

NF- κ B 启动的炎症反应在小鼠侵袭性肺曲霉病肺损伤中的作用

刘金辉¹ 杨芬² 罗闾丹² 陈志平¹ 谢小梅^{2*}

(1. 南昌大学医学院微生物学教研室 南昌 330006)
(2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

摘要: 为了探讨 NF- κ B 启动的炎症反应在小鼠侵袭性肺曲霉病肺损伤中的作用, 将小鼠分 3 组: 正常组、正常+烟曲霉菌接种组、IPA 模型组, 小鼠鼻吸入烟曲霉菌第 4 天处死, 取肺组织, 肺组织切片经 HE 染色观察病理损伤; 比色法测定肺组织 MPO 活性; 免疫组化法评价肺组织 NF- κ B p65 蛋白的活化; RT-PCR 法检测肺组织 TNF- α 、IFN- γ 和 β -tubulin mRNA 的表达。结果显示, 正常健康组小鼠肺组织结构正常, 未见炎症发生; 正常+烟曲霉菌接种组小鼠肺组织有炎症细胞浸润, 未见孢子萌芽; IPA 模型组小鼠的肺组织病理损伤严重, 可见炎症细胞浸润, 孢子萌芽生成菌丝。正常+烟曲霉菌接种组和 IPA 模型组小鼠肺组织的 TNF- α 和 IFN- γ mRNA 的相对表达水平、NF- κ B p65 免疫组化评分和 MPO 活性均高于正常组小鼠 ($P < 0.05$); 并且 IPA 模型组小鼠肺组织 NF- κ B p65 免疫组化评分值和 MPO 活性均高于正常+烟曲霉菌接种组 ($P < 0.05$)。结果提示, 烟曲霉菌感染可激活小鼠肺组织 NF- κ B 介导的炎症信号通路, 诱导下游 TNF- α 和 IFN- γ 的表达, 募集大量的中性粒细胞于感染组织, 是导致 IPA 小鼠肺组织严重病理损伤的因素之一。

关键词: 烟曲霉菌, 侵袭性肺曲霉病, NF- κ B, TNF- α

The Effect of Inflammation-mediated by NF- κ B on Lung Injury of Mice with Invasive Pulmonary Aspergillosis

LIU Jin-Hui¹ YANG Fen² LUO Hong-Dan² CHEN Zhi-Ping¹ XIE Xiao-Mei^{2*}

(1. Department of Microbiology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006)
(2. Key Laboratory of Modern Preparations of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004)

Abstract: The aim of this study was to explore the effect of inflammation-mediated by NF- κ B on lung injury of mice with invasive pulmonary aspergillosis. The mice were divided into three groups including the group of normal mice, the group of normal mice with infection and the group of IPA mice. The mice were sacrificed on day 4 post-infection. The lung tissues from each group were collected for observing the pathological alteration, evaluating histological scores of NF- κ B p65 with immuno-histochemistry stain, detecting mRNA expression level of TNF- α and IFN- γ in comparison to β -tubulin in ratio of densitometric units

using RT-PCR and measuring MPO of neutrophils with colorimetry. The pathological analysis showed the normal structure and no inflammatory reaction in the lungs of the normal mice; and the infiltration of inflammatory cells, weak injury and no germination of spore into hypha in the lungs of normal mice infected with *A. fumigatus* and serious injury like destruction of alveolar structure, bleeding and germination of spore into hypha in the lungs of IPA mice. The expression level of TNF- α and IFN- γ , histological score of NF- κ B p65 and activity of MPO in both groups of normal mice infected with *A. fumigatus* and IPA were higher than in the normal mice group ($P < 0.05$). But histological score of NF- κ B p65 and activity of MPO in IPA mice were higher than in normal mice infected with *A. fumigatus* ($P < 0.05$). The results suggested that the expression of TNF- α and IFN- γ as well as recruitment of neutrophils that were promoted by the signal pathway mediated by NF- κ B activated by infection of *A. fumigatus* may be one of the factors that cause the seriously pathological injury of lungs in the mice with invasive pulmonary aspergillosis.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Pulmonary aspergillosis, NF- κ B, TNF- α

