

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.09.002

吸烟诱导肺气肿大鼠血清 AECA 的表达及甲基波尼松龙的干预影响^{*}

张 璐,王中新,马 丽[△],张 程,张湘燕

(贵州省人民医院呼吸与危重症医学科,贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探讨吸烟诱导肺气肿大鼠血清抗血管内皮细胞抗体(AECA)的表达,分析甲基波尼松龙对其干预影响。**方法** 将 39 只大鼠随机分为对照组、吸烟大鼠肺气肿模型组(模型组)、甲基波尼松龙干预组(干预组)。模型组及干预组进行烟雾暴露被动吸烟 1 个月时,对干预组腹腔注射甲基波尼松龙(每天 1 次,每周 6 d)。烟雾暴露 90 d 后,比较各组大鼠血清 AECA、支气管肺泡灌洗液(BACF)中白细胞介素-8(IL-8)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及肺组织中肺平均内衬间隔(MLI)、平均肺泡数(MAN)的差异。**结果** 模型组血清 AECA 比对照组、干预组升高($P<0.05$);模型组 BALF 中 IL-8、TNF- α 、MMP-9 水平较对照组、干预组均升高($P<0.05$)。**结论** AECA 参与吸烟诱导肺气肿大鼠形成,甲基波尼松龙可降低 AECA 及细胞炎症因子水平,并影响肺气肿的形成。

[关键词] 肺气肿;甲基波尼松龙;抗血管内皮细胞抗体;支气管肺泡灌洗液;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素 8;基质金属蛋白酶 9

[中图分类号] R563.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)09-1156-03

Expression of serum anti-endothelial cell antibody in emphysema rats induced by smoking and intervention effect of methylprednisolone^{*}

Zhang Lu, Wang Zhongxin, Ma Li[△], Zhang Cheng, Zhang Xiangyan

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of anti-endothelial cell antibody AECA in the emphysema rats induced by smoking and to analyze the intervention effect of methylprednisolone on it. **Methods** Thirty-nine rats were randomly divided into the control group, smoking rat emphysema model group (model group) and methylprednisolone intervention group (intervention group). The model group and intervention group conducted the 1-month passive smoking by smog exposure. The intervention group was intraperitoneally injected by methylprednisolone (once daily, 6 d per week). After exposing to smog for 90 d, the differences of serum AECA level, IL-8, MMP-9 and TNF- α level in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung MLI and mean alveolar number (MAN) were compared among groups. **Results** Compared with the control group and the intervention group, the level of serum AECA in the model group was significantly increased ($P<0.05$); Compared with the control group and intervention group, the IL-8, TNF- α and MMP-9 levels of BALF in the model group were also increased ($P<0.05$). **Conclusion** AECA participates in the smoking induced emphysema formation; methylprednisolone may decrease the level of AECA and cell inflammatory factors and affects the emphysema formation.

[Key words] pulmonary emphysema; methylprednisolone; anti-endothelial cell antibodies; bronchoalveolar lavage fluid; tumor necrosis factor- α ; interleukin-8; matrix metalloproteinase 9

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种严重危害人类健康的常见病、多发病,病死率较高,并给患者及其家庭和社会带来沉重的经济负担。该病是一种以持续气流受限为特征的,同时也可以预防和治疗的疾病,其气流受限多呈进行性发展,与气道和肺组织对烟草烟雾等有害气体或有害颗粒的慢性炎症反应增强有关^[1]。当前,该病发病机制尚未完全清楚,治疗效果不尽人意。COPD 患者肺内炎症细胞以肺泡巨噬细胞、中性粒细胞和 CD4⁺ T 细胞为主,激活的炎症细胞释放多种炎性介质,包括白三烯 B₄、白细胞介素 8(IL-8)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等^[1]。越来越多的研究表明,自身免疫反应、肺泡隔细胞凋亡在肺气肿甚至 COPD 的形成过程中具有重要的作用^[2],被认为是解释 COPD

发病的新的机制,因此越来越受到国内外学者的关注和重视。

抗血管内皮细胞抗体(AECA)是一组针对血管内皮细胞膜表面结构抗原的异质性抗体,它可出现在多种自身免疫疾病当中^[2]。说明该抗体的产生可能是诱发自身免疫反应的重要因素之一,许多研究表明 COPD 的形成也和自身免疫反应有关^[3-5],尤其是有学者还发现在终末期肺气肿患者血清中检测到 AECA^[6]。有研究证明,COPD 发病和 AECA 有关,故由此可推测,AECA 亦有可能在肺气肿形成中起着重要作用,而且和疾病严重程度相关。大量的事实证明 COPD 急性加重期患者在标准治疗的基础上加用糖皮质激素能够更快地缓解症状、减缓肺功能下降^[7]。因此,结合上述相关内容,可进一步推测:皮质类固醇激素有可能通过抑制 AECA 的表达,阻断其诱发

