论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2388-04

大环内酯类药联合糖皮质激素促进哮喘大鼠嗜酸性粒细胞凋亡

黄 娟[1],许 慧[1],安常青[1],高 俊[2],陈洪雷[2] (430072 武汉,湖北省妇幼保健院儿科[1];430071 武汉,武汉大学基础医学院病理学教研室[2])

[摘要] **目的** 研究大环内酯类药联合糖皮质激素对哮喘大鼠肺组织的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中嗜酸性粒细胞(eosinophil,EOS)凋亡相关蛋白 cleaved caspase-9、Bak 表达的影响。**方法** 以卵白蛋白致敏制作大鼠哮喘模型,将大鼠分为5组:对照组、哮喘模型组、干预组 A_1(红霉素)、干预组 A_2(地塞米松)、干预组 A_3(红霉素+地塞米松)组,每组10只。并对其 BALF 中嗜酸性粒细胞进行计数,TUNEL 法检测 EOS 凋亡;ELISA 法测定 BALF 中 IL-5、IL-8 水平;Western blot 检测 EOS 中 cleaved caspase-9、Bak 蛋白的表达。**结果** 模型组 BALF 中细胞总数、EOS 所占比例均显著高于对照组和干预组($P<0.01$);凋亡率显著低于对照组和干预组($P<0.01$)。对照组及干预组 BALF 中 IL-5 和 IL-8 浓度均低于模型组($P<0.01$);干预组 A_3 中两者浓度又分别低于干预组 A_1 和干预组 A_2($P<0.01$)。对照组、干预组分别与模型组相比,cleaved caspase-9、Bak 蛋白表达的差异均有统计学意义($P<0.01$);干预组 A_3 分别与干预组 A_1、A_2 相比,cleaved caspase-9、Bak 蛋白表达均有统计学差异($P<0.01$)。**结论** 大环内酯类药可协同糖皮质激素通过上调 cleaved caspase-9、Bak 的表达促进 EOS 细胞凋亡,从而发挥抗炎作用。

[关键词] 哮喘;大鼠;大环内酯类药;cleaved caspase-9;Bak
[中图法分类号] R562.25; R965; R978.15 [文献标志码] A

Eosinophil apoptosis induced by macrolides combined with glucocorticoids in asthmatic rats

Huang Juan[1], Xu Hui[1], An Changqing[1], Gao Jun[2], Chen Honglei[2] ([1]Department of Pediatrics, Maternal and Child Hospital of Hubei Province, Wuhan, Hubei Province, 430072; [2]Department of Pathology, School of Basic Medical Science, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of macrolides combined with glucocorticoids on the expression of cleaved caspase-9 and Bak in eosinophil (EOS) of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from the lung tissues of asthmatic rats. **Methods** Asthmatic rat models were established by repeated ovalbumin sensitization of Sprague-Dawley rats, and the rats were divided into five groups including a control group, a model group, an interference group A_1 (erythromycin), an interference group A_2 (dexamesone) and an interference group A_3 (erythromycin + dexamesone). The percentage of EOS in BALF was counted, and EOS apoptosis was detected by TUNEL method. The levels of IL-8 and IL-5 in BALF were detected by ELISA, and the expression levels of cleaved caspase-9 and Bak in EOS from BALF were detected by Western blotting. **Results** The total cell number and the percentage of EOS in the model group were significantly higher than those in the control group and interference groups ($P<0.01$), and the EOS apoptosis rate was lower in the model group than in the control group and interference groups ($P<0.01$). The expression of IL-8 and IL-5 in the BALF of the model group increased significantly as compared with the control group and interference groups ($P<0.01$), and the expression of IL-8 and IL-5 in the BALF was significantly lower in the interference group A_3 than in the interference group A_1 and interference group A_2. The OD values of cleaved caspase-9 in the model group, interference groups and control group were 0.32 ± 0.05, 0.45 ± 0.08, 0.48 ± 0.10, 0.66 ± 0.15 and 0.75 ± 0.10, respectively, and the OD values of Bak in the model group, interference groups and control group were 0.40 ± 0.05, 0.54 ± 0.09, 0.57 ± 0.06, 0.78 ± 0.10 and 0.92 ± 0.12, respectively. The levels of cleaved caspase-9 and Bak were significantly higher in the interference groups and control group than in the model group ($P<$

[基金项目] 湖北省科技厅攻关项目(2007AA402C08)
[通信作者] 安常青,E-mail:Evergreenan@163.com

0.01), and those in the interference group A_3 were significantly higher than those in the interference group A_1 and interference group A_2 ($P<0.01$). **Conclusion** Macrolides combined with glucocorticoids may play an anti-inflammatory role by up-regulating cleaved caspase-9 and Bak expression to promote EOS apoptosis in the lung tissues of asthmatic rats.

