

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.07.021

论著·实验研究

## 甲磺司特对哮喘大鼠气道炎症及 IL-5 的影响

刘丹 李云 钟礼立 谭钰斌

(湖南省人民医院儿科, 湖南长沙 410005)

**[摘要]** **目的** 探讨甲磺司特(suplatast tosilate, IPD)对哮喘大鼠IL-5水平及气道炎症的影响。**方法** 50只雄性成年Sprague-Dawley大鼠(4周龄)随机分为5组:对照组、模型组、布地奈德组、IPD早期干预组和IPD晚期干预组,每组10只。采用卵清白蛋白(OVA)致敏、激发,建立支气管哮喘大鼠气道炎症模型。观察肺泡灌洗液(BALF)炎性细胞总数和EOS百分比,RT-PCR检测肺组织IL-5 mRNA的表达,ELISA测定BALF上清液中IL-5的含量。**结果** 模型组BALF中炎性细胞总数及EOS百分比、IL-5含量及肺组织IL-5 mRNA表达量均较对照组明显增高( $P<0.05$ ),IPD干预组和BUD组各指标均较模型组下降( $P<0.05$ )。**结论** IPD可减轻哮喘气道炎症反应,可能与其抑制IL-5 mRNA的转录有关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(7): 759-763]

**[关键词]** 甲磺司特;哮喘;嗜酸性粒细胞;大鼠

### Effects of suplatast tosilate on airway inflammation and interleukin-5 in asthmatic rats

LIU Dan, LI Yun, ZHONG Li-Li, TAN Yu-Pin. Department of Pediatrics, Hunan People's Hospital, Changsha 410005, China (Li Y, Email: ligunpd@163.com)

**Abstract: Objective** To study the effects of suplatast tosilate (IPD) on the airway inflammation and expression of interleukin-5 in asthmatic rats. **Methods** Fifty adult male Sprague-Dawley rats (4-week-old) were randomly assigned to five groups: placebo control, untreated asthma, budesonide(BUD)-treated asthma, early or late IPD intervention group ( $n=10$  rats each). Asthmatic mode was prepared by ovalbumin sensitization and challenge. Inflammatory cells and the percentage of EOS were detected in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). The lung tissues were removed to detect the lung histomorphology. Gene expression of IL-5 was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Levels of interleukin 5 (IL-5) in BALF were measured using ELISA. **Results** The inflammatory cells and the percentage of EOS in BALF, IL-5 levels in BALF and IL-5 mRNA expression in the lung tissues were obviously higher in the untreated asthma group than the control group ( $P<0.05$ ), while the parameters in the IPD or BUD-treated asthma groups were significantly lower than the untreated asthma group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** IPD treatment can alleviate airway inflammation in asthmatic rats, possibly through inhibiting IL-5 mRNA transcripts.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(7): 759-763]

**Key words:** Suplatast tosilate; Asthma; Eosinophil; Rats

支气管哮喘是以气道高反应性和嗜酸性粒细胞(eosinophils, EOS)性气道炎症为特征的免疫紊乱性疾病, Th1/Th2失衡、Th2细胞功能亢进是支气管哮喘的重要免疫学发病机制<sup>[1]</sup>。在哮喘中, Th2细胞通过释放IL-5、IL-4、IL-6、IL-9、IL-13以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granuloeyte

macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)等多种细胞因子和趋化因子而促进EOS的聚集和活化、IgE的形成, 形成气道慢性炎症, 气道反应性增高, 从而导致了哮喘发作<sup>[2]</sup>。甲磺司特(suplatast tosilate, IPD)是一种新型的选择性Th2细胞因子抑制剂。国外有关IPD的临床应用证实IPD能降低

[收稿日期] 2013-12-04; [接受日期] 2014-02-17

[作者简介] 刘丹, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 李云, 男, 主任医师。

哮喘受试者(包括激素依赖性哮喘、咳嗽变异型哮喘)症状评分、改善肺功能,减少 $\beta_2$ 受体激动剂的用量,具有“节约激素”的作用<sup>[3]</sup>。但其具体作用机制值得进一步探讨。本研究拟通过观察IPD早期干预与晚期干预后肺组织IL-5 mRNA表达的变化,了解该药物对免疫反应的致敏阶段与激发阶段的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组和试剂用品

4周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠50只,体重 $200 \pm 20$  g, SPF级(湖南农业大学动物部),随机分为5组,每组10只:对照组、模型组、布地奈德(BUD)组、IPD(A)组和IPD(B)组。

