DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.04.003

内毒素诱导急性肺损伤巨噬细胞炎症蛋白-2的表达*

金敬顺** 陈正堂 李胜亮 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 目的: 探讨趋化性细胞因子巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)在内毒素诱导急性肺损伤(ALI)中的可能作用。方法: 采用斑点杂交及原位杂交技术对 ALI大鼠肺组织中 MIP-2 mRNA的表达进行定量和定位研究。结果: 内毒素性 ALI各组大鼠肺组织 MIP-2 mRNA表达量显著高于对照组,且在峰值水平与血浆及肺组织匀浆髓过氧化物酶(MPO)活力呈正相关(r= 0.729, r= 0.885, P < 0.05)。原位杂交发现在 ALI早期肺内巨噬细胞是 MIP-2的主要分泌细胞。结论: 肺巨噬细胞释放的 MIP-2可能是 ALI时多形核白细胞(PMN)在肺内大量浸润并激活的原因之一,因而参与了 ALI的早期发病过程。

关键词 巨噬细胞炎症蛋白-2;急性肺损伤;内毒素
中图法分类号 R563.02; R392.1

本研究用内毒素诱导犬急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)模型,用斑点杂交及原位杂交技术,观察巨噬细胞炎症蛋白-2(Macrophage inflammatory protein-2, MIP-2) mRNA的表达及细胞来源,并观察其对 ALI时肺内多形核白细胞(Polymorphonuclear leukocyte, PMN)浸润的影响,旨在深入探讨 ALI发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

健康 Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),大肠杆菌 O_{111}-B_4内毒素(LPS)(Sigma),含 MIP-2 cDNA质粒(美国 Partricia A. Olson博士惠赠),地高辛标记及检测试剂盒(宝灵曼公司)。

1.2 大鼠内毒素性 ALI模型的建立

健康 Wistar大鼠 50只,雌雄不拘,体重 180~230 g,随机分为内毒素性 ALI 1、3、6、12 h组和对照组。内毒素组静脉注射 LPS 5 mg/kg,对照组注射等量的生理盐水。按设计的时相点放血活杀,留取血浆、肺组织,行支气管肺泡灌洗,收取支气管肺泡灌洗液(BALF)待测。

1.3 鼠源性 MIP-2 cDNA探针的制备及标记

含 MIP-2 DNA的质粒经电穿孔法[1]导入大肠杆菌 HB_{101}中,大量扩增,碱裂解法提取质粒 DNA,用 EcoR Ⅰ酶切后,电泳洗脱法回收 MIP-2 cDNA片段(1 200 bp),见图 1。地高辛随机引物法标记。

1.4 鼠肺组织总 RNA提取

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿-异戊醇一步法[2]。

1.5 斑点印迹杂交

纯化后的目的基因及提取的肺组织总 RNA,经紫外分光光度计定量后,将稀释为不同浓度的目的基因及 10 μg总 RNA直接点于经处理的硝酸纤维素膜上,经烤膜、预杂交、洗膜及显色,薄层色谱扫描仪(日本岛津 CS-9000型) 500 nm波长处扫描,以标准品各点的波形面积为纵坐标,浓度为横坐标,在半对数纸上作图,根据各样品点扫描峰面积确定 MIP-2 mRNA的相对含量。

1.6 鼠肺组织原位杂交

参照文献[3]方法。取 ALI 1 h组及对照组动物肺组织,主要步骤包括固定、切片、消化、预杂交、杂交、漂洗、显色、脱水、封片等。

1.7 血浆及肺组织匀浆髓过氧化物酶(MPO)测定

参照罗武生[4]的方法进行。

1.8 数据处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$表示。有关数据经方差分析、χ^2检验、相关及回归分析法处理。

