

论著 · 实验研究

穿孔素和颗粒酶 B 在哮喘大鼠肺组织中的表达及重组人生长激素的干预作用

邹丽萍 杜文丽 张艳 王利霞

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨哮喘大鼠肺组织中穿孔素(PFP)、颗粒酶 B(GzmB)的表达变化及重组人生长激素(rhGH)的干预作用。**方法** 30只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为正常对照组、哮喘模型组及 rhGH 干预组。通过苏木精-伊红染色观察卵蛋白激发作用及 rhGH 干预后哮喘大鼠气道的病理变化。TUNEL 原位凋亡检测支气管上皮细胞凋亡,RT-PCR 方法检测肺组织中 PFP 及 GzmB mRNA 的表达。**结果** 哮喘组支气管上皮细胞凋亡指数明显增高,而 rhGH 干预组的凋亡指数则明显低于哮喘组($P<0.05$);PFP 和 GzmB mRNA 在对照组中呈低表达;在哮喘组的表达明显强于对照组($P<0.05$);rhGH 进行干预后,PFP 和 GzmB mRNA 表达明显低于哮喘组(0.48 ± 0.08 vs 0.63 ± 0.08 ; 0.44 ± 0.13 vs 0.71 ± 0.15 ; 均 $P<0.05$)。PFP 和 GzmB mRNA 表达与支气管上皮细胞凋亡率呈正相关(r 分别为 0.800 和 0.806, $P<0.05$)。**结论** PFP 和 GzmB 参与了哮喘发病过程中的重要环节;rhGH 可能通过降低 PFP 和 GzmB 的表达抑制支气管上皮细胞的凋亡从而抑制气道重塑。

[中国当代儿科杂志,2011,13(3):223-226]

[关键词] 哮喘;重组人生长激素;穿孔素;颗粒酶 B;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0223-04

Expression of perforin and granzyme B in asthmatic rats and intervention of recombinant human growth hormone

ZOU Li-Ping, DU Wen-Li, ZHANG Yan, WANG Li-Xia. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: hezeduwenli@163.com)

Abstract: Objective To study the expression of perforin and granzyme B (GzmB) in the lungs of asthmatic rats and the effect of recombinant human growth hormone (rhGH) on the expression. **Methods** Thirty Sprague-Dawley male rats were randomly divided into a normal control group and asthma groups with and without rhGH treatment. An asthma model was prepared by repeated sensitization with ovalbumin and aluminium hydroxide. The morphological changes of the airway were observed by hematoxylin and eosin staining. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin (TUNEL) was used to detect the apoptosis of epithelial cells in the airway. RT-PCR was used to detect the mRNA transcripts of perforin and GzmB in the lung tissues. **Results** A significantly increased apoptosis rate of airway epithelial cells was noted in the untreated asthma group. The apoptosis rate was significantly reduced in the rhGH-treated asthma group ($P<0.05$). Compared with the control group, perforin and GzmB expression in the lungs in the untreated asthma group increased significantly. The rhGH-treated asthma group demonstrated significantly decreased perforin (0.48 ± 0.08 vs 0.63 ± 0.08 ; $P<0.05$) and GzmB (0.44 ± 0.13 vs 0.71 ± 0.15 ; $P<0.05$) expression in the lungs compared with the untreated asthma group. Both PFP ($r=0.800$, $P<0.05$) and GzmB ($r=0.806$, $P<0.01$) were positively correlated with the apoptosis rate of airway epithelial cells. **Conclusions** Perforin and GzmB may play important roles in the pathogenesis of asthma. rhGH treatment can inhibit apoptosis of airway epithelial cells and airway remodeling, possibly through a reduction in perforin and GzmB expression. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):223-226]

Key words: Asthma; Recombinant human growth hormone; Perforin; Granzyme B; Rats

支气管哮喘是以反复发作性气急、胸闷、咳嗽等为主要症状,若长期反复发作可导致阻塞性肺气肿。有研究表明支气管上皮细胞凋亡是哮喘发病过程中的始发因素^[1],因此抑制支气管上皮细胞的凋亡是治疗哮喘的关键环节。穿孔素(perforin, PFP)与颗粒酶 B(granzyme B, GzmB)是由细胞毒性 T 细胞

