

Galectin-9 及其受体 Tim-3 在哮喘小鼠肺组织中的表达

张志英 栾斌 冯晓霞

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨半乳糖凝集素-9(Galectin-9)及其受体 T 细胞免疫球蛋白粘蛋白分子-3(Tim-3)在哮喘小鼠肺组织中的表达及 PPAR- γ 激动剂罗格列酮(ROS)对其表达的影响。**方法** 45 只清洁级雌性 BALB/c 小鼠随机分为对照组、哮喘组、ROS 干预组。观察卵清蛋白激发及 ROS 干预治疗后哮喘小鼠肺组织的病理变化;应用 RT-PCR 方法检测肺组织 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 的表达;采用酶联免疫吸附测定法检测外周血 IL-4 及 IFN- γ 的表达水平。**结果** 哮喘组肺组织 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达显著高于对照组及 ROS 干预组($P<0.05$)。哮喘组外周血 IL-4 的表达量较对照组及 ROS 组明显升高,而 IFN- γ 表达量较对照组及 ROS 组明显降低($P<0.05$)。Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达量与 IL-4 呈正相关($r=0.792, 0.794, P<0.05$),与 IFN- γ 呈负相关($r=-0.692, -0.757, P<0.05$)。**结论** 哮喘小鼠气道肺组织中 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达有明显升高,并且其改变与 Th1/Th2 细胞因子表达量具有相关性,ROS 干预治疗后 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达下调。

[中国当代儿科杂志,2011,13(5):406-410]

[关键词] 哮喘;半乳糖凝集素-9;T 细胞免疫球蛋白粘蛋白分子-3;小鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)05-0406-05

Expression of Galectin-9 and Tim-3 in lungs of mice with asthma

ZHANG Zhi-Ying, LUAN Bin, FENG Xiao-Xia. Department of Pediatrics, Third Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Luan B, Email: luanbin0588@tom.com)

Abstract: Objective To study the expression of Galectin-9 and Tim-3 in lungs of mice with asthma and the effect of rosiglitazone (PPAR- γ agonist) on their expression. **Methods** Forty-five BALB/c SPF female mice were randomized into control group and asthma groups with and without rosiglitazone intervention. After ovalbumin stimulation and rosiglitazone intervention the pathological changes of the lung tissues were observed. Galectin-9 and Tim-3 mRNA levels in lung tissues were determined using RT-PCR. The levels of IL-4 and IFN- γ in peripheral blood were measured using ELISA. **Results** The expression of Galectin-9 and Tim-3 mRNA of lung tissues in the untreated asthma group increased significantly compared with the control and the rosiglitazone treated groups ($P<0.05$). A significantly increased blood expression of IL-4 and a significantly decreased blood expression of IFN- γ were found in the untreated asthma group compared with the control and the rosiglitazone-treated groups ($P<0.05$). The expression of Galectin-9 and Tim-3 mRNA was positively correlated with blood IL-4 level ($r=0.792, r=0.794$ respectively; $P<0.05$), but negatively correlated with blood IFN- γ level ($r=-0.692, r=-0.757$ respectively; $P<0.05$). **Conclusions** Galectin-9 and Tim-3 mRNA levels in lungs increase in mice with asthma and significantly correlate with the levels of blood Th1/Th2 cytokines. This suggests that Galectin-9 and Tim-3 are closely related to inflammatory process in asthma. Rosiglitazone treatment may decrease the expression of Galectin-9 and Tim-3. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (5):406-410]

Key words: Asthma; Galectin-9; Tim-3; Mice

哮喘是一免疫失衡性疾病,Th1/Th2 比例失衡和 Th2 优势是哮喘形成及进展的关键性机制^[1]。糖皮质激素的应用极大地改善了哮喘患者的症状及生存质量,成为治疗哮喘的经典用药。然而,糖皮质激素长期应用尤其是大剂量应用时有明显的毒副作用,少数重症哮喘患者还可能对糖皮质激素不敏感或是抵抗。因此人们一直为更有效地治疗哮喘寻求新的突破。近年研究发现,在变应性疾病中半

