

布地奈德抑制哮喘小鼠肺组织 OX40、气道炎症和气道高反应性的研究

李红岩, 王文璐, 汪凤凤, 苗伟伟, 刘洪决, 黄 茂, 殷凯生, 周林福*

(南京医科大学第一附属医院呼吸内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究布地奈德对哮喘模型小鼠肺组织 OX40(CD134)表达、气道炎症和气道高反应性的干预作用。方法: 18 只 SPF 级 BALB/c 小鼠随机分为正常组、哮喘组、布地奈德组。卵蛋白(ovalbumin, OVA)致敏和激发建立哮喘模型。末次激发 24 h 后, 测定气道反应性, HE 染色观察炎症细胞浸润, ELISA 法分别检测血清总 IgE、OVA 特异性 IgE(OVA-sIgE)以及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中的 IL-4 和 IL-13。Western blot 检测肺组织 OX40 蛋白表达。结果: 随着氯化乙酰胆碱(ACh)浓度的增加, 哮喘组小鼠气道阻力明显增加, 正常组仅轻度增加, 布地奈德组小鼠气道阻力的增加程度低于哮喘组小鼠($P < 0.05$); 在 BALF 中炎症细胞总数和嗜酸性粒细胞分类计数方面, 哮喘组小鼠高于正常组小鼠($P < 0.05$), 布地奈德组小鼠与哮喘组小鼠相比明显降低($P < 0.05$); 在 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE、OVA-sIgE 方面, 哮喘组高于正常组($P < 0.05$), 布地奈德组低于哮喘组小鼠($P < 0.05$); 哮喘组小鼠肺组织 OX40 高于正常组($P < 0.05$), 布地奈德组与哮喘组相比小鼠肺组织 OX40 降低($P < 0.05$)。结论: 布地奈德可抑制哮喘模型小鼠气道炎症和气道高反应性, 可能与抑制 OX40/OX40L 协同刺激通路有关。

[关键词] 哮喘; OX40/OX40L; 协同刺激通路; 布地奈德

[中图分类号] R562.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-768-05

Inhibitory effects of budesonide on pulmonary OX40 expression, airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in asthmatic mice

LI Hong-yan, WANG Wen-lu, WANG Feng-feng, MIAO Wei-wei, LIU Hong-yang, HUANG Mao, YIN Kai-sheng, ZHOU Lin-fu*

(Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects of budesonide on the expression of OX40 (CD134), airway inflammation, and airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. **Methods:** Total 18 BALB/c mice were randomly divided into 3 groups. They were control group, ovalbumin (OVA) group and budesonide group. Mice were sensitized and challenged by OVA. Airway responsiveness to acetylcholine chloride was measured. Hematoxylin & eosin staining was used to assess the inflammatory cell infiltrates. Levels of IL-4 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and total IgE and OVA-specific IgE (OVA-sIgE) in serum were detected by ELISA. The protein expression of OX40 was determined by Western blot analysis. **Results:** The airway resistance in the OVA group was obviously increased in a dose-dependent manner by administration of ACh, whereas only a slight increase could be detected in the control group. There were no significant differences in baseline airway resistance among three groups ($P > 0.05$). Treatment with budesonide led to a sharp decrease in airway resistance compared with the OVA group ($P < 0.05$). The number of eosinophils and total inflammatory cells in BALF in the OVA group increased significantly compared with the control group ($P < 0.05$), which was significantly decreased by treatment with budesonide ($P < 0.05$). The levels of the IL-4 and IL-13 in BALF, and the levels of total serum IgE and OVA-sIgE were significantly increased in OVA-sensitized/challenged mice compared with the control group ($P < 0.05$). Administration of budesonide reduced the levels of those Th2 cytokines in BALF, and the levels of total serum IgE and OVA-sIgE, when compared with the OVA group ($P < 0.05$). Treatment with budesonide increased the ratio of OX40, compared

[基金项目] 国家自然科学基金(81170018, 30570797, 30400191); 江苏省医学重点人才项目(RC2011066, RC2007043); 人事部和教育部留学回国人员科技启动项目(200886, FD09); 江苏省 333 高层次人才培养工程(201115); 江苏省高校自然科学研究项目(11KJB320008); 江苏省卫生国际交流支撑计划(201235)

*通讯作者, E-mail: lfzhou@njmu.edu.cn

with that in the OVA group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Budesonide could inhibit the airway inflammation and hyperresponsiveness by down-regulating the expression of OX40.