[收稿日期]2010-08-14;[修回日期]2010-09-07
[作者简介]邹丽萍,女,硕士,主任医师。

(CTL 细胞)和自然杀伤细胞(NK 细胞)分泌的介导细胞凋亡的重要因子,其在病毒性心肌炎小鼠模型中可以诱导心肌细胞的凋亡,但二者是否能诱导支气管上皮细胞凋亡,参与哮喘的发病过程至今尚无报道。重组人生长激素(rhGH)是人工合成的一种多肽,其可通过抑制相应细胞的凋亡治疗扩张型心肌病、缺血性心肌损伤等疾病。本研究通过建立大鼠哮喘模型观察 PFP 与 GzmB 的表达变化及其与上皮细胞凋亡的关系,以及 rhGH 的干预对其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 4 ~ 6 周龄 Sprague-Dawley 大鼠 30 只,体重 110 ~ 150 g,由河南省动物实验中心提供。随机分为正常对照组、哮喘模型组和 rhGH 干预组,每组 10 只。

1.2 主要仪器和试剂

2700 型 RT-PCR 仪(美国 Applied Biosystems),原位凋亡试剂盒(美国 Sigma 公司),鸡卵清白蛋白(OVA,美国 Sigma 公司),重组人生长激素(安科生物高科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 哮喘模型制作 第 1、8 及 15 天哮喘组和干预组大鼠分别应用新鲜配制的 10% OVA-氢氧化铝混悬液 1 mL (OVA 100 mg + 氢氧化铝 100 mg)腹腔注射,致敏 3 次,对照组应用生理盐水 1 mL 行腹腔注射。第 16 天开始,哮喘组和干预组大鼠分别应用 1% OVA-氢氧化铝混悬液 5 mL 雾化吸入 30 min,隔日 1 次,共雾化 20 次;干预组大鼠在第 11 次雾化吸入混悬液前 30 min 皮下注射 rhGH(1.33 KU/kg),共注射 10 次;对照组每次生理盐水 5 mL 雾化吸入 30 min,隔日 1 次,共 20 次。

1.3.2 标本制作 各组大鼠在最后一次雾化吸入后腹腔注射苯巴比妥 100 mg 处死,取右肺置于液氮中保存,留作 RT-PCR 分析。应用无菌生理盐水和 4% 甲醛对左肺进行灌注和冲洗,甲醛固定,石蜡包埋。分别于垂直和平行气道方向取材切片,作苏木精-伊红(HE)染色。

1.3.3 原位细胞凋亡检测 采用 TUNEL 原位凋亡检测技术,具体操作方法按 TUNLE 原位末端凋亡检测试剂盒说明书进行,高倍镜视野下细胞核呈棕黄色为凋亡阳性细胞。在光镜下分析结果:随机选取 5 个高倍镜野(×400 并含有同等级别支气管)的

支气管上皮总数及阳性染色上皮细胞数,按公式:阳性细胞数/细胞总数 × 100% 计算上皮细胞凋亡指数。

1.3.4 RT-PCR 分析 PFP 上游引物:5-TGTCT-CAAGCGAATACAAAGC-3,下游引物:5-GGGTC-CGAGTCTTCCAGTAG-3,扩增产物:252 bp;GzmB 上游引物:5-AGCTCCTCTTGCTCCTGC-3,下游引物:5-CACATCTCCTGGTTTCACT-3,扩增产物:422 bp。取约 200 g 肺组织边加液氮边研磨至组织完全研碎,依次加入 Triol、氯仿、75% 无水冷乙醇,依次离心弃上清后加入 10 μL DEPC 水充分溶解沉淀。取 8 μL RNA 提取液进行 cDNA 的合成,采用的为 20 μL 体系。RT-PCR 采用 50 μL 体系进行。应用 DEPC 水及 TBE、琼脂糖配制成 2% 的凝胶,加 5 μL RT-PCR 产物行电泳,紫外线灯观察产物条带并拍照。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件包对数据进行统计学分析,实验数据以均数 ± 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,变量之间采用直线回归进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色检测肺组织病理变化

