

• 基础论著 •

卡介菌核酸多糖注射液对哮喘小鼠气道炎症和肺部抗菌肽表达影响与机制研究

罗光燕 蓝楠 王孝芸 张云 李国平

【摘要】 目的 研究卡介菌核酸多糖注射液(BCG-PSN)对变应原诱导的变态反应性气道炎症和肺部抗菌肽影响。方法 BALB/c小鼠随机分为对照组、哮喘组与卡介菌核酸多糖注射液治疗组;卡介菌核酸多糖注射液组在卡介菌核酸多糖注射液免疫BALB/c小鼠后,用卵清蛋白致敏,并用卵清蛋白滴鼻激发;用整体体积描记系统测定小鼠气道呼气间歇(Penh)值;苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠肺部炎症;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺泡灌洗液(BALF)中白细胞介素4(IL-4)、 γ 干扰素(IFN- γ)浓度;免疫印迹测定肺组织抗菌肽表达。结果 在乙酰胆碱浓度为6、12、24 mg/ml时,卡介菌核酸多糖注射液组与哮喘组相比,卡介菌核酸多糖注射液组能抑制Penh值(P 分别为0.002、0.001和0.001);卡介菌核酸多糖注射液组炎症细胞评分低于哮喘组;卡介菌核酸多糖注射液组BAL液中IL-4浓度低于哮喘组($P=0.006$),卡介菌核酸多糖注射液组BAL液中IFN- γ 的浓度高于哮喘组($P=0.003$);卡介菌核酸多糖注射液组抗菌肽表达与哮喘组相比,其抗菌肽表达明显高于哮喘组($P=0.001$)。结论 卡介菌核酸多糖注射液通过诱导以Th1为主的免疫应答抑制变应原诱导的气道炎症,同时提高肺部抗菌肽表达。

【关键词】 哮喘; 卡介菌核酸多糖注射液; 气道反应性; 抗菌肽

Effect of BCG-PSN on airway inflammation and lung antimicrobial peptide in asthmatic mice model LUO Guang-yan*, LAN Nan, WANG Xiao-yun, ZHANG Yun, LI Guo-ping. *Health Section, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Corresponding author: LI Guo-ping, Email: lzlgp@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of BCG-PSN on airway inflammation and Antimicrobial peptide. **Methods** BALB/c mice were divided into normal control group, asthma mice model and BCG-PSN group. After BCG-PSN immunization in BCG-PSN group, BALB/c mice was sensitized by intraperitoneal injection (i.p) and challenged by intranasal instillation. Enhanced Pause (Penh) index of airway was measured with Buxco whole-body plethysmography (WBP) system. The lung tissues were stained with haematoxylin and eosin (H&E). The levels of the cytokines IL-4 and IFN- γ were determined using ELISA. Antimicrobial peptide was measured with western blot. **Results** In the concentration of acetylcholine for 6, 12, 24 mg/ml, BCG-PSN inhibited Penh compared to asthma mice model ($P=0.002$, $P=0.001$ and $P=0.001$). The inflammation score in BCG-PSN was significantly lower than that in asthma mice model; BCG-PSN inhibited IL-4 in bronchoalveolar lavage fluid (BAL fluid) compared to asthma mice model ($P=0.006$). BCG-PSN increased levels of the IFN- γ in BAL fluid, compared with asthma mice model ($P=0.003$). BCG-PSN increased the expression of cathelin related antimicrobial peptides (CRAMP) compared to asthma mice model. **Conclusion** These results indicate that BCG-PSN inhibited allergen-induced allergic airway inflammation mice model with regulating the immune response towards a Th1-type reaction and increased antimicrobial peptides.

