DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.006


# 哮喘豚鼠嗜酸性细胞浸润和凋亡的动态变化*

赖克方** 王长征 郭先健 钱桂生 (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: 探讨支气管哮喘肺内嗜酸性细胞(Eos)增多与 Eos凋亡异常的关系。方法: 采用卵蛋白致敏的豚鼠哮喘模型和原位细胞凋亡 DNA末端标记检测方法,动态观察肺组织 Eos浸润、支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞学和 Eos凋亡的变化。结果: 致敏豚鼠抗原激发后,血管周围 Eos迁移和浸润主要发生在24 h以内,而支气管周围 Eos浸润和 BALF内 Eos增高持续1周以上。哮喘豚鼠第24 h, 48 h, 72 h Eos凋亡率分别为[(2.1± 1.3)%, (3.7± 2.3)%, (4.6± 2.7)%,显著低于正常豚鼠(10.1± 3.4)%, $P < 0.05$],至168 h才接近于正常水平。结论: 哮喘肺内 Eos凋亡受到抑制,生存时间延长,导致肺内 Eos增多持续存在,在哮喘的发病中可能起着重要作用。

关键词 哮喘;细胞凋亡;嗜酸性细胞;支气管肺泡灌洗
中图法分类号 R562.25

支气管哮喘是种慢性炎症性疾病,涉及多种炎性细胞,其中嗜酸性细胞(Eos)起着尤为关键的作用,无论是哮喘急性期还是缓解期,肺组织内均有明显的 Eos浸润,并与病情严重程度相平行。哮喘肺内 Eos增加和持续存在,除了与骨髓释放、局部粘附趋化作用增强以外,推测还可能与 Eos在肺组织内生存时间延长,即凋亡受到抑制有关[1]。本研究采用原位细胞凋亡检测方法,并结合支气管肺泡灌洗液(BALF)和肺组织病理学检查,动态观察了哮喘豚鼠体内 Eos凋亡的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 哮喘豚鼠模型

雄性豚鼠400 g~ 500 g,本校动物所提供。采用卵白蛋白致敏和激发建立豚鼠哮喘模型,激发时吸入2%卵白蛋白生理盐水1 h,动物分为正常对照组和哮喘激发组,后者再根据哮喘发作后取材的时间进行分组。分别于哮喘激发后1 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 168 h取材。

### 1.2 支气管肺泡灌洗

3%戊巴比妥1 ml腹腔内注射处死动物。气管插管,5%小牛血清的 Hanks液灌洗,每次5 ml共6次。灌洗液回收率达80%以上。

### 1.3 肺组织学检查

处死动物后,从右肺中叶和下叶固定部位切取肺组织块,10%福尔马林固定,常规石包埋切片,HE染色,光镜检查,肺组织 Eos浸润,水肿和上皮损伤程度,参照 Underwood制定的标准进行评分[2]按等级资料作半定量。

### 1.4 Eos分离固定

BALF离心,第1管上清- 70℃保存待测,细胞制成悬液,取少许悬液用于白细胞总计数,Eos绝对计数,分类计数。细胞悬液加终浓度为10 nmol/L的 fMLP(Sigma), 37℃孵育10 min,加于比重调为1.085的 Percoll分离液(Pharmacia)上面,底部为1.100 Percoll, 1000× g离心15 min。离心后取位于1.085和1.100介面之间的 Eos,纯度和活力均> 97%。Eos涂片,玻片预先用 APES粘附剂(中山公司)处理以防脱落,4%多聚甲醛固定30 min,用于下述细胞凋亡检测。

### 1.5 原位细胞凋亡检测

试剂盒购自宝灵曼公司,参照说明书略加修正操作。0.1% Triton 4℃通透2 min, PBS漂洗。加入由末端脱氧核苷酸转移酶(TdT),脱氧三磷酸核苷(dNTP)和荧光素标记的脱氧三磷酸尿苷(dUTP)组成的混合物30 μl, 37℃反应60 min。PBS漂洗,碱性磷酸酶(AP)连接的抗荧光素抗体30 μl 37℃反应30 min,终止反应,BCIP/NBT显色,Eos特异性染色剂复染,光镜下观察。

### 1.6 统计分析

各组 BALF细胞数量和凋亡细胞百分率以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用非配对资料 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 BALF细胞学变化,见表1

未致敏豚鼠 BALF细胞总数为(77± 21)× $10^5$/ml,抗原激发8 h后,细胞总数即显著增高,与正常对照组相比增高300%, 24 h~ 72 h处于高峰时期,至168 h细胞总数仍显著高于正常

