

论著·实验研究

## 布地奈德对哮喘大鼠支气管-肺组织病理及肺部 TSLP 表达的影响

刘辉 潘家华 楼皖玲 何金根

(安徽省立医院儿科,安徽 合肥 230001)

**[摘要]** 目的 胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)是启动树突状细胞介导的过敏反应的重要物质。本研究旨在观察布地奈德对哮喘大鼠肺部 TSLP 表达的影响及对支气管-肺组织病理的影响。**方法** 采用卵清蛋白(OVA)腹腔注射2次致敏及雾化吸入4周激发建立哮喘大鼠模型,并在激发第22天将动物随机分为布地奈德组(每天吸入布地奈德0.32 mg/kg,共7 d)、哮喘组(每天吸入等量生理盐水,共7 d)。荧光免疫组化法、Western blot 法分别检测激发后第29天、36天肺 TSLP 水平,并作支气管-肺组织病理检查。**结果** 布地奈德组第29天肺部炎症较哮喘组轻,停药7 d后肺部炎症明显加重,杯状细胞增多。激发后第29天、36天肺组织 TSLP 表达均低于哮喘组( $P < 0.05$ )。**结论** 布地奈德能抑制 TSLP 表达,减轻哮喘大鼠肺部炎症细胞浸润,但停药后肺部炎症再次加重。 [中国当代儿科杂志,2010,12(10):816-819]

**[关键词]** 哮喘;胸腺基质淋巴细胞生成素;布地奈德;大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0816-04

### Effects of inhaled budesonide on the bronchial-pulmonary pathology and expression of thymic stromal lymphopoietin in lung tissues in asthmatic rats

LIU Hui, PAN Jia-Hua, LOU Wan-Ling, HE Jin-Gen. Department of Pediatrics, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China (Pan J-H, Email: Panjh@ah163.com)

**Abstract: Objective** Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) plays an important role in initiating dendritic cell mediated allergic inflammation. This study was designed to examine the effects of inhaled budesonide on TSLP expression in the lung tissues and on the bronchial-pulmonary pathology in asthmatic rats. **Methods** Thirty-two female Sprague-Dawley rats were sensitized and challenged with inhaled ovalbumin (OVA) to induce asthma. The asthmatic rats were randomly divided into 2 groups on the 22nd day of OVA challenge: a budesonide treatment group that received inhaled budesonide at 0.32 mg/kg daily for 7 days and an asthma control group that received inhaled 0.9% normal saline for 7 days. TSLP expression in the lung tissues was measured by Western blot and fluorescent-immunohistochemistry 29 and 36 days after OVA challenge. Bronchial-pulmonary pathological changes were evaluated by hematoxylin & eosin and periodic acid-schiff staining. **Results** Budesonide treatment alleviated airway inflammation when compared with the asthma control group 29 days after OVA challenge. However, the airway inflammatory reactions were aggravated in the budesonide treatment group 36 days after OVA challenge (7 days after budesonide discontinuance). TSLP expression in the lung tissues was significantly lower in the budesonide treatment group than that in the asthma control group both 29 and 36 days after OVA challenge ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Inhaled budesonide can inhibit the TSLP expression in the lung tissues and alleviate lung inflammatory reactions in asthmatic rats, but there is end-of-dose failure.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(10):816-819]

**Key words:** Asthma; Thymic stromal lymphopoietin; Budesonid; Rats

哮喘发病机制极为复杂,目前认为与气道炎症、过敏反应激活引发细胞因子网络的紊乱、微生物感染诱发等有关。胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)在体内扮演着启动树突

状细胞介导的过敏反应的重要角色<sup>[1]</sup>。目前治疗哮喘药物包括控制性药物和缓解性药物,新的疗法正在研究和开发,免疫调节剂和阻断直接诱发哮喘发病中炎症瀑布的特异性成分药物成为研究热点。

