

重组白细胞介素-10/Fc 融合蛋白对内毒素诱导急性肺损伤小鼠的实验干预作用

毕铭华 王宝恩 郑心校 李敏 Konstantin Mayer 张淑文

【摘要】 目的 探讨重组白细胞介素-10(rIL-10)/Fc 融合蛋白对内毒素诱导的急性肺损伤(ALI)小鼠炎症调控作用及其机制。方法 向气管内注射脂多糖(LPS)制成 ALI 动物模型, rIL-10/Fc 融合蛋白采用腹腔内给药方式。132 只小鼠被随机均分为正常对照组、rIL-10/Fc 对照组、ALI 模型组、rIL-10/Fc 治疗组。每组选择 25 只小鼠观察 24 h 存活率;其余用于检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞数量、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-1 β 水平,以及肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性、肺组织湿/干重(W/D)比值;光镜下观察肺组织病理学改变。结果 注射 LPS 后 4 h 可引起 BALF 中 TNF- α 和 IL-1 β 显著升高(P 均 <0.01), rIL-10/Fc 治疗组较 ALI 模型组有所降低,但差异无统计学意义;但在 8 h 和 12 h, rIL-10/Fc 融合蛋白能显著抑制 BALF 中 TNF- α 产生,在 12 h 抑制 IL-1 β 产生;并明显改善 LPS 注射 24 h 后实验动物的存活率($P<0.01$)。rIL-10/Fc 对 LPS 诱导的 ALI 小鼠 BALF 中白细胞数量、肺组织 MPO 活性、肺组织 W/D 比值无显著改变。注射 LPS 24 h 后,肺组织出现了明显的炎性改变,但在 rIL-10/Fc 融合蛋白干预后没有出现显著的差异。结论 rIL-10/Fc 融合蛋白能显著抑制 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺促炎细胞因子产生,改善预后。

【关键词】 重组白细胞介素-10/Fc 融合蛋白; 肺损伤,急性; 内毒素

The effect of recombinant interleukin-10/Fc fusion protein on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice BI Ming-hua*, WANG Bao-en, ZHENG Xin-xiao, LI Min, Konstantin Mayer, ZHANG Shu-wen. *Medical and Health Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To clarify the regulatory role and mechanism of recombinant interleukin-10/Fc (rIL-10/Fc) fusion protein on inflammatory parameters during development of acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. **Methods** An ALI model was reproduced by intra-tracheal injection of LPS. rIL-10/Fc was administered intraperitoneally. One hundred and thirty-two BALB/c mice were divided into four groups, including saline control group, rIL-10/Fc control group, ALI model group, and rIL-10/Fc treatment group. Twenty-four-hour survival rate was determined in 25 mice of each group. The number of inflammatory cells and inflammatory mediators in bronchia-alveolar lavage fluid (BALF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β , and also lung myeloperoxidase (MPO) activity, lung wet/dry (W/D) ratio were determined in the rest of mice. Pathological changes in lung were examined with hematoxylin-eosin (HE) staining, and inflammatory change was evaluated under microscope. **Results** Levels of TNF- α and IL-1 β in BALF were substantially increased 4 hours after intra-tracheal LPS (both $P<0.01$), and they were lowered but without significant difference after rIL-10/Fc administration. However, rIL-10/Fc fusion protein markedly attenuated release of TNF- α at 8 hours and 12 hours, and IL-1 β was lowered at 12 hours after LPS challenge. Pre-treatment with rIL-10/Fc fusion protein significantly improved survival rate at 24 hours in LPS challenged mice ($P<0.01$). There was no significant difference in cell count in BALF, MPO, lung W/D ratio, after treatment of rIL-10/Fc fusion protein. Obvious inflammatory changes were found in lung was found pathologically at 24 hours after LPS injection, but there was no significant difference compared with ALI mice with rIL-10/Fc fusion protein administration. **Conclusion** rIL-10/Fc fusion protein inhibits release of TNF- α and IL-1 β in BALF in a LPS-induced ALI murine model. rIL-10/Fc fusion protein improves survival rate in ALI mice by decreasing the release of pro-inflammatory cytokines.