烟曲霉为空气中常见的腐生菌,其孢子直径很小,可被动吸入呼吸道,人们每天都要吸入上百个孢子,健康个体吸入的孢子可被肺部的天然免疫所清除而不致病。侵袭性肺曲霉病(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)是由烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)侵入免疫受损宿主所导致的致死率较高的感染性疾病^[1]。天然免疫信号通路的激活在抗感染中起重要作用,病原菌侵入宿主后,其病原相关模式分子可识别呼吸系统黏膜表皮细胞和肺泡巨噬细胞的多种病原识别受体(pathogen recognition receptors, PRRs)^[2],如Toll样受体(Toll-like receptors, TLRs),核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NODs)蛋白家族和维生素A酸诱导的受体家族分子等PRRs,与之相互作用,激活不同天然免疫信号通路,最终活化NF- κ B以启动下游炎症细胞因子TNF- α 和IFN- γ 等分子的表达,并募集活化中性粒细胞,调节抗感染天然免疫。据报道NF- κ B的激活与多种肺疾病的发生有一定关联^[3],但其启动的炎症反应在IPA小鼠肺组织损伤中作用如何未见报道。

本研究以实验小鼠侵袭性肺曲霉病模型^[4]为基础,比较正常组、正常+烟曲霉菌接种组和IPA模型组小鼠,鼻吸入烟曲霉菌第4天的肺组织病理损伤特征,并检测该时相点肺组织中NF- κ B p65活化水平,IFN- γ 和TNF- α mRNA的表达水平,分析肺组织中中性粒细胞髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的活性,初步探讨NF- κ B启动的炎症反应在侵袭性肺曲霉病肺损伤中的作用,为侵袭性肺曲霉病的治疗和预防提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组:昆明种清洁级小鼠,雄性,5周龄,22 g \pm 2 g,由江西中医学院实验动物中心提供;小鼠分3组,每组6只:A)正常组:正常健康小鼠;B)正常+接种烟曲霉菌组:未免疫抑制但感染烟曲霉菌小鼠;C)IPA模型组:给予免疫抑制并感染烟曲霉菌小鼠。

1.1.2 菌株与培养基:烟曲霉菌(临床分离株,分离号3910):购自中国医学真菌菌种保藏管理中心(南京)。烟曲霉菌采用蔡氏培养基培养,配成 1×10^7 CFU/mL孢子悬液备用^[4]。

1.1.3 主要试剂:环磷酰胺(cyclophosphamide CY, NO:06060521):江苏恒瑞医药股份有限公司;Trizol为Invitrogen公司产品;TaKaRa RNA PCR Kit 3.0(AMV)试剂盒为大连宝生物工程公司产品;MPO试剂:溴化十六烷基三甲胺(CTAB)Amresco公司产品;MPO反应液:盐酸邻联茴香胺(Sigma公司产品)16.7 mg, 50 mmol/L PBS 10 mL,蒸馏水 90 mL,加30%过氧化氢,使终浓度为0.0005%。OTC包埋剂:北京中杉;兔NF- κ B多克隆抗体:Santa Cruz公司;SABC(兔IgG)试剂盒和DAB试剂盒:武汉博士德公司。ultraspec4300紫外/可见分光光度计,PTC-200梯度热循环仪;SIGMA2K-15高速冷冻离心机;FR-200复日凝胶图象分析系统。

1.2 IPA模型小鼠的建立^[4]

IPA模型组小鼠分别腹腔注射CY 200 mg/(kg·d)其它两组小鼠腹腔注射等量的生理盐水,连续2 d。除正常组小鼠外,乙醚麻醉其它两组小鼠,取制备

好的 50 μ L 的烟曲霉孢子悬液, 由鼻孔滴入, 放松腹部, 小鼠即吸入菌液。小鼠接种烟曲霉菌后第 4 天分别处死, 无菌法分离肺组织用于肺组织病理切片和 RNA 提取。

1.3 肺组织病理观察

取各组小鼠肺组织作石蜡切片, 常规 HE 染色, 观察病理变化及孢子的萌芽。

1.4 RT-PCR 检测肺组织目的基因表达

取 100 mg 肺组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA。按 TaKaRa RNA PCR Kit 3.0(AMV)使用说明进行反转录, 反转录物 -80°C 保存备用。 β -tublin(内对照)、IFN- γ 和 TNF- α 的引物由上海生工公司合成, 序列如下: β -tublin: 5'-AAGGGTCACTACACCGAG-3', 5'-GCGAATCCTGGCATGAAGAAGT-3', 其 PCR 产物长度为 506 bp; TNF- α : 5'-GTCGTAGCAAACCACCAAGTG-3', 5'-GGTATGAGATAGCAAATCGG-3', 其 PCR 产物长度为 214 bp, IFN- γ : 5'-AGCAACAACATAAGCGTCAT-3', 5'-GAAGCACCAGGTGTCAAG-3', 其 PCR 产物长度为 734 bp。50 μ L PCR 反应体系中含 10 μ L cDNA, 反应条件: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 经凝胶成像系统成像, 对各条带进行灰度扫描。以目的条带的密度积分值与同时扩增的 β -tublin 条带的密度积分值的比值, 评价目的基因 mRNA 在肺组织中相对表达水平。

