

[文章编号] 1000-4718(2007)02-0387-02

地塞米松对哮喘大鼠嗜酸性粒细胞中 p53 表达的影响*

耿秀娟[△], 孔灵菲, 陆洋

(中国医科大学附属第一医院呼吸疾病研究所, 辽宁 沈阳 110001)

[摘要] 目的: 研究支气管哮喘支气管肺泡灌洗液(BALF)嗜酸性粒细胞中凋亡相关基因 p53 的表达以及地塞米松对其的作用及其机制。方法: 将 36 只大鼠随机分为对照组、哮喘组和激素组, 并对其 BALF 的嗜酸性粒细胞进行计数, 以免疫印迹法(Western blotting)检测嗜酸性粒细胞中 p53 的表达。结果: 哮喘组 BALF 的总细胞数及嗜酸性粒细胞均高于激素组及对照组($P < 0.01$)。哮喘组 BALF 的嗜酸性粒细胞中 p53 表达弱于激素组和对照组($P < 0.01$)。结论: 哮喘气道炎症与嗜酸性粒细胞生存增加亦即嗜酸性粒细胞凋亡减少密切相关。糖皮质激素可诱导嗜酸性粒细胞凋亡, 其机制可能与促嗜酸性粒细胞凋亡的 p53 表达有关。

[关键词] 哮喘; 嗜酸性粒细胞; 细胞凋亡; 糖皮质激素类; 基因, p53

[KEY WORDS] Asthma; Eosinophils; Apoptosis; Glucocorticoids; Genes, p53

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

支气管哮喘是由多种细胞如嗜酸性粒细胞(eosinophil, Eos)及肥大细胞反应为主的慢性气道炎症。哮喘的气道炎症以 Eos 持续聚集为特征。近年来认为 Eos 凋亡障碍致 Eos 生存延长与哮喘炎症相关^[1]。阐明 Eos 凋亡机制对哮喘的防治有重要的理论和实践意义。凋亡相关基因 p53 是否参与哮喘 Eos 凋亡国内未见报道, 国外有针对哮喘气道活检标本中 p53 表达^[2]及哮喘患者支气管上皮细胞 p53 表达^[3]的报道, 因此, Eos 中 p53 表达值得研究。本研究采用卵蛋白吸入诱发大鼠哮喘模型, 应用免疫印迹法(Western blotting)检测 BALF 的 Eos 中凋亡基因 p53 的表达, 结合 BALF 中 Eos 数量的变化, 探讨细胞凋亡的可能机制, 以及地塞米松对其凋亡的影响。以阐明糖皮质激素在哮喘治疗中的确切机制, 为临床治疗哮喘提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 主要试剂与设备

JSO-OK 型超声雾化器(辽宁省鞍山市电子医疗仪器厂)、UNIVERSAL32R 离心机(德国 HELTICH 公司)、卵蛋白(上海生物制剂厂)、地塞米松磷酸钠注射液(天津市氨基酸公司人民制药厂)、percoll 分离液(Amersham 产品)、p53 兔多克隆抗体(Santa Cruz 产品)。

2 方法

2.1 动物模型复制 36 只 Wistar 大鼠(雌雄不限)(本校实验动物中心提供), 4-6 周龄, 体重 150-220 g。随机分为正常对照组、哮喘组和激素组各 12 只。哮喘组: 参照文献^[4]报道方法并加以改进复制哮喘模型: 以 10% 卵蛋白混悬液 1 mL 腹腔注射致敏, 15 d 后于密闭玻璃罩中以 1% 卵蛋白雾化吸入诱发, 每次当出现打喷嚏、呼吸急促、尿便失禁等症状时雾化结束, 每次约 20 min, 每天诱发 1 次, 共 3 d。激素组:

致敏和诱发同哮喘组, 然后腹腔注射地塞米松 0.5 mg/kg, 每天 1 次, 共 5 d。对照组: 用生理盐水代替卵蛋白致敏, 15 d 后雾化吸入生理盐水 20 min, 每天 1 次, 共 3 d。

