



嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白mRNA在支气管哮喘中的表达及意义

支气管哮喘是由多种细胞(嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞、嗜中性粒细胞、气道上皮细胞等)和细胞组分参与的气道慢性炎症性疾病。嗜酸性粒细胞(EOS)浸润引起的气道炎症是哮喘发病的中心环节,其活化及释放的颗粒性蛋白引起哮喘的特征性病理改变和气道高反应性。研究表明:EOS脱颗粒蛋白的多少比EOS浸润总数更重要。EOS颗粒蛋白主要有:EOS主要碱性蛋白(MBP)、EOS阳离子蛋白(eosinophil cationic protein, ECP)、EOS过氧化物酶(eosinophil peroxidase, EPO)以及EOS神经毒素(eosinophil-derived neurotoxin, EDN),其中MBP的毒性作用尤其显著。MBP颗粒为晶体结构,在EOS分泌颗粒中居于核心位置,周围被ECP、EPO、EDN等蛋白包绕。MBP共117个氨基酸,富含精氨酸,相对分子质量约14 000,PI值为11.4。MBP是一种非常重要的气道活性物质,具有收缩支气管平滑肌[1][2]、增强生物膜的渗透性[3]、诱导细胞凋亡[4]、活化炎性细胞[5]、引发气道重构[6]等多种气道效应,参与哮喘的气道高反应性、气道上皮损伤等病理生理过程。但当前研究都是以观察动物模型为主,对MBP参与人类哮喘的病理生理过程尚未阐明,特别是缺乏对哮喘患者体内MBP表达水平的检测和评估。

本研究观察了哮喘和对照组外周血中MBP mRNA表达水平的差异、MBP mRNA含量在不同程度哮喘患者中的表达水平,并进行了MBP与肺功能的相关分析,旨在通过对MBP含量的分析,对哮喘患者的病情及预后作出评估。

1 材料和方法

1.1 材料/对象

1.1.1 对象 依据2003年中华医学会呼吸病学分会哮喘学组制定的哮喘诊断标准[7],选取40例2004年9月~2005年3月在我院呼吸科治疗的哮喘患者,男23例、女17例,年龄21~8岁,平均年龄(50.7±9.2)岁。其中轻度持续患者15例、中度持续15例、重度持续10例,分成相应3个观察组。正常对照组为20例无呼吸系统疾患者,男8例、女12例,年龄32~55岁,平均年龄(46.7±7.1)岁。

1.1.2 试剂 RT-PCR试剂盒(美津生物技术有限公司产品),总RNA提取试剂Trizol(赛百胜生物公司产品),DNA Marker: ϕ ×174-HaeIII digest(TaKaRa公司产品),Taq DNA聚合酶(瑞真生物技术有限公司产品)。

1.1.3 仪器 PCR仪(德国Eppendorf公司产品),UVItec凝胶分析仪(英格兰UVItec公司产品),Autobox DL体积描记仪(美国美加公司产品),低温超速离心机(Harris 公司产品)

1.2 方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象均取外周血4 ml,注入密封采血抗凝管中,每管分装2 ml。室温下以3 500 r/min离心10 min,弃上清后,将抗凝管置于-70 °C冰箱保存。

1.2.2 细胞总RNA提取 在上述抗凝管中,每管加入4 ml 2×红细胞裂解液,充分混匀至液体呈红色透亮。在4 °C条件下,以3 500 r/min离心10 min,弃上清。在每管沉淀中,加入Trizol提取液1 ml,混合后

静置5 min, 使其充分裂解。然后移入1.5 ml EP管中, 加入0.2 ml的氯仿, 混匀后15~30 °C静置3 min。以12 000 r/min 4 °C条件下离心15 min后, 小心吸取上层无水相, RNA全部保存在无色的水相中。按1:1的比例加入异丙醇, 充分混匀后静置10 min, 然后12 000 r/min 4 °C条件下离心10 min, 弃上清, RNA沉淀于管底, 以75%乙醇漂洗2~3次, 弃上清干燥后, 加入dH₂O 20 μl溶解, -70 °C冰箱保存。

1.2.3 引物设计及合成 扩增人MBP引物及内参照 β-actin 引物均由上海鼎安生物科技公司设计并合成。

MBP引物: 扩增产物长度135 bp。上游引物: 5'-GAAAGATGGGGCTGTTGAGT-3' 下游引物: 5'-CTTCTCACCAGGAGGTAGCG-3' β-actin 引物: 扩增产物长度284 bp。上游引物: 5'-ATTCCTATG TGGGCGACGAG-3' 下游引物: 5'-AGAGGCGTA CAGGGATAGCA-3'

