

· 实验研究 ·

黏附分子 CD₄₄ 在哮喘气道炎症反应中的作用

李玲¹, 杨莉², 唐珩², 金蕊²

(1. 南京医科大学附属无锡市儿童医院呼吸科, 江苏 无锡 214023; 2. 东南大学附属中大医院儿科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的 观察不同时段哮喘大鼠肺组织黏附分子 CD₄₄在哮喘气道炎症反应中的作用。方法 32 只 Sprague-Dawley 大鼠随机分成 4 组:哮喘模型组(激发 1 周组、2 周组)与正常对照组(对照 1 周组、对照 2 周组),每组 8 只。以卵蛋白致敏制备大鼠哮喘模型,分别在激发后的 1 周、2 周取肺组织,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和免疫组织化学 S-P 方法研究肺组织 CD₄₄的表达;收集支气管肺泡灌洗液(BALF)行细胞分类计数。结果 哮喘激发后 1 周和 2 周后哮喘大鼠 BALF 中淋巴细胞和嗜酸性粒细胞比例显著增加($P < 0.05$),巨噬细胞比例显著降低($P < 0.05$),哮喘激发后 1 周中性粒细胞比例也显著增加($P < 0.05$)。CD₄₄在 mRNA 和蛋白水平的表达与 BLAF 中淋巴细胞、嗜酸性粒细胞呈显著正相关(均 $P < 0.05$),与激发 1 周时的巨噬细胞百分比呈显著负相关($P < 0.05$)。结论 哮喘肺组织 CD₄₄的过度表达与炎性细胞向哮喘气道炎症组织趋化浸润密切相关,在哮喘气道炎症反应过程中发挥着重要作用。

[中国当代儿科杂志,2009,11(2):142-145]

[关键词] 哮喘;CD₄₄;黏附分子;炎性细胞;大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)02-0142-04

Role of CD₄₄ on airway inflammatory response in rats with asthma

LI Ling, YANG Li, TANG Heng, JIN Rui. Department of Respiratory, Wuxi Children's Hospital, Wuxi, Jiangsu 214023, China (Email: sy33345@sina.com)

Abstract: Objective To study the role of cell adhesion molecule CD₄₄ in the lung on airway inflammatory response in rats with asthma. **Methods** Thirty-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control and asthma groups. Asthma was induced by repeated inhalation of ovalbumin. CD₄₄ expression in the lung was detected by semi-quantitatively reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immuno-histochemical staining 1 week and 2 weeks after ovalbumin challenge. Differential leukocytes (mononuclear phagocytes, neutrophils, eosinophils, and lymphocytes) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were counted. **Results** CD₄₄ expression in the lung increased 1 week after ovalbumin challenge ($P < 0.05$) and increased more significantly 2 weeks after ovalbumin challenge ($P < 0.01$) compared with that in the control group. The percentages of lymphocytes and eosinophils in BALF increased, while the percentage of BALF mononuclear phagocytes decreased significantly 1 week and 2 weeks after ovalbumin challenge in the asthma group compared with those in the control group ($P < 0.05$). An increased percentage of neutrophils was found 1 week after ovalbumin challenge in the asthma group compared with the control group ($P < 0.05$). CD₄₄ expression in the lung was positively correlated with the percentages of lymphocytes and eosinophils in BALF in the asthma group 1 week and 2 weeks after ovalbumin challenge, in contrast, lung CD₄₄ expression was negatively correlated with the percentage of mononuclear phagocytes in the asthma group 1 week after ovalbumin challenge. **Conclusions** CD₄₄ was over-expressed in the lung and closely related to inflammatory infiltration in rats with asthma. CD₄₄ may play an important role in the development of airway inflammatory in asthma.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (2):142-145]

Key words: Asthma; CD₄₄; Cell adhesion molecule; Leukocyte; Rats

哮喘气道存在持续慢性炎症,在炎性细胞活化浸润、炎性介质的释放、通透性增高及气道高反应性等一系列慢性炎症过程中,炎性细胞黏附到气道内皮是关键步骤。黏附分子 CD₄₄是细胞膜表面高度糖基化跨膜糖蛋白,通过刺激多种细胞增殖和基质合成、增高气道反应性、促进炎性细胞聚集和气道重塑等在多个环节参与哮喘的发病^[1]。本研究利用不同时段哮喘大鼠模型,观察肺组织 CD₄₄在 mRNA 和蛋白水平的表达与哮喘气道炎性细胞之间的关系,旨在进一步阐明黏附分子 CD₄₄在哮喘气道炎症中的作用机制。