试剂用品包括卵清蛋白(OVA,美国Sigma公司);甲磺司特颗粒(北京兴德通医药科技有限公司);IL-5酶联免疫吸附试剂盒(美国RD公司);Trizol、IL-5引物及GAPDH引物(Invitrogen公司)。

### 1.2 动物模型的制备

除对照组以外的4组大鼠分别于第1天和第8天腹腔注射10% OVA混合液1 mL(含OVA 100 mg、氢氧化铝100 mg及灭活百日咳杆菌苗 $5 \times 10^9$ 个作为免疫佐剂)致敏。2周后再进行激发,2% OVA泵雾化吸入,10 min/次,每日1次,连续7 d,构建大鼠哮喘模型。对照组致敏和激发均以生理盐水代替。BUD组每次激发前用BUD溶液0.64 mL/kg(含BUD 0.32 mg)<sup>[4]</sup>加生理盐水至2 mL泵雾化吸入,IPD(A)组和IPD(B)组参照文献<sup>[5]</sup>的剂量分别从致敏(实验第1天)和激发(实验第15天)阶段开始予IPD[50 mg/(kg·d)]灌胃。激发后大鼠出现哮喘症状如躁动不安、咳嗽、呼吸急促、紫绀等,证实模型制作成功。其中IPD(A)组大鼠1只灌胃过程中因灌胃针误入气管而窒息死亡。

### 1.3 肺组织苏木精-伊红染色

各组大鼠于末次激发24 h内(即第21天),腹腔注射10%水合氯醛4 mL/kg麻醉,心脏采血后处死大鼠,取右肺上叶浸泡于4%多聚甲醛中固定,脱水、透明、浸蜡,常规石蜡包埋、切片4  $\mu$ m,用苏木精-伊红(HE)染色常规病理组织

学检查,观察支气管及肺泡周围炎症细胞浸润、小血管管壁、支气管平滑肌改变及支气管壁周围的EOS浸润等情况。

### 1.4 肺泡灌洗液炎性细胞计数及EOS百分比

末次激发24 h内处死大鼠后,充分暴露气管、左支气管、左肺,在环状软骨上缘小心切开气管,用10 mL注射器针头制成灌洗针向肺组织方向插入后结扎并固定,匀速注入3 mL生理盐水至肺尖膨胀,反复抽洗3次,回收灌洗液并计量,回收率大于80%,采集的肺泡灌洗液(BALF),一部分用于BALF炎性细胞总数测定,部分离心10 min(4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min),上清液用于细胞因子IL-5测定;取少许离心沉渣涂片经瑞氏染色,镜下计数200个细胞,计数EOS百分比(在高倍显微镜下计数至少200个除红细胞和上皮细胞外的有核细胞总数)。

### 1.5 肺组织IL-5 mRNA含量的测定

用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法,取冷冻的右肺中央组织约50 mg,加入1 mL Trizol提取总RNA,紫外线分光光度法测定RNA纯度和含量。取1  $\mu$ g RNA在oligo dT(18)和dNTP mixture存在的情况下进行逆转录反应合成cDNA,再以cDNA为模板进行PCR扩增。由美国Invitrogen公司完成IL-5引物序列、大鼠GAPDH内参引物序列合成。大鼠IL-5引物序列:上游5'-TGCTTCTGTGCTTGAACGTTCTAAC-3',下游5'-TTCTCTTTTGTCCGTCATGTATTTC-3',预期扩增产物长298 bp。大鼠GAPDH内参引物序列:上游5'-CAAGGTCCATGACAACCTTTG-3',下游5'-GTCCACCCTGTTGCTGTAG-3',预期扩增产物长496 bp。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性4 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,共30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸5 min,对扩增后的产物各取10  $\mu$ L进行琼脂糖凝胶电泳(Goodview显色),电泳后紫外灯光下观察结果并照相,经凝胶成像分析系统扫描,进行面积灰度扫描,以密度代表其表达量,计算出目的基因的相对含量。目的基因的相对含量=目的基因的密度/GAPDH基因的密度。

