

论著·实验研究

布地奈德雾化治疗对哮喘小鼠糖皮质激素受体及核因子- κ B表达的影响

姚如婕 刘沉涛 黄榕 江燕 阳爱梅

(中南大学湘雅医院儿科, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 观察布地奈德雾化吸入对哮喘小鼠糖皮质激素受体 (GR) 和核因子- κ B (NF- κ B) 表达的影响。**方法** 24只健康6~8周龄雄性BALB/c小鼠随机分为生理盐水对照组、哮喘模型组 (哮喘组) 和布地奈德治疗组 (BUD组), 每组8只。通过腹腔注射卵清蛋白和氢氧化铝混悬液致敏以及卵清蛋白溶液雾化吸入激发哮喘。末次激发24h后处死小鼠, 取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 进行嗜酸性粒细胞计数, 取肺组织行病理学检查及免疫组化检测GR和NF- κ B表达水平。**结果** 哮喘组BALF中嗜酸性粒细胞计数较对照组显著增加 ($P<0.05$); BUD组与哮喘组相比嗜酸性粒细胞数量显著减少, 但仍较对照组增高 ($P<0.05$)。哮喘组小鼠肺组织可见嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞浸润, BUD组炎症细胞浸润较哮喘组明显减轻。哮喘组GR阳性细胞百分比与对照组比较明显减少 ($P<0.05$), BUD组GR阳性细胞百分比比较哮喘组明显增加, 但仍低于对照组 ($P<0.05$); 哮喘组NF- κ B阳性细胞百分比比较对照组明显增加 ($P<0.05$), BUD组NF- κ B阳性细胞百分比比较哮喘组明显减少, 但仍高于对照组 ($P<0.05$)。**结论** BUD治疗哮喘小鼠的作用机制可能与上调GR水平及抑制NF- κ B的活性有关。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 86-89]

[关键词] 布地奈德; 糖皮质激素受体; 核因子- κ B; 哮喘; 小鼠

Effect of budesonide aerosol treatment on expression of glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B in asthmatic mice

YAO Ru-Jie, LIU Chen-Tao, HUANG Rong, JIANG Yan, YANG Ai-Mei. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Huang R, Email: hrongxy@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of budesonide aerosol inhalation on the expression of glucocorticoid receptor (GR) and nuclear factor (NF)- κ B in asthmatic mice. **Methods** Twenty-four healthy male BALB/c mice aged 6 to 8 weeks were randomly divided into three groups ($n=8$ each): normal saline (control group), asthma model (asthma group) and budesonide-treated asthma (BUD group). Asthma was induced by intraperitoneal injection of ovalbumin (OVA) and aluminium hydroxide suspension and aerosol inhalation of OVA solution. Mice were sacrificed 24 hours after the last challenge. Eosinophil count in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined. Pathological examination of the lung tissues was performed and the expression levels of GR and NF- κ B were measured by immunohistochemical analysis. **Results** Eosinophil count in the BALF was significantly higher in the asthma and BUD groups than in the control group ($P<0.05$). BUD treatment decreased eosinophil count in the BALF compared with the asthma group ($P<0.05$). The lung tissues in the BUD group showed a less severe infiltration of eosinophils and lymphocytes compared with the asthma group. The percentage of GR-positive cells in the asthma group decreased significantly compared with the control group ($P<0.05$), and the percentage of GR-positive cells in the BUD group increased significantly compared with the asthma group ($P<0.05$). Compared with the control group, the percentage of NF- κ B-positive cells increased significantly in the asthma group ($P<0.05$), and the percentage of NF- κ B positive cells in the BUD group was significantly reduced compared with the asthma group ($P<0.05$). **Conclusions** The action mechanism of budesonide in treating asthmatic mice may be related to the upregulation of GR expression and the inhibition of NF- κ B activity.
[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 86-89]

Key words: Budesonide; Glucocorticoid receptor; Nuclear factor- κ B; Asthma; Mice

