

·成果简介·

# 核因子- $\kappa$ B 调控 PMN 凋亡在急性肺损伤发病中作用的研究

刘艳梅\* 王殿华\* 李陈莉† 王慧娟†

(\* 河北医科大学病理生理教研室, 石家庄 050017;

† 河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄 050017)

[关键词] 核因子  $\kappa$ B; 中性粒细胞; 凋亡; 急性肺损伤

众所周知, 中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 在机体非特异性防御反应中的地位毋庸置疑。然而近年大量研究证实: PMN 过度激活、在肺组织中大量扣押和清除延迟在全身性炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) → 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) → 多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 这一恶性发展的途径中作用重大<sup>[1]</sup>。因而适时适度清除 PMN 及其有害内容物对于控制炎症的发展和转归至关重要。最近发现 PMN 凋亡是非炎性清除 PMN 的有效方式<sup>[2]</sup>, 有关如何调控 PMN 凋亡的研究颇受学者关注。Ward 提出核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号转导途径有望成为调控 PMN 凋亡的重要干预靶位<sup>[3]</sup>。本实验拟用 SD 大鼠气管内滴注大肠杆菌内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 抑制或白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 促进 PMN 凋亡研究 PMN 凋亡失控在 ALI 发病中的作用, 并进一步探讨 NF- $\kappa$ B 在 PMN 凋亡发生过程中可能的调控作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠急性肺损伤模型复制及分组

健康 SD 大鼠, 雌雄不拘, 体重 200—250 g, 经乙醚麻醉施行气管滴注。随机分为假手术 (sham) 组 (滴注无菌生理盐水,  $n = 9$ )、LPS 组 (100  $\mu$ g/只,  $n = 7$ ) 和 LPS + IL-10 组 (LPS 与 IL-10 1  $\mu$ g/只同时滴注,  $n = 5$ )。术后动物自由活动。分别于术后 3h、6h 和 18h 放血处死动物, 行支气管肺泡灌洗 (bron-

choalveolar lavage, BAL)。

### 1.2 检测指标和方法

#### (1) 支气管肺泡灌洗 (BAL)

BAL 参照 Cox 报道的方法进行<sup>[4]</sup>。收集全部 BALF 离心 (1000 r/min, 10 min), 细胞沉淀经 4% 多聚甲醛固定后涂片, 用于免疫细胞化学 (3 h) 和凋亡 (6 h、18 h) 检测。6 h 组部分 BALF 上清用改良酚试剂法测定蛋白含量 ( $\mu$ g/mL), 沉淀常规计数白细胞总数并分类计数 500 个白细胞, 计算 BALF 中 PMN 数量 ( $\times 10^6$ /mL)。

#### (2) BALF 中 PMN 的凋亡检测

采用脱氧核苷酸末端转移酶介导的 DNA 原位末端标记技术 (TUNEL) 检测 BALF 涂片中 PMN 的凋亡。阳性细胞核染成棕黄色, 边界清楚。每张涂片随机计数 200 个 PMN, 计算阳性 PMN 所占百分率。18 h 组部分 BALF 细胞不经固定, 用吖啶橙/溴乙锭 (AO/EB) 双荧光染色立即置荧光显微镜下观察照相<sup>[5]</sup>。

#### (3) BALF 中 PMN 免疫细胞化学检测

分别采用兔抗 NF- $\kappa$ B P50、P65 及 I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$  多抗, 应用 SP 免疫组织化学试剂盒, 依次滴加一抗及相应生物素化二抗, DAB 显色, 封片照相。体积较小且核分叶的细胞为 PMN。

#### (4) 肺组织的形态学观察

6 h 组部分动物放血处死后不进行 BAL, 取肺组织 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规制备石蜡切片、HE 染色光镜观察。

国家自然科学基金资助项目。

本文于 2000 年 12 月 13 日收到。

### 1.3 统计学处理

数据用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。BALF PMN 数量行多样本均数比较的秩和检验 (Kruskal-Wallis 法) 和两两比较的秩和检验 (Nemenyi 法), 其他结果行单因素方差分析和两两比较的  $q$  检验 (Newman-Keul 法)。以  $P < 0.05$  为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 IL-10 抗 LPS 所致 ALI 的作用

