

慢阻肺大鼠肺组织中树突状细胞表面因子的表达变化及 CCL20 抗体的干预作用

孙得胜^{1,2}, 欧阳瑶¹, 顾延会¹

(1. 遵义医学院附属医院 呼吸一科, 贵州 遵义 563003; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 呼吸与危重症医学科, 卫生部呼吸系统疾病重点实验室, 武汉 430030)

【摘要】 目的 了解树突状细胞表面因子 OX62、CD83 在慢阻肺大鼠肺部的表达变化, 并探讨 CCL20 抗体的干预作用。方法 选用 30 只健康 Wistar 大鼠, 随机分为健康对照组(10 只)、慢阻肺模型组(10 只)、CCL20 单抗组(10 只), 用气道内注入脂多糖(共 2 次)联合烟雾刺激(约 28 d)的方法诱导慢阻肺模型。在实验初始对单抗组大鼠以 CCL20 单克隆抗体腹腔注射一次。在第 29 天取大鼠的肺组织观察其病理学改变, 用免疫组织化学技术检测肺部树突状细胞(DC)的表面因子 OX62、CD83 的表达变化。**结果** 模型组大鼠肺组织 HE 染色符合气道炎症和肺气肿的表现, CCL20 单抗组大鼠肺部病理表现比慢阻肺组明显减轻。与健康对照组相比, 慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 OX62 的表达比对照组明显增多($P < 0.05$), 而在 CCL20 单抗组低于慢阻肺组($P < 0.05$)。慢阻肺模型组大鼠肺组织中 CD83 的表达比对照组少($P < 0.05$), 而在慢阻肺组与 CCL20 单抗组之间则没有明显的差异($P > 0.05$)。**结论** 慢阻肺的发病可能与肺部 OX62 的表达增多及 CD83 的表达减少有关, 使用 CCL20 单抗能部分地抑制这一效应。

【关键词】 慢阻肺; 树突状细胞; CCL20 单抗; OX62; CD83

【中图分类号】 R563.3 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.03.003

Expression of the surface factors of dendritic cells in the lung tissues of rats with COPD and the effect of CCL20 antibody on it

SUN De-sheng^{1,2}, OUYANG Yao¹, GU Yan-hui¹

(1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China;

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Key Laboratory of Pulmonary Diseases of Health Ministry, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China.)

【Abstract】 Objective To understand the expression of OX62 and CD83 in the lungs of rats with COPD, and to investigate the effect of the CCL20 monoclonal antibody on it. **Methods** A total of 30 rats were randomly divided into three groups: normal, model, and CCL20 antibody treated. COPD was induced by cigarette smoke exposure 28 days and LPS solution injection twice. The rats were injected with CCL20 antibody in the last group on the first day. The rats were sacrificed on the 29th day. We investigated the pathomorphology of their lungs by HE staining and evaluated the DC distribution in their lungs by immunohistochemistry. **Results** The HE staining results of the COPD models are consistent with the typical pathological features of COPD patients, the lung pathology in CCL20 group was significantly attenuated than

【基金项目】 国家自然科学基金(81460008)。

【作者简介】 孙得胜(1980-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病的发病机制。E-mail: sun_desheng@163.com。

【通讯作者】 欧阳瑶(1965-),女,主任医师,教授,主要研究方向:慢性阻塞性肺疾病的基础与临床。E-mail: ouyangyao116@sohu.com。

that in the COPD group. Compared with healthy control group, the OX62 + DCs in the COPD model group was significantly increased ($P < 0.05$), and the CCL20 group was lower than that in the COPD group ($P < 0.05$). The CD83 + DCs of COPD group was lower than that in healthy control group ($P < 0.05$), and the difference was not statistically significant between COPD and CCL20 treated group ($P > 0.05$). **Conclusion** The pathogenesis of COPD may be related to the increase of OX62 + DC and the decrease of CD83 + DC, and this effect could be partly inhibited by CCL20 antibody.

