

# 吸烟对大鼠肺组织 $B_{7-1} / B_{7-2}$ 及其相关配体表达的影响

王洁, 许建英

(山西医科大学第一临床医学院呼吸科, 太原 030001)

**【摘要】** 目的 通过研究吸烟对大鼠肺组织  $B_{7-1} / B_{7-2}$  及其相关配体表达的影响, 探讨专职抗原提呈细胞 (APC) 在吸烟所致肺部慢性炎症发生发展中的作用。方法 将 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为不吸烟组、吸烟 6 周组和吸烟 12 周组, 每组 10 只。采用免疫组化半定量法测定大鼠气道周围肺间质中慢性炎症细胞胞膜  $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$ 、 $CD_{28}$  和 CTLA-4 的表达水平。结果 吸烟 6 周组与吸烟 12 周组大鼠肺组织  $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$ 、 $CD_{28}$  和 CTLA-4 表达量较不吸烟组均显著增高 ( $P < 0.01$ ), 吸烟 12 周组较吸烟 6 周组表达量也均增高 ( $P < 0.01$ )。随吸烟时间的延长各指标表达量均呈上升趋势。结论 吸烟可引起大鼠肺组织  $B_{7-1} / B_{7-2} / CD_{28} / CTLA-4$  表达水平的增高, 提示 APC 可能在吸烟所致肺部慢性炎症发生发展中起重要作用。

**【关键词】** 肺部慢性炎症;  $B_{7-1}$ ;  $B_{7-2}$ ;  $CD_{28}$ ; CTLA-4

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0034-03

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.008

## The Effects of Smoking on the Expression of $B_{7-1} / B_{7-2}$ and Its Associated Ligands in the Lung Tissue of Rats

Wang Jie, XU Jian-ying

(Department of Respiratory Medicine, the First Hospital of Shan Xi Medical University, Tai Yuan 030001, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the roles of antigen presenting cells (APC) in the lung of chronic inflammation by investigating the effects of smoking on the expression of  $B_{7-1} / B_{7-2}$  and its associated ligand in the lung tissue of rats.

**Methods** Wistar rats ( $n = 30$ ) were randomly divided into non smoking group and smoking 6 weeks group, 12 weeks group, the number of each group was ten. Immunohistochemistry was used to semi-quantitatively analysis the changes of  $B_{7-1} / B_{7-2}$  and its associated ligands expression on the cytomembrane of chronic inflammation cells which were on the pulmonary interstitium around airways of rats. **Results** The expression of  $B_{7-1}$ ,  $B_{7-2}$ ,  $CD_{28}$  and CTLA-4 in the lung tissue of the smoking 6 weeks and 12 weeks groups' rats were higher than those of nonsmoking group ( $P < 0.01$ ), with the smoking 12 weeks group higher than the smoking 6 weeks group ( $P < 0.01$ ). Their expressions were increased in time-dependent manner. **Conclusions** Smoking can induce increasing expression of  $B_{7-1} / B_{7-2}$  and its related ligands in the lung tissue of rats; the APC may play an important role in the process of chronic pulmonary inflammation.

