

SDF-1 及 CXCR4 在哮喘小鼠肺组织中的表达及布地奈德的干预作用

栾斌 黄先杰 乔俊英

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 探讨哮喘小鼠发病过程中基质细胞衍生因子-1(SDF-1)及其受体 CXCR4 在肺内表达的变化及布地奈德的干预影响。方法 清洁级雄性 BALB/c 小鼠 30 只,随机分为对照组、干预组及哮喘组。观察卵蛋白激发及用布地奈德干预后哮喘小鼠气道的病理变化;免疫组织化学染色观察 SDF-1 表达的变化;RT-PCR 法观察 CXCR4 mRNA 表达的变化。结果 SDF-1 及 CXCR4 mRNA 在对照组中呈低表达,在哮喘组中表达明显增加,使用布地奈德进行干预后 SDF-1 及 CXCR4 mRNA 的表达明显降低(0.426 ± 0.052 vs 0.361 ± 0.065 ; 0.829 ± 0.027 vs 0.723 ± 0.094 ; $P < 0.05$),且二者表达量均与气道壁厚度呈正相关($r = 0.744$, $P < 0.01$; $r = 0.553$, $P < 0.01$)。结论 SDF-1 及其受体 CXCR4 可能参与了哮喘小鼠气道重塑过程,布地奈德干预改善哮喘小鼠的气道重塑可能与降低 SDF-1 及 CXCR4 的表达有关。 [中国当代儿科杂志,2010,12(3):215-218]

[关键词] 哮喘;气道重塑;基质细胞衍生因子-1;CXCR4 趋化因子受体4;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)03-0215-04

Expression of stromal cell derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor 4 and the effects of budesonide on their expression in mice with asthma

LUAN Bin, HUANG Xian-Jie, QIAO Jun-Ying. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: luanbin0588@tom.com)

Abstract: Objective To study the expression of stromal cell derived factor-1(SDF-1) and CXCR4 chemokine receptor 4 (CXCR4) in the airway and the effect of budesonide on their expression in mice with asthma. **Methods** Thirty BALB/c male mice were randomly divided into three groups: placebo control, untreated asthma, and budesonide-treated asthma. The asthma group were induced by intraperitoneal injection of 10% ovalbumin (OVA) on days 1, 8 and 15, and then from days 22 to 34, challenged by inhalation of 2% OVA aerosol every other day. The budesonide-treated asthma group received an inhalation of budesonide (1 mg) before OVA challenge. The pathological changes of the airway were assessed by hematoxylin and eosin staining. The immunohistochemistry was used to estimate the expression of SDF-1 in the lung. RT-PCR was used to evaluate the expression of CXCR4 in the lung. **Results** Compared with the control group, SDF-1 and CXCR4 expression in the lung in the untreated asthma group increased significantly ($P < 0.05$). The budesonide-treated asthma group demonstrated significantly decreased SDF-1 (0.426 ± 0.052 vs 0.361 ± 0.065 ; $P < 0.05$) and CXCR4 (0.829 ± 0.027 vs 0.723 ± 0.094 ; $P < 0.05$) expression in the lung as compared with the untreated asthma group. Both SDF-1 ($r = 0.744$, $P < 0.01$) and CXCR4 ($r = 0.553$, $P < 0.01$) were positively correlated with the thickness of the airway wall. **Conclusions** SDF-1 and CXCR4 may be associated with airway remodeling in mice with asthma. Budesonide can improve airway remodeling, possibly by decreasing the expression of SDF-1 and CXCR4.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(3):215-218]

Key words: Asthma; Airway remodeling; Stromal cell derived factor-1; CXCR4 chemokine receptor 4; Mice

支气管哮喘是由多种细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症,以气道高反应性和气道重塑为特点。而气道重塑的发生可能是哮喘难以完全治愈及肺功能逐渐下降的重要原因之一,但目前对于气道重塑的发生机制并没有完全阐明。基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1, SDF-1)及 CXC 趋化因

