

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.01.017

论著·实验研究

1,25-(OH)₂D₃ 对哮喘小鼠肺内 TIM-4 表达的影响

栾斌 王亚哲 张艳丽 谷惠茹 李彦玲 赵杰

(郑州大学第三附属医院儿内科,河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 建立小鼠哮喘气道重塑模型,观察1,25-(OH)₂D₃对哮喘小鼠气道结构及T细胞免疫球蛋白域粘蛋白4(T cell immunoglobulin mucin protein-4, TIM-4)表达的影响。**方法** 30只BALB/c雌性小鼠随机分为对照组、哮喘组和1,25-(OH)₂D₃干预组,采用卵清蛋白致敏、激发建立哮喘模型。取小鼠肺组织,采用苏木精-伊红染色观察气道重塑情况,并应用RT-PCR法和免疫组化法检测肺内TIM-4 mRNA和蛋白的表达。**结果** 哮喘组发生典型的气道重塑改变,与对照组比较,TIM-4表达水平升高(105±9 vs 42±5, $P<0.05$);1,25-(OH)₂D₃干预组较哮喘组气道重塑有所改善,TIM-4表达降低(78±6),差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** TIM-4可能参与小鼠气道重塑过程;新型免疫调节剂1,25-(OH)₂D₃可下调哮喘小鼠肺内TIM-4的表达,改善气道重塑。

[中国当代儿科杂志,2013,15(1):67-70]

[关键词] 哮喘;气道重塑;1,25-(OH)₂D₃;TIM-4;小鼠

Effect of 1,25-(OH)₂D₃ on expression of TIM-4 in the lungs of asthmatic mice

LUAN Bin, WANG Ya-Zhe, ZHANG Yan-Li, GU Hui-Ru, LI Yan-Ling, ZHAO Jie. Department of Pediatrics, Third Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: luanbin0588@tom.com)

Abstract: Objective To establish a mouse model of asthmatic airway remodeling and investigate the effects of 1, 25-(OH)₂D₃ on airway structure and T cell immunoglobulin mucin protein-4 (TIM-4) expression in asthmatic mice. **Methods** Thirty female mice (BALB/c strain) were randomly divided into control, asthma and 1, 25-(OH)₂D₃ intervention groups. An asthmatic mouse model was induced using ovalbumin. Lung tissue of the mice was collected, mRNA expression of TIM-4 was evaluated by RT-PCR and airway remodeling and protein expression of TIM-4 were observed by hematoxylineosin staining and immunohistochemistry. **Results** Typical airway remodeling was found in the asthma group, and TIM-4 expression in this group was significantly higher than in the control group (105±9 vs 42±5; $P<0.05$). Compared with the asthma group, the 1, 25-(OH)₂D₃ intervention group showed improvement in airway remodeling and a decrease in TIM-4 expression (78±6) ($P<0.05$). **Conclusions** TIM-4 may be involved in the airway remodeling of mice. As a new type of immunoregulator, 1,25-(OH)₂D₃ can downregulate expression of TIM-4 in the lungs and improve airway remodeling in asthmatic mice. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(1):67-70]

Key words: Asthma; Airway remodeling; 1,25-(OH)₂D₃; TIM-4; Mice

支气管哮喘是儿童呼吸系统最常见的疾病之一,以气道慢性炎症、气道高反应性和气道重塑为基本病理特征,其发病机制复杂,目前尚未完全阐明。T细胞免疫球蛋白域粘蛋白4(T cell immunoglobulin mucin protein, TIM)基因家族是新近发现的基因家族。研究表明,TIM蛋白家族在Th1/Th2细胞介导的免疫调节应答中,具有双向调节T细胞活化的作用。其中,TIM-4主要表达于活化的树突状细胞(dendritic cell, DC)及巨噬细胞表面,在肿瘤免疫耐受和肾脏缺血再灌注损伤等方面发挥着重要作用,与其他免疫性疾病亦存在相关性^[1-5],但对其发挥生物学效应的具体机制尚未完全明确。1,25-(OH)₂D₃是维生素D₃的活性代谢产物。除调节骨钙代谢外,1,25-(OH)₂D₃还具有免疫调节作用,主要通过活化DC及单核细胞来影响免疫状态^[6-7]。目前关于1,25-(OH)₂D₃是否对哮喘患者具有保护效应,尚无明确定论。本研究通过建立小鼠哮喘气道重塑模型,并应用1,25-(OH)₂D₃进行干预,观察哮喘小鼠气道重塑及TIM-4表达改变,探讨哮喘的发病机制,以及寻找新的治疗靶点。

