维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2004)05－0644－04

# 细胞粘附分子在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症中的作用

曾春芳，吴亚梅

(重庆医科大学临床学院肺科，重庆· 400016)

【摘　要】目的：制备慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型，探讨细胞间粘附分子－1(ICAM－1)、E－选择素在 COPD 气道炎症中的作用。方法：Wistar 大鼠 20 只随机分为对照阻(A 组，10 只)、模型组(B 组，10 只)；采用两次气管内注入脂多糖(LPS)和反复烟熏的方法制作 COPD 大鼠模型；采用免疫组化法检测 ICAM－1、E－选择素在 COPD 大鼠支气管肺组织中的表达。结果：所建大鼠模型的病理及病理生理学改变基本符合人类 COPD 的特点；模型组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM－1 表达强度显著高于对照组($P<0.01$)，且与支气管肺泡灌洗夜(BALF)中白细胞总数及中性粒细胞数成显著正相关(分别为：$r=0.76$，$P<0.01$；$r=0.65$，$P<0.05$)；模型组支气管肺组织微小血管内皮细胞 E－选择素的表达强度显著高于对照组($P<0.01$)，且与 BALF 白细胞总数及中性粒细胞数成显著正相关(分别为：$r=0.82$，$P<0.001$；$r=0.79$，$P<0.001$)。结论：ICAM－1、E－选择素可能参与了 COPD 气道炎症过程。

【关键词】细胞间粘附分子－1；选择素；炎症；慢性阻塞性肺疾病

【中国图书分类法分类号】R563.5　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－12－31

# The role of cell adhesion molecules in airway inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease

*ZHEN Chunfang, et al*

(*Department of Pulmonary Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the role of intercellular adhesion molecule－1(ICAM－1) and E－selectin in the airway inflammation in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease(COPD). *Methods*: 20 Wistar rats were randomly divided into two groups: the control group(group A, 10 rats) and the model group (group B, 10 rats). COPD rat model was established by intratracheal instillation of lipopolysacharide(LPS) twice and exposure to cigarette smoke daily; the expression of ICAM－1 and E－selectin in rat lung tissue was detected by means of immunohistochemistry(sp). *Results*: The changes in histopathology and pathophysiology in the animal model were similar to those in COPD patients. The expression of ICAM－1 on bronchi and alveolar epithelial and bronchopulmonary capillary endothelial cells of the model significantly increased as compared with the control group($P<0.01$) and was positively correlated with the leukocyte numbers and neutrophils in BALF in the model group($r=0.76$, $P<0.01$; $r=0.65$, $P<0.05$, respectively). The expression of E－selectin on bronchopulmonary capillary endothelial cells the of the model group significantly increased as compared with the control group ($P<0.01$)and was positively correlated with the leukocyte numbers and neutrophils in BALF in the model group($r=0.82$, $P<0.001$; $r=0.79$, $P<0.001$, respectively). *Conclusion*: ICAM－1 and E－selectin may be involved in the process of airway inflammation in COPD.

【Key words】ICAM－1; E－selectin; Inflammation; COPD

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一类主要由慢性支气管炎和(或)肺气肿导致的、以气流阻塞为特征的疾病，目前其发病机制还不十分清楚，普遍认为 COPD 是一种慢性炎症过程。细胞粘附分子(CAMs)是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间相互结合起粘附作用的糖蛋白。近来研究表明 CAMs 可能参与了 COPD 的炎症过程。我们采用气管内注入 LPS 和反复烟熏的方法制作 COPD 大鼠模型，采用免疫组化法检测 ICAM－1(属 CAMs 的免疫球蛋白超家族)、E－选择素(属 CAMs 的选择素家族)在 COPD 大鼠支气管肺组织中的表达，以探讨二者在 COPD 气道炎症中的作用。

作者介绍：曾春芳(1968－　)，女，主治医师，主要研究方向：慢性阻塞性疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com



## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

清洁级成年雄性 Wistar 大鼠 20 只(购自重庆医科大学实验动物中心),体重 160±20g,鼠龄 10 周。

### 1.2 实验方法

1.2.1 动物分组 随机分为两组(1)对照阻(A 组,10 只):大鼠正常饲养,不做任何干预。(2)模型组(B 组,10 只):分别于第 1、15 天气管内注入 LPS(200μg/100μl/只);第 2~14 天,16~32 天每日烟熏两次:每日上下午分别将大鼠置于 72L 的密闭玻璃箱内,将香烟插在 50ml 注射针头上,点燃斤经玻璃箱顶盖的通气孔伸入玻璃箱,先缓慢抽吸烟雾于空针内,再将烟雾推入玻璃箱内,如此反复,使玻璃箱内烟雾浓度达至 5% 左右,大鼠被动吸烟,30min 后将大鼠移出玻璃箱。32 天后进行以下实验。

1.2.2 呼吸功能测定 采用小动物肺功能测定仪测定吸气相阻力 Ri、呼气相阻力 Re、用力肺活量 FVC、0.3s 用力呼气容积 $FEV_{0.3}$。

1.2.3 标本处理 用 Hank's 液 10ml 分 3 次行左肺支气管肺泡灌洗,总问收率为 50%~80%,灌洗液行白细胞计数及分类;于右下肺矢状面最大周径处横贯取材,10% 甲醛固定,24h 内石蜡包埋、切片。

1.2.4 ICAM-1、E-选择素的检测 采用链霉菌抗生物素蛋白—过氧化酶法(武汉博士德公司 SP 即用型试剂盒)在石蜡切片上测 ICAM-1、E-选择素的免疫组化表达,一抗为 1:100ICAM-1 和 E-选择素多克隆抗体,二抗为生物素山羊抗兔 IgG,阴性对照标本除以 PBS 代替一抗外,其它步骤与被测标本相同,阳性反应为胞浆中出现棕黄色颗粒。

1.2.5 结果分析 免疫组化结果采用多功能彩色病理图象分析系统处理。每张切片在高倍镜下(40×10 视野)随机选择含支气管的视野 5 个,测量支气管肺组织阳性呈色区域的平均积分光密度值,取 5 个视野的平均值间接作为所测指标的蛋白表达量。

### 1.3 统计学方法

全部数据计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 来表示。用 SAS 统计软件行 $t$ 检验及直线相关与回归分析。

## 2 结 果

### 2.1 COPD 模型鉴定

2.1.1 COPD 模型组病理学改变 模型组支气管肺组织病理表现基本符合人类慢性支气管炎及阻塞性肺气肿的特点。光镜下见支气管纤毛柱状上皮细胞部分脱落,杯状细胞增生,支气管粘膜下肌层增生、肥厚,粘膜层、粘膜下层及肌层大量炎性细胞浸润;细支气管壁周围可见较多炎性细胞浸润,肺泡壁变薄、胀大、破裂或形成大泡,弹力网破坏。

2.1.2 BALF 白细胞计数及分类 模型组 BALF 白细胞总数及中性粒细胞数较对照组显著增高,单核-巨噬细胞所占构成比显著降低,但绝对数仍高于对照组,见表 1。

2.1.3 呼吸功能结果 模型组 Ri、Re 均显著高于对照组,$FEV_{0.3}$/FVC 则显著低于对照组,见表 2。

**表 1 两组 BALF 中白细胞计数及分类比较($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | 白细胞计数 ($\times10^8$)/L | 细胞分类(%) M | N | L |
|---|---|---|---|---|
| A 组($n=10$) | 1.72±0.56 | 87.30±2.79 | 7.50±1.72 | 5.20±1.62 |
| B 组($n=10$) | 4.10±0.76* | 71.30±5.56** | 22.50±3.98* | 6.00±2.26 |

注:M:单核-巨噬细胞,N:中性粒细胞;L:淋巴细胞;与 A 组比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$。

**表 2 两组呼吸功能结果比较($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | Ri | Re | $FEV_{0.3}$/FVC |
|---|---|---|---|
| A 组($n=10$) | 27.22±1.37 | 30.32±4.94 | 84.42±9.51 |
| B 组($n=10$) | 36.39±6.27* | 36.48±5.86* | 70.68±4.64* |