对照组肺组织形态学正常。哮喘模型组大鼠肺组织可见支气管管腔中有黏液栓形成,支气管上皮水肿、脱落,结构不规则;杯状细胞增加,黏膜下层和平滑肌增厚;气道壁及肺间质有大量炎性细胞浸润,以嗜酸性粒细胞和淋巴细胞为主;rhGH 干预组炎症反应较哮喘组减轻,杯状细胞减少,黏膜下层和平滑肌增厚较哮喘组减轻。见图 1。

2.2 上皮细胞凋亡的变化

对照组支气管上皮凋亡较少;哮喘组支气管上皮凋亡指数较多,高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);rhGH 干预组支气管上皮细胞凋亡指数高于对照组,但较哮喘组明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1 和图 2、3。

表 1 各组支气管上皮细胞原位凋亡指数的比较 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	鼠数	凋亡指数
对照组	10	14 ± 4
哮喘组	10	35 ± 6 ^a
干预组	10	26 ± 4 ^{a,b}
F 值		42.596
P 值		<0.05

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

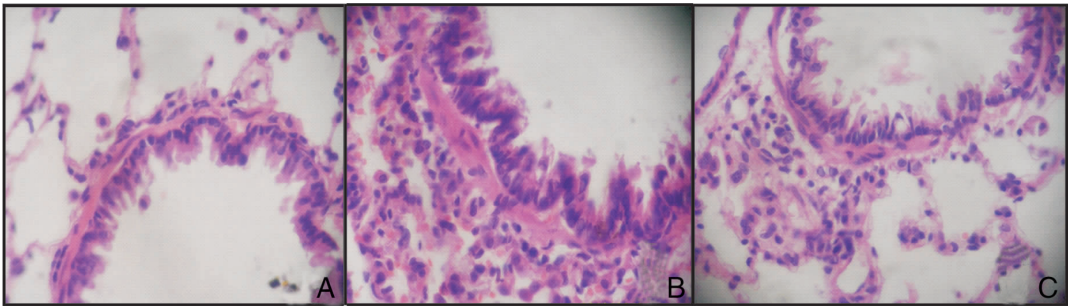


图1 各组大鼠气道壁结构改变(HE染色,×400) A:对照组,较少炎症细胞浸润,支气管管壁中等厚度;B:哮喘组,较多炎症细胞浸润(以嗜酸性粒细胞和淋巴细胞为主),平滑肌层增厚,支气管管壁较对照组增厚。C:干预组,炎症细胞浸润较哮喘组减少,支气管管壁厚度较哮喘组薄。

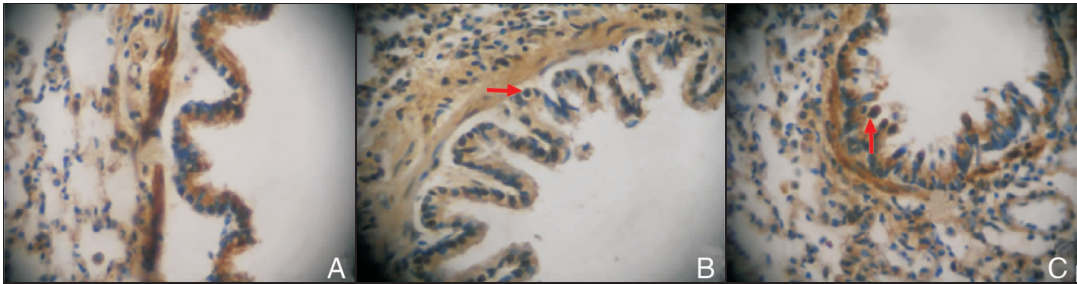


图2 各组大鼠支气管上皮细胞凋亡变化(TUNEL染色,×400) A:对照组,支气管上皮细胞较少凋亡;B:哮喘组,支气管上皮凋亡较对照组增多;C:rhGH干预组,上皮细胞凋亡较哮喘组减少。箭头所指为凋亡细胞。

