维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0394－04

母牛分枝菌菌苗对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡及 Fas、bcl－2 蛋白表达的影响

陈 虹, 赵云峰, 罗永艾

(重庆医科大学临床学院肺科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究母牛分枝杆菌菌苗对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡及 Fas、bcl－2 蛋白表达的影响。方法:30 只豚鼠随机分为生理盐水组、哮喘组及母分枝杆菌菌苗组。应用卵白蛋白(OVA)建立哮喘模型,母牛分枝杆菌菌苗组每只豚鼠在 OVA 致敏前 10 天肌注 22.5μg 母牛分枝杆菌菌苗。最后一次激发后,TUNEL 法检测肺组织嗜酸粒细胞凋亡,免疫组化法检测肺组织 Fas、bcl－2 蛋白的表达。结果:母牛分枝杆菌菌苗组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡指数(23.8±5.4)%显著高于哮喘组(4.6±0.7)%($P<0.01$);肺组织 Fas 蛋白表达(OD 值)(0.202±0.013)显著高于哮喘组(0.051±0.025)($P<0.01$);肺组织 bcl－2 蛋白表达(OD 值)(0.054±0.032)显著低于哮喘组(0.181±0.041)($P<0.01$)。结论:母牛分枝杆菌菌苗通过上调 Fas 蛋白、下调 bcl－2 蛋白在哮喘豚鼠肺组织的表达而诱导哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡。

【关键词】母牛分枝杆菌菌苗;哮喘;嗜酸粒细胞;凋亡;Fas;bcl－2

【中国图书分类法分类号】R562 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－11－18

Effects of mycobacterium vaccae vaccine on eosinophil apoptosis, protein expression of Fas and bcl－2 in lung tissues of asthmatic guinea pig

CHEN Hong, et al

(*Department of Pulmonary Diseases, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of Mycobacterium vaccae vaccine on eosinophil apoptosis, protein expression of Fas and bcl－2 in lung tissues of asthmatic guinea pig. *Methods*: 30 guinea pigs were randomly divided into NS, asthma and Mycobacterium vaccae vaccine group. A guinea pig model of asthma was estbalished with OVA(ovalbumin). Each guinea pig of Mycobacterium vaccae vaccine group was injected intramuscularly with 22.5μg of Mycobacterium vaccae vaccine 10 days before OVA immunization. After the last challenge, TdT－mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) technique was used to determine the apoptosis of eosinophils and immunohistochemistry method was used to determine protein expression of Fas and bcl－2 in lung tissue sections. *Results*: Guinea pigs of Mycobacterium vaccae vaccine group had a higher AI(apoptosis index) of eosinophils in lung tissues[(23.8±5.4)%] than that of asthma group[(4.6±0.7)%, $P<0.01$], a higher expression of Fas protein(optical density value, OD value) in lung tissues[(0.202±0.013)] than that of asthma group[(0.051±0.025), $P<0.01$], and a lower expression of bcl－2 protein(OD value) in lung tissues[0.054±0.032)] than that of asthma group[0.181±0.041), $P<0.01$]. *Conclusion*: Mycobacterium vaccae vaccine can induce the apoptosis of eosinophils in lung tissues of asthmatic guinea pigs by up－regulating the expression of Fas protein and down－regulating the expression of bcl－2 protein in lung tissues.

【Key words】Mycobacterium vaccae vaccine; Asthma; Eosinophil; Apoptosis; Fas; bcl－2

支气管哮喘是一种慢性气道炎症性疾病,嗜酸粒细胞等炎症细胞在气道黏膜的大量浸润是引起气道慢性炎症的主要原因。减少嗜酸粒细胞数量有助于哮喘气道炎症的消退[1],而促进嗜酸粒细胞凋亡可以减少嗜酸粒细胞数量,是哮喘气道炎症消退的有效途径[2,3]。Fas 抗原是一种诱导凋亡作用很强的膜表面糖蛋白,可以引起哮喘患者外周血和肺组织中嗜酸粒细胞胞的凋亡[4]。bcl－2 原癌基因在嗜酸粒细胞凋亡中研究最多,bcl－2 蛋白具有促进嗜酸粒细胞生长、抑制其凋亡的作用。母牛分枝杆菌菌苗(Mycobacterium vaccae vaccine, M. vaccae, 国内