[收稿日期] 2014-04-11; **[接受日期]** 2014-09-17

[作者简介] 姚如婕, 女, 硕士研究生, 医师。现工作单位: 长沙市妇幼保健院儿科。

[通信作者] 黄榕, 女, 教授。

支气管哮喘(简称哮喘)是气道慢性炎症性疾病,其特点为气道可逆性阻塞和气道高反应性。核因子- κ B(NF- κ B)是一种广泛存在于体内的多种细胞的核转录因子,参与多种炎症相关因子的基因转录。抑制NF- κ B的活化,进而阻断炎症因子的产生途径,可达到减轻哮喘气道炎症的目的。

糖皮质激素(GC)是目前公认治疗哮喘最有效的药物。吸入性GC主要作用在气道的上皮细胞,在细胞水平,GC通过抑制趋化因子和黏附分子的生成来阻断炎症细胞向气道募集,从而减少气道炎症细胞的数量。在基因水平,GC能够促进抑制蛋白I κ B- α 表达上调,抑制NF- κ B依赖基因的转录^[1]。本研究拟通过建立哮喘小鼠模型,探讨布地奈德(Budesonide, BUD)雾化吸入治疗哮喘小鼠的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

BUD混悬液由阿斯利康制药有限公司提供;糖皮质激素受体(GR)免疫组化检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;NF- κ B(P-65)免疫组化检测试剂盒及小鼠二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;卵清蛋白(OVA)购自上海博舜生物科技有限公司;压缩雾化机购自德国百瑞公司。

1.2 实验动物及分组

健康6~8周龄的雄性BALB/c小鼠共24只,体重 23 ± 3 g,由中南大学实验动物学部提供,符合二级动物标准,饲养于中南大学实验动物学部。按照完全随机方法将小鼠分为生理盐水对照组(对照组)、哮喘模型组(哮喘组)和BUD治疗组(BUD组),每组8只。

1.3 小鼠哮喘模型的建立

参照Mayuzumi等^[2]的方法制备小鼠哮喘模型。哮喘组小鼠分别于第1、14天腹腔注射OVA混悬液(100 μ g OVA+10 mg 氢氧化铝+0.2 mL 生理盐水)0.2 mL致敏,并于第14天以2% OVA溶液5 mL雾化吸入激发1次,第25天起予以1% OVA溶液5 mL雾化吸入激发,每日1次,每次30 min,连续激发10 d,小鼠出现呼吸急促、烦躁不安、腹肌痉挛、两便失禁为阳性反应。BUD组致敏及激发步骤同哮喘组,并从第25天起于每次激发前30 min雾化吸入BUD雾化液5 mL(含BUD

1 mg),每日1次,连续10 d;对照组腹腔注射致敏以及雾化吸入激发均以等量生理盐水替代。

1.4 嗜酸性粒细胞计数

于末次雾化24 h后处死小鼠,开胸,结扎左肺,以1 mL生理盐水灌洗右肺并回收灌洗液,重复灌洗2次,收集的灌洗液以2000 r/min离心10 min,收集上清液储存于-20℃;细胞用0.8 mL嗜酸性粒细胞(EOS)稀释液(2%伊红溶液5 mL+丙酮5 mL+双蒸水90 mL)重悬,取0.1 μ L重悬液对细胞计数板进行充池,然后在光镜下行EOS计数。

1.5 小鼠肺组织病理标本的制备

灌洗完毕后,分离小鼠结扎的左肺,浸入4%多聚甲醛固定24 h,梯度酒精脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,行小鼠肺组织切片,厚度约3 μ m,常规苏木精-伊红染色,光镜下观察病理改变。

