

论著 · 实验研究

氧化苦参碱对哮喘小鼠肺及脾脏组织中
树突状细胞分布变化影响的研究

侯伟¹ 刘海燕¹ 杨旭东² 周戩平¹ 李丹¹ 杨智毅¹ 葛利吉¹

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院儿科, 陕西 西安 710004;
2. 西安交通大学医学院遗传与分子生物学系, 陕西 西安 710061)

【摘要】目的 研究氧化苦参碱(Oxy)对哮喘小鼠气道炎症、肺和脾脏组织中树突状细胞(DC)分布变化的影响。**方法** 50只小鼠随机分为哮喘组、地塞米松治疗组、Oxy 20、40、80 mg/kg组等5组,每组10只。苏木精-伊红染色观察肺组织病理形态改变,免疫组化检测肺及脾脏组织中DC表面抗原33D1的表达变化。**结果** 哮喘组肺组织出现明显的炎症反应,在地塞米松、Oxy干预后气道炎症反应均减轻。哮喘组肺和脾脏组织中33D1抗原阳性DC可见较多表达,在地塞米松干预后阳性表达明显降低($P<0.01$),不同剂量Oxy干预后,各组肺组织的33D1阳性表达的DC均较哮喘组降低($P<0.01$),并呈剂量依赖性。在脾脏组织40 mg/kg和80 mg/kg Oxy可显著降低33D1的表达($P<0.01$)。**结论** Oxy能减轻哮喘气道炎症,并可减少哮喘小鼠肺和脾脏组织DC的数量,这可能是Oxy治疗哮喘的重要机制。

[中国当代儿科杂志,2011,13(1):40-43]

【关键词】 氧化苦参碱; 气道炎症; 脾脏; 树突状细胞; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2011)01-0040-04

Effect of oxymatrine on the distribution of dendritic cells in lung and spleen tissues of asthmatic mice

HOU Wei, LIU Hai-Yan, YANG Xu-Dong, ZHOU Jian-Ping, LI Dan, YANG Zhi-Yi, GE Li-Ji. Department of Pediatrics, Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China (Email: houweidf@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of oxymatrine (Oxy) on airway inflammation and the distribution of dendritic cells (DC) in lung and spleen tissues of asthmatic mice. **Methods** Fifty BALB/c mice were assigned into five groups ($n=10$): an asthma model group, a dexamethasone (Dex) treatment group and three Oxy treatment groups (Oxy dose: 20, 40 and 80 mg/kg respectively). The histological changes of lung tissues were observed by hematoxylin and eosin staining. The expression of 33D1 antigen (a marker of DC) in lung and spleen tissues were detected by immunohistochemical staining. **Results** The inflammatory reactions of the lung tissues in the Dex or Oxy treatment groups were less severe than those in the asthma model group. 33D1 antigen was remarkably expressed in the lung and spleen tissues of the asthma model group. After Dex treatment, the expression of 33D1 antigen in the lung and spleen tissues decreased significantly ($P<0.01$). 33D1 antigen expression in the lung tissues was significantly reduced in all of the three Oxy treatment groups in a dose-dependent manner compared with that in the asthma model group ($P<0.01$). The treatment with Oxy of 40 and 80 mg/kg decreased significantly the 33D1 antigen expression in the spleen tissues ($P<0.01$). **Conclusions** Oxy can alleviate airway inflammation and reduce the number of DC in lung and spleen tissues of asthma mice, which may be contributed to the mechanism of Oxy for treatment of asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(1):40-43]

Key words: Oxymatrine; Airway inflammation; Spleen; Dendritic cell; Mice

支气管哮喘是影响儿童健康最常见的疾病,近年来随着我国经济的迅速发展和环境的改变,发病率逐渐升高。支气管哮喘是由嗜酸性粒细胞、肥大细胞、T淋巴细胞等多种炎性细胞参与的气道慢性炎症,其中Th1/Th2功能失调是哮喘发病的关键环节。树突状细胞(dendritic cells, DC)是抗原递呈功能最强的抗原递呈细胞(antigen presenting cells, APC),在诱导Th1/Th2细胞反应的平衡和偏移过