LPS 组 BALF 中蛋白含量和 PMN 数量均明显高

于 sham 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1; 光镜下可见肺泡萎陷甚至结构消失, 肺泡腔及间质弥漫性 PMN 浸润 (图 1)。LPS + IL-10 组 BALF 中蛋白含量和 PMN 数量均显著低于 LPS 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1; 肺组织中 PMN 浸润程度明显减轻, 光镜结构基本正常 (图 1)。

表 1 气管滴注 6 h 各组 BALF 蛋白含量和 PMN 数量变化

组别	n	蛋白含量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	PMN 数 ( $\times 10^6/\text{mL}$ )
sham	9	31.74 ± 13.11	0.0016 ± 0.0008
LPS	7	95.22 ± 19.14 <sup>1)</sup>	2.1337 ± 0.2851 <sup>2)</sup>
LPS + IL-10	5	37.01 ± 2.25 <sup>1)</sup>	0.1088 ± 0.0168 <sup>2)</sup>

Data are means ± SE. 1)  $P < 0.01$  vs sham, 2)  $P < 0.01$  vs LPS

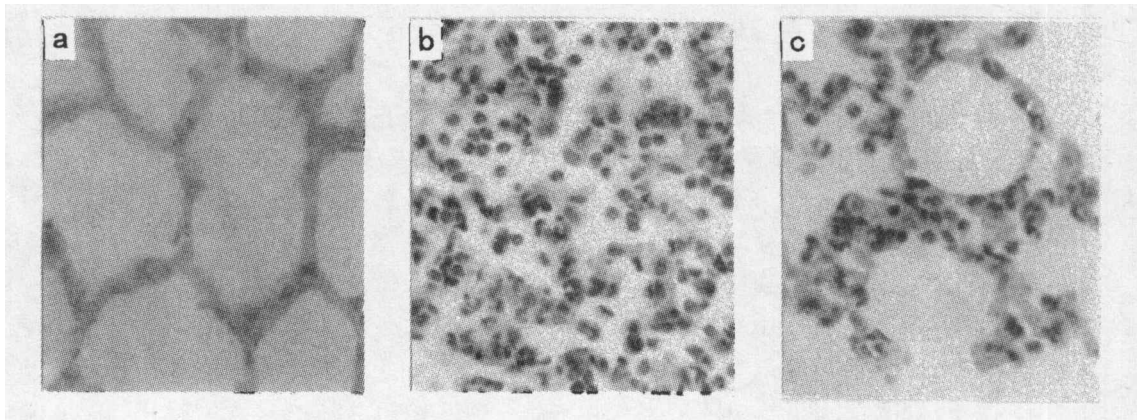


图 1 各组 SD 大鼠气管滴注药物后 6 h 肺组织形态学变化 (HE × 400)

### 2.2 IL-10 和 LPS 对 BALF 中 PMN 凋亡的影响

sham 组 BALF 细胞主要为肺泡巨噬细胞。LPS + IL-10 组 6 h 和 18 h 的 TUNEL 阳性百分率均明显高于同时时间点的 LPS 组 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。各组 BALF 中的肺泡巨噬细胞未见阳性反应。AO/EB 双荧光染色观察到 LPS 组 (18h) 以正常 PMN (核被 AO 染色呈黄绿色 - 黄色荧光, 但密度不均, 呈现结构样特征) 居多, 有少量早期凋亡的 PMN (核亦被 AO 染色, 但染色增强, 荧光亢进, 呈均匀一致的绿色)。LPS + IL-10 组 (18 h) 多见晚期凋亡的 PMN (核被 EB

染色呈橙红色, 并可见核的断裂和浓缩), 并聚集在肺泡巨噬细胞周围, 见图 2。

表 2 气管滴注 LPS、IL-10 BALF 中 PMN 凋亡百分率的变化

组别	n	凋亡百分率
LPS (6 h)	5	7.53 ± 1.49
LPS + IL-10 (6 h)	5	32.09 ± 6.87 <sup>1)</sup>
LPS (18 h)	5	10.27 ± 2.28
LPS + IL-10 (18 h)	5	42.33 ± 5.63 <sup>2)</sup>

