DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.002
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0615-04

论著

内毒素血症时小鼠肺泡巨噬细胞CD14和清道夫受体的表达

陈永华,蒋建新,谢国旗,刘大维,周继红,朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨内毒素肺损伤时,肺泡巨噬细胞逐步由免疫防御型转变为效应型的分子机制。方法 建立内毒素肺损伤动物模型,免疫组化法观察肺泡巨噬细胞CD14及清道夫受体(SR)表达的变化,并辅以计算机图像分析;同时检测肺体指数,肺组织的病理变化及动物存活率。结果 内毒素对CD14的表达呈时间依赖性升高,但加大剂量并未使其进一步增加;SR呈时间及剂量依赖性降低。肺泡巨噬细胞SR、CD14的表达变化与小鼠肺损伤程度及存活率呈平行关系。结论 内毒素致小鼠肺损伤过程中,肺泡巨噬细胞表面SR表达下调以及CD14表达上调可能是肺泡巨噬细胞由免疫防御细胞转化为致炎效应细胞的机制之一。

关键词:肺泡巨噬细胞;内毒素;肺损伤;CD14;清道夫受体
中图法分类号:R392.11;R631.1 文献标识码:A

Expression of CD14 and scavenger receptor in alveolar macrophages of mice with endotoxin-induced lung injury

CHEN Yong-hua, JIANG Jian-xin, XIE Guo-qi, LIU Da-wei, ZHOU Ji-hong, ZHU Pei-fang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the molecular mechanism of the conversion of alveolar macrophages (AMs) from immune defensive cells to effective cells in mice with endotoxin-induced lung injury. Methods The mouse model of endotoxemia was established with intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS) of three different dosages. Expression of scavenger receptor (SR) and CD14 in AMs was observed with immunohistochemistry and analyzed with computer image system. Lung-body index, pathological changes of lung tissues and the survival rate of the mice were studied. Results Expression of CD14 was increased while that of SR was decreased on the surface of AMs in a time-dependent manner, but the former was not further increased with the increase of LPS dosage. Changes of SR and CD14 expression on AMs were paralleled with the severity of lung damages and the survival rate of the mice. Conclusion The down-regulation of SR expression and up-regulation of CD14 expression on surface of AMs might be one of important mechanisms of the conversion of AMs from immune defensive cells to effective cells in acute lung injury.

Key words: macrophages; alveolar; endotoxin; lung injury; CD14; scavenger receptor

肺泡巨噬细胞作为肺局部早期接触外来抗原的吞噬和炎性细胞,其表面既存在介导调理吞噬作用的受体,又存在激活性受体。研究表明[1,2],CD14是内毒素激活巨噬细胞的主要受体,与细胞释放炎症介质有关;巨噬细胞清道夫受体(Scavenger receptor, SR)除在动脉粥样硬化发病机制中发挥重要作用外,还是重要的防御性受体,参与内毒素的清除和灭活作用。本研究通过探讨小鼠内毒素血症时肺泡巨噬细胞表面SR、CD14表达变化及其与内毒素肺损伤的关系,从细胞受体水平为阐明严重创伤或感染后肺泡巨噬细胞逐步由正常的防御性细胞转变为致炎效应细胞的分子机制提供新的认识。

1 材料与方法

1.1 动物模型与免疫组化标本的准备

昆明种雄性小鼠64只,体重(20±2)g,随机分为正常对照

基金项目:国家自然科学基金资助项目(38970833);全军医药卫生杰出中青年基金资助项目
作者简介:陈永华(1969—),男,河南省驻马店市人,硕士,主治医师,主要从事创伤性休克方面的研究。电话:(023)68757434
收稿日期:2000-01-05;修回日期:2000-03-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