子受体4(CXC chemokine receptor 4, CXCR4)属于趋化因子家族,两者共同作用参与了造血干细胞的迁移及归巢、介导免疫及炎症反应、促进血管生成,在肿瘤、类风湿性关节炎、血液系统疾病及 HIV 感染中研究较为广泛,在哮喘气道重塑中的研究较少。本研究通过建立小鼠哮喘模型,观察气道重塑的病

理变化和 SDF-1 及 CXCR4 在小鼠肺内的表达情况, 以及布地奈德的干预对其表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

卵蛋白(OVA)为美国 Sigma 公司产品;布地奈德混悬液由阿斯利康制药公司生产;RT-PCR 试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成;免疫组化兔抗小鼠 SDF-1 多克隆抗体购于 Santeruz 生物科技公司;SP 试剂盒及 DAB 显色剂均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和模型制作方法 雄性清洁级 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 30 只,由河北医科大学动物实验中心提供,体重为 15.2 ± 1.03 g,应用随机数字表法将其随机分为对照组、哮喘组和干预组,每组 10 只。模型制作参照文献^[1-2]并加以改进。哮喘组小鼠于第 1 天、第 8 天和第 15 天腹腔注射卵蛋白/氢氧化铝混合液 0.2 mL(内含卵蛋白 20 μ g,氢氧化铝 1 mg)致敏,从第 22 天开始用 2% OVA 生理盐水雾化吸入激发,隔天一次,每次 30 min,共激发 7 次;干预组以相同方法致敏和激发,每次 OVA 雾化激发 30 min 前用 1 mg 布地奈德混悬液雾化治疗;对照组使用生理盐水致敏和激发,方法同哮喘组。

1.2.2 肺组织标本处理 各组小鼠于末次雾化结束后 24 h 内用戊巴比妥钠 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,迅速开胸取左肺,置于液氮冻存,留作 RT-PCR 用,然后经右心室插管至肺动脉,用生理盐水快速冲洗后取右肺中叶,置于 4% 甲醛溶液固定 24 h,酒精梯度脱水,石蜡包埋,做厚度 5 μ m 切片,分别做 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.2.3 免疫组化及苏木精-伊红染色 石蜡切片常规脱蜡至水,抗原修复,3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,滴加一抗、二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物,DAB 显色,苏木素复染,脱水封片,阳性表达为胞浆内呈棕黄色。SDF-1 抗体稀释浓度为 1:100。苏木精-伊红于石蜡切片脱蜡后直接行苏木精-伊红染色,脱水封片。结果分析采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件,对苏木精-伊红染色图片测定相同级别的完整的支气管横断面的支气管壁面积(μm^2)、气道上皮黏膜层面积(μm^2)、气道平滑肌面积(μm^2),并将其与基底膜周径(μm)的比值代表气道壁厚度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)、上皮

黏膜层厚度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)、平滑肌层厚度($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)。对于免疫组化图片测定阳性区平均光密度值,每张切片选择至少 5 个高倍镜视野,取其平均值作为该切片的代表值。

1.2.4 RT-PCR 将冻存左肺用 Trizol 法提取总 RNA,并逆转录为 cDNA,设计引物扩增目的片段。CXCR4 上游引物为 5'-GGC TGA CCT CCT CTT TGT-3',下游引物为 5'-GTT TCC TTG GCC TTT GAC-3'。 β -actin 上游引物为 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCG C-3',下游引物为 5'-CCA CAG GAT TCC AT C CCA A-3'。扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,用 Band Scan 5.0 凝胶分析软件分别测定 CXCR4 与 β -actin 的灰度值,并以 CXCR4 与 β -actin 的比值作为该小鼠的代表值。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 16.0 进行数据分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验,各因素之间的相关性采用 pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

哮喘组小鼠经过 OVA 激发后,均出现不同程度的呼吸急促、腹部扇动、烦躁不安、饮水量增多等现象,干预组上述表现较其轻微,对照组无上述异常改变。

2.2 病理学改变

在高倍镜下观察,哮喘组小鼠气道壁增厚,管腔变形狭窄,气道上皮细胞脱落,杯状细胞化生,黏液分泌增多,平滑肌层明显增厚,黏膜下及管壁周围炎性细胞浸润明显。干预组上皮细胞偶有脱落,黏膜相对完整,气道壁增厚及炎症细胞浸润均明显轻于哮喘组。对照组肺组织几乎无上述病理改变。见图 1、表 1。

