

哮喘易感基因 *ORMDL3* 在哮喘小鼠中的表达及地塞米松的干预作用

蒋 莉,金 蕊,李 悦,庄丽丽,王 全,周国平*

(南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨哮喘易感基因 *ORMDL3* 在支气管哮喘发病时的表达及地塞米松的干预作用。方法:将 30 只健康清洁级雌性 Balb/c 小鼠随机分为 3 组:对照组、哮喘组(卵蛋白致敏)、地塞米松组(卵蛋白致敏,激发前腹腔注射地塞米松 1 mg/kg 进行干预),每组 10 只。称量和观察小鼠的体重增长趋势,对小鼠肺组织进行 HE 染色评价浸润情况,计数 3 组小鼠的外周血嗜酸性粒细胞,ELISA 法检测对比 3 组小鼠血清白介素 4(IL-4)的浓度变化,采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测小鼠肺组织 *ORMDL3* mRNA 水平表达。结果:哮喘组小鼠体重增长显著落后于其他两组($P < 0.05$),地塞米松干预后能缓解生长迟滞,但仍低于对照组($P < 0.05$)。病理组织学显示哮喘组小鼠肺组织见大量嗜酸性粒细胞浸润,黏膜下层和平滑肌增厚,管腔狭窄,地塞米松组小鼠肺组织改变较哮喘组为轻。哮喘组外周血嗜酸性粒细胞计数显著高于对照组和地塞米松组($P < 0.05$),地塞米松组计数高于对照组($P < 0.05$)。哮喘组小鼠的 IL-4 水平显著高于对照组($P < 0.05$),经地塞米松干预后 IL-4 水平显著降低($P < 0.05$),但仍高于对照组。哮喘组小鼠 *ORMDL3* mRNA 的表达水平较对照组显著升高,地塞米松组小鼠 *ORMDL3* mRNA 水平较哮喘组下降,但未达统计学意义($P > 0.05$)。结论:卵清蛋白小鼠哮喘模型中 *ORMDL3* 的 mRNA 表达显著增高,地塞米松可下调 *ORMDL3* 的表达,但未达到统计学意义,其中的机制有待进一步的深入研究。

[关键词] 哮喘;*ORMDL3*;地塞米松;小鼠

[中图分类号] Q756

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-744-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130606

The expression of *ORMDL3* in murine asthma model and the effect of dexamethasone

Jiang Li, Jin Rui, Li Yue, Zhuang Lili, Wang Quan, Zhou Guoping*

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

[Abstract] Objective: To investigate the role of *ORMDL3* in development of bronchial asthma and its response to treatment with dexamethasone. **Methods:** A total of 30 Balb/c female mice were randomly divided into three groups: control group, untreated asthma group, and dexamethasone-treated group, and 10 mice in each group. The body weight was observed every week and HE-stained was used to observe the changes of pulmonary histopathology. The number of eosinophils (EOS) in peripheral blood of three groups was counted under microscope. The concentration of interleukin-4 (IL-4) was determined by ELISA and the expression of *ORMDL3* mRNA in lungs was detected by semi-quantitative RT-PCR. **Results:** Weight gain of asthma group was significantly lower than the other two groups ($P < 0.05$), and dexamethasone intervention alleviated the physical retardation, but still lower than the control group ($P < 0.05$). There were mass inflammatory cells infiltration in asthmatic group. Dexamethasone ameliorated the above mentioned symptoms significantly. The number of EOS which in treated in untreated asthma group were significantly higher than those in the other two groups ($P < 0.05$), and group were higher than those in control group ($P < 0.05$). IL-4 was increased after challenged by OVA compared to the control group ($P < 0.05$), and it was lower after treated by dexamethasone ($P < 0.05$). After challenge, the expression of *ORMDL3* mRNA was a significantly elevated in untreated asthma group, and was alleviated in dexamethasone-treated group ($P > 0.05$), which was still higher than the control group. **Conclusion:** Over-expression of *ORMDL3* was demonstrated in the mouse airways with asthma, and dexamethasone may be effective as an anti-inflammatory agent by inhibiting *ORMDL3* expression.