【Key words】 Asthma; BCG-PSN; Airway responsiveness; Antibacterial peptide

支气管哮喘是目前面临的严重健康问题之一。哮

喘是一种慢性的气道炎症疾病,是一种常见病和多发病,并且哮喘发病率逐年上升^[1-2]。哮喘发生与室内变应原暴露密切相关^[3-4]。研究已证实,变应原是儿童与成人哮喘发作主要的危险因素之一^[5]。许多研究表明卡介菌核酸多糖注射液诱导Th1为主的免疫应答,能有效调节抗原特异性IgE反应,是治疗变态反应性疾病的

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.055

作者单位: 646000 四川省, 泸州医学院卫生科(罗光燕); 泸州医学院附属医院呼吸1科(蓝楠), 炎症与变态反应实验室(王孝芸、张云、李国平)

通讯作者: 李国平, Email: lzlgp@163.com

新方法^[6]。卡介菌核酸多糖注射液能减少过敏性鼻炎患者症状,同时减少轻度到中度支气管哮喘患者H1受体抑制剂和吸入激素治疗剂量^[7]。在前期研究中,我们研究发现吸入糖皮质激素抑制哮喘小鼠气道抗菌肽表达,增加细菌感染机会^[8],因此临床运用存在一定局限性。

卡介菌核酸多糖注射液对哮喘小鼠肺部抗菌肽影响,目前未见相关报道。我们通过建立哮喘小鼠模型,研究卡介菌核酸多糖注射液对小鼠气道反应性和变应原诱导的变态反应性气道炎症作用进行研究,并就其对抗菌肽影响进行探讨。

材料与方 法

一、材料

卡介菌核酸多糖注射液(长沙九芝堂), Balb/c小鼠清洁级(四川大学实验动物中心), 整体体积描记系统(美国的Buxco公司)。

二、免疫

Balb/c小鼠24只, 6~8周龄, 将动物按随机数字表法分为对照组、治疗组和哮喘组, 每组8只。对照组: 采用生理盐水进行注射; 治疗组: 用卡介菌核酸多糖注射液免疫治疗; 哮喘组: 采用生理盐水代替卡介菌核酸多糖注射液免疫。按照分组分别注射生理盐水0.03 ml、卡介菌核酸多糖注射液0.03 ml(10.5 μg)、生理盐水0.03 ml, 小鼠连续免疫2周, 每次间隔1 d。

在14 d和21 d, 治疗组和哮喘组小鼠用10 μg卵清蛋白加4 mg氢氧化铝凝胶腹腔注射致敏, 对照组用生理盐水代替抗原进行注射; 治疗组和哮喘组小鼠用10 μg卵清蛋白经鼻滴入激发, 每天一次, 连续7次, 对照组用生理盐水代替抗原进行鼻滴, 最后1 d激发后进行以下检查。

三、小鼠气道反应性测定

用整体体积描记系统测定气道反应性, 对照组、治疗组和哮喘组在激发后, 用美国的Buxco公司的小鼠肺功能仪检测其气道反应性。分别用1.5、3、6、12、24 mg/ml的乙酰胆碱雾化吸入激发, 测定相应浓度下气道呼气间歇(Penh)值。

四、支气管肺泡灌洗

暴露小鼠气道后, 进行气管切开和气管插管, 注入冰冷磷酸盐缓冲液(PBS)500 μl进行支气管肺泡灌洗液(BALF), 反复抽吸2次, 然后回收BALF, 并记录回吸收量; BALF经500×g, 室温下, 离心5 min后, 上清液用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定IL-4和IFN-γ细胞因子浓度, 细胞沉淀涂片后, 用HE染色, 在莱卡4000 M光学显微镜(德国莱卡)下观察细胞。

五、组织学检查

在最后一次变应原激发24 h后, 分离肺组织, 用10%中性甲醛灌注固定, 石蜡包埋, 常规切片, 进行HE染色, 在莱卡4000 M光学显微镜下观察肺组织炎症细胞浸润。根据血管周围和气道周围单核细胞浸润情况不同分为0~3分, 参照文献对肺组织炎症细胞浸润评分^[8]。