注:Ri:吸气阻力,Re 呼气阻力,$FEV_{0.3}$:0.3s 用力呼气容积,FVC:用力肺活量;与 A 组比较,* $P<0.05$

### 2.2 支气管肺组织 ICAM-1、E-选择素免疫组化结果

2.2.1 光镜下 模型组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM-1 表达阳性(图 1),对照组呈弱阳性(图 2);模型组支气管肺组织微小血管内皮细胞 E-选择素表达呈阳性(图 3):对照组呈阴性(图 4)。

2.2.2 两组支气管肺组织 ICAM-1、E-选择素阳性呈色区域平均积分光密度值比较 模型组与对照组相比显著增高,见表 3。

**表 3 两组支气管肺组织 ICAM-1、E-选择素表达程度比较($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | ICAM-1 | E-选择素 |
|---|---|---|
| A 组($n=10$) | 0.14±0.03 | 0.05±0.02 |
| B 组($n=10$) | 0.37±0.06* | 0.26±0.05* |

注:与 A 组比较,* $P<0.01$。

### 2.3 相关性分析

模型组支气管肺组织 ICAM-1 的表达与 BALF 中白细胞总数及中性粒细胞数成显著正相关(分别为:$r=0.76$,$P<0.01$;$r=0.65$,$P<0.05$);模型组支气管肺组织 E-选择素的表达与 BALF 中白细胞总数及中性粒细胞数呈显著正相关(分别为:$r=0.82$,$P<0.001$;$r=0.79$,$P<0.001$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



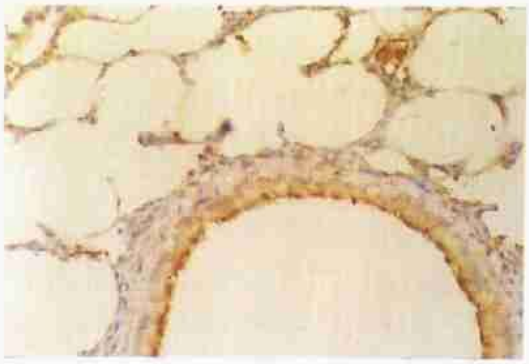


图 1 模型组大鼠:支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、肺组织微小血管内皮细胞 ICAM－1 呈阳性表达。SP×400