[Key words] asthma; *ORMDL3*; dexamethasone; mouse

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 744-748]

[基金项目] 国家自然科学基金(30872804, 81170661); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(JX10231081); 教育部博士点基金(20113234110010); 江苏省医学重点人才项目(RC2007050)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: gpzhou2003@aliyun.com

支气管哮喘是儿童最常见的慢性气道疾病之一,多种炎症细胞(嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞等)以及气道结构细胞(气道平滑肌细胞、上皮细胞等)和细胞组分参与了其病理过程^[1]。糖皮质激素是治疗哮喘的主要抗炎药物,其作用机制仍有待继续研究。本实验采用卵清蛋白致敏和激发制备 Balb/c 小鼠哮喘模型,观察体重变化趋势,进行外周血嗜酸性粒细胞计数,比较肺组织血清类黏蛋白 1 样蛋白 3(orosomucoid 1-like protein 3, *ORMDL3*) mRNA 的表达水平,观察肺组织的病理变化,以及激素地塞米松的干预对该基因表达的影响,探讨该基因在哮喘发病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雌性 Balb/c 小鼠 30 只,6 周龄 [南京医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2008-0004],置于正常室温,通风适宜环境饲养,规律喂食。

卵清蛋白(ovalbumin, OVA, Grade V)、氢氧化铝(50 g/瓶)(Sigma 公司,美国);地塞米松磷酸钠注射液(济南利民制药有限责任公司);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);小鼠 IL-4 ELISA 试剂盒(Abcam 公司,英国);PCR 引物(上海英骏公司)。隔离湿气超声波雾化器 JCS-202(上海合力医疗器械厂)。BS-1105 型电子天平(北京赛多科斯天平有限公司)。Olympus BX51 型光学显微镜(奥林巴斯公司,日本);图像分析系统(Image-pro plus 中文版 6.0)。

1.2 方法

1.2.1 哮喘模型的建立

30 只健康清洁级雌性 Balb/c 小鼠,随机分为对照组、哮喘组、地塞米松组,每组 10 只。造模方法:①致敏:哮喘组与地塞米松组小鼠第 1、7、14 天腹腔注射 OVA 混悬剂 0.2 ml(含新鲜配制的氢氧化铝 2 mg 和 OVA 2 μg)致敏;②激发:从第 21 天起哮喘组与地塞米松组小鼠每天分别置于 30 cm × 30 cm × 40 cm 的密闭容器中,以 10 g/L 的 OVA 溶液雾化吸入,30 min/d,连续 7 d。地塞米松组小鼠在激发前 30 min 腹腔注射地塞米松 0.2 ml,剂量 1 mg/kg^[2],对照组小鼠致敏与激发均以生理盐水代替,方法同哮喘组。每只小鼠每次给药前称重。

1.2.2 标本采集与处理

末次激发后 24 h,剃除小鼠口周胡须及毛发,一侧眼球摘除留取全血标本 1.5 ml,室温放置 2 h

后 4 摄氏度 1 000 g 离心留取上清-80℃保存。吸取未凝外周血 20 μl,放置于 0.38 ml 溴酚蓝溶液中混匀染色,静置 2 min 后行嗜酸性粒细胞计数,计算计数板 10 个格子中蓝染的嗜酸性粒细胞个数。嗜酸性粒细胞(个/L)=(10 个大方格内的嗜酸粒细胞/10) × 10 × 20 × 10⁶^[3]。颈椎脱臼处死小鼠。处死后打开小鼠胸腔并暴露双侧肺组织,右肺灌注灌洗液后,取右肺组织置于 5 ml EP 管中液氮保存以备总 RNA 及蛋白提取,取左肺组织切取组织块行苏木素-伊红(HE)染色。

