

地塞米松对急性哮喘大鼠肺组织 15-脂氧合酶表达的影响

革丽莎 李昌崇 张维溪 梁亚峰 张和

(温州医学院附属育英儿童医院呼吸科,浙江 温州 325027)

[摘要] 目的 15-脂氧合酶(15-LO)是一种表达于哮喘肺组织,参与抗炎和促炎物质生成的过氧化物酶。基因队列研究认为它可能对过敏性哮喘起保护作用。本研究通过观察哮喘大鼠肺组织 15-LO 的表达以及地塞米松对其表达的影响,探讨 15-LO 在哮喘中的作用。方法 将 27 只雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为:正常对照组、哮喘组、地塞米松组。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。ELISA 法测定肺组织匀浆 15-LO 蛋白含量;RT-PCR 法检测肺组织 15-LO mRNA 表达水平。结果 哮喘组大鼠肺组织匀浆 15-LO 蛋白含量($2080 \pm 73 \mu\text{g/mL}$)及肺组织 15-LO mRNA 转录水平(0.51 ± 0.14)均显著低于正常对照组的($2472 \pm 106 \mu\text{g/mL}$)和(0.76 ± 0.15)($P < 0.01$);地塞米松干预后 15-LO 蛋白($2562 \pm 218 \mu\text{g/mL}$)及 mRNA(1.02 ± 0.34)表达均上调($P < 0.01$)。结论 哮喘大鼠肺组织 15-LO 表达低下,地塞米松可能部分通过上调哮喘大鼠肺组织 15-LO 而发挥抗炎作用。 [中国当代儿科杂志,2011,13(3):227-230]

[关键词] 15-脂氧合酶;支气管哮喘;炎症;地塞米松;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0227-04

Effects of dexamethasone on 15-lipoxygenase expression in lungs of asthmatic rats

GE Li-Sha, LI Chang-Chong, ZHANG Wei-Xi, LIANG Ya-Feng, ZHANG He. Department of Respiratory Diseases, Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325027, China (Li C-C, Email:wzlichch@21cn.com)

Abstract: Objective 15-lipoxygenase (15-LO) is a prooxidant enzyme which is expressed in asthmatic lungs leading to formation of pro- and anti-inflammatory mediators. Gene expression profiling studies show the association between 15-LO and allergic asthma. This study was designed to observe the expression of 15-LO in lungs of asthmatic rats and examine the effects of dexamethasone on 15-lipoxygenase expression. **Methods** Twenty-seven male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: control, asthma and dexamethasone (DXM) intervention. An asthma model was prepared by sensitization and challenging with ovalbumin. The production of 15-LO in lung tissue homogenates was measured using ELISA. The expression of 15-LO mRNA in lungs was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The levels of 15-LO mRNA and protein in the asthma group (0.51 ± 0.14 and $2080 \pm 73 \mu\text{g/mL}$, respectively) were lower than those in the control group (0.76 ± 0.15 and $2472 \pm 106 \mu\text{g/mL}$, respectively; $P < 0.01$). DXM intervention increased significantly the levels of 15-LO mRNA and protein (1.02 ± 0.34 and $2562 \pm 218 \mu\text{g/mL}$) compared with the asthma group ($P < 0.01$). **Conclusions** The production of 15-LO in lung tissues is reduced in asthmatic rats. DXM can increase the expression of 15-LO in lung tissues and thus might provide anti-inflammatory effects in asthmatic rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):227-230]

Key words: 15-lipoxygenase; Asthma; Inflammation; Dexamethasone; Rats

支气管哮喘(简称哮喘)是免疫介导的气道慢性炎症性疾病。脂质过氧化物酶参与的花生四烯酸代谢在哮喘病理生理改变中起重要作用。5-脂氧合酶(5-lipoxygenase,5-LO)和15-脂氧合酶(15-lipoxygenase,15-LO)均为脂质过氧化物酶,是花生四烯酸