**【Key words】** Chronic pulmonary inflammation;  $B_{7-1}$ ;  $B_{7-2}$ ;  $CD_{28}$ ; CTLA-4

研究表明吸烟可导致肺部慢性炎症, 其发生发展过程可能与免疫系统对有毒物质的调节失衡有

[作者简介] 王洁 (1984 -), 女, 硕士生, 研究方向: 慢性阻塞性肺疾病基础及临床研究。E-mail: wjbaishu@163.com。

[通讯作者] 许建英, 博士生导师。Email: xujty@tom.com。

关<sup>[1]</sup>。目前认为香烟烟雾中的抗原物质可以影响机体的免疫状态,同时也是引起呼吸道及肺组织病理学改变的重要因素之一<sup>[2]</sup>。抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APC)作为机体免疫反应的首要环节,可将外源性抗原消化降解成含抗原决定簇的肽链,与细胞膜表面的主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)结合,形成抗原肽-MHC。此时 APC 表面的  $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$  分子与表达于 T 细胞表面的  $CD_{28}$ 、CTLA-4 分子互相作用,引起特异性免疫反应。本实验通过研究吸烟对大鼠肺组织  $B_{7-1}$  /  $B_{7-2}$  及其相关配体表达的影响,探讨专职 APC 在吸烟所致肺部慢性炎症发生发展过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠(山西医科大学实验动物繁育中心提供[SCXK(晋)2009-0001]);实验用香烟为芙蓉牌过滤嘴香烟(湖南中烟工业公司,焦油含量 12 mg/支,烟碱量 0.1 mg/支);兔抗  $B_{7-1}$  抗体,兔抗  $B_{7-2}$  抗体,兔抗  $CD_{28}$  抗体,兔抗 CTLA-4 抗体(北京博奥森生物技术有限公司);SABC(兔 IgG)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);DAB 显色剂(北京中杉金桥生物有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备:将 30 只健康雄性 Wistar 大鼠,体重  $200 \pm 20$  g。随机分为不吸烟组、吸烟 6 周组和吸烟 12 周组,每组 10 只。吸烟组大鼠放入自制实验性大鼠被动吸烟装置<sup>[3]</sup>(自动助燃装置连接密闭玻璃箱)内,每次吸烟 15 支(约 2 h),一日 2 次(上午、下午各 1 次),每周吸烟 6 d,分别吸烟 6 周和 12 周。不吸烟大鼠正常饲养 12 周,与吸烟大鼠饲养条件和环境相同。

1.2.2 标本采集:乌拉坦麻醉后处死动物,开胸取肺组织。抽取 4% 中性甲醛 3 mL 经主支气管均匀的注入两肺内,并置入 4% 中性甲醛中固定 48 h。石蜡包埋切片,用于 HE 染色及免疫组化染色。

1.2.3  $B_{7-1}$  /  $CD_{28}$  / CTLA-4 免疫组化染色:一抗稀释浓度为  $B_{7-1}$  (1:200)、 $B_{7-2}$  (1:200)、 $CD_{28}$  (1:300)、CTLA-4 (1:300),阴性对照以 PBS 代替一抗。采用过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SABC)免疫组化检测试剂说明书进行免疫组化半定量染色。

1.2.4 图像分析及结果判断:用 BX-51 型

Olympus 显微镜及 MISA-2000 数码显微图像分析系统对免疫组化染色切片进行图像分析。每张切片随机选取 3 个含有完整支气管环的气道,其内腔直径为  $400 \mu\text{m} \sim 600 \mu\text{m}$  之间。高倍视野下(放大倍数  $40 \times 10$  倍)观察气道周围间质中炎症细胞的分布情况。采图(规格  $15 \text{ cm} \times 18 \text{ cm}$ )并随机选取 3 个气道周围面积为  $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$  大小的肺间质作为测量区。结果判断:细胞膜周围出现点状、片状或半月形的棕黄色标记物为阳性单位。排除气道周围血管内或肺泡内免疫组化染色呈棕黄色的阳性单位。分别测量阳性单位的积分光密度、平均光密度、平均灰度。

### 1.3 统计学分析

所有数据以均数  $\pm$  标准差表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析,组间比较用 SNK-q 检验, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。同时以横轴为吸烟时间,纵轴为平均光密度值(OD),绘制  $B_{7-1}$  /  $CD_{28}$  / CTLA-4 的线性趋势图。

## 2 结果

### 2.1 大鼠肺组织病理学改变

HE 染色显示:不吸烟组大鼠肺泡结构完整,各级支气管管腔内及肺间质中少量的炎细胞浸润。吸烟 6 周组可见支气管纤毛倒伏,出现脱落。小气道腔内出现粘液栓、管壁充血水肿,支气管腔内和肺间质中可见淋巴细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞等炎症细胞浸润。吸烟 12 周组肺支气管周围平滑肌束增厚肥大或断裂萎缩,管腔纤毛柱状上皮细胞脱落或变性。支气管腔内及肺间质中可见炎性细胞,以巨噬细胞和淋巴细胞居多,部分气道出现粘液栓。肺泡间隔纤维样改变,出现肺泡融合形成肺大疱。

### 2.2 $B_{7-1}$ / $CD_{28}$ / CTLA-4 免疫组化染色

2.2.1 免疫组化阳性结果描述:两组吸烟大鼠支气管、血管周围及肺间质中可见不同程度表达为阳性的炎症细胞, $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$  的表达以巨噬细胞、淋巴细胞为主, $CD_{28}$ 、CTLA-4 的表达以淋巴细胞为主。不吸烟组大鼠表达为阳性的炎症细胞较少(见彩插 3 图 1)。