1.6 免疫组化检测小鼠肺组织GR和NF- κ B水平

将已固定的肺组织常规脱水、浸蜡、包埋后切片,厚度约5~8 μ m;载玻片采用多聚赖氨酸防脱片处理;捞片后置烤箱中,58℃约1 h,使切片紧密黏附于玻片上;切片常规脱蜡;3% H₂O₂去离子水孵育10 min,以消除内源性过氧化物酶活性;蒸馏水洗, PBS浸泡5 min;微波抗原修复;4%山羊血清封闭,37℃温箱孵育30 min;甩掉多余液体,不洗;滴加一抗工作液,37℃孵育2 h,4℃过夜;PBS洗4遍;滴加生物素标记的二抗,37℃孵育1 h, PBS洗3遍;滴加链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液,37℃温箱孵育30 min, PBS洗涤;DAB显色,苏木素复染;封片,普通光镜下观察。每只动物随机取3张切片,每张切片随机取5个高倍镜视野,计数每个视野阳性细胞数,算出平均数即为每张切片阳性细胞的百分比。

1.7 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床症状

哮喘组小鼠激发后均出现不同程度的呼吸急促、烦躁不安等症状,对照组及BUD组小鼠未见明显异常表现。

2.2 各组小鼠 EOS 计数比较

哮喘组小鼠支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 EOS 的数量 ($19.1 \pm 2.0 \times 10^6/L$) 与对照组 ($2.0 \pm 1.4 \times 10^6/L$) 相比明显增加 ($P < 0.05$) ; BUD 治疗后, BALF 中 EOS 数量 ($10.6 \pm 1.6 \times 10^6/L$) 与哮喘组比较明显减少 ($P < 0.05$) , 但仍高于对照组 ($P < 0.05$) 。

2.3 各组小鼠肺组织病理改变情况

对照组小鼠气道黏膜未见明显水肿, 支气管

管腔光滑, 气道及周围血管组织无明显炎性细胞浸润, 肺泡腔内未见炎性分泌物。哮喘组小鼠气道黏膜可见水肿明显, 黏膜上皮细胞肿胀, 气管管腔缩小, 甚至完全闭塞, 气道腔内可见炎性分泌物, 气道周围血管扩张充血, 气道黏膜层、黏膜下层以及血管周围组织可见大量的炎症细胞浸润, 以 EOS、单核细胞及淋巴细胞为主, 另外可见气道平滑肌增厚。BUD 组小鼠气道仍可见炎症变化, 但与哮喘组相比明显减轻。见图 1。

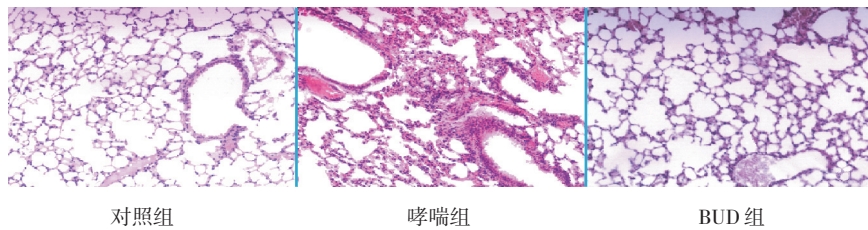


图 1 各组小鼠肺组织病理改变 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) 对照组小鼠肺组织未见明显炎症细胞浸润, 支气管管腔光滑, 肺泡腔内无明显炎性分泌物; 哮喘组小鼠气道周围血管扩张充血, 支气管、肺泡等组织可见大量的炎症细胞浸润, 气道平滑肌增厚; BUD 组小鼠肺组织仍可见少量炎症细胞浸润以及血管充血, 但较哮喘组明显好转。

2.4 各组小鼠肺组织 GR 和 NF- κ B 水平比较

哮喘组小鼠气道壁细胞中 GR 阳性细胞百分比比较对照组明显减少 ($P < 0.05$) ; BUD 组小鼠气道壁细胞中 GR 阳性细胞百分比比较哮喘组明显升高, 但仍低于对照组 ($P < 0.05$) ; 相反, 哮喘组小鼠气道壁细胞中 NF- κ B 阳性细胞所占百分比比较对照组明显增多, 而 BUD 组小鼠气道壁细胞中 NF- κ B 阳性细胞所占百分比与哮喘组比较明显减