Data are means ± SE. 1)  $P < 0.01$  vs LPS (6 h), 2)  $P < 0.01$  vs LPS (18 h)

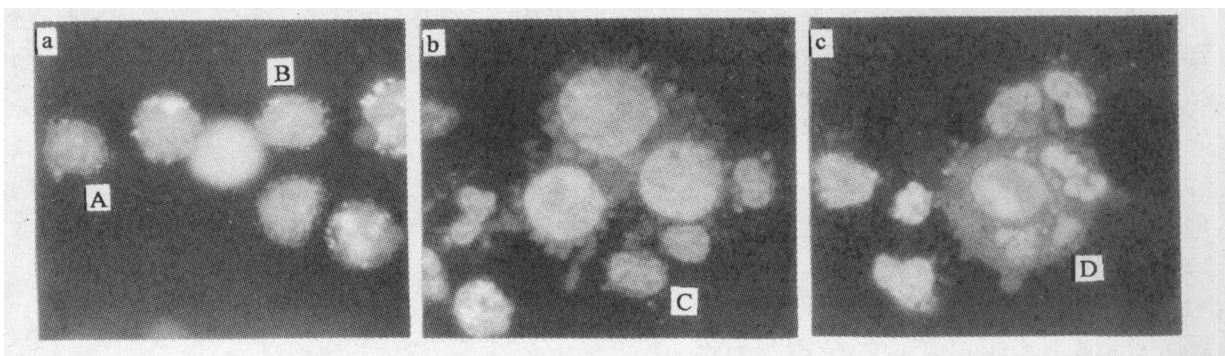


图 2 BALF AO/EB 双荧光染色. A 正常 PMN B 早期凋亡的 PMN C 晚期凋亡的 PMN D 吞噬凋亡 PMN 的肺泡巨噬细胞

### 2.3 IL-10 和 LPS 对 I $\kappa$ B 降解、NF- $\kappa$ B 核移位的影响

BALF 细胞涂片免疫细胞化学的结果显示, LPS 组(3 h) PMN 胞浆中 I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$  阳性黄染程度明显弱于 LPS + IL-10 组(3 h)。PMN 的 NF- $\kappa$ B P50、P65 阳性信号 LPS(3 h) 组位于胞核中, LPS + IL-10 组位于胞浆中。

## 3 讨论

大量 PMN 在肺内聚集、浸润是我们采用的气管内滴注 LPS 致 SD 大鼠 ALI 模型的重要特征。本实验结果证实气管内滴注 LPS 致 ALI 时, BALF 中蛋白含量和 PMN 数量显著增加, 并伴有明显的病理形态学改变。提示 LPS 可直接并通过刺激肺泡巨噬细胞、血管内皮细胞等释放多种炎症介质(TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、GM-CSF 等)间接诱导 PMN 边集、滚动、粘附于血管内皮细胞、进而游出向炎症灶趋化, 在肺组织中大量浸润。激活的 PMN 通过呼吸爆发释放大量氧自由基、蛋白水解酶及炎症介质等有害物质损伤血管内皮细胞及肺泡上皮细胞, 导致肺泡-毛细血管膜受损, 通透性增加, 引起渗透性肺水肿, 最终使肺弥散功能障碍<sup>[6]</sup>。可以认为 PMN 是 LPS 致 ALI 的重要效应细胞, 通过有效地清除肺内的 PMN 可以减轻 ALI。

IL-10 是目前公认的抗炎细胞因子。本实验结果显示, 气管内滴注 IL-10 使 LPS 所致 ALI 的 BALF 中蛋白含量和 PMN 数量明显下降, 肺组织中 PMN 浸润减轻, 形态结构显著改善。提示 IL-10 能够明显减轻 LPS 所致 ALI, 其作用机理可能是减少 PMN 在肺内聚集及或加速肺内扣押的 PMN 清除。