2.2.2 半定量结果分析:吸烟 6 周组与吸烟 12 周组大鼠肺组织  $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$ 、 $CD_{28}$ 、CTLA-4 表达量较不吸烟组均显著增高( $P < 0.01$ ),吸烟 12 周组较吸烟 6 周组各指标的表达量也均增高( $P < 0.01$ ),差异均有统计学意义(见表 1)。

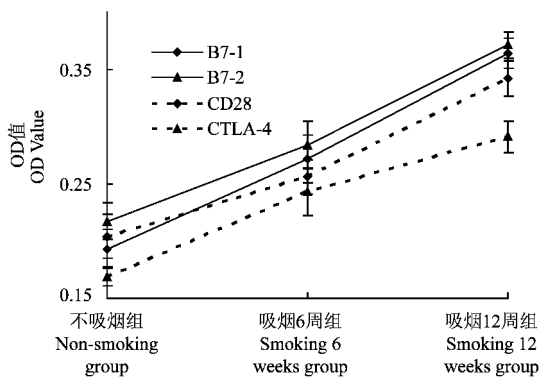
表 1  $B_{7-1}/B_{7-2}$  及其相关配体  $CD_{28}/CTLA-4$  的表达量 (OD 值)Tab. 1 The expression of  $B_{7-1}/B_{7-2}$  and its associated ligands  $CD_{28}/CTLA-4$  in chronic pulmonary inflammation

	N	$B_{7-1}$	$B_{7-2}$	$CD_{28}$	$CTLA-4$
不吸烟组 Non-smoking group	10	0.193 ± 0.017	0.217 ± 0.016	0.204 ± 0.019	0.169 ± 0.008
吸烟 6 周组 Smoking 6 weeks group	10	0.272 ± 0.021 <sup>*</sup>	0.284 ± 0.021 <sup>*</sup>	0.256 ± 0.015 <sup>*</sup>	0.243 ± 0.021 <sup>*</sup>
吸烟 12 周组 Smoking 12 weeks group	10	0.364 ± 0.013 <sup>* #</sup>	0.371 ± 0.012 <sup>* #</sup>	0.342 ± 0.015 <sup>* #</sup>	0.291 ± 0.014 <sup>* #</sup>

注: \* 与不吸烟组比较,  $P < 0.01$ ; # 与吸烟 6 周组比较,  $P < 0.01$

Note: \*  $P < 0.01$ , compared with the non-smoking group; #  $P < 0.01$ , compared with the smoking 6 weeks group

2.2.3  $B_7/CD_{28}/CTLA-4$  变化趋势:  $B_{7-1}$  与  $B_{7-2}$  的表达量随吸烟时间的延长呈上升趋势且线形相近。 $CD_{28}$  和  $CTLA-4$  的表达量随吸烟时间的延长也呈上升趋势, 吸烟 6 周时  $CD_{28}$  表达量上升趋势较  $CTLA-4$  缓慢; 吸烟 12 周时  $CD_{28}$  表达量上升趋势较  $CTLA-4$  快。(见图 2)

图 2  $B_7/CD_{28}/CTLA-4$  的趋势线形图Fig. 2 The changed Trend of  $B_7/CD_{28}/CTLA-4$ 

### 3 讨论

每支香烟燃烧时能产生大约 4700 多种化学物质<sup>[4]</sup>, 其中有相当一部分是有害的, 如香烟烟雾中的抗原物质烟草糖蛋白, 作为外源性抗原物质进入呼吸道内, 在肺组织中形成或出现新的抗原表位。再由肺部专职 APC (树突细胞、肺巨噬细胞、B 淋巴细胞和肺部嗜酸性粒细胞) 通过抗原肽-MHC 和共刺激分子将抗原信息传递给 T 细胞, 使 T 细胞活化增殖。其中  $B_7/CD_{28}/CTLA-4$  被认为是激活 T 细胞作用效果最强的共刺激分子。

有研究表明  $B_{7-1}$ 、 $B_{7-2}$  分子共有 25% 的氨基酸同源序列, 但不论 T 细胞活化阶段还是组织分布上这两种分子在 APC 上的表达和分布均不同<sup>[5]</sup>。正常静息状态下 APC 几乎不表达  $B_{7-1}$ , 巨噬细胞、B 细胞及树突细胞则表达较少的  $B_{7-2}$ 。在抗原刺激下, 活化的 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和嗜酸性粒细胞  $B_{7-1}$  和  $B_{7-2}$  表达水平都明显增高<sup>[6]</sup>。本实验结果表明不吸烟组气道间质组织中巨噬细胞与淋巴细胞