作者介绍:陈 虹(1967－),女,副教授,博士,
主要研究方向:呼吸系统疾病基础及临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

商品名:微卡)是一种双向免疫调节剂,具有双向免疫调节作用,研究报道该菌苗可以明显减少哮喘小鼠支气管肺泡灌洗液中嗜酸粒细胞数量[5]。末端脱氧枋苷酸转移酶(TdT)介导的脱氧三磷酸尿嘧啶(dUTP)末端标记法(TUNEL 法)常用于检测组织中早期的凋亡细胞,我们应用此方法研究母牛分枝杆菌菌苗对哮喘豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡是否有影响,用免疫组化方法研究肺组织促凋亡蛋白 Fas 及抑制凋亡蛋白 bcl-2 的表达。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及动物

药品来源:母牛分枝杆菌菌苗每瓶 22.5μg,由安徽龙科马生物制药有限责任公司生产。

试剂及仪器:卵白蛋白(ovalbumin,OVA)(Grade Ⅱ,sigma 公司);TUNEL 法原位细胞凋亡检测试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司;Fas、bcl-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);GD-8 型图像分析系统(成都电子科技大学金星多媒体技术有限公司生产)。

动物来源:4 周~5 周龄普通级健康英国杂毛豚鼠 30 只,购于重庆医科大学实验动物中心(合格证号:渝 20020001),体重 180g~200g,雌雄各半,分笼饲养。30 只豚鼠按随机数字法分为生理盐水组、哮喘组及母牛分枝杆菌菌苗组,每组 10 只。

1.2 实验方法

1.2.1 哮喘豚鼠的模型的建立及母牛分枝杆菌菌苗预防用药

哮喘组及母牛分枝杆菌菌苗组每只豚鼠第 1 天腹腔注射 10%卵白蛋白 1ml(用生理盐水配制)致敏,第 15 天雾化吸入 0.3%卵白蛋白激发,第次 10min,连续 10 天;母牛分枝杆菌菌苗组每只豚鼠在卵白蛋白致敏 10 天于股部肌肉注射 22.5μg 母牛分枝杆菌菌苗(溶于 1ml 生理盐水中,每侧肌注 0.5ml),共肌注 1 次;而生理盐水组每只豚鼠第 1 天腹腔注射 1ml 生理盐水,第 15 天雾化吸入生理盐水,每次 10min,连续 10 天。

1.2.2 BALF 中炎症细胞及嗜酸粒细胞计数

最后一次激发后 2h,用 20%乌拉坦以 7ml/kg 的剂量腹腔麻醉豚鼠,行气管切开及气管插管(长 6cm,内径宽 2mm),缝线牢固结扎,用 pH 值 7.4 的 PBS 液对支气管肺泡进行灌洗并收集 BALF,每次注入 5mlPBS 液,冲洗 2 次后吸出,共注入 PBS 液 3 次,回收率 80%以上。将收集的 BALF 摇匀,取 200μlABLF,加入 200μl 白细胞稀释液[6],普能光镜下在血球计数板上计数白细胞,将其余 BALF 以 1200rpm 的速度离心 10min,沉淀物涂片,HE 染色后在 400 倍放大倍数下,连续数 500 个细胞并计数嗜酸粒细胞。

1.2.3 肺组织标本处理

支气管肺泡灌洗完毕后,无菌操作下切取部分肺组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,分别进行 HE 染色、TUNEL 法检测嗜酸粒细胞凋亡和免疫组织化方法检测肺组织 Fas 蛋白及 bcl-2 蛋白的表达。

1.2.4 TUNEL 法原位细胞凋亡检测及免疫组化方法检测 Fas、bcl-2 蛋白,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 结果判定及图像处理

镜下观察:凋亡的嗜酸粒细胞特点为蓝紫色双核或单核,胞浆不着色,分布于气道黏膜层、气道周围及肺泡。高倍镜下(×400)随机选取 5 个视野,计数凋亡及未凋亡嗜酸粒细胞数量,计算嗜酸粒细胞凋亡指数(凋亡嗜酸粒细胞占所有嗜酸粒细胞的百分比,AI),5 个视野均值作为该豚鼠代表值。以细胞膜、细胞浆着色呈棕黄色的细胞为 Fas 及 bcl-2 表达的面积积分光密度值(OD 值),以 5 个视野的均值作为该豚鼠的代表值。OD 值越大,表示 Fas 及 bcl-2 蛋白表达量越多。

