

· 论 著 ·

N-乙酰半胱氨酸对哮喘小鼠 Clara 细胞及 CC16 的影响

聂小蒙¹, 李 强^{1*}, 戴益民², 倪灿荣²

(1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433; 2. 长海医院病理科)

[摘要] 目的: 观察抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC) 干预对小鼠支气管哮喘模型 Clara 细胞数量及其分泌蛋白 CC16 表达的影响。方法: 卵蛋白(OVA) 致敏, 滴鼻激发建立 BALB/c 小鼠哮喘模型。将小鼠随机分为对照组、哮喘组、NAC 干预组, 每组 10 只。应用免疫组化方法检测各组小鼠肺组织 Clara 细胞数量及细胞内 CC16 含量。Western 印迹法检测支气管肺泡灌洗液(BALF) 中 CC16 含量。结果: 哮喘组小鼠终末及呼吸性细支气管上皮 Clara 细胞分别占上皮细胞的 $(58.05 \pm 3.75)\%$ 及 $(63.70 \pm 1.79)\%$, 与对照组的 $(74.54 \pm 5.81)\%$ 及 $(78.46 \pm 1.68)\%$ 相比差异有显著性 ($P < 0.01$); NAC 干预组为 $(62.74 \pm 1.72)\%$ 和 $(67.47 \pm 3.53)\%$, 与哮喘组相比有所增加 ($P < 0.05$)。同时, 哮喘组 Clara 细胞内 CC16 含量较对照组明显减少 ($P < 0.01$); NAC 干预后, 促进了 CC16 的合成 ($P < 0.05$)。哮喘组小鼠 BALF 中 CC16 蛋白水平为 (35.6 ± 4.0) , 与对照组的 (54.7 ± 5.0) 比较差异有显著性 ($P < 0.01$); NAC 干预组 CC16 蛋白水平为 (44.1 ± 3.2) , 与哮喘组比较差异也有显著性 ($P < 0.05$)。NAC 干预组 BALF 细胞总数及嗜酸粒细胞比例较哮喘组均下降, 气道炎症较哮喘组减轻。结论: 哮喘小鼠的气道炎症可导致 Clara 细胞数量及 CC16 的合成及分泌量减少, 抗氧化剂 NAC 可通过促进 CC16 的合成和分泌抑制气道炎症反应。

[关键词] 哮喘; Clara 细胞; CC16; N-乙酰半胱氨酸

[中图分类号] R 562.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004) 07-0721-04

Effects of N-acetylcysteine on Clara cell and Clara cell 16 000 protein in murine asthma model

N IE Xiao-Meng¹, LI Qiang^{1*}, DA I Yi-Min², NI Can-Rong² (1. Department of Respiratory Diseases, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pathology, Changhai Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of N-acetylcysteine(NAC) on the number of Clara cells and secretion of Clara cell 16 000(CC16) protein in murine asthmatic model. **Methods:** The murine asthmatic model was established by sensitizing and challenging BALB/c mice with ovalbumin(OVA). Thirty mice were divided into control, asthmatic and NAC groups ($n=10$). The number of Clara cells and synthesis of CC16 were determined by immunohistochemistry. The CC16 level in bronchoalveolar lavage fluid(BALF) was determined by Western blot. **Results:** The proportions of Clara cells in terminal and respiratory bronchioles were $(58.05 \pm 3.75)\%$ and $(63.70 \pm 1.79)\%$ in the asthmatic group, $(74.54 \pm 5.81)\%$ and $(78.46 \pm 1.68)\%$ in the control ($P < 0.01$). NAC intervention did not change the number of Clara cells in asthmatic mice. The expression of CC16 in Clara cells of asthmatic group was weaker than that of control group ($P < 0.01$) and NAC group ($P < 0.05$). The level of CC16 in the BALF was (54.7 ± 5.0) in control group, (35.6 ± 4.0) in asthmatic group and (44.1 ± 3.2) in NAC group, respectively (asthma vs control, $P < 0.01$; NAC vs asthma, $P < 0.05$). NAC reduced the total number of white cells and the percentage of eosinophils in BALF, and it also inhibited airway inflammation. **Conclusion:** The number of Clara cells and the secretion of CC16 are reduced in a murine model of asthma. Antioxidants can elevate the synthesis and secretion of CC16, which may be a mechanism for their suppression of airway inflammation.

