

· 实验研究 ·

# 哮喘大鼠肺表面活性物质结合蛋白 A 的变化及其意义

## Changes of pulmonary surfactant-associated proteins A in asthmatic rats

汪隽瑛<sup>1</sup>, 方凤<sup>1</sup>, 刘枫<sup>2</sup>, 蒋瑾瑾<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长海医院儿科, 上海 200433; 2. 长海医院消化内科)

**[摘要]** 目的: 探讨哮喘大鼠肺表面活性物质结合蛋白 A (SP-A) 的变化及其在哮喘发病中的意义。方法: 26 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组及哮喘组。卵白蛋白致敏, 激发建立大鼠哮喘模型, 激发哮喘后, 行支气管肺泡灌洗, Western 印迹法测定支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 SP-A 含量; 免疫组化方法观察肺组织及气道中 SP-A 的变化; 测定 BALF 中总磷脂 (TPL)、饱和磷脂 (DSPC) 和总蛋白质 (TP) 含量; 膜天平测量 BALF 中 PS 表面活性。结果: Western 印迹检测显示哮喘组 BALF 中 SP-A 含量较对照组明显减少 ( $P < 0.001$ ); SP-A 免疫组化检测结果显示哮喘组大鼠肺及细支气管 SP-A 表达明显减弱 ( $P < 0.01$ ); 哮喘组 BALF 中 TPL 及 DSPC 含量与对照组无明显差异, TP 含量显著增加 ( $P < 0.05$ ); 哮喘组 BALF 中 PS 表面活性较对照组明显降低 ( $P < 0.001$ ), BALF 中 PS 表面活性与 DSPC 及 SP-A 含量呈显著正相关 ( $r = 0.725, r = 0.956, P < 0.01$ ), 与 TP 含量呈显著负相关 ( $r = -0.654, P < 0.01$ )。结论: 哮喘大鼠 SP-A 表达明显下降, SP-A 下降可使哮喘时 PS 活性更易被血浆蛋白抑制, 表面活性降低。

**[关键词]** 肺表面活性物质结合蛋白 A; 哮喘; 支气管肺泡灌洗液

**[中图分类号]** R 562.25 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2004)11-1255-03

\* 肺表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 是一种磷脂及特异性表面活性物质结合蛋白的混合物, 它附着于肺泡的气液界面, 从而降低肺泡气液界面的表面张力, 维持肺泡的稳定性。既往研究显示: PS 在小气道也有类似的作用。最近发现, 肺表面活性物质结合蛋白 A (surfactant-associated proteins A, SP-A) 的变化, 是肺部对急性肺损伤的普遍反应, 而 SP-A 在抗原诱导的气道过敏性炎症中的作用仍未知。为此, 我们应用卵白蛋白致敏, 建立哮喘大鼠实验模型, 观察哮喘大鼠 SP-A 的变化并探讨其意义。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 SP-A (N-19) 多克隆抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品, 辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG 为美国 Immoclub 公司产品, SP-A 标准品由美国辛辛那提大学 Dr. M. Coomack 惠赠, 过氧化物酶标记链霉卵白素染色试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品。Bio-Rad Mini Protein 垂直电泳仪, Bio-Rad 半干电转移仪, Bio-Rad Fluor MultiImager 多功能分析仪均为美国 Bio-Rad 公司产品, MPT-II 膜天平为华东师范大学科教仪器厂生产。

1.2 动物模型的制备及处理 雄性 Wistar 大鼠 26 只, 体重 (250 ± 50) g, 由本校实验动物中心提供, 随机分为正常对照组及哮喘组, 每组各 13 只。正常大鼠予生理盐水胸前皮下注射及腹腔注射, 第 15 天起予生理盐水超声雾化吸入, 每天 20 min, 连续 7 d。哮喘组参照文献 [1] 稍加改变复制哮喘大鼠模型: 予免疫原液 1 ml (含卵蛋白 100 mg, 氢氧化铝 100 mg) 胸前皮下注射致敏, 同时腹腔注射气管炎疫苗 (含  $5 \times 10^{12}$  个灭活菌), 第 15 天起予 10 mg/ml 卵蛋白溶液 (浓度 10 mg/ml) 超声雾化吸入, 每天 20 min, 连续 7 d。末次激发后, 各组大鼠随机取 5 只行病理检查, 其余大鼠经颈动脉放血处死, 气管插管, 注入生理盐水 4 ml, 保留 3 min 后吸出, 反复 4