[**Key words**] asthma; rat; macrolides; cleaved caspase-9; Bak

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Department of Hubei Province (2007AA402C08). Corresponding author: An Changqing, E-mail: Evergreenan@163.com

哮喘是炎症细胞、炎性介质、气道细胞与组织之间复杂作用的结果。慢性气道炎症是哮喘的特征,而嗜酸性粒细胞(eosinophil,EOS)凋亡不足在哮喘气道炎症中起重要作用,有许多因素与EOS凋亡有关。EOS被证实是支气管哮喘治疗干预中的主要靶点之一[1]。促凋亡蛋白caspase-9和Bak是线粒体凋亡途径的两个主要成员。最近研究证实大环内酯类药物——红霉素可抑制阿司匹林哮喘患者的EOS浸润,长期低剂量红霉素口服可降低哮喘患者的气道高反应性[2]。哮喘患者的临床治疗中,大环内酯类药物的应用可减少激素的用量,其单独应用也可降低气道高反应,但其机制不明。目前关于大环内酯类药物的抗炎机制是否与凋亡相关鲜见报道。本研究主要探讨大环内酯类药物联合糖皮质激素对哮喘大鼠肺组织EOS凋亡相关蛋白caspase-9和Bak表达的影响,观察二者联用是否能协同诱导EOS的凋亡,从而起到抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 实验仪器、药物及试剂

超生雾化器(德国PARI GmbI公司);哮喘激发实验玻璃箱(特制15 cm×15 cm×20 cm);离心机(上海X52型医用离心机);生物显微镜(日本OLYMPUS);卵蛋白干粉(美国Sigma公司);注射用乳糖酸红霉素(大连美罗大药厂,生产批号:20080624);地塞米松磷酸钠(无锡市第七制药有限公司,生产批号:20070921)。兔抗鼠Bak、cleaved caspase-9(Asp353)多克隆抗体浓缩型(美国Cell Signal Technology公司)。Hanks液(北京索莱宝公司),Percoll分离液(瑞典Pharmacia公司)。迷你型蛋白印迹仪(美国Bio-Rad)。

1.2 哮喘大鼠模型的制备和分组

参照文献[3]并稍加改变。清洁级6~8周龄SD大鼠50只,雄雌不分。体质量180~200 g,由武汉大学实验动物中心提供,批号:2003-0013。随机平均分为模型组、干预组A_1[红霉素200 mg/(kg·d)]、干预组A_2[地塞米松0.1 mg/(kg·d)]、干预组A_3[地塞米松0.1 mg/(kg·d)+红霉素200 mg/(kg·d)]和对照组,每组各10例。常规饲养7 d未见异常现象后,模型组和干预组予10 g/L卵白蛋白9 g/L盐水溶液1 ml、氢氧化铝干粉100 mg腹腔注射致敏大鼠。第15天时模型组和干预组予5 g/L卵白蛋白9 g/L盐水溶液1 ml吸入激发哮喘发作,每次30 min,持续7 d;对照组以9 g/L盐水进行腹腔注射和雾化吸入。每天激发前30 min A_1组予红霉素200 mg/(kg·d)腹腔注射;A_2组予地塞米松0.1 mg/(kg·d)腹腔注射;A_3组予地塞米松0.1 mg/(kg·d)+红霉素200 mg/(kg·d)腹腔注射。致敏后的第22天,将实验各组大鼠乙醚麻醉后断颈处死,右肺中叶浸入40 g/L多聚甲醛缓冲溶液固定,按常规制作石蜡切片,HE染色后行肺组织病理观察。

1.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)制备和计数

各组大鼠于乙醚麻醉后,行颈部正中切口,分离出气管,在环状软骨处剪一"V"形小口,立即经气管注入Hanks液5 ml,轻轻按摩胸部20~30 s后回收BALF,共6次,回收率>90%。BALF回收液3 ml经双层无菌纱布过滤,在4 ℃、1 200 r/min离心10 min,留取上清-70 ℃冰箱冻存,待测细胞因子。离心沉淀细胞用生理盐水冲洗并调整细胞数为1.0×10^9/L,在细胞计数板上计数细胞总数。取已调整细胞数的BALF 30 μl,用特制的细胞涂片离心支架在4 ℃、1 200 r/min离心10 min,通过离心作用使一定量细胞均匀平铺于载玻片上,自然晾干,经HE染色后在高倍镜下计数100个细胞,同时计算EOS细胞所占的比例,每例动物计数3张涂片。