细胞膜表面  $B_{7-1}$  和  $B_{7-2}$  表达呈弱阳性, 吸烟 6 周组和吸烟 12 周组  $B_{7-1}$  及  $B_{7-2}$  表达水平较不吸烟组明显增高, 但随吸烟时间延长两者的增高趋势相似但并不完全相同。由此推测, APC 表面的  $B_7$  分子与 T 淋巴细胞表面的  $CD_{28}/CTLA-4$  结合的氨基酸序列及结合速率均不同。

$CD_{28}/CTLA-4$  是一对具有正负调节功能的共刺激分子。 $CD_{28}$  在调节 T 细胞活化增殖的过程中起着极其重要的作用, 与  $B_7$  结合后可促进 T 细胞抗原受体 (T cell antigen receptor, TCR) 介导细胞增殖, 防止 TCR 诱导 T 细胞进入无反应状态<sup>[5]</sup>。 $CD_{28}$  能调节并维持适量的、有功能的 T 细胞存活以保证特异性免疫应答存在, 同时也可通过细胞因子激活  $CTLA-4$  维持免疫过程的平衡和稳定。 $CTLA-4$  与  $B_7$  结合的亲和系数是  $CD_{28}$  的 20 ~ 150 倍<sup>[7]</sup>, 有利于炎症早期抗原刺激较少时, APC 表面  $B_7$  分子与  $CTLA-4$  结合并抑制 T 细胞激活。本实验结果表明: 吸烟 6 周组,  $CD_{28}$  表达量上升缓慢,  $CTLA-4$  表达量与之相比上升趋势较快; 吸烟 12 周组,  $CD_{28}$  表达量上升趋势较快,  $CTLA-4$  上升趋势较平缓。 $B_7$  表达量增高的同时  $CD_{28}$  和  $CTLA-4$  表达量也有所增高。提示炎症初期  $CTLA-4$  表达增高, 并可能与  $CD_{28}$  竞争性结合  $B_7$  分子从而抑制 T 细胞活化增殖, 可下调或终止 T 细胞的反应。随着炎症反应的进展  $CD_{28}$  与  $B_7$  结合占优势使 T 细胞逐渐被激活。尽管本实验大鼠  $B_7/CD_{28}/CTLA-4$  (吸烟 12 周内) 在肺部慢性炎症发生发展中表达呈增高趋势, 但有研究显示随着免疫耐受和炎症介质引起抗原提呈功能受限等问题出现, 共刺激分子的表达不会无限制增高<sup>[8]</sup>。

$B_7/CD_{28}/CTLA-4$  为 APC 激活 T 细胞的必要途径, 进而动员炎症反应、进一步激活辅助 B 细胞、发挥细胞毒作用, 从而产生大量的细胞因子。在肺组织中可刺激上皮细胞、破坏气道纤毛系统及上皮屏障、激发气道和肺组织慢性炎症。本实验中即可见吸烟组大鼠气道上皮倒伏、脱落、杯状细胞数增多, 部分气道出现鳞状上皮化生。气道、血管周围及肺

(上接第 11 页)

