文章编号:1000-5404(2005)17-1763-03

论著

氨茶碱对哮喘大鼠肺内 *eotaxin* 表达的影响

张 雷[1],刘国祥[1],卢惠苹[2],李海东[1],黄 英[1] ([1]第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038;[2]南京军区福州总医院理疗科,福州 350025)

提 要:目的 通过观察大鼠肺内 *eotaxin* 表达的变化,探讨氨茶碱治疗哮喘的可能机制。**方法** 以OVA致敏并激发大鼠哮喘,以不同剂量的氨茶碱治疗,分别通过免疫组化和RT-PCR检测肺内 *eotaxin* 蛋白及mRNA的表达。**结果** 大、中、小剂量的氨茶碱均能明显抑制哮喘大鼠肺内 *eotaxin* 的表达(与未治疗组相比 $P<0.05$)。**结论** 氨茶碱可通过抑制 *eotaxin* 的表达减轻哮喘炎症。

关键词: 哮喘;*eotaxin*;氨茶碱
中图法分类号: R322.35; R562.25; R974.3 **文献标识码:** A

Aminophylline relieves asthma through inhibiting *eotaxin* expression in rat lungs

ZHANG Lei[1], LIU Guo-xiang[1], LU Hui-ping[2], LI Hai-dong[1], HUANG Ying[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Physiotherapy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China)

Abstract: Objective To investigate the *eotaxin* expression in rat lungs and discuss the possible mechanism of therapeutic effect of aminophylline on asthma patients. **Methods** A total of 50 rats were randomized into asthma group ($n=10$), aminophylline group ($n=30$) and control group ($n=10$). The asthma group and aminophylline group were sensitized and challenged with OVA, while the control group with 20% aluminium hydroxide gel. The aminophylline group was respectively administrated intraperitoneally 100 mg/ml, 25 mg/ml, 5 mg/ml aminophylline at dose of 1 ml half an hour before the stimulation every day. In 24 h after the last stimulation, the rats were all sacrificed and *eotaxin* protein and mRNA were investigated with immunohistochemistry and RT-PCR techniques respectively. All data were analyzed with Student's t test. **Results** Aminophylline of different doses could inhibit *eotaxin* expression significantly as compared with the other two groups ($P<0.05$). **Conclusion** Aminophylline can ameliorate asthmatic inflammation by inhibiting *eotaxin* expression.

Key words: asthma; *eotaxin*; aminophylline

支气管哮喘是一种以嗜酸性粒细胞(Eos)浸润、活化为主的气道慢性炎症。Eos的趋化、活化、脱颗粒作用受多种细胞因子调节,其中 *eotaxin* 是目前发现的作用最强、最专一的因子,是哮喘研究的热点。氨茶碱是治疗哮喘的常用药,既往认为,茶碱治疗哮喘的机制主要是:①通过抑制磷酸二酯酶(PDE)提高cAMP水平,松弛支气管平滑肌;②拮抗腺苷酶,松弛支气管平滑肌;③刺激肾上腺髓质释放内源性儿茶酚胺,间接发挥拟肾上腺素作用;④影响及改变肌细胞钙离子的流向,增加膈肌等呼吸肌力量。近年来国内学者发现氨茶碱除了能解除支气管平滑肌痉挛,还有一定的抗炎、免疫调节作用,但其作用机制尚不清楚。本研究通过检测氨茶碱治疗后大鼠肺内 *eotaxin* 表达的变化,旨在进一步揭示氨茶碱治疗哮喘的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

卵白蛋白(OVA, V级):美国Sigma公司;氨茶碱注射液:天津制药有限公司;羊抗 *eotaxin* 抗体:美国Santa Cruz公司;Tripure:美国Roche公司;RT-PCR试剂盒:美国Promega公司;iCyclerPCR扩增仪及GET DOC2000型凝胶成像仪:美国Bio RAD公司。

作者简介:张 雷(1975-),男,贵州省毕节市人,硕士,医师,主要从事哮喘等方面的研究,现在南京军区福州总医院呼吸内科。电话:(0591)22859766,E-mail:sunray168@126.com