1.3 统计学处理

各组实验数据用 SPSS 统计软件处理,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较进行 q 检验。以 $P<0.05$ 为对比组之间的差别有显著性意义,$P<0.01$ 为差别有非常显著性意义。

2 结 果

2.1 豚鼠肺组织病理学改变

HE 染色肺组织切片光镜可见生理盐水组支气管管腔光滑、上皮完整、气道黏膜无水肿,肺泡间隔正常,气道及血管周围有少量嗜酸粒细胞。哮喘组气道黏膜明显水肿,黏膜基底层增厚,杯状细胞增多,支气管管腔缩小,部分可见黏液栓,气道周围血管扩张充血,气道黏膜层、黏膜下层、血管周围组织、肺泡壁及肺泡腔内有大量炎性细胞浸润,以嗜酸粒细胞为主,嗜酸粒细胞核可见分叶和单核等形态,肺泡腔巨噬细胞也增多,肺泡隔增厚,肺泡腔呈过度充气状态(见图 1)。母牛分支杆菌菌苗组气道黏膜无明显水肿,管腔无缩小,气道黏膜有少量嗜酸粒细胞浸润,数量较哮喘组明显减少,肺泡间隔未见异常。

2.2 豚鼠 BALF 中白细胞总数及嗜酸粒细胞的比较

哮喘组豚鼠 BALF 中白细胞总数、嗜酸粒细胞及嗜酸粒细胞占白细胞总数百分比均显著高于生理盐水组(P 均<0.01);母牛分支杆菌菌苗组豚鼠 BALF 中该三项指标均显著低于哮喘组(P 均<0.01)。结果见表 1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 3 组豚鼠 BALF 中白细胞总数及嗜酸粒细胞的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	白细胞总数($\times 10^8$/L)	嗜酸粒细胞($\times 10^8$/L)	嗜酸粒细胞(%)
生理盐水组	2.04 ± 0.42	0	0
哮喘组	5.30 ± 0.92*	1.18 ± 0.36*	21.8 ± 3.0*
母牛分支杆菌苗组	3.26 ± 0.80▲	0.22 ± 0.12▲	6.3 ± 2.1▲

注:与生理盐水组比较,*$P<0.01$;与哮喘组比较,▲$P<0.01$

表 2 3 组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡指数、Fas 及 bcl-2 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	嗜酸粒细胞凋亡指数(%)	Fas 蛋白表达(OD 值)	bcl-2 蛋白表达(OD 值)
生理盐水组	13.4 ± 3.6	0.128 ± 0.037	0.092 ± 0.025
哮喘组	4.6 ± 0.7*	0.051 ± 0.025*	0.181 ± 0.041*
母牛分枝菌菌苗组	23.8 ± 5.4▲	0.202 ± 0.013▲	0.054 ± 0.032▲

注:与生理盐水组比较,*$P<0.01$;与哮喘组比较,▲$P<0.01$

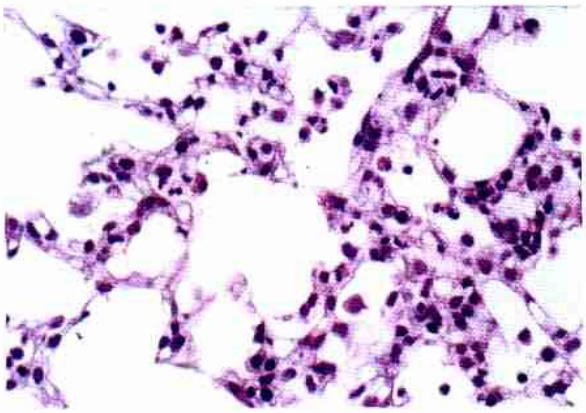


图 1 哮喘组豚鼠肺组织病理学改变(HE 染色 × 400)