【Key words】 recombinant interleukin-10/Fc fusion protein; acute lung injury; lipopolysaccharide

基金项目:北京市科技计划重大项目资助课题(2002-641)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京友谊医院(毕铭华,王宝恩,李敏,张淑文);美国匹兹堡大学器官移植中心(郑心校);德国吉森大学肺病中心(Konstantin Mayer)

作者简介:毕铭华(1966-),女(汉族),江苏省人,医学博士,副主任医师,Email:bmh_119@hotmail.com.

随着“失控炎症反应可引发多器官功能障碍综合征(MODS)”理论出现,人们对急性肺损伤(ALI)的认识转向炎症发生、调控方面。抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)是由单核/巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生,并具有多向生物活性的强免

疫抑制因子,可抑制单核/巨噬细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1、IL-6、IL-8 等多种炎症介质,有利于重建体内促炎/抗炎介质平衡^[1]。IL-10 在脓毒症治疗中的应用潜能很大,但其生物半衰期只有 30 min,重组(r)IL-10/Fc 融合蛋白具有 IL-10 的生物学功效,可以降低脓毒性休克的死亡率,同时 Fc 片段的连接延长了它的生物半衰期^[2]。本研究旨在探讨 rIL-10/Fc 融合蛋白对内毒素诱导 ALI 小鼠炎症反应和存活率的实验干预作用,为 rIL-10/Fc 融合蛋白治疗 ALI 提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 rIL-10/Fc 融合蛋白: rIL-10/Fc 融合蛋白是将 IL-10 与小鼠 Fc γ 2a 融合为二聚体,经实验证实它具有与 IL-10 相同的生物功效,同时延长了生物半衰期,由美国匹兹堡大学器官移植中心郑心教授提供。但是 Fc γ 2a 小鼠亚型易与表达 Fc γ 受体 I (Fc γ R I) 或补体(C1q)的细胞结合产生抗体介导的细胞毒作用(ADCC)或补体介导的细胞毒作用(CDC),因此,将 Fc 片段的 Fc γ R I 和 C1q 结合位点进行定点突变,使其成为非细胞毒性的 rIL-10/Fc 融合蛋白(图 1)。

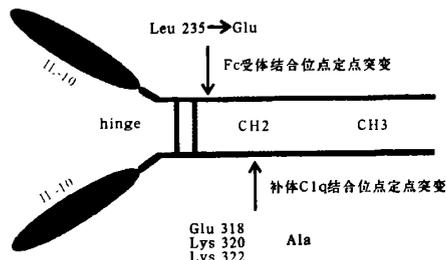


图 1 rIL-10/Fc 融合蛋白合成结构图

1.2 动物分组及模型制备: 雄性 BALB/c 小鼠, 8~12 周龄, 体重 18~21 g。按随机数字表法将小鼠分为正常对照组、rIL-10/Fc 对照组、ALI 模型组、rIL-10/Fc 治疗组。经气管内注入脂多糖(LPS, E. coli O111:B4, 美国 Sigma 公司) 10 μ g 制成 ALI 动物模型^[3]; 两个对照组注射等量(50 μ l)生理盐水。于注射 LPS 前 24 h 经腹腔注射 rIL-10/Fc 融合蛋白 2 μ g, 注射前 0.5 h 再注射 1 次。在注射 LPS 后 4、8、12 和 24 h, 每组选 8 只小鼠抽取支气管肺泡灌洗液(BALF)备用。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 小鼠存活率: 观察每组 25 只小鼠注射 LPS 或生理盐水后 24 h 的存活率。