收稿日期:2004-06-29;**修回日期:**2005-02-18

1.2 实验动物来源及分组

雄性 Wistar 大鼠 50 只，体质量 180～200 g，由第三军医大学实验动物中心提供。用分段随机化方法分为哮喘组（A 组，10 只）、治疗组（B 组，30 只）和对照组（C 组，10 只）。

1.3 模型的建立及治疗

参照文献[1]进行。将 OVA 1 mg 和氢氧化铝 200 mg 溶于生理盐水 1 ml 新鲜配制成凝胶，A、B 两组于第 1 天在大鼠双侧胸部、腹股沟共 4 点皮下注射各 0.15 ml，同时腹腔注射 0.4 ml，共计 1 ml 进行致敏，第 8 天再重复致敏。C 组以 20% 氢氧化铝凝胶同法注射。

第 15 天开始每日早上将大鼠置于 10 cm × 10 cm × 20 cm 有机玻璃盒内，超声雾化吸入 1% OVA 共 20 min 激发哮喘，持续 7 d。治疗组于每日激发前 30 min 分别予氨茶碱 100 mg/kg（B1 组）、25 mg/kg（B2 组）、5 mg/kg（B3 组）3 个剂量组腹腔注射 1 ml（生理盐水稀释）。

1.4 标本采集

最后一次雾化吸入 OVA 后 24 h，大鼠以戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉，腹主动脉放血处死，即刻开胸，左肺以 10% 中性福尔马林固定、石蜡包埋、切片，用于 HE 染色及免疫组化染色；右肺液氮冻存用于 RT-PCR 检测。

1.5 肺组织 *eotaxin* 免疫组化染色

SABC 法参照二抗试剂盒说明书进行：切片常规脱蜡至水，枸橼酸盐缓冲液微波修复，一抗稀释度为 1∶300，DAB 显色，苏木精复染。阴性对照以 PBS 替代一抗。采用德国 LEICA 图像分析系统，每张切片随机选取 10 个具代表性的视野（×400），自动选取阳性区域并计算平均光密度值（AOD）。

1.6 肺组织 *eotaxin* mRNA 含量测定

Tripure 提取总 RNA 并以 260/280 比值鉴定纯度，一步法进行逆转录扩增。引物参照文献[2]合成，上游为：5′-TGACCAGTAAGAAGATCC CCAACAC-3′，下游为：5′-TCACACAACCTTTTGAGTCTGGC-3′，共 369 bp。内参照 β-actin 上游为：5′-CGAGAAGATGACCCAGATCA-3′，下游为：5′-AGGGGCCGGACTCGTCATAC-3′，共 240 bp。扩增条件：48 ℃ 45 min，94 ℃ 2 min，以 94 ℃ 1 min，60 ℃ 2 min，72 ℃ 2 min 循环 30 次，72 ℃ 7 min 延伸。产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后于凝胶成像仪上拍照，图像分析系统测定电泳条带的积分光密度值，样品结果以“样本积分光密度值/内参照积分光密度值”的比值（IOD 比值）表示。

