DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.11.020

文章编号: 1000-5404(1999)11-0828-03

低氧急性肺损伤时肺表面活性蛋白的免疫组化研究

崔社怀[1],郭先健[2],钱桂生[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院呼吸内科;[2]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400038)

【提要】 目的: 探讨急性低氧油酸肺损伤大鼠肺组织中 SP-A和 SP-B的表达,明确 SP-A和 SP-B在肺表面活性物质(PS)中的作用,及其对该系统的影响。 方法: 采用低氧大鼠油酸肺损伤模型及免疫组化技术,采用己酮可可碱对急性肺损伤进行干预。 结果: SP-A和 SP-B在肺内的表达主要以肺泡II型上皮细胞为对象,SP-B的特异性较 SP-A高。 肺泡腔和小支气管腔内可见一层免疫阳性物质沉着,肺泡II型上皮细胞多位于肺泡隔部和角部并靠近肺泡腔。 己酮可可碱可使 SP-A蛋白表达增加。 结论: SP-A和 SP-B在肺内的表达主要以肺泡II型上皮细胞为对象,气道上皮和血管内皮以及间质细胞均未见明显的表达,SP-B的特异性较 SP-A高。 急性低氧油酸肺损伤时,肺组织 SP-A和 SP-B免疫组化显示肺泡II型上皮细胞的表达明显减弱。己酮可可碱可使 SP-A蛋白表达增加。

关键词 低氧;肺损伤;表面活性蛋白;己酮可可碱
中图法分类号 R563 文献标识码 A

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)的发病机制非常复杂,自 1967年 Ashbaugh首次报道以来,已经被人们充分认识,其临床特征主要有三大特点: 难以纠正的低氧血症、肺顺应性降低和 X线胸片的弥漫性浸润。尽管试用各种药物,从炎症介质入手试图改善 ARDS患者的预后,但至今均未获得满意的结果,其病死率一直维持在 50%~ 70%,充分说明现有的治疗手段存在不足[1]。近年研究表明,外源肺表面活性物质(Pulmonary surfacant, PS)替代治疗对防止 ARDS发生或减轻其病情、促进肺功能恢复有显著作用[2,3]。同样有资料证明 ARDS患者存在内源性 PS系统的异常[4]。PS各种表面活性指标的异常,其程度与 ARDS病情呈线性关系。不同类型的 ARDS动物模型在病变早期即有 PS的异常变化[5]。由此,ARDS的 PS系统功能的异常及其作为肺损伤过程中的重要内在因素,目前已得到公认。为了进一步明确近年发现的表面活性蛋白 A(Surfactant protein A, SP-A)和表面活性蛋白 B(Surfactant protein B, SP-B)在 PS中的作用,及其对 PS系统的影响,本实验拟观察急性低氧大鼠油酸肺损伤肺组织中 SP-A和 SP-B的表达。

1 材料与方法

实验用雄性 Wistar大鼠 18只,分为正常对照组(对照组)、急性低氧肺损伤组(实验组)和急性低氧肺损伤+己酮可可碱干预组(治疗组)。动物模型的复制: 雄性 Wistar大鼠,体重(250±30)g,放入低压仓内,匀速减压至海拔 6 000 m,持续 12 h。然后从颈外静脉注入油酸复制急性肺损伤模型,并用药物(己酮可可碱)进行处理。试验组、治疗组和对照组各取 6只大鼠右下肺膈叶,10%福尔马林固定,待检查。