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060006)和(81060006)十(7)国家科技支撑计划课题资助项目(2013BAI09B09);贵州省科学技术基金资助项目[黔科合 J 字(2011)2251]。 作者简介:张璐(1986—),住院医师,硕士研究生,主要从事慢性阻塞性肺疾病的诊治研究。 [△] 通信作者, E-mail: maligy@126.com。

的自身免疫机制、气道炎症反应从而达到防止肺气肿发生的可能。为此,本实验通过建立吸烟诱导的肺气肿大鼠模型,进一步验证 AECA 在肺气肿发病中的作用并探讨其相关机制,以期完善肺气肿的发病机制及寻求可能的治疗途径奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:健康雄性 SD 大鼠 39 只,4~5 周龄,体质量 200~250 g,由重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司实验动物中心提供(近交系,清洁级),贵州省人民医院呼吸内科实验室饲养。(2)仪器和试剂:烟雾暴露箱(自制),550 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),DL-5 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂),光学显微镜(OLYBUS BX41TF 日本),-80 ℃冰箱(Thermo Fisher Scientific 公司美国),血清 AECA ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),肺泡灌洗液 TNF-α、IL-8、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)ELISA(武汉博士德生物工程有限公司),注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(美国辉瑞制药有限公司生产批号:H20080284),雄狮牌香烟(浙江中烟有限责任公司,焦油量每盒 9 mg)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 适应性饲养 1 周后采用随机数字表法将 39 只大鼠随机分为对照组、吸烟大鼠肺气肿模型组(模型组)、甲基泼尼松龙干预组(干预组),每组 13 只。

1.2.2 COPD 模型建立及动物处理 方法参照文献[8],将模型组及干预组放入自制的大鼠实验性被动吸烟装置中,点燃 5 支香烟后放入箱内自然燃烧,至香烟燃尽,烟雾消失,共计 15 min,此为 1 次烟雾暴露,5 min 后重复 1 次烟雾暴露,3 h 后重复上述 2 次烟雾暴露。每天共烟雾暴露 4 次,每周 6 d。烟雾暴露达 1 个月时,干预组大鼠按照文献[9]报道的剂量给予甲基泼尼松龙生理盐水溶解液(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)腹腔注射,每周 6 d。第 90 天后终止所有处理并进行以下检测。

1.2.3 标本采集 末次烟雾暴露 24 h 后,参照文献[10]予 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g,腹腔注射)麻醉大鼠后,剖腹下腔静脉抽取静脉血,在 5 ℃、2 000 r/min 离心 10 min,留取血清,-70 ℃冰箱中保存待测。随后,处死大鼠,暴露气管与双肺,将右主支气管的结扎解除,将尖端磨平的 12 号针头连接于 5 mL 注射器,经气管切口向左肺缓慢注入无菌生理盐水 3 mL,每次注入后立即回吸灌洗液(回收率为 80%~90%),并经纱布过滤,重复 3 次^[8]。吸取各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)离心,取其上清液移入无菌瓶内,-70 ℃冰箱中待测。结扎大鼠左主支气管及右中上肺支气管,4%多聚甲醛固定液注入右下肺灌注,直至胸膜展平,右下肺膨胀边缘变锐,30 min 后取出右下肺并置入 4%多聚甲醛中固定 24 h。最后石蜡包埋、切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察 HE 染色的肺组织。

1.2.4 细胞因子的检测 采用 ELISA 检测血清 AECA 及 BALF 中 TNF-α、IL-8、MMP-9 水平,具体操作方法严格按照试剂盒说明书的要求进行。

1.2.5 病理标本形态定量分析 在光镜(×100)下观察,每只大鼠肺组织标本取 3 个切片,每片取 3 个视野。形态分析,在每个视野下正中心划十字交叉线,测出十字线总长(L)和每个视野面积(S),计算与交叉线相交的肺泡隔数(NS)和每个视野内肺泡数(Na),平均内衬间隔(MLI)=L/NS,MLI 表示肺泡平均内径。平均肺泡数(MAN)=Na/S,MAN 用来反映肺泡密度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较方差齐时用 SNK 检验,方差不齐时用 Kruskal-wallis 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较 3 组大鼠在造模前外观、行为、对刺激的反应及活动比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。造模结束后,对照组大鼠的一般指标与造模前比较无明显变化;模型组在造模过程中,出现毛发脱落、萎黄、牙齿偏黄、反应迟钝、活动减少、呼吸频率增快。干预组在烟雾暴露过程中,首先大鼠出现毛发脱落、反应迟钝,但在烟雾暴露 30 d 后予甲基泼尼松龙琥珀酸钠(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)腹腔内注射,随后大鼠毛发、反应及活动度较前好转。在实验过程中,模型组大鼠第 60、72 天时各死亡 1 只,干预组第 70 天时死亡 1 只,原因不详;对照组无动物死亡。