1.3.2 肺水肿测定: 摘取各组 5 只动物的全肺组织, 立即称湿重(W), 然后置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱中, 5 d 后称干重(D), 计算 W/D 比值。

1.3.3 BALF 中白细胞计数、TNF- α 和 IL-1 β 测定: 将每组 8 只动物的 BALF 离心 10 min, 取上清液贮存于 -80 $^{\circ}$ C 备用; 将沉淀溶于 1 ml 生理盐水中, 以血细胞计数板在显微镜下计数白细胞数量。采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 BALF 中 TNF- α 和 IL-1 β , 试剂由美国 R&D 公司提供。

1.3.4 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性测定: 各取每组 8 只动物的肺组织制备标本, 参照文献^[4]方法测定肺组织中 MPO 活性。

1.3.5 肺组织病理检查: 取各组 4 只动物 24 h 肺组织, 以体积分数为 4% 的多聚甲醛水溶液固定, 石蜡包埋, 行苏木素-伊红(HE)染色。每个肺组织切 3 片, 片厚 5 μ m。光镜下观察小鼠肺部炎症改变。根据肺泡扩张、出血、气道内血管壁白细胞浸润或中性粒细胞聚集和肺泡壁厚度进行病理分级, 分别计为 0~4 分; 0 分为正常肺组织; 1 分为 <25% 肺组织受累; 2 分为 25%~50% 肺组织受累; 3 分为 50%~75% 肺组织受累; 4 分为 >75% 肺组织受累。

1.4 统计学处理: 用 SPSS 11.5 统计软件包进行数据处理, 结果以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用方差分析和 t 检验, 存活率采用 Kaplan-Meier 分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rIL-10/Fc 融合蛋白对 LPS 诱导 ALI 小鼠 24 h 存活率的影响(图 2): 正常对照组和 rIL-10/Fc 对照组小鼠全部存活(存活率 100%); ALI 模型组存活 14 只(存活率 56%); rIL-10/Fc 治疗组存活 23 只(存活率 92%)。经统计学分析显示, rIL-10/Fc 融合蛋白能显著改善注射 LPS 后 24 h 小鼠的存活率($P < 0.01$)。

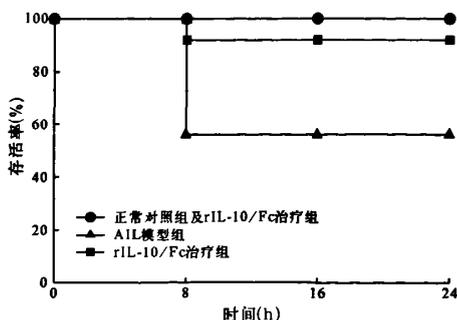
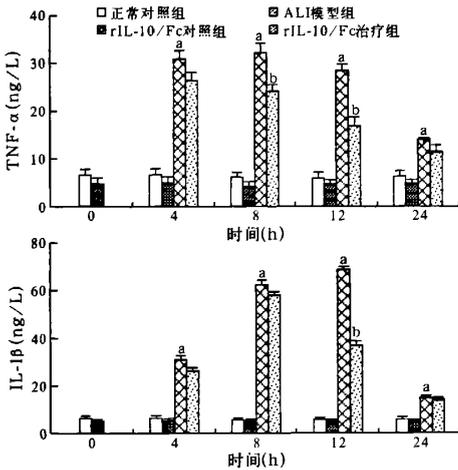


图 2 rIL-10/Fc 融合蛋白对 LPS 诱导 ALI 小鼠存活率的影响

2.2 rIL-10/Fc 融合蛋白对 BALF 中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的作用(图 3):注射 LPS 后 4 h BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 即显著升高, TNF- α 于 8 h 达峰值, IL-1 β 于 12 h 达峰值, 24 h 明显降低, 但仍显著高于正常对照组(P 均 <0.01); rIL-10/Fc 融合蛋白可显著抑制 LPS 引起的 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 升高, 8 h 和 12 h 时 TNF- α 差异显著, 12 h 时 IL-1 β 差异显著(P 均 <0.01)。