1.2.3 苏木精-伊红染色

将剪下的左侧肺在 4%的多聚甲醛溶液中灌注固定 24 h 以上,酒精脱水,石蜡固定,切成 4 μm 的薄片,石蜡切片脱蜡后直接行苏木精-伊红染色,脱水封片。采用 Image-pro plus 中文版 6.0 图像分析软件,对苏木精-伊红染色图片观察同级别的完整的支气管横断面的气道壁全层厚度、上皮黏膜层厚度、平滑肌层厚度以及周围嗜酸性粒细胞浸润程度。

1.2.4 ELISA 检测血清 IL-4

分别将不同浓度标准品和小鼠血清(100 μl/孔)加入相应孔中,空白孔除外。封住反应孔,37℃孵育 90 min,洗涤 4 次。除空白孔外,加入生物素化抗体工作液(100 μl/孔),37℃孵育 60 min,洗涤 4 次,除空白孔外,加入酶结合物工作液(100 μl/孔),37℃孵育 30 min,洗涤 4 次,加入显色剂 100 μl/孔 37℃孵育 20 min,加入终止液 100 μl/孔混匀,在 450 nm 处测吸光度值。

1.2.5 RT-PCR 检测肺组织 *ORMDL3* mRNA

取约 100 mg 肺组织标本置于研磨器中加液氮研磨完全,加入 TRIzol 试剂,按照说明步骤提取总 RNA,测定 RNA 浓度,逆转录合成 cDNA。以 1 μl cDNA 为模板进行 PCR 扩增,检测 3 组标本 *ORMDL3* 的 mRNA 的表达量,选取 β-actin 为内参。设计小鼠的 *ORMDL3* 的 PCR 引物为:正义:5'-GGGGGTGCTCAGGAAAGAGGCT-3', 5'-GGGTTGC-CAGGAAGCCACAAA-3', 反义:β-actin 的 PCR 引物为:正义 5'-CGTTG-ACATCCGTAAAGACC-3', 反义:5'-AACAGTCCGCCTAG-AAGCAC-3'。PCR 条件为:94℃预变性 4 min,94℃变性 60 s,59℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,*ORMDL3* 31 个循环,β-actin 21 个循环,72℃再延伸 10 min。取 5 μl 产物在 2%琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定,溴化乙啶显色,在紫外线投射仪下观察电泳条带,采用 Image-Pro Plus 图像分析系统分析 *ORMDL3* 条带的平均灰度值。以目的基因和

β -actin 扩增条带的灰度值之比表示目的基因 mRNA 的相对表达量。

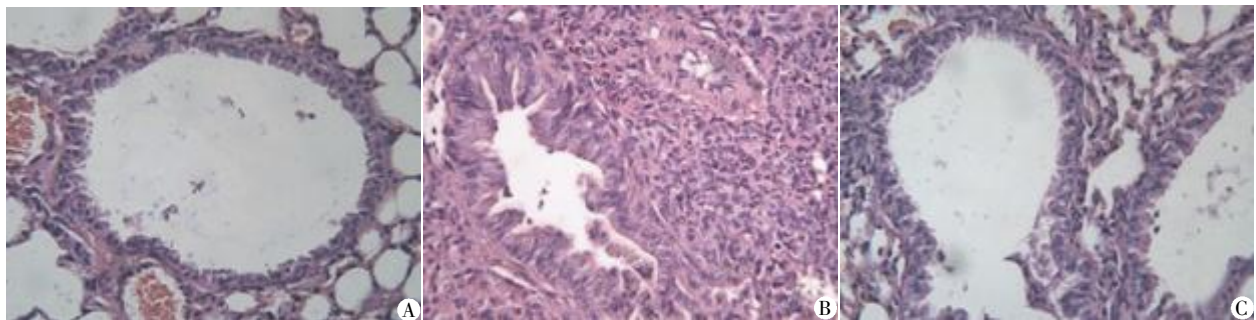
1.3 统计学方法

计量资料以均数 \pm 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 (ANOVA), 组间两两比较采用最小显著差法 (LSD 法)。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠哮喘模型行为改变比较