[收稿日期]2010-02-08; [修回日期]2010-03-12

[作者简介]刘辉,女,硕士,主治医师。

[通信作者]潘家华,教授。

布地奈德混悬液是新合成的肾上腺皮质激素,有较高的糖皮质激素受体结合力,具有明显的抗过敏、抗炎、抑制支气管痉挛的作用<sup>[2]</sup>。本研究拟用布地奈德治疗哮喘动物模型,观察布地奈德对大鼠肺组织 TSLP 的表达和支气管-肺组织病理变化。

## 1 材料和方法

### 1.1 哮喘模型建立

选用 250 ~ 300 g 健康 Sprague Dawley (SD) 雌性大鼠 40 只,随机抽取 32 只制备哮喘动物模型。第 1 天、第 8 天分别给 32 只大鼠腹腔注射 1 mL 0.1% 卵清蛋白 (OVA) 致敏,第 15 天起所有大鼠置于自制的 86 cm × 40 cm × 40 cm 纸箱内,使用压缩雾化器 (德国百瑞) 雾化吸入 1% OVA 进行激发,每天 1 次,每次 30 min,共 4 周。余 8 只作为对照组,用生理盐水代替 OVA 混悬液,步骤同上。

### 1.2 实验分组及处理

参照叶辉等<sup>[3]</sup>方法。激发第 22 天大鼠随机分成 2 组:布地奈德组及哮喘组。布地奈德组雾化吸入布地奈德混悬液 (阿斯利康公司) 0.32 mg/kg,每日 1 次,共 7 次;哮喘组雾化吸入生理盐水,每日 1 次,共 7 次;对照组雾化吸入生理盐水,每日 1 次,共 7 次。激发后第 29 天、第 36 天分批处死各组大鼠。快速分离支气管肺组织,进行各项指标检测。

### 1.3 支气管-肺组织光镜病理

取大鼠部分肺组织,置于 4% 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片,苏木精-伊红染色 (HE)、高碘酸希夫染色 (PAS) 镜检。

### 1.4 肺组织 TSLP Western blot

从肺组织中提取细胞总蛋白,进行蛋白含量的测定,SDS-PAGE 电泳分离,转膜,将膜封闭后依次加入一抗,辣根过氧化物酶标记的相应二抗,化学发光显示目的条带,试验重复 3 次。吸光度 (A) 值的测定用 Image-Pro Plus 图像分析软件对各蛋白条带和  $\beta$ -tubulin 条带进行分析,以各条带的灰度值代表其蛋白的表达量,用  $\beta$ -tubulin 条带灰度值进行校正,得出各条带的相对灰度值。

### 1.5 肺组织 TSLP 荧光免疫组化方法

新鲜采集的大鼠肺组织置于冰冻切片机,进行恒冷箱连续切片,片厚 10  $\mu$ m,置于 PBS 中浸洗 30 min,干燥后行 TSLP 免疫荧光片染。加入兔抗 TSLP 多克隆抗体 (SIGMA 公司),室温避光孵育 10 ~ 12 h,洗去一抗,加 FITC 标记羊抗兔 IgG (武汉博士德公司),孵育 1 ~ 3 h,洗去二抗,干燥,封片,

Olympus IX51 荧光显微镜下观察、记数并摄影。

## 1.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计,所得结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较,符合正态分布的采用方差分析;两组间比较采用  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 支气管-肺病理变化

哮喘组激发后第 29 天支气管黏膜上皮杯状细胞增多,黏膜下层淋巴细胞浸润增多。肺内小气管上皮内杯状细胞增多,周围间质中淋巴细胞中 ~ 重度浸润,肺泡隔明显增宽,肺泡腔有红细胞 (RBC)、淋巴细胞渗出;第 36 天支气管黏膜上皮呈假复层柱状上皮,黏膜下层浸润淋巴细胞数量减少,肺内小气管上皮内杯状细胞仍较多,肺间质淋巴细胞重度浸润,肺泡隔增宽程度有所减轻。与哮喘组比较,布地奈德组激发后第 29 天支气管黏膜上皮呈假复层上皮改变,上皮细胞脱落较少,黏膜层淋巴细胞浸润较少,肺内小气管黏膜上皮中杯状细胞增多,周围间质中淋巴细胞浸润较少,肺泡隔增宽;第 36 天肺内小气管上皮中杯状细胞明显增多,周围间质淋巴细胞重度浸润,肺泡隔增宽明显。见图 1。

