论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1058-04

NGF 参与支气管哮喘大鼠气道炎症的发生及作用机制

郑晓晶,张桂蓉 (重庆医科大学附属第二医院呼吸内科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)对支气管哮喘大鼠气道炎症的影响及作用机制。方法 24 只雄性 SD 大鼠分为正常对照组(A 组)、哮喘组(B 组)和抗 NGF 组(C 组),每组 8 只。测定各组支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)总细胞及细胞分类计数;HE 染色观察气道病理改变;RT-PCR 和 ELISA 法检测各组大鼠白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4)、干扰素-γ(interferon-γ,IFN-γ)、NGF mRNA 和蛋白表达水平。结果 B 组与 A 组比较,BALF 中细胞总数及细胞分类计数增多($P<0.05$);IL-4、NGF mRNA 和蛋白表达增加($P<0.01$);而 IFN-γ mRNA 和蛋白表达减少($P<0.01$)。C 组与 B 组比较,BALF 中细胞总数及细胞分类计数减少($P<0.05$);IL-4、NGF mRNA 和蛋白表达减弱($P<0.01$);而 IFN-γ mRNA 和蛋白表达水平无显著差异。B 组 BALF 中 NGF 含量与细胞总数、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞呈正相关($r=0.833$、0.944、0.949,$P<0.05$);与 IL-4 含量呈正相关($r=0.944$,$P<0.01$),与 IFN-γ 含量不相关($r=0.122$,$P>0.05$);与肺组织中 IL-4 mRNA 表达水平呈正相关($r=0.848$,$P<0.05$),与 IFN-γ mRNA 表达不相关($r=0.611$,$P>0.05$)。结论 NGF 与哮喘大鼠气道炎症密切相关,它可以通过使 Th2 型细胞因子分泌亢进参与哮喘的发生。

关键词:哮喘;神经生长因子;气道炎症;白细胞介素类
中图法分类号:R392-33;R392.3;R562.25 文献标识码:A

NGF participates in the airway inflammation of asthmatic mice

ZHENG Xiao-jing, ZHANG Gui-rong (Department of Respiratory Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and mechanism of nerve growth factor (NGF) on the airway inflammation of asthmatic mice. Methods Male SD rats ($n=24$) were randomly divided into the control group (group A), the asthmatic group (group B), the anti-NGF group (group C), 8 mice in each group. The total cell count and classified count of cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were performed. The pathological changes of the lung tissues were detected by HE staining. The concentrations of IL-4, IFN-γ and NGF in BALF were measured by ELISA. The mRNA expression of IL-4, IFN-γ and NGF in the lung tissues were detected by RT-PCR. Results Compared with the group A, not only the number of the total cells and classified cells in BALF significantly increased ($P<0.05$) in the group B, but also the mRNA and protein levels of IL-4 and NGF ($P<0.01$), but the mRNA and protein levels of IFN-γ significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the group B, the number of the total cells and classified cells in BALF significantly decreased ($P<0.05$) in the group C, while the mRNA and protein levels of IL-4 and NGF significantly decreased ($P<0.01$), but the mRNA and protein levels of IFN-γ showed no significant difference. The NGF levels in BALF of the group B were positively correlated with the number of total cells, eosinophils and lymphocytes in BALF ($r=0.833$, 0.944, 0.949, $P<0.05$), the mRNA and protein levels of IL-4 in BALF ($r=0.848$, 0.944 respectively, $P<0.01$), but not correlated with the mRNA and protein levels of IFN-γ in BALF ($r=0.611$, 0.122 respectively, $P>0.05$). Conclusion NGF may play a key role in the formation of airway inflammation in the asthmatic rats by promoting the secretion of Th2 cytokines.

Key words: asthma; nerve growth factor; airway inflammation; interleukin

支气管哮喘是一种气道慢性非特异性炎症性疾病,其发病机制至今仍不完全清楚。目前研究认为,Th2 细胞及其产生的细胞因子白细胞介素-4(interleukin-4,IL-4),IL-5 等在支气管哮喘中表达增加对气道

作者简介:郑晓晶,女,四川省都江堰市人,硕士研究生,主要从事支气管哮喘方面的研究。电话:(023)68574220,E-mail:xj_1030@126.com
通信作者:张桂蓉,电话:(023)63715917,E-mail:jizhe123@sina.com
收稿日期:2007-09-15;修回日期:2007-11-25