代谢的关键酶。5-LO途径生成的半胱胺酰白三烯是导致哮喘气道炎症细胞募集、支气管收缩、血管通透性增加的重要因素,甚至可能参与气道重塑^[1]。与5-LO不同,15-LO在哮喘中的作用知之甚少。目前,编码15-LO的基因ALOX15已被列为哮喘候选

[收稿日期]2010-09-03;[修回日期]2010-10-15
[基金项目]国家自然科学基金资助项目(No.30973232)。
[作者简介]革丽莎,女,硕士研究生。
[通信作者]李昌崇,教授。

基因,并认为可能在过敏性哮喘中起保护作用^[2],但具体的机制尚不清楚。本研究通过建立哮喘大鼠模型,采用糖皮质激素地塞米松(DXM)干预,明确哮喘大鼠肺组织中15-LO的表达,探讨15-LO在哮喘气道炎症中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠,二级,4~6周龄,共27只,体重 105 ± 20 g,温州医学院实验动物中心提供。

1.2 主要药品与试剂

鸡卵清白蛋白(OVA)、琼脂糖(美国 Sigma 公司),氢氧化铝(将 NaOH 和 $AlCl_3$ 按摩尔比 3:1 混合,产生 $Al(OH)_3$ 沉淀,用三蒸水充分洗涤,适量生理盐水混合后高压灭菌),地塞米松磷酸钠注射液(浙江仙琚制药,5 mg/mL,批号 09072911)。大鼠 15-LO ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录酶、PCR 试剂(TIANGEN 公司);PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 实验仪器

高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司),UV-2800 型紫外可见分光光度计(UNICO, U. S. A),Bio-Tek 酶标仪(ELX808IU, U. S. A),PCR 仪(Biometra, GERMAN),凝胶成像系统(Biosens SC645, 日本)。

1.4 动物模型制备与分组

随机将 SD 大鼠分为对照组、哮喘模型组和 DXM 组 3 组,每组 9 只。哮喘模型制备参照文献^[3]:分别于第 1 天和第 8 天腹腔注射 OVA/ $Al(OH)_3$ 混合液 1.5 mL (内含 OVA 1 mg, $Al(OH)_3$ 100 mg),第 15 天始连续 3 d 定时给予 1% OVA 雾化吸入,每次 30 min。DXM 组于每次雾化激发前 1 h,予地塞米松磷酸钠注射液 0.5 mg/kg 腹腔注射。对照组和哮喘组均以等量生理盐水替代。

1.5 标本留取

末次激发后 12 h 内,10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔注射麻醉。即刻打开胸腔,分离肺组织。取右肺前叶组织 100 mg,放入玻璃匀浆管,加入 PBS 液 2 mL,冰上来回旋转、碾磨,直至呈均匀液状。12000 rpm 离

心 10 min,取上清分装, $-70^\circ C$ 保存,用于 ELISA 检测。取右肺中叶近肺门组织,4% 多聚甲醛固定,用于组织病理检查。取右肺中叶剩余肺组织约 100 mg,液氮速冻后置于 $-70^\circ C$ 保存,作 RT-PCR 检测。

1.6 病理组织学检查及细胞计数

将经 4% 多聚甲醛固定过的大鼠肺组织常规脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察支气管肺组织病理改变。每组各选 2 张切片,在光镜下每张切片任选 10 个高倍视野,计数 $2500 \mu m^2$ 面积中的炎症细胞数目,并同时进行分类计数。