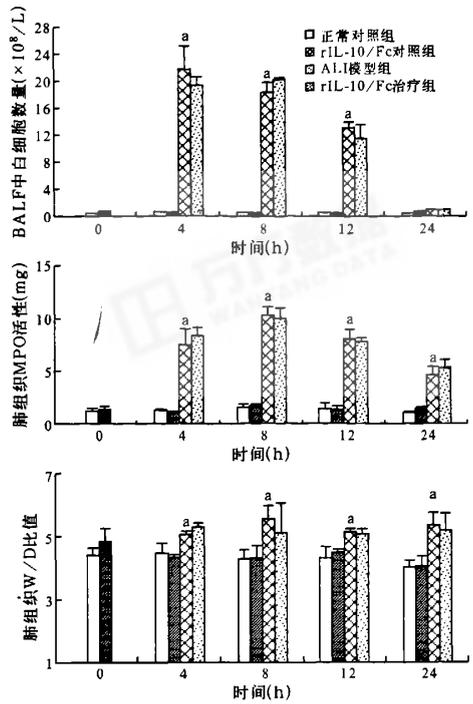
注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与 ALI 模型组比较,^b $P<0.01$
图 3 rIL-10/Fc 融合蛋白对 LPS 诱导 ALI 小鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 的作用

2.3 rIL-10/Fc 对 BALF 中白细胞数量及肺组织 MPO、W/D 比值的作用(图 4):与正常对照组比较, 注射 LPS 后 4 h BALF 中白细胞数量、肺组织 MPO 活性、W/D 比值即显著升高(P 均 <0.01)。BALF 中白细胞数量升高持续至 12 h, 于 24 h 显著下降, 与正常对照组比较差异无统计学意义; 肺组织 MPO 活性及 W/D 比值升高均持续至注射 LPS 24 h。与 ALI 模型组比较, rIL-10/Fc 组各时间点 BALF 中白细胞数量及肺组织 MPO、W/D 比值差异均无统计学意义。

2.4 肺组织病理改变(彩色插图 5):向气管内滴注 LPS 后 24 h, 动物肺组织出现明显炎性改变, 中性粒细胞聚集, 肺泡扩张、出血改变等, 但 ALI 模型组与 rIL-10/Fc 治疗组间无显著差异。

3 讨论

在 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发生中, 参与炎症的细胞有多形核白细胞(PMN)、肺泡上皮细胞、肺血管内皮细胞、肺泡、肺间质和肺血管巨噬细胞等, 其中 PMN 和肺内巨噬细胞在损伤中起关



注:与正常对照组比较,* $P<0.01$
图 4 rIL-10/Fc 融合蛋白对 LPS 诱导 ALI 小鼠 BALF 中白细胞数量及肺组织 MPO、W/D 比值的作用

键作用。炎症介质有促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、血小板激活因子等; 其中 TNF- α 、IL-1 β 具有触发进一步炎症反应的作用; 抗炎细胞因子有 IL-4、IL-10 等。促炎细胞因子进一步激活 PMN 和内皮细胞等效应细胞, 释放氧自由基、蛋白酶, 加速花生四烯酸代谢, 释放血栓素、前列腺素等炎症介质, 引发和加重炎症反应。

本研究显示, 腹腔内注射 rIL-10/Fc 融合蛋白可明显改善实验动物的 24 h 存活率。Inoue^[5]在对内毒素诱导的 ALI 大鼠进行研究时发现, 静脉内注射 IL-10 可使大鼠 48 h 的死亡率由 100% 下降至 30%, 肺组织的中性粒细胞活性降低, 病理损害减轻, 血浆和 BALF 中 TNF- α 明显降低。研究发现, rIL-10/Fc 融合蛋白可抑制促炎细胞因子 TNF- α 、Th1 细胞因子 IL-2 和 γ -干扰素 (IFN- γ) 的表达和产生, 促进 Th2 细胞因子 IL-4 和 IL-10 表达, 降低脓毒性休克小鼠的死亡率^[6-7]。Sawa 等^[8]报道, 腹腔内注射 IL-10 可显著降低气管内注射铜绿假单胞菌引起的肺毛细血管通透性指数和肺组织 W/D 比值, 减轻肺损伤, 改善实验动物的存活率。

