

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.001

肥胖对小鼠肺部炎症和肺功能的影响

叶泽慧, 黄 英, 肖晓秋, 刘 丹, 陈笑宜, 黄道超, 赵 丽

(重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨肥胖对小鼠肺部炎症及肺功能的影响。**方法:**建立肥胖小鼠模型, 雄性 ICR 小鼠母乳喂养 21 d 离乳, 随机分为高脂组与正常组, 分别给予高脂与标准饲料喂养 150 d。将高脂组中超过正常体质量的 10%~20% 定义为超重组, 超过正常体质量的 20% 定为肥胖组。进行基础肺功能测定, 肺组织 HE 染色、巨噬细胞特异性标记抗原 F4/80 免疫组化。**结果:**(1) 肺组织 HE 染色和免疫组化 F4/80 示肥胖组支气管周围、肺泡间隔炎性细胞浸润较正常组、超重组明显增多, 以巨噬细胞增多为主。(2) 肺功能测定显示肥胖组最大吸气流速、最大呼气流速、呼出 50% 潮气量时呼气流速相对于正常组和超重组无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论:**肥胖可促进肺部炎性细胞浸润, 但对通气功能影响较小。

【关键词】肥胖; 肺; 炎症; 肺功能**【中国图书分类法分类号】**R332; R589.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-05-27

Effects of obesity on pulmonary inflammation and function

YE Zehui, HUANG Ying, XIAO Xiaoqiu, LIU Dan, CHEN Xiaoyi, HUANG Daochao, ZHAO Li

(Respiratory Center, Key Laboratory of Child Development and Disorders Co-founded by Provincial Government and Ministry of Education, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To detect the effects of obesity on pulmonary inflammation and function in mice. **Methods:** Male ICR mice were fed with high fat diet for 150 d from the 21st d postnatal after weaning to establish obese mice model (high fat group) while those in control group were given standard chow diets. Mice in high fat group with weight 10%~20% heavier than the normal were classified into overweight group; mice in high fat group with weight 20% heavier than the normal were classified into obesity group. Basic lung function was recorded; pathological HE staining and immunohistochemistry labeling macrophages (F4/80) were performed to measure lung inflammation. **Results:** (1) Pathological HE staining and immunohistochemistry (F4/80) of pulmonary tissues showed that inflammatory cell infiltration in alveolar septum and around bronchus was increased in obesity group than in control group and overweight group (especially macrophages). (2) Pulmonary function (peak inspiratory flow; peak expiratory flow; 50% tidal volume expiratory flow) showed no significant difference between these groups. **Conclusions:** Obesity enhances lung inflammation, however, makes no difference in ventilation function.

【Key words】obesity; lung; inflammation; pulmonary function

肥胖已成为世界上一种重要的代谢疾病, 其发病率呈逐年上升趋势。肥胖不仅影响体形, 而且与心血管病、高血压、糖尿病、肿瘤及关节炎等疾病的发生、发展均有密切关系。除此之外, 肥胖患者中伴有呼吸异常的比例远远高于正常体质量者, 提示肥胖与呼吸功能可能存在一定联系。肥胖对呼吸功能的影响可能涉及呼吸系统多个环节, 具体表现在肺容量、通气功能和弥散功能等方面, 这些环节的变

化主要是通过脂肪组织在气道、膈肌、胸壁堆积的增加引起的。国内外已有研究表明去除机械性因素的影响, 肥胖仍能加重呼吸系统疾病的发生^[1-2]。

近年来, 肥胖与慢性系统性炎症的关系也日益受到学者们的重视^[3], 而此类慢性炎症在肺组织的表现如何? 肥胖对肺功能又有何种影响? 这正是本研究的目的。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