哮喘组小鼠激发数分钟后相继出现烦躁不安, 呼吸急促, 头面瘙痒, 毛发竖立, 口周及四肢末梢紫绀, 二便失禁等哮喘急性发作症状。早期表现躁动, 后期则行为迟滞, 少动或俯伏不动, 反应迟钝。连续 5~7 d 激发后, 小鼠出现体重增长缓慢, 发育迟滞, 毛色无光, 以上行为学表现证明哮喘模型制备成功。地塞米松组小鼠上述反应轻微, 少数可见呼吸急促, 搔抓头部表现。对照组小鼠无以上反应。体重增长变化见表 1。



A: 对照组; B: 哮喘组; C: 地塞米松组。

图 1 3 组小鼠肺组织 HE 染色 ($\times 200$)

Figure 1 Lung tissue HE staining of three group mice ($\times 200$)

2.2 小鼠肺组织镜下病理学改变

2.2 小鼠肺组织镜下病理学改变

对照组小鼠肺组织 HE 染色切片显示支气管肺泡结构清晰完整, 支气管上皮无脱落坏死, 支气管和小血管周围未见显著的炎症细胞浸润。哮喘组气管、血管周围大量嗜酸性粒细胞, 淋巴细胞和浆细胞浸润, 管腔狭窄, 部分上皮脱落坏死, 管腔可见黏液栓堵塞, 平滑肌细胞增生, 支气管平滑肌显著增厚, 支气管痉挛、收缩。而地塞米松干预后部分逆转了上述病变, 肺组织的炎性细胞浸润显著减轻 (图 1)。

2.3 小鼠外周血嗜酸性粒细胞计数比较

与其他两组相比, 哮喘组小鼠嗜酸性粒细胞计数显著升高 ($P < 0.05$), 地塞米松干预后较哮喘组显著降低, 但仍高于对照组 ($P < 0.05$, 表 2)。

2.4 小鼠血清 IL-4 的浓度比较

哮喘组小鼠的血清 IL-4 水平显著高于对照组

($P < 0.05$), 地塞米松组较哮喘组显著降低 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组 ($P < 0.05$, 表 3)。

2.5 小鼠肺组织 ORMDL3 mRNA 的表达

肺组织提取总 RNA, 经甲醛变性凝胶电泳后出现 3 条条带, 分别为 28s、18s 和 5s rRNA, 可初步判断提取的 RNA 较为完整。3 组肺组织 ORMDL3

表 2 3 组小鼠外周血 EOS 计数

Table 2 The EOS amounts in peripheral blood of three group mice ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | EOS 计数 ($\times 10^8$ 个/L) |
|-------|----|-------------------------------|
| 哮喘组 | 10 | 3.55 \pm 0.67 ^{*#} |
| 地塞米松组 | 10 | 1.56 \pm 0.32 [*] |
| 对照组 | 10 | 0.58 \pm 0.10 |

与对照组比较, $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, [#] $P < 0.05$ 。

表 3 3 组小鼠血清 IL-4 的浓度

Table 3 The levels of IL-4 in serum of three group mice ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 浓度 (pg/ml) |
|-------|----|--------------------------------|
| 哮喘组 | 10 | 61.38 \pm 6.53 ^{*#} |
| 地塞米松组 | 10 | 28.65 \pm 5.33 [*] |
| 对照组 | 10 | 15.10 \pm 3.05 |