### 1.6 IL-5含量的测定

采用大鼠IL-5 ELISA检测试剂盒检测BALF中IL-5含量,按照试剂说明书进行操作,根据光密度值计算出标本中所含因子的含量。

## 1.7 统计学分析

数据使用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 病理组织学改变

肺组织切片 HE 染色后, 对照组支气管管腔规则、黏膜上皮整齐, 管腔内无炎性渗出物及黏液栓, 管壁无增厚, 气道周围未见明显炎性细胞浸润。模型组支气管周围可见大量炎症细胞浸润, 包括: EOS、中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等; 炎性细胞主要在支气管黏膜下层及黏膜外层、肺泡壁和小血管周围等处浸润, 肺间质及肺泡腔内可见 EOS, 支气管内可见黏液栓, 气道上皮有损伤、断裂, 基底膜稍增厚且形态不规则, 平滑肌有轻度的增生。与模型组相比, IPD 组气道周围炎症明显减轻, 气道周围炎症细胞浸润、气道分泌物减少, 支气管壁增厚及上皮细胞脱落现象明显改善。BUD 组气道周围炎症细胞浸润明显减少, 气道分

泌物及上皮细胞脱落少见, 气道周围炎症较模型组明显减轻。而 BUD 组、IPD (A) 组及 IPD (B) 组之间气道炎症改变相似。见图 1。

### 2.2 各组 BALF 炎性细胞总数及 EOS 百分比

模型组 BALF 中炎性细胞总数及 EOS 百分比比较对照组明显增高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); BUD 组、IPD (A) 组和 IPD (B) 组炎性细胞总数及 EOS 百分比比较模型组明显降低, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。其中, IPD (B) 组与 IPD (A) 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 但与 BUD 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), IPD (A) 组与 BUD 组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.3 各组 BALF 中 IL-5 含量、RT-PCR 检测肺组织 IL-5 mRNA 的表达

模型组 BALF 中 IL-5 的含量, 肺组织 IL-5 mRNA 表达明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义; 与模型组比较, BUD 组、IPD (A) 组和 IPD (B) 组均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。其中, IPD (B) 组与 IPD (A) 组无统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 但与 BUD 组有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), IPD (A) 组与 BUD 组无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。见表 2, 图 2。

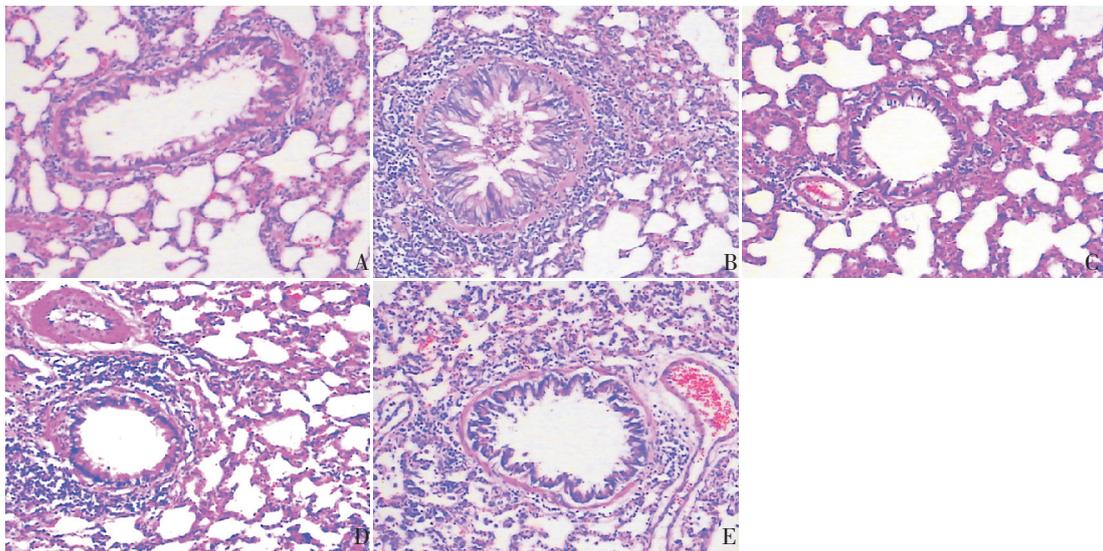


图 1 各组肺组织病理变化 (HE 染色,  $\times 100$ ) A: 对照组, 支气管管腔规则、黏膜上皮整齐, 管腔内无炎性渗出物及黏液栓, 气道周围未见明显炎性细胞浸润; B: 模型组支气管周围可见大量炎症细胞浸润, 支气管内可见黏液栓, 基底膜稍增厚且形态不规则; C: BUD 组, 气道周围炎症细胞浸润明显减少, 气道分泌物及上皮细胞脱落少见; D: IPD (A) 组, 气道周围炎症明显减轻, 气道分泌物减少, 支气管壁增厚及上皮细胞脱落现象较模型组明显改善; E: IPD (B) 组, 与 IPD (A) 组类似, 气道周围炎症较模型组明显改善。

