维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)02-0173-04

CD40/CD40L 在兔失血性休克肺组织中的表达

吴 彬,但 伶

(重庆医科大学附属第二医院麻醉科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 CD40/CD40L 在兔失血性休克肺组织中的表达及作用。方法:选取健康家兔 18 只,随机分为正常对照组(A 组),失血性休克 1h 组(B 组)和失血性休克 2h 组(C 组),每组 6 只。除对照组外,其余动物通过 Wiggers 改良法制作失血性休克肺损伤模型。采用酶联免疫吸附试验(ELISA 法)测定血浆中 TNF-α、IL-10 浓度,免疫组织化学法检测 CD40/CD40L 在肺组织中的表达,观察肺组织含水量及肺组织病理学变化。结果:与对照组相比,B、C 组肺组织可见明显肺损伤病理改变,肺含水量增加($P<0.05$),且血浆 TNF-α、IL-10 含量较 A 组明显增高($P<0.01$),休克 2h 后血浆中 TNF-α 含量较休克 1h 血浆中含量明显增高($P<0.01$);免疫组化结果显示失血性休克后肺组织中可见 CD40、CD40L 在肺泡上皮细胞及支气管粘膜上皮细胞表达,而正常肺组织内少见或未见表达。结论:失血性休克后肺损伤的发生可能与 CD40/CD40L 的异常表达有关。

【关键词】失血性休克;CD40;CD40L;肺

【中国图书分类法分类号】R563.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-18

Expression of CD40/CD40L in lung tissue of rabbits with hemorrhagic shock

WU Bin, et al

(*Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression and the effects of CD40/CD40L in lung tissue of rabbits with hemorrhagic shock. *Methods*: 18 healthy rabbits were randomly divided into control group (group A), hemorrhagic shock 1 hour group (group B) and hemorrhagic shock 2 hours group (group C), with 6 rabbits in each group. Except the rabbits in the control group, rest rabbits were made into hemorrhagic shock models with lung injury according to Wiggers modified method. TNF-α、IL-10 in plasma were measured by ELISA. Expressions of CD40 and CD40L in lung tissue were measured by immunohistohemistry. Water quantity and pathological change in the lung were observed. *Results*: The lung of group B and C displayed obvious injury, water quantity increased ($P<0.05$). Compared with group A, plasma concentration of TNF-α and IL-10 in group B and C increased obviously ($P<0.01$), and the concentration of TNF-α at the 2nd hour of hemorrhagic shock increased obviously than at the 1st hour ($P<0.01$). The immunohistohemistry results revealed that CD40 and CD40L expressed in the lung tissue after hemorrhagic shock but not in the normal. *Conclusion*: The alteration of CD40 and CD40L expression may participate in the generation and development of lung injury during hemorrhagic shock.

【Key words】 Hemorrhagic shock; CD40; CD40L; Lung

失血性休克是临床常见急症,失血性休克后可导致急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)[1],甚至引起多器官功能障碍综合症(Mutiple organ dysfunction syndrome, MODS)。失血性休克后肺损伤是多种炎症细胞介导的肺部炎症反应和炎症反应失控所致的肺毛细血管损伤,多种细胞因子在其局部炎症反应中起着至关重要的作用,目前认为肺内炎性因子和抗炎因子的平衡失调导致肺损伤的发生发展[2]。CD40/CD40L 是炎症反应中重要的信号转导系统,与多种细胞因子的产生有关。本研究通过复制失血性休克动物模型,观察 CD40/CD40L 在肺组织中的定位及表达变化,探讨 CD40/CD40L 与失血性休克后肺损伤中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

3~6 月龄新西兰兔 18 只,体重 2.0~2.5kg,雌雄兼有,由重庆医科大学实验动物中心提供。兔抗 CD40、CD40L 多克

作者介绍:吴 彬(1981-),男,硕士,研究方向:临床麻醉与肺保护。

通讯作者:但 伶,女,副教授,E-mail:danlingl@sohu.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