炎症起着关键性的调节作用。神经生长因子（nerve growth factor，NGF）是机体产生的能促进神经元存活、生长、分化的一类多肽或蛋白质分子，最新研究表明，它是参与支气管哮喘发病的重要介质。本实验拟对 NGF 在哮喘气道炎症发病中的作用进行研究，并观察 NGF 对大鼠哮喘模型中 IL-4 和干扰素-γ（interferon-γ，IFN-γ）蛋白含量和基因表达的影响，探讨 NGF 参与哮喘炎症反应的作用机制，为开辟新的治疗途径提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　SPF 级雄性 SD 大鼠（大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供）24 只，4 ~ 6 周龄，体质量 200 ~ 220 g。分为对照组（A 组）、哮喘组（B 组）和抗 NGF 组（C 组），每组 8 只。

1.1.2　主要试剂　　鸡卵蛋白（OVA）购于美国 Sigma 公司；抗 NGF 抗体购于美国 R&D Systems 公司；Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司；RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司；大鼠 IL-4、IFN-γ ELISA 试剂盒购于北京晶美生物工程公司；大鼠 NGF ELISA 试剂盒购于美国 R&D Systems 公司。

1.1.3　仪器　　S-888E 型超声波雾化器（南京道芬电子有限公司）；PCR 热循环仪（美国 Bio-Rad 公司）；酶标仪（美国 Bio-Rad 公司）；低温高速离心机（美国 BECKMAN 公司）；紫外光分光光度计（美国 Bio-Rad 公司）；光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

1.2　方法

1.2.1　哮喘模型的建立及抗 NGF 干预　　参照朱锦琪等[1]大鼠哮喘模型的建立及抗 NGF 的处理方法。

1.2.2　支气管肺组织病理学观察　　取大鼠右上叶肺组织置于 4% 多聚甲醛中固定 12 h，常规石蜡包埋切片，苏木精-伊红（HE）染色后观察病理学改变。

1.2.3　BALF 中细胞计数　　夹闭右主支气管，从气管注入无菌磷酸盐生理盐水缓冲液（phosphate buffered saline solution，PBS）2 ml 灌洗左肺，反复 3 次，回收率 50% ~ 90%，将收集到的全部支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）离心（3 000 r/min，10 min），取上清液置于 - 20 ℃低温冰箱保存，准备用于测定 IL-4，IFN-γ，NGF。细胞沉淀用 1 ml PBS 重悬，取少许计数细胞总数。余液用 HE 染色涂片，高倍镜下计数 400 个细胞行细胞分类计数。

1.2.4　BALF 中 IL-4，IFN-γ，NGF 的测定　　用 ELISA 法分别测定 BALF 上清液中 IL-4、IFN-γ、NGF 的含量。具体步骤按试剂盒说明书进行，在酶标仪波长 450 nm（IL-4、IFN-γ），492 nm（NGF）上读取吸光度值，绘制标准曲线，查出标本浓度（pg/ml）。

1.2.5　RT-PCR 法检测肺组织中 IL-4，IFN-γ，NGF mRNA 表达水平　　使用 Trizol 试剂从肺组织中匀浆抽提总 RNA，随后以两步法行 RT-PCR。用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA，以此为模板行 PCR 扩增。目的基因引物序列，IL-4 上游引物：5′-GCTATTGATGGGTCTCAGCC-3′，下游引物：5′-CAGGACGTCAAGGTACAGGA-3′，扩增片段 448 bp，退火温度为 60 ℃。IFN-γ 上游引物：5′-ATCCATGAGTGCTACACGCC-3′，下游引物：5′-GACCTCCTTGACCGTTTTCC-3′，扩增片段 184 bp，退火温度为 61 ℃。NGF 上游引物：5′-TCTATCCTGGCCACTCTGAG-3′，下游引物：5′-CTATTGGTTCAGCAGGGGCA-3′，扩增片段 209 bp，退火温度为 61 ℃。β-actin 上游引物：5′-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3′，下游引物：5′-GCCAGGATAGAGCCACCAAT-3′，扩增片段 650 bp，退火温度 61 ℃。PCR 反应条件：94 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 30 s，61 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 30 s，共 35 个循环，72 ℃再延伸 7 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，比较 IL-4、IFN-γ、NGF 与 β-actin 的相对 A 值并进行半定量分析。

1.3　统计学处理

所有统计数据用 SPSS 13.0 统计软件处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多样本均数比较采用 F 检验。相关性检验采用 Pearson 直线相关分析。

2　结果

2.1　各组大鼠 BALF 中细胞总数及分类计数

B 组大鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞数、中性粒细胞数和淋巴细胞数明显高于 A 组，两组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$），C 组大鼠 BALF 中细胞总数、嗜酸性粒细胞数、中性粒细胞数和淋巴细胞数明显低于 B 组，两组比较差异有统计学意义（$P < 0.05$，表 1）。

