

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.002

前列腺素 D2 在小鼠哮喘模型中表达水平的研究 *

袁丽粉 乔建瓯 孙淑宁 郑翠侠 王 健[△]

(上海交通大学医学院附属第九人民医院呼吸病科 上海 200011)

摘要 目的:探讨前列腺素 D2 在小鼠哮喘模型中的表达水平。**方法:**24 只小鼠随机均分为四组:正常对照 2 周组,正常对照 4 周组,哮喘模型 2 周组,哮喘模型 4 周组。以卵白蛋白和氢氧化铝混悬液致敏,并予以卵白蛋白雾化激发建立哮喘小鼠模型。末次激发 24h 后,ELISA 法检测其血清及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中前列腺素 D2 水平;收集 BALF 行嗜酸性粒细胞(eosinophil,EOS)计数;HE 染色观察其肺组织病理改变。**结果:**与正常对照 2 周及 4 周组相比,哮喘模型组小鼠肺组织病理损害明显加重,EOS 计数哮喘组显著高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),血清及 BALF 中的前列腺素 D2 水平明显高于正常组,差异有统计学意义($P<0.01$),而且随着哮喘病程的延长,即哮喘模型 4 周组较 2 周组的肺组织病理损害更为严重,EOS 计数升高更为显著,血清及 BALF 中的前列腺素 D2 增多更为明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。但正常对照 4 周组与 2 周组比较,未见明显变化。**结论:**炎性介质前列腺素 D2 水平在哮喘模型中有一定的表达水平,而且随着哮喘病程的延长,前列腺素 D2 表达水平也逐渐升高。

关键词:哮喘;前列腺素 D2;卵白蛋白;嗜酸性粒细胞计数

中图分类号:R-33;R562.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)09-1606-04

Study on the Expression Level of Prostaglandin D2 in Mouse Asthma Model*

YUAN Li-fen, QIAO Jian-ou, SUN Shu-ning, ZHENG Cui-xia, WANG Jian[△]

(Department of Respiratory Medicine, Shanghai Ninth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression level of prostaglandin D2 in mouse asthma model. **Methods:** 24 mice were randomly divided into four groups: normal control group for 2 weeks, normal control group for 4 weeks, asthma model group for 2 weeks and asthma model group for 4 weeks. The mice in asthma model group were sensitized by Ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide (Al (OH)₃) suspension and be aerosolized by ova. At the end, the levels of PGD2 in the serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were detected through ELISA, and the eosinophils of the BALF were counted, and Hematoxylin and eosin (HE) staining was performed to observe the lung tissue pathological changes. **Results:** Compared with the normal groups, the pathological damage of lung tissues in asthma model group was significantly increased. The eosinophils counting of BALF in asthma group were significantly lower than those in normal group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The PGD2 levels in serum and BALF were significantly higher than that in the normal groups, the difference was statistically significant ($P<0.01$). But, along with the prolonging of duration of asthma, lung tissue damage of asthma model in 4 weeks group was more serious than that of 2 weeks group, and EOS counts were higher in serum and BALF, prostaglandin D2 was increased more significantly, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). But, there was no obvious change between the two normal control groups. **Conclusions:** The inflammatory mediator, PGD2, has a certain level of expression in the asthma model, and PGD2 level is gradually increased with the prolongation of the duration of asthma.

Key words: Asthma; Prostaglandin D2; Ovalbumin; Eosinophil count

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R562.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)09-1606-04

前言

支气管哮喘(bronchial asthma)简称哮喘,是一种常见的慢性呼吸道疾病。流行病学资料显示^[1],全球约有 3 亿哮喘患者,我国哮喘患者人数在 1500 万左右。哮喘的发病率逐年上升,严重危害人类的健康,已经成为患者家庭和全社会的一个沉重的

负担。普遍认为^[2,3],气道慢性炎症、变态反应、气道高反应被认为与哮喘的发病密切相关。由于前列腺素 D2 (Prostaglandin D2,PGD2)参与了哮喘的慢性炎症反应过程^[4,5],因此越来越受研究者的关注。为进一步阐明 PGD2 在哮喘模型中的表达情况,我们建立小鼠哮喘模型,研究哮喘小鼠体内前列腺素 D2 的表达水平,初步探讨前列腺素 D2 在哮喘发病机制中的作用。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81170028);上海交通大学医学院科技基金项目(12XJ10020)

作者简介:袁丽粉(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:哮喘的发病机制,电话:13524811549,E-mail:yuanlifeng0122@163.com

[△] 通讯作者:王健,E-mail:wangjian0628@163.com

(投稿日期:2016-09-08 接受日期:2016-09-30)