1.7 ELISA 法检测肺组织匀浆 15-LO 含量

操作严格按试剂盒说明进行。最后使用 Bio-Tek 酶标仪测量 450nm 波长吸光度。

1.8 RT-PCR 检测肺组织 15-LO mRNA 水平

Genbank 上检索大鼠 β -Actin 和 15-LO cDNA 序列,借助 Primer Premier 5.0 生物软件设计其引物序列,由上海生工生物技术有限公司合成。内参照 β -Actin 引物:上游 5'-GCCAACC GTGAAAAGATG-3',下游:5'-CCAGGACAGAGCCACCAAT-3',PCR 产物 701 bp。15-LO 引物:上游为 5'-GGCTGAG-GTCTTTGCTG-3',下游为 5'-CGCTGTTGGGAATCCT-GTCT-3',PCR 产物长度为 363 bp。采用 Trizol 一步法抽提肺组织总 RNA,紫外分光光度计上测 RNA 的 OD 260 和 OD 280 值,计算 RNA 浓度,并评价其纯度(OD160/OD280 比值介于 1.8~2.0 之间表明所提取 RNA 有较好的纯度)。取 $1 \mu g/\mu L$ 总 RNA $2 \mu L$ 进行逆转录。以 $5 \mu L$ 逆转录产物为模板,加入特异性引物和 PCR 反应体系,进行聚合酶链反应。反应参数: $94^\circ C$ 变性 60 s,退火 30 s, $72^\circ C$ 延伸 30 s,退火温度 $58.6^\circ C$,最适循环数 36。最后,取 PCR 产物各 $5 \mu L$,15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定,凝胶成像分析系统扫描后使用 Gel-pro32 软件进行图象分析,计算 15-LO RT-PCR 产物荧光强度与 β -Actin 产物荧光强度比值,作为 15-LO mRNA 的相对表达量。

1.9 统计学分析

全部资料应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者采用 LSD 检验;方差不齐性者采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变

哮喘组支气管、血管周围、肺间质及肺泡腔内可

见大量炎症细胞,以嗜酸性粒细胞和肺泡巨噬细胞为主;支气管黏膜下水肿,黏膜皱褶增多,部分黏膜上皮细胞脱落,可见气道黏液栓。DXM组支气管肺组织炎症细胞浸润明显减轻,对照组未见异常表现。见图1。

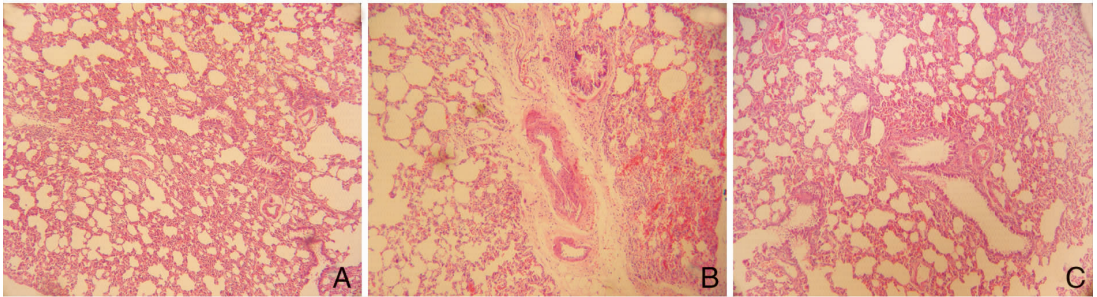


图1 各组大鼠肺组织病理改变(苏木精-伊红染色,×100) A:对照组,未见异常改变;B:哮喘组,肺泡间隔增宽,大量炎症细胞浸润;C:DXM组,炎症程度较哮喘组减轻。

2.2 各组大鼠肺组织中炎症细胞计数

与对照组比较,哮喘组炎症细胞总数、嗜酸性粒细胞比例均显著升高($P < 0.01$),肺泡巨噬细胞比例升高($P < 0.05$)。DXM干预后,炎症细胞总数及嗜酸性粒细胞比例较哮喘组明显降低($P < 0.01$),但仍高于正常对照组($P < 0.01$);巨噬细胞比例在DXM组较哮喘组下降($P < 0.05$),与对照组比较差异无统计学意义,见表1。

与其蛋白水平变化一致,见表2及图2。

表1 各组大鼠肺组织中炎症细胞总数和分类计数
($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	细胞总数 ($\times 10^6/\mu\text{m}^2$)	嗜酸性粒细胞 (%)	肺泡巨噬细胞 (%)
对照组	9	52 ± 17	7 ± 7	21 ± 6
哮喘组	9	648 ± 54 ^a	27 ± 4 ^a	27 ± 6 ^c
DXM组	9	409 ± 56 ^{a,b}	16 ± 3 ^{a,b}	24 ± 4 ^d
F值		378.37	35.19	44.01
P值		<0.01	<0.01	<0.05

