

卡介苗对哮喘小鼠肺组织中 PPAR- γ 表达的影响及意义

曾晓媛¹ 黄信刚^{1△} 陈红梅¹ 陈 健²

(1 中南大学湘雅二医院呼吸科 湖南 长沙 410011; 2 长沙市中心医院胸 7 科 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:探讨卡介苗对哮喘小鼠肺组织中 PPAR- γ 表达的影响及其意义。**方法:**30 只健康雄性昆明种小鼠随机化原则分成正常对照组(A 组)、哮喘模型组(B 组)和卡介苗干预组(C 组),每组 10 只。卵蛋白致敏法复制哮喘模型,B 组小鼠于实验的第 1、8、15 天分别给予卵蛋白与氢氧化铝混合腹腔注射。第 22 天开始给予卵蛋白溶液以压缩雾化器为动力雾化吸入激发哮喘,每日一次,每次 30min。连续激发 7 天;C 组小鼠每周一次皮内注射 0.025mg BCG,连续 3 次,距首次皮内注射 4 周后按 B 组方法致敏和激发;A 组予以等量生理盐水代替致敏液及雾化液进行腹腔注射与雾化吸入。检测细支气管炎细胞浸润及肺组织病理,RT-PCR 和 western blotting 方法检测肺组织 PPAR- γ 的表达情况。**结果:**哮喘组出现了明显气道炎症细胞浸润,上皮脱落、炎症细胞渗出、结构紊乱、PPAR- γ 表达下降。卡介苗干预组炎症细胞数下降,炎症反应减轻,PPAR- γ 表达明显增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。**结论:**卡介苗可通过上调表达 PPAR- γ ,减少炎症细胞的浸润,抑制炎症反应,从而可能防止气道重塑,该研究为卡介苗提供新的临床应用领域。

关键词:支气管哮喘;过氧化物酶体增殖物激活受体- γ ;卡介苗;肺组织

中图分类号:Q95-3, R562.25 **文献标识码:**A **章编号:**1673-6273(2011)03-409-04

Effect of Bacillus Calmette-Guerin on Expression of PPAR- γ in Lung Tissue of Asthmatic Mice and Its Significance

ZENG Xiao-yuan¹, HUANG Xin-gang^{1△}, CHEN Hong-mei¹, Chen Jian²

(1 Department of Respiratory, the Second Xianya Hospital of Central South University, Changsha Hunan 410011, China;

2 Seventh department of Chest in Changsha Central Hospital, Changsha Hunan 410011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of bacillus Calmette-Guerin (BCG) on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) in the lung tissue of asthmatic mice and its significance. **Methods:** Thirty adult male Kunming mice were randomly divided into three groups ($n=10$): the control group (group A), asthmatic group (group B), BCG group (group C). The asthmatic model was established by the ovalbumin challenge method. Mice in group B were given ovalbumin and aluminum hydroxide mixture by intraperitoneal injection at 1, 8, 15 day. Mice were inhaled ovalbumin solution driven by compressed Atomizer for asthma once a day (every 30min) from 22 day and continuously challenged for 7 days. Mice in group C were weekly given 0.025mg BCG by intradermal injection and continuously injected for 3 times. After 4 weeks, mice were sensitized and challenged by the method as group B. Mice in group A were given normal saline solution. The bronchiole inflammatory cell infiltration, remodeling index and lung tissue histopathological were observed. Expressions of PPAR- γ in lung tissue were assayed by RT-PCR and western blotting. **Results:** There were obviously bronchiole remodeling response and inflammatory cell infiltration in group B, which can be inhibited by BCG. RT-PCR and western blotting showed that the expression of PPAR- γ in lung tissue was down-regulated in group B compared to that of group A ($P<0.05$). While the expression of PPAR- γ in lung tissue was increased in group C after BCG treatment. **Conclusion:** BCG reduced infiltration of inflammatory cells and inhibited the inflammatory response to prevent airway remodeling by up-regulating the expression of PPAR- γ . The study provides a new clinical application for BCG.