[收稿日期]2012-07-30;[修回日期]2012-09-20
[作者简介]栾斌,男,本科,主任医师。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

30只SPF级BALB/c雌性小鼠,6~8周龄,体重 20 ± 2 g,购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(鄂)2010-0007。鸡卵清蛋白(ovalbumin, OVA)和1,25-(OH)₂D₃购于Sigma公司。Trizol、反转录试剂盒和PCR试剂购于北京全式金生物技术有限公司。免疫组化一抗购于北京博奥森生物技术有限公司;二抗及显色剂购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组和哮喘小鼠模型的制备 按随机原则将30只BALB/c小鼠分为对照组、哮喘组和1,25-(OH)₂D₃干预组,每组10只。适应性饲养1周后,参照文献^[1,8]制备动物模型。哮喘组和1,25-(OH)₂D₃干预组小鼠分别在第1、8、15天腹腔内注射抗原混合液0.2 mL(含OVA 50 μg、10%氢氧化铝0.15 mL和生理盐水0.05 mL)致敏,第22天开始雾化吸入1% OVA激发,每日1次,每次30 min,持续至第35天,共计14次。1,25-(OH)₂D₃干预组在每次激发前0.5 h给予腹腔内注射1,25-(OH)₂D₃混合液0.1 mL(含1,25-(OH)₂D₃ 0.1 μg、无水乙醇2.5 μL、生理盐水0.1 mL)^[2];哮喘组以生理盐水代替。对照组小鼠的致敏、雾化吸入及雾化吸入前腹腔注射均采用生理盐水代替1,25-(OH)₂D₃混合液。

1.2.2 肺组织标本制备 各组小鼠于末次雾化结束后24 h内以乙醚吸入麻醉,开胸,结扎左肺门,取出左肺,冻存于液氮中,用于RT-PCR检测;经右心室插管至肺动脉,用生理盐水快速冲洗至无血液流出,肺叶颜色呈白色后,换4%甲醛溶液冲洗,进行内固定,取出右肺中叶,置于4%甲醛溶液中进行外固定48 h,酒精梯度脱水,石蜡包埋,3 μm厚度切片,用于苏木精-伊红(HE)染色及免疫组织化学染色。

1.2.3 HE及免疫组化染色观察 石蜡切片脱蜡后,行HE染色,观察支气管壁的形态学改变,测定相同级别支气管横断面气道壁厚度;于脱蜡切片上依次滴加山羊抗小鼠一抗、二抗、辣根酶标记的链霉卵白素,DBA显色、苏木素复染,盐酸分化,而后脱水封片,进行免疫组化操作。应用计算机病理图

像分析系统在高倍镜视野(10×40)下观察阳性细胞中蛋白的表达及分析处理。每张切片随机选取5个以上高倍镜视野,取平均值作为该片的蛋白半定量结果。

1.2.4 RT-PCR检测TIM-4 mRNA表达 采用Trizol提取左肺组织总RNA,使用逆转录试剂盒合成单链cDNA,再设计引物,扩增目的基因。TIM-4上游引物为:5'-CAATCGAGGTGACAGTGGG-3',下游引物为:5'-AAGGAGCCAGGTGTTGTTG-3',产物大小为291 bp。内参GAPDH上游引物:5'-ATCACTGTCTTCCAGGAGC-3',下游引物:5'-ATCATACTTG-GCAGGTTTCT-3',产物大小为549 bp。反应条件:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,58℃(TIM-4)/52℃(GAPDH)退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;72℃延伸10 min。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,并采用凝胶电泳成像系统观察目的基因。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析,各组数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,组间数据两两比较采用LSD法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组小鼠的一般情况

对照组小鼠无明显不适。哮喘组小鼠在雾化激发10 min左右时出现搔抓颜面部,而后出现少动、弓背姿势、颜面部发绀(以口鼻周为重)、呼吸急促、喘息、腹肌收缩频繁、部分小鼠出现大小便失禁等情况;多次激发后,小鼠体重明显下降、进食减少、毛色暗淡。1,25-(OH)₂D₃干预组小鼠亦出现上述症状,但较哮喘组小鼠轻。