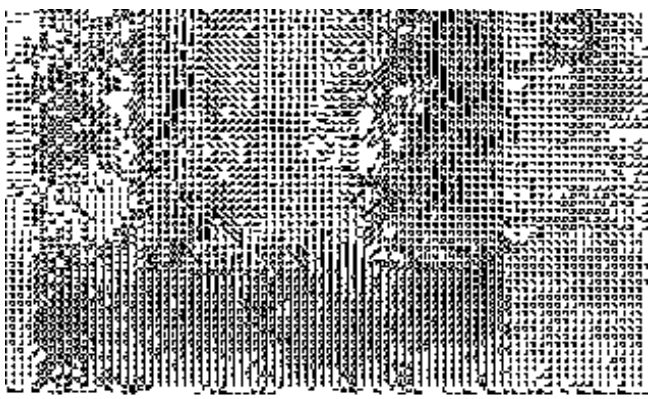


图 1 MIP-2 cDNA质粒酶切电泳鉴定
Fig 1 Identification of plasmid PBR322 containing MIP-2 cDNA by EcoR Ⅰ digestion
A: PBR322 digested by EcoR Ⅰ
B: λ/Hind Ⅲ+ EcoR Ⅰ marker

2 结果

2.1 内毒素诱导 ALI大鼠肺组织病理学变化

ALI大鼠肺组织可见肺间质充血、水肿、出血,肺泡壁增

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670311
** 金敬顺,女,35岁,主治医师,硕士,现在解放军 254医院呼吸内科 天津,300142
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

厚,小动脉周围水肿套形成,细支气管粘膜上皮脱落等。除大量PMN外,尚可见到较多巨噬细胞(Macrophage, MΦ)浸润。

2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)白细胞计数、分类

ALI各组 BALF白细胞总数、PMN分类、计数均显著高于对照组($P < 0.01$)。肺泡巨噬细胞(AM)因 PMN所占比例显著增高而比例下降,但其绝对计数在 ALI 3 h组及以后各组均显著升高($P < 0.05$~ 0.01),见表 1。

表 1 ALI各组及对照组 BALF白细胞计数、分类

Tab 1 The white blood cell count and differential count of BALF

Group	n	Cell count (× 10^6/ml)		
		WBC	PMN	AM
Control	8	3.05± 0.64	0.026± 0.002	0.874± 0.023
ALI 1 h	8	5.15± 2.37*	0.334± 0.054*	0.59± 0.062
ALI 3 h	8	8.23± 2.53*	0.548± 0.063*	0.434± 0.065*
ALI 6 h	8	10.67± 5.57*	0.542± 0.072*	0.357± 0.054*
ALI 12 h	8	9.13± 2.68*	0.434± 0.053*	0.425± 0.058*

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

2.3 肺组织 MIP-2 mRNA定量分析

内毒素性 ALI各组 MIP-2 mRNA表达强度均非常显著高于对照组($P < 0.01$),于 ALI 3 h组达高峰,对照组为(52.6± 7.15) pg/10μg总 RNA,峰值为(267.14± 34.48) pg/10μg总 RNA,见图 2 3。

2.4 肺组织原位杂交

在内毒素性 ALI 1 h组大鼠肺组织中,可见位于肺小动、静脉及细支气管周围,疏松结缔组织内的 MΦ MIP-2表达阳性,表现为胞浆内呈蓝紫色颗粒样着色。对照组阴性,见图 4 5。

