

布地奈德抑制支气管哮喘小鼠 TSLP 及 Th2 优势免疫作用的研究

王文璐^{1,2}, 李红岩¹, 苗伟伟¹, 汪凤凤¹, 刘洪泱¹, 黄茂¹, 殷凯生¹, 周林福^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院呼吸内科, 江苏 南京 210029; ²南京市市级机关医院呼吸科, 江苏 南京 210018)

[摘要] 目的:研究布地奈德抑制哮喘小鼠 Th2 优势应答的作用及其机制。方法:选择 24 只 6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠,随机分为 3 组:正常对照组、哮喘模型组、布地奈德组,每组 8 只。卵白蛋白(OVA)致敏和激发制作哮喘模型。小鼠末次雾化吸入激发 24 h 后,采用小鼠肺功能仪检测气道对乙酰胆碱(Ach)的阻力;苏木精-伊红(HE)染色观察气道炎症浸润情况;支气管肺泡灌洗液(BALF)瑞氏染色计数嗜酸性粒细胞百分比;酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清总 IgE、BALF 液中白细胞介素 4(IL-4)和 IL-13;免疫印迹(Western blot)测定肺组织胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)表达水平。结果:与正常对照组比较,哮喘模型组气道阻力、气道炎症、血清总 IgE、BALF 中 Th2 细胞因子(IL-4、IL-13)以及肺组织 TSLP 蛋白表达明显增高($P < 0.05$)。与哮喘模型组比较,布地奈德组各项观测指标均明显降低($P < 0.05$)。结论:布地奈德通过降低肺组织 TSLP 表达、抑制 Th2 细胞因子水平而降低哮喘气道炎症和气道高反应性,可能是糖皮质激素治疗哮喘的重要机制。

[关键词] 支气管哮喘;布地奈德;胸腺基质淋巴细胞生成素;2 型辅助性 T 细胞

[中图分类号] R562.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)09-1207-04

The inhibitory effect of budesonide on TSLP-induced Th2-dominated immune response in asthmatic mice

WANG Wen-lu^{1,2}, LI Hong-yan¹, MIAO Wei-wei¹, WANG Feng-feng¹, LIU Hong-yang¹, HUANG Mao¹, YIN Kai-sheng¹, ZHOU Lin-fu^{1*}

(¹Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Respiratory Medicine, Nanjing Governmental Hospital, Nanjing 210018, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effects and mechanism of budesonide on Th2-dominated immune response in a murine model of asthma. **Methods:** Twenty-four 6-week-old healthy BALB/c mice, SPF grade, were randomly divided into 3 groups, including the normal control group, the asthma group, and the budesonide group. Mice in the budesonide group were exposed to an aerosol of budesonide daily during ovalbumin (OVA) challenge. The murine asthma model was established by OVA sensitization and challenge. Twenty-four hours after the last airway provocation, acetylcholine (Ach) was administered via caudalis vein, and the airway resistance was measured by pulmonary function detector. The levels of IL-4 and IL-13 in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and total IgE in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Total and differential cell counts in BALF were calculated by light microscopy. The airway inflammatory infiltration was detected by haematoxylin and eosin (HE) staining. The pulmonary thymic stromal lymphopoietin was determined by Western blot analysis. **Results:** As compared with the control group, the airway hyperreactivity, airway inflammation, cell count and eosinophil percentage in BALF, levels of total serum IgE and BALF IL-4 and IL-13, and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) expression in the lung were significantly increased in the asthma group ($P < 0.05$). As compared with the asthma group, all the above indices mentioned in the budesonide group were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Budesonide could reduce the allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by downregulating the expressions of pulmonary TSLP and Th2 cytokines, which may be an important mechanism of corticosteroids for the treatment of asthma.

[Key words] bronchial asthma; budesonide; thymic stromal lymphopoietin (TSLP); T-helper type 2

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(9): 1207-1210]

[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);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

支气管哮喘(哮喘)是常见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。Th1/Th2 失衡是哮喘最重要的免疫学异常,而树突状细胞(DC)在 II 型辅助性 T 细胞(Th2)优势免疫中起着关键作用^[1]。来源于上皮细胞的胸腺基质淋巴细胞生成素(TSLP)在哮喘患者体内高表达,与 DC 介导的 Th2 优势免疫密切相关^[2]。糖皮质激素是目前治疗哮喘最有效的一线药物。本实验将进一步研究吸入性糖皮质激素抑制哮喘小鼠 Th2 优势免疫的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

