

论著·实验研究

细菌脂多糖对哮喘小鼠血清 IL-4、IL-8 及肺组织 VEGF 表达的影响

栾斌 冯梅晶 乔俊英

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] 目的 观察细菌脂多糖(LPS)对支气管哮喘小鼠血清 IL-4、IL-8 及肺组织血管内皮生长因子(VEGF)的影响,探讨 LPS 在哮喘发生过程中的调节作用。**方法** 27 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、哮喘组和 LPS 干预组,每组 9 只。采用 ELISA 法检测哮喘小鼠血清 IL-4、IL-8 的浓度,免疫组织化学染色法检测肺组织中 VEGF 的表达。**结果** 哮喘组血清 IL-4 和 IL-8 水平明显高于对照组($P < 0.05$);而 LPS 干预组 IL-4 和 IL-8 水平明显低于哮喘组($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。哮喘组气道 VEGF 表达显著高于对照组($P < 0.05$);LPS 干预组其表达明显低于哮喘组($P < 0.05$),但仍高于对照组($P < 0.05$)。**结论** LPS 可能通过降低哮喘小鼠血清 IL-4 和 IL-8 水平及气道 VEGF 表达,减轻气道炎症,减少气道血管重塑的发生。

[中国当代儿科杂志,2012,14(4):297-300]

[关键词] 哮喘;脂多糖;IL-4;IL-8;血管内皮生长因子;气道重塑;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)04-0297-04

Effects of bacterial lipopolysaccharide on serum IL-4, serum IL-8 and pulmonary VEGF expression in mice with asthma

LUAN Bin, FENG Mei-Jing, QIAO Jun-Ying. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: luanbin0588@tom.com)

Abstract: Objective To study the regulatory role of bacterial lipopolysaccharide (LPS) in the development of bronchial asthma by examining the effects of LPS on serum IL-4, serum IL-8 and pulmonary vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in mice with asthma. **Methods** Twenty-seven BALB/c mice were randomly assigned into control, asthma and LPS-treated asthma groups ($n = 9$ each). Serum IL-4 and IL-8 concentrations were measured using ELISA. VEGF expression in lung tissues was examined using the immunohistochemical method. **Results** Serum IL-4 and IL-8 concentrations in the asthma group were significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). LPS treatment significantly decreased serum IL-4 and IL-8 concentrations compared with the asthma group ($P < 0.05$), although levels were significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). Airway VEGF expression in the asthma group was significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). LPS treatment significantly decreased airway VEGF expression compared with the asthma group ($P < 0.05$), although concentrations remained higher than in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** LPS can decrease serum IL-4, serum IL-8 and pulmonary VEGF expression in mice with asthma, and thus can possibly reduce both airway inflammation and airway vascular remodeling.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(4):297-300]

Key words: Asthma; Lipopolysaccharide; IL-4; IL-8; Vascular endothelial growth factor; Airway vascular remodeling; Mice

支气管哮喘是一种以气道炎症和高反应性为特征的变态反应性疾病,发病机制较为复杂,目前仍未完全明确,多种细胞因子和炎症介质参与其发生、发展的调节,并在气道重塑过程中发挥重要的作用。T 辅助细胞可以定向分化为 Th1、Th2 细胞,正常情

况下,Th1、Th2 细胞保持相对平衡状态,哮喘发生时,Th2 免疫应答增强,Th1 免疫应答减弱。近年来,越来越多的研究表明儿童的过敏性特征及哮喘发生率与其周围环境中细菌内毒素水平呈负相关^[1-2]。适量细菌毒素的接触,有望减少儿童过敏性

疾病及哮喘的发生率,从而为哮喘的辅助治疗寻求新的靶点。脂多糖(LPS)作为一种免疫调节剂,可以调节 Th2 型免疫应答。IL-4 能诱导嗜酸性粒细胞、肥大细胞释放 IgE,在哮喘发生中起到正反馈的作用,IL-8 与 IL-4 有协同作用,除趋化中性粒细胞外,还可部分趋化嗜酸性粒细胞及活化的淋巴细胞,促进 IgE 的分泌。部分研究表明,VEGF 的表达与 IL-4 存在正相关^[3]。糖皮质激素及 β 2 受体激动剂已成为治疗哮喘的经典药物,长期应用糖皮质激素具有潜在的不良反应,如肾上腺功能减退、骨质疏松等,若长期大量应用 β 2 受体激动剂,对哮喘患儿同样存在不利影响^[4]。探寻新型治疗药物已经成为研究热点,本研究从哮喘发生的免疫机制着手,通过对哮喘小鼠和 LPS 干预的哮喘小鼠血清中 IL-4、IL-8 及肺组织 VEGF 表达的分析,探讨其相互之间的作用,明确 LPS 在哮喘发生过程中的调节作用,希望为哮喘的防治寻求新的治疗手段,从而改善哮喘患者的生活质量。

