

# 哮喘大鼠肺组织 Toll 样受体 3 和 9 的表达及布地奈德的影响

方丽<sup>1</sup>, 陈培英<sup>1</sup>, 童夏生<sup>2a</sup>, 陈琪<sup>3a</sup>, 范广民<sup>3b</sup>, 王恩智<sup>2b</sup> (1.诸暨市人民医院儿科, 浙江 绍兴 311800; 2.台州市中西医结合医院, a.儿科, b.检验科, 浙江 台州 317000; 3.台州中心医院, a.检验科, b.病理科, 浙江 台州 317000)

**摘要:** 目的 观察哮喘大鼠肺组织中 Toll 样受体 3(TLR3)和 TLR9 的表达及对布地奈德的影响, 探讨 TLRs 在哮喘炎症机制中的作用。方法 建立大鼠哮喘模型, 随机分成哮喘组、对照组和布地奈德组, 免疫组织化学法检测肺组织 TLR3 和

---

基金项目: 温岭市科技局基金资助项目(2009-2-55)

作者简介: 方丽, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: (0576)86853180 E-mail: xshtzg37@163.com \*通信作者: 童夏生, 男, 硕士, 主任医师 Tel: (0576)86853180 E-mail: xshtzg37@163.com

TLR9 的表达。结果 哮喘组(OD 值: 0.201±0.034)和布地奈德组(OD 值: 0.195±0.043)肺组织 TLR3 的光密度值显著高于对照组(OD 值: 0.144±0.039)( $P<0.05$ ), 布地奈德组与哮喘组差异无统计学意义。哮喘组(OD 值: 0.236±0.022)和布地奈德组(OD 值: 0.231±0.023)肺组织 TLR9 的光密度值均显著低于对照组(OD 值: 0.271±0.025)( $P<0.05$ ); 布地奈德组与哮喘组差异无统计学意义; 肺组织 TLR3 和 TLR9 蛋白的表达水平无显著相关性( $n=26, r=-0.153$ )。结论 哮喘大鼠肺组织 TLR3 蛋白表达升高, TLR9 蛋白的表达则反之, TLRs 的表达过度或不足可能是哮喘气道炎症的重要原因之一。布地奈德的抗炎作用可能主要不是通过 TLR3 和 TLR9 的途径实现。

关键词: 哮喘; Toll 样受体; 糖皮质激素; 免疫组织化学

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2014)07-0805-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.008

## Effect of Budesonide on Expression of Toll Like Receptor 3 and 9 in Rat Asthma Model

FANG Li<sup>1</sup>, CHEN Peiying<sup>1</sup>, TONG Xiasheng<sup>2a</sup>, CHEN Qi<sup>3a</sup>, FAN Guangmin<sup>3b</sup>, WANG Enzhi<sup>2b</sup>(1.Department of Pediatrics, People's Hospital of Zhuji, Shaoxing 311800, China; 2.Taizhou Integrated Traditional and Western Medicine Hospital, a.Department of Pediatrics, b.Department of Clinical Laboratory, Taizhou 317000, China; 3.Taizhou Central Hospital, a.Department of Clinical Laboratory, b.Department of Pathology, Taizhou 318000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the potential roles of Toll like receptor(TLR) in pathogenesis of asthma inflammation, and the expression of TLR 3 and 9 in rat asthma model. **METHODS** The rats were randomly and averagely divided into asthma, control and budesonide-treated group. Expressions of TLR3 and TLR9 protein were detected by immunohistochemical method. **RESULTS** Expressions of TLR3 protein in lung tissue in asthma group(optical density: 0.201±0.034) and in budesonide-treated group(optical density: 0.195±0.043) were significantly higher than that in control group(optical density: 0.144±0.039)(all  $P<0.05$ ). While there was no significant difference of TLR3 protein expression between budesonide-treated and asthma group. Dramatically, expressions of TLR9 protein in lung tissue in asthma group(0.236±0.022 optical density) and budesonide-treated group(optical density: 0.231±0.023) were significantly lower than that in control group(optical density: 0.271±0.025)(all  $P<0.05$ ). Moreover, there was no significant difference of TLR9 protein expression between in budesonide-treated and asthma group. Furthermore, there was no significant correlation between levels of TLR3 and TLR9 in lung tissue( $n=26, r=-0.153, P>0.05$ ). **CONCLUSION** Level of TLR3 increased in asthmatic asthma lung tissue group. On the other hand, level of TLR9 decreased. TLRs may act as an important role in asthma exacerbation, and the anti-inflammation function of TLRs may not mainly work through TLR3 and TLR9 path way.