与对照组比较, $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, [#] $P < 0.05$ 。

表 1 3 组小鼠体重增长趋势

Table 1 Body weight growth trends of three group mice ($g, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 第 1 天 | 第 7 天 | 第 28 天 |
|-------|----|------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 哮喘组 | 10 | 20.68 \pm 0.32 | 21.50 \pm 0.33 ^{*#} | 23.42 \pm 0.40 ^{*#} |
| 地塞米松组 | 10 | 20.77 \pm 0.31 | 22.09 \pm 0.23 [*] | 25.23 \pm 0.34 [*] |
| 对照组 | 10 | 21.03 \pm 0.40 | 23.05 \pm 0.30 | 26.97 \pm 0.39 |

与对照组比较, $P < 0.05$; 与地塞米松组比较, [#] $P < 0.05$ 。

mRNA 经 RT-PCR 半定量实验测量灰度值发现哮喘组小鼠肺组织的 *ORMDL3* mRNA 的表达较对照组显著增加 ($P < 0.05$); 而地塞米松组 OVA 致敏的小鼠肺组织 *ORMDL3* mRNA 表达较哮喘组减少, 未达到统计学意义 ($P > 0.05$), 但仍高于对照组 (图 2)。

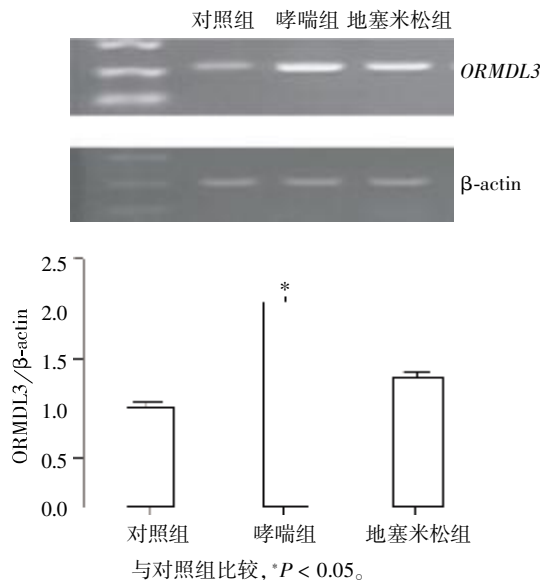


图 2 小鼠肺组织 *ORMDL3* mRNA 的表达

Figure 2 Expression of *ORMDL3* mRNA in murine lung tissue

3 讨论

ORMDL3 基因是新近发现的一种哮喘相关基因, Moffatt^[4]等首次运用全基因组关联研究鉴定了这个基因。该基因与未折叠蛋白反应(unfold protein response, UPR)及细胞的鞘脂类代谢平衡相关^[5-6], 其功能延伸至多种炎症疾病和过敏性疾病中, 比如炎症性肠病(包括溃疡性结肠炎^[7-9])、强直性脊柱炎、支气管哮喘。北京儿童医院和首都儿科研究所的 60 例哮喘儿童及 60 例对照儿童外周血的研究发现, *ORMDL3* 基因的 mRNA 表达水平在哮喘组中显著高于对照组^[10]。Kang 等^[11]通过对亚洲地区的 1 411 例儿童(包括哮喘组和对照组)进行相关研究发现, 染色体 17q12~q21 区包含的基因 *gasdermin B* (*GSDMB*)/*ORMDL3* 的突变能引起气道高反应性和哮喘, 而嗜酸性粒细胞炎症可能在这个过程中起到了间接作用。这个研究, 首次揭示了 *GSDMB/ORMDL3* 的多态性可以对嗜酸性粒细胞介导的气道高反应性产生影响。本实验中哮喘组小鼠的外周血及肺组织 HE 染色切片中均可见大量嗜酸性粒细胞聚集, 与之对应的哮喘组小鼠 *ORMDL3* mRNA 表达较对照组显著升高与以上理论相符合。