卵白蛋白(OVA, V 级, A5503, 美国 Sigma 公司); 布地奈德混悬液(英国 Astra Zeneca 公司)。TSLP(美国 Abcam 公司); IgE ELISA 试剂盒(FA00676B, 美国 BPB 公司); 白介素(IL)-4 ELISA 试剂盒(FMK0005, 上海晶美生物公司); IL-13 ELISA 试剂盒(EK0425, 武汉博士德生物公司); β -actin 多克隆抗体(KGAA001, 南京凯基生物公司)。小鼠肺功能仪(XAC-337D, 北京鑫澳成科技有限公司); 勃林格殷格翰超声雾化器(S-888E, 南京道森科技有限公司); 自制小鼠雾化吸入箱 29 cm × 22 cm × 18 cm。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和处理

24 只 6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠, 体重(20 ± 2)g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 饲养于南京医科大学实验动物中心, 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。按随机数字表法分为 3 组: 正常对照组、哮喘模型组、布地奈德组, 每组 8 只。

哮喘模型组和布地奈德组小鼠于第 0、14 天腹腔注射抗原液 0.2 ml (含氢氧化铝 400 μ g 和 OVA 100 μ g), 第 21 天开始用 1% OVA 溶液雾化, 激发小鼠哮喘发作, 每天 1 次, 每次 1 h, 连续 3 d。正常对照组以生理盐水代替 OVA 作雾化。正常对照组和哮喘模型组分别在激发前 30 min 给予生理盐水雾化。布地奈德组在第 21 天起, 在雾化吸入 OVA 激发前 30 min, 雾化吸入布地奈德混悬液 4 mg(8 ml), 每天 1 次, 每次 30 min。

1.2.2 呼气阻力测定

小鼠末次雾化吸入 24 h 后, 用戊巴比妥钠(70 mg/kg)腹腔注射麻醉, 分离暴露气管和颈内静脉。内径为 2 mm 的导管于气管第 2~3 软骨环处插管, 尾静脉留置 27 号针头给药。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 μ g/kg 泵入), 连续记录激发前、后的呼气阻力(Re)值。

1.2.3 酶联免疫吸附试验

OVA 末次激发 24 h 后, 处死小鼠, 立即摘眼球取血, 4℃、4 000 r/min 离心 15 min 获取血清。用 1 ml (分 3 次, 每次分别为 0.4、0.3、0.3 ml) PBS 液行支气管肺泡灌洗, 回收率均 > 85%。支气管肺泡灌洗液(BALF) 4℃、1 500 r/min 离心 10 min, 收集上清。ELISA 法检测血清总 IgE、BALF 液中 IL-4 和 IL-13 含量, 具体步骤按试剂盒说明书进行。在酶标仪波长 450 nm 上读取吸光度(A)值, 通过标准曲线换算成相应浓度, 结果以 μ g/ml 表示。IgE、IL-4、IL-13 测定的最小限值分别为 1、4、7 μ g/ml。

1.2.4 肺组织病理学

支气管肺泡灌洗术后, 取小鼠左上肺, 用 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, 瑞氏染色计数细胞总数和嗜酸性粒细胞百分比。

1.2.5 免疫印迹实验

取 100 mg 冰冻肺组织, 加入 600 μ l 裂解液, 冰上匀浆、超声、静置 1 h, 4℃、150 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 以 BCA 法测定蛋白浓度。50 μ g 蛋白加入等体积上样缓冲液[100 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris·HCl, pH6.18)、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。辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 TSLP 多克隆 IgG 抗体(1:1 000 稀释), 室温孵育过夜, 辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗(1:3 000 稀释) 孵育 1.5 h。洗膜后, 用发光试剂盒显示 TSLP 蛋白条带。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

各组数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析。两两比较采用 Neuman-Keuls 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 布地奈德对小鼠肺功能的影响

3 组小鼠基础气道阻力(RL)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 μg/ml)激发的气道反应性检测中,哮喘模型组、布地奈德组小鼠的平均 RL 显著高于正常对照组($P < 0.05$)。布地奈德组的平均 RL 较哮喘模型组显著降低($P < 0.05$,图 1)。

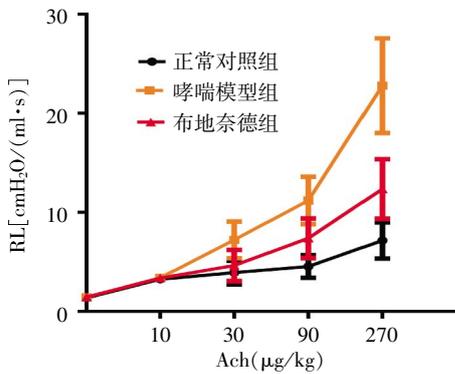


图 1 各组小鼠在不同浓度乙酰胆碱刺激后的气道阻力比较
Figure 1 Comparison of airway responsiveness in each group after stimulated with different concentration of acetylcholine chloride

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

哮喘模型组血清总 IgE、BALF 中 IL-4 和 IL-13

水平较正常对照组显著升高($P < 0.05$)。布地奈德组血清总 IgE、BALF 中 IL-4 和 IL-13 水平较哮喘模型组显著降低($P < 0.05$,表 1)。