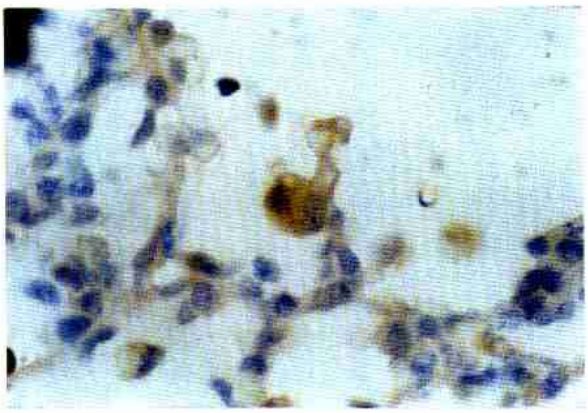


图 2 母牛分枝菌菌苗组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞 Fas 蛋白呈强阳性表达(免疫组化 × 1000)

2.3 3 组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞凋亡指数、Fas 及 bcl-2 蛋白表达的比较

3 组豚鼠肺组织均可见嗜酸粒细胞凋亡、Fas 蛋白及 bcl-2 蛋白表达(结果见表 2)。哮喘组豚鼠肺组织可见少量凋亡的嗜酸粒细胞,凋亡指数显著低于母牛分支杆菌菌苗组豚鼠($P<0.01$);母牛分支杆菌菌苗组豚鼠肺组织 Fas 蛋白为强阳性表达,主要表达细胞为嗜酸粒细胞(见图 2),表达量(OD 值)显著高于哮喘组豚鼠($P<0.01$);哮喘组豚鼠肺组织 bcl-2 蛋白为强阳性表达,主要表达细胞为嗜酸粒细胞(见图 3),表达量(OD 值)显著高于母牛分支杆菌菌苗组豚鼠($P<0.01$)。

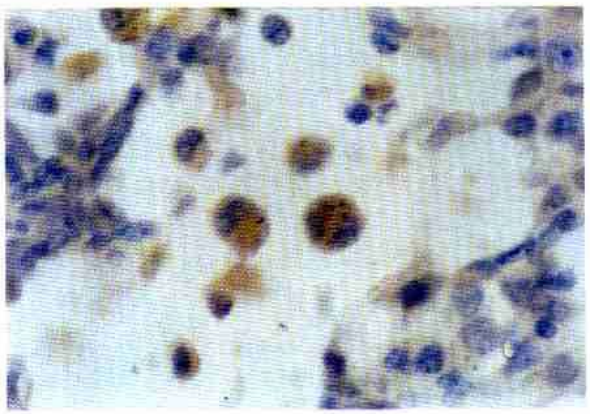


图 3 哮喘组豚鼠肺组织嗜酸粒组细胞 bcl-2 蛋白呈强阳性表达(免疫组化 × 1000)

3 讨 论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是生物体内存在的一种普遍现象,可以调节机体的细胞分化和更新、清除体内多余或衰老的细胞,对于维持体内的细胞的平衡和稳定具有重要作用,细胞凋亡后形成凋亡小体,被吞噬细胞吞噬,不引起炎症反应,而且有利于组织炎症的消退[7]。哮喘气道慢性炎症的发生、炎症细胞的清除以及为症的消退与嗜酸粒细胞凋亡密切相关。研究发现哮喘存在嗜酸粒细胞凋亡不足或延迟[3],嗜酸粒细胞凋亡受抑是肺组织嗜酸粒细胞浸润增加的一个生要原因[8]。Fas 抗原又称凋亡抗原、APO-1 或 CD95,是由 325 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子(TNF)/神经生长因子(NGF)受体超家族成员,具有很强的凋亡诱导作用[9],Fas 蛋白可在嗜酸粒细胞、中性粒细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞、淋巴细胞和单核细胞上表达[10]。bcl－2 基因是调节细胞凋亡基因家族中的基本成员，bcl－2 蛋白高表达可明显延长细胞的生存期[11]，能够抑制嗜酸粒细胞的凋亡。