ALI 的重要特点是促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 等

的过度表达,它激活、趋化中性粒细胞和黏附分子、并生成超氧化物,损伤血管内皮细胞,引起血管通透性增强,释放多种生物活性物质,进一步放大炎症反应,加重破坏肺组织。有研究显示,急性胰腺炎患者出现持续内毒素血症、内毒素增敏系统水平增加, TNF- α 生成异常升高,而抑制 TNF- α 的生成可以减轻急性胰腺炎患者伴发的肺组织损伤^[9]。也有报道, IL-10 可抑制促炎因子的基因表达^[10]。一项来自健康志愿者的临床研究显示, rIL-10 可减轻内毒素引起的发热,降低 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 水平,抑制肺内中性粒细胞聚集和脱颗粒^[11]。最近的临床研究报告, IL-10-1082 基因型是发生 ARDS 的危险因子^[12],并证明了抗炎介质 IL-10 在 ALI 进展过程中的重要作用。rIL-10/Fc 融合蛋白干预的 ALI 小鼠 BALF 中促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低。因此,我们推断 rIL-10/Fc 融合蛋白通过抑制炎症介质的产生,抑制了 LPS 诱导的 ALI 发生发展,可能是其降低实验小鼠死亡率的原因之一。

与以往结果不同,本实验中并没有发现 rIL-10/Fc 融合蛋白能显著改变 ALI 小鼠 BALF 中白细胞数量、肺组织 MPO 活性(中性粒细胞聚集),以及肺组织 W/D 比值,病理结果也没有提示肺部炎症的明显差异,这可能与实验中采用的给药方式有关,同时提示抗炎介质对 ALI 实验动物预后的改善作用存在其他相关机制。肺在引发 MODS 和多器官功能衰竭中具有重要作用^[13-15];动物实验显示 ALI 发生时出现小肠上皮细胞凋亡^[16]。但是否 rIL-10/Fc 融合蛋白对 ALI 模型动物其他器官功能有影响以及其改善生存率更详细的机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Sfeir T, Saha DC, Astiz M, et al. Role of interleukin-10 in monocyte hyporesponsiveness associated with septic shock [J]. Crit Care Med, 2001, 29(1):129-133.
 [2] Zheng XX, Steele AW, Nickerson PW, et al. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation [J]. J Immunol, 1995, 154(10):5590-5600.
 [3] 毕铭华, 王宝恩, Martina Schafer, 等. 脂肪乳对内毒素诱导急