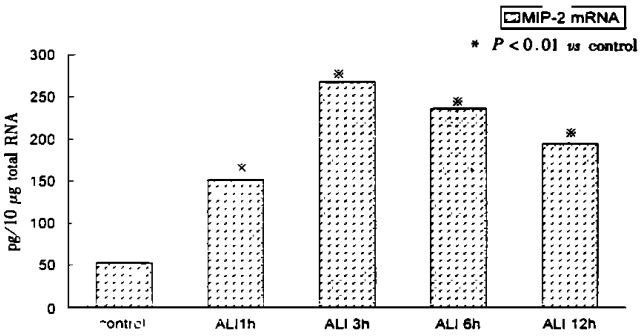


图 2 对照组及急性肺损伤各组 MIP-2 mRNA表达相对含量

Fig 2 The content of expression of MIP-2 mRNA

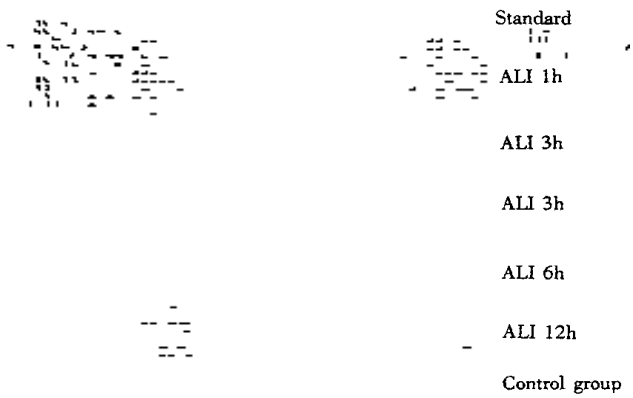


图 3 MIP-2 mRNA表达的斑点杂交检测

Fig 3 The expression of MIP-2 mRNA by dot hybridization

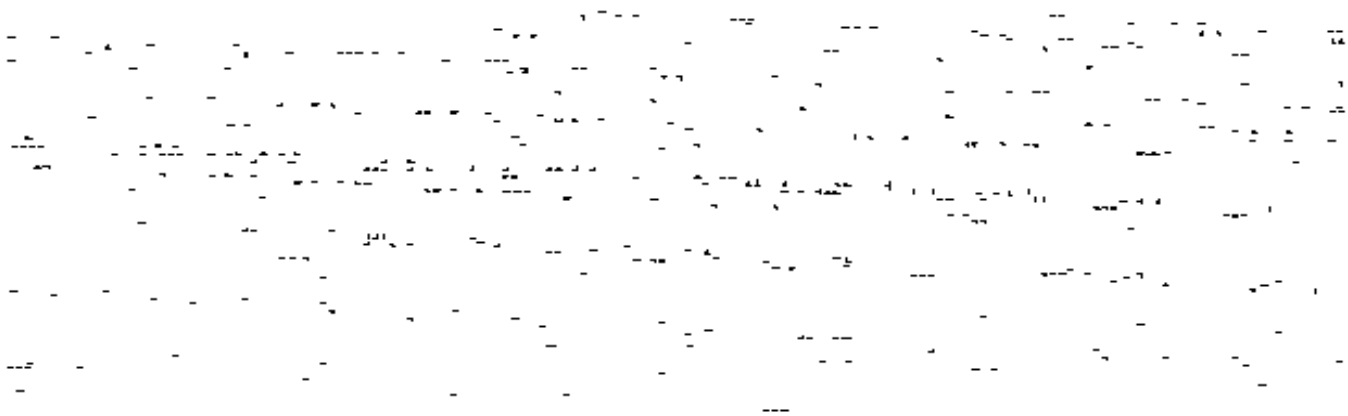


图 4 内毒素性 ALI 1 h组大鼠,可见位于小气管周围的巨噬细胞 MIP-2 mRNA表达阳性 (原位杂交× 210)

Fig 4 The positive signals of MIP-2 mRNA in macrophages surrounding the bronchioles of ALI 1 h group (ISH× 210)

图 5 对照组大鼠肺组织 MIP-2 mRNA表达阴性 (原位杂交× 210)

Fig 5 Negative expression of MIP-2 mRNA in the lung of control group (ISH× 210)

2.5 血浆及肺组织匀浆 MPO活力

血浆 MPO活力在 ALI 3 h及以后各组均显著高于对照组[0.047± 0.017) U/ml],并在 6 h达峰值[(0.228± 0.201) U/ml]($P < 0.01$)。肺组织匀浆 MPO活力,ALI各组高于对照组[(1.321± 0.699) U/g],亦于 6 h达峰值[(2.764± 0.283) U/g]($P < 0.01$),见表 2。

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

表 2　ALI各组及对照组血浆及肺组织匀浆 MPO测定

Tab 2　The MPO activity in plasma and lung homogenate

Group	n	Plasma	Homogenate
Control	8	0.0468±0.0174	1.32±0.699
ALI 1 h	8	0.0498±0.0167	1.85±0.983
ALI 3 h	8	0.1370±0.0340**	2.245±0.385**
ALI 6 h	8	0.2280±0.2010**	2.764±0.283**
ALI 12 h	8	0.1880±0.0186**	1.799±0.170**