[KEY WORDS] asthma; Clara cells; CC16; N-acetylcysteine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 721-724]

^[1] Clara 细胞是排列在细支气管上的无纤毛上皮细胞, CC16 是其分泌的主要蛋白之一, 因其相对分子质量约为 16 000 而得名。CC16 能抑制磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 的活性^[1], 是重要的内源性抗炎物质。已有研究^[2,3] 提示, 气道炎症可使 Clara 细胞及 CC16 减少。本研究运用免疫组化和 Western 印迹法, 通过检测抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC) 干预前后, 哮喘小鼠肺组织中 Clara 细胞数量及 CC16 表达的变化, 以研究 Clara 细胞及

CC16 与哮喘发病的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组 6 周龄 BALB/c 小鼠 30 只, 雌雄不限, 体质量 15~20 g, 清洁级, 上海西普

[基金项目] 上海市科委重点科研基金(034119828)。

[作者简介] 聂小蒙(1978-), 女(汉族), 硕士生, 助教

E-mail: xmnjie@hotmail.com

*Corresponding author. E-mail: Liqres@sh163.net

尔-必凯公司提供, 随机分为对照组、哮喘组和 NAC 干预组 3 组, 每组各 10 只。卵蛋白 (OVA, grade V)、DAB 购自美国 Sigma 公司。Marker、NBT/BCIP 购自华舜生物工程有限公司。羊抗小鼠 CC16 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。生物素标记猪抗山羊抗体、碱性磷酸酶标记兔抗山羊抗体、辣根过氧化物酶标记链酶卵白素均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 哮喘模型的建立及各组处理 除对照组外, 其余 2 组小鼠均在第 0、7、14 天腹腔注射 OVA 混悬液 0.2 ml (含 20 μ g OVA, 2.6 mg 氢氧化铝) 致敏, 第 21~26 天鼻腔滴入 50 μ l 2 mg/ml OVA 生理盐水溶液激发。对照组小鼠以生理盐水代替 OVA, 分别腹腔注射及鼻腔滴入。NAC 干预组在第 15~26 天予 230 mg/kg NAC 灌胃, 每天 1 次, 第 21~26 天在 OVA 滴鼻前 1 h 进行^[4]。

1.3 处死及标本采集 全部小鼠于末次激发后 24 h 放血处死。经气管插管分 3 次注入生理盐水进行支气管肺泡灌洗, 每次 1 ml。BALF 离心后, 细胞进行计数及分类, 上清液冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。取整个肺置于 10% 中性缓冲甲醛中固定, 用于 H-E 染色和免疫组化。

1.4 H-E 染色及免疫组化 常规石蜡包埋切片, H-E 染色观察肺组织病理改变。免疫组化: 4 μ m 组织切片, 脱蜡至水, 0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶活性, 微波修复抗原, 10% 猪血清封闭, 山羊抗小鼠 CC16 多克隆抗体 (1:4 000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 生物素标记猪抗山羊抗体 (1:200) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 辣根过氧化物酶标记链酶卵白素 (1:200) 37 $^{\circ}$ C 孵育

30 min, DAB 显色。光镜下观察, 胞质内棕色颗粒为阳性, 计算阳性细胞数^[5]。在每只小鼠的终末或呼吸性细支气管上任取 50 个免疫阳性细胞, 每组共 500 个细胞, 按如下标准计数不同阳性程度细胞的个数: -, 细胞内无棕色颗粒沉淀; $\pm$, 棕色颗粒少量、稀疏; +, 胞质内 1/2 区域出现棕色颗粒沉淀; ++, 胞质内 3/4 区域出现棕色颗粒沉淀; +++, 胞质内全部区域出现棕色颗粒沉淀。

1.5 BALF 中 CC16 蛋白水平测定 将 BALF 冻干浓缩, BCA 法测定总蛋白浓度, 每个样品上样总蛋白量均为 10 μ g, 用 Western 法测定 CC16 水平, 一抗同免疫组化一抗, 二抗为碱性磷酸酶标记的兔抗羊二抗, NBT/BCIP 显色。使用 Fluoro-S 图像自动分析系统对结果进行分析。

1.6 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行组间比较。各组小鼠 Clara 细胞免疫阳性程度比较采用 SPSS 统计软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 肺组织切片 H-E 染色 哮喘组小鼠支气管及血管周围可见大量炎细胞浸润, 以嗜酸粒细胞 (EOS)、中性粒细胞、淋巴细胞为主。支气管上皮细胞肿胀, 且有部分脱落, 部分杯状化生。管壁平滑肌肥大, 基底膜增厚。NAC 干预组上述炎症反应减轻。