[收稿日期]2010-08-29;[修回日期]2010-10-19
[作者简介]张志英,女,硕士研究生。
[通信作者]栾斌,教授。

乳糖凝集素-9 (Galectin-9) 及其受体 T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain containing molecules-3, Tim-3) 在转录水平和蛋白水平都有明显升高, 并且其改变与 Th1/Th2 细胞因子表达量有直接关系, 它们与变应性炎症过程密切相关^[2]。因此本研究探讨性地把 Galectin-9 及特异性表达于 Th1 细胞表面的 Tim-3 作为免疫调节的靶分子, 通过免疫调节使哮喘中 Th1/Th2 反应失衡恢复平衡, 以期能为哮喘发病机制和临床治疗的研究提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

清洁级 BALB/c 雌性小鼠 45 只 (购自郑州大学实验动物中心), 5~8 周龄, 体重 18~22 g; 卵蛋白 (美国 Sigma 公司); 氢氧化铝 (北京化工厂); 小鼠 IL-4、IFN- γ ELISA 试剂盒 (美国 RD 公司); 过氧化物酶体增植物激活受体- γ (PPAR- γ) 激动剂罗格列酮 (ROS) (葛兰素史克有限公司); Galectin-9、Tim-3 及内参各引物合成 (北京赛百盛生物技术有限公司), Galectin-9 与 Tim-3 RT-PCR 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及哮喘模型制作 将小鼠按随机数字表法分为哮喘组、对照组、ROS 组, 每组各 15 只。模型制作参考文献^[3-6]并略加改进, 哮喘组给予 1% OVA/Al(OH)₃ 混悬液 0.2 mL 于第 1、7、14 天腹腔注射联合皮下注射致敏, 第 21 天开始用 2% OVA 雾化吸入激发, 30 min/次, 每日 1 次, 持续 2 周; ROS 组于第 28 天起在激发前 30 min 给予 ROS 灌胃干预 (10 mg/kg) 持续 1 周, 余同哮喘组; 对照组用等量生理盐水致敏和雾化吸入, 余同哮喘组。

1.2.2 标本的制备及血清收集 末次激发后 24 h 内摘眼球取血, 收集外周血 0.8 mL, 3000 rpm, 4℃ 离心 5min, 取上清液分装后于 -80℃ 保存备作 ELISA 分析。采血后迅速开胸, 取右侧肺组织, 快速液氮冻存; 沿左心耳部剪开, 给予生理盐水灌注, 直到左肺组织冲洗干净、发白后取左肺中叶放于 10% 的甲醛溶液中固定 24 h, 酒精梯度脱水, 石蜡包埋, 做 5 μ m 切片, 行苏木精-伊红 (HE) 染色, 光学显微镜下观察肺组织病理学变化。

1.2.3 ELISA 法检测血清中 IL-4、IFN- γ 水平 参照试剂说明书进行, 加终止液混匀后立即由自动酶标仪测定吸光度 OD 450 值, 绘制标准曲线, 据样

品的 OD 值确定其浓度。

1.2.4 RT-PCR 检测肺组织中 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 的表达 将液氮冻存的右肺用 Trizol 一步提取法提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 设计引物扩增目的片段。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 Galectin-9、Tim-3 及内参 GAPDH 的灰度值, 并以 Galectin-9、Tim-3 与内参 GAPDH 的比值作为该小鼠的代表值。PCR 各引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 各引物序列

引物	序列	5'—3'	目的长度 (bp)
Galectin-9	Sense	TTGAGGAAGGAGGGTATG	310
	Antisense	TGGATGGTAGTTTGAGCC	
Tim-3	Sense	TACCTACATCTGGGACACTT	127
	Antisense	TGGTATCTGCTGGATTCT	
GAPDH	Sense	AGGCCGGTGCTGAGTATGTC	530
	Antisense	TGCCTGCTTCACCACCTTCT	

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析, 数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数的比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验; 相关性研究采用 Pearson 相关检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

哮喘组小鼠经过 OVA 激发后, 均出现不同程度的烦躁不安、呼吸急促、腹肌抽搐、大小便失禁、俯卧不动或卧于容器壁、饮水量增加等表现, ROS 组与哮喘组相比上述表现较轻, 而对照组未出现上述表现, 表明哮喘模型制备成功, 所有受试动物未出现非正常死亡。