Key words: bronchialasthma; peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; bacillus Calmette-Guerin (BCG); lung tissue

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-409-04

前言

支气管哮喘(简称哮喘)的患病率,死亡率逐年上升,全世界支气管哮喘患者约 1 亿人,成为严重威胁人类健康的主要慢

性疾病。但其发病机制尚不完全清楚,因此尚无很好的防治方法。近年来发现,过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 在炎症细胞、呼吸道上皮、支气管黏膜下层、呼吸道平滑肌均有表达,具有抑制炎症、诱导细胞分化、抑制增殖、诱导凋亡等作用^[1]。卡介苗(BCG)是结核杆菌条件培养 230 代后得到的减毒活疫苗,主要用于防治结核。它具有很强的非特异性免疫刺激作用,它在纠正 Th1/Th2 细胞因子平衡,诱导 Th2 型向 TH1 型细胞转化,减少炎症反应的发生中发挥着重要作用。本实验旨在探讨卡介苗

作者简介:曾晓媛,(1979-),女,硕士,医师,从事呼吸病研究,

Tel: 15873121590, E-mail: zeng_30@sohu.com

△通讯作者:黄信刚,主任医师,湖南省长沙市湘雅附属二医院呼

吸科, Tel: 13875858704, E-mail: hxg@21cn.com

(收稿日期:2010-10-07 接受日期:2010-10-30)

对哮喘小鼠肺组织中 PPAR- γ 表达的影响,从而为卡介苗提供新的临床应用。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

40 只健康雄性昆明种小鼠(由湖南中医药大学实验动物中心供),8 周龄,体重 20 ± 2 g。按编号抽签方法随机分为正常对照组(A 组),哮喘模型组(B 组),卡介苗干预组(C 组)。参照文献[2]方法并加以改良制备哮喘模型。B 组:小鼠正常饲养 4 周后于实验的第 1、8、15 天每只小鼠分别给予 0.1ml 10%卵蛋白(OVA)与 0.2ml 10%氢氧化铝混合腹腔注射。第 22 天开始将小鼠置于自制密闭透明雾化吸入箱内,给予 10ml 1%卵蛋白溶液以压缩雾化器为动力雾化吸入激发哮喘,每日一次,每次 30min。连续激发 7 天,观察并记录小鼠呼吸及全身情况。以出现呼吸增快、打喷嚏、口周发绀、腹肌痉挛、点头呼吸为激发成功。C 组:将分为 C 组的小鼠每周一次皮内注射 0.025mg BCG,连续 3 次,距首次皮内注射 4 周后按 B 组方法致敏及激发,建立哮喘模型方法处理。A 组:予以等量生理盐水代替致敏液及雾化液进行腹腔注射与雾化吸入,其余步骤同哮喘模型组。

1.2 支气管肺泡灌洗及细胞计数

各组小鼠最后一次雾化 24 小时后,称量体重,腹腔注射 10%的水合氯醛(0.6g/kg)麻醉,小鼠四肢松弛后固定于手术台上,分离出气管及左右主支气管,结扎右主支气管,5 号针插入气管,手术线结扎,钳子固定,然后用 PBS 液灌洗左支气管肺泡并收集支气管肺泡灌洗液(BALF),每次注入 0.6ml,反复冲洗 3 次后吸出,共 3 次。每次灌洗后立即回收,回收率 70%-80%。支气管肺泡灌洗液(BALF)置 1.5ml 离心管中,于 4℃,2000 转/分,离心 10 分钟,弃上清液,沉淀物重悬于 100 μ l 的 PBS 中,以血细胞计数板做细胞计数,得出每毫升 BALF 中的细胞总数。余下的细胞沉淀用于涂片,经瑞氏染色,在油镜下进行白细胞分类,至少计数 200 个白细胞作细胞分类计数,算出中性粒细胞、淋巴细胞及嗜酸性粒细胞数。

1.3 小鼠肺组织的病理分析

制备肺组织匀浆后,余右肺组织置于 4%的多聚甲醛固定液中固定 24 小时。然后酒精梯度脱水,石蜡包埋切片,厚度 4 μ m,以苏木素-伊红(HE)染色,参照文献^[3]评定支气管周围的炎症细胞浸润程度。0-4 级:0,没有炎症细胞浸润;+,0-25%细胞浸润;++,25%-50%细胞浸润;+++,50%-75%细胞浸润;++++,75%-100%细胞浸润。

1.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测肺组织 PPAR- γ mRNA 表达

右肺组织 0.1g,参照江刚等^[4]实验步骤检测 PPAR- γ mRNA 表达。(1) PPAR- γ 上游引物:5'-CTGCTCCACACTAT-GAAGAC-3';下游引物:5'-ACAGTTTCTCTTCTCAGCC-3'扩增产物片断长为 465bp;(2) 内参照 β -actin 上游引物:5'-GC-CAACCGTGAGAAGATGAC-3';下游引物:5'-CTGTGTTG-GCATAGAGGTC-3'(引物均由上海生工合成)扩增产物片断长为 358bp。