1.7 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 软件包进行 t 检验。

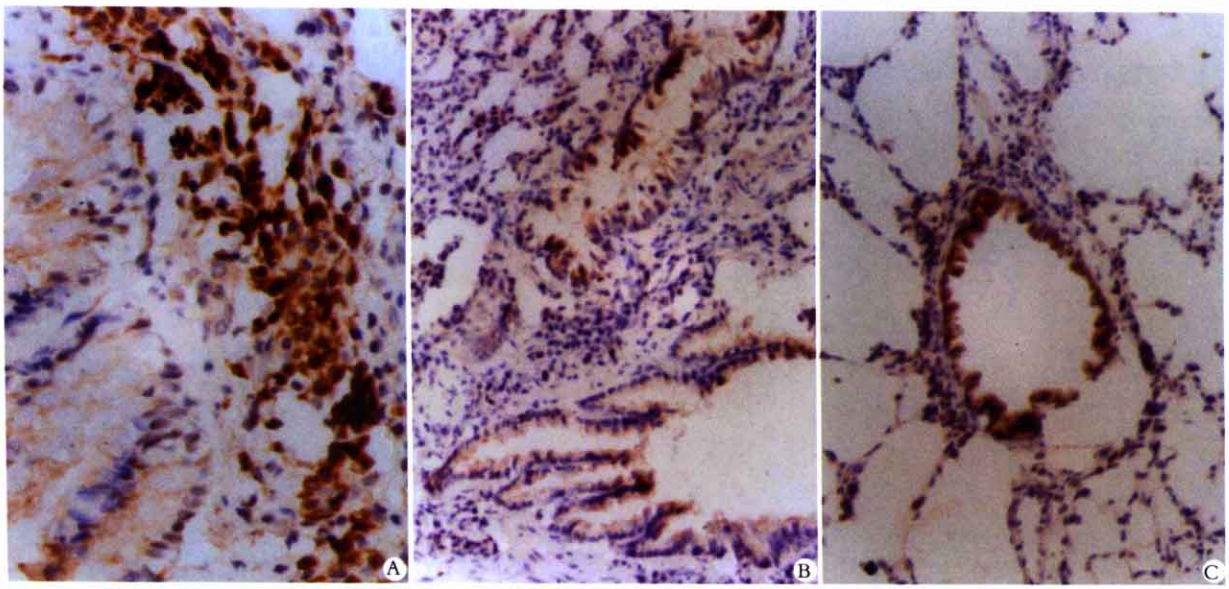
2 结果

2.1 肺组织 *eotaxin* 蛋白表达

对照组：支气管、细支气管上皮细胞呈弱阳性表达；哮喘组：主要表达于支气管、细支气管上皮细胞，此外肺泡巨噬细胞、嗜酸性粒细胞及部份淋巴细胞等炎性细胞也有表达，阳性明显强于对照组；治疗组：各剂量组表达相对于哮喘组均有不同程度的减轻（表 1，图 1）。

2.2 肺组织 *eotaxin* mRNA 表达

对照组：少量表达；哮喘组：表达较对照组明显增加；治疗组：各剂量组表达相对于哮喘组均有不同程度的减少（表 1，图 2）。



A: Asthma group (SABC ×400); B: 100 mg/kg aminophylline group (SABC ×200); C: 5 mg/kg aminophylline group (SABC ×200)

图 1 *Eotaxin* 在各组肺组织中的免疫组化染色

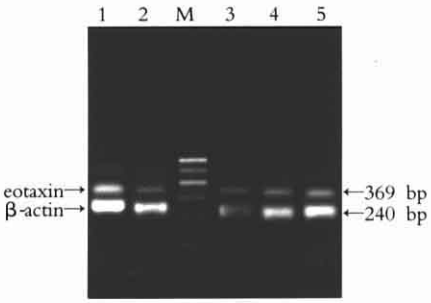
Fig 1 Immunohistochemical staining of *Eotaxin* in each group

表 1　各组肺组织 *eotaxin* 表达（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　*Eotaxin* expression in lung tissue（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Group	Protein（AOD）	mRNA（IOD ratio）
Control	0.10 ± 0.03	0.18 ± 0.05
Asthma	0.32 ± 0.04△	0.86 ± 0.21△
100 mg/kg	0.12 ± 0.02**	0.21 ± 0.10**
25 mg/kg	0.18 ± 0.02**	0.39 ± 0.12**
5 mg/kg	0.29 ± 0.03*	0.65 ± 0.19*

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* asthma；△：$P<0.01$，*vs* control



1：Asthma；2：Control；M：Marker；3：100 mg/kg aminophylline；4：25 mg/kg aminophylline；5：5 mg/kg aminophylline