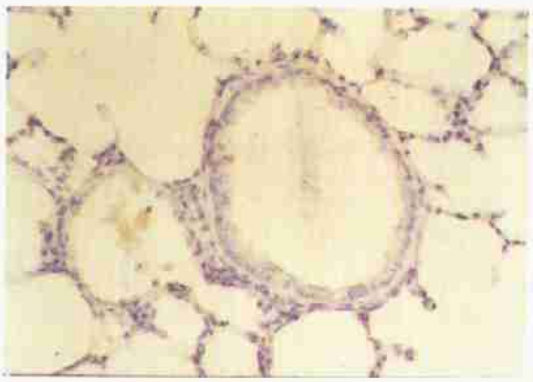


图 2 对照组大鼠:支气管肺组织 ICAM－1 呈低水平表达。SP×400

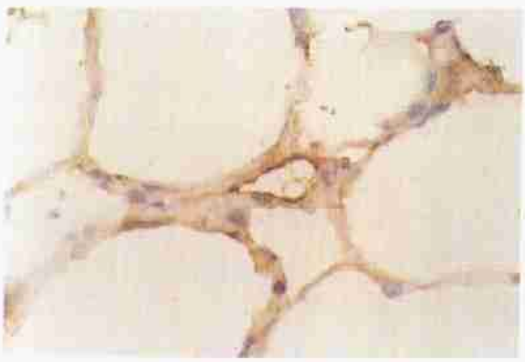


图 3 模型组大鼠:肺组织微小血管内皮细胞 E－选择素呈阳性表达。SP×1000

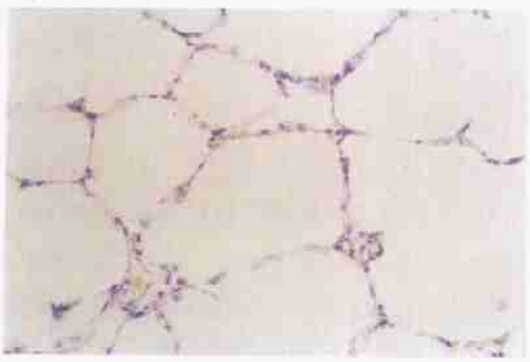


图 4 对照组大鼠:支气管肺组织 E－选择素表达呈阴性。SP×400

## 3 讨 论

本文采用两次气管内注入适量 LPS 和反复烟熏的方法[1],制作 COPD 大鼠模型。结果表明,模型组支气管肺组织病理形态学基本符合人类慢性支气管炎及阻塞性肺气肿的特点;模型组呼吸功能检测 Ri、Re 均显著高于对照组,而 $FEV_{0.3}$/FVC 则显著低于对照组,表明模型组存在气流阻塞;模型组 BALF 中的白细胞总数及中性粒细胞数显著高于对照组($P$ 均$<0.01$),单核－巨噬细胞所占构成比显著低于对照组,但巨噬细胞绝对计数增加,表明气道腔存在以中性粒细胞及巨噬细胞为主的炎症。本模型的制备是成功的。

CAMs 作为一种起粘附作用的糖蛋白,其对机体发育、维持组织结构、介导炎症反应、肿瘤转移及创伤修复等方面均很重要。研究表明,CAMs 介导了炎症反应中白细胞的跨内皮迁徙及向炎症部位的积聚。CAMs 包括五大家族,即免疫球蛋白超家族、整合素家族、选择素家族、钙离子依赖性家族、H－细胞粘附分子超家族。

ICAM－1 属 CAMs 的免疫球蛋白超家族,其配体为淋巴细胞功能相关抗原－1(CD11a/CD18)和巨噬细胞粘附分子－1(CD11b/CD18),二者均属 $\beta_2$ 整合素。ICAM－1 主要表达于内皮细胞、上皮细胞及淋巴细胞等表面,正常情况下,ICAM－1 呈低水平表达;但当受到炎症因子 LPS、IFN－γ、TNF－α 等的刺激时,其表达数小时后迅速增加,表达上调的 ICAM－1 与其白细胞表面配体的相互作用介导了炎症反应中白细胞跨内皮迁徙及向炎症部位的积聚过程。本实验结果发现模型组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM－1 表达显著增强,与对照组相比($P<0.01$),且与 BALF 中的白细胞数目及中性粒细胞数呈显著正相关(分别为:$r=0.76$,$P<0.01$;$r=0.65$,$P<0.05$),表明 COPD 气道内炎症细胞的聚集与支气管肺组织 ICAM－1 表达上调有关。支气管肺组织微小血管内皮细胞上调的 ICAM－1 对于白细胞跨越血管内皮具有重要作用;而支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞的 ICAM－1 表达上调则有助于中性粒细胞与上皮细胞的粘附,进而引起中性粒细胞游走入气道。Zimmerman 等[2]研究发现,炎性介质的刺激可明显增高白细胞与大鼠肠系膜小静脉内皮细胞的

维普资讯 http://www.cqvip.com



粘附及白细胞游走,而抗 CD11b/CD18 或抗 ICAM-1 单抗均可明显减弱这种粘附和游走。结果表明,白细胞粘附和游走过程是受白细胞上的 CD11b/CD18 和内皮细胞上的 ICAM-1 共同调节的。Michael 等[3]在人类气道上皮细胞及全层气管条体外培养中,用 TNF-α 刺激上皮细胞可使 ICAM-1 表达上调 3-4 倍,其与中性粒细胞的粘附力显著加强;用抗 ICAM-1 单抗可使中性粒细胞与上皮细胞的粘附减少 50%。本实验结果提示 ICAM-1 可能通过介导中性粒细胞的跨内皮迁徙及向气道游走参与了 COPD 的气道炎症过程。Vignola 等[4]对 COPD 患者行支气管刷片检查,结果发现其上皮细胞和杯状细胞上的 ICAM-1 表达增加,与正常对照组相比具有显著差异($P<0.03$);Stefano 等[5]报道 COPD 患者气道粘膜活检组织检查结果中支气管上皮细胞 ICAM-1 表达量增加($P<0.01$)。本实验结果对照组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及血管内皮细胞其 ICAM-1 呈低水平表达,与 ICAM-1 静息状态下在这些细胞有少量表达有关。