1.5 Western blot 检测肺组织 PPAR- γ 蛋白表达

取小鼠右肺组织 0.1g,剪碎,加入 RIPA 裂解液裂解,冰

上裂解 30min 后,于 4℃离心 10min,取上清液,BCA 试剂测定蛋白含量后,1 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液调蛋白浓度使各组一致(50 μ g/20 μ l),在 100℃加热 10min 使蛋白质变性。聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PDVF 膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白质分子质量标准位置。用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 小时,按 1:200 加入兔抗鼠 PPAR- γ 一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗三次,1:2000 加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温 1 小时,TBST 洗三次后,用 western blot 荧光检测试剂盒显示结果于 X 光片。Epson 1650 photo 扫描仪收集图像,用 Lab-work S 图像分析系统对 Western blot 结果进行吸光度扫描,以对照组的面积灰度值为 100%与实验组进行比较和半定量分析。

1.6 统计学处理

数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS13.0 统计软件进行分析。多组样本比较采用单因素方差分析,并行 LSD 两两比较,各指标间行直线相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠哮喘模型建立

在小鼠哮喘模型建立期间,卵蛋白雾化时模型组(B 组)和 BCG 治疗组(C 组)均有不同程度哮喘症状,B 组和 C 组先后各 2 只和 3 只小鼠出现抽搐,脱离雾化吸入后症状自行缓解,正常对照组(A 组)未见哮喘症状。末次诱喘后观察动物,发现 B 组小鼠有明显的喘息,呼吸急促(呼吸频率 > 200 次/分),C 组小鼠的喘息和呼吸急促症状较 B 组为轻(150 次/分 $<$ 呼吸频率 < 200 次/分),A 组无喘息和呼吸急促(呼吸频率 < 150 次/分)。

2.2 BCG 治疗后对哮喘小鼠 BALF 中白细胞总和分类细胞数的影响

模型组(B 组)与正常对照组(A 组)比较,BALF 中白细胞总数,分类细胞数(包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞)均明显升高($P < 0.01$);BCG 治疗组(C 组)与模型组(B 组)比较,明显降低 BALF 中白细胞总数,分类细胞数($P < 0.05$),结果详见表 1。

2.3 BCG 治疗后对哮喘小鼠支气管炎症细胞浸润及气道重塑的影响

病理学 HE 染色发现:正常对照组(A 组)细支气管及肺泡结构正常,支气管纤毛排列整齐,支气管黏膜上皮完整,未见炎症细胞浸润(如图 1A 所示);而哮喘组(B 组)气道壁粘膜、粘膜下、肺间质、小血管周围可见大量的炎症细胞(以中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主)浸润,粘膜明显充血水肿,气道粘膜层及粘膜下层明显增厚,杯状细胞大量增生,上皮细胞坏死和脱落,气道内有大量的粘液栓及脱落的粘膜上皮,支气管粘膜皱壁增多卷屈,管腔狭窄(如图 1B 所示)。BCG 治疗组(C 组)气道壁粘膜、粘膜下、小血管周围可见程度较轻的炎症细胞(以中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主)浸润,粘膜轻度充血水肿,气道粘膜层及粘膜下层轻度增厚,杯状细胞轻度增生,上皮细胞有少量坏死和脱落,气道内有少量的粘液栓及脱落的粘膜上皮,支气管粘膜皱壁增多卷屈情况较哮喘组(B 组)为轻(如图 1C 所示)。

表 1 各组哮喘小鼠肺泡灌洗液白细胞总数及分类细胞数情况($\bar{x} \pm s$) ($\times 10^6/L$)

Table 1 The total number of white blood cells and the number of categories cells in BALF of asthmatic mice in each group ($\bar{x} \pm s$) ($\times 10^6/L$)

组别 Groups	鼠数(n) mice (n)	白细胞总数 WBC	中性粒细胞数 neutrophils	嗜酸性粒细胞数 eosinophils	淋巴细胞数 lymphocytes
A	10	0.78 $\pm$ 0.135	0.061 $\pm$ 0.018	0	0.067 $\pm$ 0.016
B	10	1.65 $\pm$ 0.151*	0.217 $\pm$ 0.220*	0.15 $\pm$ 0.021*	0.164 $\pm$ 0.017*
C	10	1.26 $\pm$ 0.226**	0.15 $\pm$ 0.020**	0.098 $\pm$ 0.021**	0.147 $\pm$ 0.016**