实验结果显示：生理盐水组豚鼠组织有 Fas、bcl－2 蛋白适量表达及嗜酸粒细胞凋亡，也有少量嗜酸粒细胞浸润，说明该组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞适度凋亡是维持嗜酸粒细胞数量平衡的一种方式。哮喘组豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达及嗜酸粒细胞凋亡指数显著低于生理盐水组、而 bcl－2 蛋白表达显著高于生理盐水组，说明该组豚鼠肺组织由于 Fas 蛋白低表达及 bcl－2 蛋白高表达使嗜酸粒细胞凋亡受抑，OVA 激发后，引起肺组织大量嗜酸粒细胞浸润并释放许多炎症介质，从而造成肺组织严重哮喘炎症反应。母牛分枝杆菌菌苗组豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达及嗜酸粒细胞凋亡指数显著高于哮喘组、而 bcl－2 蛋白表达显著低于哮喘组，说明母牛分枝杆菌菌苗能够通过上调哮喘豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达、下调 bcl－2 蛋白表达从而诱导嗜酸粒细胞凋亡，造成该组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞数量显著低于哮喘组，嗜酸粒细胞释放的炎症介质也明显减少，因此肺组织哮喘炎症反应明显轻于哮喘组。

综上所述，母牛分枝杆菌菌苗通过上调哮喘豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达、下调 bcl－2 蛋白表达从而诱导哮喘豚鼠肺组织浸润的嗜酸粒细胞凋亡，使支气管肺泡灌洗液及肺组织中嗜酸粒细胞数量明显减少、肺组织哮喘炎症后应明显减轻，表明 OVA 致敏豚鼠前注母牛分枝杆菌菌苗对哮喘豚鼠模型的形成有一定的预防作用。

参 考 文 献

[1] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: Mechanisms and climical relevance in asthmatic and allergic inflammation [J]. Br J Haematol, 2000; 111(1): 61－67.

[2] Kankamranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, et al. Dlayed eosinophil apoptosis in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000; 106(1Pt1): 77－83.

[3] 罗英琳. 嗜酸粒细胞凋亡在哮喘中的作用[J]. 右江民族医学院学报, 2002; 24(3): 436－437.

[4] Rojas RE, Martinez JNE, Martinez ANE, et al. Apotosis in allergic diseade [J]. RevAllergy Mex, 2000; 47(4): 134－137.

[5] Zuany－Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al. Supprssion of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae－induced allergen－specific regulatioy T－cells [J]. Nature Medicine, 2002; 8(6): 625－629.

[6] 刘金保，钟南山，李树浓，等. PPD 对豚鼠实验性哮喘气道炎症的作用[J]. 免疫学杂志, 2002; 18(5): 350－352.

[7] Huges J, Liu Y, Van dame J, et al. Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36－independemt vitronection receptor/thrombospondin recognition wmchanism that is uncoupled from chemokine secretion [J]. J Immunol, 1997; 158(9): 4389－4397.

[8] 周林福，殷凯生. 三氧化二砷对哮喘豚鼠肺内哮酸性粒细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002; 22(4): 292－294.

[9] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. Science, 1995, 267(5203): 1449－1456.

[10] 胡晓光，李昌崇. 细胞因子对哮喘嗜酸性粒细胞凋亡的调控及药物的影响[J]. 浙江医学, 2002; 24(3): 187－189.

[11] 覃冬云，梁 标. 哮喘小鼠 T 细胞周期和 bcl－2 基因表达的变化[J]. 基础医学与临床, 2004; 24(2): 188－191.

(上接第 332 页)

[4] Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, et al. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin－like growth factor－Ⅱ on liver natural killer cell functions [J]. Hepatology, 1997; 25: 411－415.

[5] Tanigawa K, Sakaida Ⅰ, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases [J]. J Gastroenterol, 2000; 35: 112－119.

[6] 张 玲，宋晓英，刘 杞. 肝再生增强因子在抗－Thy1.1 肾炎大鼠肾组织中的表达及变化[J]. 中华肾脏病杂志, 2004; 20(2): 136－137.

[7] Danner S, Belasco JG. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA－binding proteins from cDNA libraries [J]. Proc Natl Acad USA, 2001; 98(23): 12954－12959.

[8] Petra W, Lechner M, Merschak P, et al. Molecular cloning of a novel lipocalin－1 interacting human cell membrane receptor using phage display [J]. J Biol Chem, 2001; 276(23): 20206－20212.

[9] 沈倍奋，主编. 分子文库[M]. 第 1 版，北京：科学出版社, 2001; 2.

[10] Santi E, Capone S, Mennuni C, et al. Bacteriophage lamda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics [J]. J Mol Biol, 2000; 296: 497－506.