次, 收集支气管肺泡灌洗液 (bronchial alveolar lavage fluid, BALF), 记录回收量, 最大回收量为 14.0 ml, 最小回收量为 12.8 ml, 平均 (13.33 ± 0.34) ml, 因各样本 BALF 回收率基本一致, 且两组间回收率经  $\chi^2$  检验无统计学差异, 故 BALF 所测各项目结果不再用灌洗液回收率进行校正。将 BALF 分成 2 份, 取 12 ml 4 离心 (2 500 r/min, 8 min), 吸取上清液待测磷脂、总蛋白及表面张力, 其余 BALF 4 离心 (1 100 r/min, 4 min), 吸取上清液待测 SP-A。

1.3 Western 印迹检测 BALF 中 SP-A 的变化 取待测大鼠 BALF 样品 10  $\mu$ l 及 SP-A 标准品 10  $\mu$ l (浓度为 1  $\mu$ g/ml), 12% SDS-PAGE 电泳分离后, 半干转移, TTBS 封闭液封闭 1 h, 加入抗大鼠 SP-A 多克隆抗体 (1 500), 4 结合过夜, 加入二抗 (1 1 000) 后孵育 1 h, ECL Reagent 试剂显影, 对显影结果用 Bio-Rad Fluor MultiImager 多功能分析仪对各 SP-A 蛋白条带进行光密度扫描。

1.4 免疫组化检测肺组织、气道 SP-A 表达变化 石蜡切片脱蜡至水, 3% 过氧化氢封闭, 正常兔血清封闭 10 min, 一抗 4 孵育过夜, 生物素化二抗及辣根酶标记链霉卵白素工作液依次作用 15 min, DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 染色。结果以出现棕黄色颗粒为阳性染色, 并按下列标准判断: (-) 为不着色或呈背景颜色; (+) 为弱阳性, 细小显色颗粒, 数稀少; (++) 为强阳性, 粗大显色颗粒, 数密多; (++) 表现介于 (+) 和 (+++) 之间。

1.5 BALF 中总磷脂 (TPL)、饱和磷脂 (DSPC)、总蛋白质 (TP) 含量测定 TPL 测定采用 Bartlett 法, DSPC 测定采用 M anson 法, TP 的测定采用 Lowry 法。

1.6 BALF 中 PS 表面活性测定 采用 MTP-II 膜天平测定, 记录样品吸附平衡后表面张力的变化。根据最大表面张

\* [作者简介] 汪隽瑛 (1974-), 女 (汉族), 硕士, 主治医师  
E-mail: junyingwang@hotmail.com

力(maximum surface tension,  $ST_{max}$ )和最小表面张力(minimum surface tension,  $ST_{min}$ ), 计算出稳定系数(stability index, SI),  $SI = 2(ST_{max} - ST_{min}) / (ST_{max} + ST_{min})$ 。  $ST_{min}$ 反映了PS降低表面张力的能力, SI反映了PS分子膜压缩时的稳定性。

1.7 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 10.0 软件包进行统计学处理, 采用完全随机设计资料  $t$  检验作均数的显著性检验, 等级资料采用 Wilcoxon 等级资料秩和检验, 对 BALF 中 PS 的表面活性指标与 SP-A、DSPC、TP 3 项指标进行多元相关分析。

## 2 结果

2.1 Western 印迹检测 BALF 中 SP-A 的变化 Western 印迹检测结果见图 1。正常对照组大鼠 BALF 中 SP-A 光密度值为  $30.26 \pm 3.89$ , 哮喘组 SP-A 光密度值为  $17.01 \pm 4.53$ , 两组差异显著( $t = 6.28, P < 0.001$ )。