[**Key words**] asthma; OX40/OX40L; costimulatory pathway; budesonide

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 768-772]

支气管哮喘(哮喘)是多基因参与的具有遗传易感性的慢性气道炎症性变态反应性疾病,其发病涉及多种炎症细胞、炎性介质和复杂的细胞因子网络,以血清 IgE 增高、肺组织嗜酸性粒细胞浸润和气道高反应性为显著的临床特征^[1-2]。其中,CD4⁺T 细胞在哮喘的形成和发病过程中发挥重要作用^[3]。OX40(CD134)/OX40 配体(OX40L)协同刺激通路能够促进 CD4⁺T 细胞活化、增殖、迁移以及记忆性 T 细胞的形成,并在 I 型和 II 型辅助性 T 细胞(Th1 和 Th2 细胞)极化中起关键作用,与哮喘密切相关^[4-5]。本实验通过建立哮喘小鼠模型,观察吸入性糖皮质激素布地奈德对气道炎症和气道高反应性的干预作用,研究布地奈德对 OX40/OX40L 协同刺激通路的影响,旨在从分子水平进一步探讨布地奈德治疗哮喘的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

18 只 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠,体重(20 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,饲养于南京医科大学动物实验中心,12 h 光照/12 h 黑暗,室温为 22~25℃,湿度为 40%~70%,颗粒饲料喂养,自由饮水。随机分为 3 组,每组 6 只,即正常对照组(正常组)、哮喘模型组(哮喘组)和布地奈德组。

鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA, V 级, Sigma 公司,美国);吸入性布地奈德混悬液;OX40 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国);白介素(interleukin, IL)-4 和 IL-13 ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国);IgE 和 OVA 特异性 IgE(OVA-sIgE)ELISA 试剂盒(BPB 公司,美国);β-actin 多克隆抗体(南京凯基生物公司);小鼠肺功能仪(北京鑫澳成科技有限公司);低温高速离心机(Eppendorf 公司,德国);PARI TurboBOY N 雾化器(PARI 公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 哮喘模型制作及给药方法

哮喘组、布地奈德组:第 0、14 天腹腔注射抗原液 0.2 ml (含 OVA 100 μg 和氢氧化铝 400 μg),第

21 天开始用 5%OVA 溶液雾化,激发小鼠哮喘发作,每周 3 次,每次 30 min,连续 8 周。布地奈德组于 OVA 雾化前 30 min 雾化吸入布地奈德混悬液 6 ml。正常组以生理盐水代替 OVA 作腹腔注射及雾化。

1.2.2 呼气阻力测定

参照文献[6]方法进行呼气阻力测定。小鼠末次雾化吸入 24 h 后,戊巴比妥钠(70 mg/kg)麻醉,分离暴露气管和颈内静脉。内径 2 mm 塑料导管于气管第 2~3 软骨环处插管,尾静脉留置 27 号针头以便给药。设置呼吸机潮气量 6 ml/kg,呼吸频率为 90 次/min,吸呼比为 1:1。静脉注射氯化乙酰胆碱(Ach)(分别以 10、30、90、270 μg/kg 泵入),连续记录激发前、后的气道阻力值。

1.2.3 血清总 IgE、OVA-sIgE 及支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)中 IL-4 和 IL-13 水平测定

用 1 ml (分别为 0.4、0.3、0.3 ml)PBS 液行支气管肺泡灌洗,回收率均>85%。BALF 4℃ 1 500 r/min 离心 10 min,收集上清。用 ELISA 法检测血清总 IgE 和 OVA-sIgE 及 BALF 中 IL-4 和 IL-13 含量,具体步骤按试剂盒说明书操作。在酶标仪波长 450 nm 上读取吸光度值,通过标准曲线换算成相应浓度。

1.2.4 肺组织病理学检查

支气管肺泡灌洗术后,取小鼠左上肺,4%多聚甲醛固定,HE 染色观察气道炎症浸润情况。BALF 沉渣重悬后,光镜下计数细胞总数,并行瑞氏染色计数细胞总数和嗜酸性粒细胞百分比。

1.2.5 肺组织中 OX40 蛋白表达水平测定

100 mg 冰冻肺组织中加入 600 μl 裂解液,冰上匀浆、超声、静置 1 h,4℃ 15 000 r/min 离心 15 min,取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。50 μg 蛋白加入等体积上样缓冲液[100 mmol/L 三羟甲基甲烷盐酸盐(Tris-HCl, pH 6.18)、20%甘油、0.02%溴酚蓝、2%十二烷基硫酸钠(SDS)、200 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)],12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转移至 PVDF 膜上。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 OX40 多克隆 IgG 抗体(1:2 000 稀释)室温孵育过夜,洗膜后用 HRP 标记兔抗羊 IgG 抗体