注: * 与对照组(A 组)比较 $P<0.01$; ** 与哮喘组(B 组)比较 $P<0.05$

Note : compared with A, * $P<0.01$; compared with B, ** $P<0.05$

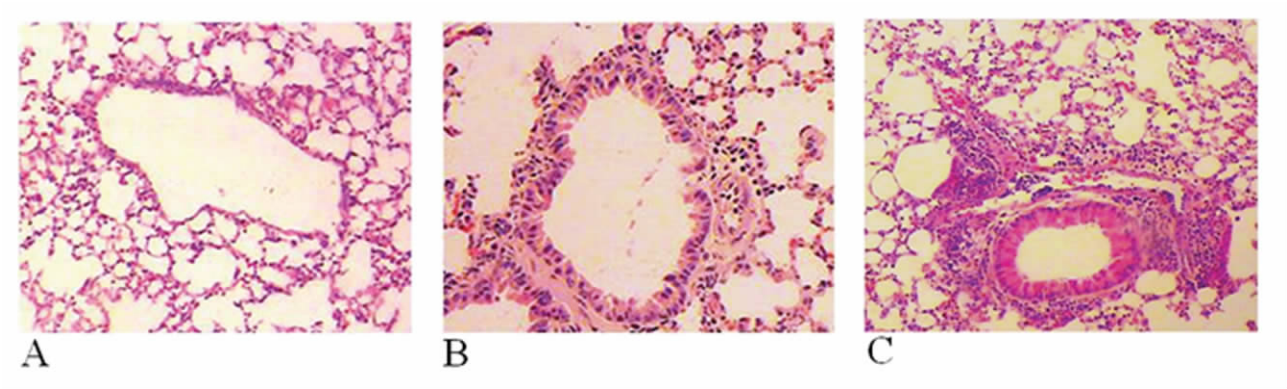


图 1 BCG 治疗后哮喘小鼠肺支气管组织病理学改变(HE, $\times 100$): A 为对照组; B 为哮喘组; C 为 BCG 治疗组

Fig1 Histopathological change of bronchial in asthmatic mice (HE staining, $\times 100$). A, Control group; B, Asthma group; C, BCG group

2.4 BCG 治疗后对 各组哮喘小鼠肺组织 PPAR- γ mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示: 正常对照组 (A 组) 小鼠肺组织中 PPAR- γ mRNA 高水平表达, 哮喘模型诱导成功后, 模型组(B 组) 小鼠肺组织中 PPAR- γ mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.01$), 而 BCG 治疗后, 与模型组比较, BCG 治疗组(C 组) 小鼠肺组织中 PPAR- γ mRNA 表达水平明显增加 ($P<0.05$) (如图 2 所示)。

2.5 BCG 治疗后对 各组哮喘小鼠肺组织 PPAR- γ 蛋白表达的影响

同样, western 结果显示: 正常对照组(A 组) 小鼠肺组织中高表达 PPAR- γ 蛋白, 哮喘模型诱导成功后, 模型组(B 组) 小鼠肺组织中 PPAR- γ 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 而 BCG 治疗后, 与模型组比较, BCG 治疗组(C 组) 小鼠肺组织中 PPAR- γ 蛋白表达水平明显增加 ($P<0.05$) (如图 3 所示)。

3 讨论

支气管哮喘是一种气道慢性炎症性疾病, 其疾病的发生发展由多种细胞包括气道炎症细胞、结构细胞(如嗜酸粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞和气道上皮细胞等)和细胞组分(cellular elements)参与^[9]。本研究通过卵蛋白复制小鼠的急性哮喘模型, 结果显示, 哮喘小鼠气道壁粘膜、粘膜下、肺间质、小血管周围可见大量的炎症细胞(以中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞为主)浸润, 粘膜明显充血水肿, 气道粘膜层及粘膜下层明显增厚, 杯状细胞大量增生, 上皮细胞坏死和脱落, 气道内有大量的粘液栓及脱落的粘膜上皮, 支气管粘膜皱壁增多卷屈, 管腔狭窄, 提示支气管出现了重塑, 表明哮