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

表2 各组大鼠肺组织 15-LO 蛋白及 mRNA 水平的比较
($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	15-LO ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	15-LO mRNA
对照组	9	2472 ± 106	0.76 ± 0.15
哮喘组	9	2080 ± 73 ^a	0.51 ± 0.14 ^a
DXM组	9	2562 ± 218 ^b	1.02 ± 0.34 ^b
F值		27.66	11.33
P值		<0.01	<0.01

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

2.3 各组大鼠肺组织 15-LO 蛋白含量

哮喘组 15-LO 蛋白含量显著低于对照组($P < 0.01$),DXM组 15-LO 蛋白水平较哮喘组明显升高($P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义,见表2。

2.4 肺组织 15-LO mRNA 水平

哮喘组 15-LO mRNA 表达显著低于对照组,DXM组显著高于哮喘组(均 $P < 0.01$),与对照组比较差异无统计学意义。肺组织 15-LO mRNA 表达

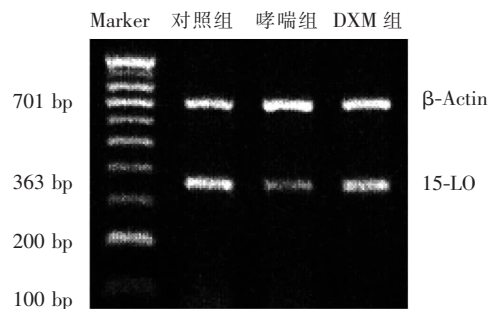


图2 肺组织 15-LO mRNA 表达(RT-PCR)

3 讨论

15-LO 是 1975 年发现于兔嗜红细胞的一种脂质过氧化物酶,主要表达于气道上皮细胞、嗜酸性粒细胞、肺泡巨噬细胞、嗜曙红细胞以及血管内皮细胞等,能催化不饱和脂肪酸代谢,整合入细胞膜表面的膜磷脂^[4]。当慢性缺氧、一过性贫血或 IL-4、IL-13

等刺激时,15-LO 表达上调,参与肺动脉高压、动脉粥样硬化、糖尿病、癌症等炎症相关疾病的发病机制。在花生四烯酸代谢过程中,15-LO 主要催化其15位碳原子生成15-羟-过氧化二十碳四烯酸(15-HETE),随后与15-LO 通过跨细胞作用生成脂氧素(lipoxins, LXs),其主要成员包括LXA4、LXB4及其同分异构体。LXA4是目前发现的内源性促炎症消退介质之一,能启动炎症刹车信号,在体内发挥广泛的抗炎促消退作用^[5]。外源性15-LO 能促进体内LXA4的合成^[6],DXM 能上调炎症细胞上的脂氧素受体^[7]。大部分的研究表明,15-LO 涉及的脂氧素系统是体内的抗炎症系统^[8-9]。然而,关于糖皮质激素对15-LO 的调控研究甚少。

本研究采用RT-PCR 和ELISA 法检测哮喘大鼠肺组织内15-LO 的表达以及糖皮质激素DXM 对其的调控。结果表明,哮喘大鼠肺组织15-LO 蛋白和mRNA 表达低下,经DXM 干预后,15-LO 表达显著上调,提示DXM 的抗炎症作用部分通过增加哮喘大鼠肺组织15-LO 的表达而实现,进一步佐证了15-LO 的促炎症消退作用。