2.2 各组大鼠 BALF 中 TNF-α、MMP-9 及 IL-8 水平比较 模型组及干预组大鼠 BALF 中 TNF-α、MMP-9、IL-8 水平均高于对照组($P < 0.05$);但干预组 BALF 中 TNF-α、MMP-9、IL-8 水平低于模型组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 BALF 中 TNF-α、MMP-9 及 IL-8 水平比较($\bar{x} \pm s$,ng/L)

组别	n	TNF-α	MMP-9	IL-8
对照组	13	190.33±8.18	42.01±1.73	252.09±9.23
模型组	11	272.72±4.82 ^a	62.89±1.41 ^a	358.16±11.46 ^a
干预组	12	230.31±5.79 ^{ab}	50.89±1.79 ^{ab}	293.75±9.31 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

2.3 各组大鼠血清中 AECA 水平比较 模型组、干预组血清中 AECA 水平分别为(149.51±3.55)、(121.49±4.86)ng/L,均高于对照组的(91.27±4.60)ng/L,差异有统计学意义($P < 0.05$);但干预组血清中 AECA 水平低于模型组($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠肺组织 HE 染色切片病理学变化 显微镜下,对照组中肺组织结构正常,肺泡间隔完整,气管壁结构清楚,气管内表面纤毛丰富、整齐,未见脱落现象。模型组的大鼠支气管肺内出现较多的慢性炎性细胞浸润,纤毛脱落、倒状,呈杯状上皮细胞化生,肺泡壁变薄或断裂,肺泡腔扩大,部分融合成肺大泡;在上述变化中,干预组较模型组都相对减轻。与对照组比较,模型组大鼠 MLI 明显增加,MAN 明显减小,表现为明显的肺气肿样改变,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,干预组大鼠 MLI 明显减小,MAN 明显增加($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠 MLI 及 MAN 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MLI(×10 ⁻⁶ m/个)	MAN(×10 ⁶ 个/m ²)
对照组	13	44.30±2.09	433.24±9.32
模型组	11	84.17±8.74 ^a	188.34±11.42 ^a
干预组	12	54.81±7.31 ^b	315.50±16.15 ^b

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

3 讨论

AECA 是一类针对血管内皮细胞膜表面结构抗原的异质性抗体^[11]。AECA 能够识别在人体内皮细胞的多种抗原决定簇,虽然它们的靶抗原和精确的致病作用仍不清楚,但它们结

合到内皮细胞的细胞膜抗原,能诱导血管内皮细胞的损伤,从而导致血管损伤^[12]。近几年,自身免疫机制已经被确认为是 COPD 发病机制之一^[6,13-16]。AECA 已在 COPD 患者中被检测出^[3-4]。在动物模型中进行诱导肺气肿,内皮细胞是其中的一个靶细胞。因此,作者推测,AECA 参与 COPD 的发病。本课题组前期研究表明,COPD 患者血清中发现 AECA 的表达,并发现 COPD 患者较正常对照人群血清 AECA 水平显著增高^[2]。有研究发现在非 COPD 患者或不吸烟患者中,该水平呈低表达或不表达^[17]。

本实验采用肺气肿大鼠模型,实验中发现模型组血清中 AECA 水平较对照组明显升高。结合前述文献支持 AECA 在吸烟诱导的肺气肿发病中有重要意义。目前国内外较多研究表明 TNF- α 、IL-8 和 MMP-9 可参与吸烟诱发的肺气肿形成^[18-20]。本实验表明,模型组大鼠 BALF 中 IL-8、TNF- α 、MMP-9 水平明显高于对照组。和前述文献报道一致,支持上述炎症因子在吸烟诱发的肺气肿形成的重要作用。