1.4 BALF中EOS分离

参照文献[4]制成密度为1.090 g/ml和1.080 g/ml的Percoll液,各2 ml先后加入15 ml锥形玻璃试管,然后轻轻沿管壁加回收之余下BALF于其上,1 800 r/min离心20 min后,收集中间层及沉淀细胞,EOS纯度达95%以上。立即放于-80 ℃冰箱冻存。

1.5 TUNEL法检测EOS凋亡

参照原位细胞凋亡检测试剂盒说明进行操作,高倍镜视野下随机选择10个视野,计数总细胞数和凋亡细胞阳性率。

1.6 ELISA法测定BALF中IL-5、IL-8浓度

ELISA法检测各组大鼠BALF上清液中IL-5和IL-8浓度,具体步骤按试剂盒说明进行。

1.7 Western blot检测EOS中cleaved caspase-9和Bak蛋白的含量

1.7.1 EOS蛋白的提取 -70 ℃保存的EOS室温融化,放入EP管中,加入200 μl的蛋白裂解液冰浴中超声粉碎,4 ℃ 12 000 r/min离心30 min收集上清,取5 μl按二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)试剂盒说明进行蛋白定量,其余于-20 ℃冰箱保存待用。

1.7.2 检测步骤及扫描分析 参考文献[5]。cleaved caspase-9和Bak抗体均以1∶1 000稀释。ECL曝光,显影,定影后以Quantity One凝胶软件分析系统分析条带,以大鼠GAPDH作为内参照。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，组间差异行独立样本 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组 BALF 中细胞总数和 EOS 所占比例及其凋亡比例情况

模型组 BALF 中细胞总数、EOS 所占比例均显著高于对照组（$P<0.01$），凋亡率显著低于对照组（$P<0.01$，表 1）。干预组 BALF 细胞总数和 EOS 均较模型组下降（$P<0.01$），凋亡率较模型组显著上升（$P<0.01$）。干预组 A_3 的 BALF 中细胞总数、EOS 所占的比例与干预组 A_1 和 A_2 分别相比均显著下降（$P<0.01$），凋亡率较模型组显著上升（$P<0.01$）。

表 1 各组 BALF 细胞计数、EOS 所占的比例及其凋亡情况（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	细胞总数（$\times10^7$/L）	EOS（%）	凋亡率（%）
对照组	10	31.90 ± 1.21	0.66 ± 0.22	25.20 ± 11.4
模型组	10	48.20 ± 1.39[a]	6.83 ± 1.64[a]	12.21 ± 7.02[a]
干预组 A_1	10	39.88 ± 1.40[ab]	4.56 ± 0.54[ab]	44.53 ± 16.19[ab]
干预组 A_2	10	38.68 ± 1.17[ab]	3.02 ± 0.91[ab]	40.18 ± 10.65[ab]
干预组 A_3	10	36.40 ± 1.05[abcd]	1.87 ± 0.61[abcd]	63.61 ± 13.30[abcd]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较；c：$P<0.01$，与干预组 A_1 比较；d：$P<0.01$，与干预组 A_2 比较

2.2 各组 BALF 中 IL-5 和 IL-8 浓度比较

模型组 BALF 中 IL-5 和 IL-8 浓度明显高于对照组和干预组（$P<0.01$）。干预组 A_3 IL-5 和 IL-8 浓度又明显低于干预组 A_1（$P<0.01$）和干预组 A_2（$P<0.01$）；与对照组无统计学差异（$P>0.05$），见表 2。

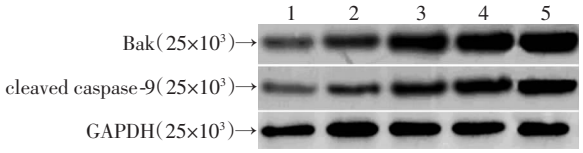
表 2 各组 BALF 中 IL-5 和 IL-8 浓度（g/L，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	IL-5	IL-8
对照组	10	42.24 ± 9.06	37.90 ± 15.02
模型组	10	99.20 ± 17.45[a]	105.32 ± 21.14[a]
干预组 A_1	10	69.48 ± 4.40[ab]	90.49 ± 17.21[ab]
干预组 A_2	10	62.61 ± 7.17[ab]	84.20 ± 19.16[ab]
干预组 A_3	10	50.84 ± 10.01[bcd]	53.01 ± 18.37[bcd]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较；c：$P<0.01$，与干预组 A_1 比较；d：$P<0.01$，与干预组 A_2 比较