2.2 病理学改变

肺组织 HE 染色显示: 对照组肺组织结构完整, 气管形态规则, 黏膜上皮完整, 支气管、肺泡隔及血管周围未见炎症细胞浸润, 细支气管平滑肌未出现增殖, 支气管腔内分泌物少, 肺泡形态规则。哮喘组肺组织切片可见肺内支气管黏膜下及血管周围较多嗜酸性粒细胞浸润, 黏膜下充血水肿, 黏液腺增生, 气道上皮多处断裂和上皮细胞脱落, 肺间质和支气管腔内可见炎性细胞渗出和分泌物, 支气管壁略显增厚和基底膜轻度增厚且不规则。ROS 组小鼠肺组织炎性细胞浸润等病理改变较哮喘组减轻。见图 1。

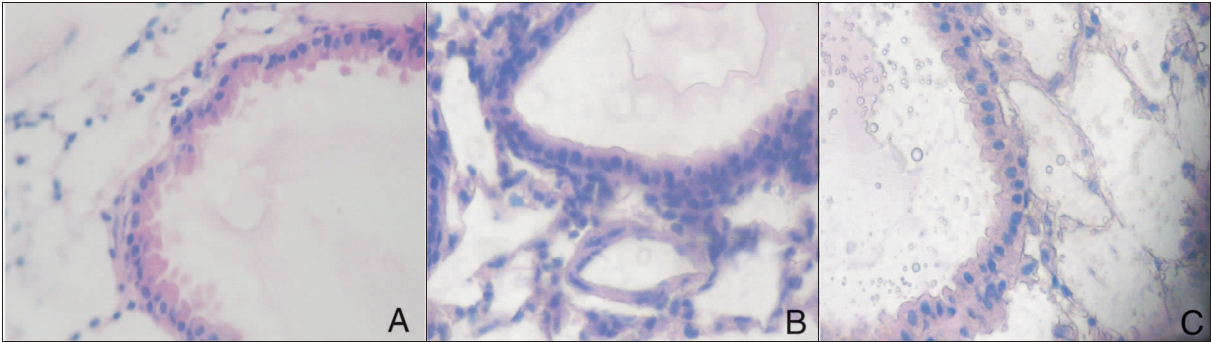


图1 各组小鼠肺组织切片(HE, ×400) **A**: 对照组肺组织结构完整,气管形态规则,黏膜上皮完整,支气管、肺泡隔及血管周围未见炎症细胞浸润,支气管腔内分泌物少,肺泡形态规则;**B**: 哮喘组可见支气管黏膜下及血管周围较多嗜酸性粒细胞浸润,黏膜下充血水肿,黏液腺增生,肺间质和支气管腔内可见炎性细胞渗出和分泌物,支气管壁略显增厚和基底膜轻度增厚且不规则;**C**: ROS 组肺组织炎性细胞浸润等病理改变较哮喘组减轻。

2.3 血清 IL-4 和 IFN-γ 表达

哮喘组血清 IL-4 表达强度较对照组、ROS 组有不同程度的增高;而 IFN-γ 在哮喘组肺组织中表达强度与对照组、ROS 组比较显著减弱,组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2,图 2。

表 2 血清 IFN-γ 和 IL-4 的表达 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	IFN-γ	IL-4
对照组	15	600 ± 105	347 ± 44
哮喘组	15	372 ± 131 ^a	565 ± 76 ^a
ROS 组	15	398 ± 120 ^{a,b}	483 ± 68 ^{a,b}
<i>F</i> 值		16.2	43.5
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

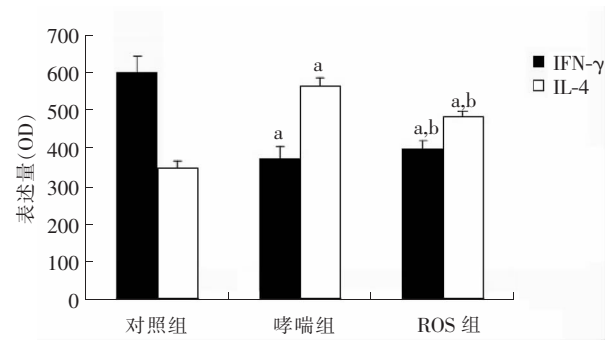


图2 各组小鼠外周血中 IFN-γ 和 IL-4 表达水平的比较 a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

2.4 RT-PCR 检测 Galectin-9 及 Tim-3 mRNA 表达的结果

Galectin-9 及 Tim-3 mRNA 在对照组肺组织中仅有少量表达,而在哮喘组肺组织中表达量显著增加,ROS 组二者的表达量较哮喘组降低但仍高于对照组,各组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 3,图 3 ~5。