隆抗体(BA0729,BA1583),DAB显色剂及SABC试剂盒(SA1022)均为武汉博士德生物工程有限公司产品。TNF-α、IL-10ELISA试剂盒(SR023、SR087,上海轩昊科技发展有限公司)。

1.2 失血性休克模型的建立及实验分组

用质量分数为3%的戊巴比妥钠30mg/kg经兔耳缘静脉麻醉,再由耳缘静脉注射肝素2~4mg/kg致全身肝素化。行右侧股动脉穿刺,接换能器进行有创血压测定。左股动脉插管连接无菌储血袋,左股静脉穿刺备输血用。采用Wiggers改良法制作失血性休克模型:左股动脉放血[速度为2~3ml/(kg·min)]至平均动脉压降为(40±5)mmHg,维持此血压。在此期间根据平均动脉压的波动情况给予放血或回输血液,以维持血压在此范围内。新西兰兔18只随机分为正常对照组(A组,6只),失血性休克1h组(B组,6只),失血性休克2h组(C组,6只)。各组在静脉穿刺后采血1次。对照组仅行动静脉穿刺操作,2h后采集血液及肺组织标本;B组于放血、成功建立模型后1h采集血液及肺组织标本;C组于放血、成功建立模型后2h采集血液及肺组织标本。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肺水含量测定 于以上各时间点分别处死实验动物,开胸取右肺上叶,迅速用吸水纸吸干表面水分及血液后称湿重,然后将标本置于80℃烘箱中干燥36h称干重,计算肺湿/干重(W/D)比。

1.3.2 血浆TNF-α、IL-10检测 于以上各时间点在动物处死前取静脉血5ml注入抗凝管中混匀,在4℃ 3 000r/min离心10min取血浆。采用ELISA法检测血浆中TNF-α,IL-10含量,按说明书操作。单位以pg/ml表示。

1.3.3 肺组织病理学检查 解剖取肺组织观察,然后取右肺下叶,多聚甲醛浸泡固定,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察。

1.3.4 肺组织中CD40、CD40L的表达 取适量右肺下叶固定石蜡包埋切片后免疫组化检测。免疫组化染色步骤:石蜡切片常规脱蜡至水,3%H_2O_2室温处理10min灭活内源性酶。进行高温水浴抗原修复,5%山羊血清封闭,室温20min,滴加相应一抗,4℃过夜。滴加生物素化二抗,37℃孵育20min。滴加第二代辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃孵育20min,DAB显色剂显色。最后苏木素复染,脱水透明,封片。阴性对照以PBS代替一抗。胞膜或胞浆出现棕黄色颗粒为阳性。

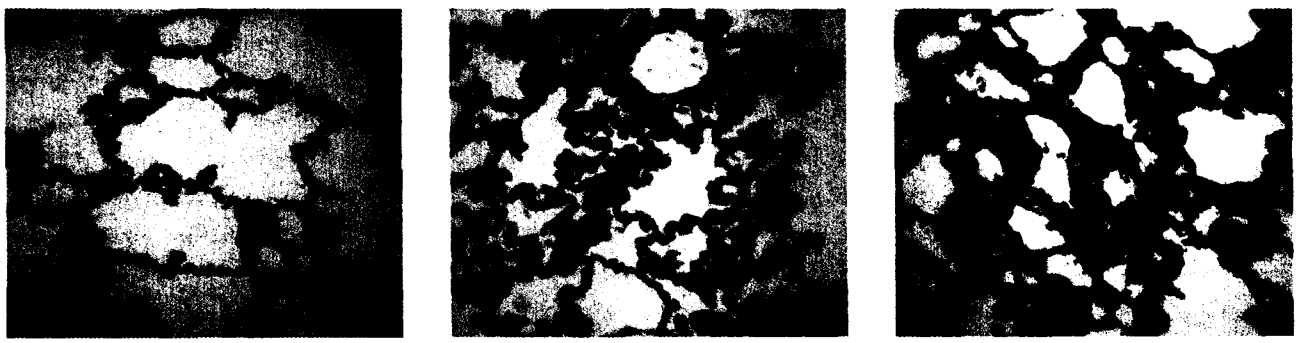
1.4 统计学方法

计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS11.5统计软件进行分析,组间对比应用t检验,$P<0.05$为差异有显著性。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变