2.3 Western blot 检测 EOS 中 cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白的含量

Western blot 法检测模型组、干预组 A_1、干预组 A_2、干预组 A_3 和对照组中 EOS 的 cleaved caspase-9 的光密度值分别为：（0.32 ± 0.05）、（0.45 ± 0.08）、（0.48 ± 0.10）、（0.66 ± 0.15）和（0.75 ± 0.10）；Bak 光密度值分别为：（0.40 ± 0.05）、（0.54 ± 0.09）、（0.57 ± 0.06）、（0.78 ± 0.10）和（0.92 ± 0.12）；模型组 cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白表达显著低于其他 4 组（$P<0.01$，图 1）。干预组 A_3 cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白表达显著高于干预组 A_1 和干预组 A_2（$P<0.01$），但干预组 A_1 与干预组 A_2 之间相比，差异无统计学意义（$P>0.05$）。



1：模型组；2：干预组 A_1；3：干预组 A_2；4：干预组 A_3；5：对照组

图 1 cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白在大鼠不同病变肺组织 EOS 中的表达

3 讨论

支气管哮喘患病率在世界大部分地区正以惊人的速度上升，尤其是儿童支气管哮喘，已成为全球关注的公众健康问题和儿童最常见的慢性呼吸道疾病。EOS 募集于肺中并释放炎性介质是哮喘气道炎症的关键环节之一，哮喘时外周血、痰、BALF 及气道活检组织中 EOS 数量均明显升高。哮喘发作时 EOS 凋亡减少，且与哮喘严重程度可能呈负相关[1]。

我们既往的研究[5]显示：哮喘模型组黏膜、黏膜下层及肺泡区有大量的 EOS 炎症细胞浸润，而干预组炎症明显减轻。本研究结果证实哮喘模型组 BALF 中炎性细胞总数和 EOS 数明显高于对照组，而凋亡率明显低于对照组，与既往病理观察相符。干预组 A_3 分别与 A_1 和 A_2 相比其 BALF 中炎性细胞总数、EOS 所占的比例均显著下降，凋亡率显著增加，说明红霉素联合地塞米松可降低 EOS 数量，促进 EOS 凋亡。5 组 BALF 中 IL-8 和 IL-5 水平的差异进一步证实这一点。无论是 IL-8 还是 IL-5 浓度，模型组均最高，3 组干预组浓度均显著低于模型组，且干预组 A_3（联合用药组）的 IL-8 和 IL-5 浓度又显著低于单药干预组 A_1 和 A_2 组。IL-8 为中性粒细胞趋化之一，主要参与中性粒细胞及 EOS 向炎症部位的活化和迁移[6-7]；IL-5 几乎参与了 EOS 前体细胞分化、成熟、趋化及活化的全过程，同时还能抑制 EOS 凋亡，导致哮喘嗜酸性粒细胞性气道炎症[8]。我们的实验证明红霉素联合地塞米松可下调 IL-8 和 IL-5 的水平显著减少 EOS 在气道黏膜募集，促进 EOS 凋亡。汪浩等[9]证实地塞米松可降低哮喘大鼠 BALF 中 IL-8 水平，但未研究大环内酯类药物及其联合糖皮质激素对哮喘大鼠 IL-8 的作用；Asano 等[10]证实大环内酯类药物诱导 EOS 凋亡与其抑制 IL-5 有关，但未涉及与地塞米松联合作用。

Bak 是 Bcl-2 家族的一种促凋亡蛋白，既和 Bcl-2 同源，又能拮抗 Bcl-2 的作用。Bak 定位于线粒体外膜，是凋亡信号转导中线粒体通路的关键蛋白。在凋亡刺激下，Bak 的构像会发生改变，促进细胞色素 c 的释放。细胞色素 c 释放至细胞质会激活 caspase-9 通

