论著·实验研究

布地奈德对哮喘大鼠内源性 H_2S、CSE、CBS 体系的调节机制

李绍波[1]　童夏生[2]　王昕昕[1]　金小红[1]　叶辉[3]

(1. 台州医院儿科,浙江 临海　317000; 2. 台州中西医结合医院儿科,浙江 温岭　317500;
3. 台州市第一人民医院儿科,浙江 黄岩　318020)

[**摘　要**] **目的**　观察布地奈德对哮喘大鼠血浆硫化氢(H_2S)含量和胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)、胱硫醚-β-合成酶(CBS) mRNA 的表达,探讨内源性 H_2S、CSE、CBS 体系在哮喘发病机制中的作用。**方法**　Sprague-Dawley 大鼠 30 只随机分成对照组、哮喘组、布地奈德组,每组 10 只。用鸡卵白蛋白(OVA)致敏与激发建立大鼠哮喘模型。分光光度法测定血浆 H_2S 的含量,RT-PCR 法测定肺组织 CSE、CBS mRNA 的表达水平。**结果**　哮喘组血浆 H_2S 的含量(61 ± 16 μmol/L)显著低于对照组(84 ± 15 μmol/L)($P < 0.01$),布地奈德组(71 ± 14 μmol/L)与哮喘组和对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。哮喘组肺组织 CSE mRNA 和 CBS mRNA 的表达水平显著低于对照组($P < 0.01$),布地奈德组 CSE mRNA 和 CBS mRNA 表达显著低于对照组但高于哮喘组(均 $P < 0.01$)。相关性分析结果显示血浆 H_2S 含量和支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞总数表达呈显著负相关($n = 30$, $r = -0.549$, $P < 0.01$)。**结论**　哮喘大鼠 H_2S、CSE、CBS 的表达下降,它们的表达下降可能促进了炎症细胞在气道中的聚集,布地奈德改善哮喘炎症的机制可能部分通过内源性 H_2S、CSE、CBS 体系起作用。

[**中国当代儿科杂志,2010,12(8):654 – 657**]

[**关　键　词**]　哮喘;硫化氢;胱硫醚-γ- 裂解酶;胱硫醚-β-合成酶;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)08 – 0654 – 04

Regulative mechanism of budesonide on endogenous hydrogen sulfide, cystathionine-γ-lyase and cystathionine-β-synthase system in asthmatic rats

LI Shao-Bo, TONG Xia-Sheng, WANG Xin-Xin, JIN Xiao-Hong, YE Hui. Department of Pediatrics, Taizhou Hospital, Linhai, Zhejiang 317000, *China* (*Email*: *lishaobo*71@*yahoo. com. cn*)

Abstract: **Objective**　To investigate plasma hydrogen sulfide (H_2S) levels and cystathionine-γ- lyase (CSE) and cystathionine-β-synthase (CBS) mRNA expression in the lung tissues in asthmatic rats and to explore the roles of endogenous H_2S, CSE and CBS system in the pathogenesis of asthma. **Methods**　Thirty male Sprague-Dawley rats (age 5 to 7 weeks) were randomly divided into three groups: control, asthma and budesonide treatment ($n = 10$ each). The asthma model was established by ovalbumin (OVA) sensitization and challenge. The budesonide treatment group received inhaled budesonide before challenge. The contents of plasma H_2S were measured by spectrophotometry. The levels of CSE and CBS mRNA in the lung tissues were examined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results**　The contents of plasma H_2S in the asthma group (61 ± 16 μmol/L) were significantly lower than those in the control group(84 ± 15 μmol/L) ($P < 0.01$). The contents of plasma H_2S in the budesonide treatment group (71 ± 14 μmol/L) were not statistically different from those in the control and asthma groups. CSE mRNA and CBE mRNA expression in the asthma group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). The budesonide treatment group had a decreased CSE mRNA expression and CBE mRNA expression compared with the control group, but had significantly increased CSE and CBE mRNA expression compared with the asthma group ($P < 0.01$). There was a significantly negative correlation between H_2S contents in plasma and total inflammatory cells in bronchoalveolar lavage fluid ($n = 30$, $r = -0.549$, $P < 0.01$). **Conclusions**　Plasma H_2S levels and CSE and CBS expression in the lung decrease in asthmatic rats, which possibly promotes inflammatory cell aggregation to the airway. Budesonide may alleviate airway inflammation in asthmatic rats possibly through the system of endogenous H_2S, CSE and CBS.