1 材料与方 法

1.1 主要仪器和实验试剂

全自动生化分析仪(美国 DADE 公司 Dimension RXL), 生物光学显微镜 (Nikon 日本), 血细胞计数仪 (日本光电 MEK-7222K), 卵白蛋白 (ovalbumin, OVA, Grade V, 美国 sigma 公司), 氢氧化铝 ($[Al(OH)_3]$) (美国 sigma 公司), 前列腺素 D2 Elisa 试剂盒 (美国 sigma 公司), 5% 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海化学试剂公司)。

1.2 实验动物、分组及实验方法

1.2.1 实验动物及分组 SPF 级健康雌性 BALB/C 小鼠 24 只, 体质量 16~20 g, 4 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。各小鼠均分笼 (每笼 5 只), 自由饮用食物和水, 12 h 昼夜周期喂养。经标准饲料适应性喂养 2 周后随机均分为 4 组: 正常对照 2 周组, 正常对照 4 周组, 哮喘模型 2 周组, 哮喘模型 4 周组。每组 6 只小鼠。

1.2.2 实验方法 小鼠哮喘模型造模方法参照文献^[9]并稍作修改。哮喘模型组: 造模第 1 天、第 8 天分别腹腔注射混悬液体 0.2 mL (内含 20 微克 OVA 以及 2.25 mg $Al(OH)_3$ 凝胶), 于第 15 天将小鼠置于 20 cm×20 cm×15 cm 的密闭容器中, 使用超声雾化仪超声雾化 1% OVA 气雾剂, 每天 1 次, 每次半小时。哮喘模型 2 周组连续雾化 2 周, 哮喘模型 4 周组连续雾化 4 周。正常对照组: 于 D1、D8 分别腹腔注射 0.2 mL 无菌注射用水, 在第 15 天起使用超声雾化仪超声雾化无菌注射用水, 每天 1 次, 每次半小时。正常对照 2 周组连续雾化 2 周, 正常对照 4 周组连续雾化 4 周。

1.3 标本采集及处理

1.3.1 支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数及 PGD2 水平的测定 小鼠取仰卧位, 剪开并分离颈部肌肉, 充分暴露气管, 打开胸腔, 暴露肺组织, 结扎左肺主支气管, 用 PBS 缓冲液行右肺支气管肺泡灌洗, 每次 0.5 mL, 重复 3 次, 回收率在 80% 以上。收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid,

BALF) 于 1.5 mL Eppendoff 管中, 离心 (2000 r/min, 4℃) 10 min, 取上清 -20℃ 保存备用用于 ELISA 法检测 PGD2 水平。离心后的沉淀用 0.5 mL PBS 重悬, 取 0.1 mL 用血细胞计数仪计算细胞总数, 取 50 微升细胞沉淀涂片, 干燥固定, 经瑞氏染色显微镜下行分类计数, 至少计数 6 个视野, 至少计数 500 个白细胞行嗜酸性粒细胞 (eosinophil, EOS) 计数。

1.3.2 血清 PGD2 水平的测定 末次雾化后 24 h, 摘除小鼠眼球, 眼眶内取血, 常温下静置 1 小时后 3000 r/min 离心 10 min, 获取血清, 并保存于 -20℃ 待用, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 PGD2 水平。

1.3.3 肺组织形态学观察 处死小鼠后, 取其右肺后叶组织于 10% 中性福尔马林溶液固定至少 24 h, 然后取出制成石蜡切片, 常规苏木素-伊红染色, 光镜下病理组织观察。

1.4 统计分析

数据以均数±标准差表示, 使用 SPSS19.0 统计软件包进行处理, 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

哮喘模型 2 周组小鼠表现为明显竖毛、烦躁不安、搔头挠背、抓耳挠腮等症状。哮喘模型 4 周组小鼠症状则较为严重, 大多表现为腹肌抽搐、二便失禁、喘鸣、呼吸减慢或节律不齐、动作迟缓或俯伏不动、反应迟钝等症状。这些行为学表现证明哮喘模型制备成功。正常对照 2 周组及正常对照 4 周组均无上述症状。

2.2 肺组织病理学改变

如图 1 所示: 哮喘模型组 (C 图及 D 图) 与正常对照组 (A 图及 B 图) 相比, 气道壁增厚明显, 管腔可见狭窄, 管壁及其周围大量炎性细胞浸润, 且以嗜酸性粒细胞为主。其中模型 4 周组 (D 图) 病变较 2 周组 (C 图) 更为严重。正常对照 2 周组 (A 图) 与正常对照 4 周组 (B 图) 相比, 肺组织病理学改变不明显。