1.5 肺组织 MPO 活性的测定^[5]

取肺组织 100 mg, 加 0.5% CTAB 溶液 2 mL, 匀浆, 超声粉碎亚细胞成分。 $12000\times g$ 4°C 离心 20 min。取 0.1 mL 上清液加 MPO 反应液 2.9 mL, 460 nm 波长处紫外分光光度计扫描 2 min。以第 30 秒到第 90 秒的 1 min 吸光度的变化代表酶活力的改变。1 U MPO 活力以分解 1 mmol H_2O_2 来表示。MPO 活力单位 $\text{U/g} = (\text{A}_{460}/\text{min}) / (11.3 \times \text{所加组织量 g}/\text{反应液 L})$

1.6 肺组织 NF- κ B p65 蛋白的测定

取小鼠肺组织, 冰冻包埋切片, 甲醛固定; 3% 的 H_2O_2 37°C 孵育 10 min, PBS 洗 3 次; 山羊血清 25°C 封闭 20 min, 加特异性 NF- κ B p65 抗体(1:200),

37°C 1 h, PBS 洗 3 次; 滴生物素标记二抗, 37°C 20 min, PBS 洗 3 次; 滴加 SABC 试剂, 37°C 20 min, PBS 洗 4 次; DAB 显色, 25°C 20 min; 水洗, 苏木素染色, 中性树脂胶封片, 镜下观察。

观察 5 个有代表性的视野, 细胞核染为棕黄为阳性细胞, 并计算阳性细胞百分率(P_i): P_i 评分标准为 5 级, 阳性染色细胞占计数细胞百分率 0~9% 为 0 分, 10%~39% 为 1 分, 40%~69% 为 2 分, 70%~89% 为 3 分, 90%~100% 为 4 分; 同时观察胞浆的棕黄染色程度(i), 其分为 5 级, 评分标准为基本不着色者 0 分, 着色淡者 1 分, 着色适中者 2 分, 明显着色者 3 分, 强着色者 4 分。计算免疫染色分值 (Immunostaining score) = $(P_i \times i) / 4$, 以反应 NF- κ B p65 在肺组织中的活化。

1.7 统计学方法

数据采用 SPSS13.0 分析软件进行统计处理, 数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), t 检验法对组间均数进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理观察

小鼠接种烟曲霉第 4 天后的肺组织切片 HE 染色结果见图 1, 正常组小鼠的肺组织结构正常; 正常+烟曲霉菌接种组小鼠肺组织炎症细胞浸润明显, 有出血, 但未见孢子聚集及萌芽成菌丝; IPA 模型组小鼠肺组织中可见较严重的急性肉芽肿炎症病灶, 炎症细胞浸润, 孢子萌芽生成菌丝, 炎症细胞与菌丝相互作用。

2.2 小鼠肺组织 NF- κ B p65 测定

免疫组化结果显示, 正常组肺组织 NF- κ B p65 染色较浅。正常+烟曲霉菌接种组气管柱状上皮细胞胞浆中可见弱阳性染色。IPA 模型组可见强阳性染色, 气管柱状上皮细胞、肺组织上皮细胞和巨噬细胞的胞浆和胞核中均见阳性染色; IPA 模型组小鼠免疫组化总评分显著性高于正常+烟曲霉菌接种组 ($P < 0.05$)。见图 2 和表 1。

2.3 小鼠肺组织 TNF- α 和 IFN- γ mRNA 表达

感染烟曲霉菌 4 d 后, 正常+烟曲霉菌接种组和 IPA 模型组肺组织 TNF- α 和 IFN- γ 基因的 mRNA 表达量高于正常组 ($P < 0.05$); IPA 模型组 TNF- α 基因的

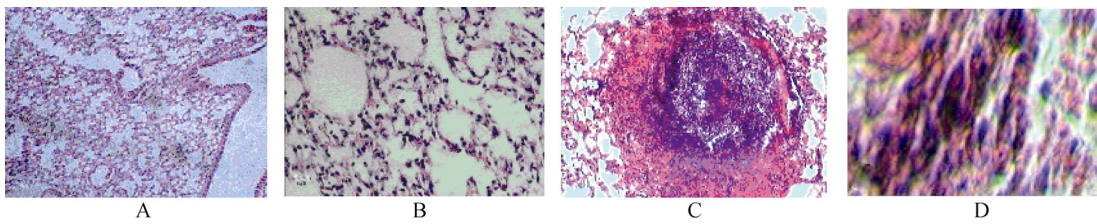


图 1 肺组织 HE 染色图

Fig. 1 Results of HE staining of the lungs

A: The normal group($\times 100$); B: The normal mice group with infection($\times 200$); C: IPA mice group($\times 200$); D: IPA mice group($\times 400$)