1 材料与方法

1.1 材料

卵蛋白(OVA)为美国 Sigma 公司产品,IL-4、IL-8 ELISA 试剂盒系美国 RD 公司产品,免疫组化兔抗小鼠 VEGF 多克隆抗体 SP 试剂盒及 DAB 显色剂购于北京博奥森公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及哮喘模型的建立 27 只清洁级雌性 BALB/c 小鼠,购于河南省实验动物中心,于恒温、安静、相对避光环境中适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法将其随机分为对照组、哮喘组和 LPS 干预组,每组 9 只。哮喘模型的建立参考本课题组前期研究并加以改进^[5]:哮喘组于实验第 1 天、第 8 天和第 15 天腹腔注射 OVA + 氢氧化铝混合液 0.2 mL(内含 OVA 20 μ g,氢氧化铝 1 mg)致敏,第 22 天开始用 2% OVA 生理盐水雾化吸入激发,隔日一次,每次 30 min,共激发 7 次。LPS 干预组在致敏阶段每隔 2 d 腹腔注射 1 mL 含 100 μ g LPS 溶液,激发阶段在每次激发前 1 h 腹腔注射相同剂量浓度 LPS。对照组致敏与激发均以生理盐水代替 OVA。

1.2.2 标本采集 于末次雾化结束后 24 h 内用乙醚吸入麻醉小鼠,摘眼球法快速收集 1 mL 全血,离心 5 min,取上清液待用。

1.2.3 肺组织标本制作 取右肺中叶,垂直气道取材,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,酒精梯度脱水,石

蜡包埋,做厚度 5 μ m 切片,进行免疫组织化学染色。

1.2.4 ELISA 法检测小鼠血清 IL-4、IL-8 含量

将稀释后的标准品及样品加入反应孔内;加入抗体,盖上板膜,轻轻振荡混匀,37℃ 温育 1 h;洗涤液洗去孔内液体,加入亲和链酶素-HRP,混匀,37℃ 温育 30 min;洗去孔内液体,加入底物 A、B,37℃ 温育 10 min;加入终止液后于 450 nm 波长的酶标仪上测定各孔的 OD 值。以吸光度 OD 值为纵坐标,相应的 IL-4 和 IL-8 标准品浓度为横坐标,做出标准曲线,并根据标准曲线计算出各样本的 IL-4(IL-8)含量。

1.2.5 免疫组织化学染色及结果观察 切片脱蜡至水,PBS 洗涤;抗原修复,PBS 浸泡;封闭内源性过氧化物酶,PBS 浸泡;滴加山羊血清,封闭内源性生物素,甩除;滴加一抗,4℃ 过夜,PBS 浸泡;滴加二抗,PBS 浸泡;滴加辣根过氧化物酶标记卵霉链白素,PBS 浸泡;DBA 显色,显微镜下控制,自来水中止;苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阳性表达主要集中于气道上皮细胞、气道平滑肌细胞,阳性细胞胞浆着色呈棕黄色。采用彩色医学图像分析系统进行图像采集并数据分析。每张切片随机选取 5 个支气管壁作图像分析,400 倍光镜下测量阳性部位的吸光度值,取平均值为该切片的代表值。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计量资料用均数 $\pm$ 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 IL-4、IL-8 含量

本研究显示,哮喘组血清 IL-4 和 IL-8 水平明显高于对照组,而 LPS 干预组 IL-4 和 IL-8 水平明显低于哮喘组,但仍高于对照组($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠血清 IL-4 和 IL-8 的含量 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)			
组别	鼠数	IL-4	IL-8
对照组	9	19.2 $\pm$ 0.6	72.1 $\pm$ 2.6
哮喘组	9	361.2 $\pm$ 8.1 ^a	289.9 $\pm$ 9.4 ^a
LPS 干预组	9	191.0 $\pm$ 3.4 ^{a,b}	142.0 $\pm$ 6.6 ^{a,b}
F 值		1123.1	267.2
P 值		<0.05	<0.05

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

2.2 各组小鼠肺组织 VEGF 表达

哮喘组小鼠气道 VEGF 表达显著高于对照组 ($P < 0.05$); LPS 干预组其表达明显低于哮喘组 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 2, 图 1。