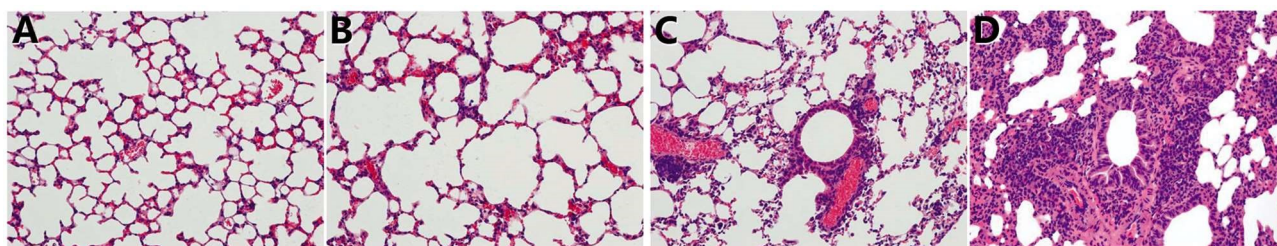


图 1 各组小鼠肺组织光镜结构 (HE×200)

Fig.1 Lung tissue structure of mice in each group under light microscope (HE×200)

Note: A: normal control group for 2 weeks; B: normal control group for 4 weeks; C: asthma model group for 2 weeks; D: asthma model group for 4 weeks.

2.3 支气管肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞计数

EOS 计数在模型 2 周组及 4 周组都较正常组有明显增多 ($P<0.01$), 而且, 与模型 2 周组相比, 模型 4 周组的 EOS 计数增多更加明显 ($P<0.05$)。正常对照 2 周组与 4 周组相比, 嗜酸性粒细胞计数无统计学差异 ($P>0.05$)。

2.4 各组小鼠血清及 BALF 中 PGD2 的变化

哮喘组小鼠血清及 BALF 中 PGD2 水平明显高于正常对照组, 且随着哮喘病程的延长, PGD2 水平也逐步升高 (如表 2

所示)。

3 讨论

哮喘的病因和发病机制一直都是研究的热点问题。众多研究资料显示^[7,8], 哮喘是一种慢性变态反应性气道炎症 (allergic airway inflammation, AAI), AAI 是导致哮喘患者气道高反应性和气道弥漫性、可逆性阻塞的病理基础。气道内以 EOS 浸润为主的变态反应性炎症是哮喘的主要病理特征^[9,10]。哮喘病程越

长,气道阻塞的可逆性就会变得越小,气道重塑 (airway remodeling)也将越加明显^[11,12],甚至可导致肺功能的不可逆性损害。哮喘的防控和治疗已经成为亟待解决的热点问题。近年来研究

发现^[13,14],PGD2 参与哮喘的炎症过程,对气道炎症起促进作用,PGD2 对 EOS 及相关炎症细胞具有双重调节作用,这些强烈提示了 PGD2 在哮喘的发病机制中占有重要位置。

表 1 各组小鼠嗜酸性粒细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the counts of eosinophils in the mice of each group($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	Eosinophils counting(10 ⁷ /mL)
Normal control group for 2 weeks	6	4.1± 1.5
Normal control group for 4 weeks	6	4.3± 1.2
Asthma model group for 4 weeks	6	17.2± 1.5*
Asthma model group for 4 weeks	6	27.4± 2.1* ^Δ

Note: *P<0.01, compared with normal control groups in two week's group and four week's group respectively; ^Δ P<0.05, asthma model group in 4 weeks compared with asthma model group in 2 weeks.

表 2 各组小鼠血清及 BALF 中 PGD2 水平的比较($\bar{x} \pm s$,pg/mL)

Table 2 Comparison of PGD2 levels in serum and BALF of each group($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

Group/ types of specimen	Serum	BALF
Normal control group for 2 weeks	267.64± 8.11	23.49± 3.31
Normal control group for 4 weeks	271.52± 5.65	22.30± 1.95
Asthma model group for 2 weeks	408.50± 5.68**	29.32± 1.85**
Asthma model group for 4 weeks	463.89± 9.85** ^Δ	36.33± 3.51** ^Δ

Note: **P<0.01, compared with normal control groups in two week's group and four week's group respectively; ^Δ P<0.05, asthma model group in 4 weeks compared with asthma model group in 2 weeks.