六、免疫印迹

肺组织在RIPA裂解液中匀浆, 通过蛋白定量试剂盒(碧云天, 中国)定量蛋白浓度。20 μg蛋白上样至15%聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE), 在100 V下电泳90 min后; 凝胶在15 V电压下, 用半干转膜仪(Amersham Ecl Semi-Dry Transfer Unit)转膜20 min, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 一抗为兔多克隆抗菌肽(CRAMP)抗体(1:500)(Abcam, 美国), 二抗为那根过氧化酶标记的羊抗兔(HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody)(1:1000), 通过增强型化学发光底物(碧云天, 中国)进行检测。

七、统计学处理

各组数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用SPSS 10.0进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 者为差异具有显著性。

结 果

一、小鼠气道反应性变化

图1显示: 用整体体积描记系统检测小鼠的气道反应性, 乙酰胆碱浓度为1.5、3、6、12、24 mg/ml时, 哮喘组Penh上升的百分比较对照组和治疗组明显升高; 治疗组, 乙酰胆碱浓度为6、12、24 mg/ml时与哮喘组相比Penh有明显下降, 两组比较差异有统计学意义(P 分别为0.002、0.001和0.001)。

二、卡介菌核酸多糖注射液对变应原诱导的气道炎症的抑制作用

变应原激发后24 h, 通过肺组织学检测, 观察卡介菌核酸多糖注射液对变应原诱导的气道炎症的作用。图2显示: 气道、肺泡和血管周围的炎症细胞浸润情况, 对照组气道无炎症细胞浸润, 哮喘组在气道、肺泡和血管周围存在大量的炎症细胞浸润, 治疗组与哮喘组相比, 卡介菌核酸多糖注射液能抑制气道、肺泡和血管周围的炎症细胞浸润; 治疗组气道周围, 血管周围炎症评分和成片的炎症细胞评分与哮喘组相比, P 分别为0.01、0.001和0.002(表1)。以上结果表明卡介菌核酸多糖注射液能有效抑制变应原诱导的气道炎症。

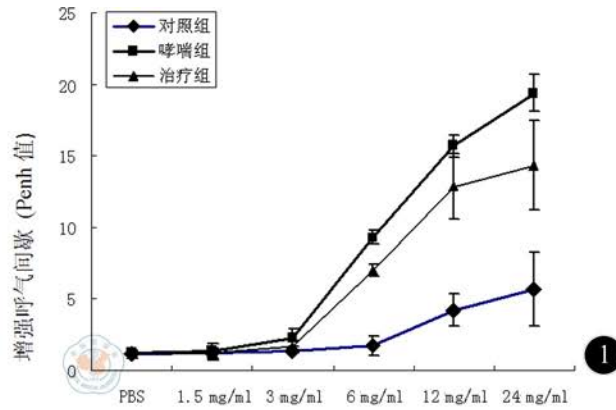


图1 小鼠气道反应性变化

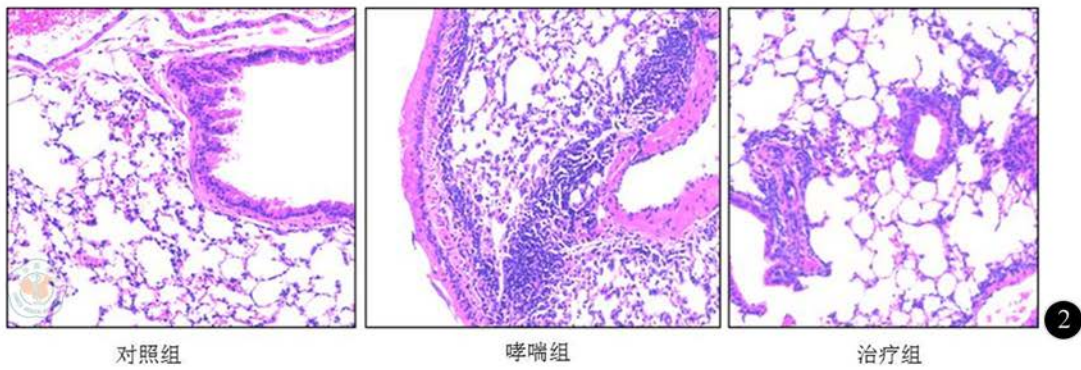


图2 卡介菌核酸多糖注射液能有效抑制变应原诱导的气道炎症 (HE ×100)