少, 但仍高于对照组 ($P < 0.05$) 。见表 1, 图 2。

表 1 各组小鼠肺组织 GR 和 NF- κ B 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	鼠数	GR 阳性细胞百分比	NF- κ B 阳性细胞百分比
对照组	8	39.2 ± 2.8	9.1 ± 1.6
哮喘组	8	11.9 ± 2.0^a	27.8 ± 2.5^a
BUD 组	8	$23.1 \pm 2.8^{a,b}$	$18.0 \pm 1.9^{a,b}$

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

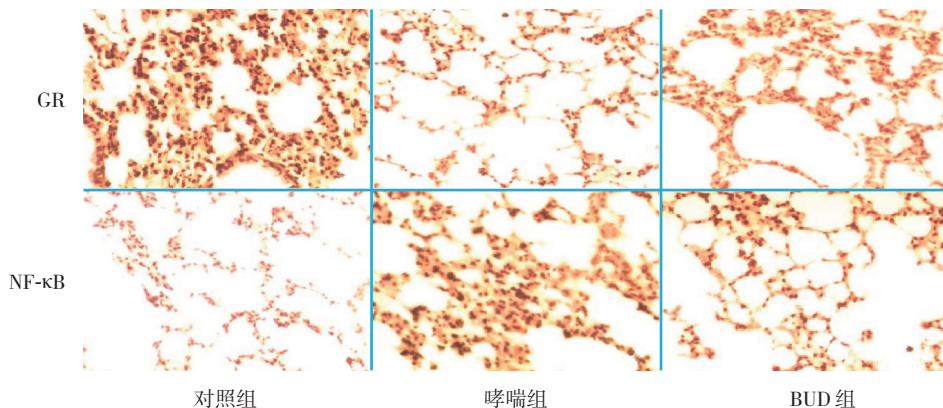


图 2 小鼠肺组织免疫组化结果 (DAB 显色, $\times 100$) 哮喘组小鼠气道壁细胞中 GR 阳性细胞较对照组明显减少; BUD 组小鼠气道壁细胞中 GR 阳性细胞较哮喘组明显升高, 但仍低于对照组; 相反, 哮喘组小鼠气道壁细胞中 NF- κ B 阳性细胞较对照组明显增多, 而 BUD 组小鼠气道壁细胞中 NF- κ B 阳性细胞较哮喘组明显减少, 但仍高于对照组。图中棕色颗粒为阳性细胞。

3 讨论

哮喘是一种以EOS浸润为特征的气道炎症性疾病,伴有多种炎症介质和细胞因子参与。由于哮喘发病机制复杂,哮喘动物模型在研究中发挥了重要的作用。本研究采用OVA混悬液雾化吸入激发BALB/c小鼠建立哮喘模型,结果显示小鼠激发后均出现不同程度的呼吸急促、烦躁不安等症状,病理观察显示哮喘组小鼠气道黏膜明显水肿,气道管腔缩小,甚至闭塞,气道腔内可见炎性分泌物,气道黏膜层、黏膜下层以及血管周围组织可见大量EOS、单核细胞及淋巴细胞浸润,气道平滑肌增厚,BALF中EOS数量增多,提示小鼠哮喘模型制备成功。

GC是目前应用最为广泛的甾体类抗炎药物,其在哮喘治疗中的作用已成为国际共识^[3]。本研究结果显示与哮喘组比较,BUD吸入治疗后,小鼠肺部炎性细胞浸润明显减轻,BALF中EOS数量明显减少,但与对照组比较BALF中EOS仍有明显增高,提示BUD吸入治疗有明显的疗效,但单一使用吸入糖皮质激素不能完全控制气道炎症。