【Key words】 COPD; Dendritic cell; CCL20 antibody; OX62; CD83

自 1679 年 Bonet 以“庞大容量的肺”描述慢性阻塞性肺疾病(简称慢阻肺, COPD)到近年 GOLD (The Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 慢阻肺全球倡议)对慢阻肺最新定义的认识,气道和肺组织对有害气体或颗粒的异常炎症反应被认为是其重要特征^[1],且越来越多的研究提示慢阻肺也可能是一种自身免疫性疾病^[2],有学者发现在其发病过程中有免疫细胞被募集到肺^[3]。慢阻肺中的免疫应答是在特定的抗原驱使下完成的^[3-4],同时它受到树突状细胞(dendritic cell, DC)的严密调控^[5-6]。DC 环绕气道形成敏感的防御体系,在外来抗原侵袭机体时,它们从完好的上皮组织移行到受侵袭的部位并摄取这些抗原^[7],DC 表面受体在信号刺激下介导了此过程^[8]。DC 继续迁移到局部引流淋巴结,提呈所摄取的抗原给相关的 T 细胞。相应的炎症反应就是在这些 T 淋巴细胞的介导下发生的。DC 的迁移是趋化作用的结果,在它们的趋化因子与相关的受体间的相互作用下完成^[9]。CCL20 是未成熟树突状细胞(imature DC, iDC)的主要趋化因子,当气道发生炎症反应的时候,表达于气道上皮的 CCL20 大量增加^[10],它与受体间的相互作用被认为是 iDC 被募集于气道的一个可能的重要机制。

我们通过香烟烟雾刺激和气道内注入细菌内毒素脂多糖(LPS)制备大鼠慢阻肺模型,分别检测 DC 的表面因子 OX62 和 CD83 在肺组织中的表达,并通过阻断 CCL20 观察抗 CCL20 干预对慢阻肺大鼠的治疗效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

清洁级 Wistar 雄性大鼠(共 30 只),鼠龄 8 周,体重 200 ~ 220 g,由重庆市第三军医大学大坪医院实验动物中心提供【SCXK(渝)2014 - 0005】。二部法抗兔/鼠通用型免疫组化试剂盒(上海基因科技公司),小鼠抗大鼠 OX62 单克隆抗体(美国 R&D Systems 公司),兔抗-CD83 多克隆抗体(北京博奥森

生物技术公司),大鼠 CCL20 单克隆抗体(美国 R&D Systems 公司),羊抗鼠 IgG-HRP(北京爱普华美生物科技公司),脂多糖(美国 Sigma 公司),香烟(黄果树牌,烟气烟碱 1.0 mg 焦油 11 mg 一氧化碳量 13 mg 贵州中烟工业有限公司)。

1.2 模型的建立

实验在遵义医学院进行【SYXK(黔)2014 - 003】将大鼠随机分为健康对照组、慢阻肺模型组和 CCL20 单抗干预组(每组 10 只)。使用香烟烟雾刺激和气道内注入脂多糖的方法制备慢阻肺模型^[11]:后两组大鼠于第 1 天和第 15 天气道内注入脂多糖溶液(200 $\mu\text{g}/200 \mu\text{L}$);第 2 ~ 28 天(第 15 天除外)于造模箱(由玻璃制成,25 cm \times 35 cm \times 80 cm,箱顶有直径约 2 cm 的通气孔,箱中部从下向上有两排铁网,铁网间摆放并点燃香烟)内被动吸烟(每天 2 次,每次燃 12 支香烟)。当日 2 次被动吸烟造模间隔 2 h,健康对照组不予上述处理。CCL20 单抗组大鼠第 1 天注脂多糖前用 CCL20 单克隆抗体(100 $\mu\text{g}/\text{只}$)腹腔注射。

