

ICAM-1 及其受体在高致病性禽流感病毒性肺炎中的作用研究*

赵宏霞^{1,2}, 夏咸柱^{1**}, 鲁继荣², 岳玉环¹, 杨松涛¹, 朱平¹

(1. 军事医学科学院军事兽医研究所, 吉林长春 130062; 2. 吉林大学第一医院儿科, 吉林长春 130061)

Roles of ICAM-1 and it's Receptors in HPAIV Pneumonia

ZHAO Hong-xia^{1,2}, XIA Xian-zhu^{1**}, LU Ji-rong², YUE Yu-huan¹, YANG Song-tao¹, ZHU Ping¹
(1. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Science of PLA Changchun 130062, China; 2. The First Hospital, Jilin University, Changchun 130061, China)

Abstract : The intercellular adhesion molecular-1 (ICAM-1) and it's its receptors in the mice's lungs of HPAIV and control mice pneumonia were detected by using immunohistochemistry staining after infected mice with Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV). The expressive level of ICAM-1, and its receptors of CD11b and CD18 were first detected after 24 hours infection in bronchial alveolar epithelial cells, bronchopulmonary capillary endothelial cells, and infiltrating lymphocyte and monocytes, and reached were the peaks 4 days after infection. The highest expression of ICAM-1 and its receptors were detected when infected with 100LD50/50 μ L HPAIV. The change was confirmed by the method of ELISA. Our results indicate that ICAM-1 and its receptors have the high expression level in HPAIV pneumonia, and may play an important roles in the pathogenesis.

Key words : ICAM-1 ; CD81 ; CD11b ; Pneumonia ; HPAIV ; Mouse

摘要 : 本文应用高致病性禽流感病毒性肺炎 (Highly pathogenic avian influenza viral pneumonia, HPAIV) 小鼠模型, 采用免疫组织化学染色方法, 对实验组和对照组小鼠肺组织中 ICAM-1 及其受体的表达含量进行检测。研究发现: 实验组小鼠肺组织中 ICAM-1 及其受体表达含量在攻毒后 1d 即开始升高, 第 4 天达高峰。就攻毒剂量来说, 以 100LD50/50 μ L 攻毒组小鼠肺组织中 ICAM-1 及其受体阳性表达量升高最明显。并通过 ELISA 方法进一步证实了这种变化。结果表明: ICAM-1 及其受体在 HPAIV 中呈现高表达, 可能在其发病中发挥了重要作用。

关键词 : ICAM-1 ; 受体 ; 高致病性禽流感 ; 病毒性肺炎 ; 小鼠

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0038-05

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种家禽和野禽的高度接触性传染病。依据其 HA 抗原性差异可分为 15 个亚型, 目前发现的高致病性禽流感都是由 H5 和 H7 亚型引起。香港 1997 年爆发 H5N1 亚型禽流感, 并首次报告有人类感染。2003 年底至今, 亚洲有 10 多个国家相继爆发 H5N1 亚型高致病性禽流感, 不仅引起禽类的大批死亡, 更严重的是造成数十人的感染以至死亡, 据世界卫生组织调查统计: 截至 2005 年 2 月 7 日, 人类感染 H5N1

亚型禽流感人数为 58 人, 死亡 45 人, 死亡率高达 78%。禽流感已对人类构成极大的威胁, 预防和控制禽流感是当务之急。感染 H5N1 亚型禽流感病鸡肺组织病理呈现卡他性肺炎和间质性肺炎变化。高致病性禽流感感染人类, 多数死亡病人的直接死因是急性重症病毒性肺炎。炎性细胞的粘附是肺损伤发生的重要环节, 在炎症细胞的游走、聚集, 免疫细胞的激活过程中, 粘附分子的表达起着关键作用。细胞粘附分子 (CAMs) 是一类介导细胞与细

收稿日期: 2005-06-27, 修回日期: 2005-08-24

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471295); 军队医药卫生科研基金资助 (04Z016); 军事医学科学院科技创新基金资助。