1.2.4 RT-PCR及半定量分析 取提取的总RNA产物5 μl, 按试剂盒的说明, 依次加入RNase Free H₂O 6 μl、5×RT缓冲液 4 μl、dNTP 2 μl、RNase抑制剂 1 μl、Oligo(dT)20引物 1 μl、ReverTra Ace 1 μl, 建成20 μl 逆转录反应体系, 充分混匀, 30 °C, 10 min; 42 °C, 20 min; 99 °C, 5 min; 4 °C, 5 min。

取上述逆转录后的反应产物cDNA 5 μl, 加入10×RCR Buffer 4 μl、dNTP 2 μl、MBP上、下游引物各1 μl、Taq Ace 0.25 μl, 加dH₂O配成20 μl PCR反应体系, 充分混匀, 94 °C, 45 s; 55 °C, 45 s; 72 °C, 1 min。扩增35个循环, 最后72 °C延伸5 min结束。β-actin 的最佳退火温度为57 °C。

取PCR扩增产物, 采用1.5%琼脂糖凝胶电泳, 以β-actin为阳性对照, 用UVItec凝胶分析仪将电泳图扫描后用Gel-Pro Analyzer进行分析, 用目的条带与β-actin条带相比, 以积分光密度之比进行半定量分析。

1.2.5 肺功能及嗜酸性粒细胞测定 所有哮喘患者及正常对照组的肺功能检查由我院呼吸科肺功能室经验丰富的专科医师完成。FEV₁占预计值百分比(FEV₁%Pred)、PEF占预计值百分比(PEF%Pred)等多项肺功检测数据比较可靠。观察对象的外周血嗜酸性粒细胞计数, 嗜酸性粒细胞百分比等检验数据由我院检验科完成。

1.2.6 统计学处理 应用SPSS10.0软件处理数据。两样本均数的比较采用t检验, 多组比较采用One-Way ANOVA 法, 相关分析采用Pearson法。

2 结果

2.1 哮喘患者组与正常对照组MBP mRNA表达水平的差异情况

哮喘组与对照组标本RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图(图1)结果显示: 在大约135 bp和284 bp位置, 各电泳道均出现扩增条带, 与MBP、β-actin预期扩增的目的条带位置一致。

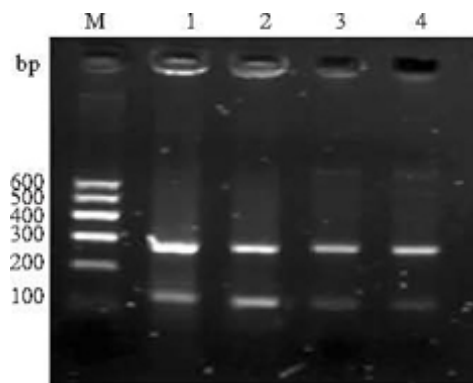


图1 MBP mRNA在哮喘和对照组的表达

Fig.1 Expression of MBP mRNA in asthma and control groups

Lanes 1, 2: Asthma group; Lanes 3, 4: Control group; MBP: Major basic protein

MBP和β-actin相应于135 bp和284 bp位置。1、2电泳道为哮喘组, 3、4电泳道为对照组。可见 1、2电

泳道MBP目的条带较3、4电泳道MBP条带明显清晰，即1、2电泳道MBP mRNA表达水平比3、4电泳道显著增高。由哮喘组与正常组外周血MBP mRNA表达相对含量及EOS计数检测结果(表1)可知：(1)哮喘组患者的MBP mRNA表达水平(0.37 ± 0.11)远高于正常对照组(0.17 ± 0.04 , $P < 0.001$) (2)哮喘组和对照组外周血EOS数量(0.86 ± 0.52 vs 0.21 ± 0.10) $10^9/L$ 和EOS占白细胞的百分比(10.19 ± 4.71 vs 2.97 ± 1.08)两项检查也存在显著差异($P < 0.001$)。

表 1 MBP mRNA 表达和 EOS 数量在两组中的比较
Tab.1 Comparison of major basic protein (MBP) mRNA expression and eosinophil (EOS) count between the 2 groups (Mean±SD)

Group	n	EOS count($\times 10^9/L$)	EOS/WBC(%)	MBP mRNA
Control	20	0.21 ± 0.10	2.97 ± 1.08	0.17 ± 0.04
Asthma	40	$0.86 \pm 0.52^{**}$	$10.19 \pm 4.71^{**}$	$0.37 \pm 0.11^{**}$