表 3 肺组织中 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	Galectin-9	Tim-3
对照组	15	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.05
哮喘组	15	0.61 ± 0.09 ^a	0.54 ± 0.08 ^a
ROS 组	15	0.40 ± 0.06 ^{a,b}	0.47 ± 0.09 ^{a,b}
<i>F</i> 值		77.24	39.60
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

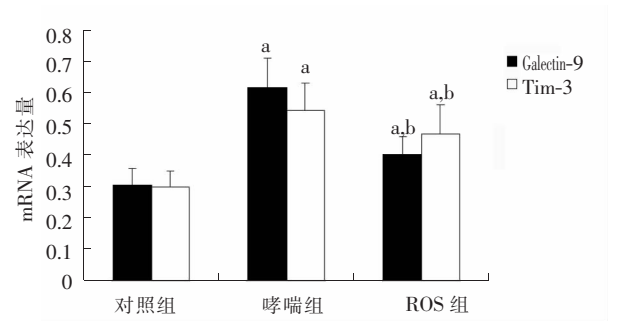


图3 各组肺组织中 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 的表达水平的比较 a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与哮喘组比较, $P < 0.01$

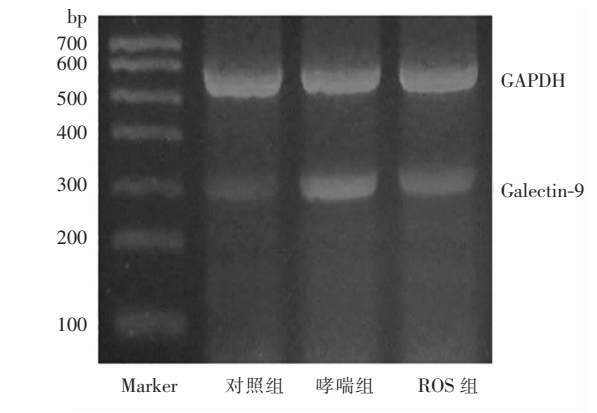


图4 各组小鼠肺组织中 Galectin-9 mRNA 的表达

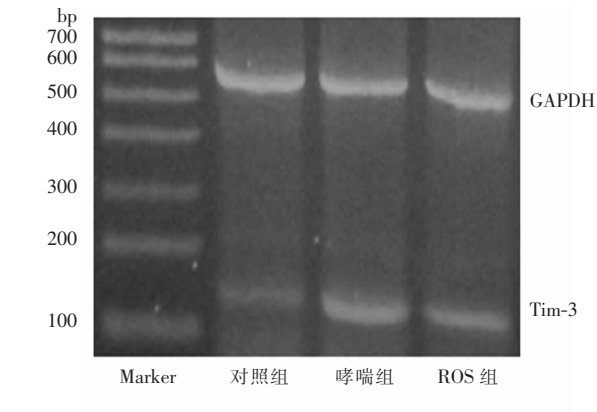


图5 各组小鼠肺组织中 Tim-3 mRNA 的表达

2.5 相关性分析结果

对肺组织 Galectin-9 及 Tim-3 mRNA 表达量与血清中 IFN- γ 及 IL-4 表达水平进行 Pearson 相关性检验,结果显示:二者的表达强度与血清 IL-4 表达量呈正相关(r 分别为 0.792, 0.794, $P < 0.01$),与 IFN- γ 表达量呈负相关(r 分别为 -0.692, -0.757, $P < 0.01$)。

3 讨论

支气管哮喘是由多种炎症细胞、细胞因子、炎症介质共同参与的慢性呼吸道非特异性炎症。气道炎症是引起气道高反应性及气流受限的病理基础^[7],因此控制气道炎症是治疗哮喘的关键。

Galectin-9 是一种新发现的嗜酸性粒细胞趋化因子,在细胞分化、凋亡、黏附、细胞间聚集、调节炎症反应和肿瘤转移方面也发挥了作用。Suk 等^[8]研究发现, Galectin-9 广泛分布于胰岛细胞、肺脏、肝脏、扁桃体和多种免疫细胞中,同时在血清中发现了 Galectin-9 的天然抗体,但该抗体的生物学意义有待于研究。本研究发现哮喘组小鼠肺组织切片中可见