**KEY WORDS:** asthma; Toll like receptor; glucocorticoid; immunohistochemistry

“卫生假说”认为,哮喘的发病机制与 Th1/Th2 失衡有关,如果年幼时期机体暴露于病原体的机会减少,那么他们没有足够的刺激来激活 Th1 反应, Th1/Th2 平衡则倾向于 Th2 反应,哮喘的发病率就会升高<sup>[1]</sup>。Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)是最重要的模式识别受体,与 Th1/ Th2 失衡关系密切,在哮喘的发病机制中起着非常重要的作用<sup>[2]</sup>。但是不同亚型的 TLR 所起的作用不尽相同,有些具有促炎作用,有些则反之<sup>[3]</sup>,其机制至今尚未完全阐明。最近研究发现,TLR3 单核苷酸多态性与哮喘相关,rs3775291(G/A)SNPs 与过敏性哮喘易感性独立相关,并与哮喘夜间发作相关,但与哮喘患者的外周血嗜酸性粒细胞、血浆总 IgE、哮喘严重程度分级无相关性<sup>[4]</sup>; TLR3 基因多态性还与婴幼儿毛细支气管炎及以后的喘息发作有关<sup>[5]</sup>。研究还发现 TLR9 基因多态性也与哮喘相关<sup>[6]</sup>。而

TLR3 和 TLR9 在哮喘肺组织中的表达水平如何,国内报道甚少,本研究通过建立大鼠哮喘模型,观察布地奈德对肺组织 TLR3 和 TLR9 表达的影响,探讨 TLRs 在哮喘炎症机制中的作用,为哮喘的防治提供理论参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂

兔抗大鼠 TLR3 和 9 抗体均购自美国 Imgenex 公司, V 级鸡卵白蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司。

#### 1.2 动物及分组

27 只清洁级健康 SD 大鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司),许可证号: SCXK(沪)2007-0005, 4~5 周龄, ♂, 体质量(121±7)g, 在杭州师范大学实验动物中心清洁级环境中饲养,自由进食、水。随机分成哮喘组、对照组、布地奈德组,每组 9 只。

### 1.3 动物模型复制

哮喘组第1天和第8天腹腔注射 OVA/Al(OH)<sub>3</sub> 混合液(含 OVA 1 mg 和 Al(OH)<sub>3</sub> 100 mg)2 mL 致敏, 各1次。第15天开始每天向大鼠喷雾(PARI BOY-037G6000GERMANY 空气压缩雾化器)1% OVA 30 min, 连续激发7 d。对照组致敏和激发均以生理盐水替代 OVA 和 Al(OH)<sub>3</sub>, 布地奈德组致敏和激发方法同哮喘组, 不同的是在每次激发前0.5 h 给予雾化布地奈德溶液 1 mg·组<sup>-1</sup>(阿斯利康公司, 批号: 309973)。

### 1.4 肺组织 TLR 3 和 9 的检测

末次激发 24 h 后, 水合氯醛腹腔注射麻醉, 心脏抽血致死。取右肺内侧带肺组织, 4%多聚甲醛-PBS 溶液固定, 常规石蜡包埋、切片, 采用免疫组化 SP 法测定 TLR 3 和 9 的表达<sup>[7]</sup>。每张切片随机选择 5 个细支气管, Image-pro Plus 5.1 免疫组

化图像分析系统对阳性细胞进行灰度扫描, 取其平均值代表该片的光密度值(OD 值)。

### 1.5 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS16.0 统计软件, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差齐性者采用 LSD 法, 方差不齐者采用 Tamhane's T2 检验, 两因素的相关分析采用直线相关分析法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 布地奈德对大鼠哮喘的影响