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670337
** 赖克方,男,35岁,主治医师,博士研究生
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

($P < 0.001$)。豚鼠哮喘激发后,Eos增高的时间过程与细胞总数的变化类似,72h Eos最高达(246± 84)× $10^5$/ml为正常值的约50倍,Eos增高维持至少168 h

### 2.2 肺组织病理学变化,见表2

未致敏豚鼠病理学检查未发现明显异常,个别豚鼠可见轻度 Eos浸润,但无明显炎性改变。致敏豚鼠抗原吸入1 h即见嗜酸性细胞在血管腔内聚集,血管周围 Eos浸润48 h明显减少,而支气管周围 Eos浸润持续存在,部分形成细胞粘液栓位于管腔内,并有上皮脱落和水肿,见图1

表1　哮喘豚鼠 BALF细胞学变化($\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Time-course of the change in cell numbers in BALF from sensitized guinea-pigs after challenge($\bar{x}\pm s$)**

| Group | $n$ | Time after challenge($t$/h) | Total (× $10^5$/ml) | Eos (× $10^5$/ml) | MΦ (× $10^5$/ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| Control | 6 | | 77± 21 | 5± 2 | 71± 18 |
| Antigen | 6 | 8 | 231± 65* | 99± 29* | 112± 20* |
| | | 24 | 373± 140* | 108± 52* | 201± 34* |
| | | 48 | 353± 129* | 124± 45* | 191± 42* |
| | | 72 | 582± 201* | 246± 84* | 303± 71* |
| | | 168 | 282± 104* | 87± 63* | 172± 101* |

*: $P < 0.001$ *vs* control; MΦ: Macrophage

表2　哮喘豚鼠肺组织炎性变化($n$= 4)

**Tab 2　Inflammatory change in lung tissue from sensitized guinea-pigs after challenge ($n$= 4)**

| Time after challenge($t$/h) | Perivascular eosinophilia | Peribronchiolar eosinophilia | Odema | Epithelial damage |
|---|---|---|---|---|
| Control | 1(0~ 1)* | 0(0~ 1)* | 0(0~ 1)* | 0(0~ 0)* |
| 1 | 2(1~ 2) | 1(0~ 1) | 1(0~ 1) | 0(0~ 1) |
| 8 | 5(4~ 5) | 4(3~ 5) | 2(2~ 2) | 2(2~ 3) |
| 24 | 4(3~ 5) | 5(5~ 5) | 4(4~ 5) | 5(4~ 5) |
| 48 | 1(1~ 3) | 5(5~ 5) | 5(4~ 5) | 4(5~ 5) |
| 72 | 1(1~ 2) | 4(4~ 5) | 4(3~ 4) | 5(5~ 5) |
| 168 | 0(0~ 1) | 3(2~ 5) | 1(1~ 2) | 4(3~ 5) |

*: Grade according to reference 2; presented as median with the range in parenthesis

### 2.3 Eos凋亡变化,见图2

少数凋亡细胞染成紫蓝色,细胞体积缩小,其余正常细胞呈淡红色,表明所分离细胞的高纯度性及本法检测凋亡的特异性。对照组豚鼠 BALF的 Eos凋亡率为(10.± 3.4)%,豚鼠哮喘发作后第24 h,48 h,72 h Eos凋亡率分别为(2.± 1.3)%,(3.7± 2.3)%,(4.6± 2.7)%,显著低于正常豚鼠($P < 0.05$),至第7天,Eos凋亡率升至(8.5± 3.1)%,接近于正常组水平。



图1　豚鼠哮喘发作72 h后肺组织病理改变;大量 Eos聚集在支气管腔内　(HE× 200)

**Fig 1　Bronchial lumen from a sensitized guinea pig 72 h after antigen inhalation containing great many eosinophils**　(HE× 200)

图2　豚鼠哮喘发作24h后 BALF分离的 Eos原位凋亡检测,碱性磷酸酶系统 BCIP/NBT显色,chromotrope 2R复杂,呈紫蓝色者为凋亡细胞　(× 400)

**Fig 2　Apoptosis detection of eosinophils isolated from BALF of a sentizied guinea-pig 24h after antigen inhalation by in situ tailing. Stained with BCIP/NBT and chromotrope 2R. Only two cells are lablled by tailing**　(× 400)