作者简介: 赵宏霞 (1971-) 女, 吉林长春籍, 博士研究生, 主要从事小儿呼吸系统疾病研究。

** 通讯作者: 夏咸柱 (1939-) 男, 江苏建湖籍, 中国工程院院士。

Corresponding author. Tel: 0431-6986748; Email: xia_xianzhu@yahoo.com.cn

胞外基质间相互结合起粘附作用的糖蛋白, 其对机体发育、维持组织结构、介导炎症反应等方面起着重要作用。以往对呼吸道合胞病毒和腺病毒肺炎的研究中发现, 炎性细胞黏附是其肺部感染的重要环节, 而 ICAM-1 与其受体结合是炎性细胞黏附、聚集的关键^[2]。我们先前的研究发现 ICAM-1 及其受体 CD11b、CD18 在高致病性禽流感病毒(Highly pathogenic avian influenza virus, HPAIV)感染小鼠外周血中呈高表达, 提示 ICAM-1 及其受体与 HPAIV 引起的炎症密切相关。本研究应用免疫组织化学染色方法对 HPAIVP 模型小鼠肺组织中 ICAM-1 及其受体的表达含量进行检测, 进一步探讨 ICAM-1 及其受体在 HPAIVP 发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用高致病性禽流感病毒为军事医学科学院军事兽医研究所保存的 A/Tiger/Harbin/01/2001 (H₅N₁), 经 SPF 鸡胚增殖后收集病毒尿囊液, LD₅₀=10^{-7.25}。于-80℃ 储存备用, 所有实验均在生物安全 级实验室中进行。

实验动物均选用普通级健康昆明小鼠, 体重为 18~20 g, 购于长春市生物制品所。

1.2 攻毒实验

1.2.1 不同病毒浓度攻毒实验: 65 只小鼠, 随机分为实验组和对照组, 实验组再按攻毒浓度不同分为 1~12 组, 每组 5 只, 每只分别接种 50 μL 不同稀释度的 H₅N₁ 病毒。即将接种虎源 H₅N₁ 流感病毒 (TIV) 的鸡胚尿囊液以 2% DMEM 10 倍倍比稀释至 10⁻¹²。小鼠经乙醚麻醉后每个稀释度滴鼻 50 μL/只接种。对照组小鼠同时以 50 μL 2% DMEM 滴鼻。攻毒后密切观察各组小鼠临床症状, 均于濒死前眼球放血处死, 解剖小鼠无菌取肺, 并于右下肺矢状面最大周径处横贯取肺, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 留做免疫组织化学染色。

1.2.2 相同病毒浓度攻毒实验: 60 只小鼠, 随机分为实验组和对照组。每组 30 只。实验组小鼠经乙醚麻醉后, 每只通过滴鼻途径滴入以 2% DMEM 培养液稀释的 10⁻⁵/50 μL 病毒尿囊液, 为 100~150 LD₅₀/50 μL。对照组同时以 50 μL 2% DMEM 滴鼻。攻毒后分别于不同时间各取 5 只攻毒小鼠和对照小鼠, 眼球放血处死后解剖小鼠, 称重计算肺指数(肺重/体重), 无菌取肺, 并于右下肺矢状面最大周径处横贯取肺, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 留做免疫组织化学染色。并取左肺研磨取肺上

清液, 应用 ELASA 方法检测肺组织中 ICAM-1 及其受体 CD11b/CD18 的表达含量。

1.3 免疫组织化学分析

ICAM-1 及其受体 CD11b/CD18 的检测。采用链霉菌抗生物素蛋白—过氧化酶法 (武汉博士德公司 SP 即用型试剂盒) 在石蜡切片上测 ICAM-1 及其受体 CD11b/CD18 的免疫组化表达。一抗为 1:100 ICAM-1/CD11b/CD18 抗小鼠单克隆抗体, 二抗为生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 阴性对照标本除以 PBS 代替一抗外, 其它步骤与被测标本相同, 阳性反应为胞浆中出现棕黄色颗粒。

1.4 图象分析

免疫组化结果采用多功能彩色病理图象分析系统处理。每份肺标本切片 5 张, 每张切片在高倍镜下 (×400 视野) 随机选择含支气管肺组织的视野 5 个, 测量支气管肺组织阳性呈色区域的平均积分光密度值, 取平均值间接作为所测指标的蛋白表达量。

