

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00706

慢性阻塞性肺病模型大鼠肺组织树突状细胞的数量变化及药物干预效果

马朝辉^{1△}, 张晶^{1△}, 陈若华², 戈霞辉¹, 白冲^{1*}

1. 第二军医大学长海医院呼吸内科, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院特需诊疗科, 上海 200433

[摘要] **目的:**观察慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠肺组织局部树突状细胞(DC)的存在状况,并探讨吸入糖皮质激素布地奈德及抗胆碱能受体支气管扩张剂异丙托溴铵对 COPD 大鼠肺部 DC 数目的影响。**方法:**60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组($n=15$):正常对照组、COPD 模型组、布地奈德组、异丙托溴铵组。后 3 组用两次气管内注入脂多糖(LPS, 200 $\mu\text{g}/\text{只}$)及熏香烟 4 周的复合刺激法建立大鼠 COPD 模型,布地奈德组、异丙托溴铵组于第 8 天起每天吸入相应药液。于第 31 天处死,肺组织切片 H-E 染色观察病理改变,免疫组化染色观察 DC 的表达。**结果:**COPD 模型组、布地奈德组、异丙托溴铵组均出现 COPD 的特征性病理改变,且肺组织内 DC 的数量明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);布地奈德组 DC 数目则较 COPD 模型组明显减少($P<0.01$),异丙托溴铵组 DC 数目与 COPD 模型组比较差异无统计学意义。**结论:**DC 在 COPD 的发病机制中有重要作用,糖皮质激素布地奈德干预可以降低 COPD 大鼠肺部 DC 的数量,异丙托溴铵则无此作用。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病;树突状细胞;布地奈德;异丙托溴铵

[中图分类号] R 563 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0706-04

Presence of dendritic cells in bronchi and lung tissues of rats with chronic obstructive pulmonary disease and influence of budesonide and ipratropium bromide

MA Zhao-hui^{1△}, ZHANG Jing^{1△}, CHEN Ruo-hua², GE Xia-hui¹, BAI Chong^{1*}

1. Department of Respiratory Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of VIP Medicine, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the presence of dendritic cells (DC) in lung tissues of rat models of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and the influence of budesonide and ipratropium bromide on the number of DCs. **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into four groups ($n=15$): control group, COPD model group, budesonide treatment group and ipratropium bromide treatment group. The COPD rat models were established by intratracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS) twice and exposure to tobacco smoke for 4 weeks. Drug inhalation group received inhalation of budesonide (Pulmicort) or ipratropium bromide (Atrovent) since the second week. The rats were sacrificed at the 31th day. Lung slices were observed with H-E staining for pathological changes and the status of DC were determined by immunohistochemical method. **Results:** The COPD model group, budesonide treatment group, and ipratropium bromide treatment group all had the pathological changes of COPD, and their DC numbers were significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). DC number in Pulmicort treatment group was significantly less than that in the COPD model group ($P<0.01$), and there was no significant difference between the Atrovent treatment group and the COPD model group. **Conclusion:** The pulmonary DCs play an important role in the pathogenesis of COPD. Pulmicort can decrease the number of DCs in rat model of COPD, and ipratropium bromide has no obvious effect on DC number.

[KEY WORDS] chronic obstructive pulmonary disease; dendritic cells; budesonide; ipratropium bromide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):706-709]

慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)发病机制复杂,目前认为其受环

[收稿日期] 2009-03-26 **[接受日期]** 2009-05-26

[基金项目] 上海市卫生局科研基金(2006JJ073). Supported by Science Foundation of Health Department of Shanghai Municipal Government (2006JJ073).

[作者简介] 马朝辉, 硕士, 主治医师. E-mail: mzh@yaho.com.cn; 张晶, 硕士生. E-mail: zhangjing2008251@yeah.net

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873232, E-mail: bc7878@sohu.com