2.2 样品采集 动物麻醉后行气管插管左肺支气管肺泡灌洗生理盐水 5 mL × 6, 回收 BALF, 回收率 > 90%。BALF 回收液 3 mL 经双层无菌纱布过滤, 在 4 °C、1 200 r/min 离心 10 min 分离细胞。离心沉淀细胞用生理盐水冲洗并调整细胞数为 1.0×10^9 cells/L, 在细胞计数板上计数细胞总数。取已调整细胞数的 BALF 30 μL, 用特制的细胞涂片离心支架在 4 °C、1 200 r/min 离心 10 min, 通过离心作用使一定量细胞均匀平铺于载玻片上, 冷风吹干, 经 HE 染色后在高倍镜下计数 100 个细胞, 同时进行细胞分类计数, 每例动物计数 3 张涂片。左肺上叶注入 4% 多聚甲醛 5 mL, 切下置于 4% 多聚甲醛中固定 1 周。

2.3 BALF 嗜酸性粒细胞分离 制成密度为 1.090 kg/L 和 1.080 kg/L 的 Percoll 液, 各 2 mL 先后加入 15 mL 锥形玻璃试管, 然后轻轻沿管壁加回收之余下 BALF 于其上, 2 000 r/min 离心 20 min 后, 收集中间层及沉淀细胞, Eos 纯度达 95% 以上。立即放于 -70 °C 冰箱冻存。

2.4 肺组织标本处理 固定的肺组织常规石蜡包埋切片 HE 染色。

2.5 Western blotting 法测定嗜酸性粒细胞中 p53 的表达

① -70 °C 保存的 Eos 室温融化, 放入 Eppendorf 管中, 加入 200 μL 的蛋白裂解液冰浴中超声粉碎, 4 °C 过夜, 4 °C 12 000 × g 离心 45 min, 吸出上清。采用 Folin-酚试剂法进行蛋白定量后, -20 °C 保存待用。

② Western 印迹分析: 取含有蛋白的上述溶液 40 μg 加在 12% 的十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) - 聚丙烯酰胺凝胶中(浓缩胶缓冲液为 pH 6.8 的 0.5 mmol/L Tris

[收稿日期] 2005-04-29 [修回日期] 2005-07-18

* [基金项目] 辽宁省教育厅资助项目(No. 2004D188)

Tel: 0414-3622366; E-mail: gengxiuj2005@yahoo.com.cn

△ 现在辽宁本溪市中心医院呼吸科

-HCl,分离胶为 pH 8.8 的 0.5 mmol/L Tris - HCl),在 pH 为 8.3 的 25 μmol/L Tris - 192 μmol/L 甘氨酸 - 0.1% SDS 中,120 V,38 mA 条件下电泳 2 h,将分离胶中的蛋白经水浴式电转印(转印缓冲液为 48 mmol/L Tris,20% 甲醇,39 mmol/L 甘氨酸,0.037% SDS)到硝酸纤维膜上(100 mA 条件下,1 h)转印膜在封闭液(10% 脱脂奶粉)中封闭 1 h 后,与兔抗大鼠 p53 多克隆抗体(1:500 稀释)孵育过夜(4℃)。次日,充分冲洗转印膜,将膜放入碱性磷酸酶标记的 II 抗(1:3 000 稀释)中室温孵育 2 h。用含有 0.1% Tween - 20 的 PBS 冲洗 3 次,ECL 显色。GDS8000 凝胶自动成像仪扫描成像,使用 V2.03 分析软件测定条带积分吸光度(A)值。

3 统计学处理

采用 SPSS12.0 统计软件处理。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,

各均数间比较用单因素方差分析,随后采用 LSD 法进行两两比较。

结 果

1 肺组织切片 HE 染色

哮喘组大鼠肺组织切片 HE 染色可见支气管收缩,管腔狭窄,支气管周围炎性细胞浸润,嗜酸性粒细胞增多。激素组大鼠支气管及肺泡区炎症明显较轻。正常组大鼠支气管及肺泡区炎性细胞少见。

2 各组 BALF 中细胞总数和细胞分类情况

哮喘组 BALF 中细胞总数、Eos 均显著高于对照组 ($P < 0.01$) (表 1)。激素组 BALF 细胞总数和 Eos 均较哮喘组下降 ($P < 0.01$)。

表 1 BALF 细胞计数及细胞分类

Tab 1 Total counts and sort of cells in BALF ($\bar{x} \pm s$, $n = 36$)

Group	Total cell number($1 \times 10^7/L$)	AM (%)	L (%)	Eos (%)	N (%)
Control	30.00 ± 1.71	83.88 ± 1.19	3.85 ± 1.09	6.69 ± 0.37	5.59 ± 1.79
DEX	33.33 ± 1.67 [#]	71.77 ± 0.90	9.73 ± 1.02	12.74 ± 0.97 [#]	5.49 ± 2.25
Asthma	47.67 ± 2.50 [*]	69.04 ± 0.77	8.55 ± 0.77	16.25 ± 0.69 [*]	6.18 ± 1.34

* $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs asthma group.