组和低(1 mg/kg)、中(5 mg/kg)、高(10 mg/kg)剂量内毒素(LPS)致伤组,各内毒素组又分为注射内毒素后0.5、1、3、5、8 h组,每组4只。经尾静脉注入相应剂量的LPS(*E. coli* 026:B6, DIFCO)复制内毒素血症/肺损伤模型。至相应时相点,动物麻醉后用4%多聚甲醛经右心室灌注固定,取出肺脏,后固定16~18 h,常规石蜡包埋切片,行免疫组化染色。

1.2 SR、CD14检测

采用S-P免疫组化法。石蜡切片5 μm,常规脱蜡,经0.3% H_2O_2-甲醇灭活内源性过氧化物酶,并以5%正常羊血清封闭后,加1∶800 SR(Serotec Ltd,英国)和CD14(Pharmingen,美国)单抗,4 ℃冰箱过夜。1∶200生物素化二抗和辣根过氧化物酶标记链酶卵白素(北京中山公司)分别与切片在37 ℃孵育30 min,DAB显色,苏木精复染。PBS代替一抗作为阴性对照。切片经TECBIAS-6803真彩色生物医学图像分析系统分析,40× 10显微镜下每一切片随机观察8个视野,以积分光密度(IOD)平均值表示CD14及SR表达的相对强度。

1.3 肺损伤检测指标

1.3.1 肺体指数测定 另取昆明种雄性小鼠128只,体重(20±2) g。实验前禁食12 h,自由饮水。随机分组同前,每组8只,称体重(g)并记录。内毒素动物模型的复制同前述,至相应时相点,以1%戊巴比妥钠(35 mg/kg)腹腔注射麻醉后,开胸取出肺脏称重(g),计算肺重与体重的比值。

1.3.2 肺组织病理学观察 小鼠肺损伤后,至相应时相点,解剖观察大体标本;石蜡切片常规HE染色,观察光镜下肺损伤的程度。

1.4 动物死亡率观察

观察各组动物致伤后24 h内死亡率。

1.5 统计学处理

实验所得计数资料用 χ^2 检验;计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,伤后各时相点与正常组相比采用双侧 t 检验;各剂量组之间相比采用单因素方差分析;SR及CD14之间应用相关性分析。

2 结果

2.1 SR表达变化

正常对照组肺泡巨噬细胞表面SR表达相对较高。计算机图像分析显示,注射LPS后1 h,高剂量组肺泡巨噬细胞SR平均IOD值显著低于对照组($P<0.05$),而低剂量组及中等剂量组SR表达变化不明显;但注射LPS 3 h后,3个内毒素剂量组肺泡巨噬细胞表面SR表达均明显减少($P<0.01$),并随时间延长而进行性下调。肺泡巨噬细胞表面SR表达变化与LPS呈明显的量效关系,即随着LPS剂量增加,肺泡巨噬细胞表达SR减少更明显,见表1。

表1 伤后肺组织SR表达变化($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The integral optical density of SR in lung after the infusion of LPS($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group		Time after challenged with LPS(h)				
		0.5	1	3	5	8
Control	317.8±45.4					
1 mg/kg		301.4±55.1	289.4±55.7	263.5±42.3	242.9±43.6 *	208.9±57.5 **
5 mg/kg		304.6±42.5	283.5±35.8	242.4±33.7 *	194.6±27.4 **	152.9±25.0 **
10 mg/kg		287.9±44.2	257.7±31.4 *	189.0±48.2 **	153.2±30.2 **	105.0±30.2 **
F value		0.28	1.27	6.72	13.57	13.40
P		>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2 CD14表达变化

CD14阳性细胞主要为肺泡巨噬细胞,少量分布于肺上皮细胞。注射LPS后1 h,3组CD14平均 D_λ 值有增加趋势,但与正常组比无统计学意义,注射LPS后3 h,3组肺泡巨噬细胞CD14表达增加明显($P<0.05$),并随时间延长均进一步增多,至8 h,3组CD14阳性产物呈弥漫性分布($P<0.01$)。但3组间肺泡巨噬细胞CD14表达差异不显著,见表2。