2.2 BALF 细胞计数及分类 哮喘组小鼠 BALF 中细胞总数及 EOS 比例较对照组均明显增多 ($P < 0.01$); NAC 干预后, 细胞总数及 EOS 比例较哮喘组均减少 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠 BALF 中白细胞计数及分类

Tab 1 White blood cell count of each subpopulation in BALF mice in different groups

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Total ($\times 10^7/L$)	WBC subpopulation ($\times 10^{-2}$)				
		Eosinophils	Neutrophils	Macrophages	Lymphocytes	Epithelial cells
Control	2.62 $\pm$ 1.36	1.00 $\pm$ 0.41	9.25 $\pm$ 4.21	68.75 $\pm$ 2.33	12.62 $\pm$ 0.25	8.38 $\pm$ 2.29
Asthma	7.85 $\pm$ 1.46**	61.75 $\pm$ 6.48**	13.05 $\pm$ 3.07	14.40 $\pm$ 5.38	7.25 $\pm$ 1.36	3.55 $\pm$ 1.12
NAC	5.77 $\pm$ 1.24**	54.00 $\pm$ 3.32**	23.59 $\pm$ 3.04	3.83 $\pm$ 1.37	12.58 $\pm$ 5.03	6.00 $\pm$ 1.84

** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs asthma group

2.3 免疫组化结果 所有切片的免疫组化阳性染色均集中于细支气管上皮的无纤毛细胞 (Clara 细胞) 上, 主要分布于终末及呼吸性细支气管。哮喘小鼠终末及呼吸性细支气管上皮 Clara 细胞占上皮细胞的 (58.05 $\pm$ 3.75)% 和 (63.70 $\pm$ 1.79)%, 明显少于对照组的 (74.54 $\pm$ 5.81)% 和 (78.46 $\pm$ 1.68)%,

而 NAC 组则分别为 (62.74 $\pm$ 1.72)% 和 (67.47 $\pm$ 3.53)%, 较哮喘组有所增加 ($P < 0.05$)。哮喘组 Clara 细胞免疫阳性强度与对照组有显著差异 ($P < 0.01$), 而 NAC 组与哮喘组有显著差异 ($P < 0.05$), 见表 2。这表明哮喘小鼠 CC16 含量较对照组明显减少 ($P < 0.01$), 而 NAC 组 CC16 含量较哮喘组明显

增多($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠 Clara 细胞免疫阳性强度

Tab 2 Immunostaining intensity of Clara cells in different group

Group	Number of Clara cells				
	-	±	+	##	###
Control	111	39	42	153	155
Asthma	186	56	63	85	110
NAC	162	44	52	93	149

2.4 BALF 中 CC16 分析 对照组 CC16 蛋白水平为(54.7 ± 5.0), 哮喘组为(35.6 ± 4.0), NAC 干预组为(44.1 ± 3.2), 哮喘组 CC16 蛋白表达水平较对照组明显下降($P < 0.01$), NAC 干预组 CC16 蛋白表达水平较哮喘组升高($P < 0.05$), 见图 1。

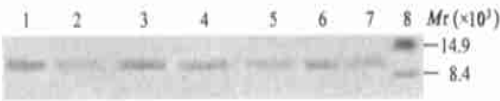


图 1 BALF 中 CC16 蛋白水平

Fig 1 BALF CC16 level in different groups

1, 2: Asthma group; 3, 4: Control group;
5-7: NAC group; 8: Marker

3 讨论

Shijubo 等^[6]通过免疫组化研究发现, 哮喘患者 CC16 阳性细胞占小气道上皮细胞的比例较正常对照明显下降。Lensmar 等^[2]发现哮喘患者在低剂量抗原刺激诱发气道炎症后, BALF 中 CC16 减少; Arsalane 等^[3]发现 LPS 诱发的急性气道炎症, 可使大鼠 BALF 中 CC16 水平下降。本研究结果显示, 哮喘组小鼠终末及呼吸性细支气管上皮 Clara 细胞数量较对照组小鼠明显减少, 细胞内免疫阳性强度(反映 CC16 含量)也明显减弱, BALF 中 CC16 蛋白水平明显降低。此结果与以上研究一致, 都说明气道炎症是导致 Clara 细胞数量下降和 CC16 表达减少的原因。