1.5 双抗体夹心 ELASA

应用双抗体夹心技术测定小鼠肺组织上清中 ICAM-1 及其受体 CD11b/CD18 的表达含量。一抗为 1:100 ICAM-1/CD11b/CD18 抗小鼠单克隆抗体 (为 SouthernBiotech 公司产品), 二抗为辣根过氧化物酶标记的标记的山羊抗小鼠 IgG (北京鼎国生物技术有限公司产品)。每个时间点分别留取 5 份攻毒小鼠和对照小鼠肺上清检测相应抗原, 在酶标仪 450nm 处读取 OD 值, 取其平均值作为相对含量。

1.6 统计分析

使用 SPSS 10.0 统计软件进行数据的分析处理。采用 ANOVA 法进行组间差异性的比较, $P < 0.05$ 时差异显著。

2 结果

2.1 HPAIVP 模型病理组织学与超微结构观察

攻毒组小鼠支气管肺组织病理表现均符合高致病性禽流感病毒性肺炎特点。光镜下主要改变是肺组织肺泡间隔不同程度增宽, 肺内小血管及肺泡间隔的毛细血管扩张、淤血, 肺泡腔不同程度缩小, 可见中等量淋巴细胞和单核细胞浸润 (图 1) 电镜下肺泡腔内可见流感病毒样颗粒, 呈圆形、椭圆形, 直径 80~120 nm, 核衣壳表面有囊膜包裹, 囊膜表面有纤突 (图 2)。

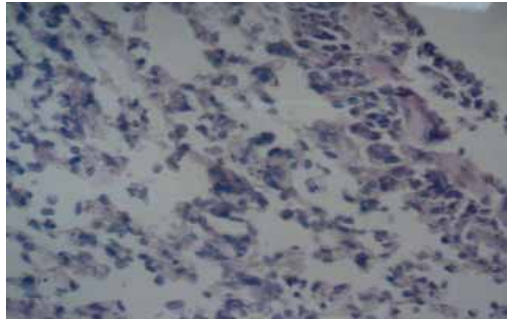


图1 HPAIV肺炎小鼠的肺组织炎细胞浸润

Fig.1 Inflaming cells infiltrating of HPAIV pneumonia mice

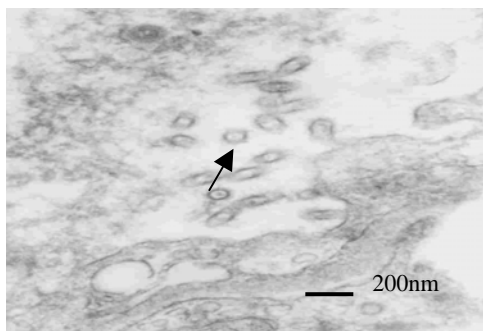


图 2 HPAIVP 鼠肺组织的流感病毒样颗粒

Fig.2 Influenza virus-like particle in lung of HPAIVP mice

2.2 HPAIVP 模型组小鼠肺指数变化趋势

从 HPAIVP 模型组小鼠肺指数变化趋势图 3 可以看出,肺指数从第 2 天即呈现升高趋势,到第 4、5 天升高明显,第 6 天达峰值。反应了 HPAIV 引起的肺部炎症渗出在攻毒后 4、5、6d 最明显,第 6 天后随着炎症渗出减少及逐渐吸收,肺指数也相应下降。

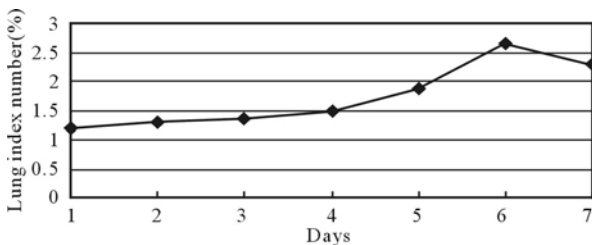


图 3 HPAIVP 模型组小鼠肺指数变化趋势

Fig.3 Lung index number change of model mice in experiment 2

2.3 支气管肺组织 ICAM-1 及其受体免疫组化分析

2.3.1 不同攻毒量实验组

光镜下可见在肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞的游离面、血管内皮细胞、浸润的单核细胞胞浆内

可见 ICAM-1、CD18 和 CD11b 阳性染色或较强阳性染色。肺泡上皮细胞的阳性染色多为灶状。从 10^{-4} 组开始,染色强度较以前几组明显加重,染色强度有所增加,范围扩大,到 10^{-6} 以后下降。变化趋势见图 4。