图 1 大鼠 BALF 中 SP-A 的 Western 印迹法测定  
1: SP-A 标准品; 2, 3: 哮喘组; 4, 5: 对照组

2.2 免疫组化检测肺组织、气道 SP-A 表达变化 正常对照组大鼠肺内 SP-A 表达丰富, 分布于肺泡 II 型细胞及部分肺泡巨噬细胞内, 呈棕黄色颗粒, 肺泡及细支气管腔内也有一

薄层棕黄色物; 哮喘组大鼠肺内 SP-A 表达明显减弱(图 2)。按前述判断标准进行评判, 对照组(+) 3 只, (++) 2 只, 哮喘组(-) 1 只, (+) 4 只, 两组差异显著( $u_c = 2.629, P < 0.01$ )。

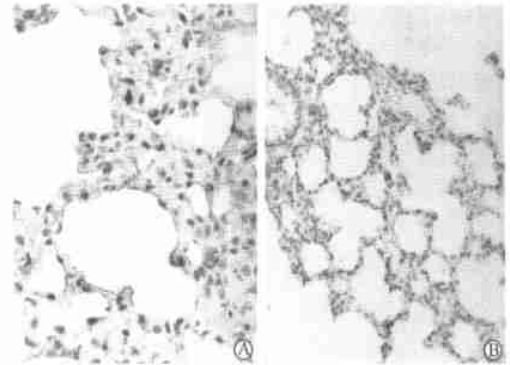


图 2 各组大鼠 SP-A 免疫组化染色

A: 正常对照组大鼠免疫染色阳性肺泡上皮细胞较多, 染色强, 肺泡腔内也有一薄层免疫染色阳性物( $\times 400$ ); B: 哮喘组大鼠免疫染色阳性肺泡上皮细胞较正常对照组减少, 肺泡腔及终末细支气管腔内免疫染色阳性物染色较弱( $\times 200$ )

2.3 BALF 中 TPL、DSPC、TP 含量的测定及 PS 表面活性检测 两组大鼠 BALF 中 TPL 与 DSPC 含量无显著差异, 但哮喘组 BALF 中 TP 含量比正常对照组明显增高( $P < 0.05$ )。哮喘组大鼠 BALF 表面活性较对照组明显下降, 表现为  $ST_{min}$  升高( $P < 0.001$ ), SI 降低( $P < 0.001$ ),  $ST_{max}$  无明显变化, 各组大鼠 BALF 中 TPL、DSPC、TP 含量及 BALF 中 PS 表面活性见表 1。

表 1 各组肺泡灌洗液中 TPL、DSPC、TP 含量及 PS 表面活性变化

| 组别  | $(n = 8, \bar{x} \pm s)$                            |  |  |   |   |                      |
|-----|---|--|--|---|---|----------------------|
|     | TPL<br>( $\beta/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | DSPC<br>( $\beta/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | TP<br>( $\beta/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) | $ST_{max}$<br>( $F/\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) | $ST_{min}$<br>( $F/\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ) | SI                   |
| 对照组 | $116.05 \pm 10.20$                                  | $48.64 \pm 26.50$                                    | $85.41 \pm 21.18$                                  | $59.13 \pm 2.75$                                    | $13.38 \pm 5.63$                                    | $1.28 \pm 0.25$      |
| 哮喘组 | $117.17 \pm 10.22$                                  | $28.12 \pm 10.81$                                    | $172.67 \pm 74.53^*$                               | $60.13 \pm 3.48$                                    | $33.13 \pm 4.82^{**}$                               | $0.56 \pm 0.11^{**}$ |

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

2.4 BALF 中 PS 表面活性指标与 SP-A、DSPC 及 DSPC/TP、TP 的多元相关分析 对 BALF 的表面活性指标(Y)与 SP-A ( $X_1$ )、DSPC ( $X_2$ ) 及 TP ( $X_3$ ) 等 3 项指标进行多元相关分析, 发现 BALF 的 PS 表面活性高低与 SP-A、DSPC 含量呈显著正相关, 与 BALF 中 TP 含量呈显著负相关, 详见表 2。