性肺损伤小鼠的干预作用[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(12):711-715.
 [4] Gray KD, Simovic MO, Chapman WC, et al. Endotoxin potentiates lung injury in cerulein-induced pancreatitis [J]. Am J Surg, 2003, 186(5):526-530.
 [5] Inoue G. Effect of interleukin-10 on experimental LPS-induced acute lung injury [J]. J Infect Chemother, 2000, 6(1):51-60.
 [6] Zheng XX, Steele AW, Hancock WW, et al. A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice [J]. J Immunol, 1997, 158(9):4507-4513.
 [7] Feng X, Zheng XX, Yi S, et al. IL-10/Fc inhibits macrophage function and prolongs pancreatic islet xenograft survival [J]. Transplantation, 1999, 68(11):1775-1783.
 [8] Sawa T, Corry DB, Gropper MA, et al. IL-10 improves lung injury and survival in Pseudomonas aeruginosa pneumonia [J]. J Immunol, 1997, 159(6):2858-2866.
 [9] Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: a complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug [J]. Crit Care Med, 2002, 30(Suppl 1):S58-S63.
 [10] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor [J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19:683-765.
 [11] Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MC, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration [J]. J Immunol, 1997, 158(8):3971-3977.
 [12] Schroeder O, Schulte KM, Schroeder J, et al. The -1082 interleukin-10 polymorphism is associated with acute respiratory failure after major trauma: a prospective cohort study [J]. Surgery, 2008, 143(2):233-242.
 [13] van Helden HP, Kuijpers WC, Steenvoorden D, et al. Intratracheal aerosolization of endotoxin (LPS) in the rat: a comprehensive animal model to study adult (acute) respiratory distress syndrome [J]. Exp Lung Res, 1997, 23(4):297-316.
 [14] Spies M, Chappell VL, Dasu MR, et al. Role of TNF-alpha in gut mucosal changes after severe burn [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(3):G703-708.
 [15] 姚咏明, 盛志勇, 林洪远, 等. 脓毒症定义及诊断的新认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(6):321-324.
 [16] Husain KD, Stromberg PE, Javadi P, et al. Bcl-2 inhibits gut epithelial apoptosis induced by acute lung injury in mice but has no effect on survival [J]. Shock, 2003, 20(5):437-443.

(收稿日期:2008-04-10 修回日期:2008-07-14)

(本文编辑:李银平)

• 启事 •

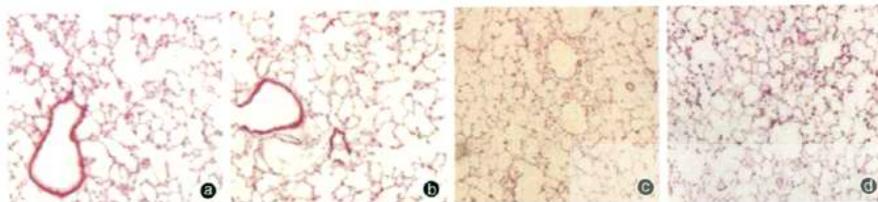
《机械通气技术临床应用与进展》和《危重病急救医学进展》学习班招生通知

上海交通大学医学院附属新华医院急救中心将分别于 2008 年 10 月 19—25 日举办《机械通气技术临床应用与进展》学习班(项目编号:2008-03-02-024(国)),于 2008 年 10 月 26—31 日举办《危重病急救医学进展》学习班(项目编号:2008-03-10-147(国)),以宋志芳教授主编的《现代呼吸机治疗学——机械通气与危重病》第 2 版和《实用危重病综合救治》第 1 版为教材,每个学习班授予国家级 I 类继续教育学分 10 分。举办地点在上海交通大学医学院附属新华医院,招生对象为从事急诊、急救、危重病、ICU、呼吸、麻醉等专业技术人员,招生名额为 30~50 名,收取费用:学费暨资料费 800 元,食宿费 600 元(其余费用一律不收)。联系人:赵洁(13916733661),于洋(13761879849),潘耀明(021-28022655),宋志芳(13611790423)。

(上海交通大学医学院附属新华医院)