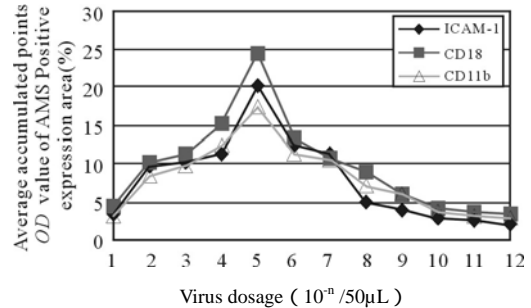


图4 ICAM-1及其受体表达量与攻毒量关系

Fig.4 Relation between virus dosage and the expression of ICAM-1 and it's receptors

2.3.2 相同病毒浓度攻毒组

1) 支气管肺组织 ICAM-1 变化:光镜下实验组小鼠支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM-1 表达阳性,浸润的单核细胞胞浆内可见阳性染色或较强阳性染色。肺泡上皮细胞的阳性染色多呈灶状。(图 5A),第 4 天阳性表达量最多,第 6 天开始下降。对照组少数肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞的游离面、血管内皮细胞、单核细胞胞浆内可见微弱的阳性染色。(图 5B)。

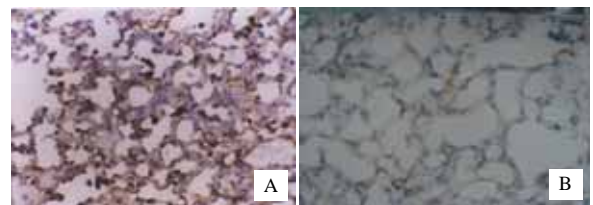


图 5 小鼠攻毒后第 4 天支气管肺组织表达 ICAM-1 水平

Fig.5 Expression level of ICAM-1 in the fourth day after infection

Bronch-lung tissue (A) was high in experiment mice, that of control mice (B) was low.

2) 支气管肺组织 CD11b 变化:光镜下模型组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、支气管肺组织微小血管内皮细胞 CD11b 表达阳性,浸润的单核细胞胞浆内可见阳性染色或较强阳性染色。肺泡上皮细胞的阳性染色多呈灶状。(图 6A),第 4 天阳性表达量最多,第 6 天开始下降。对照组有少量微弱阳性表达(图 6B)。

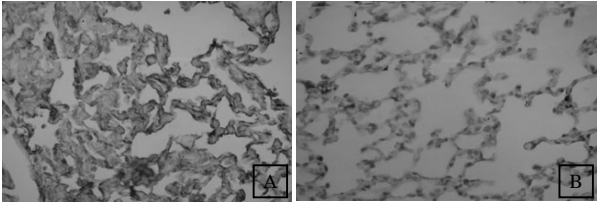


图6 小鼠攻毒后第4天支气管肺组织表达 CD11b 水平
Fig.6 Expression level of CD11b in (the fourth day after infection)

Bronch-lung tissue(A) is high in experiment mice, that of control mice(B) is low.

3) 支气管肺组织 CD18 变化: 光镜下模型组支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、支气管肺组织微血管内皮细胞 CD18 表达阳性, 浸润的单核细胞胞浆内可见阳性染色或较强阳性染色, 肺泡上皮细胞的阳性染色多呈灶状(图 7A)。第 4 天阳性表达量最多, 第 6 天开始阳性表达量下降。对照组有少量微弱阳性表达(图 7B)。

2.3.3 ICAM-1 及其受体变化

感染 HPAIV 后第 1 天小鼠支气管肺组织 ICAM-1

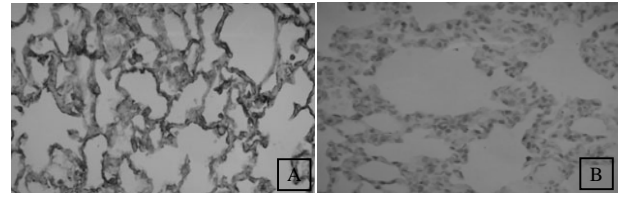


图7 小鼠攻毒后第4天支气管肺组织表达 CD18 水平实验组小鼠支气管肺组织 CD18 高水平表达, 对照组呈低水平表达

Fig.7 Expression level Of CD18 in (the fourth day after infection)

Bronch-lung tissue(A) is high in experiment mice, that of control mice(B) is low.