[收稿日期]2008-05-28;[修回日期]2008-07-10
[作者简介]李玲,女,硕士,副主任医师。主攻方向:小儿呼吸系统疾病防治。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 32 只,体重 220 ~ 250 g (上海中科院实验动物中心提供)。主要试剂及药品:鸡卵清蛋白 (ovalbulium-OVA, Sigma 公司), 高温灭活百日咳杆菌 (上海生物研究所)。Tripure 试剂 (Roche 公司), CD₄₄ 与 GAPDH 引物由上海生工生物工程技术公司合成, RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物公司, Takara), MarkerLD 2000 (北京天为时代科技生物公司)。兔抗大鼠 CD₄₄ 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、PBS 缓冲溶液粉剂、柠檬酸抗原修复液、苏木素均购自北京中衫金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠哮喘模型制备 参考文献[2]。

1.2.2 实验分组与标本的收集制备 32 只大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只。激发哮喘 1 周组:1% OVA 吸入 1 周。激发哮喘 2 周组:1% OVA 吸入 2 周。对照组:又分为对照 1 周组及对照 2 周组, 在第 0 天腹腔注射 0.9% 生理盐水 2 mL, 2 周后用生理盐水吸入, 余同哮喘组。对照 1 周组、激发哮喘 1 周组于激发后 1 周, 对照 2 周组、激发哮喘 2 周组于激发后 2 周处死大鼠, 收集支气管肺泡灌洗液 (BALF) 后取右肺中叶 80 mg 置 -70℃ 冰箱中, 1 月内行总 RNA 抽提。大鼠处死后立即经气管插管取 BALF 沉淀行细胞涂片, 瑞氏染色, 镜下行炎性细胞分类计数。

1.2.3 CD₄₄ mRNA 的检测 ①肺组织总 RNA 提取与定量:采用 Tripure-氯仿一步法提取 80 mg 大鼠肺组织总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 含量。②RT-PCR:根据试剂盒说明逐一加入试剂及 1 μg 总 RNA, 反应体积 50 μL。CD₄₄ 和 GAPDH 的引物如表 1。③CD₄₄ mRNA 的半定量检测:取 CD₄₄ 与 GAPDH 扩增产物 5 μL 在 2% 琼脂糖凝胶中, 80 V 电压电泳 50 min, 以 DNA Marker DL2000 同时电泳作为 DNA 片段分子量标准, 推测 PCR 扩增产物正确与否。用 Image Kaster Total Lab 分析软件以 GAPDH 为内参照分别计算产物 CD₄₄ 的表达量。

1.2.4 CD₄₄ 免疫组织化学半定量分析 对所有切片采用免疫组化 S-P 法, 实验步骤按试剂盒说明进行。采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统测定各组气道黏膜 CD₄₄ 含量 (以免疫组织化学染色静态灰度值表示)。

表 1 PCR 引物的碱基序列及扩增片段长度

目的基因	引物序列 (5'→3')	位置	扩增片段
CD ₄₄	上游 ACCAAGAAGACATCGATGCC	615-634	241 bp
	下游 TGTCCAGCTAATTCGGATCC	855-836	
GAPDH	上游 ACCACAGTCCATGCCATCAC	567-587	452bp
	下游 TCCACCACCCTGTTGCTGTA	958-938	

1.3 统计学方法

所有数据结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件处理数据, 两组间采用 *t* 检验。相关性分析采用 Spearman 等级相关分析。*P* < 0.05 时表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 BALF 中嗜酸性粒细胞的数目

大鼠 BALF 中嗜酸性粒细胞 (EOS) 的数目在激发哮喘 1 周组与对照 1 周组比较、激发哮喘 2 周组与对照 2 周组比较、激发哮喘 2 周组与激发哮喘 1 周组比较差异均有显著性 (*P* < 0.05, 表 2)。

表 2 肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞的数目 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EOS 计数 (×10 ⁷ /L)	
		1 周	2 周
对照组	8	0.65 ± 0.26	0.73 ± 0.32
哮喘组	8	6.88 ± 2.23 ^a	11.62 ± 4.24 ^{a, b}

a: 与对照组比较, *P* < 0.05; b: 与哮喘组 1 周比较, *P* < 0.05

2.2 BALF 中炎性细胞分类比例

大鼠 BALF 中巨噬细胞比例在激发哮喘 1 周组比对照 1 周组、激发哮喘 2 周组比对照 2 周组有显著减少, 但激发哮喘 2 周组与激发哮喘 1 周组比较差异无显著性 (*P* > 0.05)、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的比例在激发哮喘 1 周组比对照 1 周组、激发哮喘 2 周组比对照 2 周组、激发哮喘 2 周组比激发哮喘 1 周组均有显著性增加 (*P* < 0.05); 激发哮喘 1 周组中性粒细胞比例升高 (和对照 1 周组相比, *P* < 0.05), 而在激发哮喘 2 周组中趋于减低, 与对照组比较差异无显著性 (表 3)。