重组白细胞介素-10/Fc融合蛋白对内毒素诱导急性肺损伤小鼠的实验干预作用

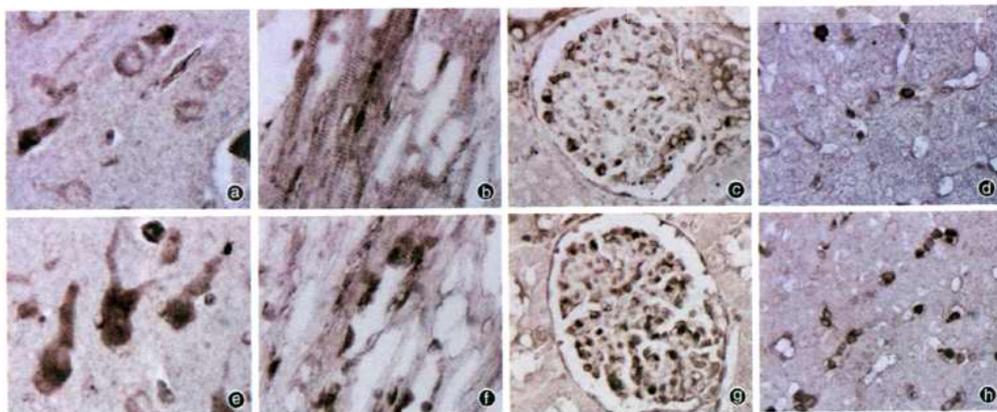
(正文见461页)



④:正常对照组, ③:rIL-10/Fc对照组, ②:ALI模型组, ①:rIL-10/Fc治疗组
图5 rIL-10/Fc融合蛋白对LPS诱导ALI小鼠24 h肺组织炎症改变的作用(HE, ×20)

心肺复苏的质量对复苏后炎症反应的影响

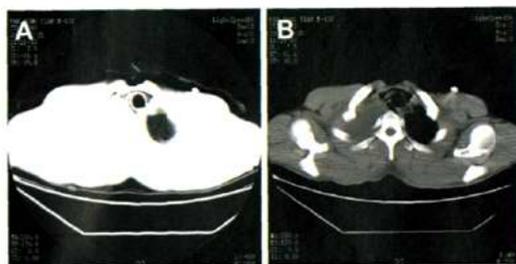
(正文见469页)



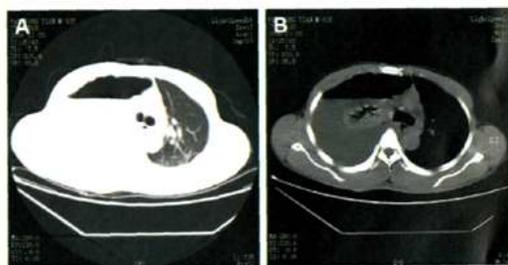
④~①依次为S-CPR组脑、心、肾、肝组织, ③~②依次为N-CPR组脑、心、肾、肝组织
图2 两组动物各脏器组织NF-κB的表达(免疫组化, ×400)

自发性食管破裂9例分析

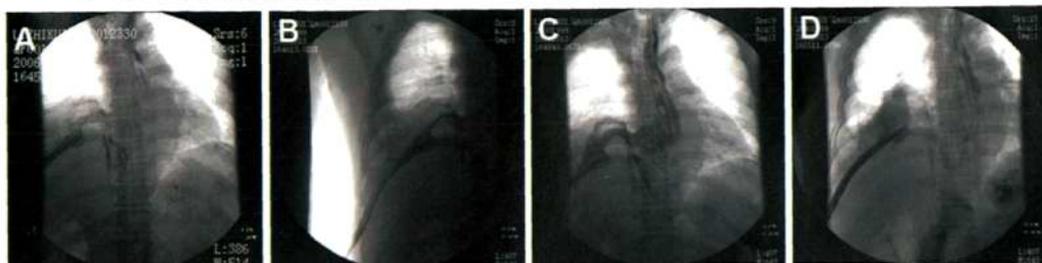
(正文见504页)



A: 肺窗, B: 纵隔窗
图1 1例食管自发破裂患者双侧颈根部皮下积气



A: 肺窗, B: 纵隔窗
图2 1例食管自发破裂患者右侧液气胸并右侧肺不张



A: 注射造影剂时, B: 造影剂流动过程, C: 造影剂从食管右侧快速进入胸腔并经引流管流出体外, D: 造影剂少量进入胃内
图3 1例食管碘油造影示食管胸膜瘘, 在食管相当于第7胸椎水平