### 2.2 荧光免疫组化结果

各组 TSLP 阳性细胞主要包括巨噬细胞、肥大细胞、淋巴细胞,成群分布于肺内气道与血管周围结缔组织中,肺泡隔内的阳性细胞散在分布。与对照组比较,激发后第 29、36 天哮喘组及布地奈德组大鼠肺组织 TSLP 表达阳性细胞数目均明显增高 ( $F = 652.4, 598.7, P < 0.01$ )。激发后第 29、36 天布地奈德组大鼠肺组织 TSLP 表达阳性细胞数目均低于哮喘组 ( $P < 0.05$ );哮喘组和布地奈德组大鼠肺组织 TSLP 阳性细胞数在激发后第 36 天均较第 29 天减少,差异有统计学意义 ( $t = 4.95, 2.78, P < 0.05$ )。见表 1,图 2。

### 2.3 Western blot 结果

TSLP 蛋白条带为 19 KD。激发后第 29、36 天哮喘组大鼠肺组织 TSLP 蛋白条带灰度值均高于布地奈德组。哮喘组、布地奈德组大鼠肺组织 TSLP 蛋白条带灰度值激发后第 36 天较第 29 天减少,差异有统计学意义 ( $t = 8.76, 7.03, P < 0.05$ ),与对照组相比,激发后第 29、36 天哮喘组及布地奈德组大鼠肺组织 TSLP 蛋白条带灰度值均显著增高,  $F = 670.6, 544.9, P < 0.01$ 。见表 1,图 3。

表1 肺组织 TSLP 蛋白的 Western blot 灰度值和 TSLP 阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	灰度值		TSLP 阳性细胞数(/mm <sup>2</sup> )	
		激发后第 29 天	激发后第 36 天	激发后第 29 天	激发后第 36 天
对照组	4	0	0	2.2 ± 0.8	1.8 ± 0.5
哮喘组	8	3 491 ± 200 <sup>e</sup>	2 956 ± 178 <sup>a,e</sup>	39.8 ± 1.7 <sup>e</sup>	35.6 ± 3.9 <sup>a,e</sup>
布地奈德组	8	2 610 ± 139 <sup>b,e</sup>	2 211 ± 145 <sup>a,b,e</sup>	30.9 ± 2.0 <sup>b,e</sup>	28.5 ± 1.6 <sup>a,b,e</sup>
F 值		670.6	544.9	652.4	598.7
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与同组激发后第 29 天比较,  $P < 0.05$ ; b: 与哮喘组比较,  $P < 0.05$ ; c: 与对照组比较,  $P < 0.05$