动物实验证实^[15],前列腺素 D2 是哮喘气道炎症和气道高反应性的主要致病因子。PGD2 可使外周血中 EOS 快速下降,浸润到气道,进而使得气道产生痉挛、渗出,导致气道重塑,这与 PGD2 活化 EOS 上前列腺素 D 受体,产生 EOS 趋化作用有关^[16]。而且研究还发现^[17]支气管肺泡灌洗液中 PGD2 增高,这将更有利于趋化 EOS 进入气道。在哮喘患者 BALF 中有 PGD2 增高,过敏原激发后 PGD2 分泌增多,导致各种 PGD2(CRTH2)受体的活化,进而导致各种细胞因子和化学趋化物的产生,引起淋巴细胞和嗜酸性细胞聚集于抗原激发物的部位,产生一系列过敏反应^[18]。PGD2 的增多有可能是患者易于出现哮喘症状和气道重塑的一个重要原因。PGD2 是强大的炎症调节分子^[19],可以作用于细胞上的不同受体,从而增强或抑制炎症。PGD2 在肺内主要来源于肥大细胞,在哮喘患者 BALF 中显著升高^[20]。

本实验通过 OVA 致敏并反复雾化吸入诱导,成功建立了慢性哮喘小鼠模型,发现与正常对照组小鼠相比,哮喘模型组小鼠气道壁增厚明显,支气管管腔可见狭窄,管腔内可见黏液栓,黏膜及黏膜下层组织增厚,肺泡间隔不同程度增厚,部分肺泡间隔断裂,肺泡腔融合,管壁及其周围大量炎性细胞浸润,其中模型 4 周组病变较 2 周组更为严重(图 1)。同时行支气管肺泡灌洗,发现 BALF 中 EOS 计数亦明显高于正常对照组,而且随着哮喘病程的延长,EOS 计数亦明显升高(表 1)。相应地,哮喘小鼠血清及肺泡灌洗液中 PGD2 水平明显高于正常对照组(表 2),而且诱导哮喘 4 周组 PGD2 水平升高较诱导哮喘 2 周组更为明显,差异有统计学意义。从而提示哮喘小鼠中 PGD2 与 EOS 的调控有关,PGD2 可使得外周血中 EOS 快速下降,浸润到气道,BALF 中 EOS 明显升高,而 EOS 在呼吸道炎性反

应、呼吸道高反应性等方面发挥重要作用。

通过本实验,我们发现过敏源(OVA)激发后血清及支气管肺泡灌洗液中 PGD2 分泌增多,从而引起 EOS 明显增多,产生一系列过敏反应。OVA 致敏和激发的慢性哮喘小鼠气道 EOS 增多,气道反应性增高,而这一切都与前列腺素 D2 增多有关。另外,本研究结果同时证明,哮喘小鼠体内 PGD2 水平较正常对照组明显升高,且随着哮喘病程的延长,PGD2 表达亦逐渐增多,抑制 PGD2 的产生将成为以后哮喘治疗的新的靶点,为哮喘的防治提供理论依据。

参考文献(References)

- [1] 苏楠,林江涛,刘国梁,等.我国 8 省市支气管哮喘患者控制水平的流行病学调查[J].中华内科杂志,2014,53(8): 601-606
Su Nan, Lin Jiang-tao, Liu Guo-liang, et al. An epidemiological survey on the level of control in patients with bronchial asthma in 8 provinces and cities in China [J]. Chin J Intern Med, 2014, 53(8): 601-606
- [2] 张方琪,杨学敏,唐元元,等.嗜酸性粒细胞在哮喘发病机制中的研究进展[J].中华肺部疾病杂志,2013,6(2): 55-58
Zhang Fang-qi, Yang Xue-min, Tang Yuan-yuan, et al. Research progress of eosinophils in the pathogenesis of asthma [J]. Chin J Lung Dis, 2013, 6(2): 55-58
- [3] 蒋宝安,屈斌,郑辉,等.支气管哮喘的发病机制及药物治疗研究进展[J].中国当代医药,2015,22(13): 35-41
Jiang Bao-an, Qu Bin, Zheng Hui, et al. Research Progress on pathogenesis and drug therapy of bronchial asthma [J]. China Modern Medicine, 2015, 22(13): 35-41
- [4] Kagawa S, Fukunaga K, Oguma T, et al. Role of Prostaglandin D2 Receptor CRTH2 in Sustained Eosinophil Accumulation in the Airways