雄性 ICR 小鼠 (北京, 维通利华) 27 只, 出生体质量为 (1.74 ± 0.03) g。母乳喂养 21 d 后, 随机分为正常组和高脂组

作者介绍: 叶泽慧, Email: yeyu19870313@126.com,

研究方向: 儿童哮喘研究。

通信作者: 黄 英, Email: huangying62@126.com。

基金项目: 国家“十一·五”科技支撑计划基金资助项目 (编号: 2007BA124B05)。

料组,标准组体重质量(11.33 ± 0.27) g,高脂组体重质量(11.74 ± 0.42) g,两组比较无统计学差异($P > 0.05$)。高脂组(18只)给予高脂饲料喂养 150 d,超过正常体质量的 10%~20%定义为超重组(10只),超过正常体质量的 20%定为肥胖组(8只)^[2];正常组(9只)给予标准饲料喂养 150 d。饲料由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。高脂饲料成分:蛋白质 24%,碳水化合物 41%,脂肪 24%;标准饲料成分:蛋白质 19.2%,碳水化合物 67.3%,脂肪 4.3%。

1.2 基础肺功能测定

采用 Emka 动物肺功能仪检测小鼠基础肺功能。将清醒、自由活动状态下的小鼠置于全身体积描计箱内,待小鼠稳定后,连续监测 5 min 肺功能各项指标的变化[最大呼气流速(peak expiratory flow, PEF);最大吸气流速(peak inspiratory flow, PIF),呼出 50%潮气量时呼气流速(50% tidal volume expiratory flow, EF50)]数据分析由 emka TECHNOLOGIES iox 软件完成。

1.3 动物的处置

小鼠仰卧,分离颈部组织,暴露气管,结扎左侧支气管,留置针行气管插管,PBS(0.01 mol/L)0.5 ml 缓慢注入,保留片刻后回收,灌洗 3 次,混合置于 EP 管中。 4°C ,1 500 r/min,10 min 离心,沉渣用于细胞总数计数,重悬后吸取悬浮液涂片,瑞氏染色后计数 200 个细胞中各种炎症细胞比例。分离左上叶肺组织,4%多聚甲醛溶液固定 1 周,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后石蜡包埋、切片,片厚 $5 \mu\text{m}$,置 56°C 烘箱中烤 12 h。

1.4 肺组织病理切片 HE 染色

石蜡切片行 HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察组织形态、支气管周围炎性细胞浸润情况。每张切片在显微镜下放大 200 倍,随机选取横断面较圆、直径 100~200 μm 完整支气管横截面进行观察。

1.5 肺组织免疫组化(F4/80)

切片脱蜡至水,枸橼酸溶液微波修复,自动冷却,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$ 。 $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 溶液室温孵育 20 min,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$;10%封闭用山羊血清 37°C 孵育 30 min,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$ 。滴加一抗(抗 F4/80 抗体滴度 1:100), 4°C 孵育过夜。室温复温 45 min,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$;滴加生物素化二抗 37°C 孵育 30 min,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$;辣根酶标记链霉卵白素工作液(橙色液体)室温孵育 20 min,PBS 液漂洗 $3 \times 3 \text{ min}$ 。DAB 显色,苏木精复染后,中性树胶封片,显微镜下观察显色情况。阴性对照采用 PBS 液取代一抗,其余步骤同上。

1.6 统计学分析

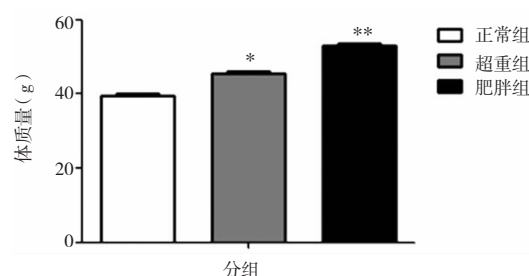
所得数值用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组之间的比较采用方差分析,其两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量评价

高脂饲料喂养 150 d 后,体质量明显增加,根据体质量

的差异分为超重组、肥胖组,体质量分别为(45.57 ± 0.42) g、(52.93 ± 0.67) g;正常组体质量为(39.54 ± 0.60) g。超重组体质量高于正常体质量的 10%~20%,肥胖组体质量高于正常组体质量 20%以上,见图 1。



*,超重组与正常组比较, $P < 0.05$;**,肥胖组与超重组比较, $P < 0.05$

图 1 小鼠体质量

Fig.1 Weight of mice

总体方差分析,体质量具有统计学差异($F = 136.51$, $P = 0.000$)。两两比较均具有统计学差异($P < 0.05$);超重组与正常组比较, $P = 0.000$;肥胖组与正常组比较, $P = 0.000$;肥胖组与超重组比较, $P = 0.000$ 。