及其受体表达量即开始增多, 到第 4 d 达到高峰, 之后逐渐下降。感染后 1~6 d, 模型小鼠支气管肺组织 ICAM-1 及其受体表达量均明显升高, 与对照组比较差异非常显著, $P < 0.01$, 见表 1。

感染 HPAIV 后第 1 天小鼠支气管肺组织 ICAM-1 及其受体表达量 OD_{450} 值即开始升高, 到第 4 天达到高峰, 之后逐渐下降。与免疫组化结果一致。 OD_{450} 值变化趋势见下图 8。

表 1 肺组织 ICAM-1 及其受体阳性呈色区域平均积分光密度值 (%)

Table 1 Average accumulated points OD value of ICAM-1 and it's receptors positive expression area in lung ($\bar{X} \pm SD$)

CAMs	Groups	Days					
		1	2	3	4	5	6
ICAM-1	experiment	5.7 ± 0.1	8.2 ± 1.5	16.5 ± 2.4	32.4 ± 2.6	26.3 ± 2.1	11.3 ± 0.7
	control	3.3 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2
CD18	experiment	8.5 ± 0.2	11.3 ± 2.1	22.8 ± 2.3	36.6 ± 2.1	19.7 ± 2.3	8.9 ± 1.5
	control	4.4 ± 0.6	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.4	4.5 ± 0.3	4.3 ± 0.5	4.4 ± 0.5
CD11b	experiment	6.5 ± 0.6	8.9 ± 0.7	18.6 ± 1.3	$23.4 \pm 1.2^*$	12.3 ± 1.2	11.9 ± 0.9
	control	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.5	3.2 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.4

In all the experiment groups, $P < 0.01$, compared with control group.

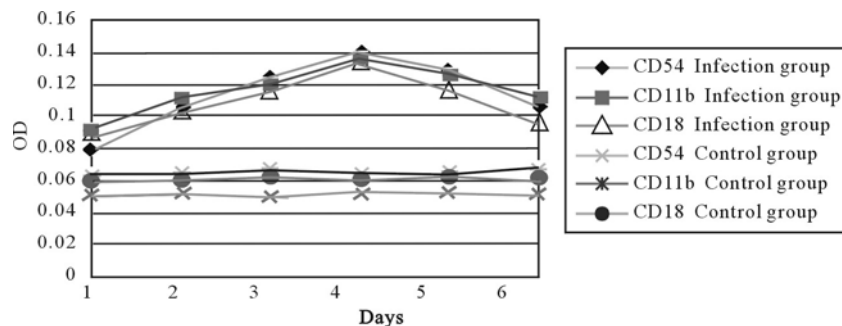


图8 肺组织上清液中 ICAM-1 及其受体表达含量 OD 值趋线图

Fig.8 OD value of ICAM-1 and its receptors expression in lung supernatant

3 讨论

ICAM-1 属 CAMs 的免疫球蛋白超家族, 主要表达于内皮细胞、上皮细胞及淋巴细胞等表面, 正常

情况下呈低水平表达; 但当受到炎症因子刺激时, 其表达数小时后迅速增加, 表达上调的 ICAM-1 与其白细胞表面受体的相互作用介导了炎症反应中白细胞跨内皮迁徙及向炎症部位的积聚过程^[3,4]。

CD11b/CD18 是 ICAM-1 的受体,在细胞间粘附和炎症反应中发挥生物学作用^[5],正常情况下仅在单核细胞和中性粒细胞膜上呈低水平表达。在败血症和败血症休克病人中性粒细胞 CD11b 表达量显著增加,在呼吸道合胞病毒诱发的毛细支气管炎患儿鼻咽分泌物中性粒细胞 CD11b 表达量也明显增加^[6]。CD11b/CD18 通过与 CD54 相互作用而介导白细胞与内皮细胞粘附,此为炎症的早期反应,血管损伤的关键步骤^[7]。