糖皮质激素作为哮喘长期治疗的一线用药, 可

以有效控制气道高反应性, 减轻气道炎症。实验中发现哮喘组小鼠生长发育迟滞, 经地塞米松干预后小鼠体重增长显著, 说明该药对内环境平衡有促进作用。而地塞米松有效抑制 IL-4 的同时伴随 *ORMDL3* 的 mRNA 水平表达降低, 其可能的作用机制有: ① IL-4 能激活 JAK/STAT6 经典通路诱发哮喘^[12], 而信号转导和转录激活因子 6 (STAT6) 能直接调节 *ORMDL3* 的表达^[13], 因此推断地塞米松通过抑制 IL-4 的分泌间接抑制 STAT6 激活从而下调 *ORMDL3* 的表达。② IL-4 可以直接调控 *ORMDL3* mRNA 的表达^[13], 由于糖皮质激素对 IL-4 有直接的抑制作用, 因此推断使用糖皮质激素能通过 IL-4 下调 *ORMDL3* 的表达从而抑制哮喘炎症的发生。而地塞米松组 *ORMDL3* mRNA 虽有降低但未达到统计学意义, 可能的原因有: 模型数量有限; 造模的激发时间和糖皮质激素的给药剂量及疗程有待调整; 实验方法可采用更精确的实时定量 PCR 法, 因此仍需进一步实验求证。

作为一种新发现的哮喘相关基因, *ORMDL3* 无疑为哮喘发病与治疗的探索提供了新的靶点。*ORMDL3* 究竟是通过何种信号转导途径来参与调控机体的免疫系统, 又是如何与环境及个体因素相互作用, 这些都需要进一步的实验明确, 从而为探索在新的环节上对哮喘进行干预治疗提供思路。

[参考文献]

- [1] 中华医学会儿科分会呼吸学组. 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 745
- [2] 刘日明, 吴建民, 高岩, 等. 地塞米松对小鼠哮喘模型脾巨细胞 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(9): 742-746
- [3] 刘成玉. 临床检验基础实验指导[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 32-34
- [4] Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473
- [5] Han S, Lone MA, Schneiter R, et al. Orml and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(13): 5851-5856
- [6] Breslow DK, Collins SR, Bodenmiller B, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis [J]. Nature, 2010, 463(7284): 1048-1053
- [7] Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, et al. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge [J]. Gut, 2011, 60(11): 1580-1588
- [8] Lsukens D, Georges M, Libioulle C, et al. Evidence for

significant overlap between common risk variants for Crohn's disease and ankylosing spondylitis [J]. Plos One, 2010, 5 (11):e13795

[9] Kaser A, Martinez-Naves E, Blumberg RS. Endoplasmic reticulum stress: implications for inflammatory bowel disease pathogenesis [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2010, 26 (4): 318-326

[10] 金哲, 蔡欣, 王强, 等. 北京地区哮喘儿童 ORMDL3 基因表达水平、生活方式与室内空气质量的相关性研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(10): 22-25

[11] Kang MJ, Yu HS, Seo JH, et al. GSDMB/ORMDL3 variants contribute to asthma susceptibility and eosinophil-mediated bronchial hyperresponsiveness [J]. Hum Immunol, 2012, 73(9): 954-959

[12] Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, et al. Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling [J]. Immunol Today, 2000, 21(2): 60-64

[13] Miller M, Tam AB, Cho JY, et al. ORMDL3 is an inducible lung epithelial gene regulating metalloproteases, chemokines, OAS, and ATF6 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(41): 16648-16653

[收稿日期] 2013-01-17

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方, 均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写, 如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字; 多位阿拉伯数字不能拆开转行; 小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙, 不用千分撇“,”; 数值的有效数字应全部写出, 如“1.50、1.75、2.00”, 不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围: 5~10; 注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$, 不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围: 20%~30%, 不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围: 1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围: $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 不写成 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, $(85 \pm 2)\%$ 不能写成 $85 \pm 2\%$;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为: 50 cm×80 cm×100 cm, 不能写成 50×80×100 cm, 或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑: 接雅俐)