2.2 3组小鼠肺组织病理形态学改变

在普通光学高倍显微镜(10×40)下观察:对照组小鼠支气管壁结构完整光滑,上皮细胞排列整齐,无杯状细胞化生,气道壁厚度正常(48 ± 4 μm)。哮喘组小鼠支气管壁增厚(141 ± 6 μm)、受损,部分上皮细胞脱落,杯状细胞增多,平滑肌层增厚,支气管周围炎性细胞浸润增多。1,25-(OH)₂D₃干预组小鼠亦出现上述变化,但较哮喘组有所减轻,支气管壁厚度较哮喘组明显减少(76 ± 6 μm),差异有统计学意义($P<0.05$)。见图1、表1。

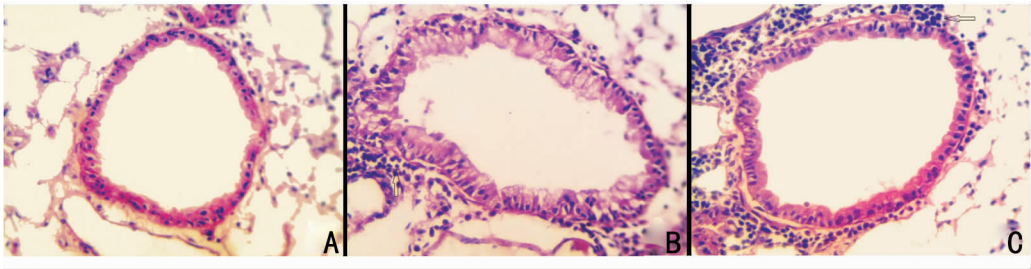


图1 3组小鼠肺组织病理形态学改变(苏木精-伊红染色,×400) A:对照组气道壁厚度基本正常,细胞排列规则,未见明显炎症细胞浸润;B:哮喘组气道壁厚度明显增加,细胞排列紊乱,炎症细胞浸润增多;C:1,25-(OH)₂D₃干预组气道壁厚度较哮喘组明显减轻,细胞排列稍规则,炎症细胞有所减少。

表1 3组小鼠气道壁厚度、TIM-4 mRNA 及蛋白表达				
组别	鼠数	气道壁厚度(μm)	TIM-4 mRNA	TIM-4 蛋白
对照组	10	48 ± 4	0.105 ± 0.011	42 ± 5
哮喘组	10	141 ± 6 ^a	0.650 ± 0.023 ^a	105 ± 9 ^a
干预组	10	76 ± 6 ^{a,b}	0.435 ± 0.020 ^{a,b}	78 ± 6 ^{a,b}
F 值		84.94	2075.30	21.26
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

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

2.3 3组小鼠 TIM-4 免疫组化结果

TIM-4 主要表达于肺泡间质、支气管壁及血管周围的抗原提呈细胞上。对照组小鼠 TIM-4 蛋白表达较弱,哮喘组小鼠 TIM-4 呈强阳性表达,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。1,25-(OH)₂D₃ 干预组小鼠 TIM-4 蛋白的表达明显低于哮喘组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图2、表1。

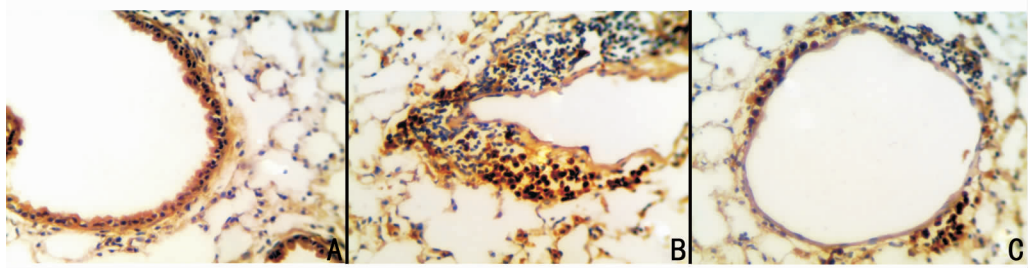


图2 3组小鼠肺组织 TIM-4 表达情况(DAB 显色,×400) A:对照组 TIM-4 表达较弱,炎性细胞浸润较轻;B:哮喘组 TIM-4 呈强阳性表达,炎性细胞浸润明显增多;C:1,25-(OH)₂D₃ 干预组 TIM-4 表达及炎症细胞浸润均较哮喘组减少。深棕黄色为 TIM-4 表达阳性细胞。