[收稿日期]2010-05-07;[修回日期]2010-06-07
[基金项目]陕西省科技计划中药现代化项目(2008K-06);陕西省中医药管理局资助项目(No. 03147)。
[作者简介]侯伟,男,硕士,副教授。

程中起关键作用,参与哮喘的发病机制^[1]。氧化苦参碱(oxymatrine, Oxy)是常用的清热燥湿中药,前期研究发现,Oxy能明显降低哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎性细胞数量,影响细胞因子水平变化,从而改善哮喘气道炎症^[2]。为进一步探讨Oxy在哮喘气道炎症形成和免疫调节中的作用机制,本研究通过建立卵蛋白(OVA)致敏的小鼠哮喘模型,观察Oxy对哮喘小鼠肺及脾脏DC分布变化的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级4周龄BALB/c小鼠50只,购于西安交通大学医学院实验动物中心,体重 30.0 ± 5.6 g,随机分成哮喘、地塞米松组、Oxy低(20 mg/kg)、中(40 mg/kg)、高(80 mg/kg)剂量干预组,每组10只。

1.2 试剂与仪器

OVA购自美国Sigma公司,抗小鼠DC单克隆抗体(33D1)购自eBioscience公司。雾化器为德国百瑞Pari2 Master,雾化颗粒直径在 $0.5 \sim 5 \mu\text{m}$ 之间。氧化苦参碱注射液(天津生物化学制药厂,200 mg/2 mL,国药准字H12020506)、计算机图像分析系统。

1.3 方法

1.3.1 哮喘模型的建立 哮喘模型的建立参照文献^[3]。小鼠适应性饲养2周后,于实验第1天和第8天分别腹腔注射OVA抗原0.2 mL(含卵蛋白100 μg 和氧化铝1 mg)致敏2次,于实验第15天起将小鼠置于密闭容器内,以3%的卵蛋白溶液6 mL雾化,每天1次,每次30 min,连续7 d。

1.3.2 干预实验 地塞米松组从第15天起每次雾化前1 h给予地塞米松0.2 mg/kg腹腔注射,连续7 d。而Oxy低、中、高剂量组分别给予Oxy注射液20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg腹腔注射,连续7 d。

1.3.3 标本制备 最后一次激发后24 h各组小鼠用盐酸氯胺酮腹腔麻醉后处死。取左肺下叶肺组织,并行左上腹切口,暴露脾脏,分离周围组织取脾,10%甲醛固定组织24 h。肺组织使用负压针管抽取气体,酒精梯度脱水,石蜡包埋做5 μm 厚切片,分别行苏木精-伊红染色和免疫组化染色。

1.3.4 肺、脾脏组织33D1表达的检测 采用免

疫组织化学方法,主要步骤如下:常规脱腊、水化,3%过氧化氢去除内源性过氧化物酶;抗原修复液37℃ 10 min修复抗原,正常血清封闭;加小鼠DC单抗(33D1)37℃ 2 h,加入生物素化二抗37℃ 20 min,免疫组化染色37℃ 20 min,DAB显色;苏木素复染、透明、封片,以胞浆染色呈棕黄色的细胞为阳性细胞。

1.3.5 结果观察和测量 苏木精-伊红染色后镜下观察每组气道炎症浸润,管腔狭窄黏液栓堵塞,气道上皮细胞脱落情况。免疫组化染色后以计算机图像分析系统测定平均吸光度值,用背景的吸光度值减去阳性部位的吸光度值即为阳性部位的吸光度值,每只动物取5个小气道,平均后作为该标本的吸光度值。

1.4 统计学分析

用SPSS 13.0统计软件进行分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

哮喘组经激发后,出现呼吸急促,口唇发绀,腹部煽动,易激惹,烦躁不安。地塞米松组、氧化苦参碱组也出现哮喘组情况,但症状明显减轻。

2.2 病理学观察

肺组织切片的苏木精-伊红染色,可见小鼠气道黏膜固有层嗜酸性细胞浸润,单核细胞明显增生,上皮增厚、破坏和脱落,纤毛细胞消失,炎性细胞大量堆积,气管及血管周围炎性细胞浸润以嗜酸性粒细胞、淋巴细胞和中性粒细胞为主,气道黏液分泌增多。气道周围小血管壁不完整,血管结构紊乱,血管壁也有不同程度增厚。地塞米松及Oxy干预后肺组织炎症反应明显减轻,不同剂量的Oxy之间病理改变差别不明显,见图1。