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

## 3 讨论

本研究观察了豚鼠哮喘模型肺内 Eos浸润及凋亡的动态变化。抗原激发后,肺组织和 BALF内 Eos迅速升高,72 h达到最高峰,Eos增高持续 1周以上。血管周围 Eos浸润早于肺组织,抗原激发后 8 h~ 24 h最为明显,此后迅速降低,肺内 Eos浸润过程与既往文献 [2,3]报道基本一致,本研究 BALF回收的 Eos和白细胞的总计数要高于一般文献报道 1~ 2个数量级,可能与抗原吸入时间较长有关。另外本研究发现肺血管 Eos迁移主要发生在抗原激发后 24 h以内,较 Underwood等报道的时间 48 h要短。从 BALF细胞学变化来看,Eos 24 h未达到最高峰,至 72 h Eos进一步增高,这可能是 Eos在肺内发生再分布的结果,即肺泡间质和支气管壁粘膜浸润的 Eos进一步向肺泡和支气管腔内迁移的结果。支气管周围 Eos浸润变化为这一推测提供了佐证。既然肺血管 Eos迁移主要发生在抗原激发后 24 h内,Eos在肺内持续存在 1周以上的时间,提示这些早期浸润的 Eos可在肺内存活 7 d以上的时间。

既往限于方法学的限制,对哮喘体内 Eos凋亡变化知之甚少。外周血 Eos存活时间大约为 25 h[4], Eos在体外只能存活 2 d~ 3 d,但加入细胞因子 IL-3, IL-5或 GM-CSF时,Eos存活时间显著延长,可以存活 1~ 2周 [5,6]。本研究发现哮喘豚鼠肺内 Eos凋亡率很低,抗原激发后 1 d~ 3 d显著低于正常豚鼠,至第 7天 Eos凋亡率升高接近于正常水平。结合肺组织学和 BALF细胞学的变化,本研究结果表明,哮喘体内 Eos凋亡受到抑制,Eos在肺组织内存活时间延长。

细胞凋亡是生物体内存在的一种普遍现象,对维持组织细胞的平衡起着重要作用。凋亡细胞在内切酶作用下发生 DNA裂解,形成许多大约相差 200 bp的 DNA裂解片段,电泳时呈梯状改变,这是检测凋亡最具特异性的方法,但此方法只能观察群体细胞的凋亡现象,对个别细胞凋亡无法进行定量检测,除 DNA凝胶胶电泳外,还有荧光染料染色和形态学观察等方法,均有局限性。本研究采用 DNA末端标记法,可对个别细胞凋亡进行检测,并有较好的特异性和敏感性 [7]。检测的基本原理为:凋亡细胞 DNA裂解后,很多 DNA 3-OH末端暴露,通过 TdT作用,使 DNA裂解片段延升并被标记。

肺内 Eos浸润增加是支气管哮喘的一个显著特征,即使是缓解期哮喘,支气管膜亦可见了 Eos浸润。Eos浸润程度与哮喘的病情严重程度如气道高反应性和 FEV1.0密切相关 [8]。本研究发现支气管 Eos浸润程度与气道上皮损害和组织水肿呈平行关系。激活的 Eos通过释放阳离子蛋白,主要碱基蛋白等多种毒性产物,造成气道上皮损伤,引起气道高反应性。Eos在肺内存活时间延长,将进一步加重气道上皮的损伤,这可能是慢性哮喘迁延不愈的一个重要原因,进一步探讨诱导哮喘体内 Eos凋亡的方法,对指导临床治疗具有重要意义。

## 参考文献


1 Simon H-U, Blaser K. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosinophilia? Immunology Today, 1995; 16(2): 53

2 Underwood S, Foster M, Raebarn D *et al*. Time-course of antigen-induced airway inflammation in the guineapig and its relationship to airway hyperresponsiveness. Eur Respir J, 1995; 8(10): 2104

3 Dunn C J, Elliott G A, Dostveen JA *et al*. Development of a prolonged eosinophil-rich inflammatory leukocyte infiltration in the guinea-pig asthmatic response to ovalbumin inhalation. Am Rev Respir Dis, 1988; 137(2): 541

4 Kroegel C, Virchow Jr J-C, Luttmann W *et al*. Pulmonary immune in health and disease: the eosinophil leucocyte. Eur Respir J, 1994; 7(2): 519

5 Sedgwick J B, Quan S F, Calhoun W J *et al*. Effect of interleukin and granulocyte-macrophage clone stimulating factor on *in vitro* eosinophil function. J Allergy Clin Immunol, 1995; 96(2): 375