解剖取肺组织观察见B、C组肺体积均有增大,肺叶表面有大小不等的散在淤斑和淤点,切面可见部分红色实变,有粉红色液体渗出。光镜下见B组、



对照组 未发生休克　　失血性休克1h　　失血性休克2h

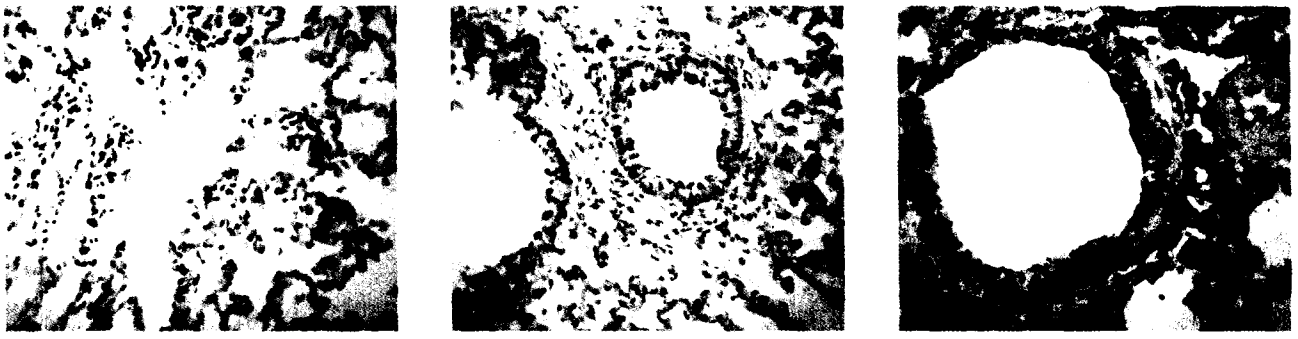
图1 肺组织病理学改变(HE染色,×250)

表1 各组血浆TNF-α、IL-10与肺组织W/D变化($\bar{x}\pm s$,n=6)

组别	例数(n)	TNF-α(pg/ml)		IL-10(pg/ml)		W/D
		休克前	休克后	休克前	休克后	
A组	6	10.92±1.25	11.21±1.55	101.62±5.10	110.81±16.65	4.76±0.20
B组	6	11.19±0.79	31.31±3.42**#	102.54±4.66	406.14±20.86**#	5.11±0.24*
C组	6	10.73±1.42	44.02±4.35**#△	105.58±6.65	416.53±16.21**#	5.00±0.09*

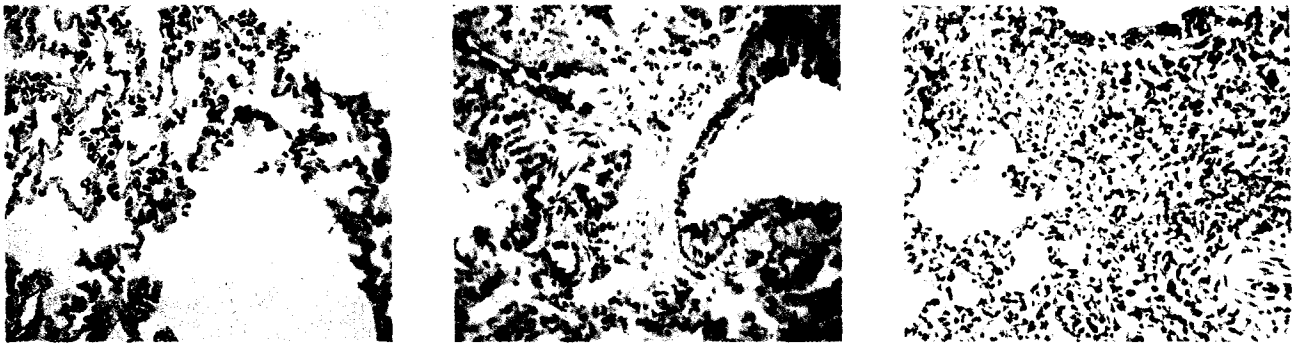
注:*表示与A组比较$P<0.05$,**表示与A组休克后比较$P<0.01$,#表示与同组休克前比较$P<0.01$,△表示与B组休克后比较$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com



