice pretreated with Ad5-IGF-1 is able to significantly lower lung index, the protein concentration in BALF, and the concentration of IGF-1 in serum and lung homogenate is obviously increased. Protection of AT I may be one of the mechanisms.

【Key words】 perfluoroisobutylene; recombinant adenoviruses 5; insulin-like growth factor-1; acute lung injury

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.04.008

基金项目:国家自然科学基金项目(30840039);军队医药卫生“十一五”科研项目(06MA257)

作者单位:100853 北京,解放军总医院急诊科(李蓓、陈力、马劲夫、尹明、黎檀实);军事医学科学院毒物药物研究所(赵建、丁日高)

通信作者:黎檀实,Email:lts301@sohu.com

全氟异丁烯(PFIB)是一种毒性约为光气 10 倍的有毒气体,能穿透防毒面具,具有强大的肺杀伤作用,吸入后可引起明显的以通透性肺水肿为特征的急性肺损伤(ALI),甚至死亡^[1],因而也是一种备受关注的潜在化学战剂^[2]。由于其中毒机制尚不清楚,因而缺乏特效的解毒剂及治疗措施。近年来,生长因子在组织损伤修复中的作用引起广泛关注,胰岛素样生长因子 1(IGF-1)是一种多功能细胞增殖调控因子,对细胞正常生长、细胞分裂增殖以及胚胎发育等方面都有十分重要的作用。本研究中观察 IGF-1 对 PFIB 吸入致小鼠 ALI 的防治效果,以寻求新的 ALI 防治策略。

1 材料与方 法

1.1 材料:雄性昆明小鼠,体重(20±2)g,由军事医学科学院实验动物中心提供;PFIB 由上海有机氟材料研究所提供;携带 IGF-1 基因的重组腺病毒 5 载体(Ad5-IGF-1,滴度 3.0×10¹⁵ pfu/L)、重组腺病毒 5 空载体(Ad5-null,滴度 2.7×10¹⁵ pfu/L)均购于上海医元生物基因科技发展有限公司;Folin 酚由美国 Sigma 公司提供;IGF-1 放射免疫药盒由解放军总医院放射免疫所提供。

1.2 动物分组及模型制备:将 64 只小鼠按照随机数字表法分为 4 组:①正常对照组(A 组);②PFIB 染毒组(B 组):小鼠置于动态吸入染毒系统中吸入 PFIB^[3] 5 min,剂量 130 mg/m³;③IGF-1 干预组(C 组):经气管内一次性滴入 Ad5-IGF-1 15 μl,在滴入后 7 d 转基因表达高峰时进行 PFIB 暴露染毒;④空载腺病毒对照组(D 组):在染毒前 7 d 气管内滴入 Ad5-null 15 μl。C 组及 D 组染毒方法、剂量及时间与 B 组相同。

1.3 指标检测及方法:于染毒后 24 h 腹主动脉放血处死小鼠,留取血清,用放射免疫法测定血清中 IGF-1 浓度。各组随机选取 8 只小鼠,开胸行气管插管进行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)离心取上清液,以 Folin 酚法测定 BALF 中

白蛋白与总蛋白含量。另 8 只小鼠处死取左肺,称重后用生理盐水研磨制成匀浆,离心取上清液,用放射免疫法测定肺组织匀浆中 IGF-1 含量;取右前叶肺称湿重,80 ℃烘箱内烘干称干重,计算肺湿/干重(W/D)比值及肺含水量[(肺湿重-肺干重)/肺湿重×100%],以评价肺水肿及固形物漏出程度。取右第三叶肺组织,一部分以戊二醛、锇酸固定,树脂包埋、超薄切片,铀-铅双染后透射电镜下观察肺泡 I 型上皮细胞(AT I)并拍照;其余肺叶用甲醛水溶液固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,常规光镜下观察。

1.4 统计学分析:采用 SPSS 统计软件处理数据,所测数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,行单因素方差分析, $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组肺 W/D 比值、肺含水量及 BALF 中白蛋白、总蛋白含量比较(表 1):B 组小鼠肺系数较 A 组显著升高(P 均 <0.01);C 组小鼠肺系数较 B 组及 D 组明显降低,差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。BALF 中白蛋白及总蛋白变化与肺系数变化类似。

2.2 各组血清及肺组织 IGF-1 含量比较(表 1):B 组血清中 IGF-1 有所下降,肺组织匀浆中 IGF-1 含量明显升高($P<0.01$);C 组血清及肺组织匀浆中 IGF-1 含量较其他各组均明显升高,差异有统计学意义(P 均 <0.01)。