NF- κ B是重要的促炎细胞因子的转录调节器,NF- κ B活化在哮喘的发病过程中发挥重要的作用。多种与哮喘发生有关的细胞因子和酶类,如IL-1 β 、IL-4、巨噬细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、TNF- α 、巨噬细胞炎性蛋白质-1 α (MIP-1 α)、环氧合酶(COX-2)、细胞黏附分子-1(ICAM-1)等,其基因都受到NF- κ B的调节^[4-5]。

有证据表明,GC能够促进抑制蛋白I κ B- α 表达的上调,阻断NF- κ B的活化,抑制NF- κ B依赖的基因转录^[1],达到减轻气道炎症、控制哮喘的目的。而GC需要通过与GR结合才能发挥抗炎作用。已证实气道中GR主要存在于上皮细胞和支气管平滑肌内,未激活的GR以蛋白复合物的形式存在,GC与GR结合后,受体/激素复合物移行至胞核,形成同型二聚体,与相对应的顺式作用DNA序列即糖皮质激素应答元件(glucocorticoid-response elements, GREs)相结合,进而阻断或者刺激靶基因的转录^[6]。NF- κ B与GR结合形成复合物调节多种基因的转录,包括GR本身的基因转录^[7]。研究发现,COPD患者的外周血白细胞中,GR水平明显低于正常对照组,在重症哮喘患者的外周血单核细胞中,GR的亲和力也是下降的,经过治疗后,

哮喘患者外周血白细胞中的GR水平上调^[8]。

有研究表明,GR和NF- κ B可能在功能上互为转录拮抗因子,机制可能为:(1)NF- κ B和GR之间的直接物理联系,NF- κ B p65的RHD结构域和GR的DBD结构域参与两者间的直接作用,互相抑制其转录活化功能;(2)NF- κ B与GR竞争有限的转录辅助因子,如CREB结合蛋白(CBP),CBP在两者的转录活化过程中都是必需的,而数量有限,二者通过竞争抑制对方的活性;(3)GC可直接结合I κ B- α 基因启动子上的GC结合位点,活化I κ B- α 基因的启动子,促使I κ B- α 表达的上调,进而抑制NF- κ B依赖的基因转录^[9]。本研究免疫组化结果显示与对照组相比,哮喘小鼠气道壁细胞中GR的表达减少,而NF- κ B的表达增加;经BUD雾化治疗后,与哮喘组相比,BUD组小鼠气道壁细胞中GR表达增加,NF- κ B的表达减少;说明BUD雾化治疗哮喘的机制可能与上调GR水平和抑制NF- κ B的活性有关,通过抑制NF- κ B活化,阻断炎症因子的作用,抑制气道的炎症反应,使哮喘患者的病情得到缓解。

[参考文献]

- [1] Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, et al. Targeting the NF- κ B pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(1): 1-13.
- [2] Mayuzumi H, Ohki Y, Tokuyama K, et al. Age-related difference in the persistency of allergic airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 143(4): 255-262.
- [3] Papadopoulos NG, Arakawa H, Carlsen KH, et al. International consensus on (ICON) pediatric asthma[J]. *Allergy*, 2012, 67(8): 976-997.
- [4] Murphy DM, O'Byrne PM. Recent advances in the pathophysiology of asthma[J]. *Chest*, 2010, 137(6): 1417-1426.
- [5] 顾丹,白春学.核因子 κ B与支气管哮喘发病关系及其临床意义中华哮喘杂志(电子版)[J]. 2009, 3(3): 216-219.
- [6] Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(9): 518-530.
- [7] Adcock IM, Gilbey T, Gelder CM. Glucocorticoid receptor localization in normal and asthmatic lung[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(3): 771-782.
- [8] 柳涛,彭敏,蔡柏蔷.核转录因子 κ B和糖皮质激素受体在慢性阻塞性肺病患者稳定期的相互作用[J]. *中国医学科学院学报*, 2010, 32(2): 147-150.
- [9] Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 380(1-2): 41-54.

(本文编辑: 万静)