对照组 CD40 染色结果阴性　　休克 1h CD40 染色呈阳性　　休克 2h CD40 染色呈阳性

图 2 CD40 在肺组织中的表达(免疫组织化学法×400)



对照组 CD40L 染色结果阴性　　休克 1h CD40L 染色呈阳性　　休克 2h CD40L 染色呈阳性

图 3 CD40L 在肺组织中的表达(免疫组织化学法×400)

C 组肺组织内有大量的红细胞,肺泡隔明显增宽,肺泡壁增厚,肺间质水肿侵润,肺泡腔内有红细胞及炎性细胞侵润,与对照组肺组织的正常形态对比明显,其中 C 组较 B 组改变更明显(见图 1)。

2.2 肺组织湿/干重比(W/D)

与正常对照组相比,休克 1h、2h 组 W/D 值明显增高($P<0.05$)。而休克 1h 组与休克 2h 组 W/D 值则无明显差异($P>0.05$)。见表 1。

2.3 血浆 TNF-α,IL-10 浓度的变化

组间比较:休克前各组 TNF-α 及 IL-10 浓度对比无显著性差异($P>0.05$);休克后 B、C 组血浆 TNF-α、IL-10 浓度明显高于 A 组($P<0.01$),且 C 组血浆 TNF-α 浓度较 B 组浓度明显增高($P<0.01$),但 B 组与 C 组血浆 IL-10 含量无显著性差异($P>0.05$)。组内比较:A 组动静脉穿刺前后血浆 TNF-α、IL-10 浓度无显著性差异($P>0.05$),B、C 组休克后血浆 TNF-α、IL-10 浓度较各自休克前明显增高($P<0.05$)。见表1。

2.4 肺组织 CD40、CD40L 的表达

免疫组织化学法结果显示 B 组与 C 组 CD40、CD40L 染色均呈阳性反应,但强度无明显差异。CD40 及 CD40L 主要在肺泡上皮细胞及支气管粘膜上皮细胞呈不同程度棕染阳性反应,其中细胞膜及细胞浆均可见棕黄色颗粒,而 A 组正常肺组织内未见表达(见图 2,3)。

3 讨 论

CD40 与其配体 CD40L 是一对互补的蛋白质分子,分别属于 TNF 受体和 TNF 超家族成员。CD40 表达在 B 细胞、活化 T 细胞、内皮细胞、血小板、单核细胞等细胞上,CD40L 主要表达在活化的 CD_4^+T 细胞、血小板及单核细胞等细胞上。CD40/CD40L 的相互作用促进 B 细胞增殖、分化和免疫球蛋白的转化;另外 CD40/CD40L 的相互作用上调各种刺激因子,并促进多种细胞因子的产生[3]。因此,CD40 及 CD40L 不仅在体液免疫和细胞免疫中发挥重要作用,而且在炎症反应中起重要作用。炎性损伤时,血中炎性细胞渗出,在趋化因子作用下聚集在某一部位肺组织,通过 CD40/CD40L 机制与组织细胞相互作用,引起细胞生物学行为改变,如炎症介质的释放,细胞间黏附分子的表达、环氧合酶 COX-2 的合