表 2 BALF 中 PS 表面活性指标与 SP-A、DSPC 及 DSPC/TP、TP 的多元相关分析

| 测定项目       | SP-A   |          | DSPC   |          | TP     |          |
|------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
|            | r      | P        | r      | P        | r      | P        |
| SI         | 0.956  | $< 0.01$ | 0.725  | $< 0.01$ | -0.654 | $< 0.01$ |
| $ST_{min}$ | -0.960 | $< 0.01$ | -0.647 | $< 0.01$ | 0.731  | $< 0.01$ |
| $ST_{max}$ | -0.306 | $> 0.05$ | -0.402 | $> 0.05$ | 0.095  | $> 0.05$ |

## 3 讨论

PS 可以降低气道气液界面的表面张力, 在保持气道结

构及维持气道处于最佳开放状态中起重要作用。哮喘时气道内蛋白渗出增加, 而多种蛋白(如清蛋白、纤维蛋白)均可抑制 PS 功能, 使得 PS 活性下降<sup>[2]</sup>。以往有关 PS 在哮喘发病机制中的研究大多局限于 PS 脂质成分, 而有关 SP 的研究很少, 作为 PS 中最主要的蛋白成分, SP-A 在哮喘时究竟有何变化, 目前尚不清楚。

本研究利用大鼠哮喘模型来进行研究, 结果表明哮喘组 BALF 中 SP-A 含量较对照组明显下降, 哮喘组大鼠肺及细支气管腔内 SP-A 表达明显降低。SP-A 的重要生理功能之一是增强 PS 对于抑制因子如血浆蛋白等的抵抗能力, SP-A 基因缺失小鼠肺功能基本正常, 但 PS 比野生型小鼠更易被血浆蛋白抑制<sup>[3]</sup>, SP-A 的这种作用在某些病理状态显得尤为重要。

哮喘时由于气道变态反应性炎症, 血管内皮和上皮的通透性增加, 血浆成分及蛋白渗出, 本研究也发现哮喘大鼠

BALF 中 TP 含量明显增高, BALF 表面活性明显降低, BALF 的表面活性不仅与 TP、DSPC 含量相关, 还与 SP-A 的含量呈显著正相关, 提示哮喘时 SP-A 下降可使 PS 活性更易被血浆蛋白抑制, 而表面活性降低, 间接导致气道阻力增加。

此外, SP-A 属于胶原凝集素家族, 胶原样凝集素能够与细菌或病毒等病原表面的特异性碳水化合物结合, 起调理素的作用。完整的 SP-A 是由 6 个三聚体亚基共 18 条肽链组成的巨分子, 是天然免疫的重要成分。研究发现 SP-A 可与各种病原, 如病毒、细菌、真菌结合<sup>[4]</sup>, SP-A 还可调节肺局部的炎症或免疫反应。有关 SP-A 对免疫细胞的调节作用的研究逐渐增多, SP-A 可在抗原结合及抗原提呈、调节过敏效应细胞释放炎症介质等多环节抑制过敏性炎症<sup>[5]</sup>。很可能哮喘时 SP-A 的减少可进一步使哮喘时的炎症反应放大, 尤其是在重症哮喘。但体内 SP-A 在过敏性炎症中起何作用还不明确, 仍需深入研究和探讨。此外, 研究已证实 SP-A 在肺部的防御功能, 哮喘时 SP-A 的下降会使呼吸道感染易感性增加, 这可能是哮喘患者易患呼吸道感染的原因之一。

哮喘时引起 SP-A 表达下降的机制可能与以下几方面有关: 哮喘时肺泡 II 型细胞受损, 功能下降, 导致 SP-A 分泌减少。本研究免疫组化结果也显示哮喘组大鼠肺内 SP-A 表达明显降低, 不仅细胞内的免疫阳性染色明显减弱, 而且阳性 II 型细胞数明显减少。此外, 哮喘时明显增加的炎症介质