路,最终导致细胞死亡。caspase-9 是 caspase 家族中位于最上游的重要成员,是 caspase 系统引起细胞凋亡的最重要的起始因子。cleaved caspase-9 是 procaspase-9 在 Asp353 位点自我裂解形成的一个大的活性片段,可进一步激活细胞凋亡的最关键酶 caspase 3,启动 caspase 级联,从而导致细胞凋亡[11]。最近研究[12]表明,通过 caspase 依赖的 EOS 凋亡机制,一种新的细胞周期素依赖激酶抑制剂的药物 AT7519 能诱导人 EOS 的凋亡并能增强小鼠过敏性胸膜炎的消退。本研究采用蛋白印迹法检测 cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白在大鼠肺组织 EOS 中的表达,发现在对照组和干预组中,cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白表达的平均光密度值与模型组相比,差异均有显著性,并且干预组 A_3 分别与干预组 A_1 和 A_2 相比,cleaved caspase-9 和 Bak 蛋白表达的差异也有显著性,表明红霉素联合地塞米松可上调哮喘大鼠肺组织 EOS 中 cleaved caspase-9 和 Bak 的蛋白表达,两药联用效果优于单用。陆洋等[13]研究了糖皮质激素对哮喘大鼠嗜酸性粒细胞中 caspase-9 的表达的影响,但未涉及大环内酯类药物单独及联合糖皮质激素对该蛋白表达的影响。综上我们的实验证明,大环内酯类药联合糖皮质激素可下调 IL-5、IL-8 水平减少 EOS 在气道黏膜的聚集,上调凋亡相关蛋白 cleaved caspase-9、Bak 的表达促进 EOS 凋亡,降低气道炎症。

参考文献:

[1] Wegmann M. Targeting eosinophil biology in asthma therapy[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(4): 667-674.
[2] Shoji T, Yoshida S, Sakamoto H, *et al*. Anti-inflammatory effect of roxithromycin in patients with aspirin-intolerant asthma[J]. Clin Exp Allergy, 1999, 29(7): 950-956.
[3] 吕国平, 崔德健, 郭英江, 等. 介绍一种建立大鼠哮喘模型的实验方法[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 18(6): 377-378.
[4] 李志奎, 王长征, 钱桂生. 哮喘豚鼠肺组织嗜酸性粒细胞 fas 表达及药物的影响[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(5): 321-324.
[5] 黄娟, 许慧, 安常青, 等. 大环内酯类药物对哮喘大鼠肺组织凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(16): 1262-1264, 1267.
[6] Gordon J R, Swystun V A, Li F, *et al*. Regular salbutamol use increases CXCL8 responses in asthma: relationship to the eosinophil response [J]. Eur Respir J, 2003, 22(1): 118-126.
[7] Erger R A, Casale T B. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium[J]. Am J Physiol, 1995, 268(1 Pt 1): L117-L122.
[8] Kim S H, Lee Y C. Piperine inhibits eosinophil infiltration and airway hyperresponsiveness by suppressing T cell activity and Th2 cytokine production in the ovalbumin-induced asthma model[J]. J Pharm Pharmacol, 2009, 61(3): 353-359.
[9] 汪浩, 武晓兰, 谭红霞, 等. IL-8 和 Eotaxin 在哮喘大鼠中的表达及地塞米松的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 270-273.
[10] Asano K, Kamakazu K, Hisamitsu T, *et al*. Modulation of Th2 type cytokine production from human peripheral blood leukocytes by a macrolide antibiotic, roxithromycin, *in vitro*[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(11): 1913-1921.
[11] Chen M, Guerrero A D, Huang L, *et al*. Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic BCL-2 family members[J]. J Biol Chem, 2007, 282(46): 33888-33895.
[12] Alessandri A L, Duffin R, Leitch A E, *et al*. Induction of eosinophil apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor AT7519 promotes the resolution of eosinophil-dominant allergic inflammation[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25683.
[13] 陆洋, 孔灵菲, 耿秀娟. Caspase-3、caspase-9 在哮喘大鼠模型嗜酸性粒细胞中的表达及糖皮质激素的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(11): 1033-1035.

(**收稿**:2012-09-03;**修回**:2012-10-10)
(编辑 王 红)

“造血干细胞移植治疗血液病”重点号本刊2012年第24期即将出版

专家述评

1 重视造血干细胞移植中的造血微环境问题 …… 张 曦,等

论著

1 减低剂量 Bu/Cy 预处理方案进行异基因造血干细胞移植治疗白血病的效果观察 …… 陈 姝,等
2 异基因造血干细胞移植治疗年轻慢性淋巴细胞白血病患者3例 …… 李杰平,等
3 异基因造血干细胞移植联合供者 CIK 细胞过继免疫治疗复发难治血液肿瘤11例临床分析 …… 陈 林,等
4 异基因造血干细胞移植联合伊马替尼治疗成人 Ph+急性淋巴细胞白血病临床观察 …… 刘 嘉,等
5 异基因造血干细胞移植术治疗自体造血干细胞移植术后复发的恶性淋巴瘤17例疗效分析 …… 苏 毅,等