表 1　3 组大鼠 BALF 中细胞总数及细胞分类计数（$\times 10^8$/L，$n = 8$，$\bar{x} \pm s$）

组别	细胞总数	嗜酸性粒细胞	中性粒细胞	淋巴细胞	巨噬细胞
A 组（正常对照组）	9.2 ± 0.9	0	0.021 ± 0.018	0.045 ± 0.027	0.642 ± 0.059
B 组（哮喘组）	22.0 ± 1.5[a]	0.118 ± 0.089[a]	0.109 ± 0.065[a]	0.102 ± 0.043[a]	0.618 ± 0.031[a]
C 组（抗 NGF 组）	10.6 ± 1.3[b]	0[b]	0.014 ± 0.003[b]	0.053 ± 0.030[b]	0.600 ± 0.032[b]

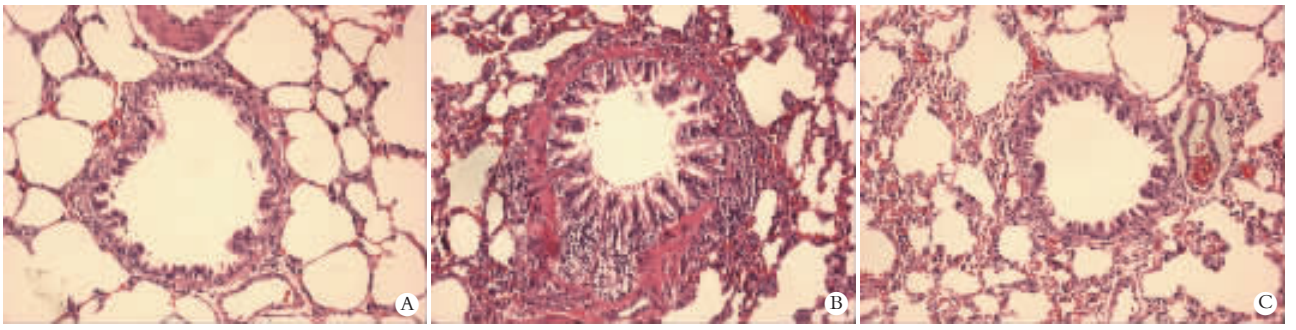
a：$P < 0.05$，与 A 组比较；b：$P < 0.05$，与 B 组比较

2.2　各组大鼠支气管肺组织病理学改变

A 组大鼠气道上皮完整，支气管管壁和周围肺组织无明显炎性细胞浸润（图 1A）；B 组大鼠支气管和周围肺组织有大量炎性细胞浸润，以嗜酸性粒细胞，淋巴细胞为主，黏膜皱襞加深，气道上皮脱落，支气管管腔缩小，黏液栓增多（图 1B）。C 组大鼠支气管及周围肺组织病理改变较 B 组大鼠明显减轻（图 1C）。

2.3　BALF 中 IL-4、IFN-γ 和 NGF 的含量

B 组大鼠 BALF 中 IL-4、IFN-γ 和 NGF 含量分别为（65.5 ± 5.1）pg/ml、（133.0 ± 14.2）pg/ml、（76.0 ± 7.7）pg/ml，A 组分别为（27.3 ± 1.9）pg/ml、（242.0 ± 18.3）pg/ml、（55.0 ± 4.3）pg/ml，两组比较差异有统计学意义（$P < 0.01$）；C 组大鼠 BALF 中 IL-4 含量为（28.5 ± 2.1）pg/ml，C 组与 B 组比较差异有统计学意义（$P < 0.01$），而 C 组大鼠 IFN-γ 的含量为（131.2 ± 12.3）pg/ml，C 组与 B 组比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。

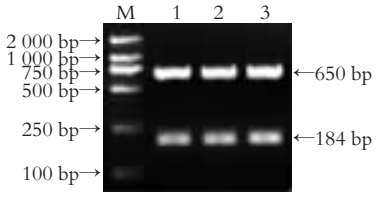


A：A 组(正常对照组)；B：B 组(哮喘组)；C：C 组(抗 NGF 组)

图1 各组大鼠支气管肺组织的病理表现 (HE×200)