境和遗传双重因素的影响^[1]。树突状细胞(dendritic cell, DC)是体内最重要的专职抗原递呈细胞,只有它可以激活初始型 T 淋巴细胞。近期研究^[2]发现 DC 可能参与了 COPD 的绝大多数的病理过程。本研究通过免疫组化方法测定 COPD 大鼠肺部 DC 数目的改变,同时观察吸入糖皮质激素布地奈德及抗胆碱能受体支气管扩张剂异丙托溴铵对 COPD 大鼠肺部 DC 数量的影响,以探讨 DC 与 COPD 发病的相关性,以及吸入布地奈德及异丙托溴铵对 DC 的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 布地奈德(普米克令舒)购自 AstraZenca 公司,异丙托溴铵(爱全乐)购自 Boehringer Ingelheim 公司,抗大鼠 DC 单克隆抗体(OX-62)购自 Biological 公司,S-P 试剂盒购自美国 Maxim Biotech 公司。

1.2 模型制备与分组 COPD 模型参照文献^[3]制备。4 周龄雄性健康 SD 大鼠 60 只,购自第二军医大学实验动物中心,体质量(150.3±6.6)g,随机分为 4 组:正常对照组(A 组),COPD 模型组(B 组),布地奈德治疗组(C 组),异丙托溴铵治疗组(D 组),每组 15 只。B、C、D 组大鼠关在染毒箱内(采用玻璃自制,30 cm×30 cm×90 cm),每天上午熏 1 支牡丹烟(上海卷烟厂生产,烤烟型,每支含焦油 13 mg、烟气烟碱 1.0 mg、烟气一氧化碳 12 mg)0.5 h×2 次(间隔 2 h),1、14 d 气道内滴入脂多糖(LPS, Sigma 公司)200 μg(0.2 ml),滴入脂多糖当日不予被动吸烟。A 组不熏烟,仅第 1、14 天气道内注入 0.2 ml 生理盐水。C 组于制作模型第 8 天起每日下午在 28 L 密闭箱内以雾化器雾吸 1 次皮质激素布地奈德 2 mg(4 ml);D 组于制作模型后第 8 天起雾吸支气管扩张剂异丙托溴铵 1 mg(4 ml),吸入方法及时间同 C 组。

1.3 标本采集及 H-E 染色 4 组大鼠均于实验第 31 天以戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉,剖腹,经腹主动脉放血处死大鼠,迅速开胸取右肺中下叶分离,用 10%甲醛固定,常规石蜡包埋切片,H-E 染色。

1.4 肺组织免疫组织化学染色 新鲜冷冻组织固定,切片,100%丙酮固定 20 min。PBS 漂洗 3×5 min;3% H₂O₂(80%甲醇)滴加在切片上,室温静置 10 min;PBS 漂洗 3×5 min;滴加正常与二抗同源血清封闭液,室温 20 min,甩去多余液体;滴加一抗抗大鼠 DC 单克隆抗体 50 μl,4℃过夜,PBS 漂洗 3×5 min;滴加兔抗 HRP-IgG 的二抗 40 μl,室温静置 45 min;PBS 漂洗 3×5 min;DAB 显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度;PBS 漂洗 10 min;苏木精复染

2 min,盐酸乙醇分化,自来水冲洗 10~15 min;脱水、透明、封片、镜检。以胞质和胞膜染成棕黄色或黄色细胞为 DC 阳性细胞。对比右中下肺 H-E 染色图片及组织化学图片,确定大鼠肺部 DC 分布。每张切片取 5 帧图像(×40)输入计算机进行分析,分别计算阳性细胞数,取平均值,计算单位面积肺组织及气管、支气管内 DC 数量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析,计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数的比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般表现 A 组大鼠无异常表现,体质量增幅为(65.2±11.0)g;B、C、D 组大鼠第 4 周末表现倦怠,毛发失去光泽,体质量增幅分别为(52.7±10.7)、(48.2±7.4)、(48.7±10.3)g,3 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),但与 A 组相比均有明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 病理形态学改变 (1)大体标本肉眼所见:B 组大鼠两肺呈膨胀状态,体积增大,肺表面略显不平,可见小囊泡状突起,未见出血及渗出物;其他各组大体观差异不明显。(2)光镜下所见:A 组病理标本经 H-E 染色后显示大鼠气管、支气管、肺泡结构完整,细支气管上皮细胞无变性,肺泡腔内无渗出物,肺泡间隔无增厚。B 组肺组织病理表现出特征性改变,除了有细支气管狭窄变形外,还见到局灶性肺炎改变;管壁大量淋巴细胞浸润,细支气管邻近肺泡隔区域淋巴细胞及中性粒细胞浸润。该区域也可见局灶性肺泡隔破坏,多个肺泡相互融合,部分细支气管管壁见平滑肌和胶原纤维组织增生,同时小动脉管壁增厚,血管内皮细胞和平滑肌细胞增生(图 1)。C、D 两组病理表现与 B 组相似。