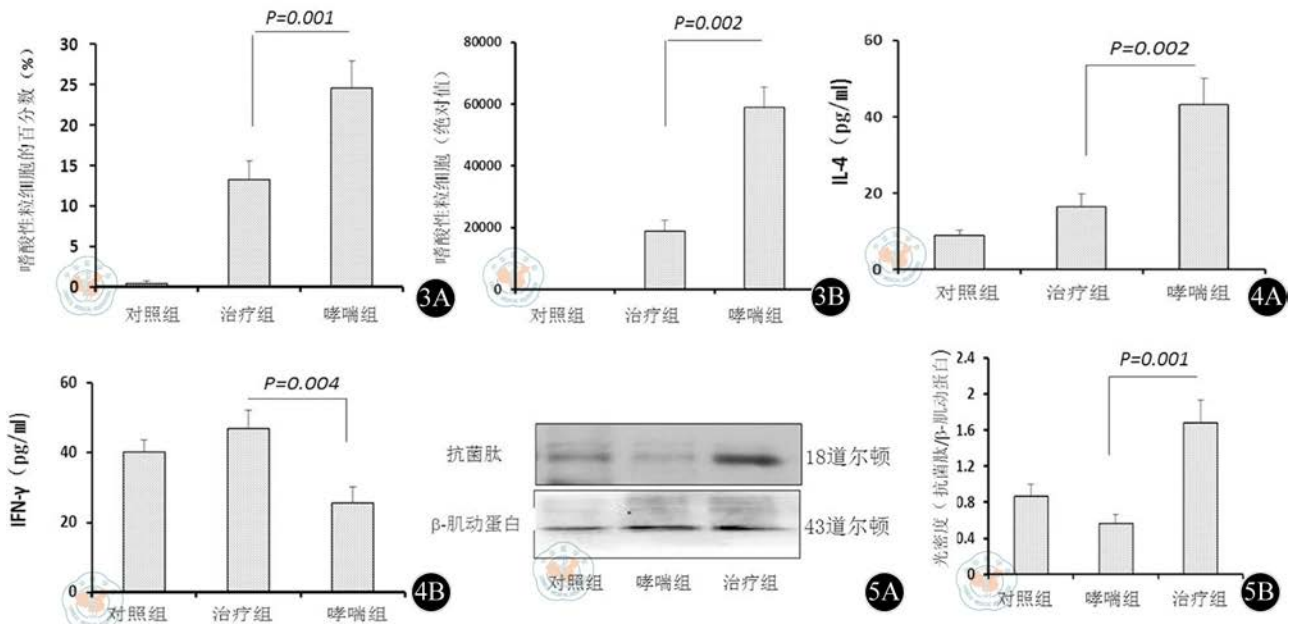


图3 卡介菌核酸多糖注射液对嗜酸性粒细胞浸润的抑制作用。3A: BALF中嗜酸粒细胞的百分数; 3B: BALF中嗜酸粒细胞的绝对计数 图4 BALF中IFN-γ和IL-4的ELISA法测定 图5 卡介菌核酸多糖注射液对哮喘小鼠肺组织抗菌肽表达影响。β-肌动蛋白作为免疫印迹内参照

表1 免疫治疗后肺组织炎症细胞浸润 (x̄ ± s)

组别	气道周围	血管周围	成片的炎症细胞
治疗组	1.46 ± 0.96 ^a	1.31 ± 0.56 ^b	1.41 ± 0.63 ^c
哮喘组	2.76 ± 1.26	2.42 ± 0.86	2.23 ± 1.14