1.3 标本采集

第 29 天分别选取两组大鼠麻醉后开胸,剪取左肺予多聚甲醛固定,制作石蜡标本及病理切片,并行 HE 染色及免疫组化实验。取右肺各叶放入低温冷冻管,并保存备用。

1.4 指标检测

观察模型组大鼠肺组织 HE 染色切片是否有慢支炎、肺气肿的病理表现,CCL20 单抗组的病理改变是否有所减轻。免疫组化实验的切片于光镜下选阳性表达最强的 5 个视野,计算机采图后输入软件 IPWIN 60 中分析,计算积分值光密度(IOD),每幅图使用此软件分析 3 次。在同一切片中随机选取 5 个不同视野,分别测得积分光密度值,以其平均值代表样本中 OX62 或 CD83 的表达水平。

1.5 数据分析

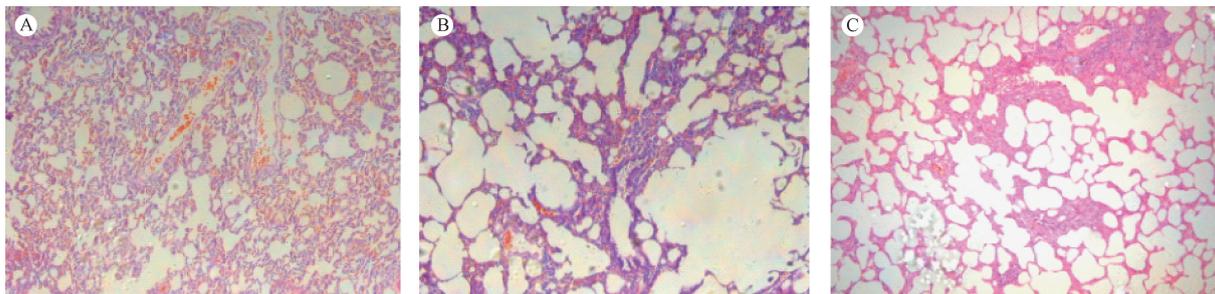
计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有独立的实验至少重复 3 次。统计学分析用 SPSS19.0 统计软件完成,用单因素方差分析的方法比较各组间样本均数,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠肺组织的病理表现

对照组:肺泡结构完整连续,未见炎性细胞浸润,符合正常肺组织病理表现。慢阻肺模型组:肺

泡间隔内可看到毛细血管扩张充血,伴炎性细胞浸润,部分肺泡间隔断裂、融合,呈“慢支炎、肺气肿”改变,符合慢阻肺的典型病理特点。CCL20 单抗组:肺泡间隔增宽,伴有炎细胞浸润,部分肺泡腔略扩大,但病变程度明显比慢阻肺组减轻(图 1)



注:A. 对照组;B. 慢阻肺组;C. CCL20 单抗组。

图 1 肺组织病理表现($\times 10$)

Note: A (controls); B (COPD models); C (CCL20 monoclonal antibody treated group).

Fig. 1 Photomicrographs of haematoxylin and eosin stained lung tissue ($\times 10$)

2.2 三组大鼠肺组织中 OX62 和 CD83 的表达

OX62 和 CD83 的免疫组化阳性染色主要表达于 DC 的胞浆,广泛分布于肺泡以及气道周围的相关淋巴组织和血管附近。慢阻肺模型组大鼠的肺组织 OX62 表达比对照组显著增多($P < 0.05$),而 CCL20 单抗组的 OX62 表达比慢阻肺模型组显著减少($P < 0.05$)。慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 CD83 的表达比健康对照组显著减少($P < 0.05$),而与 CCL20 单抗组相比,无明显差异($P > 0.05$)(图 2/表 1)