2.3 肺组织病理学变化(彩色插页图 1):A 组小鼠肺组织结构清晰,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。B 组小鼠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。C 组小鼠各种肺损伤较 B 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。D 组小鼠各种损伤与 B 组类似。

2.4 AT I 超微结构变化(彩色插页图 2):A 组小

表 1 各组小鼠肺 W/D 比值、肺含水量、BALF 中白蛋白和总蛋白含量及血清和肺组织匀浆中 IGF-1 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	肺 W/D 比值	肺含水量 (%)	BALF(g/L)		IGF-1(μg/L)	
				白蛋白	总蛋白	血清	肺组织
A 组	8	3.803±0.424	73.425±2.903	0.00±0.00	0.14±0.09	219.252±79.031	80.939±11.145
B 组	8	6.659±0.820 ^a	82.889±2.044 ^a	1.56±0.51	3.95±0.92 ^a	161.707±73.872	133.959±36.004 ^a
C 组	8	4.022±0.291 ^b	74.994±1.945 ^b	0.76±0.20 ^b	1.78±0.53 ^{ab}	337.438±55.861 ^{ab}	246.755±29.170 ^{ab}
D 组	8	6.498±1.301 ^c	83.264±2.620 ^c	2.34±0.72 ^c	3.74±0.79 ^c	164.576±63.099 ^c	146.016±49.634 ^c

注:与 A 组比较,^a $P<0.01$;与 B 组比较,^b $P<0.01$;与 C 组比较,^c $P<0.01$

鼠肺组织 AT I 细胞器较丰富,有被染成黑色的板层体。PFIB 染毒后 B 组小鼠肺组织内 AT I 出现明显的病理改变,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。C 组小鼠 AT I 各项病理改变均较 B 组明显改善,而 D 组小鼠 AT I 的病理改变与 B 组类似。

3 讨论

从 20 世纪 90 年代开始,腺病毒就作为基因治疗的有效载体,具有宿主范围广、可感染分裂和非分裂细胞、高滴度制备、易纯化、外源基因装载容量大等特点,被广泛应用于基础研究和临床试验中。此外腺病毒载体系统还可以广泛用于人类及非人类蛋白的表达,腺病毒可感染一系列哺乳动物细胞,因此在大多哺乳动物细胞和组织中均可用来表达重组蛋白,是一种非常有应用前景的科学研究载体。

研究发现,IGF-1 既有胰岛素类似的功能及介导生长激素的作用,又可以促进细胞的分化和增殖,在抑制细胞凋亡方面也有重要的作用。另外,IGF-1 可通过多种信号转导途径来调控和抑制细胞凋亡,在阻断神经元凋亡、成纤维细胞凋亡及心肌细胞缺血/再灌注损伤中都发挥了显著的调控作用,对阿尔茨海默症、帕金森症等神经元退行性疾病及脑缺血、脑缺血/再灌注损伤等心血管疾病也有治疗作用^[4]。也有研究证实血浆 IGF-1 升高有利于肺组织的修复,并在 AT I 合成和分泌肺泡表面活性物质特异结合蛋白(SP-A)中起重要作用^[5-7]。

本实验中发现,在 PFIB 吸入染毒前经气道给予 Ad5-IGF-1 能够显著降低染毒后 24 h 小鼠的肺含水量、W/D 比值及 BALF 中的蛋白含量。有研究发现 PFIB 吸入染毒后(剂量 $100 \text{ mg/m}^3 \times 10 \text{ min}$),大鼠 BALF 中蛋白成分主要为白蛋白、转铁蛋白和 IgG,均为血液中的蛋白成分,表明 PFIB 染毒后肺泡水肿液中的蛋白主要来自血浆蛋白的漏出^[8],因此可用 BALF 中蛋白含量来间接反映气血屏障通透性和损伤程度。所以我们认为 IGF-1 对于 PFIB 吸入引起的肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞的损伤应有抵抗作用,可以显著减少肺损伤造成的水和固形物的漏出。

另外,AT I 是肺气血屏障中上皮屏障主要构成细胞之一,具有增殖和分化的能力,参与修复肺损伤、调节自身和邻近细胞的功能,还可以通过主动运转 Na^+ 参与维持肺泡相对干燥,在 ALI 过程中发挥