注: 与哮喘组相比, ^aP=0.01, ^bP=0.001, ^cP=0.002

三、卡介菌核酸多糖注射液对 BALF 中嗜酸性粒细胞的抑制作用

通过分析 BALF 中嗜酸性粒细胞的数量, 进一步观察卡介菌核酸多糖注射液对气道炎症的作用。图 3 显

示, 治疗组与哮喘组相比, 卡介菌核酸多糖注射液能抑制 BALF 中嗜酸粒细胞的百分数和嗜酸粒细胞的绝对计数, P 分别为 0.001 和 0.002。

四、卡介菌核酸多糖注射液对支气管肺泡灌液中 IL-4 和 IFN- γ 的影响

我们通过 IL-4 和 IFN- γ 分析卡介菌核酸多糖对人类辅助性 T 细胞 (Th) 亚群 Th1 和 Th2 免疫影响。图 4 显示: 卡介菌核酸多糖注射液与对照组和哮喘组相比, 卡介菌核酸多糖注射液能有效抑制 BAL 液中 Th2 细胞分泌 IL-4 ($P=0.002$), 同时卡介菌核酸多糖注射液能诱导 Th1 细胞分泌的细胞因子 IFN- γ 增加 ($P=0.004$)。

五、卡介菌核酸多糖注射液对肺组织抗菌肽表达影响

通过免疫印迹分析肺组织抗菌肽表达, 进一步观察卡介菌核酸多糖注射液对抗菌肽表达作用。图 5 显示, 正常小鼠肺组织存在抗菌肽 (CRAMP) 表达, 过敏原诱导哮喘小鼠模型肺组织抗菌肽表达与正常组相比表达下降, 但卡介菌核酸多糖注射液治疗组与哮喘组相比, 抗菌肽表达增加; 通过半定量分析显示: 卡介菌核酸多糖注射液抗菌肽表达明显高于哮喘组 ($P=0.001$)。

讨 论

过敏性哮喘是一种气道慢性炎症疾病, 目前的药物治疗并不能改变其自然病程。现已经研究证明, 免疫治疗能改变变态反应疾病和哮喘异常的免疫应答反应^[9-10]。然而, 由于特异性免疫治疗的不良反应已经限制其广泛使用, 这种不良反应发生与变应原疫苗本身存在的缺陷和变应原粗提物诱导的血清中高 IgE 抗体产生有关^[11-12]。

随着变态反应疾病和哮喘细胞与分子免疫学机制的研究进展, 出现了许多新的治疗策略。其中以卡介菌多糖核酸具有明显抗炎和抗过敏作用^[7]。在我们实验中发现, 使用整体体积描记系统检测小鼠的气道反应性, 乙酰胆碱浓度为 1.5、3、6、12、24 mg/ml 时, 哮喘组 Penh 上升的百分比较对照组和治疗组明显升高; 治疗组乙酰胆碱浓度为 6、12、24 mg/ml 时与哮喘组相比有明显下降, 表明卡介菌多糖核酸能有效降低变应原诱导的气道反应。

在变应原诱导的过敏反应应答过程中, 变应原能明显活化 CD4⁺ T 细胞, 诱导 IgE 抗体生成, 过敏反应应答与气道炎症和气管痉挛密切相关^[13]。我们研究发现变应原诱导肺部变态反应气道炎症动物模型主要表现为气道、肺泡和血管周围出现大量的炎症细胞浸润, 卡介菌多糖核酸能抑制炎症细胞浸润。我们研究

结果进一步证实, 卡介菌多糖核酸能有效诱导以 Th1 为主的免疫应答, 这种免疫应答反应能有效抑制变应原诱导的气道炎症。小鼠变态反应动物实验已证明, 小鼠存在明显的 Th2 免疫应答, IFN- γ 在小鼠 B 淋巴细胞合成 IgG2a 抗体过程中起着关键作用, IFN- γ 能有效抑制 IL-4 诱导的 IgE 抗体产生。在我们研究中, 我们分析了卡介菌多糖核酸对变应原诱导肺部变态反应气道炎症动物模型免疫应答的影响, 结果发现变应原诱导的肺部变态反应气道炎症动物模型, 主要表现为 IL-4 细胞因子增加, 卡介菌多糖核酸免疫能有效抑制 IL-4 细胞因子, 增加 IFN- γ 。结果表明, 卡介菌多糖核酸免疫能有效诱导以 Th1 为主的免疫应答。