肺内支气管黏膜下及血管周围有较多嗜酸性粒细胞浸润,证实了其对嗜酸性粒细胞的化学趋化作用。Yamamoto 等^[9]发现,哮喘豚鼠肺组织中存在 Galectin-9 蛋白表达,且其表达程度与外周血嗜酸性粒细胞活性及凋亡程度密切相关。研究显示, Galectin-9 可与 Th1 细胞表面蛋白 Tim-3 相结合造成致敏小鼠产生 IFN- γ 的 Th1 细胞数量减少,从而下调 Th1 应答效应^[10]。本研究对 Galectin-9 mRNA 在哮喘小鼠肺组织中的表达进行检测,结果发现其在哮喘组小鼠肺组织中表达显著增加,其表达强度与外周血中 Th2 细胞因子 IL-4 表达量呈正相关,与 Th1 细胞因子 IFN- γ 表达量呈负相关。提示模型组小鼠 Th1 应答效应下调, Th2 应答效应上调,分析可能与以下原因相关: Tim-3 是特异性表达于活化的 Th1 细胞上的表面分子; Galectin-9 是 Tim-3 的特异性配体; Galectin-9 与 Tim-3 的结合,导致 Th1 型效应细胞受抑制, Th2 细胞反应性增高,打破了 Th1/Th2 细胞的平衡。

Tim-3 是近年来新发现的一种与 T 细胞功能有关的表面分子,属 Tim 基因家族成员,其膜蛋白不表达于初始 T 细胞,而特异性地表达于活化的 Th1 细胞表面,主要调节 Th1 细胞介导的免疫应答。Tim-3 作为一种负调节分子选择性表达在活化的 Th1 细胞表面,在 Th1 细胞介导的免疫应答和巨噬细胞的活化中起重要作用,并可能与变态反应性疾病的发病有关^[11]。文献报道, Tim-3 通过与其配体 Galectin-9 结合,特异地诱导 Th1 细胞凋亡,从而下调 Th1 免疫应答^[12-13]。研究显示, Tim-3 单克隆抗体在显著减轻致敏实验动物的气道高反应和黏膜局部嗜酸性粒细胞聚集的同时还可显著的降低肺泡灌洗液中 Th2 细胞因子水平,提示 Tim-3 可能成为支气管哮喘治疗的一个新的作用靶点^[14]。本研究发现,哮喘组小鼠外周血中 IL-4 表达较对照组水平升高, IFN- γ 表达较对照组降低,这提示哮喘发病中存在 Th1/Th2 免疫失衡,相关性分析发现哮喘组肺组织中 Tim-3 mRNA 表达量与外周血中 Th2 细胞因子 IL-4 表达量呈正相关,与 Th1 细胞因子 IFN- γ 表达量呈负相关。本研究在基因水平上证实了 Galectin-9 及其受体 Tim-3 在哮喘小鼠肺组织局部表达明显增加,同时证实它们的表达量与外周血中 IL-4 和 IFN- γ 蛋白表达量有显著的相关性,这说明二者的表达与支气管哮喘的发病机制密切相关,但其具体作用机制有待于进一步研究。

过氧化物酶体增殖活化受体- γ (PPAR- γ) 是一类核激素受体, ROS 是高选择性 PPAR- γ 的外源性

强力配体激动剂,其与 PPAR- γ 结合后激活 PPAR- γ 的活性,调控许多炎症反应因子^[15],已经证实 PPAR- γ 表达于人气道上皮细胞株,而且其活化能够对抗此体系中的促炎症反应^[16-17]。近年来研究表明 PPAR- γ 参与了呼吸道变态反应性炎症的诸多方面,例如降低抗原诱发的气道高反应性、减轻肺部炎症反应、减少细胞因子产生及抑制嗜酸性粒细胞的聚集^[18-19]。与糖皮质激素相比呼吸道平滑肌细胞中活化的 PPAR- γ 具有明显的抗炎作用^[20],有研究显示^[21]对哮喘小鼠应用 PPAR- γ 激动剂可抑制过敏性炎症的进展,如肺部嗜酸性粒细胞的增多和气道高反应,PPAR- γ 激动剂不仅可以作用于肺部炎症细胞(嗜酸粒细胞、巨噬细胞、Th2 细胞),而且能更直接有效地降低气道高反应性和抑制气道重塑。本研究在哮喘动物模型建立的基础上给予 ROS 进行干预,发现 ROS 组外周血中 IL-4 较哮喘组显著减少,同时 IFN- γ 较哮喘组升高,提示 ROS 与 PPAR- γ 结合后激活 PPAR- γ 的活性,加强了 PPAR- γ 抑制炎症反应因子的作用;RT-PCR 检测 ROS 组小鼠肺组织中 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 表达量较哮喘组减低,可能是 ROS 和 PPAR- γ 结合后激活 PPAR- γ 的活性,进而影响 Galectin-9 和 Tim-3 mRNA 的表达,对抗了哮喘体系中的促炎症反应的结果。本研究结果表明 PPAR- γ 激动剂 ROS 减轻了哮喘小鼠肺部炎症反应,一定程度上增强了 Th1 免疫反应或抑制亢进了的 Th2 免疫反应,从而改善哮喘发病机制中 Th1/Th2 的失衡,由此提示 PPAR- γ 激动剂有望成为哮喘患者的一种新的治疗手段。