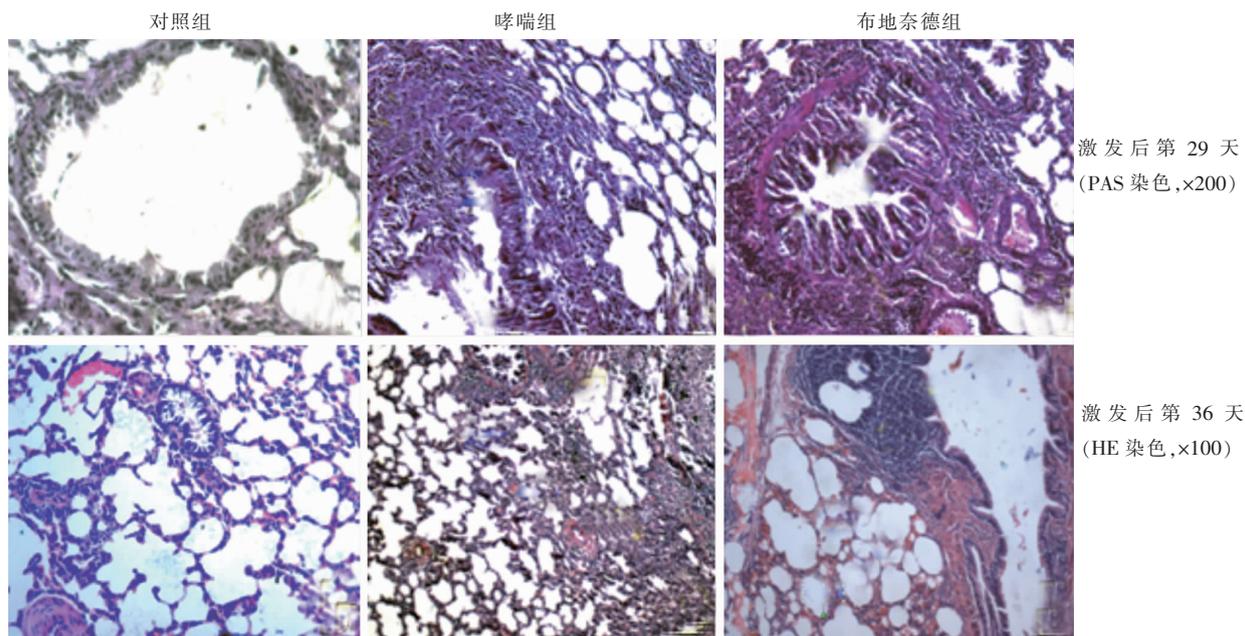


图1 3组大鼠支气管-肺组织病理切片 对照组肺部无病理改变。哮喘组激发后第 29 天肺内小气管上皮内杯状细胞增多, 黏膜下层淋巴细胞浸润增多; 第 36 天肺泡隔增宽程度有所减轻, 隔内仍有淋巴细胞浸润, 肺泡腔有淋巴细胞、红细胞渗出。布地奈德组激发后第 29 天肺内小气管上皮内杯状细胞大量增多, 上皮细胞脱落少, 黏膜层结缔组织中浸润淋巴细胞较少; 激发后第 36 天, 肺内小气管黏膜上皮呈复层上皮, 杯状细胞仍多, 周围间质淋巴细胞重度浸润, 肺泡腔大量 RBC 和淋巴细胞渗出。