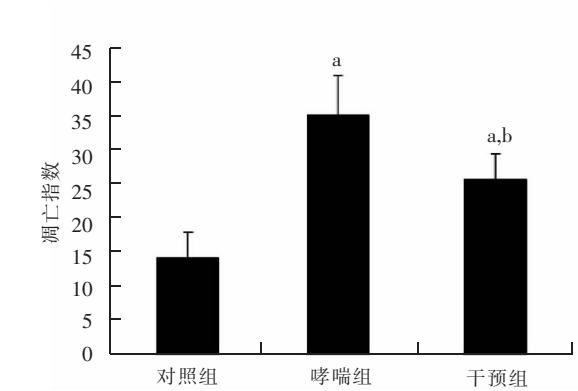


图3 支气管上皮细胞凋亡指数($n=10$) a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与哮喘组比较, $P<0.05$

2.3 支气管肺组织中的 PFP 及 GzmB mRNA 的表达

哮喘组、干预组的 PFP 及 GzmB 表达量均较对照组增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。rhGH 干预组的两者表达均较哮喘组减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2,图4。

表2 各组 PFP 和 GzmB mRNA 的表达 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	鼠数	PFP	GzmB
对照组	10	0.33±0.12	0.21±0.09
哮喘组	10	0.63±0.08 ^a	0.71±0.15 ^a
干预组	10	0.48±0.08 ^{a,b}	0.44±0.13 ^{a,b}
F 值		26.439	37.402
P 值		<0.05	<0.05

a 与对照组比较, $P<0.05$;b 与干预组比较, $P<0.05$

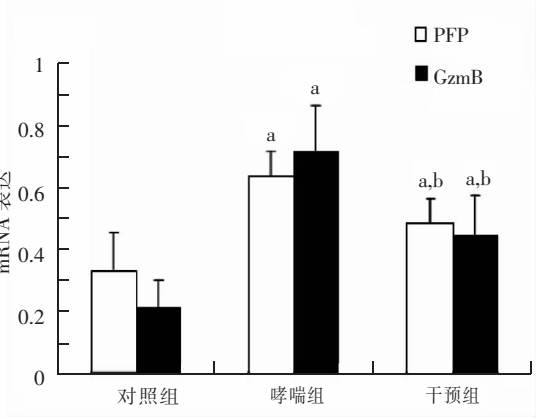


图4 肺组织中 PFP 和 GzmB mRNA 的表达($n=10$) a:与对照组比较, $P<0.05$; b:与哮喘组比较, $P<0.05$

2.4 相关性分析

PFP 表达量与支气管上皮细胞凋亡指数呈正相关($r=0.800,P<0.05$)。GzmB 表达量亦与支气管上皮细胞凋亡指数呈正相关($r=0.806,P<0.05$)。

3 讨论

炎症细胞的募集及气道重塑参与了哮喘的发生与发展,目前对于引起炎症反应及气道重塑的始发机制较少阐述。支气管上皮是接触外界环境的第一

道防线,它的凋亡变化启动了哮喘发生的后续环节。

PFP 和 GzmB 是由 CTL 细胞分泌的细胞因子,也是免疫应答和免疫防御过程中重要效应分子之一,具有诱导细胞凋亡的作用^[2-3]。毛海英等^[4]研究发现哮喘患儿 CD8⁺ T 淋巴细胞 PFP 与 GzmB 的表达较正常儿童明显增加;Bratke 等^[5]的研究亦发现哮喘患者血液中 GzmB 的表达明显增加。本研究发现哮喘模型组肺组织中 PFP 和 GzmB mRNA 表达明显升高,支气管上皮细胞凋亡指数增加,气道壁周围大量炎性细胞浸润,平滑肌增生肥厚,杯状细胞和黏膜下腺体增生,胶原沉积明显,这与既往报道相符^[6]。干预组 PFP 和 GzmB 表达较少,支气管上皮细胞凋亡指数下降,气道壁周围较少炎症细胞浸润,气道壁各层厚度减少,胶原沉积减少,与 Benayoun 等^[7]的研究一致。哮喘大鼠肺组织中高表达 PFP 及 GzmB,支气管凋亡率增加,二者诱导细胞凋亡的可能机制为^[8]:①CTL 细胞在 MHC- I 类抗原(主要组织相容性复合体 I 类抗原)制约下识别靶细胞,通过抗原受体与原紧密结合,从胞浆颗粒中释放出穿孔素。在 Ca²⁺ 存在的条件下穿孔素单体可迅速附着于靶细胞膜,嵌入靶细胞膜的双层磷脂中,多个单体聚合形成打孔聚合物,在靶细胞膜上形成跨膜通道,使 GzmB 等进入到细胞浆和细胞核中。颗粒酶裂解特异性细胞核蛋白质后激活自溶性内切酶,使 DNA 断裂降解、细胞凋亡。②跨膜孔道形成后靶细胞膜去极化使细胞内环境紊乱,引起渗透压的改变,导致细胞溶解。