肺组织 SP-A和 SP-B免疫组织化学检测[6]。免疫组化用 LSAB组合试剂盒,珠海经济特区生化药品公司,广东。

SP-A, SP-B多克隆抗体: 美国俄亥俄州儿童医学中心 Whitsett教授惠赠。

1.1 标本的制备

常规留取肺组织标本,10%福尔马林液固定,石蜡包埋切片,片厚 4μm 置 40%甲醛明胶包被载玻片上。

1.2 操作步骤

按试剂盒说明书进行,同时设阴性对照。① 二甲苯脱蜡,常规酒精至水,重新湿化组织切片。② 3% H_2O_2孵育 5 min以消除内在过氧化酶反应。③ 用蒸馏水冲洗,再置 Tirs缓冲液浸泡 5 min。④ 加入 1∶20稀释的正常猪血清(阻断剂),37℃孵育 20 min。⑤ 擦去载玻片上多余的水分和猪血清。⑥ 分别加入 1∶800稀释的 SP-A和 SP-B多克隆抗体 20μl,室温孵育 30 min。⑦ 用 0.01 mol/L PBS缓冲液冲洗载玻片并浸泡 10 min。⑧ 加 1∶400倍稀释的生物素标定的猪抗兔免疫球蛋白(联接剂),37℃孵育 30 min。⑨ PBS洗片 10 min。⑩加 1∶400倍稀释过氧化物酶标定抗生链菌素(Streptavidin)20μl,37℃ 30 min。重复步骤⑦。⑪加 DAB基质液(DAB 6 mg 10 ml Tris° Cl pH 7.6, 0.1 ml 3% H_2O_2,过滤后使用)10μl室温孵育 10 min。⑫以蒸馏水冲洗,苏木精-伊红复染。中性树胶封片,光镜观察,照相。

2 结果

结果表明:① 实验组和对照组的 SP-A和 SP-B在肺内的表达主要以肺泡II型上皮细胞为对象,气道上皮和血管内皮以及间质细胞均未见明显的 SP-A和 SP-B蛋白的表达。从肺泡II型上皮细胞表达的特异性看,SP-B的特异性较 SP-A高。肺泡II型上皮细胞,在 SP-B抗体处理组较 SP-A抗体处理组着色明显,易于辨认,见图 1 2 ② 实验组和对照组的肺泡腔内和小支气管腔内可见一层免疫阳性物质沉着,这种现象以 SP-A处理组常见,而在 SP-B处理组则不多见。③ 对照组显示肺泡II

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670336)
作者简介: 崔社怀,男,43岁,副主任医师,副教授,博士
收稿日期: 1999-01-22 修回日期: 1999-07-22

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

型上皮细胞多位于肺泡的隔部和角部并靠近肺泡腔。④ 己酮可可碱治疗组,肺泡腔和小支气管腔中免疫阳性物质明显增加,以 SP-A抗体处理组较显著。结果提示己酮可可碱可使 SP-A蛋白表达增加,见图 3~ 5