研究^[7]发现, CC16 启动子 5'侧翼区有 IFN- γ 和肝细胞核因子 HNF-3 β 的结合位点。IFN- γ 可直接或通过干扰素调节因子 1 诱导的 HNF-3 β 升高来间接促进 CC16 基因转录。而 TNF- α 可作用于 CC16 启动子 5'侧翼区, 抑制 CC16 基因的表达^[8]。Ohkawara 等^[9]发现, OVA 致敏及激发建立的 BALB/c 小鼠哮喘模型, IFN- γ 较对照组小鼠降低, 而 TNF- α 水平升高。综合上述研究, 推测哮喘气道炎症时 Th1 型细胞因子 IFN- γ 水平降低及炎性因子 TNF- α 水平升高, 抑制了哮喘小鼠 CC16 基因的

表达, 导致 Clara 细胞中 CC16 含量减少。CC16 减少后削弱了对 PLA₂ 的抑制作用, 使类花生四烯酸类促炎细胞因子生成增多, 导致炎细胞迁移聚集, 分泌炎性因子, 使 CC16 进一步下降。CC16 合成减少导致 BALF 中 CC16 的含量减少。体外实验中, CC16 可抑制 PLA₂ 介导的成纤维细胞趋化^[10]。因而推测 CC16 缺乏使成纤维细胞聚集, 对气道重塑有一定作用, 气道重塑后 Clara 细胞减少。

哮喘气道中的致炎因子使炎细胞分泌活性氧自由基增多。活性氧自由基可通过氧化脂质和蛋白质启动氧化过程, 进一步加重炎症反应。本实验应用抗氧化剂 NAC 干预后, 发现小鼠 Clara 细胞内 CC16 含量及 BALF 中 CC16 水平均较哮喘组升高。已有许多实验证实 NAC 可抑制氧化还原敏感转录因子——核因子 κB (NF- κB) 的合成, NF- κB 控制着许多炎性基因(如 IL-1 β , TNF- α , IL-6 等)的表达^[11]。NAC 可能通过减少炎性因子 TNF- α 等的生成促进 CC16 基因表达, CC16 增多后抑制了 PLA₂ 的活性, 减轻了肺组织的炎症反应。因而 NAC 干预组 BALF 细胞总数和 EOS 比例较哮喘组明显减少, H-E 染色显示肺组织炎症反应也明显减轻。我们认为 NAC 对哮喘的治疗作用, 除了清除哮喘发病过程中增多的氧自由基外, 还可能通过促进 CC16 的合成及分泌来实现。

综上所述, 哮喘气道炎症使 Clara 细胞数量及 CC16 的合成及分泌量减少, 抗氧化剂 NAC 可通过促进 CC16 的合成和分泌抑制气道炎症反应。由于氧化总是与炎症过程并存, 因此抗氧化剂可能会成为哮喘治疗的一个新方向, 其确切治疗机制尚待进一步阐明。

[参考文献]

[1] Levin SW, Butler JD, Schumacher UK, et al. Uteroglobin inhibits phospholipase A₂ activity[J]. *Life Sci*, 1986, 38(20): 1813-1819.

[2] Lensmar C, Nord M, Gudmundsson GH, et al. Decreased pulmonary levels of the anti-inflammatory Clara cell 16 kDa protein after induction of airway inflammation in asthmatics[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(6): 976-981.

[3] Arsalane K, Broeckaert F, Knoops B, et al. Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(5): 1624-1630.

[4] Blesa S, Cortijo J, Martinez-Losa M, et al. Effectiveness of oral N-acetylcysteine in a rat experimental model of asthma[J]. *Pharmacol Res*, 2002, 45(2): 135-140.

[5] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of Clara cells in normal human airway epithelium

- [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 159 (5 Pt 1): 1585-1591.
- [6] Shijubo N, Itoh Y, Yamaguchi T, *et al*. Clara cell protein-positive epithelial cells are reduced in small airways of asthmatics [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160 (3): 930-933.
- [7] Ramsay PL, Luo Z, Magdaleno SM, *et al*. Transcriptional regulation of CCSP by interferon- γ *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284 (1): L108-L118.
- [8] Harrod KS, Jaramillo RJ. Pseudomonas aeruginosa and tumor necrosis factor- α attenuate Clara cell secretory protein promoter function [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26 (2): 216-223.
- [9] Ohkawara Y, Lei XF, Stampfli MR, *et al*. Cytokine and eosinophil responses in the lung, peripheral blood, and bone marrow compartments in a murine model of allergen-induced airways inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 16 (5): 510-520.
- [10] Lesur O, Bernard A, Arsalane K, *et al*. Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A₂-mediated inhibition of fibroblasts migration *in vitro* [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152 (1): 290-297.
- [11] Liu SF, Haddad EB, Adcock I, *et al*. Inducible nitric oxide synthase after sensitization and allergen challenge of Brown Norway rat lung [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 121 (7): 1241-1246.
- [收稿日期] 2003-12-19 [修回日期] 2004-05-15
[本文编辑] 曹 静