6 Zhang S, Mohammed Q, Burbidge A *et al*. Cell cultures from brohchial subepithehial myofibroblasts enhance eosinophil survival *in vitro*. Eur Respir J, 1996; 9(8): 1839

7 Gold R, Schmied M, Giegerich G *et al*. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *In situ* tailing and nick translation techniques. Lab Invest, 1994; 71(2): 219

8 Chapman L D, Morleg J. Eosinophil accumulation and airway hyperreactivity. Eur Respir J, 1996; 9(Suppl 22): 133


(收稿: 1998-01-06;修回: 1998-05-15)

(编辑 王 红)

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

# Dynamic changes in eosinophil infiltration and apoptosis in asthmatic guinea pigs*

Lai Kefang, Wang Changzheng, Guo Xianjian, Qian Guisheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

**Abstract** Objective: To investigate the relationship between pulmonary eosinophil (Eos) infiltration and apoptotic dysregulation in asthmatic guinea pigs. Methods: After the model of asthma was established with ovalbumin sensitization in guinea pigs, the dynamic changes of pulmonary Eos infiltration, cytology of braonchoalveolar lavage fluid (BALF) and apoptosis were observed with *in situ* DNA tailing technique. Results: The increase in Eos infiltration around the blood vessels occurred within 24 h while that around the bronchi and increase of Eos number in BALF persisted for at least 7 d after the sensitization. The rates of Eos apoptosis in asthmatic guinea pigs at the 24th, 48th and 72nd h after the sensitization were respectively (2.1± 1.3)%, (3.7± 2.3)% and (4.6± 2.7)%, which were significantly lower than those in the normal guinea pigs ($P < 0.05$). Conclusion: The Eos infiltration in the lungs is inhibited to result in prolonged increase of Eos, which may play an important role in the pathogenesis of asthma.

**Key words** asthma; apoptosis; eosinophil; bronchoalveolar lavage fluid; guinea pig

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670337

(上接 197页)

色,吻合口通畅,病理见胃窦浆肌层纤维化,未见肌间神经丛及神经节细胞,吻合口周围炎明显。胆酸明显升高。C组:十二指肠肌电图几乎呈一条直线,胃体、底与正常无明显差异,有轻、中度胃潴溜,及胆汁返流。吻合口周围炎性反应明显,胆酸明显升高。

## 3 讨论

传统胃大部切除治疗消化性溃疡已有 100多年的历史,虽然效果肯定,但是并发症多,尤其是切除幽门后致返流性胃炎进一步可发展成残胃癌,越来越受到重视。1969年 Johnston[1]开始用高选迷切治疗十二指肠球部溃疡,其主要优点是:保留了胃窦、幽门的神经,同时保留了幽门+十二指肠的解剖完整性,不需附加引流,不但能达到一定的降酸效果,而且不会发生胆汁返流和胃大部切除术的一些并发症。但是该术式常因迷切不完全以及术后因胃窦 G细胞分泌过多的胃泌素导致复发率增高(一般报道 10%~ 45%)[2],为了克服胃大部切除和 HSV两术式的缺点,我科于 1988年设计了 HSV+ HG治疗消化性溃疡[3]。为了解该术式对预防胆汁返流和对胃功能的影响,我们于 1992年开始进行动物实验研究,从胃肌电图、胆酸测定、病理及术中肉眼观察结果显示,HSV+ HG由于保留了胃窦浆肌层的功能,在其带动下胃及幽门的功能不受影响。HSV+ HG不但能防止胆汁返流,而且,对胃及幽门的功能无影响,在高选迷切的基础上加作含胃窦粘膜在内的半胃切除,可以减少溃疡复发。保留了胃十二指肠解剖完整性,不会发生胃大部切除的一些并发症,认为是目前治疗溃疡病较理想的术式,值得临床推广应用。

关键词　胃疾病/外科手术;高选迷切加半胃切除

中图法分类号　R656.6

## 参考文献

1 Johnston D. Highly selective vagotomy without a drainage procedure in the treatment of duodenal ulcer. Br J Surg, 1970; 57: 289

2 孙念绪,蔡志民.防止胆汁返流的术式-高选迷切加半胃切除(附 110例临床分析).中国实用外科杂志, 1997; 17(7): 414

3 孙念绪,马宏敏.治疗消化性溃疡的新术式-HSV加 PALPHG.医师进修杂志, 1992; 15(3): 35

(收稿: 1997-12-03;修回: 1998-05-25)

(编辑　冯崇英)

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