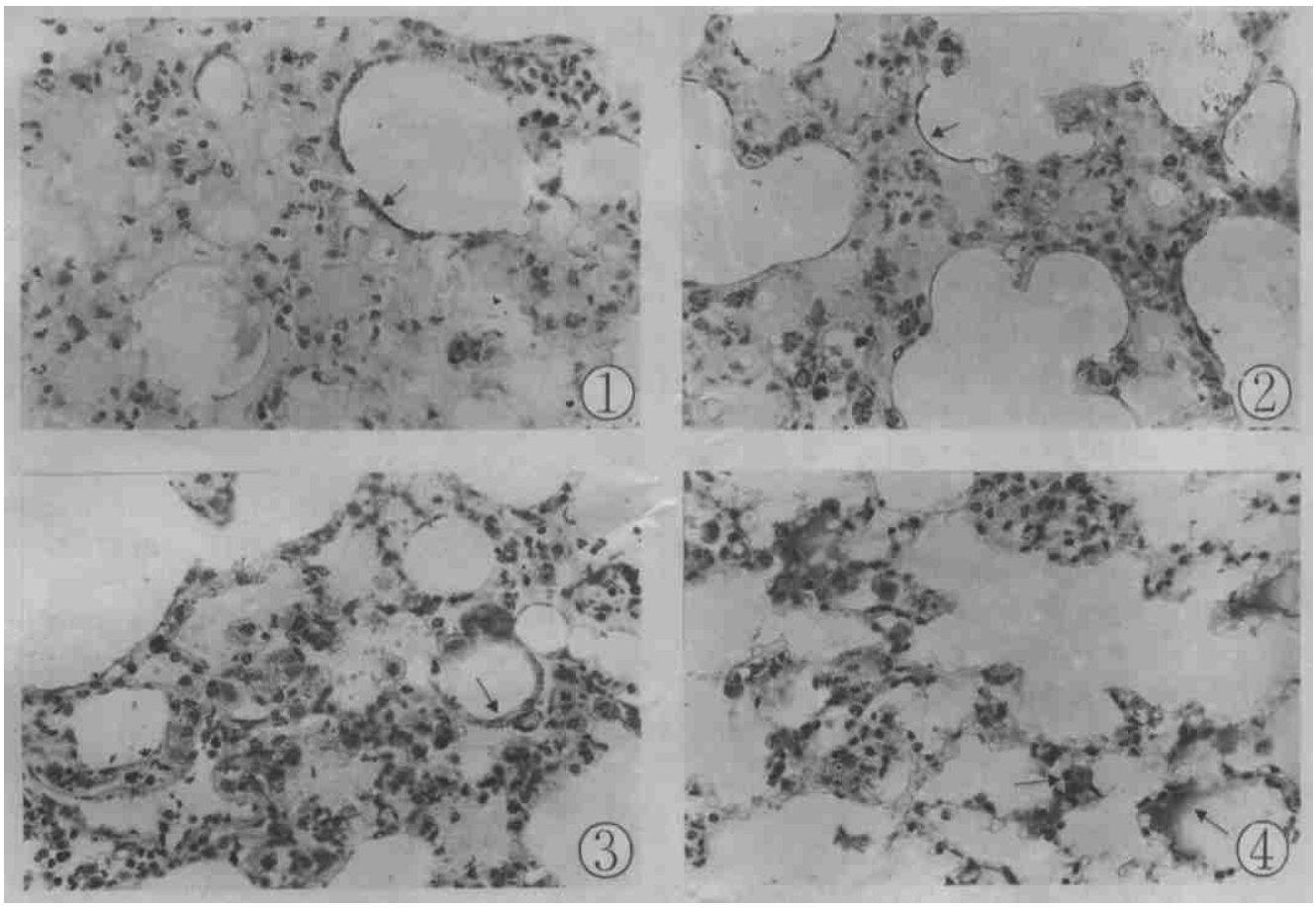


图 1　注射油酸 4 h,大鼠肺组织内 SP-A表达
SP-A阳性物质沿肺泡表面分布,部分肺泡Ⅱ型上皮细胞浆内也可见阳性颗粒(↑)　(LSAB× 200)
Fig 1　Expression of SP-A in the lung tissue of rats 4 h after injection of oleic acid
SP-A positive product was localized at the surface and some in the cytoplasm of type Ⅱ alveolar cell (↑)　(LSAB× 200)
图 2　注射油酸 4 h,大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞 SP-B表达
SP-B阳性颗粒位于肺泡Ⅱ型上皮细胞及肺泡表面　(LSAB× 200)
Fig 2　Expression of SP-B in type Ⅱ alveolar cell of rats 4 h after injection of oleic acid
SP-B positive product was localized at the surface of type Ⅱ alveolar cell and some at the surface of alveoli　(LSAB× 200)
图 3　己酮可可碱治疗 1 h,示大鼠肺组织内 SP-A表达明显增强
SP-A阳性物质位于肺泡腔表面　(LSAB× 200)
Fig 3　Markedly intensified expression of SP-A in lung tissue of rat 1 h after treated with pentoxifylline
SP-A positive product was localized at the surface of alveolar cavity　(LSAB× 200)
图 4　己酮可可碱治疗 2 h,见肺泡Ⅱ型皮上皮细胞 SP-B表达增强,部分肺泡腔也见阳性 SP-B阳性物质　(LSAB× 200)
Fig 4　Intensive positive expression of SP-B in type Ⅱ alveolar cell and some in the alveolar cavity treated with pentoxifylline　(LSAB× 200)

3　讨论

本研究结果表明,SP-A和 SP-B在肺内的表达主要以肺泡Ⅱ型上皮细胞为主,气道上皮和血管内皮以及间质细胞均未见明显的表达。从肺泡上皮细胞表达的特异性看,SP-B的特异性较 SP-A高,可能与 SP-A的产生细胞有关,因为除肺泡Ⅱ型上皮细胞外,小支气管的 Clara细胞也可分泌 SP-A;而 SP-B的来源仅仅见于肺泡Ⅱ型上皮细胞,故其特异性较高。因而肺泡腔内和小支气管腔内可见一层免疫阳性物质沉着,这种