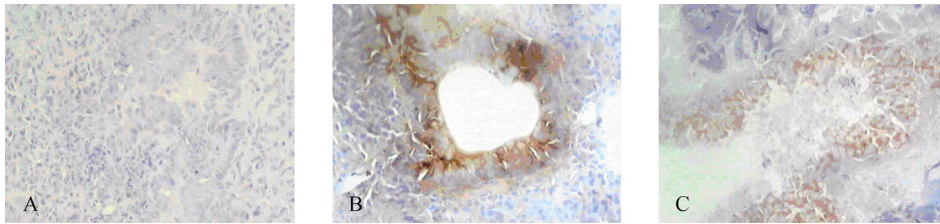


图 2 小鼠肺组织 NF-κ Bp65 的免疫组化染色

Fig. 2 Histological stain of NF- κ Bp65 in lungs of mice

Note: A: The normal group($\times 200$); B: The normal mice group with infection($\times 200$); C: IPA mice group($\times 200$)

表 1 小鼠肺组织目的基因 mRNA 表达、MPO 值和 NF-κBp65 免疫组化总评分的比较($\bar{x}\pm s$)($n=6$)
Table 1 Comparison of mRNA expression level, MPO value and scores of NF-κBp65 in lungs of mice($\bar{x}\pm s$)($n=6$)

Group	TNF- α Ratio of densitometric units	IFN- γ Ratio of densitometric units	MPO Value(U/g)	Histo-scores of NF-κBp65
The normal mice with infection	0.5189 \pm 0.0294	0.0697 \pm 0.0153	2.089 \pm 0.440	0.27 \pm 0.12
IPA mice	0.6185 \pm 0.0418	0.0362 \pm 0.0163	3.438 \pm 0.671	1.75 \pm 0.94
Normal mice	0.4480 \pm 0.0580	0.0066 \pm 0.0026	0.246 \pm 0.035	0

Note: * : $P < 0.05$, vs the normal group; # : $P < 0.05$, vs IPA mice group

mRNA 表达量高于正常烟曲霉菌接种组, 但 IFN- γ mRNA 表达量低于正常烟曲霉菌接种组($P < 0.05$)。见图 3 与表 1。结果说明其上游通路得以激活。

IPA 模型组小鼠肺组织 MPO 值显著高于正常组 ($P < 0.05$), IPA 模型组小鼠肺组织 MPO 值高于正常+烟曲霉菌接种组($P < 0.05$), 见表 1。

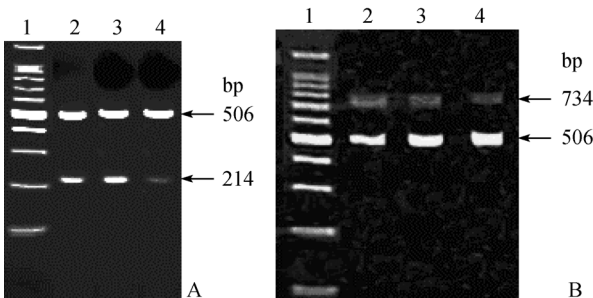


图 3 小鼠肺组织 TNF- α mRNA(A)和 IFN- γ mRNA(B) 的表达

Fig. 3 Expression of TNF- α mRNA(A)and IFN- γ mRNA(B)
1: Marker; 2: The normal mice group with infection; 3: IPA mice group;
4: The normal group

2.4 小鼠肺组织 MPO 活性

烟曲霉菌感染 4 d 后, 正常+烟曲霉菌接种组和

3 讨论

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)是中性粒细胞合成一种特异性含氯溶酶体酶, 主要存在于中性粒细胞嗜天青颗粒中, 含量较恒定, 约占细胞干重的 5%, 其含量的多少与中性粒细胞的数目成正比, 是评价中性粒细胞在组织中积聚的指标^[5,8]。本研究结果发现正常小鼠肺组织的MPO值处于本底水平, 说明无中性粒细胞的募集, 这一结果与病理观测结果一致。而正常+烟曲霉菌接种组和IPA模型组小鼠肺组织MPO值均显著高于正常小鼠组 ($P < 0.05$), 说明烟曲霉菌的侵入是中性粒细胞募集到感染组织的诱因。其募集的分子机制非常复杂, 在本研究中, 感染小鼠肺组织中NF- κ B p65 及其下