也可抑制 SP-A 的合成。也有学者<sup>[6]</sup>认为哮喘发作时气道及肺泡腔内渗出的血浆蛋白, 使局部区域的蛋白含量升高, 可以抑制 SP-A 的合成与分泌。SP-A 在哮喘过敏性炎症中的作用究竟如何, 还有待于今后进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] 孙雨, 方凤, 满立新, 等. 肺表面活性物质对哮喘大鼠白细胞介素-4 的影响[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(5): 446
- [2] Cheng G, Ueda T, Sugiyama K, et al. Compositional and functional changes of pulmonary surfactant in a guinea pig model of chronic asthma[J]. *Respir Med*, 2001, 95(3): 180-186
- [3] Korfhagen TR, Levine AM, Whitsett JA. Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1408(2-3): 296-302
- [4] Hawgood S, Poulain FR. The pulmonary collectins and surfactant metabolism[J]. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 495-519
- [5] Wang JY, Shieh CC, Yu CK, et al. Allergen-induced bronchial inflammation is associated with decreased levels of surfactant proteins A and D in a murine model of asthma[J]. *Clin Exp Allergy*, 2001, 31(4): 652-662
- [6] van de Graaf EA, Jansen HM, Lutter R, et al. Surfactant protein A in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J Lab Clin Med*, 1992, 120(2): 252-263

[收稿日期] 2004-05-26

[修回日期] 2004-09-01

[本文编辑] 曹静

## · 实验研究 ·

# 西罗莫司和 FTY 720 对大鼠胰岛细胞体外分泌功能的影响

Effects of FTY 720 and sirolimus on in vitro insulin secretion of rat islet cells

蔡锦全<sup>1</sup>, 谭建明<sup>1</sup>, 董维平<sup>2</sup>, 王煜菲<sup>2</sup>, 王鉴波<sup>2</sup>

(1. 南京军区福州总医院泌尿外科, 福州 350025; 2. 上海市第一人民医院糖尿病研究室, 上海 200080)

[摘要] 目的: 探讨西罗莫司(sirolimus)和 FTY720 对大鼠胰岛细胞体外分泌胰岛素功能的影响。方法: 将大鼠胰岛细胞分别与西罗莫司和 FTY720 共培养后进行糖刺激胰岛素释放试验, 用 ELISA 方法检测培养液中胰岛素含量并进行比较研究。结果: FTY720 和西罗莫司对大鼠胰岛细胞胰岛素分泌无明显影响。结论: FTY720 和西罗莫司对大鼠胰岛细胞及分泌功能无明显影响, FTY720 和西罗莫司有可能作为临床胰岛细胞移植的主要免疫抑制剂使用。

[关键词] 胰岛; 细胞移植; 免疫抑制剂

[中图分类号] R 587.1

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)11-1257-02

\* 胰岛细胞移植是治疗 1 型糖尿病的一种有效方法, 移植的胰岛细胞可提供内分泌的胰岛素, 维持机体糖代谢稳定, 防止糖尿病严重并发症的发生和发展。然而, 临床成人胰岛细胞移植效果并不理想, 其主要原因包括: 移植的胰岛细胞无功能; 移植部位的炎症反应造成胰岛细胞破坏; 同种异体排斥反应、自身免疫性疾病再发引起胰岛细胞的破坏; 免疫抑制剂对胰岛细胞的毒性作用等<sup>[1-4]</sup>。近年来, 新型无激素免疫抑制剂方案成功应用于成人胰岛细胞移植, 取得了令人满意的治疗效果, 亦说明免疫抑制剂的毒性作用是导致胰岛细胞移植失败的主要原因之一<sup>[5]</sup>。本研究通过大鼠胰岛细胞分别与不同浓度的 FTY720 和西罗莫司(sirolimus)共培养,

旨在探讨免疫抑制剂对胰岛细胞的毒性作用及对胰岛素分泌功能的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料与试剂 胶原酶 P (Roche); FicoII 400 (Pharmacia); RPM I 1640 (Gibco); FTY720 (华东制药有限公司); 西罗莫司(惠氏-白宮制药有限公司); 超敏大鼠胰岛素检测试剂盒(Mercodia); 成年雄性 SD 大鼠 2 只(8~10 周

\* [基金项目] 福建省重大科技项目(2002Y007)。

[作者简介] 蔡锦全(1966-), 男(汉族), 硕士, 副主任医师