2.3 小鼠肺组织中DC表面33D1抗原的表达

哮喘组33D1阳性表达明显增多。干预后地塞米松组、不同剂量Oxy组33D1表达均明显减少,与哮喘组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),其中低剂量Oxy干预组与中、高剂量组之间33D1表达差异有统计学意义($P < 0.05$),而中剂量与高剂量组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),见图2,图3。

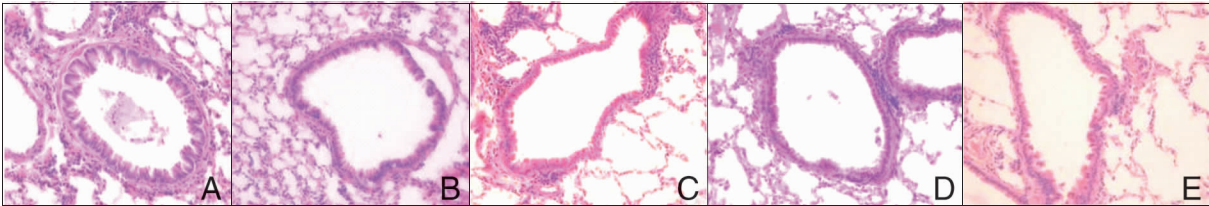


图1 肺组织病理学改变(苏木精-伊红染色×40) A:哮喘组,支气管周围间质增宽,大量炎性细胞浸润;B:地塞米松组,肺组织病理改变较哮喘组减轻;C~E:分别为低、中、高剂量Oxy干预组,支气管周围炎性细胞浸润较哮喘组减少。

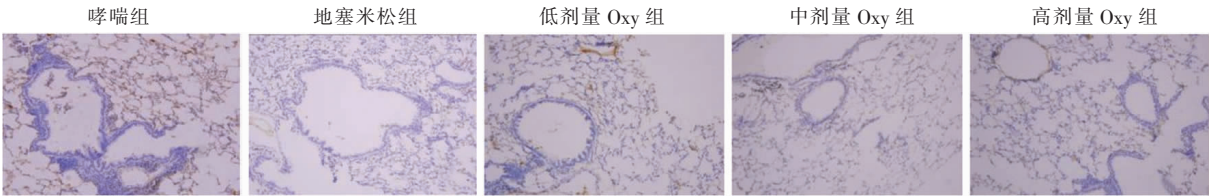


图2 肺组织中33D1表达(免疫组化ABC法染色×10) 哮喘组肺组织33D1表达高,地塞米松组33D1表达较哮喘组减少,低、中、高剂量Oxy干预组肺组织33D1表达较哮喘组减少。