(1:3 000 稀释)处理 1.5 h。洗膜后用发光试剂盒显示 OX40 蛋白条带。每组实验重复 3 次^[7]。以小鼠 β -actin 为内参照(1:100 稀释)。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。SPSS13.0 统计软件进行方差分析。各组间差异的显著性采用单因素方差分析(ANOVA)。两两比较采用 Neuman-Keuls 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 各组小鼠在不同浓度乙酰胆碱刺激后的气道阻力比较

Table 1 The comparison of airway resistance in each group after stimulation with different concentration of acetylcholine chloride [cmH₂O/(ml·s), $\bar{x} \pm s$]

组别	基础值	乙酰胆碱浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		10	30	90	270
正常组($n = 6$)	1.36 \pm 0.14	2.81 \pm 0.13	4.03 \pm 1.03	5.37 \pm 2.02	6.77 \pm 1.06
哮喘组($n = 6$)	1.54 \pm 0.18	2.83 \pm 0.18	8.19 \pm 1.28*	11.7 \pm 4.14*	24.23 \pm 3.78*
布地奈德组($n = 6$)	1.44 \pm 0.15	2.74 \pm 0.29	4.79 \pm 1.81#	7.12 \pm 1.91	13.43 \pm 2.68#

与正常组相比,* $P < 0.05$;与哮喘组相比,# $P < 0.05$ 。

2.2 布地奈德对血清总 IgE、OVA-sIgE 及 BALF 中 IL-4、IL-13 的影响

哮喘组血清总 IgE 和 OVA-sIgE,及 BALF 中 IL-

2 结果

2.1 布地奈德对哮喘小鼠肺功能的影响

3 组小鼠基础气道阻力相似,介于 1.0~1.6 cmH₂O/(ml·s)(1 cmH₂O = 0.109 8 kPa)。不同剂量 Ach(10、30、90、270 $\mu\text{g}/\text{ml}$)激发的气道反应性检测中,哮喘组、布地奈德组小鼠的平均气道阻力明显高于正常组($P < 0.05$)。布地奈德组的平均气道阻力较哮喘组明显降低($P < 0.05$,表 1)。

4和 IL-13 水平较正常组明显升高($P < 0.05$)。布地奈德组血清总 IgE 和 OVA-sIgE,及 BALF 中 IL-4 和 IL-13 水平较哮喘组明显降低($P < 0.05$,表 2)。

表 2 各组小鼠血清总 IgE、OVA-sIgE 及 BALF 中 IL-4、IL-13 水平比较

Table 2 The comparison of levels of IL-4 and IL-13 in BALF, and levels of total IgE and OVA-specific IgE in serum in each group ($\bar{x} \pm s$)

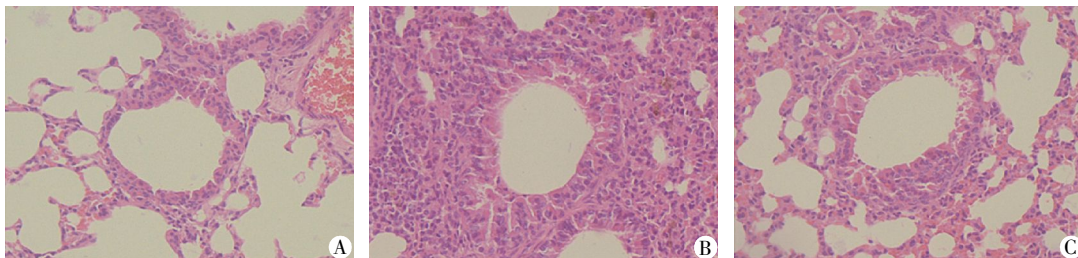
组别	BALF (pg/ml)		Serum (ng/ml)	
	IL-4	IL-13	总 IgE	OVA-sIgE
正常组($n = 6$)	20.42 \pm 6.48	16.91 \pm 2.67	34.56 \pm 9.32	3.38 \pm 0.69
哮喘组($n = 6$)	132.30 \pm 13.31*	63.95 \pm 10.56*	191.26 \pm 23.53*	20.90 \pm 1.76*
布地奈德组($n = 6$)	63.65 \pm 9.92#	31.84 \pm 6.35#	81.84 \pm 16.24#	9.30 \pm 2.97#