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

现象以 SP-A处理组常见,而在 SP-B处理组则不多见。肺泡II 型上皮细胞多位于肺泡的隔部和角部并靠近肺泡腔。

已经证明, ARDS患者 BALF中 SP-A和 SP-B含量降低,而且有人认为, SP-A含量与 ARDS严重程度之间呈负相关,并把 SP-A和 SP-B含量的减少作为 ARDS的敏感标志物[7]。严重败血症所致的 ARDS患者同样检测到 SP-A和 SP-B含量的减低[7]。本研究结果表明,急性低氧油酸肺损伤时,肺组织 SP-A和 SP-B免疫组化肺泡II 型上皮细胞的表达明显减弱。这种表达的减低可能与肺泡II 型上皮细胞损伤、合成 SP-A和 SP-B的能力下降、加之排泌进入肺泡腔增加有关。所以在急性低氧油酸肺损伤中,肺泡腔沿细胞表面分布的免疫阳性物质沉着。而肺泡II 型上皮细胞着色较淡。至于是否存在肺部的 SP-A和 SP-B的丢失现象,尚未发现直接证据。不过,已有资料报道,肺泡巨噬细胞可以吞噬并降解 SP-A和 SP-B,其结果可能导致了肺内 SP-A和 SP-B表达的降低。

己酮可可碱是黄嘌呤衍生物,晚近报道其对急性肺损伤有一定的保护作用。本研究结果表明,己酮可可碱治疗组,肺泡腔和小支气管腔中免疫阳性物质明显增加,以 SP-A抗体处理组较显著。提示己酮可可碱可使 SP-A蛋白表达增加。这种使 SP-A表达增加的原因,可能是己酮可可碱治疗急性肺损伤的作用机制之一,己酮可可碱尚可抑制 IL1和 TNFα激活白细胞、干扰 TNF遗传信息翻译而治疗急性肺损伤。

(致谢:西南医院病理科刘丽梅技师,阎晓初副教授给予了大力协助,在此深表谢意。)

参考文献

[1] Milberg J A, Davis D R, Steinberg K P, *et al*. Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) [J]. 1983~ 1993. JAMA(中文版), 1996, 15(1): 151- 156.

[2] Weg J G, Balk R A. Safety and potential efficacy of an aerosolized surfactant in human sepsis induced adult respiratory distress syndrome[J]. JAMA, 1994, 272(18): 1433 - 1438.

[3] Spragg R G, Gilliard N, Richman P, *et al*. Acute effect of a single dose of porcine surfactant on patients with the adult respiratory distress syndrome[J]. Chest, 1994, 105(1): 195- 202.

[4] Pison U, Seeger W, Buchhorn R, *et al*. Surfactant abnormalities in patients with respiratory failure after multiple trauma [J]. Am Rev Respir Dis, 1989, 140(4): 1033 - 1039.

[5] Fracica P J, Caminiti S P, Piantadosi C A, *et al*. Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates. Ⅱ. Morphometric analysis [J]. J Appl Physiol, 1994, 76(3): 1002- 1010.

[6] 梁英杰,凌启波.一种快速高敏感的免疫组织化学染色法-LSAB法 [J].中华病理学杂志, 1993, 22(6): 369- 370.

[7] Lewis J F, Veldhuizen R, Possmayer F, *et al*. Altered alveolar surfactant is an early marker of acute lung injury in septic adult sheep [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 150(1): 123- 130.

(编辑 王 红)

Study of pulmonary surfactant associated proteins with immunohistochemistry in oleic acid-induced acute hypoxic lung injury in rats

CUI She-huai, GUO Xian-jian, QIAN Gui-sheng (Department of Respiratory Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To study the expression of SP-A and SP-B in the lung tissues during acute hypoxic lung injury in rats and their effects on the pulmonary surfactant (PS) system. **Methods**: The rat model of acute hypoxia induced with oleic acid was employed. The pattern of SP-A and SP-B expression was observed with immunocytochemical staining on paraffin sections. Acute hypoxic lung injury was treated with pentoxifylline. **Results**: SP-A and SP-B were expressed mainly in the type Ⅱ alveolar cells and SP-B was more highly expressed than SP-A. The administration of pentoxifylline increased the synthesis of SP-A protein during oleic acid induced acute hypoxic lung injury. **Conclusion**: SP-A and SP-B proteins were expressed in type Ⅱ alveolar cells with higher expression of SP-B than of SP-A. Pentoxifylline increased the synthesis of SP-A during acute hypoxic lung injury.

Key words immunocytochemistry; SP-A; SP-B; hypoxia; lung injury

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(39670336)

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