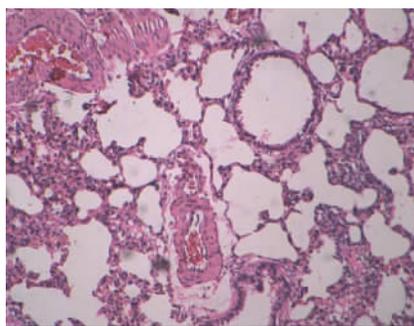


图 1 COPD 模型大鼠肺组织 H-E 染色结果

Fig 1 H-E staining of lung tissue of COPD model rats

Original magnification: ×100

2.3 DC 数目观察 结果(图 2)表明:A 组小鼠肺

部 DC 数目稀少,密度为 (1.5 ± 0.8) 个/ mm^2 。B、C、D 三组大鼠 DC 在肺内主要分布于气管、支气管、肺泡、脏层胸膜和气管周围相关淋巴组织及血管周围,以气管周围较为密集。B 组大鼠 DC 密度为 (20.3 ± 5.3) 个/ mm^2 ,较 A 组明显增加($P < 0.001$)。C 组

DC 密度为 (12.7 ± 3.7) 个/ mm^2 ,与 A 组相比明显增高($P < 0.001$),但与 B 组相比数目明显下降($P < 0.001$)。D 组 DC 密度为 (18.9 ± 4.5) 个/ mm^2 ,与 B 组比较 DC 数目无差异($P = 0.44$)。

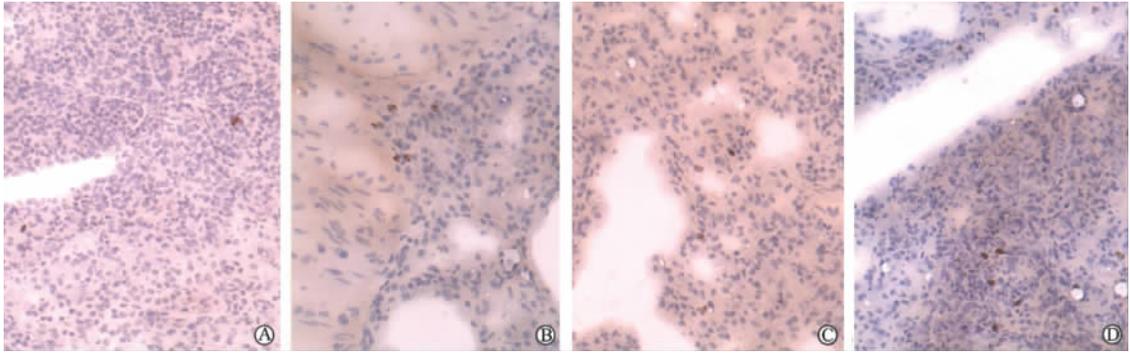


图 2 各组肺组织 DC 免疫组织化学染色图

Fig 2 Immunohistochemistry examination of lung DCs

A: Control group; B: COPD model group; C: COPD rats receiving inhalation of budesonide; D: COPD rats receiving inhalation of ipratropium bromide. Original magnification: $\times 40$

3 讨论

COPD 的发病机制目前尚未明确,研究^[1]认为 COPD 的发病机制受环境和遗传的双重作用。环境因素中,吸烟和感染被认为是最主要的两个因素。香烟烟雾中的丙烯醛、氢氰酸和甲醛等,能破坏纤毛上皮细胞,使纤毛脱落,细胞坏死,继而增生变厚^[4-5]。烟雾含大量氧自由基,活化的肺泡巨噬细胞和中性粒细胞生成更多的氧自由基^[1],这些内、外源性自由基可造成组织损伤。烟雾可提高气道上皮和肺泡上皮的通透性,使之更易遭受蛋白酶攻击,造成蛋白酶/抗蛋白酶系统失衡,促使肺气肿形成,还可增加肺组织对细菌感染的易感性^[4-5]。下呼吸道感染更加重 COPD 相关的支气管肺损害,形成恶性循环,致使病理不断进展。本研究以熏烟和气道内滴入 LPS 模拟这一病理过程建立 COPD 大鼠动物模型,4 周后模型组各大鼠出现毛色萎黄,活动能力下降,咳嗽及呼吸道分泌物增加,病理形态学检查与文献^[6-7]报道类似,符合 COPD 典型病理表现,提示模型构建成功。