· 个案报告 ·

微创内固定系统治疗胫骨多段粉碎性骨折一例报告

Treatment of tibial multi-segment comminuted fracture by less invasive stabilization system: a case report

王秋根, 纪 方, 陆晴友, 李国东, 汪 方

(第二军医大学长海医院骨科, 上海 200433)

[关键词] 微创内固定系统; 胫骨骨折; 骨折; 粉碎性

[中图分类号] R 683.420.5

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X (2004) 07-0724-01

1 临床资料 患者, 女, 71 岁。因面包车撞击致左胫腓骨开放性粉碎性骨折, 右三踝骨折伴腓骨上端骨折, 第8~10双侧多发性肋骨骨折, 硬膜下血肿。急诊以多发伤收住入院, 左胫骨中段内侧有一 5 cm 皮肤破口, 经清创缝合及相关科室协助处理, 病情稳定。入院后 5 d, 经积极术前准备, 对左胫骨多段粉碎性骨折在全麻下行 AO 微创内固定系统 (less invasive stabilization system, L ISS) 钢板内固定术, 术中患者置于骨科牵引床上, 左跟骨骨牵引状态下, 通过手法复位维持左小腿力线, 取左胫骨近段前外侧 S 形微创切口, 切开皮肤约 5 cm, 通过此切口在左胫骨外侧皮下经胫前骨筋膜室插入长 29 cm、13 孔 L ISS 胫骨近端钢板, 插入过程中以拇指置于胫骨嵴, 以确保钢板与胫骨接触与服贴, 并通过 C 臂监测, 获得骨折复位。以 2 mm 克氏针通过定位系统放置在钢板的远近端, 确定定位系统和胫骨的对应关系, 分别在骨折近端、上 1/3、下 1/3、远端通过定位系统各钻入 3、2、1、2 枚自攻自钻型锁定螺钉并与钢板锁定。C 臂 X 线机透视下见左胫骨多段粉碎骨折对位对线满意, 腓骨骨折也同时获得较满意的复位, 切口缝合后左下肢伸膝位石膏托外固定。术后切口一期愈合, X 线正侧位片复查, 骨折对位对线良好 (图 1)。嘱患者左股四头肌主动收缩, 3 周后拆除石膏外固定, 并逐步行左膝关节屈伸功能锻炼, 术后 5 周左膝关节屈伸可达 105°。

2 讨论 胫骨多节段粉碎性骨折的治疗较为棘手, 普通加压钢板虽然可以在开放复位后给予良好的固定, 但对软组织的过度破坏, 使本身缺少血供的骨块更加缺血, 骨不连的发生率大大增加。如使用交锁髓内钉治疗, 由于胫骨近端的



图 1 胫骨多段粉碎性骨折 L ISS 治疗前 (左)、后 (右) 正侧位 X 线片

骨折线距髓内钉开口太近而使髓内钉插入或近端锁钉锁定困难, 常导致固定失败。外固定支架可在此类骨折中运用, 但固定的可靠性令人担忧, 且有针道感染之虞。而运用 AO 的微创内固定系统治疗此类骨折, 有较为独特的优势。

L ISS 钢板包括股骨远端 (L ISS-DF) 和胫骨近端 (L ISS-PT) 两类接骨板, 1999 年由国际内固定研究会 (AO/ASIF) 推荐使用。经全球范围内 4 年的临床应用, 对股骨远端、胫骨近端骨折的治疗取得了较为满意的疗效, L ISS-PT 与胫骨的解剖形态一致, 骨折固定的稳定性是通过自攻自钻型螺钉于钢板螺孔锁定后的成角稳定性来维持, 而普通加压钢板

(下转第 728 页)

[作者简介] 王秋根 (1960-), 男 (汉族), 教授, 主任医师, 博士生导师 E-mail: qiugen@sina.com.cn