非常重要的作用。本实验显示,染毒组外源性给予 IGF-1 小鼠的 AT I 微绒毛、线粒体及细胞核损伤较空载腺病毒对照组小鼠有明显减轻,认为 IGF-1 在 PFIB 吸入性肺损伤中对 AT I 有保护作用;无 IGF-1 外源性补充小鼠肺组织匀浆中 IGF-1 浓度较正常对照组也显著升高,血清 IGF-1 浓度有所下降,但差异无统计学意义,说明 PFIB 吸入性损伤后小鼠肺组织摄取 IGF-1 增多,以此来促进受损肺组织的修复,同时循环中的 IGF-1 浓度降低,这与 Jackson 等^[9]的研究结果类似。我们既往的实验研究也显示,在 ALI 组织修复过程中提高 IGF-1 水平对 AT I 的增殖和分化有积极的意义^[10]。

综上所述,在 PFIB 吸入性肺损伤时补充 IGF-1 对肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞的损伤有抵抗作用,对 AT I 的凋亡可能发挥了抑制调控作用,虽然本研究未在其具体的调控机制方面深入研究,但是表明 IGF-1 可能被作为靶点在 PFIB 吸入性肺损伤的预防及治疗方面提供新的方向。

参考文献

- [1] Lehnert BE, Archuleta D, Behr MJ, et al. Lung injury after acute inhalation of perfluoroisobutylene: exposure concentration-response relationships. *Inhal Toxicol*, 1993, 5(1): 1-32.
- [2] 张宪成. 全氟异丁烯的理化性质及侦检防护. 国外医学军事医学分册, 1995, 12(3): 113-118.
- [3] 张宪成, 王文珠, 彭双清, 等. 不同吸附剂对 PFIB 防护性能的实验研究. *中国工业医学杂志*, 1999, 12(3): 136-138.
- [4] 薛亚梅, 李坤, 吕杰强. IGF-1 对细胞凋亡的抑制调控. *生命科学*, 2007, 19(1): 68-72.
- [5] Joe P, Wallen LD, Chapin CJ, et al. Effects of mechanical factors on growth and maturation of the lung in fetal sheep. *Am J Physiol*, 1997, 272(1 Pt 1): L95-105.
- [6] Chetty A, Manzo N, Waxman AB, et al. Modulation of IGF-binding protein-2 and -3 in hyperoxic injury in developing rat lung. *Pediatr Res*, 2005, 58(2): 222-228.
- [7] 方凤. 肺表面活性物质在新生儿呼吸系统疾病中的应用. *实用儿科临床杂志*, 2003, 18(5): 333-335.
- [8] Gurley LR, Buchanan JS, London JE, et al. High-performance capillary electrophoresis of proteins from the fluid lining of the lungs of rats exposed to perfluoroisobutylene. *J Chromatogr*, 1991, 559(1-2): 411-429.
- [9] Jackson NC, Carroll PV, Russell-Jones DL, et al. Effects of glutamine supplementation, GH, and IGF-1 on glutamine metabolism in critically ill patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 278(2): E226-233.
- [10] 黎檀实, 沈洪, 尹明, 等. 生长激素对大鼠肺泡 I 型上皮细胞凋亡抑制作用的观察. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(5): 290-293.

(收稿日期: 2009-02-24 修回日期: 2009-03-13)

(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)

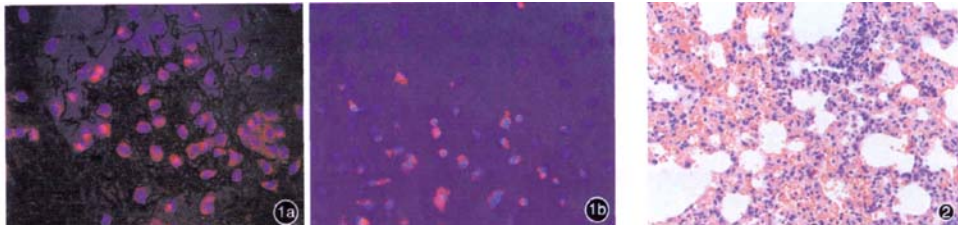


图1 荧光显微镜下观察LPS孵育HPAEC (a)后p-MLCK在胞质呈红色染色; ML-7孵育HPAEC (b)后p-MLCK表达减少 免疫荧光染色 $\times 400$ 图2 显微镜下观察LPS组小鼠肺组织有大量中性粒细胞聚集, 肺水肿和出血明显 HE $\times 100$