维普资讯 http://www.cqvip.com

成[4]。炎症后期,通过 CD40/CD40L 交联,成纤维细胞增生、聚集,合成并释放胶原蛋白,沉积在组织局部,引起纤维化。

本研究结果显示,失血性休克后肺组织中出现 CD40 及 CD40L 表达,主要表达在肺泡上皮细胞及支气管粘膜上皮细胞,而正常肺组织未见表达。本研究还观察到,失血性休克兔肺组织 W/D 重比正常对照组明显增高,光镜下肺组织病理学检查结果显示肺充血,间质水肿及炎症细胞聚集,提示失血性休克后肺组织有炎症反应的发生。由此可见,CD40 及 CD40L 在失血性休克后的肺组织中的表达与肺组织炎症反应的发生有一定关系。根据本研究结果发现在失血性休克后,血浆中 TNF-α 浓度随休克时间的延长而增高。同时血浆中抗炎介质 IL-10 浓度在休克后较休克前明显增高,但休克后 1h 和休克后 2h 相比无明显变化。这表明失血性休克后机体炎症介质 TNF-α 的释放强度强于抗炎介质 IL-10 的释放,这进一步说明了失血性休克后机体内发生了失控的炎症反应,这正是引发肺损伤的重要原因。但我们发现,CD40 及 CD40L 在休克后 1h 及休克后 2h 肺组织中的表达无明显差异,说明在失血性休克后肺组织中 CD40 及 CD40L 的表达与炎症介质 TNF-α 浓度变化、肺组织的炎症反应及病理损伤程度不一致,可能是此时水平的 CD40/CD40L 足够介导失血性休克后肺组织的炎症反应,也可能是其他因素参与了这种炎症反应,或者是某些抗炎介质如 IL-10 抑制了 CD40/CD40L 的相互作用。

根据本研究结果并结合相关文献报道可以知道,失血性休克后,机体可被激活合成和释放大量 TNF-α,TNF-α 又可促进其他细胞因子和炎症介质的释放,形成炎性网络,产生炎症瀑布效应[5]。在炎症反应早期,肺组织中 CD40 及 CD40L 的数量和分布与 TNF-α 等炎症因子的释放具有共增长的关系[6]。CD40/CD40L 的表达与炎症介质的刺激有关,同时,又促进了炎症介质的产生。CD40/CD40L 的表达参与了肺组织炎症反应的发生,促进了呼吸道中的炎症反应。但只观察了单纯性失血性休克 2h 内 CD40/CD40L 表达的变化,尚不清楚更长时间后 CD40/CD40L 的变化规律。由于肺组织内炎性反应的信号转导机制较为复杂,CD40/CD40L 对失血性休克肺损伤确切的分子机制,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Song Y,Ao L,Raeburn CD,et al. A low level of TNF-α mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor [J]. Am J physiol Lung Cell Mol Physiol,2001;281:677-684.

[2] Strieter RM,Kunkel SL,Keane MP,et al. Chemokines in lung injury:Thomas A. Neff lecture[J]. Chest,1999;116(1 Suppl):103s-110s.

[3] Van Kooten C,Banchereau J. CD40-CD40ligand[J]. J Leukoc Biol,2000;67(1):2-17.

[4] Sime PJ,O'Reilly KM. Fibrosis of the lung and other tissues: new concepts in pathogenesis and treatment[J]. Clin Immunol,2001;99(3):308-319.

[5] Oberholzer A,Oberholzer C,Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity[J]. Shock,2001;16(2):83-96.

[6] Lei XF,Ohkawara Y,Stampfli MR,et al. Disruption of antigen-induced inflammatory responses in CD40 ligand knockout mice [J]. J Clin Invest,1998;101(6):1342-1353.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 168 页)

(12):1032-1038.

[5] Gorg A,Obermaier C,Boguth G,et al. A current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis,2000;21(6):1037-1053.

[6] Bae SM,Lee CH,Cho YL,et al.Two-dimensional gel analysis of protein expression profile in squamous cervical cancer patients [J]. Gynecol Oncol,2005;99(1):26-35.

[7] Wong YF,Cheung TH, Lo KW,et al. Protein profiling of cervical cancer by protein-biochips:proteomic scring to discriminate cervical cancer from nomal cervix[J]. Cancer Lett,2004;211(2):227-234.

[8] 夏其昌,曾 嵘,编著.蛋白质化学与蛋白质组学[M]. 北京:科学出版社,2004.242-248.

(责任编辑:冉明会)