2.4 3组小鼠肺内 TIM-4 mRNA 检测结果

RT-PCR 检测结果显示,哮喘组小鼠肺内 TIM-4 mRNA 相对表达量较对照组显著增高($P < 0.05$);1,25-(OH)₂D₃ 干预组小鼠 TIM-4 mRNA 相对表达量较哮喘组明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图3、表1。

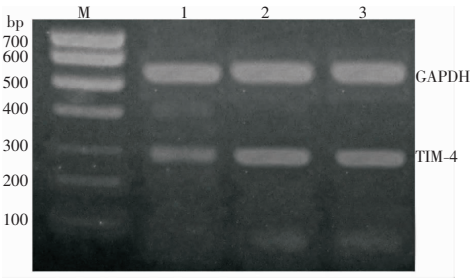


图3 小鼠肺组织 TIM-4 mRNA 表达量的变化
M: DNA marker; 1: 对照组; 2: 哮喘组; 3: 1,25-(OH)₂D₃ 干预组。

3 讨论

TIM 蛋白家族是一个保守的跨膜磷脂酰丝氨酸受体家族^[9-11],调控着固有和适应性免疫应答过程。TIM 蛋白的高度可变区域,能特异性识别表达于不同免疫细胞表面的磷脂酰丝氨酸,从而调节着包括过敏、哮喘、器官移植免疫耐受和对抗病毒感染等的免疫过程。与其他家族成员不同,TIM-4 仅表达于抗原提呈细胞表面,如 DC、巨噬细胞等,与其受体 TIM-1 结合,作为 T 细胞活化强有力的免疫共刺激分子,调控 Th2 细胞的分化增殖。研究表明,阻断 DC 上 TIM-4/TIM-1 的相互作用,能抑制 Th2 细胞的分化增殖^[3, 10],该功能已在过敏性肠炎、肾缺血再灌注损伤中得到证实^[4-5],但在哮喘中的作用尚未明确。本研究结果显示,哮喘组小鼠支气管及血管周围 TIM-4 的表达量显著增多,主要表达于支气管、血

管及肺泡周围的巨噬细胞及 DC 中,提示 TIM-4 大量形成与哮喘气道重塑相关,可能与促进 Th1/Th2 分化的失衡相关。

1,25-(OH)₂D₃ 即活性维生素 D,除了具有经典的调节骨钙及磷的代谢外,还发现具有强大的免疫调节作用^[12-13]。其免疫调节的途径多样,不同的研究结论尚不完全一致。1,25-(OH)₂D₃ 处理的 DC 能够起到抑制过敏性气道炎症中的免疫反应,同时,能够通过抑制 CD40、CD86/80 等共刺激分子抑制 DC 的活化^[14];肺泡上皮细胞能高表达 1α-羟化酶,可合成活性维生素 D,它可通过抑制趋化因子、血小板源性生长因子、基质金属蛋白酶类等细胞因子的分泌,从而抑制炎症反应^[15];另外 1α-羟化酶还表达于支气管黏膜上皮细胞、DC、肺泡巨噬细胞及淋巴结内^[14],提示这些组织也可产生活性维生素 D。体内活性维生素 D 含量正常,能降低很多疾病的发生风险,这与其调节着许多基因的表达密切相关,这些被调控的基因主要存在于皮肤黏膜系统及免疫系统中^[16]。流行病学调查显示:维生素 D 缺乏,可能是疾病和免疫紊乱的潜在原因,维生素 D 与固有和适应性免疫应答均有密切关系^[17]。本实验在哮喘造模过程中,给予 1,25-(OH)₂D₃ 干预治疗后发现,1,25-(OH)₂D₃ 不仅能有效缓解哮喘的发作程度,而且使干预组气道壁厚度、炎症细胞浸润程度明显改善,提示 1,25-(OH)₂D₃ 干预治疗后能有效降低哮喘气道炎症,改善气道重塑。RT-PCR 及免疫组化结果显示,1,25-(OH)₂D₃ 干预组中 TIM-4 蛋白及 mRNA 水平均明显低于哮喘组,提示 1,25-(OH)₂D₃ 可能通过调节巨噬细胞、DC 上 TIM-4 mRNA 的表达,改变 TIM-4 蛋白的表达量,进而调节 Th2 细胞的分化增殖,最终达到缓解哮喘的发作。