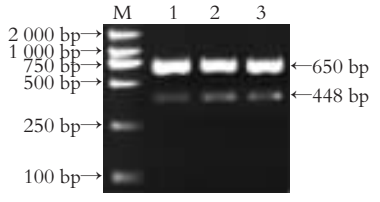
2.4 肺组织中 IL-4、IFN-γ 和 NGF mRNA 表达的比较

B 组大鼠肺组织中 IL-4、IFN-γ 和 NGF mRNA 相对表达量为(60.4±6.5)%、(10.2±2.2)%、(70.9±7.6)%，A 组大鼠分别为(37.3±5.5)%、(51.4±3.7)%、(36.8±5.5)%，两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)；C 组大鼠 IL-4 mRNA 相对表达量为(42.6±1.9)%，C 组与 B 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)，C 组大鼠 IFN-γ mRNA 相对表达量为(12.3±1.6)，C 组与 B 组比较差异无统计学意义($P>0.05$)(图2～4)。



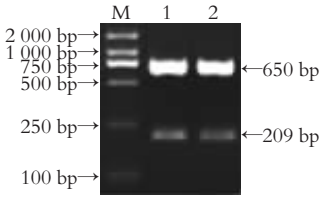
1：B 组(哮喘组)；2：C 组(抗 NGF 组)；3：A 组(正常对照组)；M：标准

图2 各组大鼠肺组织 IFN-γ mRNA 的表达



1：B 组(哮喘组)；2：C 组(抗 NGF 组)；3：A 组(正常对照组)；M：标准

图3 各组大鼠肺组织 IL-4 mRNA 的表达



1：B 组(哮喘组)；2：A 组(正常对照组)；M：标准

图4 B 组与 A 组大鼠肺组织 NGF mRNA 的表达

2.5 相关性分析

BALF 中 NGF 含量与细胞总数、嗜酸性粒细胞、淋巴细胞数呈正相关($r=0.833$、0.944、0.949，$P<0.05$)；与 BALF 中 IL-4 含量呈正相关($r=0.944$，$P<0.01$)；与 BALF 中 IFN-γ 含量不相关($r=0.122$，$P>0.05$)；与肺组织中细胞因子 IL-4 mRNA 表达呈正相关($r=0.848$，$P<0.05$)；与 IFN-γ mRNA 表达不相关($r=0.611$，$P>0.05$)。

3 讨论

支气管哮喘是一种气道非特异性炎症性疾病，$CD4^+$ T 淋巴细胞的两个功能性亚群 Th1/Th2 及其产生的细胞因子在支气管哮喘气道炎症中起着关键性的调节作用，Th1 细胞主要分泌 IFN-γ，Th2 细胞主要分泌 IL-4，正常情况下 Th1/Th2 应处于一种平衡状态，哮喘发病时存在 Th2 细胞异常增加，产生 IL-4 等细胞因子增加[2,3]。IL-4 在哮喘炎症过程中被认为是起主导作用的因子。它可以刺激 B 淋巴细胞的增殖和分化，诱导 IgE 的产生；促进肥大细胞的生长；提高血管内皮细胞表面黏附分子(vascular endothelial adhesion molecule，VCAM-1)的表达，诱导淋巴细胞及嗜酸性粒细胞对内皮细胞的黏附作用。而 IFN-γ 被认为是一种抗哮喘的因子，它具有抑制 Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5 等，降低气道反应性等作用[4]。近来的研究表明，NGF 在支气管哮喘中有着重要的病理生理意义。但目前 NGF 参与哮喘发病的作用机制仍未明了。Bonini 等[5]首次提出 NGF 蛋白水平在过敏性哮喘患者血清中明显高于正常对照组及非过敏性哮喘患者。Virchow 等[6]发现，在参与变应原激发实验患者的肺泡灌洗液中，NGF 产生同样是增加的。以往的研究结果提示，在用卵蛋白致敏的高度表达 NGF 的转基因小鼠的肺泡灌洗液中，嗜酸性粒细胞和淋巴细胞的数量多于对照组[7]。Kassel 等[8]证实在用变应原反复刺激哮喘患者后，肥大细胞的数量随着 NGF 的增加而不断增加。体外实验还显示，NGF 可使肥大细胞和成纤维细胞发生定向迁移[9]。