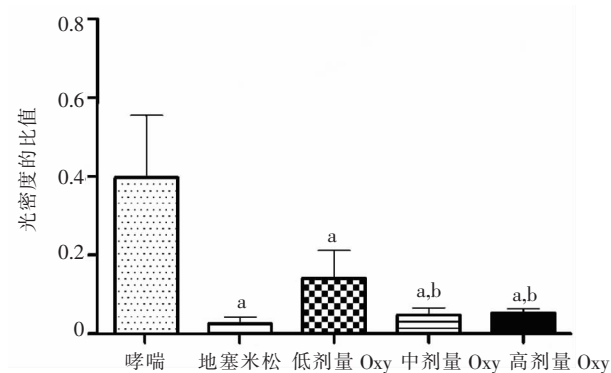


图3 肺组织中33D1的表达 a:与哮喘组比较, $P<0.01$; b:与低剂量Oxy组比较, $P<0.05$

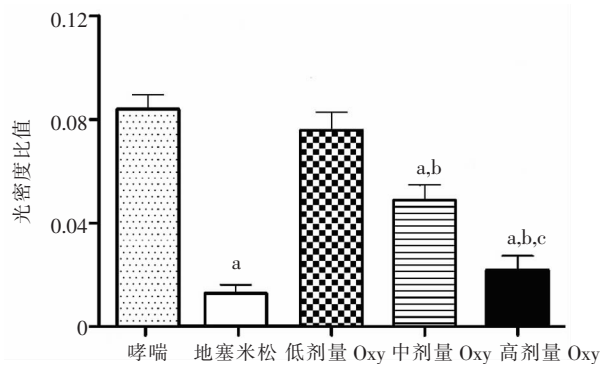


图4 脾脏组织中33D1的表达 a:与哮喘组比较, $P<0.01$; b:与低剂量Oxy组比较, $P<0.05$; c:与中剂量Oxy组比较, $P<0.05$ 。

2.4 小鼠脾脏组织中DC表面33D1抗原表达

本研究发现,小鼠脾脏组织33D1抗原表达在各组间差异有统计学意义($F=8.34, P<0.01$)。哮喘组33D1阳性表达明显增多。地塞米松干预后33D1表达明显减少($P<0.01$)。低剂量Oxy干预后33D1表达与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。中、高剂量Oxy干预后33D1表达较对照组和低剂量Oxy组明显减少($P<0.01$),其中不同剂量Oxy干预组之间33D1表达差异有统计学意义($P<0.05$),见图4。

3 讨论

DC是目前已知的功能最强的抗原提呈细胞,参与抗原的识别、加工处理与提呈,是机体免疫反应的首要环节,也是免疫反应中识别自我与非我的关键环节。支气管哮喘主要表现为气道慢性炎症,抗原特异性Th2细胞在哮喘气道炎症形成及发展中起重要作用,气道DC在诱导初始型T细胞对吸入抗原的初级免疫反应和过敏反应的发展中起重要作用,DC为始动气道变态反应之必需^[4]。未成熟DC在初级免疫应答中捕捉吸入性抗原后分化成熟并迁移至局部淋巴结,呈递抗原至T细胞,激活T细胞。有研究表明,DC在哮喘发病中除可自分泌细胞因

子,还能有效激活 Th2 细胞分泌细胞因子,在哮喘发病机制中起重要的作用。

目前哮喘的治疗是以糖皮质激素抗炎为主,它可作用于大多数炎症细胞和结构细胞,由于长期使用糖皮质激素可产生一定的副作用,虽然有较好的疗效,但并不能从根本上解决疾病的发病和进展,因此积极寻找新的治疗药物和手段十分重要。研究发现 Oxy 能有效对抗哮喘大鼠气道的慢性炎症,减轻肺组织局部炎性浸润和气道壁增生、肥厚,可以显著降低致敏大鼠的气道高反应性,但其抗哮喘炎症的具体机制尚不完全清楚^[5]。推测 DC 可能通过诱导 Th1/Th2 细胞分化在哮喘发作时起重要作用^[6]。脾脏是机体重要的外周免疫器官,含有大量的免疫细胞,包括 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞及 DC 等。脾脏中的 DC 含量很少,但因 DC 是唯一能激活初始型 T 细胞的抗原提呈细胞,使其在体内抗原提呈细胞中起主导作用^[7]。正常情况下绝大多数体内 DC 处于非成熟状态,未成熟的 DC 表达低水平的协同刺激分子和黏附分子(ICAM-1),体外激发混合淋巴细胞反应(mixed lymphocyte reaction,MLR)的能力较弱,但具有极强的摄取和加工处理抗原的能力。在外源性抗原、炎症刺激因素等共同影响下,它们能从非淋巴组织进入次级淋巴组织并逐渐成熟^[8]。成熟的 DC 能够吸引、活化幼稚 T 细胞并与之相互作用,从而启动初级免疫反应^[9]。由于 DC 分布广泛,但是数量极少,仅占外周血单个核细胞(PBMC)的 1% 以下,占小鼠脾脏的 0.2% ~ 0.5%。目前尚无能够用于 DC 鉴定的特异性分子标志,在鉴定所得到的细胞是否为 DC 时,常常要通过形态、组合性细胞表面标志、MLR 中刺激初始型 T 细胞增殖等几方面综合判断。在试验研究中 DC 相对特异性标志小鼠为 33D1 和 NLDC145,大鼠为 OX62,人类为 DC 的 CD1a 和 CD83。