游分子TNF- α 表达上调与中性粒细胞MPO表达升高的同步性,就提示中性粒细胞募集至少需要肺组织细胞与炎症细胞的NF- κ B/TNF- α 天然免疫信号通路的激活。文献报道的研究结果^[5-7]也证实感染早期中性粒细胞的募集需要TNF- α 的调节。

尽管烟曲霉菌的感染均能激活正常+烟曲霉菌接种组和IPA模型组小鼠肺组织中NF- κ B/TNF- α 介导的抗感染天然免疫信号通路,募集中性粒细胞到感染的肺组织。但本研究的病理观察结果显示二组小鼠肺组织病理损伤程度存在明显的差异,IPA小鼠的肺组织肺泡塌陷,可见较严重的急性肉芽肿炎症病灶,孢子萌芽生成菌丝,募集的单核细胞和中性粒细胞与菌丝相互作用。正常+烟曲霉菌接种组肺组织炎症细胞浸润明显,有出血,但未见孢子聚集及萌芽成菌丝。

造成二组小鼠肺组织病理改变出现显著差异的分子机制比较复杂。我们已取得的研究结果表明^[4],IPA模型小鼠由于感染前服用了免疫抑制剂CY,和正常小鼠相比,末梢血液中的淋巴细胞和脾细胞计数显著下降,淋巴器官胸腺和脾脏出现明显萎缩,循环至肺组织的单核细胞等淋巴细胞数量下降,导致肺组织中正常表达NF- κ B的细胞数量显著下调,使得感染立即早期抗真菌的天然免疫未能有效的激发。感染早期的孢子未能杀死,得以萌芽生成菌丝,导致烟曲霉菌在组织中侵袭性生长繁殖^[9]。本文的病理结果和IPA小鼠肺组织体外真菌培养的菌落数显著高于正常接种组^[4],就提示免疫抑制剂CY下调肺组织中正常表达NF- κ B的细胞,导致感染早期孢子萌芽生成菌丝,并得以进一步繁殖,是IPA发生和发展的重要因素。

本研究发现IPA模型组小鼠肺组织NF- κ B的活性和MPO值高于正常+烟曲霉菌接种组($P<0.05$),并与肺损伤呈正相关性,说明IPA小鼠中菌丝萌芽后导致的真菌进一步的侵袭性生长繁殖,新合成的菌体成份及其二级代谢产物可与肺组织细胞PRRs相互作用,激活NF- κ B通路,导致其介导的抗真菌感染的天然免疫信号放大,进一步募集大量中性粒细胞与单核细胞到肺组织。这可能是IPA模型组小鼠肺组织MPO值高于正常+烟曲霉菌接种组的原因之一。大量募集的中性粒细胞对感染组织及其临近

组织所致的病理损伤的机制是比较清楚的^[10,11],其所合成和释放的MPO等各种蛋白酶在抑制孢子的出芽和菌丝繁殖的同时,对机体组织造成病理损伤。本研究结果说明NF- κ B/TNF- α /中性粒细胞的募集(MPO值)这一天然免疫通路的过度诱导激活,是导致IPA小鼠肺组织严重病理损伤的一个原因,为进一步探讨IPA的有效治疗与预防提供了分子基础。

参 考 文 献

- [1] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 1998, **26**: 781-803.
- [2] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, **124**: 783-801.
- [3] Wright JG, Christman JW. The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. *Am J Respir Med*, 2003, **2**(3): 211-219.
- [4] 罗闯丹, 施 旻, 谢小梅, 等. 侵袭性肺曲霉病实验小鼠模型的建立. *江苏医药*, 2008, **34**(1): 66-68
- [5] Silvia B, Silvia M, Katia P, et al. TLRs Govern Neutrophil activity in *Aspergillosis*. *J Immunol*, 2004, **173**: 7406-7415.
- [6] Masumoto JK, Yang S, Varambally B, et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment *in vivo*. *J Exp Med*, 2006, **203**: 203-213.
- [7] Schelenz S, Smith DA, Bancroft GJ, et al. Cytokine and chemokine response following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus*: obligatory role of TNA-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med Mycol*, 1999, **37**: 183-194.
- [8] Aratani Y, Kura F, Watanabe H, et al. Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*, 2002, **40**: 557-563.
- [9] Tobias MH, Marta F. *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic cell*, 2007, **6**(11): 1953-1963
- [10] Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukocyte Biology*, 1994, **56**: 672
- [11] Lee WL, Downey GP. Leukocyte elastase: Physiological functions and role in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**: 896-904.