由于进入到炎症灶的 PMN 无法再回到血循环, 只能以坏死或凋亡的方式被清除。现已证实凋亡的 PMN 不仅脱颗粒、呼吸爆发等致炎功能下降, 而且更易被吞噬细胞识别、吞噬, 另外吞噬大量凋亡的 PMN 能够使吞噬细胞产生和释放前炎症介质的功能受到抑制, 这种凋亡和清除间的动态平衡既防止了 PMN 的过度过量激活加重炎症反应, 又能够避免凋亡的 PMN 继发坏死释放毒性内容物加重周围组织损伤<sup>[2]</sup>。由此可见 PMN 凋亡作为非炎症清除 PMN 的主要方式, 其启动的时机和程度决定了包括 ALI 在内的多种炎症反应的程度和转归<sup>[3]</sup>。本实验采用 TUNEL 和 AO/EB 双荧光染色两种方法证实气管内滴注 LPS 具有延迟 PMN 凋亡的作用, 而 IL-10 显著促进 BALF 中 PMN 凋亡, 进而被肺泡巨噬细胞

吞噬清除。这一结果与 Cox 等所做报道一致<sup>[4]</sup>。提示 PMN 凋亡延迟是 LPS 导致大量 PMN 在肺内聚集、浸润而引起 ALI 的主要机制。而 IL-10 则通过促进 PMN 凋亡, 随即被肺泡巨噬细胞吞噬和清除起到减轻 ALI 的作用。Ishii 等人也报道紫外线照射能够引起以 PMN 在肺内聚集为特征的 ALI, 而 PMN 的凋亡和被肺泡巨噬细胞清除是这种 ALI 得以自然恢复的重要因素<sup>[7]</sup>。PMN 凋亡失控在 ALI 发生、发展中具有重要的病理生理学意义, 因而我们试图寻找一条调控 PMN 凋亡的有效途径。

NF- $\kappa$ B 是一组调控细胞凋亡的重要转录因子, 由多肽 P50 和 P65 亚基形成同源或异源二聚体, 其中发挥主要生理功能的是 P50-P65 异源二聚体。静息时, NF- $\kappa$ B 二聚体与其主要调控抑制蛋白 I $\kappa$ B 形成三聚体存在于胞浆。胞外因素可引起 I $\kappa$ B 磷酸化, 与 NF- $\kappa$ B 二聚体解离后降解, NF- $\kappa$ B 二聚体得以向核内迅速转移<sup>[8]</sup>。Donaldson 等人发现 T 淋巴细胞中 NF- $\kappa$ B 的激活在 2—3 h 达高峰, 随后陡然下降<sup>[9]</sup>。因此本实验选择滴注药物后 3 h 这一时间点检测 NF- $\kappa$ B, 发现 LPS 能够引起 PMN 中 I $\kappa$ B $\alpha$ 、 $\beta$  降解, 和 NF- $\kappa$ B P50、P65 亚基核移位, 而 IL-10 对此均具有抑制作用。Ward 等人曾报道 NF- $\kappa$ B 是体外培养的人血 PMN 自发凋亡的重要调控因子, 使用多种 NF- $\kappa$ B 抑制剂 (gliotoxin, SN50, PDTC, curcumin, MG-132) 都显著提高 PMN 凋亡百分率<sup>[10]</sup>。由此我们推测 NF- $\kappa$ B 对本实验中 PMN 凋亡失控可能起着重要的调控作用。LPS 激活 NF- $\kappa$ B 延迟 PMN 凋亡的作用可能是通过激活 I $\kappa$ B 激酶, 使 I $\kappa$ B 磷酸化后降解而实现的<sup>[11]</sup>。IL-10 通过抑制 NF- $\kappa$ B 促进 PMN 凋亡。Schottelius 等人提出 IL-10 在 I $\kappa$ B 激酶活性及 NF- $\kappa$ B 亚基与 DNA 的结合活性两个水平发挥抑制 NF- $\kappa$ B 的作用<sup>[12]</sup>。目前 NF- $\kappa$ B 下游调控凋亡的机制尚未明了。现有资料表明激活的 NF- $\kappa$ B 可能通过启动具有抑制细胞凋亡作用的生存蛋白 (survival proteins, 如 c-myc、bcl-2 等) 的表达来抑制 PMN 凋亡<sup>[3]</sup>。