2.3 免疫组化结果

SDF-1 在对照组中呈弱阳性表达,在哮喘组表达明显增多,经布地奈德干预其表达量有所减少,但仍较对照组多($P < 0.05$)。见图 1、表 2。

2.4 RT-PCR 结果

对照组 CXCR4 mRNA 表达量较少,哮喘组表达量明显增多,布地奈德干预组其表达量有所减少,但仍较对照组多($P < 0.05$)。见表 2。

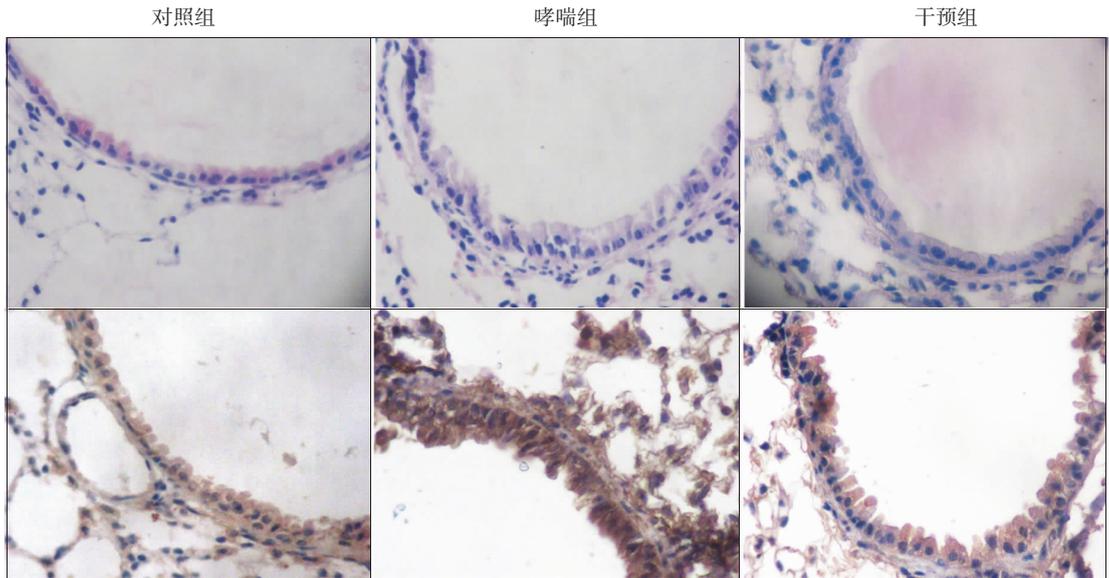


图1 各组小鼠气道结构(苏木精-伊红染色×400,上排)和SDF-1免疫组化染色(×400,下排) 上排示对照组气道壁较薄;哮喘组可见气道壁明显增厚,并见炎症细胞浸润;干预组经布地奈德干预后,气道壁增厚及炎症细胞浸润减轻。下排示对照组气道上皮细胞呈棕黄色,呈弱阳性表达;哮喘组气道上皮细胞呈深棕黄色,强阳性表达;干预组经布地奈德干预后,表达明显减弱。

表1 各组小鼠气道壁厚度、上皮层厚度和平滑肌厚度的比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$)

组别	鼠数	气道壁厚度	上皮黏膜层厚度	平滑肌层厚度
对照组	10	16.5 ± 3.0	8.2 ± 1.5	5.7 ± 1.0
哮喘组	10	29.2 ± 4.4 ^a	14.6 ± 2.1 ^a	9.9 ± 1.5 ^a
干预组	10	20.6 ± 3.3 ^{a,b}	10.0 ± 1.7 ^{a,b}	6.9 ± 1.2 ^{a,b}
F值		32.088	34.995	30.462
P值		<0.05	<0.05	<0.05