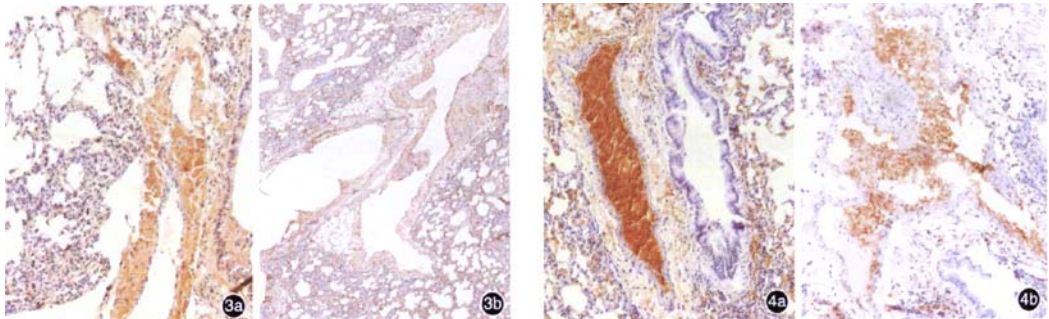


图3 光镜下观察小鼠肺组织MLCK阳性表达, 胞质呈黄色 LPS组(a)MLCK表达上调, 位于肺内皮和上皮细胞; ML-7组(b)MLCK阳性表达较LPS组明显减少 免疫组化 $\times 100$ 图4 光镜下观察小鼠肺组织CD11b阳性表达, 胞质呈黄色 LPS组(a)CD11b阳性表达位于血管内炎性细胞; ML-7组(b)CD11b阳性表达较LPS组明显减少 免疫组化 $\times 100$

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)

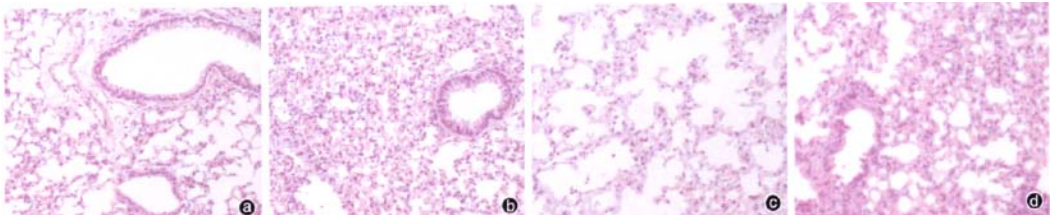


图1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 正常对照组(a)肺组织结构清晰,可见细支气管和肺泡组织,肺空泡变,肺泡壁与肺间质内未见炎性细胞浸润; PFIB染毒组(b)肺组织可见透明膜形成,大量红细胞渗出,可见弥漫性肺泡不张,正常肺泡结构消失,水肿液积聚,大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集等病变; IGF-1干预组(c)各种肺损伤较PFIB染毒组明显减轻,未见弥漫性肺泡不张和水肿液积聚,也未见大量中性粒细胞及巨噬细胞聚集等病变; 空载腺病毒对照组(d)各种损伤与PFIB染毒组相似 HE $\times 100$

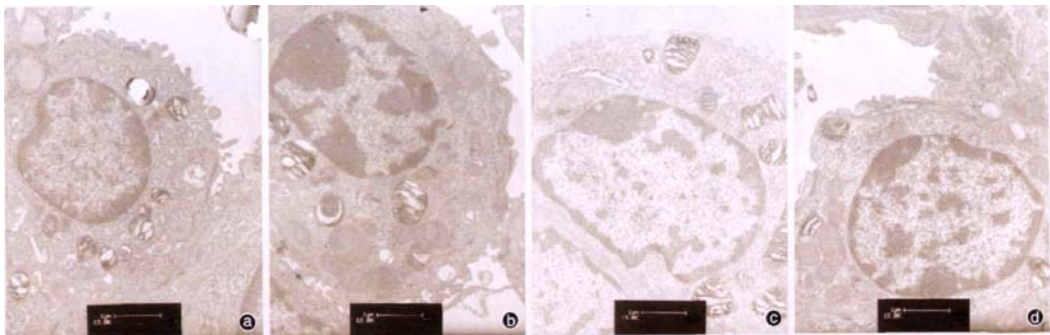


图2 电镜下观察各组小鼠肺组织ATII超微结构改变 正常对照组(a)肺组织ATII细胞器比较丰富,有被染成黑色的板层体; PFIB染毒组(b)肺组织ATII可见细胞微绒毛脱落,细胞核皱缩,染色质变致密并呈现边缘化,线粒体肿胀,双层膜结构破坏,基质内出现空泡; IGF-1干预组(c)ATII各项病理改变较PFIB染毒组明显改善,而空载腺病毒对照组(d)ATII的病理改变与PFIB染毒组相似 钨铂双染 $\times 13\ 000$