表 1 各组 BALF 中炎性细胞总数及 EOS 百分比比较  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	炎性细胞总数 ( $\times 10^6/L$ )	EOS 细胞百分比 (%)
对照组	10	4.6 ± 0.3	1.3 ± 0.8
模型组	10	42.7 ± 1.8 <sup>a</sup>	13.0 ± 1.8 <sup>a</sup>
BUD 组	10	14.6 ± 1.0 <sup>a,b</sup>	4.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
IPD(A) 组	9	14.8 ± 2.0 <sup>a,b</sup>	4.0 ± 0.6 <sup>a,b</sup>
IPD(B) 组	10	16.6 ± 1.3 <sup>a,b,c</sup>	5.6 ± 0.8 <sup>a,b,c</sup>
F 值	-	1047.89	162.04
P 值	-	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与 BUD 组比较,  $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠 BALF 中 IL-5 含量和肺组织 IL-5 mRNA 的表达量 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	IL-5 (pg/mL)	IL-5 mRNA
对照组	10	5.07 ± 0.16	0.25 ± 0.03
模型组	10	14.60 ± 0.57 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.05 <sup>a</sup>
BUD 组	10	7.87 ± 0.36 <sup>a,b</sup>	0.46 ± 0.07 <sup>a,b</sup>
IPD(A) 组	9	8.23 ± 0.38 <sup>a,b</sup>	0.48 ± 0.08 <sup>a,b</sup>
IPD(B) 组	10	8.82 ± 0.63 <sup>a,b,c</sup>	0.53 ± 0.05 <sup>a,b,c</sup>
F 值	-	589.415	249.894
P 值	-	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; b 示与模型组比较,  $P < 0.05$ ; c 示与 BUD 组比较,  $P < 0.05$ 。

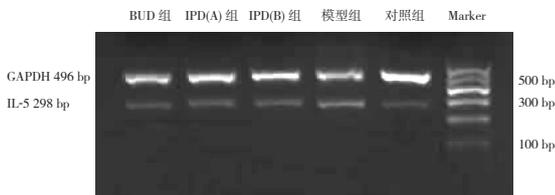


图 2 各组大鼠肺组织 IL-5 mRNA 的 RT-PCR 产物电泳图

### 3 讨论

目前, 支气管哮喘的发病机制还不十分清楚, 可能与遗传、免疫、环境等有关。在免疫学上, 一般将哮喘的发病过程分为 3 个阶段: 初期为致敏阶段, 包括过敏原刺激、T 细胞激活、IL-4 产生、IgE 合成和效应细胞释放介质; 第 2 期为慢性过敏性炎症阶段, 以 Th1/Th2 细胞比例失衡、IL-5 增多及 EOS 活化、增多和聚集为特征, 在哮喘发作过程中起主要作用; 第 3 期以气道重构为特征, 是难治性支气管哮喘的重要原因<sup>[6]</sup>。因此, 早期干预和治疗是防止哮喘炎症发展的有效措施, 对防止气道重构尤为重要。IPD 是近年新开发治疗支气管哮喘的一种药物, 国外研究证实, IPD 是一种新型的选择性 Th2 细胞因子抑制剂, 能抑制 EOS 炎症, 进而降低 IgE 抗体滴度, 抑制肥大细胞脱颗粒和炎症介质的释放, 降低气道高反应性, 改善气道炎症<sup>[7]</sup>。另外 IPD 能阻断单核细胞向树突状细胞(DC)的分化、成熟和功能, 促使 Th1 反应增强<sup>[8]</sup>。其作用靶点可能位于 EOS 表面的氯离子通道<sup>[9]</sup>, 使该药的作用机制受到了一些争论, 因此, 有必要对 IPD 的作用进行深入研究。本研究观察 IPD 早期和

晚期干预对哮喘大鼠肺组织 IL-5 mRNA 表达量、BALF 中 IL-5 的含量、BALF 中炎性细胞总数与 EOS 百分比的变化, 发现模型组大鼠 BALF 中 IL-5 的含量增加及肺组织 IL-5 mRNA 表达增强, 经 IPD 早期和晚期干预后, 其肺组织 IL-5 mRNA 的表达显著降低, BALF 中 IL-5 含量下降, 说明 IPD 治疗哮喘的重要机制之一是通过抑制局部肺组织 IL-5 基因转录, 减少 IL-5 的生物合成, 进而抑制 IL-5 对 EOS 在气道的浸润、聚集和活化, 降低气道高反应性 (airway hyperresponsiveness, AHR), 从而减轻哮喘气道炎症。