表2 伤后肺组织CD14表达变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The integral optical density of CD14 in lung after the infusion of LPS($\bar{x}\pm s$)

Group		Time after challenged with LPS(h)				
		0.5	1	3	5	8
Control	118.5±18.3					
1 mg/kg		126.9±20.9	135.9±11.5	164.2±29.3 *	175.2±17.4 **	225.4±28.8 **
5 mg/kg		138.3±15.5	142.7±14.5	172.9±21.3 *	204.0±36.2 **	234.2±33.4 **
10 mg/kg		140.7±23.4	150.1±26.1	183.8±30.6 **	209.7±37.3 **	248.1±53.0 **
F value		1.07	1.18	1.03	2.73	0.66
P		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　SR 与 CD14 表达的相关性

相关分析表明, 低、中、高剂量组 SR 平均 D_A 值与 CD14 平均 D_A 值变化呈显著负相关关系($r=-0.91, -0.93, -0.89$, $P<0.01$)。

2.4　肺体指数的改变

伤后肺水肿的程度(肺体指数)进行性升高, 致伤 1 h 后 3 组间肺体指数差异显著($P<0.01$), 见表 3。

表 3　伤后肺体指数(1×10^{-3})的改变($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of lung-body index (1×10^{-3}) after injection of LPS ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Group		Time after challenged with LPS(h)				
		0.5	1	3	5	8
Control	6.53±0.95					
1 mg/kg		6.59±0.93	7.05±0.54	7.20±0.89	7.31±0.51	7.38±0.58 *
5 mg/kg		7.08±0.54	7.49±0.19 *	7.67±1.20 *	8.19±0.73 **	8.33±0.74 **
10 mg/kg		7.31±1.05	8.20±0.38 **	8.25±0.47 **	8.32±0.36 **	8.92±0.86 **
F value		1.44	17.12	9.76	7.85	8.92
P		>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.5　肺组织病理学改变

注射 LPS 后 3 h, 小剂量组大体观察见表面有针尖样出血点, 至 8 h 出血加重, 呈斑片状出血, 但不超过一侧肺叶的 1/4。光镜下观察炎性细胞浸润及肺间质增厚的程度呈时间依赖性增加。大剂量组解剖观察见伤后 1~3 h 即可出现接近肺叶 1/4~1/3 面积的斑片状出血点, 到 8 h 出现极重度出血, 出血面积超过一侧肺叶的 50%, 光镜观察见大量炎性细胞浸润并可扩散到肺泡腔内, 肺间质及肺泡水肿。中剂量组损伤程度介于二者之间, 见图 1。