大鼠肺组织病理表现与早期文献报道一致^[11-13],符合慢阻肺肺组织的典型病理特点, CCL20 单抗干预组大鼠肺组织的病理改变比慢阻肺模型组显著减轻。

本实验显示,慢阻肺模型组大鼠肺组织中 DC 的表面因子 OX62 的表达比对照组显著增加。OX62 是大鼠 DC 的标志物^[14], CCL20 是未成熟 DC (immature DC, iDC) 的趋化因子^[15],当气道发生炎症反应的时候,在 CCL20 等趋化因子作用下,部分 iDC 向肺部迁移^[16],故而引起肺部 DC 增多、OX62 的表达增加。实验还发现 CCL20 单抗组 OX62 的表达比慢阻肺模型组减少($P < 0.05$),这很可能由于部分 CCL20 与注射到体内的 CCL20 抗体结合,从而使对 DC 发挥趋化作用的 CCL20 减少,使肺部 OX62 的表达减少,同时也使病情减轻。

表 1 OX62 和 CD83 在三组大鼠肺组织中的表达($n = 10$)

Tab. 1 Expression of OX62 and CD83 in lung tissues of rats in the three groups($n = 10$)

组别 Groups	积分光密度(IOD)	
	OX62	CD83
健康对照组 Controls	17.07 \pm 3.31	43.43 \pm 14.33
慢阻肺模型组 COPD models	73.45 \pm 5.42*	14.76 \pm 5.58*
CCL20 单抗组 CCL20 group	37.58 \pm 3.79#	24.25 \pm 8.81

注: * 与健康对照组比较, $P < 0.05$; # 与慢阻肺模型组比较, $P < 0.05$ 。

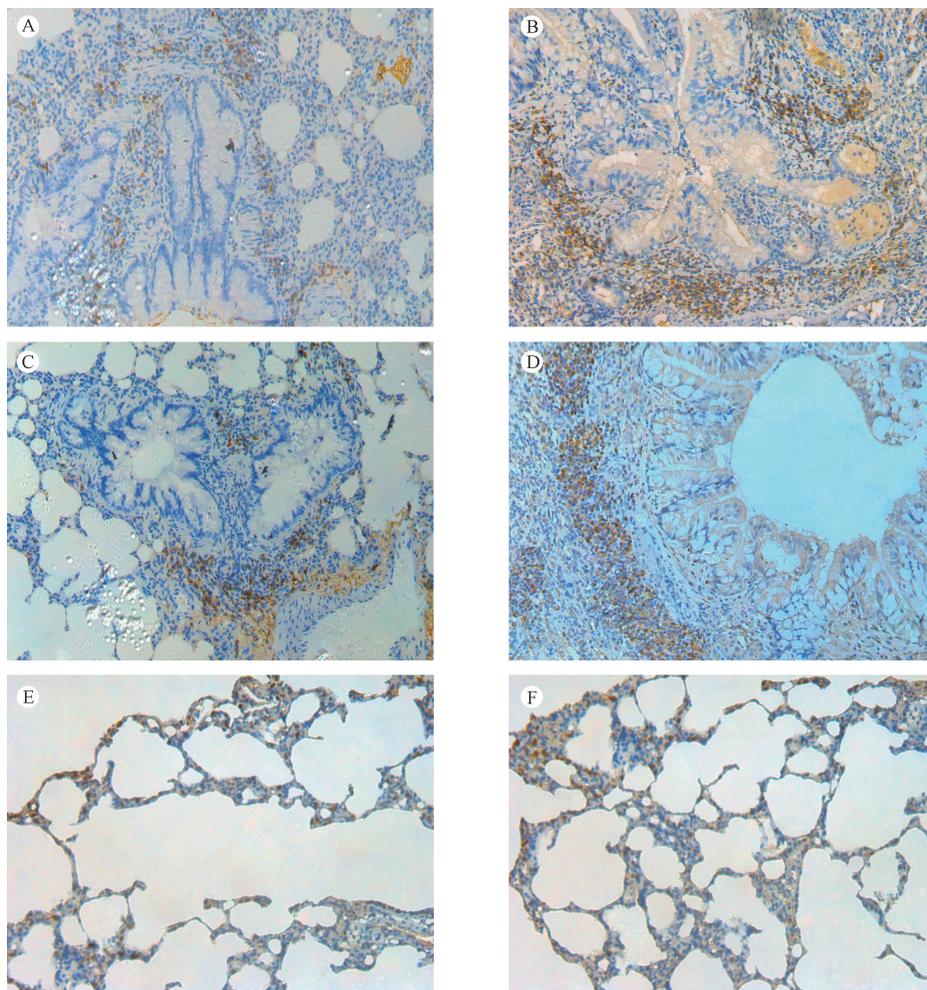
Note: Compared with the control group * $P < 0.05$; compared with the COPD model group # $P < 0.05$.