[**Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (8):654 – 657**]

Key words:　Asthma; Hydrogen sulfide; Cystathionine-γ-lyase; Cystathionine-β-synthase; Budesonide; Rats

[收稿日期]2009 – 10 – 23;[修回日期]2010 – 02 – 23
[基金项目]浙江省温岭市科技局基金资助项目(2007-55)。
[作者简介]李绍波,男,硕士,主治医师。

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是近年来新发现的气体信号分子,它在生理状态下发挥着与一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)极为相似而又独特的血管舒张活性,是具有重要生物活性的内源性化学小分子。已有实验证明 H_2S 在循环系统、神经系统、呼吸系统、消化系统等均有重要的病理生理意义[1],被认为可能是第三个内源性气体信号分子[2],是目前研究热点之一。胱硫醚-γ- 裂解酶(cystathionine-γ-lyase, CSE)和胱硫醚-β-合成酶(cystathionine-β-synthase, CBS)被认为是合成内源性 H_2S 的主要限速酶,对 H_2S 的合成起着非常重要作用。但是 H_2S、CSE 和 CBS 体系如何参与哮喘的发病机制至今尚不明确,尤其是糖皮质激素对它们表达的影响知之甚少。因此,研究 H_2S、CSE 和 CBS 体系在哮喘发病机制中的作用,可能对哮喘提供新的治疗方法和评价疗效有一定的参考价值。本研究旨在探讨内源性 H_2S 在哮喘炎症过程中可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

卵白蛋白(OVA)Ⅴ级购自美国 Sigma 公司,Trizol 抽提试剂购自 Invitrogen USA,RT-PCR 试剂盒购自 Fermentas USA,琼脂糖(agarose)购自上海晶美生物工程有限公司,溴化乙淀(EB)和 DEPC 购自上海生物工程有限公司。

1.2 实验动物及分组

清洁级健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 30 只,5 ~ 7 周龄,平均体重 234 ± 19 g,由温州医学院实验动物中心提供[动物批号:SCXK(浙)2005-0019]。随机分成 3 组,每组 10 只,分别为对照组、哮喘组、布地奈德组。

1.3 动物模型的复制

复制方法参照文献[3]。第 1 天和第 8 天腹腔注射 OVA/$Al(OH)_3$ 混合液 1 mL[含 OVA 1 mg 和 $Al(OH)_3$ 100 mg]致敏,各 1 次。第 15 天开始喷雾 1% OVA 30 min,每天 1 次连续激发 7 d。对照组致敏和激发均以生理盐水替代 OVA/$Al(OH)_3$。布地奈德组处理基本同哮喘组,不同的是在首次激发前 24 h 和每次激发前 30 min 给予布地奈德溶液 2 mg 雾化(阿斯利康公司生产,生产批号:303363)。

1.4 血、支气管肺泡灌洗液及肺组织标本的制备

末次激发 24 h 后,10% 水合氯醛(400 mg/kg)腹腔注射麻醉,右心室抽血 2 mL(用于 H_2S 含量的测定)。处死后结扎右主支气管,气管插管后行左肺灌洗(10 mL 生理盐水分 3 次灌洗),支气管肺泡灌洗液(BALF)经 2 000 r/min 离心 15 min,沉渣经生理盐水重悬,行细胞总数计数(除上皮细胞和红细胞外)和分类计数。取右肺门部位组织块,4% 多聚甲醛-PBS 溶液固定,常规石蜡包埋、切片、苏木精-伊红染色,光镜观察肺组织病理变化。余肺组织液氮速冻后 - 80℃ 冰箱保存,作 RNA 抽提。

1.5 血浆 H_2S 含量测定

采用亚甲蓝分光光度法。在试管中加入 0.5 mL 1% 醋酸锌,然后加入 0.1 mL 血浆标本混匀,再加入 0.5 mL 20 mmol/L 对苯二胺盐酸盐和 0.5 mL 30 mmol/L 三氯化铁,室温孵育 20 min。再加入1 mL 10% 三氯醋酸沉淀蛋白,加 2.5 mL 蒸馏水补足体积至 5 mL。2 000 r/min 离心 5 min,吸出上清液,在 670 nm 处检测上清液的吸光度(A)值。根据标准曲线计算上清液中 H_2S 含量[4]。