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与哮喘组比较, $P < 0.05$

表2 各组小鼠SDF-1和CXCR4表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SDF-1	CXCR4 mRNA
对照组	10	0.27 ± 0.04	0.61 ± 0.12
哮喘组	10	0.47 ± 0.05 ^a	0.83 ± 0.03 ^a
干预组	10	0.36 ± 0.07 ^{a,b}	0.72 ± 0.09 ^{a,b}
F值		22.604	11.698
P值		<0.05	<0.05

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与哮喘组比较, $P < 0.05$

2.5 相关性分析结果

SDF-1表达量与气道壁厚度呈正相关($r = 0.744, P < 0.01$);CXCR4 mRNA表达量与气道壁厚度呈正相关($r = 0.553, P < 0.01$)。

3 讨论

尽管哮喘一直被认为是气流可逆性受阻的疾病,但在许多哮喘患者中都发现了不完全可逆气流受阻的证据,这种不可逆性气流受阻与气道结构的

改变即气道重塑有着密切的关系。本研究通过建立小鼠哮喘模型,探讨SDF-1及CXCR4在哮喘气道重塑中的作用。

Locke等^[3]对3种常见的卵蛋白雾化激发哮喘模型进行了对比,包括连续4d的急性哮喘模型、连续7d的亚急性哮喘模型及每周3次连续6周的慢性哮喘模型,发现短时间暴露于卵蛋白足以引起重塑的早期改变。杯状细胞增生及上皮层增厚在雾化4d后已经发生,在慢性哮喘中,这些改变持续发展,另外,上皮下胶原沉积明显增加。急性和亚急性哮喘模型表现出明显的气道炎症,但在慢性哮喘模型中气道炎症却并不明显。气道高反应性在3种哮喘模式中都存在,但是在慢性哮喘模型中最显著。本研究对亚急性模型进行了改进,将连续雾化7d改为隔日一次,这样使气道结构的改变更明显,而不需要更长的时间。在本研究中,可见哮喘组小鼠呼吸急促、腹部扇动、烦躁不安、饮水量增多等现象。肺组织切片可见上皮层增生,炎症细胞浸润,平滑肌层增厚,说明模型制作是成功的。

炎症细胞浸润是哮喘气道的一个特点,并且参与了哮喘的发病过程^[4]。在这些炎症细胞中,以淋巴细胞及嗜酸性粒细胞为主。基质细胞衍生因子-1(SDF-1)又称CXC趋化因子配体12(CXCL12),属于CXC趋化因子家族,是目前已知最强的T淋巴细胞趋化物质^[5],对于单核细胞、嗜酸性粒细胞也有很强的趋化作用。Gonzalo等^[6]在小鼠变应性气道

疾病模型中用特异性抗体中和 SDF-1 可明显降低小鼠肺部嗜酸性粒细胞数目及气道高反应性。本研究采用免疫组化的方法检测到在哮喘小鼠肺部 SDF-1 表达明显增多,与文献报道^[7]一致,增多的 SDF-1 会趋化更多的炎症细胞到达肺部,加重肺部的炎症损伤,损伤的气道结构细胞会产生及释放多种生长因子及炎症介质,参与并加重气道重塑的发生发展。另外 SDF-1 在哮喘气道血管生成中也发挥重要作用,Hoshino 等^[7]研究发现哮喘患者气道黏膜下血管的增多与肺部 SDF-1 阳性细胞数目呈正相关。另有报道在小鼠黏膜下注射 SDF-1 明显诱导局部小血管的生成并伴有白细胞的浸润^[8]。已有研究表明气道血管生成及血管重塑介导了气道黏膜白细胞浸润及血浆蛋白的渗出^[9],从而参与气道重塑的发生。