OVA 激发后大鼠表现为烦躁不安、搔痒、喘鸣、气促、腹肌抽搐等症状。哮喘组肺组织见支气管、肺间质及血管周围炎性细胞浸润, 支气管黏膜水肿、黏液腺增生、黏液栓形成及部分黏膜上皮细胞脱落; 布地奈德组较哮喘组明显减轻; 对照组肺组织结构完整, 仅见少量炎症细胞。结果见图 1。

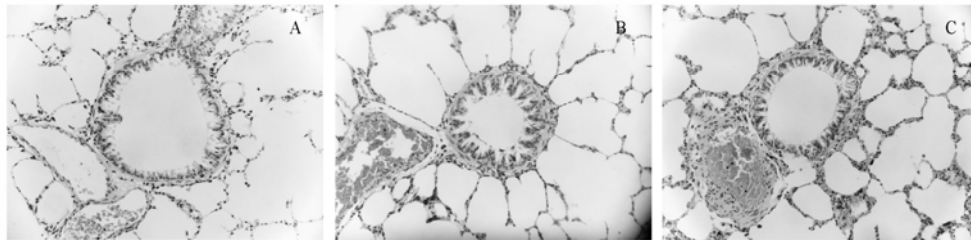


图 1 肺组织病理变化(HE, 200×)

A-对照组; B-哮喘组; C-布地奈德组

Fig. 1 Pathological change in lung tissue(HE, 200×)

A-control group; B-asthma group; C-budesonide group

### 2.2 肺组织 TLR3 的表达

阳性细胞胞浆呈棕黄色表达, 结构清晰, 着色明显高于背景。阳性细胞主要为支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞及淋巴细胞。哮喘组和布地奈

德组肺组织 TLR3 的光密度值均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 布地奈德组与哮喘组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见表 1 和图 2。

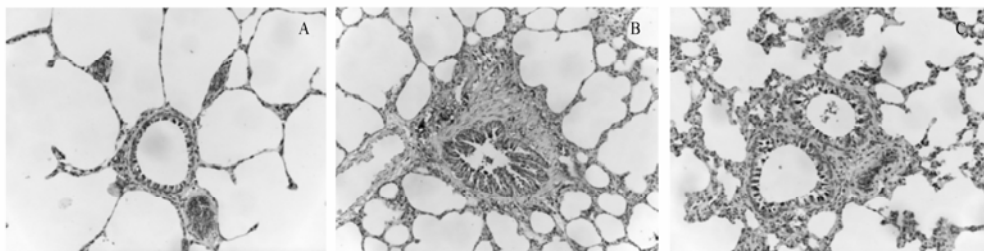


图 2 大鼠肺组织 TLR3 蛋白表达(DAB 显色, 200×)

A-对照组; B-哮喘组; C-布地奈德组

Fig. 2 The expression of TLR3 protein in rat lung tissue(DAB staining, 200×)

A-control group; B-asthma group; C-budesonide group

### 2.3 肺组织 TLR9 的表达

阳性细胞主要为支气管上皮细胞和肺泡上皮细胞。哮喘组和布地奈德组肺组织 TLR9 的光密

度值均显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ); 布地奈德组与哮喘组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见图 3 和表 1。

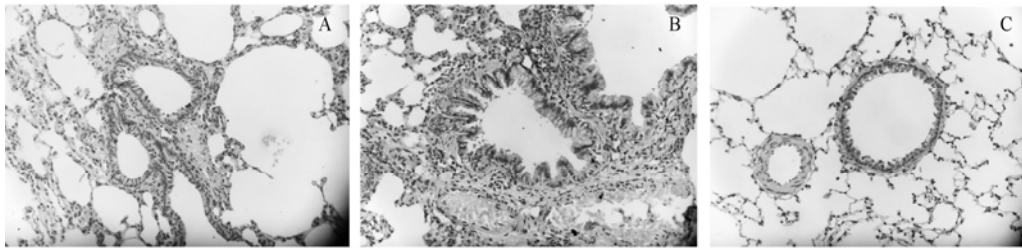


图3 大鼠肺组织 TLR9 蛋白表达(DAB 显色, 200×)

A-对照组; B-哮喘组; C-布地奈德组

Fig. 3 The expression of TLR9 protein in rat lung tissue(DAB staining, 200×)