rhGH 是人工合成的多肽,可用于治疗扩张型心脏病、缺血性心肌损伤等,其机理均为抑制了相应细胞的凋亡。烟雾吸入致肺损伤时,经皮下注入外源性 rhGH 能有效抑制细胞凋亡^[9]。本研究表明哮喘模型组及 rhGH 干预组上皮细胞凋亡指数均高于正常对照组,且 rhGH 干预组上皮细胞凋亡指数低于哮喘模型组,进一步证实了上皮细胞的过度凋亡参与了哮喘发病的病理过程。目前哮喘治疗为国际上通用的激素治疗方案,但吸入糖皮质激素不能减少支气管上皮细胞的凋亡,不能阻止哮喘的始发环节。郑仰明等^[10]的研究发现布地奈德虽能明显减轻淋巴细胞和嗜酸性粒细胞的浸润,但对上皮细胞的凋亡却无抑制作用。吸入糖皮质激素可通过一定途径抑制支气管上皮细胞的增殖,并不能抑制哮喘大鼠支

气管上皮细胞的凋亡^[11]。本研究采用 rhGH 干预后 PFP、GzmB 表达减少,支气管上皮细胞的凋亡减少,淋巴细胞和嗜酸性粒的浸润减少,气道重塑得到改观,可部分逆转哮喘的发病过程。

本研究证实了支气管上皮细胞参与了哮喘发生发展的病理过程,这种损伤机制可能与 PFP 和 GzmB 的表达增加有关。通过应用 rhGH 干预可抑制支气管上皮细胞的凋亡从而阻止哮喘发生的后续环节进而抑制气道重塑,为哮喘的治疗提供新的思路。但是导致支气管上皮细胞凋亡的具体机制及 PFP 及 GzmB 的作用机制仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Davies DE. The role of the epithelium in airway remodeling in asthma[J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6(8): 678-682.

[2] 郭春艳,韩波. 穿孔素抗体对颗粒酶 B 在病毒性心肌炎中表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(22):1754-1756.

[3] Pardo J, Wallich R, Ebneth K, Iden S, Zentgraf H, Martin P, et al. Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(10): 1768-1779.

[4] 毛海英,马敏,曹兰芳. 哮喘患儿 CD8⁺ T 淋巴细胞穿孔素与颗粒酶素 B 表达的研究[J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(12): 1060-1062.

[5] Bratke K, Böttcher B, Leeder K, Schmidt S, Küpper M, Virchow JC Jr, et al. Increase in granzyme B + lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(3): 542-548.

[6] Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4(6):419-429.

[7] Benayoun L, Pretolani M. Airway remodeling in asthma: mechanisms and therapeutic perspectives[J]. Med Sci (Paris), 2003, 19(3): 319-326.

[8] 舒玲华,陈新山. 病毒性心肌炎猝死心肌 Perforin 和 Desmin 表达的研究[J]. 中华中西医杂志,2005,6(19):2587-2588.

[9] 孙健,张建国,刘群,冯世海,施耘,赵永健. 重组人生长激素对烟雾吸入性损伤大鼠肺泡Ⅱ型细胞的增殖及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中华损伤与修复杂志, 2008, 3(6):683-691.

[10] 郑仰明,李昌崇,张维溪,管小俊. 哮喘气道重塑大鼠气道上皮细胞凋亡及布地奈德的干预作用[J]. 中国循证杂志, 2006,1(2):106-112.

[11] 孔祥永,栾斌,贾天明,冯建飞,王秀芳,王西阁,等. 地塞米松对实验性哮喘大鼠气道细胞 DNA 合成和气道重塑的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2002,4(2):109-113.

(本文编辑:俞 燕)