AM; macrophage; Eos; eosinophil; N; neutrophil; L; lymphocyte.

3 BALF 中 Eos 的 p53 表达

各组 Eos 中 p53 蛋白条带位于分子量约 53 kD 处。哮喘组 Eos 中 p53 的 A 值为 10 959 ± 948 明显低于激素组 (18 549 ± 598) 和对照组 (21 060 ± 3 494) ($P < 0.01$),见图 1。

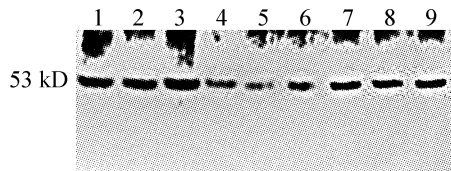


Fig 1 p53 protein expression in eosinophil of BALF. Lane 1, 2, 3: control group; Lane 4, 5, 6: asthma group; Lane 7, 8, 9: DEX group.

图 1 BALF 中 Eos 的 p53 蛋白表达

讨 论

几种炎症细胞长期浸润气道是支气管哮喘的一个突出特征,其中 Eos 数量在哮喘病人气道中是增加的^[1]。本研究结果显示 BALF 中炎性细胞总数和 Eos 数明显高于对照组,也高于激素组,说明 Eos 在气道炎症与哮喘的联系中起着重要作用。

已有研究证实,糖皮质激素治疗后 Eos 凋亡增加,糖皮质激素在体外也可引起 Eos 凋亡,并能阻滞次大剂量 IL - 5 的抑制凋亡作用^[5]。促 Eos 凋亡是哮喘气道炎症缓解及症状减轻的关键机制之一。

p53 是一癌基因,近年研究显示 p53 与细胞凋亡有密切关系。但 p53 与哮喘 Eos 凋亡的研究较少报道。Antonio 等^[2]发现与慢性支气管炎患者支气管活检标本对比,哮喘病人有增长的细胞浸润表达 bcl - 2,大大超过了细胞表达 p53。本研究发现哮喘组 Eos 中 p53 表达弱于激素组,也弱于对照组,表明哮喘 Eos 数量增加、生存延长与此基因表达减少有

关,应用糖皮质激素能明显减少 Eos 数量,增加 p53 的表达,说明糖皮质激素治疗哮喘的作用至少有一部分可能是通过减少 Eos 数量、促进 Eos 凋亡来实现的,糖皮质激素能增加巨噬细胞或支气管上皮细胞识别和吞没凋亡 Eos 的能力^[6];同时推测 p53 基因有一定的促凋亡作用,可能参与了哮喘发病环节。

[参 考 文 献]

[1] Kankaanranta H, Lindsay MA, Giembyeez MA, et al. Delayed eosinophil apoptosis in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 106(7): 77 - 83.

[2] Antonio M, Vignola MD, Chanez P, et al. Asthma, rhinitis, other respiratory diseases. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 1999, 103(4): 563 - 573.

[3] Vignola AM, Chiappara G, Siena L, et al. Proliferation and activation of bronchial epithelial cells in corticosteroid - dependent asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 108(5): 738 - 746.

[4] 王鲁宁,孔灵菲,刘玉琪. 地塞米松对哮喘豚鼠气道壁厚度的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(5): 564 - 565.

[5] Bloom JW, Chacko J, Lohman IC, et al. Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids [J]. Apoptosis, 2004, 9(1): 97 - 104.

[6] Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation. Corticosteroids, eosinophils and bronchial epithelial cells; new insights into the resolution of inflammation in asthma [J]. J Endocrinol, 2003, 178(1): 37 - 43.