目前发现的高致病性禽流感都是由 H5 和 H7 亚型禽流感病毒引起。而多数感染 HPAIV 死亡病人的直接死因是急性重症病毒性肺炎。我们制作的 HPAIV 模型小鼠肺组织的主要病理改变是:肺泡间隔不同程度增宽,肺内小血管及肺泡间隔的毛细血管扩张、淤血,可见中等量淋巴细胞和单核细胞浸润,炎症细胞积聚是 HPAIV 发生的重要环节。本实验研究应用免疫组织化学染色方法和 ELISA 方法发现 HPAIV 组小鼠支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM-1 及其受体表达显著增强(与对照组相比 $P < 0.01$)。结合我们前面的研究结果:HPAIV 感染小鼠外周血白细胞表面 CD11b、CD18、CD54 的阳性细胞百分率(PPC)和/或平均荧光强度(MFI)与对照组比较普遍升高:表明 HPAIV 中炎症细胞的聚集与支气管肺组织 ICAM-1 及其受体表达上调有关。当 HPAIV 进入呼吸道后,数小时内即引起支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管肺组织微小血管内皮细胞 ICAM-1 及其受体表达显著增强,支气管肺组织微小血管内皮细胞上调的 ICAM-1 对于白细胞跨越血管内皮具有重要作用;而支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞的 ICAM-1 表达上调则有助于中性粒细胞与上皮细胞的粘附,进而引起中性粒细胞进入气道导致一系列炎症的病理变化。而在感染 HPAIV 后的第 4-5 天 ICAM-1 及其受体表达增强最明显,之后下降,与小鼠肺指数变化趋势相一致。HPAIV 病毒进入呼吸道后,随着病毒复制的增多,感染后第 4、5 天,肺部炎性渗出及炎性细胞浸润增多,肺部实变明显,故肺重增加,肺指数增大。故我们认为我们的结果提示 ICAM-1 及其受体通过介导中性粒细胞等炎性细胞的跨内皮迁徙及向气道游走和聚集参与了 HPAIV 气道炎症过程,且其表达量与小鼠肺炎严重程度相关。

国外学者 Zimmerman 等^[8]研究发现,白细胞粘

附和游走过程是受 CD11b/CD18 和 ICAM-1 共同调节的。Kumasaka 等应用抗 ICAM-1 抗体及 ICAM-1 抗敏寡核苷酸治疗大肠杆菌内毒素所致急性肺损伤,可减少肺泡内白细胞浸润 58%~75%^[9]。本试验结果表明,ICAM-1 参与了 HPAIV 气道炎症过程,CAMs 阻滞疗法有望成为治疗 HPAIV 的重要选择。

References

- [1] Chan P K. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hongkong in 1997 [J]. *Clin Infect Dis*, 2002, 34:S58-64.
- [2] Wang S Z, Smith P K, Lovejoy M, *et al*. Shedding of L-selectin and PECAM-1 and upregulation of Mac-1 and ICAM-1 on neutrophils in RSV bronchiolitis [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(5Pt1):L983-L989.
- [3] Zhou Z, Liu Y, Miao A D, *et al*. Protocatechuic aldehyde suppresses TNF-alpha-induced ICAM and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 18, 513 (1-2): 1-8.
- [4] Hayashi T, Hasegawa K, Ichinohe N. ICAM-1 expression on endothelium and systemic cytokine production in cutaneous neutrophilic leukocytoclastic vasculitis in mice[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20(1): 45-47.
- [5] Troelstra A, de Graaf-Miltenburg L A, van Bommel T, *et al*. Lipopolysaccharide-coated erythrocytes activate human neutrophils via CD14 while subsequent binding through CD11b/Cd18[J]. *Immunol*, 1999, 162:4220.
- [6] Yang L, Froio R M, Sciuto T E, *et al*. Blood. 2005 Jul 15; Epub 2005 Apr 5. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha activated vascular endothelium under flow[J]. *Blood*, 2005, 15:584-592.
- [7] Kang B H, Manderschied B D, Huang Y C, *et al*. Contrasting response of lung parenchymal cells to instilled TNF alpha and IFN gamma: the inducibility of specific cell ICAM-1 in vivo[J]. *Am J Respir Cell Mol Bio*, 1996, 15:540-550.
- [8] Zimmerman B J, Holt J W, Paulson J C, *et al*. Molecular determinants of lipid mediator - induced leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules [J]. *Am J physiol*, 1994, 266 (3 pt 2): H847.
- [9] Kumasaka T, Quinlan W M, Doyle N A, *et al*. Role of the intercellular adhesion molecular O1 in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice[J]. *Clin Invest*, 1996, 97: 2362.