[参 考 文 献]

- [1] 李峰,赵红洋,温暖,毕玫荣,吴蕾,朱微微. 支气管哮喘发病机制进展[J]. 实用全科医学,2007,5(10):922-923.

[2] Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, et al. Galectin-9 inhibits CD44-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(1): 27-35.

[3] 沈华浩,王茉莉. 支气管哮喘小鼠模型应用评价[J]. 中华结核和呼吸杂志,2005,28(4):284-286.

[4] 田代印,符州,张燕,王莉佳,迟磊,李睿,等. 一种改良型小鼠哮喘模型方法的建立及评价[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(4):601-603.

[5] 韩伟,周新. 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 在支气管哮喘小鼠血管重塑中的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2006,29(7):484-488.

[6] 栾斌,黄先杰,乔俊英. 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[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(3):215-218.
- [7] Hamid Q. Inflammatory cells, cytokine and chemokine expression in asthma immunocytochemistry and in situ hybridization[J]. Allergy Clin Immunol,2003,111(4):902-903.

[8] Suk K, Hwang DY, Lee MS. Natural autoantibody to galectin-9 in normal human sera[J]. J Clin Immunol, 1999, 19(3): 158-165.

[9] Yamamoto H, Kashio Y, Shoji H, Shinonaga R, Yoshimura T, Nishi N, et al. Involvement of galectin-9 in guinea pig allergic airway inflammation[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2007, 143(Suppl 1): 95-105.

[10] Chae SC, Park YR, Lee JH, Chung HT. The association of TIM-3 gene polymorphism with atopic disease in Korean population[J]. Hum Immunol, 2004, 65(12): 1427-1431.

[11] McIntire JJ, Umetsu SE, Akbari O, Potter M, Kuchroo VK, Barsh GS, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. Nat Immunol, 2001, 2(12): 1109-1116.

[12] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. Nat Immunol, 2005, 6(12): 1245-1252.

[13] Zhu C, Anderson AC, Kuchroo VK. Tim-3 and its regulatory role in Immune Responses[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2011, 350: 1-15.

[14] Kearley J, McMillan SJ, Lloyd CM. Th2-driven, allergen-induced airway inflammation is reduced after treatment with anti-Tim-3 antibody in vivo[J]. J Exp Med, 2007, 204(6): 1289-1294.

[15] Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappa B and AP-1[J]. Biol Chem, 1999, 274(45):32048-32054.

[16] Wang AC, Dai X, Luu B, Conrad DJ. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(6):688-693.

[17] Serhan CN, Devchand PR. Novel antiinflammatory targets for asthma. A role for PPARgamma? [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 24(6): 658-661.

[18] Fukui N, Honda K, Ito E, Ishikawa K. Peroxisome proliferator-activated receptor γ negatively regulates allergic rhinitis in Mice [J]. Allergol Int, 2009, 58(2): 247-253.

[19] Honda K, Marquillies P, Capron M, Dombrowicz D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model [J]. J Allergy Clin Immunol, 2004, 113(5):882-888.

[20] Patel HJ, Belvisi MG, Bishop-Bailey D, Yacoub MH, Mitchell JA. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors in human airway smooth muscle cells has a superior anti-inflammatory profile to corticosteroids: relevance for chronic obstructive pulmonary disease therapy [J]. J Immunol, 2003, 170(5): 2663-2669.

[21] Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin JP, Auwerx J, Staels B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammatory and eosinophil activation[J]. Exp Med, 2003, 198(3): 411-421.

(本文编辑:俞 燕)