本实验中哮喘大鼠 BALF 中的 NGF 含量与气道炎性指标密切相关，表现为 BALF 中 NGF 含量越多，

嗜酸性粒细胞、淋巴细胞浸润数越多，BALF 中 IL-4 的含量越高，肺组织中 IL-4 mRNA 的表达越高；在阻断内源性 NGF 哮喘模型的 BALF 中嗜酸性粒细胞及淋巴细胞的浸润减少，BALF 中 IL-4 的含量减少，肺组织中 IL-4 mRNA 的表达也减少。这从分子生物学的角度进一步说明了 NGF 与哮喘气道炎症的发生密切相关。本研究显示哮喘组大鼠 BALF 中 IL-4 的蛋白含量及肺组织 IL-4 mRNA 表达均高于正常对照组，并且 BALF 中 NGF 的蛋白含量与肺组织 IL-4 mRNA 表达及 BALF 中 IL-4 的蛋白含量成正相关，与 IFN-γ 不相关，抗 NGF 组大鼠肺组织 IL-4 mRNA 表达及 BALF 中 IL-4 的蛋白含量低于哮喘组，而 IFN-γ 变化不明显。由此推断 NGF 可能通过调节 IL-4、IFN-γ 的失衡表达，引起 Th2 型细胞因子分泌亢进，使其产生 IL-4 增加，而对 Th1 型细胞因子的分泌无明显作用，进一步加剧了 Th1/Th2 的偏移状态，诱导支气管哮喘的发生，这对于解释支气管哮喘的发病机制可能具有重要意义。

另外，本研究表明，抗 NGF 可以减轻气道炎症的发生，并减轻 T 细胞亚群向 Th2 转化能力，使哮喘中 $CD4^+$ T 淋巴细胞 Th2 优势表达受到抑制，故 BALF 中 IL-4 的水平下降，其 Th1/Th2 类因子表达的偏移状态被逆转。因此，影响 Th1/Th2 类细胞因子表达的因素虽然很多，其中调节 NGF 水平可以从基因水平影响 T 细胞激活状态，影响哮喘的气道炎症。这为探索新的治疗途径提供了实验依据。目前普遍认为气道炎症能够导致气道高反应性，因此推断以 NGF 为靶点，通过阻断 NGF 的分泌或使用抗 NGF 的药物可以减轻哮喘气道高反应性的发生，从而减轻哮喘发作时的症状。但目前这种物质对人体的安全性及有效性有待进一步探索。

参考文献：

[1] 朱锦琪，冯俊涛，胡成平，等. 神经生长因子、白血病抑制因子调控支气管哮喘大鼠神经源性炎症机制的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2006，29(6)：376－380.

[2] Romagnani S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation [J]. Mol Immunol，2002，38(12－13)：881－885.

[3] 王文建，杨　莉. 地塞米松对支气管哮喘模型大鼠气道重建的影响[J]. 郑州大学学报·医学版，2007，42(1)：130－133.

[4] Hu C，Wedde-Beer K，Auais A，*et al*. Nerve growth factor and nerve growth factor receptors in respiratory syncytial virus-infected lungs[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2002，283(2)：L494－L502.

[5] Bonini S，Lambiase A，Bonini S，*et al*. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，1996，93(20)：10955－10960.

[6] Virchow J C，Julius P，Lommatzsch M，*et al*. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation[J]. Am J Respir Crit Care Med，1998，158(6)：2002－2005.

[7] Path G，Braun A，Meets N，*et al*. Augmentation of allergic early-phase reaction by nerve growth factor[J]. Am J Respir Crit Care Med，2002，166(6)：818－826.

[8] Kassel O，de-Blay F，Duvernelle C，*et al*. Local increase in the number of mast cells and expression of nerve growth factor in the bronchus of asthmatic patients after repeated inhalation of allergen at low-dose[J]. Clin Exp Allergy，2001，31(9)：1432－1440.

[9] Sawada J，Itakura A，Tanaka A，*et al*. Nerve growth factor functions as a chemoattractant for mast cells through both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways[J]. Blood，2000，95(6)：2052－2058.

（编辑　吴培红）

中华医学会第十五次全国放射学学术会议通知

中华医学会定于 2008 年 10 月 16－20 日在重庆国际会议展览中心召开第十五次全国放射学学术会议。这是放射界的全国盛会首次选择在西部地区召开。届时将有众多国际、国内著名专家到会作专题学术报告，并进行多种形式的学术交流。凡未在正式出版物上公开发表的以下有关内容均可投稿参会：常规 X 线及数字 X 线成像的临床应用；CT、MRI 及其新技术临床应用与基础研究；介入放射学诊疗技术应用及研究；PACS 系统的应用经验；放射学设备管理、维修、维护以及放射技术学；放射学护理。详情请登陆网址：http://www.chinaradiology.org/ccr15/。本次会议在学术交流方面得到了《第三军医大学学报》和《重庆医科大学学报》的鼎力支持。大会组委会将选出部分优秀论文在《第三军医大学学报》（CSCD 核心库）2008 年第 20 期、《重庆医科大学学报》（CSCD 扩展库）2008 年第 10 期刊出。有意者请按杂志稿约要求将论文全文投至邮箱 fsxh2006@sina.com，并在主题中注明“XX 学报＋作者名”。《第三军医大学学报》稿约可登陆 http://aammt.tmmu.com.cn 查看。投稿截止日期：2008 年 6 月 30 日。