本研究显示,地塞米松可以明显减轻气道炎症,减少炎性细胞的浸润。Oxy 与地塞米松一样也能有效对抗哮喘小鼠的气道炎症,减轻肺组织局部炎性浸润和气道壁增生、肥厚。不同剂量的 Oxy 均有这种效果,且之间的病理形态上变化差异不显著。有研究发现在过敏性气道炎症时,炎症持续进行必须有一定数目的 DC 不断地增补到肺组织中而维持气道炎症,通过干预 DC 而干预哮喘炎症瀑布效应可能成为治疗哮喘的新方法。本研究显示,哮喘小鼠的肺及脾脏组织中 DC 有较广泛的 33D1 抗原免疫染色阳性分布,主要在气管、支气管、肺泡以及气管

周围相关淋巴组织、血管周围,表明肺、脾脏组织中 DC 数量、分布变化与哮喘发病机制有密切的关系。给予地塞米松治疗后肺及脾脏组织中 33D1 阳性 DC 显著减少,肺组织在不同剂量 Oxy 干预治疗后,各组的 33D1 阳性 DC 均较哮喘组降低,其中中等和高剂量组 33D1 阳性 DC 减少更显著。而在脾脏组织小剂量 Oxy 对 33D1 抗原阳性 DC 无影响,而中等和高剂量 Oxy 可显著降低 33D1 的阳性 DC 分布,结果表明 Oxy 在哮喘免疫治疗中已显示出良好的疗效。

DC 在气道上皮构成一个免疫调节网络,是机体预防吸入性抗原侵袭的第一道防线^[10]。本研究发现,哮喘小鼠气道及脾脏组织中 DC 数量增多,表明 DC 参与哮喘发病机制,Oxy 可明显减轻气道变应性炎症,抑制肺及脾脏组织中 DC 数量,可以改善哮喘气道炎症的程度,这可能是 Oxy 治疗支气管哮喘的重要机制。

[参 考 文 献]

[1] Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(6): 702-708.

[2] 侯伟,刘海燕,王爱荣. 氧化苦参碱对小鼠哮喘模型气道炎症及细胞因子的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版),2004,25(6):587-589.

[3] 侯伟,刘海燕,杨旭东,李静,周戩平,李丹,等. 氧化苦参碱对哮喘小鼠肺组织中 TGF- β 1 及 AngII 表达的影响[J]. 中国儿童保健杂志,2010,18(2):135-137.

[4] Maldonado-López R, Moser M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses[J]. Semin Immunol, 2001, 13(5): 275-282.

[5] 焦霞,沈其昀,王利民,许以平,张黎明. 氧化苦参碱对哮喘小鼠的抗炎作用及对 ICAM21 mRNA 表达的影响[J]. 首都医科大学学报,2006,27(1): 27-30.

[6] 蒋东波,周雅德,杨锡强,李华强,姚忠凯,覃世文,等. 树突状细胞在小儿哮喘发病机制中的作用[J]. 中华儿科杂志,2004,42(7):520-523.

[7] 刘茜,陆江阳,王晓虹,田宏伟,田光,杨毅,等. 小鼠脾脏树突状细胞的分布与形态学观察[J]. 军事医学科学院院刊,2007,31(4):346-348.

[8] Agger R, Crowley MT, Witmer-Pack MD. The surface of dendritic cells in the mouse as studied with monoclonal antibodies[J] Int Rev Immunol, 1990, 6(2-3): 89-101

[9] Lombardi V, Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma[J]. Drug News Perspect, 2009, 22(8): 445-451.

[10] Grunig G, Banz A, de Waal Malefyt R. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells[J]. Pharmacol Ther, 2005, 106(1): 75-96.

(本文编辑:徐福兰)