E-选择素属 CAMs 的选择素家族,主要表达于血管内皮细胞,其配体主要为 Lewis x($sle^x$)和 $Sle^a$($sle^x$ 的异构体)[6~8],也可识别 L-选择素。E-选择素在静息内皮细胞上含量甚微,但当受到炎症因子 IL-1、TNF-α、LPS 刺激后,数小时即可表达于活化的内皮细胞上。E-选择素与白细胞表面的配体结合,介导炎症部位早期白细胞沿血管内皮细胞的滚动粘附过程。研究显示[9],血管内皮细胞在受到 rIL-1β 刺激后,4~6h 其表面的 E-选择素表达量达高峰,且中性粒细胞与内皮细胞的结合明显增加,而抗 E-选择素抗体可抑制其 80%的结合率。本实验结果显示模型组支气管肺组织微小血管内皮细胞 E-选择素表达较正常对照组显著增强($P<0.01$),且与 BALF 中白细胞总数及中性粒细胞数呈显著正相关(分别为 $r=0.82, P<0.01$; $r=0.79, P<0.001$),表明气道内炎性细胞的聚集与 E-选择素的表达上调有关。提示 E-选择素可能通过介导白细胞-内皮细胞反应参与了 COPD 的炎性过程。Riise 等报道[10]COPD 患者血清 E-选择素含量高于对照组($P<0.001$),且气道内细菌培养阳性的 COPD 患者较细菌培养阴性的 COPD 患者血浆可溶性 E-选择素升高($P<0.01$)。Stefano 等[5]研究显示 COPD 患者支气管活检组织血管上 E-选择素表达增高,与对照组相比呈显著差异($P<0.01$),且高表达的 E-选择素与支气管粘膜浸润的中性粒细胞数目呈正相关($r=0.77, P<0.02$),表明 E-选择素参与了 COPD 的疾病过程。

COPD 是以气道为中心的慢性炎症性疾病。白细胞跨越血管内皮是炎症反应的重要步骤,而白细胞沿血管内皮早期的滚动粘附过程则是白细胞跨越内皮的关键。ICAM-1 对于白细胞跨越内皮具有重要作用,E-选择素则参与了白细胞沿血管内皮早期的滚动粘附过程。白细胞一旦跨越了血管内皮,在趋化因子的作用下逐向气道移行,气道上皮细胞表面的 ICAM-1 有助于白细胞跨越气道上皮进入气道腔,但详细作用机制有待进一步探讨。COPD 的临床治疗效果不甚理想,进一步研究 COPD 炎性机制,研究各种酶、细胞因子、粘附分子在其中的作用,对于指导临床具有重要意义。

## 参 考 文 献

[1] 宋一平,崔德健,茅培英,等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. 中华内科杂志,2000;39(8):556.

[2] Zimmerman BJ, Holt JW, Paulson JC, et al. Molecular determinants of lipid mediator-induced leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules[J]. Am J physiol, 1994; 266(3 pt 2):H847.

[3] Tosi MF, Stark JM, Smith CW, et al. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: Effects on neutrophil epithelial cell adhesion[J]. Am J Respir cell Mol Biol, 1992;7(2):214-221.

[4] Vignola AM, Campbell AM, Chanez P, et al. HLA-DR and ICAM-1 expression on bronchial epithelial cells in asthma and chronic bronchitis[J]. Am Rev Respir Dis, 1993;148(3):689.

[5] Stefano AD, Maestrelli P, Roggeri A, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994;149(3):803.