总之, 初步的工作表明 PMN 凋亡失控在 LPS 致 ALI 发病中起着至关重要的作用, 而 NF- $\kappa$ B 可能是调控 PMN 凋亡的重要靶位。深入研究 NF- $\kappa$ B 及其信号转导途径在调控 PMN 凋亡中的作用及机制, 进而加以干预将为 ALI 乃至 MODS 的最终控制开辟崭新的前景。

## 参 考 文 献

- [1] Chaslett S. Cellular mechanism of acute lung injury. Thorax, 1992.

- 47: 60—68.
- [2] Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**: S5—S11.
- [3] Ward C, Dransfield I, Chilvers ER et al. Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *TIPS*, 1999, **20**: 503—509.
- [4] Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am. J. Physiol.*, 1996, **271**: L566—L571.
- [5] 汪承亚,盛瑞兰,汪凡等. 吖啶橙/溴乙锭双荧光染色检测细胞凋亡的形态学方法. *中国病理生理杂志*, 1998, **14**(1): 104—106.
- [6] Kunkel E J, Jung U, Bullard D C et al. Absence of trauma - induced leukocyte rolling in mice deficient in both P - selectin and intercellular adhesion molecule. *J. Exp. Med.*, 1996, **182**: 57—65.
- [7] Ishii Y, Hashimoto K, Nomura A et al. Elimination of neutrophils by apoptosis during the resolution of acute pulmonary inflammation in rats. *Lung*, 1998, **176**: 89—98.
- [8] Stancovski I, Baltimore D. NF- $\kappa$ B activation: the I $\kappa$ B kinase revealed. *Cell*, 1997, **91**: 299—302.
- [9] Donaldson LF, Hanley MR, Villablanca AC. Inducible receptors. *TIPS*, 1997, **18**: 171—181.
- [10] Ward C, Chilvers ER, Lawson MF et al. NF -  $\kappa$ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**: 4 309—4 318.
- [11] Manna S K, Aggarwal B B. Lipopolysaccharide inhibits TNF - induced apoptosis: role of nuclear factor- $\kappa$ B activation and reactive oxygen intermediates. *J. Immunol.*, 1999, **162**: 1 510—1 518.
- [12] Schottelius A J G, Mayo M W, Sartor R B et al. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of  $\kappa$ B kinase activity and nuclear factor $\kappa$ B DNA binding. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**(45): 31 868—31 874.

## EFFECT OF POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS APOPTOSIS REGULATED BY NF- $\kappa$ B IN ACUTE LUNG INJURY

Liu Yanmei\* Wang Dianhua\* Li Chenli† Wang Huijuan†

(\* Department of Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017;

† Department of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

**Key words** NF- $\kappa$ B, neutrophils, apoptosis, acute lung injury

·成果简介·

## 纳米粒子的分散及其有机复合材料的复合技术

徐国财 马家举 邢宏龙

(淮南工业学院化学工程系,淮南 232001)

[关键词] 纳米粒子, 纳米复合材料, 纳米作用能

有机纳米复合材料一般包括聚合物基有机纳米复合材料和聚合物基无机纳米复合材料, 聚合物基无机纳米复合材料是集有机组分和无机纳米组分于一体的一种新型的功能高分子材料, 是当今高分子材料科学最优先发展的方向之一<sup>[1]</sup>。它主要有三种制备方法, 即溶胶-凝胶法、嵌入法和纳米粒子填

充法, 就材料制备方式和性能来讲, 三种方法各有优点和局限, 这方面已有多篇文献进行了论述。比较而言, 纳米粒子填充法具有下列优点, 一是在聚合物基体中可有目的有选择地引入单一或复合纳米组分, 二是聚合物基体本身的可选择空间较大, 因此开展纳米粒子填充法制造聚合物基无机纳米复合材料

本文于 2001 年 2 月 14 日收到。