表 1 3 组小鼠 BALF 中 IL-4、IL-13 和血清总 IgE 水平比较
Table 1 Comparison of levels of IL-4 and IL-13 in BALF, and total IgE in serum in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	BALF		血清
	IL-4(pg/ml)	IL-13(pg/ml)	IgE(ng/ml)
正常对照组	21.97 ± 4.29	11.02 ± 2.84	120.75 ± 33.15
哮喘模型组	123.81 ± 28.36*	45.43 ± 7.04*	656.83 ± 73.14*
布地奈德组	47.20 ± 8.10#	21.17 ± 5.39#	278.27 ± 64.85#

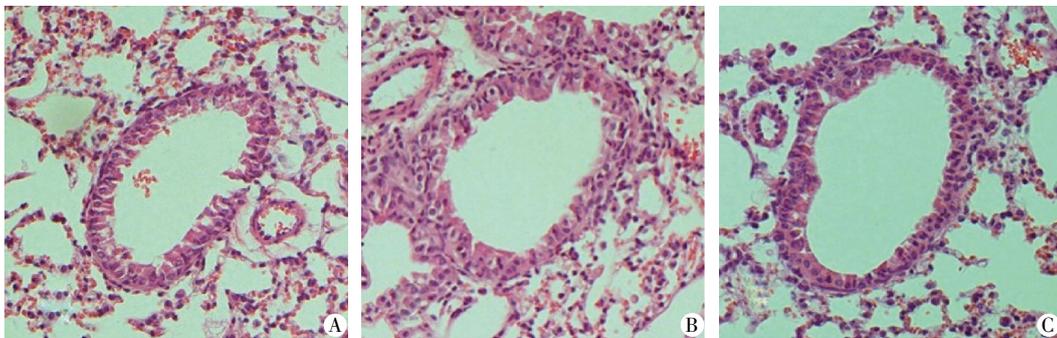
与正常对照组比较,* $P < 0.05$,与哮喘模型组比较,# $P < 0.05$ 。

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,正常对照组无炎症细胞浸润,而哮喘模型组小鼠气道炎症细胞浸润显著增多,布地奈德组气道炎症和 BALF 炎症细胞募集均显著低于哮喘模型组($P < 0.05$,图 2)。

2.4 布地奈德对肺组织中 TSLP 蛋白表达水平的影响

以 TSLP 相对表达量表示肺组织 TSLP 表达水平。正常对照组存在 TSLP 低表达,哮喘模型组 TSLP 较正常组表达显著增加($P < 0.05$)。与哮喘模型组比较,布地奈德组 TSLP 表达显著降低($P < 0.05$,图 3)。



A:正常对照组;B 哮喘模型组;C 布地奈德组。

图 2 各组小鼠肺组织病理染色(HE,× 100)

Figure 2 The pathological manifestation of the lung tissue in each group (HE,× 100)

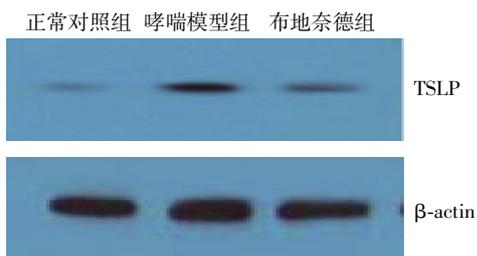


图 3 Western blot 检测 TSLP 蛋白表达

Figure 3 Expression of TSLP protein detected by Western blot

3 讨论

哮喘是以 DC 介导的 Th2 优势免疫为特征的慢性气道变应性疾病。其中,来源于上皮细胞的 TSLP 在哮喘患者体内高表达。TSLP 是一种类 IL-7 细胞因子^[3],支持前 B 细胞系长期生长,具有增强胸腺细胞增生的作用。TSLP 可以激活人骨髓源性 DC,引起 MHC II、CD54、CD83、B7 分子(CD80 和 CD86)以及 DC-lamp 表达明显上调,促进 T 细胞增殖及分化^[4]。

TSLP可直接作用于激活的CD4⁺T细胞,迅速激活STAT5介导的Th2免疫应答^[5]。而且,TSLP激活的DC拥有强力诱导形成Th2微环境的功能,有助于产生哮喘Th2优势免疫,在哮喘的发生和发展中起重要作用。本实验发现,哮喘组TSLP较正常组表达明显升高,提示TSLP参与介导哮喘Th2优势免疫。