皮质醇类固醇能抑制花生四烯酸的代谢,减少白三烯和前列腺素的合成,抑制炎症细胞的定向移动,活化并提高呼吸道平滑肌 β 受体的反应性等^[21]。能够抑制炎症因子合成,如 IL-1、IL-3、IL-2、IL-5、IL-6、IL-8 及 TNF- α 的合成分泌,而诱导炎症细胞的凋亡等。较多研究表明伴随有 AECA 升高的自身免疫性疾病对皮质醇类固醇治疗反应良好,而大量的临床事实证明 COPD 急性加重期患者在标准治疗基础上加糖皮质激素可缓解症状,减慢肺功能下降^[8]。因此,皮质醇激素有可能通过抑制 AECA 的表达,阻断其诱发的自身免疫机制、气道炎症反应从而防止肺气肿发生可能。

本实验表明,甲基波尼松龙干预后大鼠血清中 AECA 水平较模型组显著降低,可说明甲基波尼松龙可干预 AECA 表达,从而对 COPD 治疗起一定作用。干预组 BALF 中 TNF- α 、IL-8、MMP-9 水平较模型组降低。本研究旨在探讨 AECA 在肺气肿形成中的作用及其相关机制,通过实验结果发现 AECA 与吸烟诱发的肺气肿形成;甲基波尼松龙可降低细胞炎症因子水平而干预肺气肿的形成。进一步了解肺气肿的发病机制,为临床上寻求新的治疗方法提供了理论指导。

参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版),2014,36(2):67-79,80.
- [2] 姚红梅,张璐,张程,等. 抗血管内皮细胞抗体在大鼠肺气肿中的作用及其与甲强龙干预的关系研究[J]. 中国生化药物杂志,2014,34(4):8-11.
- [3] Lee SH, Goswami S, Grudo A, et al. Anti-elastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema[J]. Nat Med, 2007,13(5):567-569.
- [4] Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008,177(2):156-163.
- [5] Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, et al. An animal model of autoimmune emphysema[J]. Am J

- Respir Crit Care Med, 2005,171(7):734-742.
- [6] Taraseviciene-Stewart L, Douglas IS, Nana-Sinkam PS, et al. Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease? [J]. Proc Am Thorac Soc, 2006,3(8):687-690.
- [7] Keating GM, McCormack PL. Salmeterol/fluticasone propionate: a review of its use in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Drugs, 2007, 67(16):2383-2405.
- [8] 张程,陈平,蔡珊,等. 重组人 II 型肿瘤坏死因子受体-抗体融合蛋白对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(6):432-436.
- [9] 李莉,王向东. 糖皮质激素抑制慢性支气管炎大鼠气道磷酸二酯酶 4D 和肿瘤坏死因子 α 的表达[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2009,8(6):534-538.
- [10] 张程,张湘燕,罗溶溶,等. 预防性使用英夫利西单抗对肺气肿模型大鼠气道炎症的影响研究[J]. 中国药房,2011,22(37):3480-3482.
- [11] 邓学新,曾学军. 抗内皮细胞抗体临床意义及致病机制[J]. 中华风湿病学杂志,2003,7(3):175-177.
- [12] Blaiss MS. Safety update regarding intranasal corticosteroids for the treatment of allergic rhinitis [J]. Allergy Asthma Proc, 2011,32(6):413-418.
- [13] Cosio MG, Saetta M, Agusti A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease[J]. N Engl J Med, 2009,360(23):2445-2454.
- [14] Agustí A, Macnee W, Donaldson K, et al. Hypothesis: does COPD have an autoimmune component? [J]. Thorax, 2003,58(10):832-834.
- [15] Leidinger P, Keller A, Heisel S, et al. Novel autoantigens immunogenic in COPD patients[J]. Respir Res, 2009, 10(1):20-26.
- [16] Voelkel N, Taraseviciene-Stewart L. Emphysema: an autoimmune vascular disease? [J]. Proc Am Thorac Soc, 2005,2(1):23-25.
- [17] Karayama M, Inui N, Suda T, et al. Antiendothelial cell antibodies in patients with COPD[J]. Chest, 2010, 138(6):1303-1308.
- [18] Zhang XY, Zhang C, Sun QY, et al. Infliximab protects against pulmonary emphysema in smoking rats[J]. Chin Med J, 2011,124(16):2502-2506.
- [19] 邓星奇,修清玉,陈吉泉. 慢性阻塞性肺疾病患者诱导痰中基质金属蛋白酶及组织抑制剂的变化[J]. 中华急诊医学杂志,2009,18(10):1097-1099.
- [20] 马衍茹,马衍刚. COPD 患者血清 IL-6、IL-8 和 TNF- α 水平检测及临床意义[J]. 山东医药,2011,51(27):76-77.
- [21] 刘远波,胡吉智. 地塞米松、氨茶碱联合肾上腺素抢救难治性哮喘发作 2 例[J]. 中国社区医师(医学专业),2012,14(23):218-219.