2.3 肺组织 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平的表达

对照 1 周组、对照 2 周组肺组织 CD₄₄ 的无论在 mRNA 还是蛋白水平均有少量表达; 与对照 1 周组比较, 激发哮喘 1 周组肺组织 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平的表达显著增加 (均 *P* < 0.05)。与对照 1 周组、激发哮喘 1 周组比较, 激发哮喘 2 周组肺组织 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平的表达增加更加显著 (*P* < 0.01, 表 4)。

2.4 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平和 BALF 中炎性细胞相关性分析

哮喘大鼠气道 CD₄₄ 在 mRNA 与蛋白水平的表达与 BLAF 中淋巴细胞、嗜酸性粒细胞的比例呈显

著正相关(均 $P < 0.05$);与激发哮喘 1 周 BLAF 中巨噬细胞的比例呈负相关($P < 0.05$);与中性粒细胞及激发哮喘 2 周时 BLAF 中巨噬细胞的比例之间无统计学相关关系(表 5)。

表 3 BALF 中炎性细胞分类比例(%) ($\bar{x} \pm s$)

细胞种类	鼠数	巨噬细胞		淋巴细胞		嗜酸性粒细胞		中性粒细胞	
		1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周
对照组	8	90.25 ± 2.12	90.38 ± 1.93	3.75 ± 0.89	3.87 ± 1.28	0.63 ± 0.52	0.48 ± 0.52	5.50 ± 1.51	5.00 ± 1.10
哮喘组	8	62.38 ± 1.41	58.12 ± 4.09	13.88 ± 1.36	20.75 ± 2.49 ^a	8.75 ± 1.03	16.62 ± 2.20 ^a	15.00 ± 1.31	4.63 ± 1.41
<i>t</i>		-9.76	-14.32	13.01	22.13	30.28	16.5	8.26	2.05
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

a: 与哮喘 1 周组比较, $P < 0.05$

表 4 肺组织 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平的表达

肺组织 CD ₄₄	mRNA 水平		免疫组化 DAB 染色(静态灰度值)	
	1 周	2 周	1 周	2 周
对照组	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.05	132.73 ± 7.06	128.75 ± 11.1
哮喘组	0.63 ± 0.06	0.77 ± 0.03 ^a	94.53 ± 3.81	84.40 ± 4.56 ^a
<i>t</i>	7.45	3.40	-8.13	-9.47
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

a: 与哮喘 1 周组比较, $P < 0.05$

表 5 CD₄₄ mRNA 和蛋白水平和 BALF 中炎性细胞相关性分析

		巨噬细胞		淋巴细胞		嗜酸性粒细胞		中性粒细胞	
		1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周
CD ₄₄ mRNA	<i>r</i>	-0.682	0.156	0.816	0.835	0.852	0.831	0.147	0.335
	<i>t</i>	3.41	0.351	3.527	3.75	4.06	3.67	0.37	0.867
	<i>P</i>	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05
CD ₄₄ 免疫组化 静态灰度值	<i>r</i>	-0.769	0.142	0.837	0.791	0.785	0.814	0.246	0.156
	<i>t</i>	4.31	0.843	3.57	4.38	4.0.8	4.18	1.07	0.857
	<i>P</i>	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

细胞黏附是细胞间信息交流的一种方式,是多细胞生物维持本身形态结构和功能的重要生物学现象。细胞黏附分子糖蛋白及其黏附机制可能是介导和参与哮喘时细胞浸润、增殖乃至间质纤维化的分子基础^[3]。

CD₄₄是细胞黏附分子中的重要成员,又称吞噬细胞糖蛋白 I、III 型细胞外基质受体^[4],它是哮喘发生的一种重要的前炎症因子,主要通过介导细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏连,刺激多种细胞增殖和基质的合成、参与并介导多种炎症细胞的黏附和跨内皮转移,尤其在促使嗜酸粒细胞和淋巴细胞聚集于肺部发挥重要作用^[1]。因此,进一步探讨

如何阻断哮喘变态反应性炎症中 CD₄₄ 的过度表达,对防止哮喘的发生发展具有重要意义。

本实验从基因转录和蛋白水平探讨不同时段哮喘大鼠模型气道黏附分子 CD₄₄ 的表达,结果显示正常大鼠肺组织 CD₄₄ 的在 mRNA 水平有少量表达,激发哮喘后肺组织 CD₄₄ 表达上调,随着激发时间的延长至两周升高更加显著。免疫组织化学结果证实,CD₄₄ 主要表达在气道黏膜上皮细胞膜,同时表明哮喘模型组不论在代表大气道的段支气管或细支气管肺泡区,CD₄₄ 的蛋白表达均较正常对照组显著升高,且随着哮喘持续时间的延长,肺组织 CD₄₄ 的表达亦随之增高,提示黏附分子 CD₄₄ 与哮喘病变程度有关,在早期即发挥重要作用,这种作用随着哮喘的进展而增强。