图 2　各组肺组织 *eotaxin* mRNA RT-PCR 产物电泳结果

Fig 2　Electrophoresis of *eotaxin* mRNA RT-PCR product

3　讨论

炎细胞趋化因子分为 CC、CXC、C、CXXXC 等四大亚家族，作用于 Eos 的主要是 CC 家族。*eotaxin* 即属于 CC 家族，在支气管哮喘的发病过程中它可与 Eos 表面的 CCR3 受体特异性结合，从而诱导 Eos 的趋化、活化、脱颗粒作用[3,4]。我们已往的研究已发现 *eotaxin* 在支气管哮喘的发病机制中具有重要作用，其蛋白表达强度与 Eos 的浸润程度密切相关。这提示了 *eotaxin* 不仅是判断哮喘病变程度的早期、灵敏指标，还可作为治疗哮喘的一个靶目标。

本实验显示无论大剂量、中等剂量还是小剂量的氨茶碱均能不同程度地抑制肺组织中 *eotaxin* 蛋白及 mRNA 的表达，提示了氨茶碱可通过干预 *eotaxin* 表达抑制 Eos 的浸润、活化和脱颗粒，从而对哮喘具有一定的治疗作用。氨茶碱抑制 *eotaxin* 表达的机制尚不清楚，我们的实验证实了 *eotaxin* 主要由支气管上皮细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞等细胞表达，TNF-α、IL-4 等细胞因子均可上调 *eotaxin* 的表达。氨茶碱可能主要是通过调节 T 淋巴细胞、巨噬细胞的功能、诱导 Eos 凋亡等机制调节细胞因子网络，进而干预 *eotaxin* 的表达。氨茶碱在支气管哮喘的治疗中不但具有解痉作用，还具有一定的抗炎、免疫调节作用。已往认为氨茶碱的治疗浓度为 10～20 μg/ml，动物实验也显示一般至少需要 20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 以上的氨茶碱才能有效防治哮喘。我们的研究发现 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 的氨茶碱也可在一定程度上干预 *eotaxin* 的表达，提示小剂量的氨茶碱对哮喘具有一定的抗炎作用。氨茶碱抗炎作用的机制尚有待深入研究，已发现它还可通过干预 TNF-α、IL-6 等细胞因子调节巨噬细胞、T 淋巴细胞、中性粒细胞等炎细胞的功能，可通过抑制 Eos 粘附分子表达、诱导 Eos 凋亡阻止 Eos 在肺内的聚集[5～7]。

综上所述，在支气管哮喘的治疗过程中氨茶碱可通过干预 *eotaxin* 的表达抑制 Eos 的浸润、活化、脱颗粒，从而具有抗炎作用。

参考文献：

[1] 黄　英，张　雷，刘国祥. Wistar 大鼠支气管哮喘模型的建立[J]. 中华名医论坛，2003，(11)：58－59.

[2] Wong K H, Negishi H, Adashi E Y. Expression, hormonal regulation, and cyclic variation of chemokines in the rat ovary: key determinants of the intraovarian residence of representatives of the white blood cell series[J]. Endocrinology, 2002, 143(3): 784－791.

[3] White J R, Lee J M, Dede K, *et al*. Identification of potent, selective non-peptide CC chemokine receptor-3 antagonist that inhibits *eotaxin*-, *eotaxin*-2-, and monocyte chemotactic protein-4-induced eosinophil migration[J]. J Biol Chem, 2000, 275(47): 36626－36631.

[4] Weltman J K. Cytokines: regulators of eosinophilic inflammation[J]. Allergy Asthma Proc, 2000, 21(4): 203－207.

[5] 包　红，李清华，邓西平，等. 氨茶碱对支气管哮喘患者 T 细胞亚群的影响[J]. 中国医师杂志，2000，(增刊 1)：81－82.

[6] 赖克方，王长征，郭先健，等. 氨茶碱治疗对哮喘豚鼠肺内嗜酸性粒细胞凋亡的作用[J]. 临床与实验病理学杂志，1999，15(6)：520－522.

[7] 李志奎，王长征，钱桂生. 氨茶碱对体外嗜酸性粒细胞凋亡及 Fas mRNA 表达的影响[J]. 中国药理学通报，2001，17(5)：543－545.

（编辑　薛国文）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg = 0.133 kPa）。

本刊编辑部