本研究对各组大鼠支气管肺组织中的炎症细胞进行分类计数发现,哮喘组嗜酸性粒细胞比例较正常对照组显著增加($P < 0.01$),肺泡巨噬细胞比例也升高($P < 0.05$),是过敏性哮喘的特征之一。Chu 等^[10]和Profita 等^[11]曾分别研究了哮喘患者的气道活检组织和肺泡灌洗液,发现15-LO 在哮喘患者中表达升高,与嗜酸性粒细胞、肺泡巨噬细胞有关。而在本研究中,哮喘大鼠并没有表现为15-LO 的上调。原因考虑如下:①本研究是观察大鼠整个肺组织的15-LO 表达,如果嗜酸性粒细胞和巨噬细胞15-LO 表达升高,可能存在其他靶细胞,如血管内皮细胞、气道上皮细胞15-LO 表达低下,而使整体15-LO 水平较低。对15-LO 的定位研究,将有助于进一步阐述导致15-LO 表达差异的原因。②本研究中复制的哮喘模型时间尚短,而哮喘患者多表现为慢性气道炎症。理论上,15-LO 的促炎症消退作用往往始于炎症后期的某个阶段,其上调可能需要特定的炎症介质刺激或信号通路的激活。③15-LO 表达可能与靶细胞的状态有关。在SD 大鼠哮喘模型中的研究表明,哮喘组嗜酸性粒细胞凋亡率低于正常对照组,DXM 干预后嗜酸性粒细胞凋亡率较哮喘组显著升高($P < 0.01$)^[3]。本研究发现DXM 可以

上调15-LO 的表达。所以推测,嗜酸性粒细胞15-LO 的上调可能与细胞的凋亡状态有关。在哮喘早期,嗜酸性粒细胞大量活化,而慢性炎症过程中嗜酸性粒细胞活化与凋亡并存,因而能够解释15-LO 在本哮喘模型中表达低下,而在哮喘患者中表达升高。

综上所述,本研究发现在SD 大鼠哮喘模型中,OVA 致敏后连续雾化激发3d,哮喘大鼠肺组织15-LO 表达低下。激发过程中,DXM 干预使15-LO 的表达上调。从而说明了DXM 部分通过上调支气管哮喘大鼠肺组织15-LO 的表达而发挥抗炎作用。

[参 考 文 献]

- [1] Kleinman R, Mura M, Liu MY. 半胱氨酰白三烯拮抗剂治疗儿童哮喘[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(5): 398-403.
- [2] Tremblay K, Daley D, Chamberland A, Lemire M, Montpetit A, Laviolette M, et al. Genetic variation in immune signaling genes differentially expressed in asthmatic lung tissues[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(3): 529-536.
- [3] 苏苗赏,李昌崇,林立,郑吉善,郑仰明,管小俊,等. 地塞米松对年幼哮喘大鼠 Toll 样受体4 信号转导的调节机制[J]. 中华儿科杂志,2006,44(12): 937-940.
- [4] Kühn H, O'Donnell VB. Inflammation and immune regulation by 12/15-lipoxygenases[J]. Prog Lipid Res, 2006, 45(4): 334-356.
- [5] Levy BD. Lipoxins and lipoxin analogs in asthma[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005, 73(3-4): 231-237.
- [6] Bannenberg GL, Aliberti J, Hong S, Serhan C. Exogenous pathogen and plant 15-lipoxygenase initiate endogenous lipoxin A4 biosynthesis[J]. J Exp Med, 2004, 199(4): 515-523.
- [7] Hashimoto A, Murakami Y, Kitasato H, Hayashi I, Endo H. Glucocorticoids co-interact with lipoxin A4 via lipoxin A4 receptor (ALX) up-regulation[J]. Biomed Pharmacother, 2007, 61(1): 81-85.
- [8] Celik GE, Erkekol FO, Misirligil Z, Melli M. Lipoxin A4 levels in asthma: relation with disease severity and aspirin sensitivity[J]. Clin Exp Allergy, 2007, 37(10): 1494-1501.
- [9] Fierro IM, Serhan CN. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin triggered lipoxins[J]. Braz J Med Biol Res, 2001, 34(5): 555.
- [10] Chu HW, Balzar S, Westcott JY, Trudeau JB, Sun Y, Conrad DJ, et al. Expression and activation of 15-lipoxygenase pathway in severe asthma: relationship to eosinophilic phenotype and collagen deposition[J]. Clin Exp Allergy, 2002, 32(11): 1558-1565.
- [11] Profita M, Sala A, Riccobono L, Paternò A, Mirabella A, Bonanno A, et al. 15-Lipoxygenase expression and 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid release and reincorporation in induced sputum of asthmatic subjects[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(4): 711-716.

(本文编辑:王霞)