## 参考文献:

- [ 1 ] Huang X , Zhu D , Lou Y. A novel anticancer agent , icaritin , induced cell growth inhibition , G1 arrest and mitochondrial transmembrane potential drop in human prostate carcinoma PC-3 cells[J]. Eur J Pharmacol , 2007 ; 564 ( 1 ) : 26 - 36.
- [ 2 ] Ye HY , Lou YJ. Estrogenic effects of two derivatives of icaritin on human breast cancer MCF-7 cells[J]. Phytomedicine. 2005 ; 12 : 735 - 741.
- [ 3 ] Wang ZQ , Lou YJ. Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylcaritin in MCF-7 cells [J]. Eur J Pharmacol. 2004 , 504 ( 3 ) : 147 - 153.
- [ 4 ] Zhu DY , Zhang XN , Du Y. Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into neuronal cells induced by icaritin in vitro[J]. Journal of Zhejiang University ( Medical Sciences ). 2007 , 36 ( 3 ) : 217 - 223.
- [ 5 ] Wang Z , Wang H , Wu J , et al. Enhanced co-expression of beta-tubulin III and choline acetyltransferase in neurons from mouse embryonic stem cells promoted by icaritin in an estrogen receptor-independent manner[J]. Chem Biol Interact. 2009 , 179 ( 2 - 3 ) : 375 - 85.
- [ 6 ] Kataoka S , Tsuruo T. Physician Education: Apoptosis [J]. Oncologist. 1996 , 1 ( 6 ) : 399 - 401.
- [ 7 ] Nagata S. Apoptosis by death factor [J]. Cell , 1997 ; 88 ( 3 ) : 355 - 336.
- [ 8 ] Kockenbery D , Nunez G , Milliman C , et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death [J]. Nature , 1990 , 348 ( 6299 ) : 334 - 336.
- [ 9 ] Liu S , Bishop WR , Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21 ( WAF1 / Cip1 ) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy [J]. Drug Resist Updat. 2003 , 6 ( 4 ) : 183 - 195.
- [ 10 ] Adachi S , Ito H , Tamamori-Adachi M , et al. Cyclin A / cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes [J]. Circ Res. 2001 , 88 ( 4 ) : 408 - 414.
- [ 11 ] 袁长青 , 丁振华. Caspase 的结构与功能 [J]. 国外医学分子生物学分册 , 2002 , 24 ( 3 ) : 146 - 150.
- [ 12 ] Perfettini JL , Kroemer RT , Kroemer G. Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak [J]. Nature Cell Biology , 2004 , 6 : 386 - 388.

(修回日期)2011-01-17

(下接第 36 页)

泡内有大量炎症细胞浸润。小气道肌层萎缩或肥大、肺泡结构破坏形成肺大疱并出现肺组织纤维化。由此可见, B<sub>7</sub>/CD<sub>28</sub>/CTLA-4 作用机制可能参与了肺部慢性炎症及其所引起的病理学改变。

综上所述, 吸烟可引起大鼠肺组织 B<sub>7</sub>/CD<sub>28</sub>/CTLA-4 表达水平的增高, 促进或抑制 T 细胞的活化增殖以调节适应性免疫反应, 提示 APC 可能在吸烟所致肺部慢性炎症发生发展中起重要的作用。这也为临床上阻断或延缓吸烟所致的肺部慢性炎症的进程提供了新的治疗思路, 但其具体调节机制还有待进一步研究。

## 参考文献:

- [ 1 ] Curtis J L , Freeman C , Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research [J]. Proceedings of the American Thoracic Society , 2007 , 4 ( 7 ) : 512 - 521.
- [ 2 ] Domagal-Kulawik J. Effects of Cigarette Smoke on the Lung and Systemic [J]. Immunity Journal of Physiology and Pharmacology. 2008 Dec ; 59 , Suppl 6 : 19 - 34.
- [ 3 ] 许三林 , 吴人亮 , 陈春莲 , 等. 上皮钙粘附素在吸烟小鼠呼吸道上皮损伤修复中表达的研究 [J]. 中华结核和呼吸杂志 , 1999 , 22 : 417 - 419.
- [ 4 ] 付强 , 成静 , 韩中博 , 等. 香烟烟雾提取物对人呼吸道上皮细胞 DNA 损伤和凋亡的影响 [J]. 《癌症》. 2006 , 25 ( 10 ) : 1191 - 1197.
- [ 5 ] 施焕中 , 林江涛. 肺脏免疫学及免疫相关性疾病 ( 第 1 版 ) [M]. 人民卫生出版社. 2006 , 02. 326 - 331.
- [ 6 ] Steven CE , David C , Andrem D , et al [J]. Transplantation , 1997 , 64 ( 10 ) : 1497 - 1499.
- [ 7 ] Chang TT , Kuchroo VK , Sharp AH. Role of the B7-CD28 / CTLA-4 pathway in autoimmune disease [J]. Curr Dir Autoimmun , 2002 , 5 ( 1 ) : 113 - 130.
- [ 8 ] Clinton S. R , Francesca F. Cigarette Smoke Exposure Impairs Nodes of Mice Proliferation in Thoracic Lymph Dendritic Cell Maturation and T Cell [J]. Immunol. 2008 ; 180 ; 6623 - 6628.