研究表明过敏性鼻炎患者上皮细胞人防御素 $\beta 2$ 表达下降, 其机制与 Th2 细胞水平增加有关^[14]。在我们目前研究表明过敏原诱导哮喘小鼠模型肺组织抗菌肽表达与正常组相比表达下降, 卡介菌核酸多糖注射液治疗能增加抗菌肽表达增加, 其机制可能与卡介菌多糖核酸免疫能有效抑制 IL-4 细胞因子, 诱导 IFN- γ 有关。

总之, 卡介菌多糖核酸能诱导 Th1 免疫应答, 这种免疫性保护应答能有效抑制变应原诱导的肺部变态反应性炎症, 具有抑制小鼠气道反应性与气道炎症作用, 同时增加肺部抗菌肽表达。

参 考 文 献

- [1] Kanceljak-Macan B. Current views on allergic diseases. Arh Hig Rada Toksikol, 2004, 55: 123-134.
- [2] Vargas MH, Diaz-Mejia GS, Furuya ME, et al. Trends of asthma in Mexico: an 11-year analysis in a nationwide institution. Chest, 2004, 125: 1993-1997.
- [3] Milian E, Diaz AM. Allergy to house dust mites and asthma. P R Health Sci J, 2004, 23: 47-57.
- [4] Cole Johnson C, Ownby DR, Havstad SL, et al. Family history, dust mite exposure in early childhood, and risk for pediatric atopy and asthma. J Allergy Clin Immunol, 2004, 114: 105-110.
- [5] Trombone AP, Tobias KR, Ferriani VP, et al. Use of a chimeric ELISA to investigate immunoglobulin E antibody responses to Der p 1 and Der p 2 in mite-allergic patients with asthma, wheezing and/or rhinitis. Clin Exp Allergy, 2002, 32: 1323-1328.
- [6] 刘桂珍, 姜志平, 吴晋湘, 等. 卡介菌多糖核酸的抗炎和抗过敏作用中国药理学通报, 2004, 10: 1177-1181
- [7] Li J, Luo DF, Li SY, et al. Efficacy of intramuscular BCG polysaccharide nucleotide on mild to moderate bronchial asthma accompanied with allergic rhinitis: a randomized, double blind, placebo-controlled study. Chin Med J (Engl), 2005, 118: 1595-1603.
- [8] Wang P, Wang X, Yang X, et al. Budesonide suppresses pulmonary antibacterial host defense by down-regulating cathelicidin-related antimicrobial peptide in allergic inflammation mice and in lung epithelial cells. BMC Immunol, 2013, 14: 7.
- [9] Kwon SS, Kim N, Yoo TJ. The effect of vaccination with DNA encoding murine T-cell epitopes on the Der p 1 and 2 induced immunoglobulin E synthesis. Allergy, 2001, 56: 741-748.

- [10] Campbell D, DeKruyff RH, Umetsu DT. Allergen immunotherapy: novel approaches in the management of allergic diseases and asthma. Clin Immunol, 2000, 97: 193-202.
- [11] Martín Muñoz MF. Efficacy of immunotherapy in the treatment of asthma. Allergol Immunopathol (Madr), 2004, 32: 133-141.
- [12] Reyes Moreno A, Castrejon Vazquez MI, Miranda Feria AJ. Failure of allergen-based immunotherapy in adults with allergic asthma. Rev Alerg Mex, 2003, 50: 8-12.
- [13] Martin JG, Suzuki M, Ramos-Barbon D, et al. T cell cytokines: animal models. Paediatr Respir Rev, 2004, 5 Suppl A: S47-51.
- [14] Choi IJ, Rhee CS, Lee CH, et al. Effect of allergic rhinitis on the expression of human β -defensin 2 in tonsils. Ann Allergy Asthma Immunol, 2013, 110: 178-183.

(收稿日期: 2013-09-10)

(本文编辑: 戚红丹)

罗光燕, 蓝楠, 王孝芸, 等. 卡介菌核酸多糖注射液对哮喘小鼠气道炎症和肺部抗菌肽表达影响与机制研究 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (21): 9633-9637.



中华医学会