** $P < 0.001$ vs control group

2.2 哮喘患者中不同病情程度MBP mRNA的表达情况

哮喘组不同病情程度的MBP RT-PCR产物琼脂糖凝胶电泳图(图2)显示：1、3、5 电泳道条带位于135 bp位置，与 β -actin预期扩增的目的条带位置一致。2、4、6 电泳道条带位于284 bp位置，符合MBP目的条带位置。1、2；3、4；5、6电泳道分别为哮喘重度；中度；轻度持续状态标本RT-PCR产物。从图可见MBP mRNA表达含量 $2 > 4 > 6$ 电泳道。

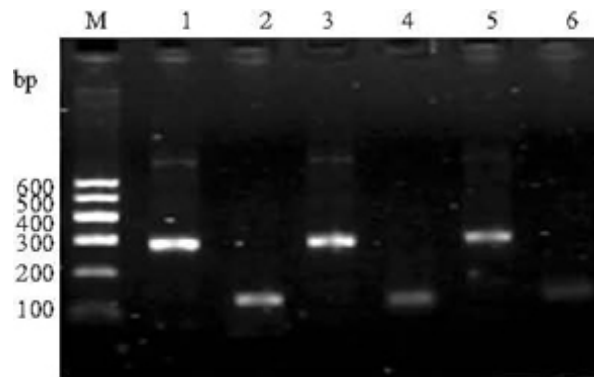


图2 MBP mRNA在哮喘和对照组的表达
Fig.2 Expression of MBP mRNA in different clinical types of asthma
Lanes 1, 3, 5: β -actin (284 bp); Lanes 2, 4, 6: MBP (135 bp)

不同病情程度哮喘组外周血MBP mRNA表达相对含量及肺功能检查结果(表2)：(1)在哮喘患者中，中度持续哮喘组MBP mRNA表达水平(0.42 ± 0.05)和重度持续哮喘组(0.47 ± 0.05)，远高于轻度持续哮喘组MBP mRNA表达水平(0.25 ± 0.06 , $P < 0.001$)。同时，在中度和重度持续哮喘组间，MBP mRNA含量也存在显著差异($P < 0.05$) (2)各哮喘组的肺功能指标FEV1%Pred、PEF%Pred符合其相应的临床标准，轻、中、重度哮喘患者肺功能依次减弱，各组的FEV1%Pred、PEF%Pred比较具有显著差异($P < 0.001$)。

表 2 哮喘各类型组 MBP mRNA 表达和肺功能的比较

Tab.2 Comparison of MBP mRNA expression and pulmonary function in different clinical types of asthma

(Mean±SD)				
Group	n	FEV1% Pred (%)	PEF% Pred (%)	MBP mRNA
Mild	15	92.76±5.23	89.22±4.74	0.25±0.06
Moderate	15	79.35±5.74**	71.98±5.88**	0.42±0.05**
Severe	10	47.97±7.99***	39.35±5.87***	0.47±0.05***

**P<0.001 vs mild group; *P<0.05, **P<0.001 vs moderate group

2.3 哮喘患者MBP mRNA的表达含量同其肺功能的分析

在哮喘患者中，轻度、中度、重度持续哮喘组MBP mRNA相对含量分别为 0.25 ± 0.06 、 0.42 ± 0.05 、 0.47 ± 0.05 时，其肺功能指标，如FEV1%Pred显著下降，对应为 $92.76 \pm 5.23\%$ 、 $79.35 \pm 5.74\%$ 和 $47.97 \pm 7.99\%$ 。外周血MBP mRNA的表达含量同肺功能水平呈负相关($r=-0.7490$, $P<0.001$)。见图3。

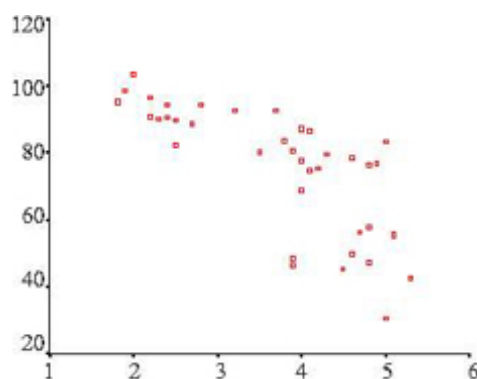


图3 哮喘患者MBP mRNA表达与肺功能的相关分析图

Fig.3 Correlation of MBP mRNA expression in asthma patients with pulmonary function ($r=-0.7490$, $P<0.001$)

3 讨论

EOS浸润引起的气道炎症是哮喘发病的中心环节，其活化和释放的颗粒蛋白在哮喘发病过程中起重要作用。主要碱性蛋白(MBP)为EOS分泌的主要颗粒蛋白，其颗粒晶体结构与C-TL家族成员相似[8]，是非常重要的气道活性物质，但当前对其参与哮喘的病理生理过程研究甚少，特别是缺乏对哮喘患者MBP表达水平检测和评估的临床研究。