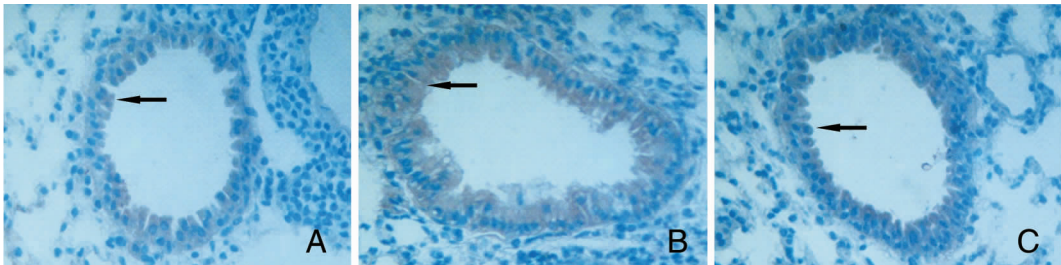


图 1 各组小鼠肺组织 VEGF 表达的免疫组织化学染色(DAB×400) A:对照组:气道 VEGF 呈弱阳性表达; B:哮喘组:气道 VEGF 呈强阳性表达,表达量显著高于对照组和 LPS 干预组; C:LPS 干预组:气道 VEGF 阳性表达较哮喘组显著降低,但仍高于对照组。箭头所指为 VEGF 阳性表达,呈褐色。

3 讨论

支气管哮喘是一种气道慢性炎症性疾病,多种炎症细胞和炎症因子参与其发生、发展过程。其中最重要的 Th2 型细胞因子 IL-4 在哮喘的调节和发作过程中起重要作用,一方面可以诱导 IgE 生成,导致 IgE 介导的速发相哮喘反应,加重哮喘发作的严重程度,促进 Th0 细胞向 Th2 细胞分化,从而促进 IL-4、IL-5 和 IL-13 等细胞因子的分泌,形成一个正反馈的调节,加重哮喘的发生^[6]。另一方面 IL-4 能抑制 Th1 细胞产生细胞因子,并抑制 IL-2 诱导的外周淋巴细胞和 T 细胞的增殖,从而抑制细胞免疫^[7]。IL-4 还能促进血管内皮细胞黏附分子的表达从而导致嗜酸粒细胞在炎症部位的选择性聚集,导致气道炎症。

目前,越来越多的学者认为,重型哮喘患者气道中性粒细胞比例显著升高,且认为其与病变程度呈正相关。IL-8 对中性粒细胞具有很强的趋化和激活作用。IL-8 可诱导中性粒细胞变形、激活,使其定向游走;促使细胞内游离钙离子浓度一过性升高,诱导中性粒细胞脱颗粒,释放蛋白水解酶、氧自由基和花生四烯酸等一系列炎性介质,诱导黏附分子的表达,引起呼吸爆发^[8],从而促进炎症反应。同时,IL-8 对嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞亦有较弱的趋化活性,能趋化并激活嗜酸性粒细胞合成与释放阳离子蛋白,并能引起气道黏膜下微血管通透性增加、腺体

表 2 各组小鼠肺组织 VEGF 表达 ($\bar{x} \pm s$, OD 值)

组别	鼠数	VEGF
对照组	9	0.0420 ± 0.0013
哮喘组	9	0.0830 ± 0.0016 ^a
LPS 干预组	9	0.0550 ± 0.0001 ^{a,b}

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

分泌亢进、平滑肌收缩及气道上皮细胞脱落,参与哮喘发作期和非急性发作期的炎症反应,属调节哮喘气道炎症的上调因子,IL-8 可促使嗜碱性粒细胞趋化,并在 IL-3 存在情况下引起嗜碱性粒细胞脱颗粒,释放组胺及白三烯,介导不依赖于 IgE 的变态反应,从而引起迟发性哮喘。同时,聚集至气道的嗜酸性粒细胞及中性粒细胞又能分泌 IL-8,形成循环通路,导致和加重哮喘的发作^[9]。

LPS 是革兰阴性杆菌细胞壁的主要成分,通过 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)信号途径来促进树突状细胞 DC (dendritic cells, DC) 的发育成熟^[10]。DC 作为体内最强的抗原呈递细胞,而且也是唯一能在体内直接激活初始 T 细胞的 APC (antigen-presenting cells, APC),具有调节 Th1/Th2 之间的平衡作用,成熟的 DC 可以正向调节免疫应答,而未成熟的 DC 则具有负向调节免疫应答和维持免疫耐受的作用。冯琳琳等^[11]研究发现适量的 LPS 在 DC 分化晚期可以刺激其成熟,使其具有更高生物学活性,从而对免疫起正向调节作用。亦有研究显示 LPS 具有对 Th1/Th2 平衡的双向调节作用,高剂量 LPS 使 Th1 反应增强, Th2 反应减弱, Th1 类因子 IFN- γ 表达增加, Th2 类因子 IL-4、IL-5、IL-13 表达减少;低剂量 LPS 使 Th2 反应增强, Th2 类因子 IL-4、IL-5、IL-13 表达增加^[12]。本研究中 LPS 干预组小鼠血清 IL-4、IL-8 较哮喘组明显减低,与文献报道一致。