外周血中的白细胞通过血管内皮屏障渗入局部

组织的过程包括白细胞在血管内皮表面的滚动、黏附和通过变形运动穿过内皮这三个相互联系的步骤。黏附分子 CD₄₄在其中发挥着不可忽视的作用。血管内皮细胞表面存在透明质酸(hyaluronan, HA), CD₄₄主要通过 HA 相连而固定于细胞表面, T 淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞表面含有 CD₄₄, 当这些细胞被激活后, CD₄₄与内皮细胞表面的 HA 结合能力增强, 从而在白细胞、内皮细胞表面滚动和黏附阶段发挥作用^[4], 阻断 CD₄₄与 HA 的结合, 可以明显抑制外周血炎症细胞向哮喘气道的聚集^[5]。因此, CD₄₄是气道变应性炎症疾病的一个潜在治疗靶点。

EOS 为主的炎症细胞浸润是变应性炎症的主要特征, EOS 是哮喘气道炎症的中心细胞。EOS 主要分布于组织内, 其特有功能的表达要求它直接进入、聚集在特异性组织反应部位并被激活。Katoh 等^[6]研究发现哮喘豚鼠 BALF 中的 EOS 和淋巴细胞显著增加, 在哮喘豚鼠腹腔内注射 CD₄₄单克隆抗体后, 发现 BALF 中原来显著增加的 EOS 和淋巴细胞明显减少, 而这两类细胞在骨髓中的计数并未发生改变, 证明 EOS 和淋巴细胞从外周血渗入呼吸道, 向肺部炎症组织浸润有赖于 CD₄₄分子的作用。本研究结果显示哮喘肺组织 CD₄₄在 mRNA 和蛋白水平的表达无论是在发病的早期还是随着疾病的发展均与 BALF 中嗜酸性粒细胞、淋巴细胞的增加密切相关, 证实黏附分子 CD₄₄在促使嗜酸粒细胞和淋巴细胞聚集于哮喘气道炎症部位的过程中发挥了重要作用, 是导致哮喘气道慢性炎症的重要因素, 与 Katoh 等^[6]报道结论一致。国外亦有临床报道^[7]黏附分子 CD₄₄在哮喘患儿气道炎症形成过程中发挥了重要作用。因此, 在病理状态下, 通过药物抑制 CD₄₄的过度表达是抑制细胞黏附和炎症反应的重要

途径, 有利于在早期控制哮喘的发展。

此外, 实验中还观察到哮喘肺组织 CD₄₄在 mRNA 和蛋白水平的表达与激发 1 周时的巨噬细胞百分比密切相关, 与 BLAF 中性粒细胞及激发 2 周时的巨噬细胞百分比无相关性, 这也提示在哮喘气道炎症形成过程中, 各类炎性细胞的作用机制不尽相同^[8,9]。

[参 考 文 献]

[1] Marc E. Rothenberg. CD₄₄—a sticky target for asthma[J]. Clin Invest, 2003, 111(10):1460-1462.

[2] 吕国平. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]. 中华结核病和呼吸杂志, 1995, 18(6): 317.

[3] Woodside DG, Vanderslice P. Cell adhesion antagonists: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease [J]. BioDrugs, 2008, 22(2): 85-100.

[4] Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD₄₄ [J]. Immunology, 1998, 93(2):139-48.

[5] Katoh S, Ishii N, Nobumoto A, Takeshita K, Dai SY, Shinonaga R, et al. Galectin-9 inhibits CD₄₄-hyaluronan interaction and suppresses a murine model of allergic asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(1): 27-35.

[6] Katoh S, Matsumoto N, Kawakita K, Tominaga A, Kincaide PW, Matsukura S. A role for CD₄₄ in an antigen-induced murine model of pulmonary eosinophilia [J]. J Clin Invest, 2003, 111(10): 1563-1570.

[7] Kopriva F, Sztokowska J, Ordeltová M, Zápalka M. Percentage of eosinophils with surface CD₄₄ and levels of eosinophil cationic protein in the peripheral blood in children with bronchial asthma and their changes after montelukast therapy [J]. Allergy Asthma Proc, 2006, 27(4): 378-82.

[8] 刘筱萍, 胡晓艳, 曾宾, 钱卫疆, 王新根. 哮喘患儿淋巴细胞 CD40/CD40L 信号分子的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(3):225-227.

[9] 孙宗芝, 李根山, 安肃英, 庞保东, 杨文卓. 哮喘儿童 IgE T 细胞亚群细胞因子的动态观察及临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(1):23-26.

(本文编辑: 吉耕中)