喘模型复制成功。

过氧化物酶体增殖物激活受体 - γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 是一种核受体超家族中的转录因子, 其配体包括类固醇、维生素 D、甲状腺激素、维甲酸受体等。以往的研究表明, PPAR- γ 是调节脂肪细胞分化和脂类代谢的重要受体^[6]。最近研究发现, PPAR- γ 在炎症细胞、呼吸道上皮、支气管黏膜下层、呼吸道平滑肌均有表达, 具有抑制炎症、诱导细胞分化、抑制增殖、诱导凋亡等作用^[1]。PPAR- γ 相关信号通路在急性肺损伤、慢性肺炎、肺动脉高压、肺纤维化中发挥重要的调节作用^[7]。PPAR- γ 激动剂通过作用于嗜酸粒细胞、T 淋巴细胞、树突状细胞、肺上皮细胞等, 能够减轻过敏性哮喘小鼠呼吸道炎症^[8-10]。

卡介苗 (BCG) 是结核杆菌培养 230 代后得到的减毒活疫苗, 主要用于防治结核。众多研究表明卡介苗在哮喘及变应性疾病中起重要的免疫调节作用, 能够诱导机体产生 Th1 免疫反应, 上调 Th1 反应, 抑制 Th2 细胞功能, 其机制可能与 BCG 诱导 IFN- γ 产生, 降低 IL-4、IL-5 水平等相关^[11]。而卡介苗干预对 PPAR- γ 在哮喘小鼠肺组织表达产生影响及意义国内外鲜见报道。

本研究结果显示, BCG 具有改善卵蛋白致喘小鼠哮喘症状的作用, 其喘息和呼吸急促症状较哮喘模型小鼠为轻。同时, 组织病理学检测发现, BCG 明显缓解了哮喘小鼠支气管慢性病变的进程, 减轻支气管炎症反应。我们进一步探讨了 BCG 改善卵蛋白致喘小鼠哮喘症状的机制, 研究发现, 在正常对照组, PPAR- γ 的表达无论在 mRNA 水平还是在蛋白水平均有高水平的表达, 经过卵蛋白致喘, 哮喘模型小鼠的 PPAR- γ 的表达量在 mRNA 水平和蛋白水平均显著下调, 其差异具有显著性

意义($P<0.01$),有趣的是,经过 BCG 的治疗后,与模型对照组比较,PPAR- γ 的表达量在 mRNA 水平和蛋白水平均有明显上调,其差异具有显著性意义($P<0.05$),提示 BCG 可能通过 PPAR- γ 介导的信号通路抑制炎症反应和改善卵蛋白致喘小鼠哮喘症状。其详细的具体机制尚不清楚,还需要进一步探讨。哮喘的病因和发病机制还不完全清楚,是一个复杂的过程,包

括免疫-炎症反应,气道重塑反应,氧化应激等及其相互作用。综上所述,BCG 在卵蛋白致敏支气管哮喘急性模型中对调控哮喘气道炎症反应可能具有调节作用,BCG 可能通过上调表达 PPAR- γ ,减少炎症细胞的浸润,抑制炎症反应,从而有效防止气道重塑,进而有效地改善哮喘疾病的症状,该研究为卡介苗提供新的临床应用领域。

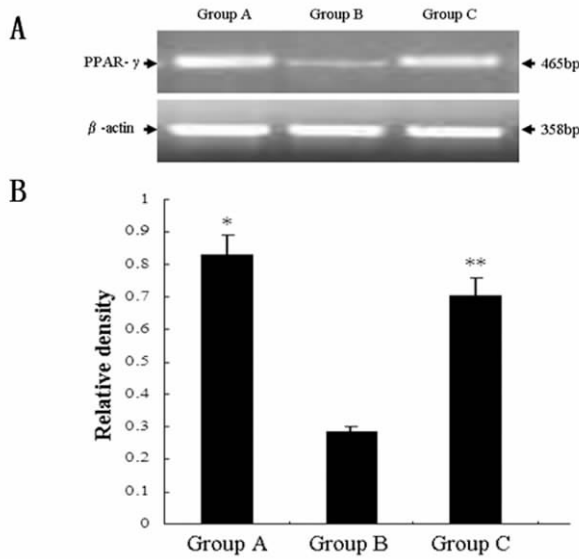


图2 BCG 治疗后哮喘小鼠肺组织 PPAR- γ mRNA 的表达变化,A 为 PPAR- γ 表达的 RT-PCR 结果,条带从左至右分别为:正常对照组(group A)、模型组(group B)、BCG 治疗组(group C)。B 为 PPAR- γ 的相对表达量,与模型组比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.2 The expression of PPAR- γ mRNA in lung tissue of asthmatic mice after treatment of BCG. A, lines from left to right: line 1, normal control group (group A); line 2, model group (group B); line 3, BCG group (group C). B, the relative expression of PPAR- γ mRNA compared with the internal standard. The results were obtained from at least three independent measurements. * $P<0.01$, ** $p<0.05$ compared to model group.