CXC 趋化因子受体 4 (CXCR4) 是一种七次跨膜的糖蛋白受体,也属于 CXC 趋化因子家族,是 SDF-1 的特异性受体,主要表达于造血细胞、大部分 T 淋巴细胞、所有的 B 淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞,并在机体的多数组织中有构成性表达。本研究用 RT-PCR 的方法检测到哮喘小鼠肺内 CXCR4 mRNA 表达增多,可以从两个方面解释:①支气管上皮细胞表达 CXCR4 增多。Eddleston 等^[10]曾对正常人支气管上皮细胞进行培养,发现支气管上皮细胞有 CXCR4 表达,且缓激肽及 IL-1 β 能明显增加 CXCR4 的表达,利用 SDF-1 与上皮细胞表达的 CXCR4 结合,能够激活下游的胞外信号调节激酶、应激活化蛋白激酶、c-Jun 氨基酸末端激酶信号途径;②表达 CXCR4 的炎症细胞在肺内增多及炎症细胞表面表达 CXCR4 增多。有研究表明 INF- γ 、TNF- α 及 TGF- β 能上调嗜酸性粒细胞表面 CXCR4 的表达^[11],而 IL-4 能诱导 T 淋巴细胞表面表达 CXCR4 增多^[12]。Gonzalo 等^[6]对卵蛋白激发的气道过敏性疾病 (airway allergic disease, AAD) 小鼠模型研究,发现 CXCR4⁺ 的单核细胞、T 淋巴细胞在 AAD 小鼠肺内浸润增多,且发现这些肺内的这些炎症细胞与外周血中细胞相比,表面表达 CXCR4 增多。同时他们利用逆转录病毒将 CXCR4 cDNA 导入到小鼠的白细胞,再用卵蛋白激发制作过敏性疾病模型,肺部炎症反应明显强于正常小鼠。而 Lukacs 等^[13]利用 CXCR4 特异性抗体 AMD3100 对哮喘小鼠进行干预,发现其能明显减轻气道炎症、降低气道高反应性。

研究证实,吸入糖皮质激素能有效减轻哮喘症状、改善生活质量、改善肺功能,降低气道高反应性,控制气道炎症,减少哮喘发作频次和程度,并且能降低哮喘死亡率。布地奈德混悬液是一种非卤代化的

糖皮质激素,具有局部抗炎作用强、作用时间长、全身副作用小等特点,临床应用较为广泛。本研究应用吸入布地奈德干预哮喘小鼠,干预组 SDF-1 及 CXCR4 的表达与哮喘组比较明显下降,气道重塑也得到改善,表明布地奈德改善哮喘小鼠的气道重塑可能与降低 SDF-1 和 CXCR4 的表达有关。其机制可能与细胞因子的相互调节有关,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Du Q, Chen Z, Zhou LF, Zhang Q, Huang M, Yin KS. Inhibitory effects of astragaloside IV on ovalbumin-induced chronic experimental asthma[J]. *Can J Physiol. Pharmacol*, 2008, 86(7): 449-457.
- [2] Rydell-Törmänen K, Uller L, Erjefält JS. Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation [J]. *Respir Res*, 2008, 9:18.
- [3] Locke NR, Royce SG, Wainwright JS, Samuel CS, Tang ML. Comparison of airway remodeling in acute, subacute, and chronic models of allergic airways disease[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007, 36(5):625-632.
- [4] James AL, Wenzel S. Clinical relevance of airway remodeling in airway diseases[J]. *Eur Respir J*, 2007, 30(1): 134-155.
- [5] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor (SDF) [J]. *J Exp Med*, 1996, 184(3): 1101-1109.
- [6] Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 α in the inflammatory component of allergic airway disease[J]. *J Immunol*, 2000, 165(1):499-508.
- [7] Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma[J]. *J Eur Respir*, 2003, 21(5):804-809.
- [8] Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells[J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(4):1125-1135.
- [9] McDonald DM. Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 2): S39-S45.
- [10] Eddleston J, Christiansen SC, Iuraw BL. Functional expression of the C-X-C chemokine receptor CXCR4 by human bronchial epithelial cells: regulation by proinflammatory mediators[J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6445-6451.
- [11] Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Ohta K, Yamamoto K, et al. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation[J]. *J Immunol*, 2000, 164(11): 5935-5943.
- [12] Jourdan P, Abbal C, Nora N, Hori T, Uchiyama T, Vendrell JP, et al. Cutting edge: IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells[J]. *J Immunol*, 1998, 160:4153-4157.
- [13] Lukacs NW, Berlin A, Schols D, Skerlj RT, Bridger GJ. AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(4):1353-1360.

(本文编辑:黄 榕)