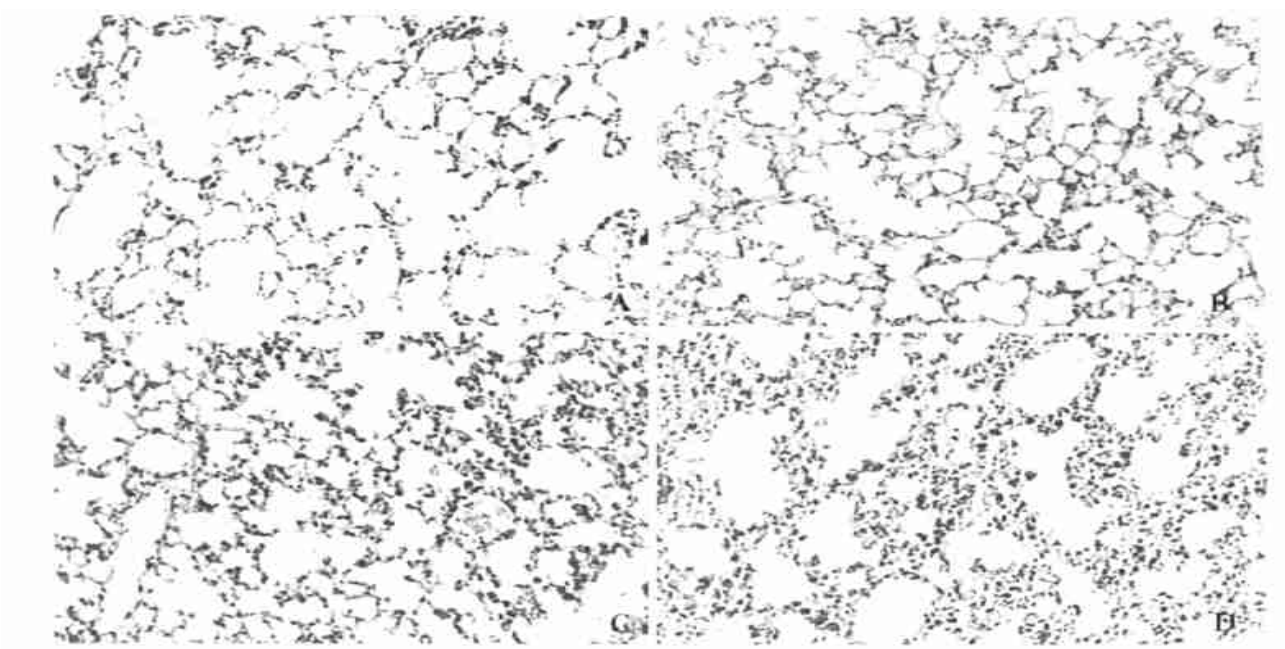


图 1　肺组织病理改变 (HE×400)

A: 正常肺组织; B: 1 mg/kg 组, 伤后 5 h; C: 5 mg/kg 组, 伤后 5 h; D: 10 mg/kg 组, 伤后 5 h

Fig 1　Pathological changes of lung tissues (HE×400)

A: Normal lung tissue; B: 1 mg/kg group 5 h after injury; C: 5 mg/kg group 5 h after injury; D: 10 mg/kg group 5 h after injury

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.6 内毒素血症时小鼠 24 h 死亡率，见表 4

表 4 内毒素血症/休克小鼠 24 h 死亡率观察

Tab 4 Mortality rate of endotoximia/ shock mice in 24 h

Group	Cases			Mortality(%)
	Survival	Death	Total	
1 mg/kg	20	0	20	0
5 mg/kg	12	8	20	40 *
10 mg/kg	4	16	20	80 *△

*: $P<0.01$ *vs* 1 mg/kg group; △: $P<0.01$ *vs* 5 mg/kg group

3 讨论

急性呼吸窘迫综合征(ARDS)是严重创伤或感染后病死率较高的并发症。尽管其发病机制仍不很清楚，但目前认为，由细菌内毒素激活肺泡巨噬细胞，诱导的局部炎症反应失控及免疫防御屏障机能下降是造成肺损伤的重要原因。CD14 为分子量 55×10^3 的糖基磷酯酰肌醇锚定糖蛋白，是内毒素激活髓样细胞的主要途径[3]。SR 是一种由 3 个亚基组成的跨膜糖蛋白，存在于巨噬细胞、肝内皮细胞等表面，可与多种带有负电荷的大分子结合，并将之转移到细胞内降解，是近年发现的介导巨噬细胞吞噬降解细菌脂多糖的受体之一[1,2,4]。对该两种受体在肺损伤中作用的探讨可为阐明 ARDS 的发病机制提供一条崭新的认识途径。

