

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

李双洪¹, 罗雅玲¹, 赖文岩²(南方医科大学南方医院¹呼吸内科,²心内科实验室, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨嗜酸性粒细胞主要碱性蛋白(MBP)mRNA 在支气管哮喘中的表达及意义。方法 采用逆转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)对40例哮喘患者及20例正常对照者的MBP mRNA表达水平进行半定量分析。探讨了外周血MBP mRNA表达水平与患者嗜酸性粒细胞数量、肺功能的关系。结果 (1)哮喘患者组的嗜酸性粒细胞计数(0.86 ± 0.52)和MBP mRNA表达水平(0.37 ± 0.11)均远高于正常对照组($0.21 \pm 0.10, P < 0.001$)和($0.17 \pm 0.04, P < 0.001$); (2)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($0.25 \pm 0.06, P < 0.001$)。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($P < 0.05$); (3)哮喘患者的MBP mRNA表达水平同患者肺功能呈负相关($r = -0.7490, P < 0.001$)。结论 哮喘患者中MBP mRNA表达水平的增高可能与哮喘病情的严重程度密切相关。MBP可能在哮喘疾病的发展过程中起着非常重要的作用。

关键词:主要碱性蛋白;哮喘;逆转录聚合酶链反应

中图分类号:R562.25 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)09-1330-04

Expression of eosinophil major basic protein mRNA in bronchial asthma

LI Shuang-hong¹, LUO Ya-ling¹, LAI Wen-yan²

¹Department of Respiratory Diseases, ²Laboratory of Cardiovascular Diseases, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the expression of eosinophil major basic protein (MBP) mRNA in bronchial asthma and explore its significance. **Methods** Peripheral blood eosinophil MBP mRNA levels were measured in 40 patients with asthma and 20 normal controls by semi-quantitative RT-PCR. The association of MBP mRNA levels with eosinophil count and pulmonary function was also analyzed. **Results** Compared with the normal control group, MBP mRNA level were significantly increased in asthma patients (0.37 ± 0.11 vs $0.17 \pm 0.04, P < 0.001$), so was the eosinophil count (0.86 ± 0.52 vs $0.21 \pm 0.10, P < 0.001$). MBP mRNA levels in patients with moderate persistent asthma (0.42 ± 0.05) and those with severe persistent asthma (0.47 ± 0.05) were significantly higher than those in patients with mild persistent asthma ($0.25 \pm 0.06, P < 0.001$), and the difference in MBP mRNA levels between moderate persistent asthma patients and severe ones was also significant ($P < 0.05$). Among the asthma patients, MBP mRNA levels showed an inverse correlation with pulmonary function ($r = -0.7490, P < 0.001$). **Conclusion** Increased MBP mRNA expression level may correlate with the severity of asthma. MBP may play an important role in the development of asthma.

Key words: major basic protein; asthma; reverse transcriptional-polymerase chain reaction

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

收稿日期:2005-10-02

作者简介:李双洪(1978-),男,2001年毕业于第二军医大学,现为南方医科大学呼吸内科硕士研究生,医师,电话:020-61641575, E-mail: lsh0224@163.com

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(赛百胜生物公司厂品),DNA Marker:φ×174-Hae III 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(美国美加公司厂品),低温超速离心机(Harris 公司厂品)

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。

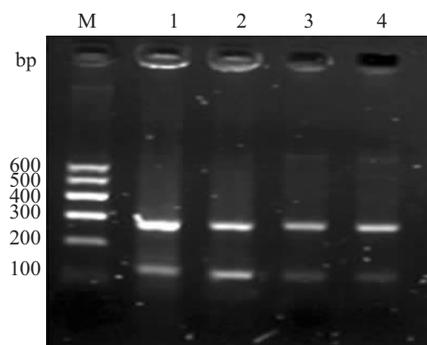


图 1 MBP mRNA 在哮喘和对照组的表达
Fig.1 Expression of MBP mRNA in asthma and control groups

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±0.52**	10.19±4.71**	0.37±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。

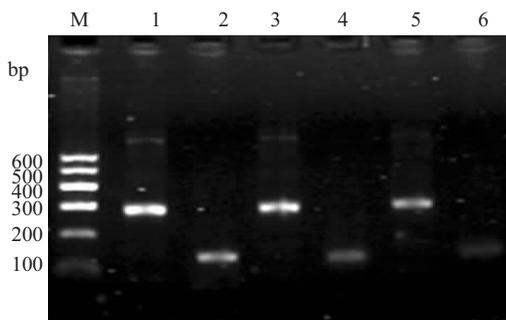


图 2 MBP mRNA 在哮喘和对照组的表达
Fig.2 Expression of MBP mRNA in different clinical types of asthma

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±5.23%、79.35±5.74%和 47.97±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。

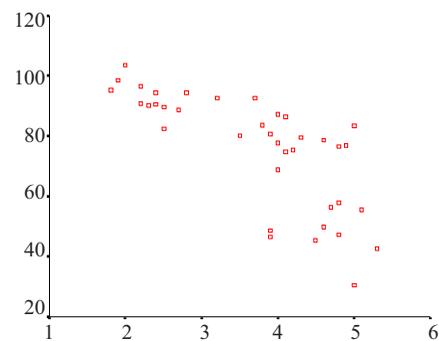


图 3 哮喘患者 MBP mRNA 表达与肺功能的相关分析图

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 通过诱导 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。

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.
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.

(责任编辑:段咏慧)