被IgE受体所交联激活的肥大细胞可高表达TSLP,原位杂交发现TSLP在哮喘气道中高表达,与疾病的严重程度和Th2炎症趋化因子表达密切相关^[6]。尤其在皮肤和肺组织上过度表达TSLP,这有助于形成哮喘和特应性皮炎^[7]。TSLP受体基因敲除的小鼠难以复制哮喘模型气道炎症^[8]。Th2细胞因子增高在哮喘发病机制中起着重要的作用。IL-4和IL-13是最重要的Th2型细胞因子^[9]。IL-4能促进Th0向Th2细胞分化^[10]。IL-4还促进B细胞增殖、活化和产生IgE,诱导IgE受体表达,正反馈增强IgE介导的效应,直接或间接诱导肥大细胞和嗜碱性粒细胞脱颗粒,导致气道炎症和气道高反应性^[11]。IL-13能调节嗜酸性粒细胞性炎症反应、黏液分泌和气道高反应性^[12]。本实验中,哮喘组小鼠炎症浸润、气道阻力、血清总IgE、BALF中IL-4和IL-13、肺组织TSLP均较正常组明显升高,支持TSLP在哮喘Th2优势免疫中起重要作用。

Zhou等^[13]研究报道,核因子 κ B(NF- κ B)过度激活是哮喘气道炎症持续与扩大的重要基础。选择性抑制NF- κ B可抑制NF- κ B依赖性细胞因子和B7-CD28/CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4)协同刺激通路,促进哮喘患者记忆Th2细胞免疫耐受^[1]。布地奈德显著抑制IL-1 β 和IL-4诱导的A549细胞NF- κ B激活,并抑制TSLP表达^[14]。本实验发现,布地奈德显著下调哮喘小鼠模型肺组织TSLP,并降低气道Th2炎症和气道高反应性。

本研究结果显示,布地奈德可能通过降低TSLP表达,抑制Th2型细胞的分化,导致Th2型细胞因子IL-4、IL-13和IgE的合成减少,减轻Th2型细胞优势免疫介导的哮喘气道炎症和气道高反应性。抑制TSLP介导的Th2优势免疫可能是布地奈德治疗哮喘的重要机制,可为研发新型哮喘治疗药物提供新靶点和新思路。

[参考文献]

[1] Zhou LF,Zhang MS,Hu AH,et al. Selective blockade of NF-kappaB by novel mutated IkappaBalphalpha suppresses CD3/CD28-induced activation of memory CD4⁺T cells in asthma[J]. Allergy,2008,63(5):509-517

- [2] Seshasayee D,Lee WP,Zhou M,et al. *In vivo* blockade of OX40 ligand inhibits thymic stromal lymphopoietin driven atopic inflammation[J]. Clin Invest,2007,117(12):3868-3878
- [3] Sebastian K,Borowski A,Kuepper M,et al. Signal transduction around thymic stromal lymphopoietin (TSLP) in atopic asthma[J]. Cell Commun Signal,2008,6:5
- [4] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin:master switch for allergic inflammation[J]. Exp Med,2006,203(2):269-273
- [5] Reche PA,Soumelis V,Gorman DM,et al. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells[J]. Immunol,2001,167(1):336-343
- [6] Redhu NS,Saleh A,Halayko AJ,et al. Essential role of NF-kappaB and AP-1 transcription factors in TNF-alpha-induced TSLP expression in human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2011,300(3):L479-485
- [7] Yoo J,Omori M,Gyarmati D,et al. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin [J]. Exp Med,2005,202(4):541-549
- [8] Lee CC,Wang CN,Lai YT,et al. Shikonin inhibits maturation of bone marrow-derived dendritic cells and suppresses allergic airway inflammation in a murine model of asthma [J]. Br J Pharmacol,2010,161(7):1496-1511
- [9] Bellini A,Marini MA,Bianchetti L,et al. Interleukin (IL)-4,IL-13,and IL-17A differentially affect the profibrotic and proinflammatory functions of fibrocytes from asthmatic patients[J]. Mucosal Immunol,2012,5(2):140-149
- [10] Tanaka S,Motomura Y,Suzuki Y,et al. The enhancer HS2 critically regulates GATA-3-mediated IL4 transcription in T(H)2 cells[J]. Nat Immunol,2011,12(1):77-85
- [11] Shi Y,Dai J,Liu H,et al. Naringenin inhibits allergen-induced airway inflammation and airway responsiveness and inhibits NF-kappaB activity in a murine model of asthma[J]. Can J Physiol Pharmacol,2009,87(9):729-735
- [12] Xue L,Liang H,Jiang X. Up-regulation of CD44 expression by interleukin-13 in a murine model of asthma [J]. Mol Med Report,2011,4(6):1233-1237
- [13] Zhou LF,Chen L,Zhu Q,et al. Unusual life-threatening Rosai-Dorfman disease of the trachea;role of NF-kappaB [J]. Thorax,2010,65(10):927-929
- [14] 陈真,杜强,周林福,等. 布地奈德对A549细胞胸腺基质淋巴细胞生成素表达作用的研究[J]. 现代生物医学进展,2009,9(10):1820-1823

[收稿日期] 2012-02-14