同时, 本研究还采用临床上常用的吸入激素 BUD 泵雾化吸入作为阳性对照, 将 IPD 与 BUD 的疗效相比较, 发现 BUD 同样能降低哮喘大鼠 BALF 中 IL-5 的含量, 抑制肺组织 IL-5 的基因转录, 与 IPD 有类似的作用。罗光伟等<sup>[10]</sup>通过建立豚鼠哮喘模型, 发现地塞米松能抑制 IL-5 基因转录, 进而抑制 IL-5 对 EOS 的聚集和活化, 从而发挥其抗气道炎症的作用, 本研究结果与之一致。临床上大多数患者已经呈 Th2 优势反应, 给予 IPD 干预能否逆转已经确立的 Th2 优势反应的研究就显得尤为重要。因此, 本研究还设立了 (晚期干预组) IPD(B) 组, 即在 OVA 激发的第 1 天 (实验第 15 天) 开始予 IPD 灌胃干预。结果表明晚期给予 IPD 也可以抑制肺组织 IL-5 的基因转录, 降低 BALF 中 IL-5 的含量, 降低 BALF 中炎性细胞总数, 并且抑制外周血 EOS 的聚集。因此, 本研究提示 IPD 对哮喘不仅有预防作用而且有治疗作用, 为 IPD 的临床应用提供了进一步的理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] Wegmann M, Hauber HP. Experimental approaches towards allergic asthma therapy-murine asthma models[J]. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov, 2010, 4(1):37-53.
- [2] Umetsu DT. Revising the immunological theories of asthma and allergy[J]. Lancet, 2005, 365(9454): 98-100.
- [3] Yoshihara S, Fukuda H, Arisaka O. Usefulness of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor based on the Th1/Th2 ratio for allergic disease in children: a retrospective study[J]. Arzneimittelforschung, 2011, 61(7): 421-424.
- [4] 尹志勤, 曲书强, 张凤蕴, 等. 布地奈德对哮喘大鼠肺部炎症及血清白细胞介素5水平的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(22): 1572-1573.
- [5] Matsumoto K, Hayakawa H, Ide K. Effects of suplatast tosilate on cytokine profile of bronchoalveolar cells in allergic inflammation of the lung[J]. Respirology, 2002, 7(3): 201-207.
- [6] 李文开, 李云, 钟礼立. 全反视黄酸对哮喘大鼠气道反应性和气道重塑的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 13(10): 827-831.
- [7] Takahior S, Go S, Wu MH, et al. Suplatast tosilate inhibits eosinophil production and recruitment into the skin in murine contact sensitivity[J]. Clin Immunol, 2003, 108 (3): 257-262.
- [8] Tanaka A, Minoguchi K, Samson KT, et al. Inhibitory effects of suplatast tosilate on the differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells from patients with asthma[J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(7): 1083-1089.
- [9] Agrawal DK, Cheng G, Kim MJ, et al. Interaction of suplatast tosilate (IPD) with chloride channels in human blood eosinophils: a potential mechanism underlying its anti-allergic and anti-asthmatic effects[J]. Clin Exp Allergy, 2008, 38(2): 305-312.
- [10] 罗光伟, 孙洁民, 陈菁. 地塞米松对哮喘豚鼠气道白介素-5、白介素-10 mRNA 表达及嗜酸性粒细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(10): 1119-1121.

( 本文编辑: 王庆红 )

· 消息 ·

## 发育期脑损伤与神经发育疗法研讨班通知

深圳大学第一附属医院(深圳市二医院)儿童神经康复中心定于2014年8月1~4日在深圳市举办国家级继续医学教育项目“发育期脑损伤与神经发育疗法研讨班[2014-06-04-040(国)]”。会议将邀请北京海军总医院、中南大学、佳木斯大学、上海市儿童医院、中山大学、南方医科大学、香港大学、深圳大学等专家教授讲授细胞治疗新生儿脑损伤、早产儿营养与脑发育、早产儿脑病、脑功能监测、缺氧缺血性脑病、遗传代谢病脑损伤、癫痫性脑病、脑瘫早期康复、ASQ发育筛查、精神发育障碍、孤独症谱系障碍、ADHD、认知运动疗法等新进展。项目负责人陈光福;会议地点:深圳市罗湖区爱国路4006号东湖国际会议中心;会务费800元/人;住宿费:标间每天160元/人,食宿费用自理;授予国家级医学继续教育I类学分10分。联系人:孔琦 18948333367, Email: air\_kq@163.com。

深圳大学第一附属医院(深圳市二医院)  
深圳市医学会儿科学分会神经康复学组  
2014年6月5日