2.2 基础肺功能比较

由图 2 可见,正常组、超重组、肥胖组 PIF 依次为: (11.33 ± 0.58) ml/s、(10.23 ± 0.22) ml/s、(10.16 ± 0.83) ml/s;各组 PEF 依次为 (9.41 ± 0.29) ml/s、(8.98 ± 0.67) ml/s、(8.41 ± 0.39) ml/s;各组 EF50 依次为 (7.76 ± 0.18) ml/s、(7.32 ± 0.15) ml/s、(7.23 ± 0.23) ml/s。3 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

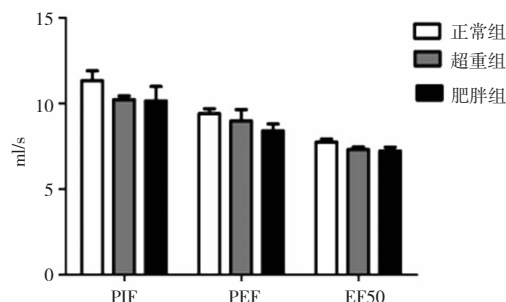


图 2 小鼠基础肺功能测定

Fig.2 Basic lung function of mice

2.3 肺组织基本病理形态

肺组织病理切片 HE 染色,见图 3。从图中可以看出,肥胖组肺泡间隔及支气管周围炎性细胞浸润较超重组、正常组明显增加。

2.4 免疫组化(F4/80)

肺组织巨噬细胞表面特异性抗原 F4/80 免疫组化,见图 4。由图可见,肥胖组肺泡间隔及支气管周围巨噬细胞阳性率较超重组、正常组明显增加。

2.5 肥胖组灌洗液细胞总数计数及分类细胞计数

肥胖组细胞总数较超重组、正常组明显增加,以巨噬细胞增多为主,见表 1。

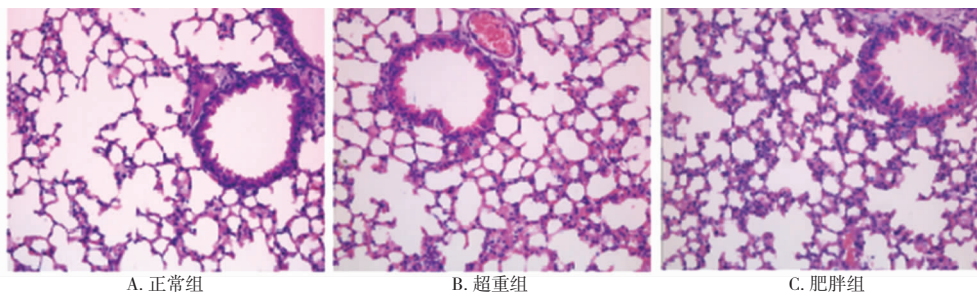


图 3 肺组织病理切片 (HE 染色,200 ×)

Fig.3 Pathological sections of pulmonary tissues (HE staining,200 ×)

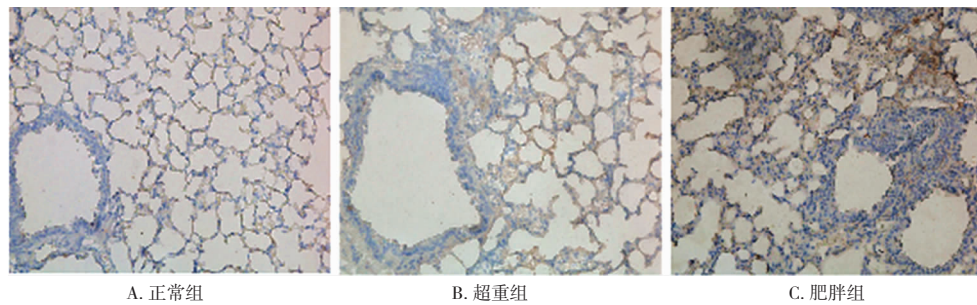


图 4 肺组织免疫组化 F4/80 (200 ×)