气道重塑包括平滑肌细胞的肥大和增生、黏膜腺体增多、基底膜增厚、成纤维细胞增生、气道血管

重塑及气道壁细胞外基质的异常沉积等,是支气管哮喘的重要特征之一^[13]。血管内皮生长因子(VEGF)属于血小板源生长因子家族,是作用于血管内皮细胞最有力的生长因子,它具有强大的促进内皮细胞增殖、增加微血管通透性、诱导血管生成等多种功能^[13-14]。而且 VEGF 还能够促进哮喘气道重塑、炎症以及增强哮喘的抗原敏感性,在 Th2 细胞介导的炎症中发挥重要作用^[15-16]。本研究中,与对照组相比,哮喘小鼠 VEGF 表达量显著上升,经过 LPS 干预后,表达量明显降低。由此可以推断,适量的 LPS 对哮喘起正向调节作用,能减轻气道炎症,降低发作程度,并在哮喘气道血管重塑中发挥一定作用。

[参 考 文 献]

[1] Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, et al. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children[J]. N Engl J Med, 2002, 347(12): 869-877.

[2] 胡东,张荣波. 脂多糖对过敏性哮喘患者细胞因子分泌的影响[J]. 现代预防医学,2007,34(2):237-239.

[3] 金小红,李昌崇,陈存国,李绍波,李凤仙,干灵红. 支气管哮喘大鼠血管内皮生长因子与 γ -干扰素、白细胞介素 4 变化的相关性及布地奈德干预对其的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2009,24(4):282-284.

[4] 沈观妍,杨烁,郭少川. 白三烯受体拮抗剂治疗儿童哮喘的疗效观察[J]. 中国医药指南,2009,7(15):31-33.

[5] 栾斌,黄先杰,乔俊英. SDF21 及 CXCR4 在哮喘小鼠肺组织中的表达及布地奈德的干预作用[J]. 中国当代儿科杂志,2010, 12(3):215-218.

[6] Steinke JW, Borish. TH2 cytokine and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists[J]. Respir Res, 2001, 2(2): 66-70.

[7] Randolph DA, Stephens R, Carruthers CJ, Chaplin DD. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation [J]. J Clin Invest, 1999, 104(8): 1021-1029.

[8] Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, Wang LH, Garfein E, Rothman P, et al. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor[J]. Immunity, 1996, 4(2):123-132.

[9] Fahy JV, Kim KW, Liu J, Boushey HA. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation [J]. J Allergy Clin Immunol, 1995, 95(4): 843-852.

[10] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.

[11] 冯琳琳,代继宏,符州,刘铮,王莉佳,李欣. 脂多糖、转化因子- β 1 对小鼠骨髓来源树突状细胞的生物学作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2009,25(10):891-893.

[12] 李鸿佳,王淑娟,李艳丽,董亮. 不同剂量脂多糖预处理对哮喘小鼠肺部炎症的影响的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008,24(10):1008-1010.

[13] Walters EH, Reid D, Soltani A, Ward C. Angiogenesis: apotentially critical part of remodelling in chronic airway diseases?[J]. Pharmacol Ther, 2008, 118(1): 128-137.

[14] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 669-676.

[15] Voelkel NF, Vandivier RW, Tudor RM. Vascular endothelial growth factor in the lung[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(2): L209-L221.

[16] 戴建,殷凯生,孙培莉. 咪喹莫特对哮喘小鼠气道反应性及气道重塑的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2009, 29(1):50-54.

(本文编辑:王庆红)

• 消息 •

危重新生儿早期干预技术新进展学习班通知

为了促进国内外同行的学术交流及合作,提高危重新生儿早期干预技术的规范使用,深圳市宝安区妇幼保健院计划于 2012 年 5 月 18 日至 20 日在深圳宝安举办危重新生儿早期干预技术新进展学习班。本班系国家级继续医学教育项目,授课老师为美国、英国、香港及国内著名专家教授。学习结束后授予学分 7 分。主要内容包括:新生儿 NICU 安全及超低出生体重儿的管理、早产儿微生态建立与长期发育结局的相关研究、呼吸机治疗及无创血气监测技术、新生儿感染标记物进展及院内感染防治策略、新生儿坏死性小肠结肠炎诊治进展等。

招收学员对象:儿科、新生儿科医务人员。学费 500 元,资料费 100 元。联系方式:深圳市宝安区 30 区裕安路 21 号,深圳市宝安区妇幼保健院新生儿科:吴志军(邮政编码 518133),联系电话:13537861781, (0755)27800920, Email: zhi-junwu@sina. com。

深圳市宝安区妇幼保健院