- of Mice with Chronic Asthma [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2011, 155(suppl 1): 6-11
- [5] Diamant Z, Sidharta PN, Singh D, et al. Setipiprant, a selective CRTH2 antagonist, reduces allergen-induced airway responses in allergic asthmatics [J]. *Clinical & Experimental Allergy*, 2014, 44 (8): 1044-1052
- [6] Liu H, Zheng M, Qiao J, et al. Role of prostaglandin D2 /CRTH2 pathway on asthma exacerbation induced by *Aspergillus fumigatus* [J]. *Immunology*, 2014, 142(1): 78-88
- [7] Dhawale VS, Amara VR, Karpe PA, et al. Activation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) attenuates allergic airway inflammation in rat asthma model [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 306: 17-26
- [8] Kim SG, Lee E, Park NY, et al. Britanin attenuates ovalbumin-induced airway inflammation in a murine asthma model [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(7): 1006-1012
- [9] Ge XN, Ha SG, Greenberg YG, et al. Regulation of eosinophilia and allergic airway inflammation by the glycan-binding protein galectin-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016
- [10] Lavinskiene S, Malakauskas K, Jeroch J, et al. Functional activity of peripheral blood eosinophils in allergen-induced late-phase airway inflammation in asthma patients [J]. *Journal of Inflammation*, 2015, 12: 25
- [11] Hardy CL, Nguyen HA, Mohamud R, et al. The activin A antagonist follistatin inhibits asthmatic airway remodelling [J]. *Thorax*, 2013, 68 (1): 9-18
- [12] Park CS, Bang BR, Kwon HS, et al. Metformin reduces airway inflammation and remodeling via activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 84(12): 1660-1670
- [13] Pettipher R, Vinall SL, Xue L, et al. Pharmacologic profile of OC000459, a potent, selective, and orally active D prostanoid receptor 2 antagonist that inhibits mast cell-dependent activation of T helper 2 lymphocytes and eosinophils [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 340(2): 473-482
- [14] 应延凤, 李睿淳, 毛宇飞, 等. 大鼠支气管哮喘模型中前列腺素 D2 水平和嗜酸粒细胞上受体改变研究 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30 (23): 1417-1420
- Ying Yan-feng, Li Rui-chun, Mao Yu-fei, et al. Study on the changes of prostaglandin D2 levels and receptors on eosinophils in rat bronchial asthma model [J]. *International Journal of respiratory*, 2010, 30(23): 1417-1420
- [15] Subhashini, Chauhan PS, Dash D, et al. Intranasal curcumin ameliorates airway inflammation and obstruction by regulating MAPK kinase activation (p38, Erk and JNK) and prostaglandin D2 release in murine model of asthma [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 200-206
- [16] Shiraishi Y, Asano K, Nakajima T, et al. Prostaglandin D2-induced eosinophilic airway inflammation is mediated by CRTH2 receptor [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(3): 954-960
- [17] Paruchuri S, Jiang Y, Feng C, et al. Leukotriene E4 activates peroxisome proliferator-activated receptor gamma and induces prostaglandin D2 generation by human mast cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (24): 16477-16487
- [18] Nittner-Marszalska M, Cichocka-Jaros E, Sanak M, et al. 9α , 11β -PGF₂, a Prostaglandin D2 Metabolite, as a Marker of Mast Cell Activation in Bee Venom-Allergic Patients [J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2015, 63(4): 317-325
- [19] Maher SA, Birrell MA, Adcock JJ, et al. Prostaglandin D2 and the role of the DP1, DP2 and TP receptors in the control of airway reflex events [J]. *Eur Respir J*, 2015, 45(4): 1108-1118
- [20] Pettipher R, Hunter MG, Perkins CM, et al. Heightened response of eosinophilic asthmatic patients to the CRTH2 antagonist OC000459 [J]. *Allergy*, 2014, 69(9): 1223-1232

(上接第 1618 页)

- [15] Wu H, de Gannes M K, Luchetti G, et al. Rapid method for the isolation of mammalian sperm DNA [J]. *Biotechniques*, 2015, 58 (6): 293-300
- [16] Keshavarz Z, Moezzi L, Ranjbaran R, et al. Evaluation of a Modified DNA Extraction Method for Isolation of Cell-Free Fetal DNA from Maternal Serum [J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2015, 7(2): 85-88
- [17] Kruhøffer M, Dyrskjøl L, Voss T, et al. Isolation of Microarray-Grade Total RNA, MicroRNA, and DNA from a Single PAXgene Blood RNA Tube [J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2007, 9(4): 452-458
- [18] Soto J, Rodriguez-Antolin C, Vallespín E, et al. The impact of next-generation sequencing on the DNA methylation-based translational cancer research [J]. *Translational Research*, 2015, 169: 1-18
- [19] Zhou Y, Xu LY, Derek M Bickhart, et al. Reduced representation bisulphite sequencing of ten bovine somatic tissues reveals DNA methylation patterns and their impacts on gene expression [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 779-790
- [20] Brisotto G, Gennaro A D, Damiano V, et al. An improved sequencing-based strategy to estimate locus-specific DNA methylation [J]. *Bmc Cancer*, 2015, 15(1): 1-10