A-control group; B-asthma group; C-budesonide group

表 1 肺组织 TLR3 和 TLR9 蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The expressions of TLR3 and TLR9 protein in rat lung tissue( $\bar{x} \pm s$ )

组别	大鼠只数	TLR3 的 OD 值	TLR9 的 OD 值
对照组	9	0.144±0.039	0.271±0.025
哮喘组	9	0.201±0.034 <sup>1)</sup>	0.236±0.022 <sup>1)</sup>
布地奈德组	8	0.196±0.033 <sup>1)</sup>	0.231±0.023 <sup>1)</sup>

注: 布地奈德组死亡 1 只; 与对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.05$

Note: One of budesonide group died; compared with control group, <sup>1)</sup> $P < 0.05$

## 2.4 相关性分析

肺组织 TLR3 和 TLR9 蛋白的表达水平无显著相关性( $n=26$ ,  $r=-0.153$ ,  $P>0.05$ )。

## 3 讨论

哮喘是一种气道慢性炎症性疾病, 其发病机制十分复杂。目前认为哮喘患者存在 Th1/Th2 失衡, Th1 炎症因子的表达不足和 Th2 炎症因子的表达增强是哮喘炎症机制的重要原因之一<sup>[8]</sup>。TLRs 属于一种 I 型跨膜膜式识别受体, 能将细胞外信号传递到细胞内, 参与天然免疫反应和适应性免疫反应, 在感染、哮喘及肿瘤等疾病的发生和发展中起着重要的作用, 还与哮喘的 Th1/Th2 失衡有关<sup>[9]</sup>。不同亚型的 TLRs 在哮喘中所起的作用不同, 在屋尘螨致敏的小鼠模型中发现, TLR4 在支气管上皮细胞和肺泡巨噬细胞上表达增加, 认为它具有促炎的作用<sup>[10]</sup>。在 TLR7 基因敲除的小鼠哮喘模型中发现, 气道上皮细胞的病毒载量增加, 认为年幼时期 TLR7 的低表达与儿童期病毒诱发的哮喘有关<sup>[11]</sup>。

本研究发现, 哮喘组肺组织 TLR3 的表达水平显著增高, 提示 TLR3 可能具有促炎的作用。TLR3 在支气管上皮细胞、肺泡上皮细胞、淋巴细胞中均有表达, 提示它可能通过这些细胞起作用。在培养后的支气管上皮细胞上, 能表达 TLR2、TLR3、

TLR4 和 TLR7; 并在给予相应的激动剂后, 炎症因子 IL-6、IL-8 和集落刺激因子等分泌增加, 认为它们具有致炎的作用, 阻断它们的表达可能是治疗哮喘的有效方法<sup>[12]</sup>。本研究还发现, 哮喘组肺组织 TLR9 的表达水平显著下降, 它可能起着抑炎的作用, 推测 TLR9 的表达不足与哮喘的气道炎症有关。在急性发作期的哮喘儿童外周血 Treg 淋巴细胞中发现, TLR1/2、4 和 7/8 的表达升高, 而 TLR9 则呈低表达, 提示 TLR9 与 TLR1/2、4 和 7/8 功能不同, 起着相反的作用<sup>[13]</sup>。其作用机制可通过增强 Th1 和减少 Th2 反应<sup>[14]</sup>, 还能抑制树突状细胞向肺组织迁徙<sup>[15]</sup>。它的激动剂(CpG DNA)具有能够减轻哮喘气道炎症的作用<sup>[16]</sup>, 其机制存在 TLR9 依赖和非 TLR9 依赖途径<sup>[17]</sup>。相关分析发现, 肺组织 TLR3 和 TLR9 蛋白的表达水平无显著相关, 表明两者在肺组织中的表达水平没有密切的内在关系。糖皮质激素是目前治疗哮喘的首选药物, 它通过“经典途径”和“非经典途径”起作用, 但其机制尚未完全阐明。本研究采用布地奈德进行干预, 发现它不能影响 TLR3 和 TLR9 的表达, 推测布地奈德的抗炎作用不是主要通过 TLR3 和 TLR9 的途径。提示对那些接受布地奈德雾化吸入疗效欠佳的哮喘患者, 不能只考虑增加布地奈德的剂量, 应考虑加用其他类别的药物。以 TLR3 或 TLR9 为调节靶点的药物可能成为治疗哮喘新的研究方向之一。