[6] Polley MJ, Phillips ML, Wayner E, et al. CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-lewis X[J]. Proc Natl Acad SCi USA, 1991;88(14):6224.

[7] Tyrrell D, James P, Rao N, et al. Structural requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin[J]. Proe Natl Acad Sci USA, 1991;88(22):10372.

(下转第 681 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



接测量围斑的 pH 值应该比用唾液做标本来源更为准确。

实验结果还显示,正畸成人和正常成人组的唾液缓冲能力无显著性差异($P>0.01$)。Heintze 等认为,唾液缓冲能力是宿主重要的内源性抗龋因子[8]。据 Ericeon 等研究报告,当唾液中酸性产物增多时,$H^+$ 可与 $HCO_3$ 结合,产生碳酸,进而形成 $CO_2$,$CO_2$ 逸出带走酸性成分,从而起到缓冲作用。本实验中未能观察到两组之间唾液缓冲能力有显著性差异,可能与本实验样本量较小有关,另外,唾液成分复杂且不稳定,不仅人与人之间有差异,而且同一个体在不同时间收集的唾液中成分亦不相同。因此,我们认为,以唾液缓冲能力判定龋活性并不完全有意义。

## 参 考 文 献


[1] 石四箴.龋病活跃性试验的应用研究[J].国外医学口腔医学分册,1997;24(4):204.

[2] Al-Khateeb S, Forsberg CM, de Josselin de Jong E, et al. A longitudinal laser fluorescence study of white spot lesions in orthodontic patients [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1998;113(6):595.

[3] 岳松龄,主编.现代龋病学[M].北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1992;69.

[4] 杨 是,石四箴,主编.口腔预防医学[M].人民卫生出版社,1995;61-62.

[5] Huser MC, Bachni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinic paraneters[J]. Am Jorthod Dentofac Orthop, 1990;97(3):213-216.

[6] 华咏梅.儿童固定矫治中龋病活跃性变化的观察[J].中华口腔医学杂志,2001;36(6):411-413.

[7] 刘加荣.正畸治疗对儿童龋病活跃性的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2003;13(5):267-269.

[8] 杨 是,石四箴,主编.口腔预防医学[M].人民卫生出版社,1995;55-57.


(上接第 647 页)


[8] Nelson RM, Dolich S, Aruffo A, et al. Higher-Affinity oligosaccharide Ligands for E-selectin[J]. J Clin Invest, 1993; 91(3):1157.

[9] Kuijpers TW, Hakkert BC, Hoogerwerf M, et al. Role of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and platelet-activating factor in neutrophil adherence to IL-1-prestimulated endothelial cells[J]. J ImmonoJ, 1991;147(4):1369.

[10] Riise GC, Larsson S, Lofdahl CG, et al, Circulating cell adhesion molecules in lbronchial lavage and serum in COPD patient with chronic bronchitis[J]. Eur Respir J, 1994;7(9): 1673.


(上接第 676 页)促进作用。对于原发性单纯收缩期高血压患者在控制血压的同时,应当注意恢复受损的自主神经、特别是迷走神经功能。

## 参 考 文 献


[1] Kleiger RE, Miller JP, Bigger JT, et al. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 1987; 59: 256-262.

[2] Chakko S, Muling Tapang RE, Huikuri HV, et al. Alterations in heart rate variability and its circadian rhythm in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy free of coronary artery disease[J]. Am Heart J, 1993;26:1364-1372.

[3] Perkiomaki JS, Ikabeimo MJ, Pikkujamsa SM, et al. Dispersion of the QT interval and autonomic modulation of heart rate in hypertensive men with and without left ventricular hypertrophy[J]. Hypertension, 1996;28:16-21.

[4] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognostic implication of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Study[J]. N Eng J Med, 1990;322:1561-1566.

[5] 邓昌明,罗开良.心率变异分析方法及其临床意义[J].四川医学,1996;17:105-108.

[6] Dabrowska B, Dabrowski A, Pmszczyk P, et al. Heart rate variability before sudden blood pressure elevations or complex cardiac arrhythmias in phaeochromocytoma[J]. J Hypertens, 1996;10(1):43-50.