1.6 RT-PCR 法测定肺组织 CSE、CBS mRNA 的表达

测定方法参照文献[5]。采用 Trizol 试剂提取总 RNA,逆转录为 cDNA,以此为模板行 PCR 扩增。目的基因引物序列:CSE(PCR 产物为 305 bp)上游引物:5′-CCAGCACTTTGCCACTCA-3′,下游引物:5′-TGCCTCCATACACTTCATCC-3′,退火温度为 55℃。CBS(PCR 产物为 338 bp)上游引物:5′-CGTGATGC-CTGAGAAGATGAGT-3′,下游引物:5′-CACCGAT-GATTTTACAACCTGG-3′,退火温度 55.4℃。GAPDH(PCR 产物为 140 bp)上游引物:5′-CAAGTTCAACG-GCACAGTCAA-3′,下游引物:5′-TGGTGAAGACGC-CAGTAGACTC-3′,退火温度为 55℃。2% 琼脂糖凝胶电泳,SmartView 凝胶数字成像系统扫描分析扩增产物条带,分别测定各扩增灰度值,以各自目的基因扩增带灰度值与内参照 GAPDH 扩增带的灰度值比,作为其 mRNA 水平的指标。引物由上海基康生物有限公司合成。

1.7 统计学分析

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 统计软件 11.5 处理,多组样本均数比较采用 one-way ANOVA 方差分析,组间两两比较,方差齐者用 LSD 法检验,方差不齐者用 Tamhane′s T2 检验,两变量的相关分析采用 Pearson 直线相关分析法,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织苏木精-伊红染色病理学改变

对照组肺组织结构完整,支气管管腔规则,黏膜上皮完整,较少见炎症细胞浸润。哮喘组肺内支气管周围见大量炎性细胞浸润、黏膜下水肿、黏液腺增生、气道上皮断裂和脱落、黏液栓形成等表现。布地奈德组上述改变较哮喘组明显减轻(见图 1)。

2.2 BALF 中细胞总数计数和分类计数

哮喘组 BALF 中细胞总数计数、淋巴细胞(LYM)、中性粒细胞(NEU)和嗜酸细胞(EOS)的百分比均显著高于对照组($P<0.01$),而巨噬细胞(MΦ)的百分比显著低于对照组($P<0.01$)。布地奈德组 BALF 中细胞总数、EOS 的百分比均显著高于对照组($P<0.05$),但均低于哮喘组($P<0.01$);MΦ 的百分比显著低于对照组但高于哮喘组($P<0.01$);LYM 的百分比显著低于哮喘组($P<0.05$)与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$);NEU 的百分比显著高于对照组($P<0.01$),与哮喘组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

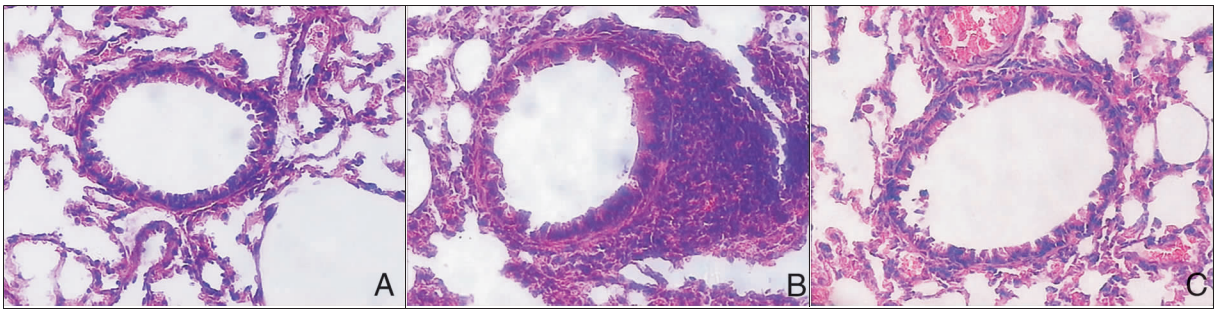

图 1 各组大鼠肺组织苏木精-伊红染色(×200) **A**:对照组,支气管管腔规则,炎症细胞浸润不明显;**B**:哮喘组,支气管周围见大量炎性细胞浸润;**C**:布地奈德组,支气管周围少量炎症细胞浸润。