Fig.4 Immunohistochemistry F4/80 of pulmonary tissues (200 ×)

表 1 肺泡灌洗液中细胞总数与分类计数

	正常组 (n=9)	超重组 (n=10)	肥胖组 (n=8)	F 值	P 值
细胞总数 × 10 ⁵ 个/ml	3.16 ± 0.18	3.92 ± 0.13 ^a	7.80 ± 0.3 ^b	134.995	0.000
巨噬细胞/200 个	133.22 ± 2.68	148.20 ± 2.73 ^a	168.38 ± 3.28 ^b	35.169	0.000
淋巴细胞/200 个	66.44 ± 2.78	51.2 ± 2.81 ^a	31.00 ± 3.13 ^b	35.249	0.000
中性粒细胞/200 个	0.33 ± 0.24	0.60 ± 0.22	0.75 ± 0.25	0.773	0.473
嗜酸性粒细胞/200 个	0	0	0		

a: 与正常组比较, 差异有统计学意义 (两组比较, 细胞总数、巨噬细胞、淋巴细胞 *P* 值依次为 0.014、0.001、0.001) ; b: 与正常组、超重组比较, 差异有统计学意义 (肥胖组与正常组比较, 细胞总数、巨噬细胞、淋巴细胞两组比较 *P* 值依次为 0.000、0.000、0.000; 肥胖组与超重组比较, 细胞总数、巨噬细胞、淋巴细胞两组比较 *P* 值依次为 0.000、0.000、0.000)

3 讨 论

随着人们生活方式的改变和生活水平的提高, 肥胖的发生率逐渐升高, 全球有超过 16 亿的成年人超重 (BMI > 25 kg/m²), 其中 4 亿成年人达到肥胖标准 (BMI > 30 kg/m²)^[4]。根据世界卫生组织预测, 到 2015 年全球有 23 亿人超重, 中国 7 亿人口将达到肥胖标准^[5]。1997 年世界卫生组织已明确宣布肥胖为一种疾病。肥胖不仅与心血管疾病、代谢性疾病、高凝状态、肿瘤相关, 还与许多呼吸系统疾病相关, 包括阻塞性睡眠呼吸暂停综合征、慢性阻塞性肺病和哮喘等。目前国内外关于单纯性肥胖对肺功能研究较少且差异很大, 对肺部炎症更是鲜有涉及。

通过饮食诱导肥胖可导致肺泡扩大与肺容量相关肺泡表面区域等改变; Gotz 等^[6]研究表明高脂饮食能增加肺泡灌洗液淋巴细胞、中性粒细胞含量, 并且发现肥胖持续时间与肺部炎症有一定相关性。本实验从组织病理学方面研究肥胖对肺部炎症的影响, 结果表明高脂饮食诱导的肥胖能够促进小鼠肺部炎症细胞的浸润、增加肺泡灌洗液细胞总数含量, 超重组小鼠肺部炎性细胞也有所增加, 但明显少于肥胖组。由此表明, 体质量与肺部炎症的浸润密切相关, 随着体质量的增加, 肺部炎症也呈逐渐增加趋势。

肥胖主要的病理生理改变是脂肪细胞数目增多、细胞体积增大以及脂肪组织内大量巨噬细胞浸润, 在肥胖小鼠肺组织中是否也存在与脂肪组织相

同的变化,目前尚不十分明确。Lumeng 等^[7]发现高脂饮食诱导肥胖所导致的慢性炎症反应以巨噬细胞聚集为主;Odegaard 等^[8]研究表明缺乏炎症蛋白的小鼠主要靠巨噬细胞促进全身炎症及肥胖。巨噬细胞广泛分布于肺泡及支气管表面,在支气管肺泡灌洗液中占 90%以上^[9]。F4/80 抗原是巨噬细胞特异性表面抗原,应用 F4/80 抗体为标记肺组织周围巨噬细胞提供了理想手段,通过本实验进一步证实炎症细胞浸润以巨噬细胞为主。巨噬细胞可能通过其产生的细胞因子参与肺部炎症的形成过程。