(修回日期)2011-01-06

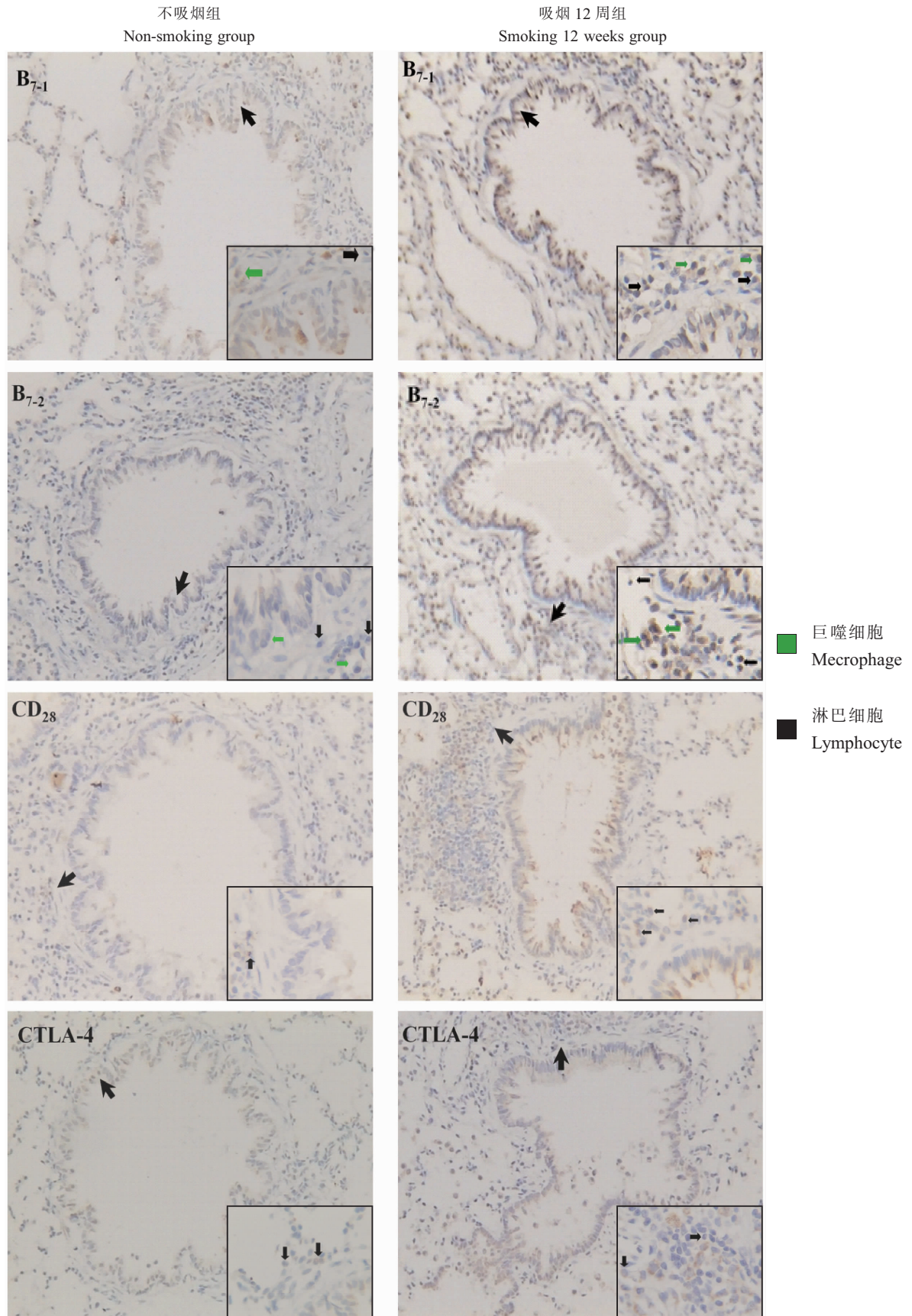


图 1 B<sub>7-1</sub>/B<sub>7-2</sub> 及其配体 CD<sub>28</sub>/CTLA-4 免疫组化染色放大倍数 10×10(10×40)

Fig. 1 Expression of B<sub>7-1</sub>/B<sub>7-2</sub> and its associated ligands CD<sub>28</sub>/CTLA-4 in non-smoking group and 12weeks group

(Immunohistoc-hemistry, ×100(400))