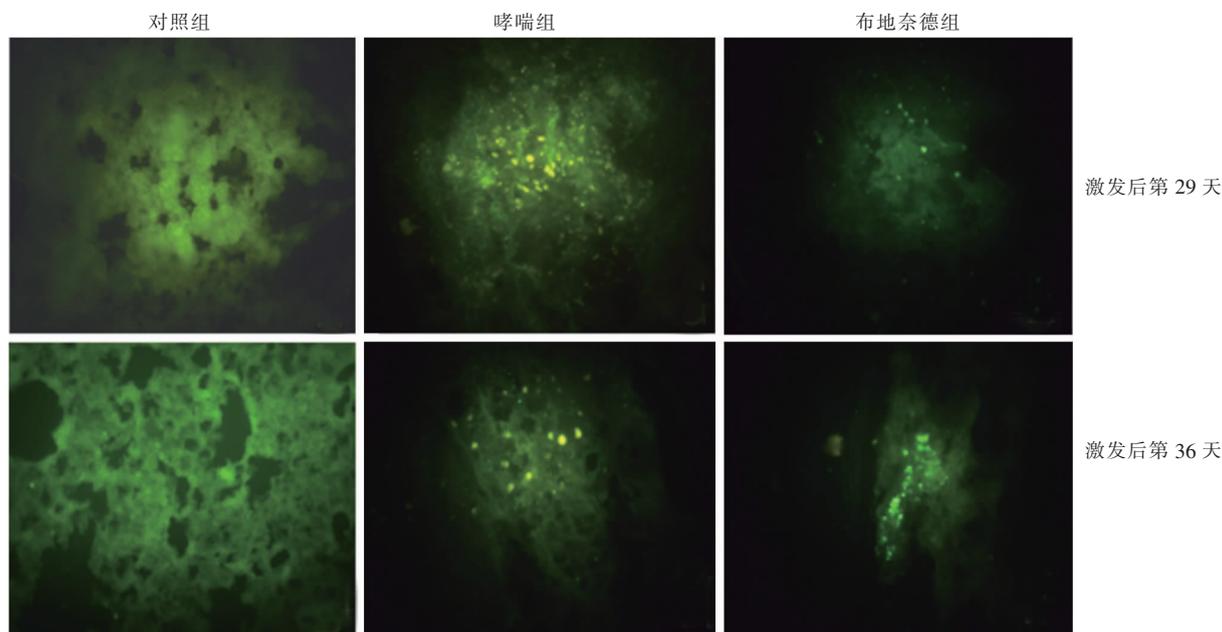


图2 3组肺组织 TSLP 表达 (荧光免疫组化,  $\times 400$ ) 对照组 TSLP 阳性细胞极少, 散在分布。哮喘组激发后第 29 天 TSLP 阳性细胞数目多; 激发后第 36 天 TSLP 阳性细胞数目比第 29 天减少。布地奈德组激发后第 29 天 TSLP 阳性细胞数目较哮喘组减少; 激发后第 36 天 TSLP 阳性细胞数目低于第 29 天。

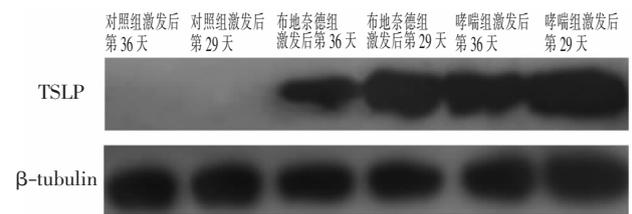


图3 Western blot法测定各组大鼠肺组织 TSLP 表达情况

### 3 讨论

哮喘的严重度实际由气道阻塞、气道高反应性和气道重塑的程度共同决定。目前有证据表明哮喘可能存在以下几种病理改变：(1)持续性的气道炎症。哮喘持续状态患儿尸检表明气道有大量的淋巴细胞和酸性粒细胞(EOS)浸润；(2)气道重塑导致不可逆的气道阻塞；(3)炎症延伸到远端气道甚至肺泡，致死性哮喘患者尸检表明哮喘的炎症反应和结构变化已延伸到小气道<sup>[4]</sup>。当前多数吸入激素并不能到达远端气道，故其疗效受到影响。

本研究观察到哮喘组支气管大量上皮细胞脱落，基底膜增厚，黏膜下层 EOS 和淋巴细胞中~重度浸润，肺内小气管杯状细胞明显增多，管壁周围淋巴细胞重度浸润，符合哮喘病理特征改变。布地奈德组激发后第 29 天大鼠支气管-肺部炎症反应得到明显抑制，说明布地奈德能够减轻气道炎症，对哮喘有一定治疗作用；而停药后 1 周，即激发后第 36 天炎症反应较前加重，肺内小气管上皮内杯状细胞增加，周围间质淋巴细胞浸润增多，肺泡腔内 RBC、淋巴细胞渗出明显，提示停药后炎症加重。