本实验首次测定 1,25-(OH)₂D₃ 干预后哮喘小鼠中 TIM-4 的表达量,推断 1,25-(OH)₂D₃ 可能由巨噬细胞及 DC 进行介导,降低 TIM-4 的表达量,从而降低气道炎症、改善气道重塑,期望为哮喘的治疗提供新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Rydell Trmanen K, Uller L, Erjefalt JS. Remodeling of extra-bronchial lung vasculature following allergic airway inflammation [J]. *Respir Res*, 2008, 9: 18.

[2] Matheu V, Back O, Mondoc E, Issazadeh-Navikas S. Dual effects of vitamin D-induced alteration of TH1/TH2 cytokine expression: enhancing IgE production and decreasing airway eosinophilia in murine allergic airway disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2003, 112(3): 585-592.

[3] Meyes JH, Chakavrti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Walder H, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 455-464.

[4] Rong S, Park JK, Kirsch T, Yagita H, Akiba H, Boenisch O, et al. The TIM-1: TIM-4 pathway enhances renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(3): 484-495.

[5] Kobayashi N, Karisola P, Pena-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, et al. TIM-1 and TIM-4 glycoproteins bind phosphatidylserine and mediate uptake of apoptotic cells[J]. *Immunity*, 2007, 27(6): 927-940.

[6] Hansdottir S, Monick MM. Vitamin D effects on lung immunity and respiratory diseases[J]. *Vitam Horm*, 2011, 86: 217-317.

[7] 马秀丽,甄艳芬. 支气管哮喘儿童血清 25-(OH)D₃ 和总免疫球蛋白 E 的变化[J]. *中国当代儿科杂志*, 2011, 13(7):551-553.

[8] Du Q, Chen Z, Zhou LF, Zhang Q, Huang M, Yin KS. Inhibitory effects of astragaloside IV on ovalbumin-induced chronic experimental asthma[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2008, 86(7): 449-457.

[9] Feng BS, Chen X, He SH, Zheng PY, Foster J, Xing Z, et al. Disruption of T-cell immunoglobulin and mucin domain molecule (TIM)-1/TIM4 interaction as a therapeutic strategy in a dendritic cell-induced peanut allergy model[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 122(1): 55-61.

[10] Zhao CQ, Li TL, He SH, Chen X, An YF, Wu WK, et al. Specific immunotherapy suppresses Th2 responses via modulating TIM1/TIM4 interaction on dendritic cells[J]. *Allergy*, 2010, 65(8): 986-995.

[11] Wilker PR, Sedy JR, Grigura V, Murphy TL, Murphy KM. Evidence for carbohydrate recognition and homotypic and heterotypic binding by the TIM family[J]. *Int Immunol*, 2007, 19(6): 763-773.

[12] Hewison M. Vitamin D and innate and adaptive immunity[J]. *Vitam Horm*, 2011, 86: 23-62.

[13] Bikle DD. Vitamin D regulation of immune function[J]. *Vitam Horm*, 2011, 86: 1-21.

[14] Sandhu MS, Casale TB. The role of vitamin D in asthma[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2010, 105(3): 191-199.

[15] Damera G, Fogle HW, Lim P, Goncharova EA, Zhao H, Banerjee A, et al. Vitamin D inhibits growth of human airway smooth muscle cells through growth factor-induced phosphorylation of retinoblastoma protein and checkpoint kinase 1[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(6): 1429-1441.

[16] Morris HA, Anderson PH. Autocrine and paracrine actions of vitamin D[J]. *Clin Biochem Rev*, 2010, 31(4): 129-138.

[17] Back O, Blomquist HK, Hernell O, Stenberg B. Does vitamin D intake during infancy promote the development of atopic allergy? [J]. *Acta Derm Venereol*, 2009, 89(1): 28-32.

(本文编辑:周勇)