表 1 BALF 中细胞总数计数和分类计数 ($\bar{x}\pm s$,%)

组别	鼠数	细胞总数($\times10^6$/L)	MΦ	LYM	NEU	EOS
对照组	10	2.8±0.4	83.0±2.6	9.2±2.1	6.6±1.8	1.2±0.9
哮喘组	10	7.3±1.2[b]	67.0±4.2[b]	13.6±1.6[b]	10.4±2.6[b]	9.0±3.6[b]
布地奈德组	10	3.7±0.4[a,d]	74.0±3.4[b,d]	10.4±2.5[c]	12.0±3.5[b]	3.6±1.3[a,d]
F 值		93.985	53.944	11.797	10.555	31.226
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与对照组比较,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与哮喘组比较,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

2.3 血浆 H_2S 含量和肺组织 CSE、CBS mRNA 的表达

哮喘组血浆中 H_2S 含量显著低于对照组($P<0.01$),布地奈德组与哮喘组和对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。哮喘组肺组织 CSE mRNA 的表达水平显著低于对照组($P<0.01$),布地奈德组低于对照组但高于哮喘组($P<0.01$)。哮喘组肺组织 CBS mRNA 表达水平低于对照组($P<0.01$),布地奈德组高于哮喘组,但仍低于对照组($P<0.01$)。见表 2。

表 2 血浆 H_2S 含量及肺组织 CSE 和 CBS mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	H_2S(μmol/L)	CSE mRNA	CBS mRNA
对照组	10	84±15	0.458±0.049	0.345±0.040
哮喘组	10	61±16[a]	0.136±0.017[a]	0.056±0.018[a]
布地奈德组	10	71±14	0.331±0.043[a,b]	0.164±0.025[a,b]
F 值		6.179	173.644	246.72
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较,$P<0.01$;b:与哮喘组比较,$P<0.01$

2.4 相关性分析

血浆 H_2S 含量和 BALF 中炎症细胞总数表达呈显著负相关($n=30$, $r=-0.549$, $P<0.01$)。

3 讨论

H_2S 一直被认为是一种有毒气体,长期接触这种气体,可以导致许多组织器官的损害。常出现结

膜炎、呼吸道黏膜刺激症状(咳嗽、咯痰等),甚至肺水肿、肺纤维化等严重呼吸道疾病,还被认为是诱发哮喘的一种危险因素,它可选择性地抑制呼吸链中细胞色素氧化酶 C 的活性,从而使组织缺氧,造成组织的缺氧性损伤。最近发现,体内含硫氨基酸代谢可以产生内源性 H_2S,且 H_2S 具有重要的生理功能。但内源性 H_2S 在哮喘发病机制中的作用,目前知之甚少。本研究通过检测哮喘大鼠模型血浆 H_2S 含量和肺组织 CSE、CBS mRNA 的表达,及布地奈德对其的影响,探讨内源性 H_2S 参与哮喘的可能作用机制。本研究结果显示,哮喘组 BALF 中细胞总数、LYM、NEU 和 EOS 细胞计数显著高于对照组,结合哮喘组支气管的病理改变,表明哮喘模型复制成功。

内源性的 H_2S 主要是半胱氨酸代谢产生,而半胱氨酸是由蛋氨酸代谢生成, CSE、CBS 和半胱氨酸转移酶是半胱氨酸的主要调节酶,对合成内源性 H_2S 起着非常重要的作用。H_2S 在体内可能有两种存在形式,其中 1/3 以气体 H_2S 形式,另外 2/3 则以 NaHS 形式存在。NaHS 在体内可解离成钠离子(Na^+) 和硫氢根离子(HS^-),后者与体内氢离子(H^+) 结合生成 H_2S,H_2S 和 NaHS 形成一种动态的平衡。CSE 不仅在平滑肌细胞中有表达,而且在肺动脉内皮细胞也有表达,肺动脉中内源性 H_2S 主要通过 CSE 的催化产生;而 CBS 主要存在于神经系统内,具有组织特异性分布[6-7]。但生理情况下,肺、支气管中也有 CBS 的存在[8]。