DC 是功能最强的抗原递呈细胞(APC),来源于骨髓前体细胞,具有独特的刺激初始型 T 细胞增殖的功能,在启动免疫反应和决定免疫走向方面起关键作用^[8]。DC 存在于整个肺组织,主要位于支气管上皮和上皮下组织以及支气管相关的淋巴组织中,在上皮中约 30% 的 DC 是 CD1a(+),支气管肺泡灌

洗液(BALF)、肺泡腔和肺泡壁仅含少量 DC,这样的分布有利于其及时捕获和处理吸入抗原及维持气道上皮屏障功能完整^[9]。Demedts 等^[10]研究发现,COPD 患者小气道内 DC 的数目明显增加,DC 的浸润与 COPD 严重程度正相关,提示 DC 在 COPD 病理发展过程中扮演重要角色。本研究发现 COPD 模型组大鼠肺部 DC 数量较正常对照组明显增加,使用布地奈德、异丙托溴铵治疗后 DC 数量仍明显高于正常对照组。细胞数量的增加可能是细胞流入的增加、局部的增殖、长期的存活、或者是流出的减少所引起。烟雾暴露可以引起野生型小鼠肺部 DC 数目明显增高,而在 CCR-6 受体缺乏小鼠中这种增加明显减弱^[5]。COPD 患者肺部 CCL20 及其受体 CCR-6 明显增高^[10],考虑到 CCL20 是吸引 DC 到炎症部位最有力的诱导物质,那么 CCL20 及其受体 CCR6 的增高提示 DC 数目的增多很可能是细胞聚集的结果。

在慢性烟雾吸入与小鼠气道 DC 的研究中发现:在吸烟 24 周时小鼠气道 DC 数目明显增加(10 倍的增加),同样在肺组织中也有 1.5 倍的增加^[11]。从慢性烟雾吸入小鼠的肺部分离 DC 和巨噬细胞,发现肺泡灌洗液及肺组织中 DC 数目在吸烟 6 个月后明显高于对照组($P < 0.001, P < 0.05$)^[12]。这些结果与本实验结果相似。但也有相反的实验结果,Robbins 等^[13]将小鼠暴露于 2 支香烟/d,1 周 5 d,共持续 2~4 个月,发现 DC 在肺组织中的数目明显

下降。这可能与动物模型的差异有关。因为 Robbims 等^[13]还发现气道炎症在戒烟小鼠中仍持续存在。此外, Lapperre 等^[14]报道, COPD 患者中吸烟者与不吸烟者气道 DC 数目没有差异, 由此推测 COPD 患者气道 DC 数目升高并不仅是吸烟的缘故, 可能与肺部感染对 DC 在肺部的迁徙有一定影响有关。Vassallo 等^[2]以熏香烟复合 LPS 刺激法建立大鼠 COPD 模型, 观察到其可诱导 DC 的免疫调节和促炎症反应; 也有研究^[15]发现 COPD 气道炎症的发展伴随着菌群的定植。本研究就是采用在熏香烟 4 周复合 LPS 刺激法建立了大鼠 COPD 模型, 所以, 我们可以考虑 COPD 中 DC 的增加可能部分归结为细菌在气道的定植。