3 讨论

慢阻肺是一种严重危及人类健康的气道慢性炎症性疾病,具有病程长、难治愈、易复发的特点,以逐渐进展、不完全可逆的气流受限为特征^[12],吸烟和感染被公认是引起它发生发展的最主要的环境因素。我们对大鼠进行烟雾刺激并注射脂多糖诱发感染以模拟这种病理生理过程,4 周后模型组

本研究显示,慢阻肺模型组大鼠的肺组织中 CD83 的表达比健康对照组显著减少。CD83 是成熟 DC (mDC) 的标志物^[17],这也许与肺部 mDC 在慢阻肺的发病过程中向局部引流淋巴结发生迁移有关^[18]。CCL20 单抗组与慢阻肺模型组相比,CD83 在肺组织中的表达无明显差异($P > 0.05$)。考虑到 CCL20 是 iDC 的趋化因子,而 mDC 的迁移在其他趋化因子的作用下完成,故单抗组大鼠体内注入 CCL20 单抗后并未对 mDC 产生直接影响,从而该组大鼠肺组织中 CD83 的表达与慢阻肺组无明显差异。

综上所述,我们通过实验发现慢阻肺的发病可



注:A. 正常对照组 OX62; B. 慢阻肺模型组 OX62; C. CCL20 单抗组 OX62; D. 正常对照组 CD83; E. 慢阻肺模型组 CD83; F. CCL20 单抗组 CD83。

图 2 各组大鼠免疫组化染色表现(×20)

Note: A. OX62 expression in the controls; B. OX62 expression in the COPD models; C. OX62 expression in the CCL20 monoclonal antibody treated group; D. CD83 expression in the controls; E. CD83 expression in the COPD models; F. CD83 expression in the CCL20 monoclonal antibody treated group.

Fig. 2 Immunohistochemical staining of the rats in each group (×20)

能与肺部 OX62 表达的增多及 CD83 表达的减少有关,使用 CCL20 单抗干预治疗能部分地缓解这种改变,从病理结果来看,其对慢阻肺的气道炎症及病理损害过程有一定的抑制或延缓作用。

参考文献:

- [1] Kim V, Criner GJ. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med 2013; 187: 228 - 237.
- [2] Brusselle G G, Joos G F, Bracke K R. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Lancet, 2011, 378(49):1015 - 1026.
- [3] Givi ME, Folkerts G, Wagenaar GTM, et al. Cigarette smoke differentially modulates dendritic cell maturation and function in time[J]. Respiratory Research. 2015;16:131 - 140.
- [4] Tanrıverdi H, Örnek T, Erboyl F, et al. Comparison of diagnostic

values of procalcitonin, C-reactive protein and blood neutrophil/lymphocyte ratio levels in predicting bacterial infection in hospitalized patients with acute exacerbations of COPD[J]. Wien Klin Wochenschr. 2015; 127:756 - 763.

- [5] Givi ME, Redegeld FA, Folkerts G, et al. Dendritic cells in pathogenesis of COPD [J]. Curr Pharm Des 2012; 18: 2329 - 2335.
- [6] Steinman RM. Decisions about Dendritic Cells: Past, Present, and Future[J]. Ann Rev Immunol 2012; 30: 1 - 22.
- [7] Blank F, Rothen-Rutishauser B, Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 36 (6):669 - 677.
- [8] Welte T, Miravittles M. Viral, bacterial or both? Regardless, we need to treat infection in COPD[J]. Eur Respir J. 2014; 44 (1):11 - 13.