据上结果所述, 哮喘大鼠肺组织 TLR3 蛋白的表达升高, TLR9 蛋白的表达则反之, TLRs 的表达过度或不足可能是哮喘气道炎症的重要原因之一。布地奈德的抗炎作用可能主要不是通过 TLR3 和 TLR9 的途径实现。

致谢: 感谢杭州师范大学实验动物中心亢晓冬老师给予指导和帮助。

## REFERENCES

- [1] STRACHAN D P. Family size, infection and atopy: the first decade of the hygiene hypothesis [J]. *Thorax*, 2000, 55(Suppl 1): S2-S10.
- [2] KLAASSEN E M, THÖNISSEN B E, VAN EYS G, et al. A systematic review of CD14 and Toll-like receptors in relation to asthma in caucasian children [J]. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 2013, 9(1): 10.
- [3] ZHANG Q, YIN K S. Relation between Toll like receptor, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell and bronchial asthma [J]. *Inter J Respir(国际呼吸杂志)*, 2007, 27(11): 843-846.
- [4] YUAN X, ZHANG Q, WEI G Z, et al. Association between polymorphisms of Toll-like receptor 3 and asthma in a southeastern Chinese Han Population [J]. *Acta Univ Med Nanjing(Nat Sci)(南京医科大学学报 自然科学版)*, 2009, 29(9): 1242-1246.
- [5] NUOLIVIRTA K, HE Q, VUONONVIRTA J, et al. Toll-like receptor 3 L412F polymorphisms in infants with bronchiolitis and postbronchiolitis wheezing [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31(9): 920-923.
- [6] QIAN X B, WU Y, CAO S Y, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the TLR9 gene with childhood atopic asthma [J]. *Chin J Med Genet(中华医学遗传学杂志)*, 2011, 28(2): 185-189.
- [7] JIANG D F, TONG X S, LUO D J, et al. Regulation with methylprednisolone on the expression of Toll like receptor 1, FasL, and tumor necrosis factor receptor associated factor 2 in asthmatic rats [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志)*, 2012, 22(6): 424-428.
- [8] SCANLON S T, MCKENZIE A N. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(6): 707-712.
- [9] DUECHS M J, HAHN C, BENEDIKTUS E, et al. TLR agonist mediated suppression of allergic responses is associated with increased innate inflammation in the airways [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 24(2): 203-214.
- [10] HONGJIA L, QINGLING G, MEIYING L, et al. House dust mite regulate the lung inflammation of asthmatic mice through TLR4 pathway in airway epithelial cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2010, 28(7): 597-603.
- [11] KAIKO G E, LOH Z, SPANN K, et al. Toll-like receptor 7 gene deficiency and early-life pneumovirus infection interact to predispose toward the development of asthma-like pathology in mice [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(5): 1331-1339.
- [12] MÅNSSON KVARNHAMMAR A, TENGROTH L, ADNER M, et al. Innate immune receptors in human airway smooth muscle cells: activation by TLR1/2, TLR3, TLR4, TLR7 and NOD1 Agonists [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68701.
- [13] LEE W I, YAO T C, YEH K W, et al. Stronger Toll-like receptor 1/2, 4, and 7/8 but less 9 responses in peripheral blood mononuclear cells in non-infectious exacerbated asthmatic children [J]. *Immunobiology*, 2013, 218(2): 192-200.
- [14] CHEN K, XIANG Y, YAO X, et al. The active contribution of Toll-like receptors to allergic airway inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(10): 1391-1398.
- [15] MO J H, CHUNG Y J, HAYASHI T, et al. The role of plasmacytoid and myeloid dendritic cells in induction of asthma in a mouse model and the effect of a TLR9 agonist on dendritic cells [J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2011, 3(3): 199-204.
- [16] BEEH K M, KANNIESS F, WAGNER F, et al. The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(3): 866-874.
- [17] RAMAPRAKASH H, HOGABOAM C M. Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and -independent manner [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2010, 152(2): 98-112.

收稿日期: 2013-08-19