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

2.6　MIP-2 mRNA表达和 MPO活力的相关性

血浆及肺组织匀浆 MPO活力与 MIP-2的表达的峰值水平呈正相关($r=0.729$, $r=0.885$, $P<0.05$)。

3　讨论

已有报道,巨噬细胞、单核细胞、成纤维细胞等可分泌 MIP-2,但这些研究多源于体外实验。本实验发现,在 ALI 1 h组动物肺组织内,可见位于小气管及小血管周围疏松结缔组织内的 MΦ MIP-2 mRNA表达阳性,表现为胞浆中许多紫蓝色的阳性颗粒;对照组阴性,提示在 ALI早期,肺 MΦ 是 MIP-2主要分泌细胞[5]。

MIP-2具有肝素结合位点,可与内皮细胞周围的肝素硫酸葡聚糖相互作用,并能上调 PMN表面粘附分子 CD_{11b}/CD_{18}的表达。当浓度为 1~10 nmol/L时,还可引起 PMN呼吸爆发[5]。本实验表明,ALI各组 MIP-2 mRNA相对含量均显著高于对照组($P<0.01$),峰值在注射内毒素 3 h组,6 h组则开始下降;而 ALI组血浆及肺组织匀浆 MPO活力亦显著升高,但于 6 h方达高峰。MIP-2表达的峰值在前,MPO活力升高峰值在后,且 MIP-2 mRNA表达与血浆及肺组织匀浆 MPO活力呈正相关。文献报道,MPO是间接反映炎症部位 PMN数目的良好指标。本实验结果表明,在内毒素性 ALI时,肺巨噬细胞释放的 MIP-2可能是引起 PMN在肺内聚集并造成肺损伤的重要原因,因而在较早阶段参与了 ALI的发病。

参考文献

1 Dower W J, Miuer J F, Ragsdale C W, *et al*. High efficiency transformation of E. coli by high voltage eletroporation. Nucleic Acids Res, 1988, 16(13): 6127

2 Chomozynske P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinum thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analyt Biochem, 1987, 162(1): 156

3 蔡文琴,王伯泓 主编.实用免疫化学与核酸分子杂交技术.成都: 四川科学技术出版社, 1994. 495~496

4 罗武生,郭兆贵.用髓过氧化物酶法定量测定心肌组织中的中性粒细胞.中国药理学通报, 1990, 6(4): 246

5 Xing R, Jordana M, kirpalani H, *et al*. Cytokine expression by neutrophils and macrophages *in vivo*: Endotoxin induces TNFα, MIP-2, IL-1β and IL-6 but not RANTES or TGFβ1 mRNA expression in acute lung inflammation. Am J Respir Cell Mol Bio, 1994, 10(2): 148

6 Driscoll K E. Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammatory. Exp lung Res, 1994, 20(6): 473

(收稿: 1998-06-23;修回: 1998-12-09)

(编辑　冯崇英)

Study of macrophage inflammatory protein-2 mRNA expression LSP-induced acute lung injury*

Jin Jingsun, Chen Zhengtang, Li Shengliang (Research Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract　Objective: To study the potential role of chemotactic macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) in the development of LPS-induced acute lung injury (ALI). Methods: The amount and distribution of MIP-2 were determined in the lungs with ALI. Results: The expression of MIP-2 mRNA was significantly higher in the lungs of the animals with ALI than those of the control ($P<0.01$). In addition, The expression level of MIP-2 mRNA was positively correlated to the activity of myeloperoxidase in the plasma and lung homogenate ($r=0.729$, $r=0.885$ and $P<0.05$). It was confirmed with *in situ* hybridization that pulmonary macrophages were the predominant source of MIP-2 in the early stage of ALI. Conclusion: MIP-2 released mainly from pulmonary macrophages might contribute to the activation and sequestration of polymorphonuclear leucocytes in the lungs challenged with LPS. So MIP-2 might take part in the development of LPS-induced ALI.

Key words　macrophage inflammatory protein-2; endotoxin; acute lung injury

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670311

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net