布地奈德作为一个强效的糖皮质激素，能减轻气道炎症，抑制炎症介质的释放<sup>[5]</sup>。其主要作用机制包括<sup>[6-7]</sup>：抗炎；降低呼吸道高反应性；表面激素吸入对粘附因子表达有直接抑制作用；直接作用于毛细血管后静脉上皮细胞，引起血管收缩，并通过抑制趋化因子和内皮活化介质的产生或释放，抑制与哮喘有关的细胞因子基因的转录等。本研究发现布地奈德组大鼠肺部 TSLP 表达较哮喘组明显减低，考虑布地奈德除了通过经典机制发挥抗炎作用以外，还有可能通过减少肺部 TSLP 的表达发挥作用。但布地奈德组在停药后 1 周，局部炎症加重，可能的原因：(1)吸入激素抑制哮喘气道慢性炎症，其起效快，但持续时间短。研究发现布地奈德停药后大鼠支气管黏膜间质仍有活化的嗜酸细胞和 T 淋巴细胞，提示大鼠对皮质激素的抗炎作用有时间依赖性。另有研究表明，长期吸入激素的哮喘患者，虽然临床

症状明显缓解，肺功能明显改善，但大部分气道反应性测定仍阳性，外周炎症因子水平仍高于正常人，说明其气道炎症未能完全缓解，因此，临床治疗哮喘，需长期规范吸入治疗<sup>[8]</sup>。(2)布地奈德抑制气道免疫反应的同时，也抑制了正常的防御功能，停药后大量的细胞因子分泌，出现高敏反应。

IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  能够诱导培养的人类支气管上皮细胞株 16HBE0 和 A549 表达和释放 TSLP。其诱导途径是通过核因子  $\kappa$ B(NK $\kappa$ B) 活化 TSLP 启动基因实现的<sup>[9]</sup>。糖皮质激素能够抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的产生，导致促炎症因子蛋白质(前列腺素、IL-1、IL-6、TNF $\alpha$  等)表达减少，抗炎症因子蛋白质(如 IL-10、转化生长因子等)表达增加，从而发挥糖皮质激素的抗炎等生物学效应<sup>[10]</sup>。因此，推测布地奈德抑制 TSLP 的合成与分泌的机制可能是通过抑制 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的合成，降低 NF $\kappa$ B 活性实现的。

尽管布地奈德组在治疗后 TSLP 表达水平下降，但肺部病理仍较重，说明 TSLP 表达水平与肺炎严重程度之间有时不一定呈正相关关系。对 TSLP 在哮喘发病中的作用机制有待进一步探讨。

### [参 考 文 献]

- [1] Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, Yuan W, Edward G, Homey B, et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP[J]. Nat Immunol, 2002, 3(7):673-680.
- [2] 张瑞珊,赵源,谭娟玲.普米克令舒吸入佐治小儿毛细支气管炎疗效观察[J].中国实用儿科杂志,2001,16(5):289-291.
- [3] 叶辉,应小明,童夏生,陈利中,赵蓓.布地奈德对哮喘大鼠中性粒细胞诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2009,14(9):1008-1011.
- [4] Mauad T, Silva LF, Santos MA, Grinberg L, Bernardi FD, Martins MA, et al. Abnormal alveolar attachments with decreased elastic fiber content in distal lung in fatal asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(8):857-862.
- [5] Gibson PG, Saltos N, Fakes K. Acute anti-inflammatory effects of inhaled budesonide in asthma; a randomized controlled trial[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(1):32-36.
- [6] Wempe JB, Tammeling EP, Koeter GH, Hakansson L, Venge P, Postma DS. Blood eosinophil numbers and activity during 24 hours: effects of treatment with budesonide and bambuterol[J]. J Allergy Clin Immunol, 1992, 90(5):757-765.
- [7] Boschetto P, Rogers DF, Fabbri LM, Barnes PJ. Corticosteroid inhibition of airway microvascular leakage[J]. Am Rev Respir Dis, 1991, 143(3):605-609.
- [8] 杜以明,薛玉文,葛秀利.哮喘患者长期吸入糖皮质激素气道炎症的变化[J].山东医药,2004,44(25):23-24.
- [9] Lee HC, Ziegler SF. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NF $\kappa$ B[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(3):914-919.
- [10] Cato AC, Wade E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids[J]. Bioessays, 1996, 18(5):371-378.

(本文编辑:黄 榕)