与正常组相比,* $P < 0.05$;与哮喘组相比,# $P < 0.05$ 。

2.3 布地奈德对哮喘小鼠气道炎症的抑制作用

HE 染色显示,与正常组相比,哮喘组小鼠气道黏膜水肿明显,气道上皮不完整,气道黏膜层、黏膜下

层以及血管周围组织可以见到大量的以淋巴细胞和嗜酸性粒细胞为主的炎性细胞浸润。布地奈德干预后,哮喘小鼠上述病理改变显著减轻(图 1,表 3)。



A:正常组未见炎症细胞浸润;B:哮喘组支气管周围炎症细胞大量浸润;C:布地奈德组支气管周围少量炎症细胞浸润。

图 1 各组小鼠肺组织病理染色(HE, $\times 200$)

Figure 1 The pathological observation of the lung tissue in each group (HE, $\times 200$)

2.4 布地奈德对肺组织中 OX40 蛋白表达水平的影响

以 OX40 相对表达量作为肺组织 OX40 表达水

平。正常组存在 OX40 低表达,哮喘组 OX40 表达显著增加 ($P < 0.05$)。与哮喘组比较,布地奈德组 OX40 表达明显降低($P < 0.05$,图 2)。

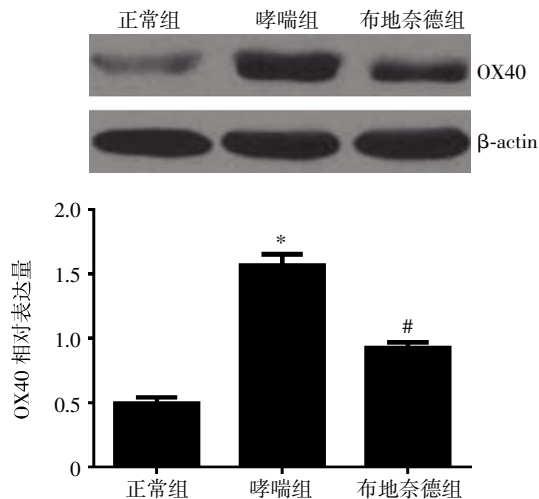
表 3 各组小鼠 BALF 总细胞数及细胞分类

Table 3 Changes of the numbers of total cells and differential cells in BALF in each group

($\times 10^4/\text{ml}, n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞总数	巨噬细胞	嗜酸性粒细胞	淋巴细胞	中性粒细胞
正常组	10.01 \pm 2.17	9.34 \pm 1.57	0.10 \pm 0.01	0.28 \pm 0.11	0.15 \pm 0.04
哮喘组	66.85 \pm 19.63*	19.60 \pm 3.50*	24.54 \pm 4.01*	15.14 \pm 2.98*	10.38 \pm 2.42*
布地奈德组	24.01 \pm 5.76#	8.99 \pm 2.44#	10.01 \pm 3.00#	4.82 \pm 1.05#	4.29 \pm 1.24#

与正常组相比,* $P < 0.05$;与哮喘组相比,# $P < 0.05$ 。



与正常组相比,* $P < 0.05$;与哮喘组相比,# $P < 0.05$ 。

图 2 Western blot 检测各组小鼠 OX40 蛋白水平表达情况
Figure 2 Expression of OX40 protein in each group by Western blot

3 讨论

哮喘是以树突状细胞(DC)介导的 Th2 优势免疫为特征的慢性气道炎症性疾病^[8-9]。Th1/Th2 亚群功能和(或)数目比例失衡是哮喘最为重要的免疫学异常,主要表现为 Th1 亚群功能降低和数目减少, Th2 亚群功能亢进和数目增多^[10]。T 细胞活化需要两个不可或缺的刺激信号:第一信号(识别信号)由 T 细胞受体(TCR)识别抗原递呈细胞(APC)表面的抗原肽-MHC 复合物所启动;第二信号(协同刺激信号/激活信号)由 T 细胞和 APC 表面的协同刺激分子的相互作用所启动。OX40/OX40L 是除 B7/CD28 之外的另一对重要的协同刺激分子,它们的相互作用能够抑制炎症细胞凋亡,介导 CD4⁺T 细胞的活化、增殖、迁移至炎症部位并产生细胞因子,继而增强炎症效应^[11]。

Th2 细胞分化依赖于 CD28 信号,并且可被 OX40 信号加强。在体外,OX40 信号与 CD28 信号协同作用,能够激活初始 CD4⁺T 细胞,促进 IL-4 的表达。对 OX40 基因敲除小鼠用 OVA 致敏和激发后,