在炎症情况下呼吸道管腔更易狭窄、阻力更大、流速更受限,这种由肥胖导致的肺部炎症是否与肺通气功能存在相关性? 本实验进行肺功能测定(包括 PIF、PEF、EF50)研究两者之间的关系。PIF 是指尽力呼气后,从肺内呼出的最大气量,反映肺 1 次通气的最大能力,在一定程度上可作为肺通气功能的指标^[10]。通过本实验发现超重或肥胖能够降低呼气/吸气流速,但相对于正常组无明显统计学差异,考虑可能与肥胖程度和持续时间相关。临床研究同样证实仅有小部分严重肥胖患者合并呼吸功能的异常,而大部分患者呼吸功能可以长时间维持在正常水平。因此在一定的肥胖程度和时间内,机体呼吸系统通过代偿机制维持平衡,轻、中度肥胖一般不伴有呼吸功能的异常^[11-12]。

肥胖可促进肺部炎症细胞(以巨噬细胞为主)的聚集,但因肥胖系一种慢性隐匿性疾病,在一定代偿范围内,并不引起肺功能的改变。随着肥胖时间的延长和负面作用的不断积累,脂肪组织在气道周围、膈肌、胸壁的过度堆积,超过机体呼吸系统的代偿能力,肥胖最终会引起肺功能的改变^[13]。

参 考 文 献

- [1] Johnston R A, Theman T A, Shore S A. Augmented responses to ozone in obese carboxypeptidase E-deficient mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 290(1): R126-133.
- [2] Gold D R, Damokosh A I, Dockery D W, et al. Body-mass index as a predictor of incident asthma in a prospective cohort of children[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2003, 36(6): 514-521.
- [3] Rosenson R S. Effect of fenofibrate on adiponectin and inflammatory biomarkers in metabolic syndrome patients[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2009, 17(3): 504-509.
- [4] 罗金梅, 肖毅. 肥胖和睡眠呼吸疾病[J]. *中国医学科学院报*, 2011, 33(3): 235-238.
- [5] Luo J M, Xiao Y. Obesity and sleep-related breathing disorders[J]. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2011, 33(3): 235-238.
- [6] McClean K M, Kee F, Young I S, et al. Obesity and the lung: 1. epidemiology[J]. *Thorax*, 2008, 63(7): 649-654.
- [7] Gotz A A, Rozman J, Rodel H G, et al. Comparison of particle-exposure triggered pulmonary and systemic inflammation in mice fed with there different diets[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 30.
- [8] Lumeng C N, Deyoung S M, Saltiel A R. Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(1): e166-174.
- [9] Odegaard J I, Ricardo-Gonzalez R R, Goforth M H, et al. Macrophage-specific PPAR gamma controls alternative activation and improves insulin resistance[J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1116-1120.
- [10] 陈平, 蔡珊, 朱应群, 等. 肺泡巨噬细胞在慢性阻塞性肺疾病气道炎症中的作用[J]. *中华内科杂志*, 2001, 40(4): 232-235.
- [11] Chen P, Cai S, Zhu Y Q, et al. Alveolar macrophage and airway inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chin J Intern Med*, 2001, 40(4): 232-235.
- [12] 黄锐, 孙莹, 叶青, 等. 肥胖、超重青少年通气功能与体成分关系[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(2): 152-154.
- [13] Huang K, Sun Y, Ye Q, et al. Relationship between ventilatory function and body composition in overweight and obese adolescents[J]. *Chin J Public Health*, 2006, 22(2): 152-154.
- [14] 余明业, 郑永克. 单纯肥胖肺功能改变的研究[J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(5): 547-548.
- [15] Yu M Y, Zheng Y K. The change of lung function in obese[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2006, 22(5): 547-548.
- [16] 刘茜, 吴亚梅, 徐玲. 肥胖、瘦素和呼吸功能[J]. *国外医学呼吸系统分册*, 2005, 25(10): 750-752.
- [17] Liu Q, Wu Y M, Xu L. Obesity, leptin and respiratory function[J]. *Sect Respir Sys Foreign Med Sci*, 2005, 25(10): 750-752.
- [18] Pianosi P T, Davis H S. Determinants of physical fitness in children with asthma[J]. *Pediatrics*, 2004, 113(3 Pt 1): e225-229.

(责任编辑: 冉明会)