本研究发现,哮喘组大鼠血浆 H_2S 含量和肺组织 CSE、CBS mRNA 的表达水平显著性低于对照组。推测血浆 H_2S 和肺组织 CSE mRNA 的表达降低可能是导致哮喘炎症形成和进展的重要原因之一。血浆 H_2S 含量和 BALF 中细胞总数呈显著负相关,推测内源性 H_2S 含量的减少可能与哮喘气道炎症细胞聚集有关。相似的研究表明,哮喘大鼠肺组织及血浆中 H_2S 和肺组织 CSE、CBS 的 mRNA 表达水平显著低于对照组,给予外源性硫氢化钠(NaHS)后,CSE、CBS 的 mRNA 的表达水平在哮喘组均显著升高,认为内源性 H_2S 不仅参与哮喘的发病过程,而且还可作为一种监测哮喘严重程度的指标[9]。目前,哮喘首选的治疗方法是吸入糖皮质激素,但其作用机制十分复杂,至今尚未完全阐明。本研究采用布地奈德干预,观察其对 H_2S、CSE 和 CBS 体系的影响,结果发现经布地奈德治疗后,血浆 H_2S 和肺组织 CSE、CBS mRNA 表达水平回升。推测糖皮质激素有效治疗哮喘的机制可能部分通过 H_2S、CSE、CBS 体系起作用。但糖皮质激素通过何种途径影响 CSE、CBS 的表达,目前仍然未明确,有待进一步探索。

在一项对大鼠肺动脉平滑肌细胞离体培养的实验中发现,低氧对肺动脉平滑肌细胞中 CSE 的基因表达有抑制作用,表现为平滑肌细胞中 CSE mRNA 含量明显减少;无论是在常氧培养还是低氧培养情况下,NaHS 对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖均有抑制作用。提出低氧时 H_2S 体系下调可能是低氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的机制之一[10]。哮喘急性发作时常伴有机体低氧过程,推测内源性 H_2S 体系下调可能还与哮喘气道平滑肌增殖有关,有待于进一步研究。

上述结果表明,哮喘大鼠 H_2S、CSE、CBS 的表达下降,它们的表达下降可能促进了炎症细胞在气道中的聚集,布地奈德改善哮喘炎症的机制可能部分通过内源性 H_2S、CSE、CBS 体系起作用。

[参 考 文 献]

[1] 王配配, 陈亚红. 呼吸系统中的内源性硫化氢[J]. 国际呼吸杂志, 2008, 28(4):246-249.
[2] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous tranamitter[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1792-1798.
[3] 童夏生,李昌崇,李绍波. 中性粒细胞及其 CD11b 在大鼠哮喘中的表达及地塞米松调控[J]. 温州医学院学报, 2005, 35(3):207-210.
[4] 张春雨,杜军保,闫辉, 唐朝枢. 新型内源性气体信号分子硫化氢对低氧性肺血管胶原重塑的影响 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(7):448-452.
[5] 闫辉,杜军保,唐朝枢. 自发性高血压大鼠硫化氢/ 胱硫醚 γ-裂解酶体系的实验观察[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(13): 1114-1117.
[6] 张静,项如莲. 硫化氢在心血管系统中的研究进展[J]. 医学综述, 2005, 11(4):318-320.
[7] 陈晓波, 杜军保, 耿彬, 蒋宏峰,唐朝枢. 硫化氢对培养的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(8):1009-1011.
[8] Bao L, Vlcek C, Paces V, Kraus JP. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-sythase mRNA isoforms[J]. Arch Biophys, 1998, 350(1):95-103.
[9] 伍蕊,姚婉贞,陈亚红,耿斌,路明,唐朝枢. 硫化氢在大鼠急性支气管哮喘模型中的变化及意义[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007, 30(7):522-526.
[10] 张春雨,丛柏林,宫丽敏,杜军保. 硫化氢体系在大鼠低氧性肺动脉平滑肌细胞增殖中的意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(2):140-142.

(本文编辑:黄 榕)