参考文献(Reference)

- [1] Benayoun L, Letuve S, Druilhe A, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 15; 164:1487-1494
- [2] Zhang XF, Dai AG, Hu RC, et al. Expression of γ -Glutamylcysteine synthetase in inflammatory cells in bronchial veolar lavage fluid of guinea pig with bronchial asthma [J]. Chinese Journal of histochemistry and cytochemistry, 2007, 16(4):424-427
- [3] Zhu YF, Dai AG, Hu RC, et al. The role of Nrf2 to γ -GCS in lung tissue of guinea pig with bronchial asthma [J]. Chin J Appl Physiol, 2006, 22(4):492-496
- [4] Jiang Gang, Dai AG, Hu RC. The regulation of cigarette smoke to γ -Glutamylcysteine synthetase in rat airway epithelial cells [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2007, 30: 710-712
- [5] 中华医学会呼吸病学分会哮喘组, 支气管哮喘防治指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2008, 31(3):177-185
The asthma branch of Chinese Medical Association .Guideline for bronchial asthma Prevention and Treatment [J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2008, 31(3):177-185
- [6] Grimaldi PA. The roles of PPARs in adipocyte differentiation[J]. Prog

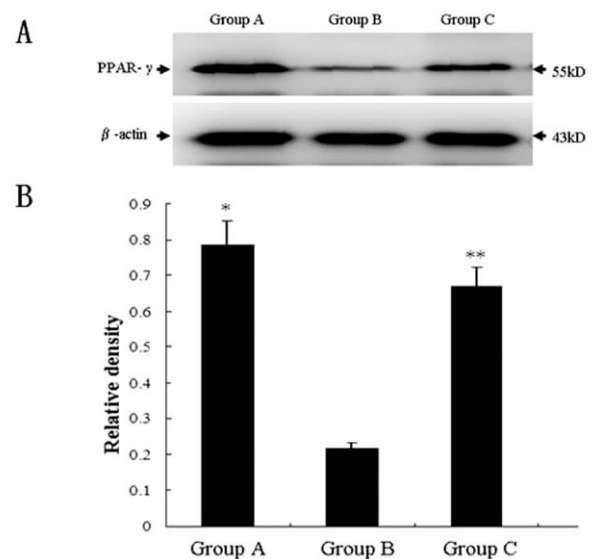


图3 BCG 治疗后哮喘小鼠肺组织 PPAR- γ 蛋白的表达变化,A 为 PPAR- γ 表达的 western 结果,条带从左至右分别为:正常对照组(group A)、模型组(group B)、BCG 治疗组(group C)。B 为 PPAR- γ 的相对表达量,与模型组比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$, $n=3$ 。

Fig.3 The expression of PPAR- γ protein in lung tissue of asthmatic mice after treatment of BCG. A, lines from left to right: line 1, normal control group (group A); line 2, model group (group B); line 3, BCG group (group C). B, the relative expression of PPAR- γ mRNA compared with the internal standard. The results were obtained from at least three independent measurements. * $P<0.01$, ** $p<0.05$ compared to model group.

Lipid Res, 2001, 40(4):269-81

- [7] Park SJ, Lee YC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a novel therapeutic target in asthma[J]. J Asthma, 2008, 45(1):1-8
- [8] Trifileff A, Bench A, Hanley M, et al. PPAR-alpha and-gamma but not -delta agonists inhibit airway IFN λ inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB- independent effect[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139(1):163-171
- [9] Woerly G, Honda K, Loyens M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic IFN λ inflammation and eosinophil activation[J]. J Exp Med, 2003, 198(3): 411-21
- [10] Park SJ, Lee KS, Kim SR, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation [J]. J Immunol, 2009, 183(5): 3259-67
- [11] 王鹏, 沈华浩, 黄华琼等. 卵白蛋白致敏时减毒活菌卡介苗干预对哮喘小鼠气道炎症的影响[C]. (第二十九届)浙江省医学会呼吸病学学术年会. 2007
Wang P, Shen HH, Huang HQ, et al. Effect of attenuated BCG on the airway inflammation of ovalbumin sensitized asthma mice. (Twenty-ninth) Respiratory Diseases[C]. Zhejiang Medical Association Annual Conference. 2007