糖皮质激素治疗已广泛用于哮喘, 但对 COPD 的治疗作用目前仍存在争议。现有的资料认为吸入皮质激素可改善 COPD 的症状, 其具体机制尚不清楚, 可能是通过皮质激素在局部的抗炎作用来完成的^[3]。本研究结果显示布地奈德组 DC 总数较 COPD 模型组显著降低, 提示吸入皮质激素通过减少 DC 来部分改善气道腔以中性粒细胞为主的炎症, 但吸入皮质激素对组织病理学及呼吸功能改变尚无明显影响。抗胆碱能受体药异丙托溴铵目前已广泛用于 COPD 的治疗。COPD 时, 受胆碱能神经支配的气道平滑肌张力增加, 并在很大程度上与气流阻塞的可逆成分相关。吸入异丙托溴铵具有一定的扩张支气管、促进纤毛功能及黏液清除的作用。Tashkin 等^[16]通过一项随机双盲试验发现, M 型胆碱受体拮抗药噻托溴铵对 COPD 患者肺功能及临床症状的改善具有长期效应。但本研究发现吸入胆碱受体拮抗药异丙托溴铵后大鼠肺组织 DC 数量与 COPD 模型组相似, 肺组织病理表现与 COPD 模型组相比也未见明显改善, 可能原因是吸入胆碱受体拮抗药并未能从根本上解决气道炎症。

总之, 本研究提示 DC 可能参与了 COPD 的发病过程, 吸入皮质激素对这一过程有明显的影响, 而吸入胆碱受体拮抗药则无明显影响。但目前对 COPD 发病过程中机体细胞免疫所起作用的研究仍比较欠缺, DC 在 COPD 过程中所扮演的角色, 以及其通过何种方式起作用仍需进一步研究。

[参考文献]

[1] GOLD Executive Committee [DB/OL]. Guidelines: Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD, November 2006 [2006-11-18]. <http://www.goldcopd.com/Guidelineitem.asp?11=2&12=1&intId=989>.

[2] Vassallo R, Kroening P R, Parambil J, Kita H. Nicotine and ox-

idative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses[J]. *Mol Immunol*, 2008, 45: 3321-3329.

[3] Shore S, Kobzik L, Long N C, Skornik W, van Staden C J, Boulet L, et al. Increased airway responsiveness to inhaled methacholine in a rat model of chronic bronchitis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151: 1931-1938.

[4] 马楠, 崔德健, 梁延杰, 佟欣, 李玲, 杨建发. 气管内注入脂多糖法建立大鼠慢性支气管炎模型[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 1999, 22: 371-372.

[5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学*[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 1192-1194.

[6] 宋一平, 崔德健, 茅培英. 慢性阻塞性肺病大鼠模型的建立及药物干预的影响[J]. *军医进修学院学报*, 2001, 22: 99-102.

[7] Tsoumakidou M, Demedts I K, Brusselle G G, Jeffery P K. Dendritic cells in chronic obstructive pulmonary disease: new players in an old game[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177: 1180-1186.

[8] Hammad H, Lambrecht B N. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2006, 118: 331-336.

[9] 谢志芳, 曹雪涛, 章卫平, 颜永碧, 于秉学, 郑尊. 小鼠骨髓树突状细胞的扩增及其超微结构观察[J]. *第二军医大学学报*, 1999, 20: 513-515.

Xie Z F, Cao X T, Zhang W P, Yan Y B, Yu B X, Zheng Z. Amplification and ultrastructure observation of murine bone marrow derived-dendritic cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 1999, 20: 513-515.

[10] Demedts I K, Bracke K R, van Pottelberge G, Testelmans D, Verleden G M, Vermassen F E, et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175: 998-1005.

[11] D'hulst A I, Vermaelen K Y, Brusselle G G, Joos G F, Pauwels R A. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice[J]. *Eur Respir J*, 2005, 26: 204-213.

[12] Bracke K, Cataldo D, Maes T, Gueders M, Noël A, Foidart J M, et al. Matrix metalloproteinase-12 and cathepsin d expression in pulmonary macrophages and dendritic cells of cigarette smoke-exposed mice[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005, 138: 169-179.

[13] Robbins C S, Dawe D E, Goncharova S I, Pouladi M A, Drannik A G, Swirski F K, et al. Cigarette smoke decreases pulmonary dendritic cells and impacts antiviral immune responsiveness[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30: 202-211.

[14] Lapperre T S, Postma D S, Gosman M M, Snoeck-Stroband J B, ten Hacken N H, Hiemstra P S, et al. Relation between duration of smoking cessation and bronchial inflammation in COPD[J]. *Thorax*, 2006, 61: 115-121.

[15] Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson C S. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173: 991-998.

[16] Tashkin D P, Celli B, Senn S, Burkhart D, Kesten S, Menjoge S, et al. A 4-year trial of tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1543-1554.