与正常鼠相比,其血清 IgE、IL-4 水平明显下降,呼吸道内的肥大细胞、嗜酸性粒细胞比例也显著下降,肺部炎症明显减轻^[12-13]。本实验发现,正常组小鼠 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-13 以及血清总 IgE、O-VA-sIgE,肺组织 OX40 蛋白表达水平很低,而哮喘组水平则明显升高。

OX40 具有以下独特的功能,使其成为治疗多种免疫相关疾病及哮喘的一个重要靶点。①体内表达 OX40 的 T 细胞是最近才被抗原刺激过的细胞,对抗原的特异性较强;②表达 OX40 的 T 细胞只有在炎症部位才存在,所以以 OX40 作为靶点不会影响外周 T 细胞库和其他部位的正常组织;③OX40 能够打破免疫耐受,恢复免疫监视;④效应性 CD4⁺T 细胞是 OX40 生物学功能的主要承担者,能维持进行中的免疫应答,诱导细胞因子的产生,并可以增强 CD8⁺T 细胞的杀伤作用。利用抗 OX40L 单克隆抗体或基因治疗干预 OX40/OX40L 的相互作用,已在动物模型上治疗疾病并取得较好效果^[14]。值得一提的是,用于治疗哮喘的 OX40L 中和抗体已经进入 I 期临床试验^[15]。

本研究结果显示,布地奈德可能通过抑制 OX40 表达而减轻哮喘气道炎症和气道高反应性。靶向 OX40/OX40L 协同刺激通路有望为临床治疗哮喘等炎症性疾病带来新的前景^[16]。

[参考文献]

- [1] Zhou LF, Zhu Y, Cui XF, et al. Arsenic trioxide, a potent inhibitor of NF- κ B, abrogates allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation [J]. Respir Res, 2006, 7: 146
- [2] 周林福, 胡志斌, 谢维, 等. Toll 样受体 4 基因多态性和内毒素在哮喘发病中的交互作用[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(2): 131-133
- [3] 吴剑卿, 许伟, 孙芸, 等. 树突状细胞表面共刺激分子在哮喘小鼠中的作用研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007, 27(1): 31-35
- [4] Xie F, Wang Q, Chen Y, et al. Costimulatory molecule OX40/OX40L expression in ductal carcinoma in situ and

- invasive ductal carcinoma of breast; an immunohistochemistry-based pilot study [J]. *Pathol Res Pract*, 2010, 206(11):735-739
- [5] Wang YH, Liu YJ. OX40-OX40L interactions; a promising therapeutic target for allergic diseases [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12):3655-3657
- [6] 庞玲玲, 李若然, 周林福, 等. 芹菜素对哮喘小鼠转录激活蛋白3及Th2型细胞因子抑制作用的实验研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(4):383-387
- [7] 吉宁飞, 周玉婷, 何畏, 等. 地塞米松对哮喘大鼠 Tbet、GATA-3 及气道炎症的作用机制 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2008, 28(11):1421-1425
- [8] Zhou LF, Zhang MS, Hu AH, et al. Selective blockade of NF- κ B by novel mutated I κ B α suppresses CD3/CD28-induced activation of memory CD4⁺ T cells in asthma [J]. *Allergy*, 2008, 63(5):509-517
- [9] 周林福, 王文璐, 李红岩, 等. 支气管哮喘患者血清对内皮穿越模型中单核细胞分化为树突状细胞的作用 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(3):169-173
- [10] 周林福, 殷凯生. B7-CD28/CTLA-4 协同刺激通路与支气管哮喘 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2002, 18(6):105-107
- [11] Sugamura K, Ishii N, Weinberg AD. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40 [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(6):420-431
- [12] Linton PJ, Bautista B, Biederman E, et al. Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(7):875-883
- [13] Salek-Ardakani S, Song J, Halteman BS, et al. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(2):315-324
- [14] Seshasayee D, Lee WP, Zhou M, et al. In vivo blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12):3868-3878
- [15] Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134) [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28:57-78
- [16] 李红岩, 王文璐, 周林福, 等. OX40-OX40L 协同刺激通路在支气管哮喘中的作用 [J]. *中华哮喘杂志(电子版)* 2010, 4(5):289-292

[收稿日期] 2012-01-17

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读, 可将数字分成组, 从小数点起, 向左或向右每 3 位分成 1 组, 组间留空隙(约为一个汉字的 1/4), 不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万, 但不能写成 4 亿 5 千 3 百万; 三千元写成 3 000 元或 0.3 万元, 但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值, 包括小数与百分数, 不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围, 使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6) $\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$, 30~40 km。

(本刊编辑: 接雅俐)