本研究中，哮喘组患者外周血EOS数量和占白细胞的百分比显著高于对照组。我们通过RT-PCR法，观察了哮喘和对照组MBP mRNA的表达水平，发现哮喘组MBP mRNA显著高于对照组。EOS活化后分泌MBP，随着EOS数量的增加，MBP mRNA表达水平相应提高。MBP活化后可诱导IL-5、组胺等炎症因子的产生，而EOS的产生、活化过程是IL-5，IL-6等通过一个广泛交叉的信号转导网络来调节[9]。因此，MBP表达的增加，可促进EOS数量的提升，两者相互促进，加重哮喘的病理过程。本研究还发现，随着患者外周血MBP mRNA表达含量的增加，哮喘持续程度逐渐加重，MBP mRNA的表达含量同肺功能水平呈负相关($r=-0.7490$, $P<0.001$)。MBP影响肺功能可能在于：(1)MBP对毒蕈碱受体的影响[2][3][10]。哮喘气道高反应性，直接原因是乙酰胆碱(ACh)过度释放的结果。EOS释放的MBP在体内能和M2受体作用，是M2受体的变构拮抗剂，阻止ACh与M2受体的结合，于是ACh大量释放，诱发气道高反应性。(2)MBP通过诱生IL-8，激活中性粒细胞加剧哮喘的持续状态[5]

[11]。(3)MBP诱导气道上皮细胞凋亡,导致气道上皮脱落、水疱形成[4]。所以,当MBP mRNA表达增高,肺功能水平呈显著下降趋势。

对轻度、中度、重度持续哮喘组观察发现,各组MBP mRNA表达水平具有显著差异。可以逆向设想,通过对哮喘患者外周血MBP的测定,能对哮喘的病情严重程度进行判断,特别是对哮喘的预后分析、指导用药方面具有显著意义。结合分析当前临床对哮喘的诊治,常规指标缺乏特异性;支气管镜检查有一定创伤性;肺功能不能准确反映气道炎症的变化。因此,从非创伤性途径有效评价和监测哮喘气道炎症来看,外周血MBP含量的测定可能有着重要的临床意义。本研究观察了40例不同病情程度哮喘患者及对照者外周血中MBP mRNA的表达水平,统计学显示各组间存在显著差异。但如果作为哮喘的临床检测指标,要求更大的样本量进行研究证实,而且需寻求较RT-PCR法更简单、更精确的MBP检测法,这些都有待于进一步的工作。

(责任编辑:段咏慧)

参考文献:

- [1] Gleich G. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2000, 105(4): 651-63.
- [2] Yost B, Gleich G, Fryer A. Ozone-induced hyperresponsiveness and blockade of M2 muscarinic receptors by eosinophil major basic protein[J]. *J Appl Physiol*, 1999, 87(4): 1272-8.
- [3] Kleine T, Gleich G, Lewis S. Eosinophil major basic protein increases membrane permeability in mammalian urinary bladder epithelium[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(1 Pt 1): C93-C103.
- [4] Shahana S, Kampf C, Roomans G. Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro[J]. *Mediators Inflamm*, 2002, 11(3): 141-8.
- [5] Page S, Gleich G, Roebuck K, et al. Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 21(2): 230-7
- [6] Matsumoto K, Saito H. The role of eosinophils in asthma: Sarastro or the Queen of Night[J]? *Int Arch Allergy Immunol*, 2001, 125(4):240-6.
- [7] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组. 支气管哮喘防治指南支气管哮喘的定义、诊断、治疗及教育和管理方案[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2003, 26(3): 132-8.
- [8] Swaminathan G, Wearer A, Loegering D, et al. Crystal structure of the eosinophil major basic protein at 1.8 Å[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(28): 26197-203.
- [9] Wong C, Ip W, Lan C, et al. Biochemical assessment of intracellular signal transduction pathways in eosinophils: implications for pharmacotherapy[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2004, 41(1):79-113.
- [10] 史亮, 罗雅玲, 赖文岩, 等. 地塞米松对哮喘豚鼠气管平滑肌毒蕈碱受体mRNA的表达及肺泡灌洗液嗜酸性粒细胞浸润的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(8): 986-90.
- [11] Shi L, Luo YL, Lai WY. Effects of dexamethasone on the expression of muscarinic receptor mRNA in asthmatic guinea pig airway smooth muscle and eosinophil infiltration in bronchoalveolar lavage fluid[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2005, 25(8): 986-90.
- [11] Teran L, Johnston S, Schroder J, et al. Role of nasal IL-8 in neutrophil recruitment and activation in children with virus-induced asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997, 155(4): 1362-6.