本研究结果显示，肺内 CD14 阳性细胞主要为肺泡巨噬细胞，少量亦分布于肺上皮细胞[5]。正常肺泡巨噬细胞表达微弱的 CD14，却表达强阳性的 SR；内毒素血症过程中，肺泡巨噬细胞表面 CD14 表达呈进行性上调，而 SR 表达呈时间及剂量依赖性下调。提示在机体未受感染时，肺泡巨噬细胞具有正常的防御吞噬功能；随着感染的进行和加重，肺泡巨噬细胞表面 SR 表达下调，CD14 表达上调，通过 SR 结合并降解内毒素的能力下降，而与 CD14 结合则增多，对肺泡巨噬细胞的激活作用增强，可诱导其合成释放过量的炎症介质加重肺损伤。Mendez 等[6]体外研究也发现，经 Ac-LDL 阻断清道夫受体，可明显增强 LPS 对肺泡巨噬细胞 TNF 的诱导生成作用。给 SR 基因敲除小鼠注射 LPS 后，血中 TNFα 水平明显升高，小鼠死亡率显著增加[4]。因此，内毒素肺损伤过程中，肺泡巨噬细胞表面 SR 表达下调、CD14 表达上调可能是促使肺泡巨噬细胞由防御细胞逐步转化为效应细胞的重要机制之一。

相关分析显示，内毒素肺损伤过程中，各内毒素剂量组 SR 与 CD14 的表达变化有显著性负相关，说明这两种受体之间可能存在一定的内在联系。我们推测内毒素致伤后，LPS 可能首先通过 CD14 依赖途径激活局部或循环血中炎性细胞释放炎性介质，这些介质或其中某种介质对 CD14 自身表达起正调控作用，而对 SR 的表达起负调控作用。Hsu[7]通过实验证实 TNF 可以抑制清道夫受体基因的转录、蛋白表达及其与配体的结合活性，因而 TNF 可能就是具有这种双向调控作用的最重要的始动介质。

研究结果还显示，注射内毒素后肺组织水肿程度、肺组织病理改变及动物死亡率也与肺泡巨噬细胞表面 SR、CD14 表达变化呈明显的平行关系。说明随着这两种受体的表达变化，肺泡巨噬细胞吞噬防御功能减弱，致炎作用增强，造成局部炎症反应失控，进而引起急性肺损伤，甚或 ARDS。对创伤或感染时这两种受体表达变化规律认识的不断深入，有助于阐明创伤后免疫机能紊乱的受体机制，可为临床治疗急性肺损伤、ARDS 提供一种新的认识途径。

由于肺泡巨噬细胞表面 CD14 表达上调并未随着内毒素剂量的增加而增多，但不同内毒素剂量组之间动物肺损伤及死亡率却存在差异显著，提示在大剂量内毒素作用时，体内可能还存在其它低亲和力内毒素受体途径[9]。

参考文献：

[1] Fenton M J, Golenbock D T. LPS-binding proteins and receptors [J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(1): 25—32.

[2] Suruki H, Kurihara Y, Takeya M, *et al*. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection [J]. Nature, 1997, 386(6 622): 292—296.

[3] 蒋建新. LBP/CD14 系统及其与内毒素作用的关系[J]. 生理科学进展, 1997, 28(3): 286—288.

[4] Gordon S. Macrophage-restricted molecules: role in differentiation and activation[J]. Immunol Lett, 1999, 65(1-2): 5—8.

[5] Feams C, Kravchenko V V, Ulevitch R J, *et al*. Murine CD14 gene expression *in vivo*: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med, 1995, 181(3): 857—866.

[6] Mendez C, Ronald V. Scavenger receptor blockade augments LPS-induced TNF production by alveolar macrophages[J]. Surgi Forum, 1995, 46(1): 41—44.

[7] Hsu H Y, Nicholson A C, Hajjar D P. Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-α is transcriptionally and post-transcriptionally regulated[J]. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7 767—7 773.

[8] Takakuwa T, Kmorf H, Sing A, *et al*. Induction of CD14 expression in Lpsm, Lpsd and tumor necrosis factor receptro-deffi-cient mice[J]. Eur J Immunol, 1996, 26(11): 2 686—2 692.

[9] Malhotra R, Bird M. L-selectin: a novel receptor for lipopolysaccharide and its potential role in bacterial sepsis[J]. Bioessays, 1997, 19(10): 919—923.

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net