- carcinomas by the Subcutaneous injection-Methyl-nitrosourea [J]. *Cancer Res.* 1983,43: 1628 - 1629.
- [14] Benakanakere I, Besch-Williford C, Schnell J, *et al.* Natural and synthetic progestins accelerate 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-initiated mammary tumors and increase angiogenesis in Sprague-Dawley rats[J]. *Clinical cancer research ; an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006, 12(13): 4062 - 4071.
- [15] Labrie F, Li S, Labrie C, *et al.* Inhibitory effect of a steroidal antiestrogen (EM-170) on estrone-stimulated growth of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA)-induced mammary carcinoma in the rat [J]. *Breast cancer research and treatment* 1995, 33(3):237 - 244.
- [16] Terada S, Uchide K, Suzuki N, *et al.* Induction of ductal carcinomas by intraductal administration of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene in Wistar rats [J]. *Breast cancer research and treatment.* 1995, 34(1):35 - 43.
- [17] Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, *et al.* Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study [J]. *Lancet.* 2003, 362(9382):419 - 427.
- [18] Lanari C, Molinolo AA, Pasqualini CD, *et al.* Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice [J]. *Cancer letters.* 1986, 33(2):215 - 223.
- [19] Ohi Y, Yoshida H. Influence of estrogen and progesterone on the induction of mammary carcinomas by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene in ovariectomized rats [J]. *Virchows Archiv B, Cell pathology including molecular pathology.* 1992, 62(6):365 - 370.
- [20] 姜军,陈意生,柳凤轩,等. 二甲基苯蒽诱导大鼠乳腺癌发生的组织形态学研究[J]. *中国肿瘤临床.* 1998,25:436 - 438.
- [21] Xia HJ, Chen CS, He BL, *et al.* Progress of non-human primate animal models of cancers [J]. *Dongwuxue Yanjiu.* 2011;32(1): 70 - 80.

[修回日期]2015 - 12 - 25

(下接第 15 页)

- [9] Cirone M, Conte V, Farina A, *et al.* HHV-8 reduces dendritic cell migration through down-regulation of cell-surfaceCCR6 and CCR7 and cytoskeleton reorganization [J]. *Virology.* 2012; 9: 92.
- [10] Demedts IK, Bracke KR, Van Pottelberge G, *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(10): 998 - 1005.
- [11] 顾延会,欧阳瑶. 烟熏联合脂多糖制备大鼠慢性阻塞性肺疾病动物模型[J]. *重庆医学.* 2012,41(13): 1295 - 1296.
- [12] Vestbo J, Hurd S S, Agustí A G, *et al.* Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary [J]. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013, 187(4): 347 - 365.
- [13] 汪珊珊,汪电雷,陶秀华,等. 脂多糖诱导的慢性阻塞性肺病模型大鼠肺支气管上皮 MRP1 功能分析[J]. *中国实验动物学报.* 2014, 22(3):30 - 34.
- [14] Manuel A Silva, Monica Porras, Jennifer Jury, *et al.* Characterization of Ileal Dendritic Cell Distribution in a Rat Model of Acute and Chronic Inflammation [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2006, 12: 457 - 470.
- [15] LaraE Kallal, MatthewA Schaller, DennisM. Lindell, *et al.* CCL20/CCR6 blockade enhances immunity to RSV by impairing recruitment of DC [J]. *Eur. J. Immunol.* 2010, 40: 1042 - 1052.
- [16] 郭佳,黄建华. 小鼠树突状细胞亚群与 T 细胞关系的研究进展[J]. *中国实验动物学报.* 2006, 14(3):236 - 240.
- [17] Liao S, Ding T, Rao X, *et al.* Cigarette smoke affects dendritic cell maturation in the small airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Mol Biol Rep* 2015, 11: 219 - 225.
- [18] López-Cotarelo P, Escribano-Díaz C, González-Bethencourt IL, *et al.* A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells [J]. *J Biol Chem.* 2015 290(2):827 - 840.

[修回日期]2016 - 01 - 25